

N° d'ordre : 40507



Thèse présentée à
l'Université des Sciences et Technologies de Lille
École Doctorale des Sciences pour l'Ingénieur
Spécialité Micro et Nanotechnologies, Acoustique et Télécommunication

BioMEMS pour l'analyse de cellules biologiques
par spectroscopie d'impédance

Thèse présentée et soutenue publiquement par

Timothée HOUSSIN

Le 23 Février 2011

Directeurs de thèse :

Monsieur Vincent SENEZ - Directeur de Recherche - IEMN - Lille

Monsieur Dimitri PAVLIDIS - Directeur de Recherche - IEMN - Lille

Membres du jury :

Madame Anne-Marie GUE - Directeur de Recherche - LAAS - Toulouse

Monsieur Mustapha NADI - Professeur - LIEN - Nancy

Monsieur Lionel BUCHAILLOT - Directeur de Recherche - IEMN- Lille

Monsieur Arnaud POTHIER - Chargé de Recherche - XLIM - Limoges

Membres invités du jury :

Monsieur Jérôme FOLLET- Maître de Conférences - ISA – Lille

Monsieur Dominique LEGRAND - Chargé de Recherche - UGSF- Lille

Remerciements

Je remercie Alain CAPPY, professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille (USTL) et ancien directeur de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) de m'avoir accueilli dans ce laboratoire de recherche.

Je remercie Lionel BUCHAILLOT, directeur de recherche au CNRS à l'IEMN et actuel directeur de l'IEMN de m'avoir accueilli dans ce laboratoire de recherche ainsi que dans son ancienne équipe NAM6. Je lui suis aussi extrêmement reconnaissant de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

J'exprime ma plus vive reconnaissance à Vincent SENEZ, directeur de recherche au CNRS à l'IEMN, pour m'avoir accueilli au sein de l'équipe BioMEMS et pour avoir dirigé mes travaux de thèse. Les nombreuses discussions scientifiques que nous avons eues et la façon avec laquelle il a guidé mes travaux m'ont montré une rigueur scientifique qui constitue certainement la meilleure expérience que doit acquérir un jeune chercheur. Il a été toujours présent pour répondre à mes questions et ses conseils, suggestions ou réponses m'ont permis de nombreuses fois de sortir « d'impasse scientifique ». Il m'a également soutenu de nombreuses fois à la mise en place des expériences présentées dans ce manuscrit, que ce soit de façon administrative ou matérielle. Lui-même sait que le contexte de notre jeune équipe de recherche n'a pas toujours facilité les choses. Pour tout ça un grand merci.

Je remercie également sincèrement Dimitri PAVLIDIS, notamment pour m'avoir guidé dans la recherche d'une bourse post-doctorale où son expérience fut alors précieuse.

Je suis très reconnaissant envers Anne-Marie GUE, directeur de recherche au CNRS au LAAS (à Toulouse) et Mustapha NADI, professeur à l'Université de Nancy pour l'honneur qu'ils me font en ayant accepté d'être rapporteur de cette thèse.

Je remercie vivement Arnaud POTHIER, chargé de recherche au CNRS au XLIM (à Limoges) pour l'expertise scientifique qu'il apporte en acceptant d'être membre du jury et examinateur de cette thèse.

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire de biotechnologies et des microorganismes de l'ISA qui m'ont accueilli et aidé lors des expériences d'analyse du parasite *C. Parvum*: Caroline DEWEER, Patrice HALAMA, Ourida HAMMOUMA, Ali SIAH, Anne FOLLET-DUMOULIN, Eduardo DEI-CAS (de l'Institut Pasteur de Lille) et particulièrement Jérôme FOLLET, sa gentillesse, sa pédagogie et sa passion ont agréablement accompagné les nombreuses heures de travail effectuées ensemble, (quand tu liras cela, la bière que je te dois ne devrait plus tarder !).

Je tiens à remercier l'ensemble de l'équipe du laboratoire de glycobiologie structurale et fonctionnelle biotechnologies qui m'ont accueilli et aidé lors des expériences d'analyse de l'interaction CHO-Lf: Marie-Estelle LOSFELD, Mathieu CARPENTIER, Joël MAZURIER, et particulièrement Dominique LEGRAND qui a effectué l'ensemble des cultures et des injections de cellules. Son professionnalisme, son habileté technique et son expérience resteront pour moi un apprentissage des plus enrichissants.

Je remercie sincèrement Gérard LEROY et Joël GEST du Laboratoire d'Etude des Matériaux et des Composants pour l'Electronique de Université du Littoral-Côte d'Opale (LEMCEL) pour leur motivation et leur collaboration.

Je remercie profondément les étudiants qui m'ont aidé à mener ces travaux de thèse : Jean FAIDERBE, Thibaut GUITTARD et Leo CHAN. Leurs aides précieuses et leur motivation ont permis de réaliser de nombreux travaux présentés dans ce manuscrit.

Je suis très reconnaissant envers Jean-Pierre SOZANSKI et Romain JOORIS du département IEMN Transfert pour avoir contribué à la conception, à la réalisation et à la maintenance du circuit relais présenté dans ce manuscrit.

Je remercie mes collègues de bureau et amis qui m'ont supporté (au bon sens comme au péjoratif) ces années de thèse : Thomas DARGENT, Roger RINGOT, Chang WU et un remerciement particulier pour Damien DEBUISSON dont le soutien moral, la bonne humeur, l'humour et la philosophie m'ont fait regretter la rédaction à domicile.

Je remercie mes collègues de l'équipe BioMEMS et quelques uns de ses voisins proches: Vincent THOMY, Philippe COQUET, Philippe BRUNET, Fharzam ZOUESHTIAGH, Farida BENDRIAA, Maxime HARNOIS, Corinne JAMROZ, Thi Phuong Nhung NGUYEN, Magalie DEVILLE, Guillaume PERRY et Renaud DUFOUR. Je remercie

particulièrement François BRUNELLE, Florian LAPIERRE et Romuald LEJARD pour leur amitié, leur disponibilité et leurs judicieux conseils (humains autant que scientifiques et techniques). Eux aussi m'ont fait regretter le travail à l'IEMN.

Ce travail n'aurait pu être mené sans la collaboration des techniciens et ingénieurs de la centrale de technologie et de caractérisation de l'IEMN ainsi que ceux et du bâtiment P3. Je les remercie pour leur savoir technique, leurs judicieux conseils et leur sympathie.

Je remercie sincèrement l'ensemble du personnel administratif, du service de D.A.O., de l'accueil, des services communs et de l'infrastructure de l'IEMN pour leur disponibilité et leur aide précieuse.

Je remercie sincèrement toutes les personnes travaillant à l'IEMN avec lesquelles j'ai eu l'occasion de discuter ou que j'ai questionné au sujet des travaux de cette thèse en salle blanche, au troisième étage, à la cafétéria. Ces personnes ont, parfois sans le savoir, contribué à ces travaux de recherche. Au-delà de l'aspect technique, je les remercie aussi pour leurs qualités humaines qui ont rendu plus agréable les nombreuses heures passées au laboratoire.

Je remercie également ma famille qui a toujours été à mes côtés et m'a continuellement poussé vers l'avant, même dans les moments les plus difficiles.

Je remercie tous mes amis qui m'ont soutenu et encouragé pendant ces années de thèse. Je n'aurais pas pu mener ces travaux sans leur précieuse amitié.

Enfin une pensée pour Maité qui a partagé ma vie pendant la rédaction d'une grande partie de ce manuscrit. Elle sait mieux que quiconque le temps consacré à la présentation de ces travaux et l'a accepté avec compréhension et patience. Pour cela et pour tout le reste qui ne peut être maladroitement résumé en quelques mots ici, merci.

MERCI A VOUS TOUS !

Table des matières

Remerciements	4
Table des matières	7
Liste des figures	14
Liste des tableaux	21
Liste des équations	22
Abréviations	27
Notation Mathématique	29
Lexique	32
<u>Préambule</u>	40
Références du Préambule	47
<u>Chapitre 1 : Travaux majeurs et état de l'art des bioMEMS pour l'analyse cellulaire</u>	50
Résumé du chapitre 1	51
I. Développement de l'électrophysiologie et des outils actuels de la biologie cellulaire.....	52
I.1. Les premiers liens entre l'électronique et la biologie : l'électrophysiologie.....	52
I.2. Développement de la biologie cellulaire et de ses techniques d'analyse	52
I.2.1. Développement de la biologie cellulaire, de la biochimie et de la biologie moléculaire.....	52
I.2.2. Les principales techniques de marquage.....	53
I.2.3. Limitations des techniques de marquage actuelles	55
I.2.4. Nouvelles techniques d'analyse cellulaire	56
I.3. Les travaux d'électrophysiologie moderne à l'origine des biocapteurs électriques intégrés.....	58
I.3.1. Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des cellules biologiques.....	58
I.3.2. Outils importants de l'électrophysiologie moderne	61
II. De la microélectronique à la microfluidique.....	63
II.1. Du premier transistor au premier composant microfluidique.....	63
II.2. Développement rapide de la microfluidique	64
III. Les nouvelles technologies développées pour la microfluidique.....	67
IV. Travaux majeurs de l'analyse cellulaire par techniques électriques intégrées.....	70
V. Atouts des bioMEMS et améliorations envisageables	77
V.1. Points forts.....	79

V.1.1.	Différentes techniques de mesures électriques.....	79
V.1.2.	Intégration aisée	81
V.1.2.1.	Pour les laboratoires sur puces	81
V.1.2.2.	Pour les analyses parallèles, statistiques et multiplexées	84
V.1.3.	Résolution spatiale facilement modulable.....	87
V.1.3.1.	A l'échelle micrométrique : étude de cellules uniques.....	87
V.1.3.1.	A l'échelle nanométrique.....	89
V.1.4.	Diversité des cellules analysables par technique électrique.....	91
V.2.	Points faibles et améliorations envisageables.....	94
V.2.1.	Problèmes liés à la reproductivité des mesures électrochimiques.....	94
V.2.2.	Des dispositifs dont le coût peut encore être réduit	96
V.2.3.	Instrumentation macroscopique.....	99
Conclusion du chapitre 1.....		103
Références du chapitre 1.....		105
<u>Chapitre 2: Conception, réalisation des bioMEMS et notions théoriques</u>		118
Résumé du chapitre 2.....		119
I.	Conception du composant	120
I.1.	Choix des matériaux	120
I.1.1.	Substrat	120
I.1.2.	Electrodes.....	121
I.1.3.	Réservoir des cellules biologiques.....	122
I.2.	Géométrie des dispositifs.....	122
I.2.1.	Dispositif avec puits.....	122
I.2.1.1.	Géométries des électrodes	123
I.2.1.2.	Géométries des puits	128
I.2.2.	Dispositif avec micro-canaux.....	128
I.2.2.1.	Géométries des électrodes.....	128
I.2.2.2.	Géométries des micro-canaux	129
I.2.2.3.	Choix des capillaires d'accès	131
II.	Procédé technologique	132
II.1.	Fabrication des électrodes	132
II.1.1.	Procédé de fabrication.....	132
II.1.2.	Problème liés aux réseaux d'électrodes court-circuités	133

II.2.	Fabrication des puits et des micro-canaux.....	135
II.2.1.	Dispositif avec puits	135
II.2.1.1.	Préparation des puits.....	135
II.2.1.2.	Fixation des puits.....	135
II.2.1.3.	Diamètre des puits	136
II.2.2.	Dispositif avec micro-canaux.....	137
II.2.2.1.	Lithographie du moule.....	137
II.2.2.2.	Gravure et préparation du moule	138
II.2.2.3.	Préparation et fixation des canaux.....	139
II.3.	Connexion des micro-dispositifs au matériel de mesure	141
II.3.1.	Conception et réalisation des différents circuits imprimés	141
II.3.1.1.	Choix du type de connexion des dispositifs aux appareils de mesures	141
II.3.1.2.	Réalisation des circuits imprimés	141
II.3.2.	Connexion des dispositifs aux circuits imprimés.....	143
II.3.3.	Connectiques	144
II.3.4.	Circuit de multiplexage des mesures.....	145
III.	Utilisation et interfaces de mesure des analyseurs d'impédance	147
III.1.	Différents types d'analyse linéaire.....	147
III.1.1.	Mesure fréquentielle	147
III.1.2.	Mesure cinétique à fréquence fixe.....	148
III.2.	Enregistrement et traitement des données.....	149
III.2.1.	Enregistrement automatique des données.....	149
III.2.2.	Traitement des données	151
III.2.2.1.	Comparaison des mesures fréquentielles	151
III.2.2.2.	Analyse cinétique des spectres d'impédance	151
IV.	Notions théoriques.....	153
IV.1.	Impédance électrochimique.....	153
IV.2.	Permittivité complexe et conductivité.....	156
IV.3.	Constante de cellule	157
IV.4.	Relaxation de Debye	160
IV.4.1.	Modèle du 1 ^{er} ordre.....	160
IV.4.2.	Modèle du 2 nd ordre	162
IV.4.3.	Modèle de Cole-Cole.....	164
IV.5.	Resistance hydrodynamique.....	165
V.	Calcul des différentes constantes de cellule	166
V.1.	Calcul des différentes constantes de cellule du dispositif à puits.....	168
V.2.	Calcul des différentes constantes de cellule du dispositif microfluidique	172

Conclusion du chapitre 2	174
Références du chapitre 2	176
<u>Chapitre 3: Caractérisation des dispositifs et modélisation</u>	180
Résumé du chapitre 3	181
I. Premières mesures et modélisation	182
I.1. Mesure d'impédance de l'eau déionisée	182
I.2. Modélisation	183
I.3. Discussion sur la modélisation des impédances électrochimiques avec un circuit équivalent	186
I.4. Influence des paramètres du circuit électrique équivalent sur les spectres d'impédance	190
I.5. Limitations des mesures d'impédance en hautes fréquences.....	192
II. Caractérisation du dispositif à puits	194
II.1. Mesure des différents milieux et analyse des différentes géométries.....	194
II.1.1. Mesure de l'impédance à vide.....	195
II.1.2. Mesure de l'impédance de l'eau déionisée	198
II.1.3. Détermination des propriétés électriques de l'eau DI par impédancemétrie....	203
II.1.3.1. Etude avec un circuit électrique équivalent	203
II.1.3.1.1. Modélisation avec un circuit électrique équivalent	203
II.1.3.1.2. Détermination des propriétés électriques à partir des composants du circuit électrique équivalent.....	207
II.1.3.2. Modélisation avec la relaxation de Debye et de Cole-Cole.....	209
II.1.3.2.1. Analyse avec le modèle de Debye au 1 ^{er} ordre.....	209
II.1.3.2.2. Analyse avec le modèle de Debye au 2 nd ordre	212
II.1.3.2.3. Analyse avec le modèle de Cole-Cole	214
II.1.4. Mesure de l'impédance de milieu cellulaire	217
II.2. Influence du volume de liquide.....	221
II.3. Effet de la tension d'excitation	223
III. Caractérisation du dispositif à microcanaux.....	226
III.1. Mesure de l'impédance à vide	226
III.2. Mesure de l'impédance de l'eau déionisée	228
III.3. Détermination des propriétés électriques de l'eau déionisée	230
III.3.1. Etude avec un circuit équivalent	230
III.3.1.1. Modélisation avec un circuit équivalent.....	230
III.3.1.2. Détermination des paramètres électriques à partir du circuit électrique équivalent.....	233

III.3.2. Modélisation avec la relaxation de Debye et de Cole-Cole	233
III.3.2.1.1. Analyse du modèle de Debye au 1 ^{er} ordre	234
III.3.2.1.2. Analyse du modèle de Debye au 2 nd ordre.....	235
III.3.2.1.3. Analyse du modèle de Cole-Cole.....	236
III.4. Mesure de l'impédance de milieu cellulaire	237
Conclusion du chapitre 3	239
Références du chapitre 3	242

Chapitre 4: BioMEMS pour l'analyse du parasite *C. parvum* par impédancemétrie.....246

Résumé du chapitre 4	247
I. <i>Cryptosporidium parvum</i> : un problème de santé publique	248
I.1. Problème mondial d'accès à l'eau potable	248
I.2. Infection due au parasite <i>Cryptosporidium parvum</i>	249
I.3. Méthodes de détection actuelles du parasite <i>C. parvum</i>	250
I.4. Méthodes innovantes et émergentes de détection.....	252
II. Mise en place d'un protocole de mesure et de préparation des oocystes	254
II.1. Stabilité des mesures	254
II.2. Régénération du dispositif	256
II.3. Préparation des suspensions de <i>C. parvum</i>	258
II.4. Protocole final de préparation des parasites et de leur analyse électrochimique.....	263
III. Effet du milieu de suspension	265
IV. Détermination de la concentration en <i>C. parvum</i>	269
IV.1. Gamme de concentrations de <i>C. parvum</i>	269
IV.2. Explication physique des modifications de conductivité.....	272
IV.3. Détermination précise de la concentration en oocystes	273
IV.4. Application de la technique d'impédancemétrie à la méthode 1622 de détection des parasites et perspectives	275
V. Détermination de la viabilité des <i>C. parvum</i>	277
V.1. Moyens actuels	277
V.2. Protocole de préparation des parasites pour les tests de viabilité.....	278
V.3. Discrimination de la viabilité par impédancemétrie.....	280
V.3.1. Application de faibles tensions	280
V.3.2. Explication biologique	281
V.3.3. Application de tensions élevées	281
Conclusion du chapitre 4	286

Références du chapitre 4	287
---------------------------------------	-----

Chapitre 5: BioMEMS pour l'étude de l'interaction cellule-protéine par impédancemétrie.....290

Résumé du chapitre 5	291
-----------------------------------	-----

I. Enjeux et intérêts de l'analyse cellulaire in-vitro par techniques interdisciplinaires.	292
I.1. Outils actuels pour l'analyse de l'interaction cellule protéine.	292
I.2. Modèle biologique d'étude.....	295
I.2.1. Choix de la protéine.....	295
I.2.2. Choix de la cellule d'étude.....	296
II. Etude de l'interaction CHO-Lf avec les dispositifs à puits.	298
II.1. Culture cellulaire.....	299
II.1.1. Etude des conditions de culture cellulaire spécifiques aux bioMEMS.....	299
II.1.1.1. Influence du substrat de culture.....	299
II.1.1.2. Validation de l'incubateur de culture.....	299
II.1.1.3. Effet des mesures électriques.....	301
II.1.2. Protocole de préparation des cellules.....	302
II.1.2.1. Premier protocole de préparation des cellules.....	302
II.1.2.2. Variation du nombre de cellules injectées dans les puits.....	303
II.1.2.3. Influence du protocole de préparation des cellules sur les mesures d'impédance électrochimique.....	305
II.1.3. Comparaison des différentes géométries d'électrodes.....	309
II.1.4. Amélioration du protocole de mesure d'impédance.....	314
II.1.4.1. Suivi continu.....	314
II.1.4.2. Mesure en parallèle.....	314
II.2. Mise en place d'un protocole d'étude de l'interaction des cellules CHO avec la lactoferrine.....	317
II.2.1. Influence du changement de milieu cellulaire.....	317
II.2.1.1. Analyse à fréquence fixe.....	318
II.2.1.2. Analyse fréquentielle.....	319
II.2.1.3. Discussion et interprétation électrochimique.....	320
II.2.2. Influence de la densité cellulaire initiale.....	322
II.3. Modélisation.....	324
II.4. Interaction des cellules CHO avec la lactoferrine.....	329
II.4.1. Etude de l'interaction CHO-Lf sans protéine témoin.....	330
II.4.1.1. Etude fréquentielle sur un tapis cellulaire à confluence.....	330

II.4.1.2.	Analyse à fréquence fixe sur un tapis cellulaire non confluent.....	332
II.4.2.	Etude de l'interaction CHO-Lf avec une protéine témoin.....	333
II.4.2.1.	Analyse fréquentielle.....	334
II.4.2.2.	Analyse à fréquence fixe.....	335
II.4.3.	Discussion et interprétation électrochimique.....	337
III.	Etude de l'interaction CHO-Lf avec les dispositifs microfluidiques.....	339
III.1.	Matériel de mesure pour la microfluidique.....	339
III.2.	Croissance cellulaire.....	341
III.2.1.	Protocole de culture.....	341
III.2.1.1.	Protocole de stérilisation et de préparation du dispositif.....	341
III.2.1.2.	Protocole d'injection des cellules.....	342
III.2.1.3.	Discussion sur les méthodes d'injection des cellules dans les microcanaux ..	347
III.2.1.4.	Protocole de culture des cellules dans les microcanaux et suivi de leur culture par impédancemétrie.....	347
III.2.2.	Suivi de la culture cellulaire dans des microcanaux par impédancemétrie.....	348
III.2.2.1.	Comparaison quantitative des cultures.....	348
III.2.2.2.	Suivi cinétique de la résistance des CHO cultivées dans les microcanaux.....	349
III.2.2.3.	Modélisation de la résistance des CHO cultivées dans les microcanaux.....	352
III.3.	Etude de l'interaction avec la Lf.....	354
III.3.1.	Détermination du débit d'injection maximum des réactifs.....	354
III.3.2.	Minimisation du volume mort.....	355
III.3.3.	1 ^{er} Protocole d'injection de la Lf et ses résultats.....	356
III.3.4.	2 ^{ème} protocole d'injection de la Lf et ses résultats.....	360
III.3.5.	Injection d'un nouveau milieu.....	362
	Conclusion du chapitre 5.....	365
	Références du chapitre 5.....	367
	 Conclusion générale : applications et perspectives.....	 372
	Références de la conclusion.....	378
	 Annexes.....	 379
	Annexe 1.....	380
	Annexe 2.....	381
	Annexe 3.....	382
	Annexe 4.....	383
	 Résumé.....	 4^{ème} de couverture

Liste des figures

Figure 1- 1 : Schéma explicatif de l'immunomarquage.	54
Figure 1- 2 : Représentation 3D de la protéine fluorescente verte. (1-10).....	54
Figure 1- 3 : Boîtes Quantiques de CdSe classées selon leur taille (1-19).....	56
Figure 1- 4 : Système développé par Fricke pour la mesure de conductivité du sang. (1-23)	58
Figure 1- 5 : Photographie des électrodes utilisées par Hodgkin et Huxley à l'intérieur de l'axone d'un calmar et la mesure résultante de l'un de ses potentiels d'action. (1-28).....	59
Figure 1- 6: Spectre « idéalisé » de la permittivité diélectrique de suspensions cellulaires et de tissus (1-30).	60
Figure 1- 7 : Photo d'une chambre Ussing. (1-34).....	61
Figure 1- 8 : Observation microscopique d'une cellule prise en patch clamp (configuration cellule attachée) et schéma des différentes configurations de patch clamp. (1-35)	62
Figure 1- 9 : Exemple de puce à ADN développée par Chipscreen Biosciences (1-42)	65
Figure 1- 10 : Exemple de laboratoire sur puce développé par Quake intégrant en parallèle 256 chambres de réactions à l'aide de 2056 valves (1-49).	66
Figure 1- 11 : Schéma des différentes techniques de réplification de micro-motifs présentées par Xia et Whitesides (1-51).	68
Figure 1- 12 : Dispositif développé par Thomas, a : Photo du microdispositif complet, b : zoom sur les électrodes, c : schéma en coupe des électrodes et de ses interconnexions (1-55).....	70
Figure 1- 13 : Schéma en coupe du transistor développé par Fromhertz ; (A) photo d'une cellule de Retz coincée au dessus de la jonction source/drain, (B) photo vue du dessus de la jonction source/drain, (C) photo en coupe du transistor (1-60).	72
Figure 1- 14 : Schéma du microdispositif et de l'interface de mesure utilisé par Giaever et Keese. (1-63).....	73
Figure 1- 15 : Photos de la matrice de microélectrodes et du circuit d'impédancemétrie réalisés par Borkholder. (1-84).	75
Figure 1- 16 : Photo du cytomètre électrique développé par Gawad et Renaud (1-89). (1-86).....	76
Figure 1- 17 : Schéma des cellules de mesure ampérométriques réalisés par Popovtzer et al. (1-99).	80
Figure 1- 18 : A : Photo du système embarqué développé par Curtis et al pour l'analyse de l'eau par test sur cellules (1-103). B : Photo du laboratoire sur puce conçu par Motorola pour l'analyse d'ADN et D : Son schéma fonctionnel (1-101). C : BioMEMS jetable élaboré par l'équipe de Han pour l'analyse de la composition du sang. (1-102).	83
Figure 1- 19 : A: Photo du dispositif développé par Ceriotti et al. intégrant des réseaux de microélectrodes interdigitées dans une plaque 96 puits. (1-104) B: Cinétique des courants obtenus simultanément sur les 16 puits du dispositif de Elsholz et al. (1-105) C: Photo du réseau d'électrodes développé par Wang et al. . (1-100).....	86
Figure 1- 20 : A: Image microscopique des cellules capturées par le système de Hua et Penell. B: Modification de la résistance de ce système pendant la capture des cellules. (1-102) C: Schéma du système développé par l'équipe de Frazier. (1-107).....	88

Figure 1- 21 : A: Photo du réseau de transistors à effets de champs à nanofils développé par l'équipe de Lieber. (1-114) B: Représentation schématique d'un transistor à effet de champs à nanotube fonctionnalisé avec des anticorps et des aptamères comme réalisé par Maehashi et al. (1-115).....	90
Figure 1- 22 : A: Photo de levure (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>) cultivées sur une électrode de travail ronde en or (1-123). B: Photo de fibroblastes embryonnaires murins cultivés sur des électrodes rondes planaires (1-129). C : Photo d'un biofilm fongique cultivé sur une électrode de platine passivée (1-130). D : Axone d'un neurone cultivé dans un microcanal en PDMS (1-127). E : Bactéries d' <i>E. Coli</i> déposées entre deux électrodes d'or (1-131).	92
Figure 1- 23 : Différences observées entre des spectres d'impédance de cellules chromaffines bovines avec différents canaux ioniques bloqués (1-107). Résultats moyennés à partir de sept expériences réalisées par l'équipe de Frazier. Les écarts types ne sont pas indiqués.....	95
Figure 1- 24 : Dispositif microfluidique en papier développé par l'équipe de Whitesides.....	96
Figure 1- 25 : Différentes configurations de déplacements EWOD réalisés avec le dispositif conçu par Abdelgawad et Wheeler sur substrat souple. (1-147)	98
Figure 1- 26 : A: Schéma de la manipulation conçue par l'équipe de Kim (1-150).	100
Figure 1- 27 : Schéma de la manipulation réalisée par Odijk et al.. (1-151)	101
Figure 1- 28 : Schéma de la manipulation développée par Lin et al.. (1-152).....	102
Figure 2- 1 : Photo du dispositif sans les réservoirs en PDMS. Les quatre zones encadrées correspondent aux quatre géométries d'électrodes.	123
Figure 2- 2 : Schéma du dispositif à puits avec les différentes électrodes indiquées.....	124
Figure 2- 3 : Photo MEB de la 1 ^{ère} géométrie d'électrode (Géométrie 1).	125
Figure 2- 4 : Photo MEB de la 2 ^{ème} géométrie d'électrode (Géométrie 2).....	125
Figure 2- 5 : Photo MEB de la 3 ^{ème} géométrie d'électrode (Géométrie 3).....	126
Figure 2- 6 : Schéma issu du fichier informatique du masque du 3 ^{ème} motif.....	126
Figure 2- 7 : Photo MEB de la 4 ^{ème} géométrie d'électrode (Géométrie 4).....	127
Figure 2- 8 : Schéma issu du fichier informatique du masque du 4 ^{ème} motif.....	127
Figure 2- 9 : Photo du dispositif sans les canaux en PDMS. Un des réseaux est encadré.	128
Figure 2- 10 : Photo prise au microscope d'un réseau de micro-électrodes.	129
Figure 2- 11 : Schéma des différentes configurations possibles pour la réalisation du canal en PDMS. A : Canal avec un rapport 1/10 entre la hauteur et la largeur. B : Canal avec un rapport 1/4 entre la hauteur et la largeur. C : Canal avec un rapport 1/10 entre la hauteur et la largeur et une épaisseur de PDMS plus importante.	130
Figure 2- 12 : Etapes technologiques de fabrication des électrodes.	133
Figure 2- 13 : A : Photo MEB d'électrodes court-circuitées. B : Photo MEB de l'évaporation du métal sur la même électrode à une zone décalée et plus fragile que le court-circuit.	134
Figure 2- 14 : Schéma en coupe du dispositif à puits.....	136
Figure 2- 15 : Magnitude de l'impédance d'eau déionisée mesurée avec les électrodes de 120 µm et différents diamètres de puits en PDMS à diverses positions.....	136
Figure 2- 16 : A et B : Fixation correcte et décalée des puits de 8mm de diamètre sur les réseaux d'électrodes (respectivement). C : Différentes configurations possibles de fixation des puits de 6mm de diamètre sur les réseaux d'électrodes.	137
Figure 2- 17 : Photo du moule en silicium servant à réaliser les microcanaux en PDMS avec la zone contenant les marches au milieu..	139

Figure 2- 18 : Schéma en coupe du dispositif à micro-canaux.....	139
Figure 2- 19 : Image MEB d'un canal fixé aux électrodes et sectionné.....	140
Figure 2- 20 : Photo du micro-dispositif à puits monté sur son circuit imprimé.....	142
Figure 2- 21 : Photo du micro-dispositif à micro-canaux sur son circuit imprimé. Des colorants bleu et rouge ont été injectés dans les micro-canaux et les capillaires d'accès sont connectés.....	143
Figure 2- 22 : Diagramme de connexion du montage expérimental pour réaliser des mesures sur un unique puits. Un ordinateur portable est branché sur l'impédancemètre pour gérer automatiquement son utilisation et le rapatriement des données.....	145
Figure 2- 23 : Diagramme de connexion du montage expérimental permettant d'invertir automatiquement le puits d'étude.....	146
Figure 2- 24 : Capture d'écran de l'application Labview développée pour paramétrer, lancer les mesures et rapatrier leurs données.....	150
Figure 2- 25 : Capture d'écran de l'application Matlab développée pour analyser cinétiquement les données issues des spectres d'impédance.....	152
Figure 2- 26 : Circuit électrique d'une impédance complexe sous sa forme série.....	155
Figure 2- 27 : Représentation graphique d'une impédance complexe dans le plan complexe. (2-14).....	155
Figure 2- 28 : Circuit électrique équivalent à un matériau diélectrique non idéal.....	157
Figure 2- 29 : Circuit électrique équivalent au modèle de relaxation.....	161
Figure 2- 30 : Evolutions fréquentielles de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative selon l'équation du modèle de relaxation de Debye au premier ordre. Adapté de (2-15). ..	162
Figure 2- 31 : Schéma des réseaux circulaires d'électrodes interdigitées. Les encarts présentent les calculs permettant de déterminer la distance entre une électrode et le centre du réseau.....	170
Figure 2- 32 : Schéma du réseau d'électrodes interdigitées des dispositifs à micro-canaux.....	173
Figure 3- 1 : Exemple d'une mesure de l'impédance d'eau DI avec le dispositif à puits et les électrodes de 4 μm droites (Géométrie 2).....	182
Figure 3- 2 : Schéma du modèle de circuit électrique équivalent utilisé pour l'analyse des mesures expérimentales, adapté de (3-1).....	183
Figure 3- 3 : Schéma du circuit électrique équivalent utilisé pour modéliser les spectres d'impédance expérimentaux.....	185
Figure 3- 4 : Circuit électrique équivalent utilisé par Olthuis (3-10).....	187
Figure 3- 5 : Schéma d'un spectre d'impédance divisé selon ses différents comportements fréquentiels. Les composants du circuit de modélisation associés à ces comportements fréquentiels sont indiqués. Adapté de (3-3).....	190
Figure 3- 6 : Mesure de l'impédance d'eau DI effectuée jusqu'à 10 MHz avec le dispositif à micropuits et ses électrodes micrométriques droites (Géométrie 2).....	192
Figure 3- 7 : Schéma du circuit électrique équivalent utilisé pour modéliser les spectres d'impédance expérimentaux avec les interconnexions des dispositifs.....	193
Figure 3- 8 : Mesures moyennées de l'impédance électrochimique à vide des différentes géométries d'électrode des dispositifs à puits.....	195
Figure 3- 9 : Mesures moyennées de l'amplitude des impédances d'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits.....	198

Figure 3- 10 : Mesures moyennées de la phase des impédances d'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits.	199
Figure 3- 11 : Evolutions fréquentielles de la conductivité électrique d'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits et modélisations avec le circuit électrique équivalent.....	204
Figure 3- 12 : Evolutions fréquentielles de la permittivité diélectrique d'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits et modélisations avec le circuit électrique équivalent.....	204
Figure 3- 13 : Comparaison du circuit électrique équivalent utilisé pour les modélisations des impédances (A) et du circuit électrique équivalent issu du modèle de Debye au 1 ^{er} ordre (B).	208
Figure 3- 14 : Mesures moyennées de l'évolution fréquentielle de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique de l'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits. Modélisations effectuées avec le modèle de Debye au 1 ^{er} ordre.	210
Figure 3- 15 : Mesures moyennées de l'évolution fréquentielle de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique de l'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits. Modélisations effectuées avec le modèle de Debye au 2 nd ordre.....	212
Figure 3- 16 : Mesures moyennées de l'évolution fréquentielle de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique de l'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits. Modélisations effectuées avec le modèle de Cole-Cole.	215
Figure 3- 17 : Mesures moyennées de l'impédance électrochimique du milieu F12-K mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits.....	217
Figure 3- 18 : Circuit équivalent utilisé pour modéliser l'impédance du milieu cellulaire.....	218
Figure 3- 19 : Mesures moyennées de l'impédance de différents volumes d'eau DI obtenues avec le dispositif à puits et ses électrodes sub-millimétriques rondes à une tension de 10mV.....	221
Figure 3- 20 : Mesure de l'évaporation d'une goutte d'eau DI par impédancemétrie avec le dispositif à puits et des électrodes sub-millimétriques rondes.....	222
Figure 3- 21 : Mesures moyennées de l'impédance de 80 μ l d'eau DI obtenues avec le dispositif à puits et ses électrodes sub-millimétriques rondes (Géométrie 4) pour des tensions de 10, 140 et 500 mV.	223
Figure 3- 22 : Exemple de court circuit provoqué par l'application de trop grandes tensions. Mesure effectuée sur 80 μ l d'eau DI avec le dispositif à puits et ses électrodes sub-millimétriques rondes à différentes tensions.....	224
Figure 3- 23 : Exemple de mesure à vide effectuée avec des tensions d'excitation de 10 et 500 mV avec le dispositif à puits et ses électrodes sub-millimétriques rondes.....	225
Figure 3- 24 : Mesures moyennées de l'impédance obtenue à vide avec le dispositif microfluidique	227
Figure 3- 25 : Mesures moyennées de l'impédance d'eau DI obtenues avec le dispositif microfluidique.	228
Figure 3- 26 : Evolutions fréquentielles de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique d'eau ionisée obtenues avec le dispositif microfluidique. Résultats présentés avec la modélisation issue du circuit équivalent électrique.	231
Figure 3- 27 : Evolutions fréquentielles de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique d'eau ionisée obtenues avec le dispositif microfluidique. Résultats présentés avec le modèle de relaxation de Debye au 1 ^{er} et au 2 nd ordre et le modèle de Cole-Cole.	234

Figure 3- 28 : Mesures moyennées de l'impédance de milieu de culture des cellules CHO obtenues avec le dispositif microfluidique.....	237
Figure 4- 1 : Illustration d'oocystes de <i>C. parvum</i> libérant leurs sporozoïtes dans l'intestin.	250
Figure 4- 2 : Schéma de la procédure actuelle de détection des parasites <i>C. parvum</i> ,	251
Figure 4- 3 : Evolution temporelle de la partie réelle de l'impédance à une fréquence de 10 KHz lors de l'injection de <i>C. parvum</i> suspendus dans de l' H ₂ O ppi avec un dispositif recouvert ou non de Parafilm. La concentration de parasites est de 10 oocystes/ μ l.	255
Figure 4- 4 : Impédances d' H ₂ O ppi avant et après l'injection de <i>C. parvum</i> suspendus à 200 oocystes/ μ l mesurées avec les électrodes micrométriques rondes.	256
Figure 4- 5 : Impédances d' H ₂ O ppi avant et après l'utilisation d'Elma Clean	257
Figure 4- 6 : Impédances d' H ₂ O ppi et de parasites suspendus dans de l' H ₂ O ppi à une concentration de 10 oocystes/ μ l mesurées successivement dans le même puits avec un pipetage intermédiaire à l'H ₂ O ppi. Mesures effectuées avec les électrodes millimétriques droites.....	258
Figure 4- 7 Impédances d' H ₂ O ppi et de deux suspensions différentes de parasites à une concentration de 500 oocystes/ μ l mesurées. Mesures effectuées avec les électrodes micrométriques droites.	259
Figure 4- 8 : Schéma du protocole de préparation des suspensions de parasites.....	260
Figure 4- 9 : Impédances d' H ₂ O ppi et de différentes dilutions de PBS dans de l' H ₂ O ppi. Mesures effectuées avec les électrodes micrométriques droites.	261
Figure 4- 10 : Impédances d' H ₂ O ppi et des surnageants issus des centrifugations successives d'une même préparation de suspensions de parasites. Mesures effectuées avec les électrodes submillimétriques rondes.....	262
Figure 4- 11 : Schéma présentant le protocole de préparation des suspensions de <i>C. parvum</i> dans de l'H ₂ O ppi. La dernière étape correspond à la préparation des gammes de concentrations.....	264
Figure 4- 12 : Photo des <i>C. parvum</i> marqués par fluorescence	265
Figure 4- 13 : Spectres d'impédance d' H ₂ O ppi et d'une suspension	266
Figure 4- 14 : Spectres d'impédance de PBS et d'une suspension de parasites à une concentration de 1000 oocystes/ μ l.	267
Figure 4- 15 : Amplitude des impédances de suspensions de <i>C. parvum</i> dans de l'H ₂ O ppi à des concentrations allant de 100 à 1000 oocystes/ μ l.	270
Figure 4- 16 : Phase des impédances de suspensions de <i>C. parvum</i> dans de l'H ₂ O ppi à des concentrations allant de 100 à 1000 oocystes/ μ l.	270
Figure 4- 17 : Conductivité de suspensions de <i>C. parvum</i> dans de l'H ₂ O ppi à des	274
Figure 4- 19 : Photo prise au microscope d'oocystes ayant subi le traitement de désenkystement. L'oocyste plein comprend des sporozoïtes morts. Le vide est un oocyste « fantôme » dont les sporozoïtes ont réagi aux acides et sont sortis.	277
Figure 4- 20 : Schéma présentant le protocole de préparation des suspensions de <i>C. parvum</i> dans de l'H ₂ O ppi pour les tests de viabilité.	279
Figure 4- 21 : Spectre d'impédance de suspensions de <i>C. parvum</i> vivants (70% de viabilité) et morts (0% de viabilité) dans de l'H ₂ O ppi à 1000 oocystes/ μ l avec une tension d'excitation de 10mV.....	280
Figure 4- 22 : Spectre d'impédance de suspensions de <i>C. parvum</i> vivants (64% de viabilité) et morts (0% de viabilité) dans de l'H ₂ O ppi à 1000 oocystes/ μ l avec une tension d'excitation de 450mV.....	282

Figure 5- 1 : Représentation schématique des interactions moléculaire de la Lf	297
Figure 5- 2 : Photo de l'incubateur de culture des CHO dédié aux manipulations d'impédancemétrie.	300
Figure 5- 3 : Photo prise au microscope confocal à fluorescence des cultures de CHO fait dans les deux types d'incubateur.....	301
Figure 5- 4 : Photo prise au microscope confocal à fluorescence des cultures de CHO avec ou sans mesures électriques	302
Figure 5- 5 : Schéma du protocole de préparation des suspensions de cellules	304
Figure 5- 6 : Spectre de la magnitude et de la phase de l'impédance de cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h après leur croissance avec le premier protocole de repiquage des cellules.....	306
Figure 5- 7 : Spectre de la magnitude et de la phase de l'impédance de cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h après leur croissance avec le protocole final de repiquage des cellules.	307
Figure 5- 8 : Spectre de la résistance et de la réactance des cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h après leur croissance avec le protocole final de repiquage des cellules.	308
Figure 5- 9 : Spectre de la résistance et de la réactance des cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h plus tard, avec un nouveau milieu. Mesures effectuées avec les électrodes millimétriques (photo MEB en encart).....	310
Figure 5- 10 : Spectre de la résistance et de la réactance des cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h plus tard, avec un nouveau milieu. Mesures effectuées avec les électrodes micrométriques droites (photo MEB en encart).	310
Figure 5- 11 : Spectre de la résistance et de la réactance des cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h plus tard, avec un nouveau milieu. Mesures effectuées avec les électrodes micrométriques rondes (photo MEB en encart).	311
Figure 5- 12 : Spectre de la résistance et de la réactance des cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h plus tard, avec un nouveau milieu. Mesures effectuées avec les électrodes submillimétriques (photo MEB en encart).	311
Figure 5- 13 : Spectre de la résistance de quatre cultures de cellules CHO après leur injection dans les puits, 25h plus tard et 46h plus tard en fin de croissance. Les pointillés indiquent la fréquence à laquelle a été effectuée l'analyse cinétique.....	315
Figure 5- 14 : Evolutions temporelles de la résistance à 15 KHz de quatre cultures de cellules CHO. 316	
Figure 5- 15 : Cinétique de la résistance normée à 4 KHz, moyennée à partir de quatre cultures cellulaires, dont le milieu a été renouvelé.	318
Figure 5- 16 : Evolutions temporelles des résistances électriques normées à différentes fréquences lors d'un changement de milieu.....	320
Figure 5- 17 : Evolutions temporelles des résistances électriques normées mesurées à 15 KHz sur des cultures de CHO avec des taux de recouvrement initiaux différents.	323
Figure 5- 18 : Photo prise au microscope confocal à fluorescence de cultures de cellules CHO effectuées avec un taux de recouvrement initial de 80% (A) et de 100% (B), 16H après l'injection des cellules.....	324
Figure 5- 19 : Circuit électrique équivalent utilisé pour la modélisation des impédances de culture de cellules CHO.....	325
Figure 5- 20 : Schéma des correspondances biologiques des différents composants du circuit électrique équivalent.	325

Figure 5- 21 : Résistance et réactance du milieu cellulaire et des cultures de CHO avec des taux de recouvrement initiaux différents, 16H après leur injection dans les puits. Spectres modélisés avec le circuit équivalent utilisé pour les cultures cellulaires.	326
Figure 5- 22 : Suivi cinétique à différentes fréquences des résistances normées d'une culture de CHO à confluence après l'injection de Lf.....	330
Figure 5- 23 : Suivi cinétique de la résistance normée à 15 KHz d'une culture de CHO non confluyente après l'injection de Lf.	332
Figure 5- 24 : Suivi cinétique à différentes fréquences des résistances normées d'une culture de CHO non confluyente après l'injection de Lf spécifique et non spécifique	334
Figure 5- 25 : Suivi cinétique de la résistance normée à 4 KHz et moyennée sur deux cultures de CHO non confluentes après l'injection de Lf et de Lf non spécifique.	336
Figure 5- 26 : Photo du banc de montage des manipulations microfluidiques	340
Figure 5- 27 : Schéma des différentes méthodes d'injection des cellules dans les microcanaux.....	346
Figure 5- 28 : Résistances de quatre cultures de CHO effectuées dans des μ canaux en début et en fin de culture	348
Figure 5- 29 : Cinétique de la résistance de deux cultures mesurées en parallèle et comparaison avec leurs observations microscopiques par fluorescence	350
Figure 5- 30 : Cinétique de la résistance d'une culture de CHO effectuée dans un μ canal sur 48H et comparaison avec les observations microscopique par fluorescence.....	351
Figure 5- 31 : Résistance et réactance du milieu cellulaire et d'une cultures de CHO dans un microcanal à différents moments de leur croissance, avec les différentes configurations de circuit équivalent.....	352
Figure 5- 32 : Comparaison des cultures cellulaires avant et après l'injection des protéines. Photos prises au microscope à fluorescence.	357
Figure 5- 33 : Evolutions temporelles des résistances électriques des canaux pendant l'injection de protéine (ici à 20 KHz)	358
Figure 5- 34 : Photo prise au microscope à fluorescence du passage d'une bulle d'air dans un microcanal	359
Figure 5- 35 : Photo prise au microscope à fluorescence avant, pendant et après le passage d'une bulle d'air à l'entrée du canal.....	359
Figure 5- 36 : Comparaison des cultures cellulaires avant et après l'injection des protéines avec le nouveau protocole. Photos prises au microscope à fluorescence.....	361
Figure 5- 37 : Evolutions temporelles des résistances électriques des microcanaux pendant l'injection de protéine avec le nouveau protocole (ici à 50KHz).....	361
Figure 5- 42 : Comparaison des cultures cellulaires avant et après l'injection d'un nouveau milieu. Photos prises au microscope à fluorescence.	363
Figure 5- 43 : Evolutions temporelles des résistances électriques des canaux pendant l'injection d'un nouveau milieu (ici à 1KHz)	364

Liste des tableaux

Tableau 2- 1 : Conductivité électrique du Platine, du Titane et de l'Or.....	121
Tableau 2- 2 : Constantes de cellules des différentes configurations de peignes interdigités.....	172
Tableau 3- 1 : Permittivités diélectriques relatives mesurées à vide avec les différentes configurations de peignes interdigités.....	196
Tableau 3- 2 : Comparaison des paramètres de modélisation de l'impédance de l'eau DI obtenus avec les différentes géométries.....	200
Tableau 3- 3 : Profondeur de champ des différentes géométries d'électrodes.....	201
Tableau 3- 4 : Fréquences de coupure basse fréquence et haute fréquence des spectres d'impédance de l'eau DI déterminées à partir des différentes modélisations.....	202
Tableau 3- 5 : Comparaison des paramètres électriques de l'eau DI déterminés à partir des spectres de conductivité électrique et de permittivité relative pour les différentes géométries d'électrodes.....	206
Tableau 3- 6 : Comparaison des paramètres électriques de l'eau DI issus du circuit électrique équivalent pour les différentes géométries d'électrodes.....	207
Tableau 3- 7 : Paramètres de la modélisation au 1 ^{er} ordre de la relaxation de Debye sur les spectres de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative pour les différentes géométries d'électrodes.....	211
Tableau 3- 8 : Paramètres de la modélisation au 2 nd ordre de la relaxation de Debye sur les spectres de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative pour les différentes géométries d'électrodes.....	213
Tableau 3- 9 : Paramètres de la modélisation du modèle de Cole-Cole sur les spectres de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative pour les différentes géométries d'électrodes.....	216
Tableau 3- 10 : Comparaison des paramètres de modélisation de l'impédance du milieu F12-K avec 10% de sérum fœtal bovin obtenue avec les différentes géométries.....	219
Tableau 3- 11 : Fréquences de coupure basse fréquence des spectres d'impédance du milieu F12-K déterminées à partir des paramètres de modélisation.....	219
Tableau 4- 1 : Comparaison des valeurs de résistance des suspensions issues de la modélisation de l'impédance de l'H ₂ O ppi et d'une suspension de parasites à une concentration de 1000 oocystes/μl.....	268
Tableau 4- 2 : Comparaison des valeurs de R_{ech} issues de la modélisation des impédances des suspensions d'H ₂ O ppi sans traces de PBS avec différentes concentrations de parasites.....	272
Tableau 5- 1 : Taux de variations des résistances mesurées avec les différentes géométries d'électrodes au cours de la croissance cellulaire.....	312
Tableau 5- 3 : Comparaison des paramètres de modélisation de l'impédance des cultures avec différents taux de recouvrement initiaux. Modélisations obtenues avec le circuit équivalent utilisé pour les cultures cellulaires.....	327
Tableau 5- 4 : Taux de variation des résistances lors des différentes injections de Lf.....	338
Tableau 5- 5 : Comparaison des paramètres de modélisation de l'impédance des cultures avec différentes densités cellulaire initiales. Modélisation obtenue avec le circuit équivalent avec un modèle d'interface.....	353

Liste des équations

$Z(\omega) = \frac{U(\omega)}{I(\omega)}$ (1).....	153
$I(\omega) = I(\omega) \cdot e^{j(\alpha\omega + \theta_i)}$ (2).....	153
$U(\omega) = U(\omega) \cdot e^{j(\omega\alpha + \theta_v(\omega))}$ (3).....	153
$Z(\omega) = \frac{ U(\omega) }{ I(\omega) } \cdot e^{j(\theta_v(\omega) - \theta_i)} = Z(\omega) \cdot e^{j\varphi(\omega)}$ (4).....	154
$Z(\omega) = R(\omega) + jX(\omega)$ (5).....	154
$X(\omega) = -\frac{1}{C(\omega) \cdot \omega}$ (6).....	154
$ Z(\omega) = \sqrt{R(\omega)^2 + X(\omega)^2}$ (7).....	155
$\varphi(\omega) = \arctan\left(\frac{X(\omega)}{R(\omega)}\right) = \arccos\left(\frac{R(\omega)}{ Z(\omega) }\right) = \arcsin\left(\frac{X(\omega)}{ Z(\omega) }\right)$ (8).....	155
$R(\omega) = Z(\omega) \cdot \cos(\varphi(\omega))$ (9).....	156
$X(\omega) = Z(\omega) \cdot \sin(\varphi(\omega))$ (10).....	156
$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon(\omega) - j\frac{\sigma(\omega)}{\omega}$ (11).....	156
$\varepsilon^*(\omega) = \frac{\kappa}{j \cdot \omega \cdot Z(\omega)}$ (12).....	157
$\sigma(\omega) = \kappa \frac{R(\omega)}{R(\omega)^2 + X(\omega)^2}$ (13).....	158
$\varepsilon_r(\omega) = -\frac{\kappa}{\varepsilon_0 \cdot \omega} \frac{X(\omega)}{X(\omega)^2 + R(\omega)^2}$ (14).....	158
$\sigma(\omega) = \frac{\kappa}{R_{//}(\omega)}$ (15).....	158
$\varepsilon_r(\omega) = \frac{\kappa}{\varepsilon_0 \cdot \omega \cdot X_{//}(\omega)} = \frac{\kappa \cdot C_{//}(\omega)}{\varepsilon_0}$ (16).....	158
$R_{//}(\omega) = \frac{R(\omega)^2 + X(\omega)^2}{R(\omega)}$ (17).....	159
$X_{//}(\omega) = \frac{R(\omega)^2 + X(\omega)^2}{X(\omega)}$ (18).....	159
$R(\omega) = \frac{1}{\omega} \frac{\sigma(\omega) / \omega}{\varepsilon(\omega)^2 + \left(\sigma(\omega) / \omega\right)^2} \frac{e}{S}$ (19).....	159

$$X(\omega) = -\frac{1}{\omega} \frac{\varepsilon(\omega)}{\varepsilon(\omega)^2 + \left(\frac{\sigma(\omega)}{\omega}\right)^2} \frac{e}{S} \quad (20) \dots\dots\dots 159$$

$$\sigma(\omega) = \frac{e}{S} \frac{R(\omega)}{R(\omega)^2 + X(\omega)^2} \quad (21) \dots\dots\dots 159$$

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_r(\omega) \cdot \varepsilon_0 = -\frac{1}{\omega} \frac{e}{S} \frac{X(\omega)}{X(\omega)^2 + R(\omega)^2} \quad (22) \dots\dots\dots 159$$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad (23) \dots\dots\dots 160$$

$$C(\omega) = C_\infty + \frac{\Delta C}{1 + j\omega\tau} \quad (24) \dots\dots\dots 160$$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} - j \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \quad (25) \dots\dots\dots 161$$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau)^2} - j \left(\omega\tau \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau)^2} + \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \right) \quad (26) \dots\dots\dots 161$$

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (27) \dots\dots\dots 161$$

$$\sigma(\omega) = \omega^2 \tau \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau)^2} \cdot \varepsilon_0 + \sigma_{DC} \quad (28) \dots\dots\dots 162$$



$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{MF}}{1 + j\omega\tau_1} + \frac{\varepsilon_{MF} - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau_2} - j \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \quad (32) \dots\dots\dots 163$$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{MF}}{1 + (\omega\tau_1)^2} + \frac{\varepsilon_{MF} - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau_2)^2} - j \left(\omega\tau_1 \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{MF}}{1 + (\omega\tau_1)^2} + \omega\tau_2 \frac{\varepsilon_{MF} - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau_2)^2} + \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \right) \quad (33) \dots\dots 163$$

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{MF}}{1 + (\omega\tau_1)^2} + \frac{\varepsilon_{MF} - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau_2)^2} \quad (34) \dots\dots\dots 164$$

$$\sigma(\omega) = \omega^2 \tau_1 \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{MF}}{1 + (\omega\tau_1)^2} \cdot \varepsilon_0 + \omega^2 \tau_2 \frac{\varepsilon_{MF} - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau_2)^2} \cdot \varepsilon_0 + \sigma_{DC} \quad (35) \dots\dots\dots 164$$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau)^{1-a}} - j \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \quad (36) \dots\dots\dots 164$$

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \cdot \left(1 + \sin\left(\frac{\pi}{2} a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} \right)}{1 + 2 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2} a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} + (\omega\tau)^{2(1-a)}} - j \cdot \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \cdot \left(\cos\left(\frac{\pi}{2} a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} \right)}{1 + 2 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2} a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} + (\omega\tau)^{2(1-a)}} - j \frac{\sigma_{DC}}{\omega}$$

(37) \dots\dots\dots 165

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \cdot \left(1 + \sin\left(\frac{\pi}{2} a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} \right)}{1 + 2 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2} a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} + (\omega\tau)^{2(1-a)}} \quad (38) \dots\dots\dots 165$$

$$\sigma(\omega) = (\varepsilon_0 \cdot \omega) \cdot \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \cdot \left(\cos\left(\frac{\pi}{2} a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} \right)}{1 + 2 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2} a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} + (\omega\tau)^{2(1-a)}} + \sigma_{DC} \quad (39) \dots\dots\dots 165$$

$$R_H = \frac{128 \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot D^4} \quad (40) \dots\dots\dots 165$$

$$R_H = \frac{12 \cdot \eta \cdot L}{l \cdot h^3 \cdot (1 - 0.63 \frac{h}{l})} \quad (41) \dots\dots\dots 166$$

$$P = R_H \cdot Q \quad (42) \dots\dots\dots 166$$

$$\kappa = \frac{2}{(N-1)L} \times \frac{I_{\text{elliptique}}(k)}{I_{\text{elliptique}}(k')} \quad (43) \dots\dots\dots 166$$

$$I_{\text{elliptique}}(k) = \int_{t=0}^1 \frac{dt}{\sqrt{(1-t^2)(1-k^2t^2)}} \quad (44) \dots\dots\dots 166$$

$$k = \cos\left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l}\right) \quad (45) \dots\dots\dots 166$$

$$k^2 + k'^2 = 1 \quad (46) \dots\dots\dots 167$$

$$k' = \sqrt{1 - \cos^2\left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l}\right)} \quad (47) \dots\dots\dots 167$$

$$\frac{I_{\text{elliptique}}(k)}{I_{\text{elliptique}}(k')} = \frac{\pi}{\ln\left(\frac{2(1+\sqrt{k'})}{1-\sqrt{k'}}\right)} \quad (48) \dots\dots\dots 167$$

$$\frac{I_{\text{elliptique}}(k)}{I_{\text{elliptique}}(k')} = \frac{\pi}{\ln\left(\frac{1 + \left(1 - \cos^2\left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l}\right)\right)^{1/4}}{1 - \left(1 - \cos^2\left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l}\right)\right)^{1/4}}\right)} \quad (49) \dots\dots\dots 167$$

$$\kappa = \frac{2}{(N-1)L} \times \frac{\pi}{\ln\left(\frac{1 + \left(1 - \cos^2\left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l}\right)\right)^{1/4}}{1 - \left(1 - \cos^2\left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l}\right)\right)^{1/4}}\right)} \quad (50) \dots\dots\dots 167$$

$$L = 2R \sin\left(\frac{\alpha}{2}\right) \quad (51) \dots\dots\dots 169$$

$$\sin\left(\frac{\pi - \alpha}{2}\right) = \frac{n(e+l)}{R} \quad (52) \dots\dots\dots 170$$

$$L_n = 2R \sin\left[\frac{\pi}{2} - \arcsin\left(\frac{n(e+l)}{R}\right)\right] \quad (53) \dots\dots\dots 170$$

$$2R \sin \left[\frac{\pi}{2} - \arcsin \left(\frac{n(e+l)}{R} \right) \right] \rightarrow 2R \cos \left[\arcsin \left(\frac{n(e+l)}{R} \right) \right] \rightarrow 2R \sqrt{1 - \left(\frac{n(e+l)}{R} \right)^2} \quad (54) \dots\dots\dots 171$$

$$(N-1)L \approx NL \rightarrow \sum_{i=1}^{i=N} L_i = 2 \cdot \sum_{i=1}^{i=\frac{N}{2}-1} 2R \sqrt{1 - \left(\frac{i(e+l)}{R} \right)^2} \quad (55) \dots\dots\dots 171$$

$$K = \frac{2}{2 \cdot \sum_{i=1}^{i=\frac{N}{2}-1} 2R \sqrt{1 - \left(\frac{i(e+l)}{R} \right)^2}} \frac{\pi}{\ln \left(\frac{1 + \left(1 - \cos^2 \left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l} \right) \right)^{1/4}}{1 - \left(1 - \cos^2 \left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l} \right) \right)^{1/4}} \right)} \quad (56) \dots\dots\dots 171$$

$$Z_w = \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} + \frac{A_w}{j\sqrt{\omega}} \quad (57) \dots\dots\dots 184$$

$$|Z_w| = \sqrt{2} \cdot \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} \quad (58) \dots\dots\dots 184$$

$$\varphi_{Z_w} = \frac{\pi}{4} \quad (59) \dots\dots\dots 184$$

$$Z_{CPE} = \frac{1}{K \cdot (j \cdot \omega)^n} \quad (60) \dots\dots\dots 184$$

$$Z_{CPE} = \frac{1}{K \cdot \omega^n} \cdot \frac{1}{j^n} = \frac{1}{K \cdot \omega^n} \cdot e^{-j \cdot n \cdot \pi/2} = \frac{1}{K \cdot \omega^n} \left(\cos \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right) - j \cdot \sin \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right) \right) \quad (61) \dots\dots\dots 185$$

$$Z(f) = \frac{\frac{R_{éch}^2}{C_{diélec}^2 \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^2} + \frac{\cos \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right)}{K \cdot C_{diélec}^2 \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^{n+2}}}{R_{éch}^2 + \frac{1}{K^2 \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^{2n}} + \frac{1}{C_{diélec}^2 \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^2} + \frac{2 \cdot R_{éch} \cdot \cos \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right)}{K \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^n} + \frac{2 \cdot \sin \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right)}{K \cdot C_{diélec} \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^{n+1}}}$$

$$- j \frac{\frac{R_{éch}^2}{C_{diélec} \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)} + \frac{1}{K^2 \cdot C_{diélec} \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^{2n+1}} + \frac{2 \cdot R_{éch} \cdot \cos \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right)}{K \cdot C_{diélec} \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^{n+1}} + \frac{\sin \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right)}{K \cdot C_{diélec}^2 \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^{n+2}}}{R_{éch}^2 + \frac{1}{K^2 \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^{2n}} + \frac{1}{C_{diélec}^2 \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^2} + \frac{2 \cdot R_{éch} \cdot \cos \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right)}{K \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^n} + \frac{2 \cdot \sin \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right)}{K \cdot C_{diélec} \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^{n+1}}} \quad (62)$$

..... 186

$$Z(f) = \frac{R_{éch}}{\left(1 + 4 \cdot R_{éch}^2 \cdot C_{diélec}^2 \cdot \pi^2 \cdot f^2 \right)} + \frac{\cos \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right)}{K \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^n} + j \cdot \left(\frac{\sin \left(n \cdot \frac{\pi}{2} \right)}{K \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^n} - 2 \cdot \frac{R_{éch}^2 \cdot C_{diélec} \cdot \pi \cdot f}{\left(1 + 4 \cdot R_{éch}^2 \cdot C_{diélec}^2 \cdot \pi^2 \cdot f^2 \right)} \right) \quad (63)$$

..... 187

$$Z_A = \frac{Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{CPE} + Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{R_{éch}}}{Z_{C_{diélec}} + Z_{CPE} + Z_{R_{éch}}} \quad (64) \dots\dots\dots 188$$

$$Z_B = \frac{Z_{CPE} \cdot Z_{C_{diélec}} + Z_{R_{éch}} \cdot (Z_{CPE} + Z_{C_{diélec}})}{Z_{R_{éch}} + Z_{C_{diélec}}} \quad (65) \dots\dots\dots 188$$

$$C_{diélec} \ll K \rightarrow Z_{C_{diélec}} \gg Z_{CPE} \quad (66) \dots\dots\dots 188$$

$$Z_{CPE} + Z_{C_{diélec}} \approx Z_{C_{diélec}} \quad (67) \dots\dots\dots 189$$

$$Z_A \approx \frac{Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{CPE} + Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{R_{éch}}}{Z_{R_{éch}} + Z_{C_{diélec}}} \quad (68) \dots\dots\dots 189$$

$$Z_B \approx \frac{Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{CPE} + Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{R_{éch}}}{Z_{R_{éch}} + Z_{C_{diélec}}} \quad (69) \dots\dots\dots 189$$

$$F_{CBF} \approx \frac{1}{\pi \cdot R_{éch} \cdot C_{dl}} \quad (70) \dots\dots\dots 191$$

$$F_{CBF} \approx \frac{1}{\pi \cdot R_{éch} \cdot K} \quad (71) \dots\dots\dots 191$$

$$F_{CHF} \approx \frac{1}{2\pi \cdot R_{éch} \cdot C_{diélec}} \quad (72) \dots\dots\dots 191$$

$$|Z| = \frac{1}{C_{diélec} \cdot \omega} \quad (73) \dots\dots\dots 196$$

$$\sigma \text{ (S.m}^{-1}\text{)} = 2,20874 \cdot 10^{-4} + 4,41048 \cdot 10^{-7} \times C_{c. parvum} \quad (74) \dots\dots\dots 274$$

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{nombre d'oocytes vides}}{\text{nombre total d'oocytes (pleins et vides)}} \times 100 \quad (75) \dots\dots\dots 279$$

$$U_m = \frac{3}{2} E_0 R \cos \theta \quad (76) \dots\dots\dots 284$$

$$N_2 = \frac{N_1}{S_1} \times S_2 \quad (77) \dots\dots\dots 303$$

$$\frac{N_1}{V_1} = \frac{N_2}{V_2} \quad (78) \dots\dots\dots 304$$

$$\frac{S_1}{S_2} = \frac{V_1}{V_2} \quad (79) \dots\dots\dots 305$$

$$\leftrightarrow S_2 = \frac{V_2}{V_1} \times S_1 \quad (80) \dots\dots\dots 305$$

$$\Delta X\% = \frac{|X_{T0} - X_{Tfinal}|}{|X_{T0}|} \times 100 \quad (81) \dots\dots\dots 309$$

$$C_s = \frac{6 \times \eta \times Q}{h^2 \times l} \quad (82) \dots\dots\dots 354$$

Abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARN : Acide ribonucléique

AFM : Microscope à force atomique (de l'anglais atomic force microscope)

BF : Basses fréquences

cf : Du latin confer, « se référer à » en français

CHO : Ovaires d'hamster chinois (de l'anglais chinese hamster ovary)

C. Parvum : *Cryptosporidium parvum*

CPE : Element à phase constante (de l'anglais constant phase element)

DEP : Diélectrophorèse

DI : déionisé

E. Coli : *Escherichia coli*

e.g. : Du latin exempli gratia du latin, « par exemple » en français

EWOD : Electromouillage sur diélectrique (del'anglais electrowetting on dielectric)

Fc : Fréquence de coupure

HF : Hautes fréquences

H₂O ppi : Eau pour préparation injectable

i.e. : Du latin id est, « c'est-à-dire » en français

kDa : Kilodalton

ITO : Oxyde d'indium-étain (de l'anglais indium tin oxyde)

Lf : Lactoferrine

MDCK : Cellules épithéliales rénales canines (de l'anglais Madine-Darby canine kidney)

MEA : Réseaux d'électrodes multiple (de l'anglais multi electrode array)

MEB : Microscope électronique à balayage

MEMS : Microsystème (de l'anglais micro-electro-mechanical systems)

MicroTAS : Microsystème à analyse totale (de l'anglais micro total analysis systems)

min : Minutes

PBS : Tampon phosphate salin (de l'anglais phosphate buffered saline)

PCR : Réaction en chaîne par polymérase (de l'anglais polymerase chain reaction)

PEN : Polyéthylène naphthalate

PEY : Polyéthylène téréphtalate

PDMS : Polydiméthylsiloxane

PMMA : Polyméthylmethacrylate

QCM : Microbalance à quartz (de l'anglais quartz microbalance)

REM : Moulage de réplique (de l'anglais replica molding)

RIE : Gravure ionique réactive (de l'anglais reactive ion etching)

RPM : Rotation par minute

s : Seconde

SAW : Onde acoustique de surface (de l'anglais surface acoustic wave)

SPR: Résonance des plasmons de surface (de l'anglais surface plasmon resonance)

STM : Microscope à effet tunnel (de l'anglais scanning tunnel microscope)

TEER : Résistance électrique transépithéliale (de l'anglais transepithelial electric resistance)

UV : Ultra-violet

VIH : Virus de l'immunodéficience humaine

Notation mathématique**Constantes**

Symbole	Nom	Valeur	Unité
ϵ_0	Permittivité du vide	$8,8541.10^{-12}$	$F.m^{-1}$
π	Pi	3,14159265	-

Variables

Symbole	Nom	Unité
A	Aire d'une section	m^2
A_w	Facteur d'amplitude de l'élément Warburg	$\Omega.s^{-0.5}$
C	Capacitance	F
$C_{C. parvum}$	Concentration en oocystes	Oocystes/L
$C_{diélec}$	Conductance due aux propriétés diélectriques de l'échantillon	F
C_{dl}	Capacité de double couche	
D	Diamètre	m
E_0	Champ électrique appliqué	$V.m^{-1}$
F_{CBF}	Fréquence de coupure en basse fréquence	Hz
F_{CHF}	Fréquence de coupure en haute fréquence	
I	Courant électrique	A
$I_{elliptique}$	Intégrale elliptique du premier ordre	-
K	Facteur d'amplitude d'un CPE	$S.s^n$
L	Longueur	m

N	Nombre d'unité (électrode ou cellule)	-
P	Pression hydrodynamique	Pa
Q	Débit volumique du fluide	$m^3 \cdot s^{-1}$
R	Rayon	m
R	Résistance	Ω
R _{//}	Résistance d'une configuration parallèle	
R _{cellule}	Résistance due aux propriétés conductrices du milieu présent aux interstices intercellulaires	
R _{éch}	Résistance électrique due aux propriétés de conduction de l'échantillon	
R _{int}	Résistance due aux interconnexions électrique	
R _H	Résistance hydrodynamique	$Pa \cdot s \cdot m^{-3}$
R _{milieu}	Résistance due aux propriétés conductrices du milieu cellulaire	Ω
S	Surface	m^2
U	Tension	V
U _m	Tension transmembranaire	V
V	Volume	m^3
X	Réactance	Ω
X _{//}	Réactance d'une configuration parallèle	
Z	Impédance	
Z _{CPE}	Impédance d'un CPE	

$Z_{CPEcellule}$	CPE du aux propriétés diélectriques des cellules	Ω
$Z_{CPEmilieu}$	CPE du aux propriétés diélectriques à l'interface avec le milieu	
e	Espace entre deux électrodes	m
f	Fréquence	Hz
h	Hauteur	m
k	Module de l'intégrale elliptique du premier ordre	-
l	Largeur	m
n	Facteur de phase d'un CPE	-
α	Facteur de dispersion du modèle de Cole-Cole	
ϵ_r	Permittivité diélectrique relative	
ϵ_{BF}	Permittivité diélectrique relative aux basses fréquences	
ϵ_{HF}	Permittivité diélectrique relative aux hautes fréquences	
η	Viscosité du liquide	Pa.s
κ	Constante de cellule	m^{-1}
φ	Phase	Degré
σ	Conductivité électrique de l'échantillon	$S.m^{-1}$
σ_{DC}	Conductivité électrique statique	$S.m^{-1}$
τ	Temps de relaxation	s
ω	Pulsation	Hz

Lexique

Apoptose :

Mort programmée d'une cellule, réaction qui peut être provoquée par le manque de facteurs de croissance cellulaire, des dommages subis par l'ADN ou simplement le manque de contact avec les cellules environnantes ou avec la matrice extracellulaire. Ce genre de réaction en cascade peut donc être facilement provoqué par des réactifs cytotoxiques (détériorant le noyau cellulaire).

Aptamère :

Courtes séquences d'ADN ou ARN synthétisés *in-vitro*.

Biomatériau :

Matériau artificiel destiné à être greffé sur l'homme.

Boîte quantique :

Matériel semi-conducteur utilisant la propriété de quantifications des niveaux d'énergie des électrons de valence pour confiner leur mouvement à l'aide de barrières de potentiel présentes dans les trois directions de l'espace. Ces barrières de potentiel sont physiquement créées avec les dimensions nanométriques de la boîte semi-conductrice.

Capteur à base de cellule :

Capteur utilisant des cultures *in-vitro* de cellules pour mesurer l'effet de réactifs possiblement cytotoxiques. Ces expériences font parti d'un ensemble de contrôles permettant l'analyse exhaustive des conséquences physiologiques d'agents chimiques.

Confluence :

Situation d'un tapis cellulaire où le substrat de culture est entièrement recouvert par les cellules et où les cellules sont donc toutes contigües.

CPE (Elément à phase constante) :

Composant électronique fictif dont l'impédance possède une phase constante avec la fréquence et une amplitude inversement proportionnelle à la racine n-ième de la fréquence. n étant un réel compris entre 0 et 1.

Cristaux photoniques :

Matériau correspondant à la juxtaposition nanométrique et périodique de matériaux d'indices optiques différents pour confiner spatialement les photons.

Cytotoxicité :

Propriété d'un réactif à détériorer les cellules.

Constante de dissociation à l'équilibre (Kd) :

Cette constante est égale à la concentration nécessaire de protéines pour que la moitié des sites récepteurs du ligand soient occupés. Plus cette constante est faible, plus l'affinité entre une protéine et son récepteur est donc élevée.

Cytomètre en flux :

Outil d'analyse biologique consistant à faire passer un flux de cellules marquées par fluorescence au travers d'un laser exciteur pour détecter la fluorescence émise.

Diagramme Cole-Cole :

Diagramme où la partie imaginaire de l'impédance complexe est représentée en fonction de sa partie réelle. Chaque point constituant le graphe correspond à une valeur de la partie réelle et de la partie imaginaire obtenue à une fréquence spécifique. Sur ce type de graphique, l'évolution fréquentielle de la courbe doit donc être précisée.

Dispersion alpha :

Dispersion diélectrique mesurée sur des suspensions biologiques causée par la diffusion des ions et contre ions.

Dispersion beta :

Dispersion diélectrique mesurée sur des suspensions biologiques est due aux phénomènes de relaxation apparaissant à l'interface des membranes cellulaires (effet Maxwell-Wagner à la différence de permittivité diélectrique entre la membranaire cellulaire et le milieu de suspension).

Dispersion gamma :

Dispersion diélectrique mesurée sur des suspensions biologiques est due aux phénomènes de relaxation apparaissant avec les milieux polaires et aqueux.

Double couche électrique :

Le phénomène de double couche électrique apparaît quand une électrode est placée dans un liquide chargé. Cet effet est dû à l'attraction vers les électrodes des contre-ions de l'électrolyte (ions de polarité opposée à celle de l'électrode) et des molécules polaires de l'électrolyte qui s'orientent selon la polarité des électrodes. Entre ces charges issues de l'électrolyte et les charges issues des électrodes, aucune charge n'est présente. Une capacité dite de double couche apparaît alors à l'interface des électrodes et de l'électrolyte. Comme les distances séparant les charges issues de l'électrolyte et les charges issues des électrodes sont très faibles (quelques angströms), les capacités de double couche sont élevées (quelques $\mu\text{F}/\text{cm}^2$). Cette double couche électrique comprend une couche fixe d'ions et de molécules adsorbées à la surface du métal (couche de Stern), couche qui est indépendante de la concentration en ions de l'électrolyte, et une couche mobile et diffusive qui dépend de la concentration de l'électrolyte en ions (la couche de Gouy).

EC₅₀ :

Concentration nécessaire d'un réactif pour obtenir 50 % d'un effet cellulaire.

Element Warburg :

Composant électronique fictif dont l'impédance possède une phase de 45 degrés constante avec la fréquence et une amplitude inversement proportionnelle à la racine carré de la fréquence.

GFP (Protéine fluorescente verte) :

Ces protéines servent de marqueurs fluorescents synthétisés en même temps que la protéine d'intérêt. Pour cela, le gène à l'origine de cette protéine est fusionné *in-vitro* au gène codant la protéine étudiée. Cet ADN recombinant est ensuite intégré au génome de la cellule qui synthétisera ainsi la protéine d'étude en même temps que la protéine fluorescente. Ce type de protéine est donc artificiel et est appelé protéine de fusion.

IC₅₀ :

Concentration nécessaire d'un réactif pour obtenir 50 % d'un effet cellulaire inhibiteur. Cette mesure est donc comparable à l'EC₅₀ mais pour un effet inhibiteur.

Immunomarquage :

Technique biologique consistant à repérer une protéine à l'aide d'anticorps spécifiques et des liaisons anticorps-antigènes.

In situ :

Expression qualifiant l'analyse d'une cellule dans un organe intact. Cette expression est intermédiaire à l'analyse *in vitro* et *in vivo* puisque pour ce type d'étude, l'organisme n'est pas maintenu en vie.

In vitro :

Expression qualifiant une analyse effectuée hors d'un organisme ou d'un organe mais dans un environnement contrôlé et artificiel (e.g. boîtes de Pétri ou bioMEMS).

In vivo :

Expression qualifiant une analyse effectuée dans un organisme vivant.

FRET (transfert d'énergie par résonance de type Förster) :

Technique de marquage utilisant deux fluorophores : un fluorophore donneur qui va transmettre son énergie à un autre fluorophore accepteur.

Longueur de Debye :

La longueur de Debye correspond à la zone autour d'un matériau dans laquelle des charges extérieures peuvent influencer le déplacement des charges mobiles circulant intrinsèquement dans ce matériau. Concernant les charges circulant dans une électrode plongée dans un électrolyte, cette longueur correspond à la zone de double couche.

Microscope confocal à fluorescence :

Microscope permettant d'atteindre des profondeurs de champ très faible (600 nm) et de localiser précisément au sein d'une cellule les marqueurs fluorescents. Pour atteindre cette résolution optique, un laser est utilisé comme source de lumière et un sténopé placé devant le détecteur permet de ne pas recevoir de lumière des plans adjacents au plan focal.

Parafilm :

Le Parafilm est un film couramment utilisé en biologie pour sceller des boîtes de pétri ou autre contenant. Il est flexible, déformable, imperméable à l'eau et très légèrement perméable aux gaz.

Patch clamp :

Méthode consistant à mettre en contact une micropipette contenant une électrode baignant dans un électrolyte avec la membrane d'une cellule de façon hermétique, permettant ainsi une mesure électrique isolée d'un unique canal ionique.

Profondeur de champ :

Distance à partir de laquelle l'intensité du champ électrique est divisée par deux

Protéine G :

Récepteurs représentant la famille de récepteurs membranaires la plus importante chez les mammifères. Les protéines G sont des protéines membranaires qui s'activent en se fixant à de la guanosine triphosphate (GTP) et se désactivent en se fixant à de la guanosine diphosphate (GDP) pour déclencher ou inhiber des réactions biochimiques intracellulaire, d'où leur nom.

QCM (Microbalance à quartz):

Cette microbalance utilise les propriétés piézoélectriques du quartz dont la fréquence de résonance est extrêmement sensible à sa masse. Ce type de détecteur peut être utilisé pour repérer avec une grande sensibilité l'adhésion covalente de protéines sur sa surface préalablement fonctionnalisée.

Résistance électrique transépithéliale (TEER) :

Mesure électrique de l'espace intercellulaire. Cette mesure permet de quantifier la confluence des cellules.

SAW (Onde acoustique de surface) :

Les SAW utilisent des matériaux piézoélectriques telles que le quartz, le niobate de lithium ou tantalate de lithium (LiTaO_3) pour déplacer à leur surface des ondes acoustiques générées et mesurées le plus souvent par des électrodes interdigitées en contact direct avec les substrats. L'onde est atténuée et déphasée lorsqu'elle entre en contact avec les particules biologiques.

Sécrétion exocrine :

Sécrétions s'écoulant en dehors du sang comme la peau ou les muqueuses.

SPR (Résonance des plasmons de surface) :

Cette méthode consiste à utiliser le phénomène d'onde évanescente apparaissant à l'interface d'un métal et d'un milieu diélectrique, ici le milieu biologique, lorsqu'une onde optique se réfléchit sur le métal. Cette onde évanescente va être modifiée par la fixation de particules biologiques à la surface du métal et cette modification se répercutera sur l'angle de réflexion de l'onde optique. On peut donc quantifier de façon précise la fixation de molécules biologiques à la surface du métal fonctionnalisé en mesurant les variations de cet angle.

Volume mort :

Volume contenu dans les capillaires. C'est ce volume qui limite le temps d'accès des réactifs aux biodétecteurs. Plus généralement, un volume mort correspond à un volume qui doit être traversé par les réactifs mais qui n'intervient pas dans le processus de détection

Zone apicale :

Zone de la cellule exposée au milieu de culture *in-vitro* et à l'intérieur de l'organe *in-vivo*.

Zone basale :

Zone de la cellule en contact avec le substrat de culture *in-vitro* et en contact avec le liquide interstitiel *in-vivo*.

Préambule

Les sciences techniques arrivent aujourd'hui à un carrefour de leur histoire. Tous les domaines scientifiques se doivent dorénavant de savoir communiquer entre eux et d'échanger leurs informations afin de développer un seul et même langage scientifique. Les différentes sciences techniques doivent se « décloisonner » et s'ouvrir aux autres domaines de connaissance tout en faisant l'effort de les comprendre. Le défi de beaucoup de chercheurs est dorénavant de savoir être interdisciplinaire.

Depuis une petite vingtaine d'année, des chercheurs de plus en plus nombreux essayent de conjuguer des domaines aussi variés que la biologie, la chimie, la physique et l'électronique à des échelles de l'ordre de la cellule biologique. Attirés par les micro-technologies et les applications inédites rendues possibles par leurs utilisations transversales, de plus en plus de biologistes se mettent à exploiter ces techniques mixtes.

Leurs études biologiques, chimiques ou environnementales utilisent des outils fabriquées avec les techniques de la microélectronique. Ces mêmes techniques qui étaient jusque là principalement utilisées pour les domaines de l'information et des télécommunications (développement de transistors de plus en plus rapides, de systèmes de communication intégrés).

Ce domaine peut être désigné par le terme de BioMEMS qui désigne l'utilisation de Micro Electro Mechanical Systems (MEMS, micromachines ou microsystèmes), systèmes micrométriques combinant mécanique et électronique, à des fins biologiques. Pour ces composants, la partie mécanique correspond majoritairement à de la mécanique microfluidique. La manipulation d'élément biologique implique en effet l'utilisation régulière d'éléments microfluidiques (continue ou digitale). On retrouve aussi souvent le terme de biodétecteurs bien que cette notion ne précise pas la dimension du composant de transduction (microscopique ou macroscopique).

L'accès des biologistes à ces technologies d'intégration leur a permis de miniaturiser des méthodes déjà couramment employées de façon macroscopique dans les laboratoires, comme par exemple la chromatographie (0-1) ou la diélectrophorèse (0-2). Elles ont également permis de mettre en parallèle des systèmes de mesures biologiques complexes afin d'atteindre des débits d'analyse extrêmement rapides (0-3,0-4,0-5,0-6). Le développement des puces à ADN pour la course au séquençage du génome humain en est l'un de ses meilleurs exemples. Ce genre de système est aussi appelé laboratoire sur puce (lab-on-chip) du fait qu'il intègre

sur un même substrat différentes étapes d'analyse de réactifs que l'on trouve dans un laboratoire de biologie (ce qui peut ne pas être le cas d'un bioMEMS miniaturisant une seule étape d'une analyse biologique).

Les microtechnologies ont également été utilisées dans les recherches sur les biomatériaux (cf lexique) afin de comprendre plus finement l'interaction des cellules humaines avec de tels substrats.

Enfin, globalement, dans ces différentes applications, l'utilisation de volume de plus en plus petit permet de réduire le temps et le coût des analyses biologiques. Des applications récentes sont même directement liées à l'environnement, comme la détection de métaux lourds ou la purification de l'eau.

Pour les biologistes, un des principaux attraits de ces techniques davantage issues de la physique ou de la biochimie que de la biologie, est le fait qu'elles permettent des analyses sans marquage et non invasives.

En effet, pour suivre des réactions impliquant des cellules biologiques ou des protéines, les biologistes utilisent encore principalement des marqueurs fluorescents ou radioactifs. La détection de ces réactions se fait ensuite par l'intermédiaire de microscopes confocaux (cf lexique) pour la fluorescence ou de liquides scintillants et d'autoradiographie pour la radioactivité.

La fixation de ces marqueurs se fait de façon endogène par le biais d'anticorps qui iront s'attacher spécifiquement à des antigènes au sein de la cellule ou de façon exogène par l'introduction directe de fluorophores ou de marqueurs organiques. Seulement, le trafic informationnel cellulaire étant extrêmement complexe, il n'est jamais certain que ces fixations n'induisent pas elles-mêmes une modification du phénomène observé. C'est pourquoi ce type d'analyse avec marqueurs est dite invasive. Ces techniques de marquages et leurs limitations sont présentées plus en détail dans le 1^{er} chapitre.

Les techniques d'ingénierie biomédicale intégrées ont amené différents domaines de la physique à être appliqués en biologie. Différents types de détecteurs non invasifs et sans marqueurs ont ainsi été développés. Dans ce préambule, nous les présenterons de façon simplifiée en les regroupant par domaine physique respectif. Nous pouvons citer les détecteurs utilisant des techniques issues de l'optique, de la mécanique, de l'acoustique et de

l'électronique. Les détecteurs électroniques sont présentés de façon plus exhaustive dans le 1^{er} chapitre, ils ne seront donc pas ici évoqués.

Il faut être prudent et précis quand on évoque les détecteurs optiques dans le domaine des laboratoires sur puce. En effet, de nombreux microdispositifs utilisent de façon pratique des systèmes optiques qui ne sont pas intégrés et/ou ne correspondent pas au système de détection même. Dans ce cas, la détection ou la capture spécifique de matériel biologique se fait en amont par des méthodes miniaturisées électriques, mécaniques, acoustiques, microfluidiques ou même chimiques. Le système complet ainsi développé utilise un matériel optique macroscopique (comme par exemple un microscope) pour vérifier le bon tri ou la bonne récupération des éléments étudiés au sein du microdispositif.

Une des techniques optiques miniaturisées les plus exploitées aujourd'hui est la résonance des plasmons de surface (SPR) (cf lexique). Cette technique est déjà bien implantée dans les laboratoires de biologie. Elle permet aux biologistes de mener en parallèle l'étude quantitative d'interaction protéine-protéine de façon très précise, à haut débit et sans utiliser de marqueurs. Certaines publications ont même montré le potentiel de cette méthode pour des analyses de culture cellulaire effectuée *in-vitro* (cf lexique) à la surface du biodétecteur (0-7). Le SPR a ainsi permis de détecter des modifications morphologiques (0-8) et des réactions cellulaires plus discrètes (0-9). Le principal problème de cette technique est que la zone investiguée par l'onde évanescente est très petite (quelques dizaines de nanomètres). Pour effectuer des analyses cellulaires à l'aide de cette méthode, il est donc nécessaire que la réaction étudiée provoque des modifications de l'interface cellule-substrat.

Concernant le domaine de l'optique, nous pouvons aussi mentionner les cristaux photoniques (cf lexique). Les cristaux photoniques 2D (i.e. sur substrat) peuvent aussi être intégrés dans des plaques 96 puits. Cette intégration permet d'effectuer des analyses toxicologiques à haut débit (0-10). Les fibres de cristaux photoniques sont également utilisées pour l'étude de cellules en suspension ou l'analyse protéique de solutions biologiques (0-11). Au contraire des cristaux photoniques sur substrat, leur utilisation reste limitée aux éléments biologiques en suspension. L'application des cristaux photonique 3D pour la biologie reste aussi une voie émergente mais leur réalisation technologique n'est pas encore au point (0-12). Leur application est discutée dans le 1^{er} chapitre car elle se rapproche des techniques de marquage.

Nous pouvons également répertorier les biodétecteurs intégrés sans marquage utilisant les propriétés de l'acoustique. Un des biodétecteurs acoustiques les plus au point actuellement est la Micro Balance à Quartz (QCM) (cf lexique). Le fonctionnement de cette technique et ses applications évoquent celles du système SPR, bien que son implémentation dans les laboratoires biologiques soit bien moindre. Certains travaux ont démontré l'utilisation de QCM pour des cultures cellulaires (0-13). Comme pour les capteurs à base de cellule (cf lexique), le QCM a permis de mesurer la lyse de cellules de Vero par infection virale (0-14). Enfin, comme leur nom l'indique, les systèmes QCM détectent des variations de masse par unité de surface. La culture cellulaire provoquant une variation initiale de masse importante, les microbalances peuvent ne pas être adaptées à la détection d'interactions discrètes cellule-protéine.

Les ondes acoustiques de surface (Surface Acoustic Wave en anglais, SAW) (cf lexique) sont également appliquées en biologie depuis une quinzaine d'années (0-15). Les techniques de SAW ont été jusqu'ici principalement utilisées pour la détection de particules biologiques en suspension (des protéines le plus souvent). Des travaux récents ont pourtant montré que l'utilisation d'une couche de dioxyde de silicium pouvait permettre de passiver les électrodes de (LiTaO₃) pour y cultiver des cellules souches et mesurer leur interaction avec des ondes acoustiques de surface (0-16).

Un inconvénient des bioMEMS acoustiques est qu'ils sont constitués de matériaux piézoélectriques peu courants qui peuvent compliquer leur intégration au sein d'un laboratoire sur puce.

Nous pouvons enfin mentionner les détecteurs mécaniques. Le plus couramment utilisé pour les applications biologiques est la poutre suspendue. D'abord appliquée à la détection de gaz, elle est également utilisée en mode résonant pour détecter la fixation de cellules biologiques en suspension, que ce soit des bactéries, des protéines, de l'ADN ou même des parasites (0-17). La croissance bactérienne peut aussi être détectée (0-18). Certains travaux ont montré qu'il était possible de mesurer sur ces poutres en temps réel la contraction cellulaire de fibroblastes placés dans une matrice de collagène (0-19). Bien que présentant une sensibilité très élevée (la fixation d'une unique bactérie peut être repérée (0-20)), l'analyse de cellules adhérentes semble compliquée par la mise en vibration du système.

Nous pouvons enfin mentionner l'utilisation de micro-pinces pour étudier la déformation mécanique de protéines ou d'ADN (0-21). L'intégration de cette méthode reste complexe.

Nous avons succinctement présenté les principaux biodétecteurs intégrés sans marqueurs répartis selon leur domaine physique. Certains d'entre eux sont limités dans leur intégration envisageable au sein d'un laboratoire sur puce ou ne permettent pas d'étudier des cellules cultivées *in-vitro*. Certaines méthodes sont déjà couramment utilisées dans les laboratoires alors que d'autres, malgré l'innovation qu'elles représentent, ont encore du mal à s'imposer dans la communauté des biologistes.

Les microsystemes électriques, précurseurs dans l'étude sans marqueurs de cellules adhérentes, semblent d'emblée présenter une polyvalence d'analyse unique. Au contraire des biodétecteurs sans marqueurs issus des autres domaines physiques, ils ne nécessitent pas d'étape de transduction électrique. L'absence de dissipation énergétique lors de ces étapes de conversion peut représenter un avantage pour la détection de phénomènes physicochimiques de faibles amplitudes. Nous avons donc choisi d'utiliser les techniques électriques pour analyser nos cellules biologiques d'intérêt et étudier leurs interactions biochimiques.

Les travaux de thèse ici présentés concernent l'analyse de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance basse fréquence dans des systèmes microfluidiques. Ils ont été réalisés au sein de l'équipe BioMEMS dans le laboratoire de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN, UMR 8520), sous la direction de Vincent Senez et la codirection de Dimitri Pavlidis. L'IEMN est un laboratoire parfaitement adapté à notre étude puisqu'il possède un savoir faire important dans la caractérisation électrique et la fabrication de composants microélectroniques.

Cette thèse a été menée en collaboration avec l'Institut Supérieur d'Agriculture (ISA), l'Unité de Glycobiologie Structurale et Fonctionnelle de l'Université de Lille 1 (UMR 8576) et le Laboratoire d'Etude des Matériaux et des Composants pour l'Electronique de Université du Littoral-Côte d'Opale (LEMCEL).

L'objectif de ces travaux est de développer de nouvelles techniques d'analyse biologique en utilisant et en intégrant des détecteurs électriques au sein de composants microfluidiques. Le but des dispositifs ainsi développés est de simplifier la mise en œuvre des études cellulaires, automatiser partiellement leurs tâches, réduire les volumes de réactifs utilisés et les quantités de matériel biologique manipulées et ainsi réduire le coût et la durée des expériences. L'intégration de ces manipulations permet également d'effectuer des analyses simultanées et parallèles de différents paramètres expérimentaux.

La première partie de ce mémoire expose d'abord les travaux majeurs de l'analyse biologique électrique et de ses techniques intégrées. L'état de l'art du domaine est ensuite présenté : différents avantages des bioMEMS sont illustrés par des études récentes pertinentes. Des améliorations à apporter et des voies de développement envisageables sont également discutées.

Dans le deuxième chapitre, les deux dispositifs développés au cours de cette thèse sont décrits : un bioMEMS à puits et un dispositif microfluidique. La conception et la fabrication des composants sont présentées. L'infrastructure de mesure est détaillée. Des notions théoriques importantes d'impédancemétrie sont exposées.

La troisième section présente la caractérisation des dispositifs. Le circuit équivalent électrique utilisé pour la modélisation de nos mesures est d'abord décrit. Le dispositif à puits est étudié en mesurant l'impédance de différents liquides, la relaxation diélectrique de l'eau déionisée en basse fréquence (B.F.), l'effet de paramètres expérimentaux. Enfin, le dispositif microfluidique est caractérisé de la même manière.

La quatrième partie décrit l'application de l'impédancemétrie intégrée à la désinfection de l'eau en parasite. Le modèle d'étude ici choisi est le *Cryptosporidium parvum*. Les enjeux environnementaux importants liés à cette problématique sont expliqués. La mise en place du protocole de manipulation employé est ensuite détaillée. Enfin, les mesures effectuées sur l'influence du milieu de suspension des parasites, la détermination de leur concentration et de leur viabilité sont présentées et discutées.

Le cinquième chapitre s'articule autour de l'analyse électrique de l'interaction discrète entre la lactoferrine (Lf) et les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO). L'étude est d'abord effectuée avec les dispositifs à puits. Une caractérisation des conditions de culture spécifiques aux bioMEMS, un protocole de culture, une étude de certains paramètres expérimentaux et une modélisation électrique sont présentés. L'interaction de la Lf et des CHO est mesurée par impédancemétrie. Cette même interaction est ensuite étudiée avec les dispositifs microfluidiques.

Le manuscrit s'achève par une conclusion reprenant les principaux résultats des différents chapitres ainsi qu'une présentation des perspectives de ces travaux.

Références du préambule

- 0-1. Effenhauser C, Manz A, Widmer H. Glass Chips for High-Speed Capillary Electrophoresis Separations with Submicrometer Plate Heights. *Analytical Chemistry*. 1993 Oct 1;65(19):2637-2642.
- 0-2. Hughes M. Strategies for dielectrophoretic separation in laboratory-on-a-chip systems. *Electrophoresis*. 2002 Aoû;23(16):2569-2582.
- 0-3. Auroux P, Iossifidis D, Reyes DR, Manz A. Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications. *Analytical Chemistry*. 2002 Juin 1;74(12):2637-2652.
- 0-4. Vilkner T, Janasek D, Manz A. Micro Total Analysis Systems. Recent Developments. *Analytical Chemistry*. 2004 Juin 1;76(12):3373-3386.
- 0-5. Dittrich PS, Tachikawa K, Manz A. Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and Trends. *Analytical Chemistry*. 2006 Juin 1;78(12):3887-3908.
- 0-6. West J, Becker M, Tombrink S, Manz A. Micro total analysis systems: Latest achievements. *Analytical Chemistry*. 2008 Jun 15;80(12):4403-4419.
- 0-7. Hide M, Tsutsui T, Sato H, Nishimura T, Morimoto K, Yamamoto S, et al. Real-Time Analysis of Ligand-Induced Cell Surface and Intracellular Reactions of Living Mast Cells Using a Surface Plasmon Resonance-Based Biosensor. *Analytical Biochemistry*. 2002 Mar 1;302(1):28-37.
- 0-8. Chabot V, Cuerrier CM, Escher E, Aimez V, Grandbois M, Charette PG. Biosensing based on surface plasmon resonance and living cells. *Biosens Bioelectron*. 2009 Fév 15;24(6):1667-1673.
- 0-9. Yanase Y, Suzuki H, Tsutsui T, Hiragun T, Kameyoshi Y, Hide M. The SPR signal in living cells reflects changes other than the area of adhesion and the formation of cell constructions. *Biosens Bioelectron*. 2007 Jan 15;22(6):1081-1086.
- 0-10. Chan L, Gosangari S, Watkin K, Cunningham B. A label-free photonic crystal biosensor imaging method for detection of cancer cell cytotoxicity and proliferation. *Apoptosis*. 2007 Juin 1;12(6):1061-1068.
- 0-11. Rindorf L, Jensen J, Dufva M, Pedersen L, Hoiby P, Bang O. Photonic crystal fiber long-period gratings for biochemical sensing. *Optics Express*. 2006 Sep 4;14(18):8224-8231.
- 0-12. Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotech*. 2004 Jan;22(1):47-52.
- 0-13. Wegener J, Janshoff A, Galla H. Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines. *European Biophysics Journal*. 1998 Nov 16;28(1):26-37.

- 0-14. Gryte DM, Ward MD, Hu W. Real-Time Measurement of Anchorage-Dependent Cell Adhesion Using a Quartz Crystal Microbalance. *Biotechnology Progress*. 1993;9(1):105-108.
- 0-15. Welsch W, Klein C, vonSchickfus M, Hunklinger S. Development of a surface acoustic wave immunosensor. *Analytical Chemistry*. 1996 Jul 1;68(13):2000-2004.
- 0-16. Shih C, Kau N, Tsai B. Stem Cell Differentiation Base on Acoustic Wave Sensor [Internet]. Dans: 2007 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems. Bangkok, Thailand: 2007 [cité 2010 Mai 14]. p. 626-629. Available from:
<http://ieeexplore.ieee.org/Xplore/login.jsp?reload=true&url=http%3A%2F%2Fieeexplore.ieee.org%2Fiel5%2F4160288%2F4144525%2F04160399.pdf%3Farnumber%3D4160399&authDecision=-203>
- 0-17. Lavrik NV, Sepaniak MJ, Datskos PG. Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors. *Rev. Sci. Instrum*. 2004;75(7):2229.
- 0-18. Nugaeva N, Gfeller KY, Backmann N, Lang HP, Düggelin M, Hegner M. Micromechanical cantilever array sensors for selective fungal immobilization and fast growth detection. *Biosens Bioelectron*. 2005 Déc 15;21(6):849-856.
- 0-19. Campbell B, Clark W, Wang J. A multi-station culture force monitor system to study cellular contractility. *Journal of Biomechanics*. 2003 Jan;36(1):137-140.
- 0-20. Ilic B, Czaplewski D, Zalalutdinov M, Craighead HG, Neuzil P, Campagnolo C, et al. Single cell detection with micromechanical oscillators. *J. Vac. Sci. Technol. B*. 2001;19(6):2825.
- 0-21. Yamahata C, Collard D, Legrand B, Takekawa T, Kunternura M, Hashiguchi G, et al. Silicon nanotweezers with subnanometer resolution for the micromanipulation of biomolecules. *Journal of Microelectromechanical Systems*. 2008 Jun;17(3):623-631.

Chapitre 1 :

Travaux majeurs et état de l'art des bioMEMS pour l'analyse cellulaire

Ce chapitre présente dans un premier temps un historique des grands travaux scientifiques qui ont amené au développement des biodétecteurs électriques intégrés. Les premiers travaux d'électrophysiologie sont évoqués. Les techniques d'analyse cellulaire actuellement employées en biologie sont décrites et leurs limitations discutées. Nous présentons ensuite des travaux d'électrophysiologie importants du 20^e siècle qui ont démontré pour la première fois des notions majeures qui sont toujours régulièrement appliquées dans le domaine des bioMEMS. Les premiers systèmes d'analyse biologique qui ont permis d'étudier électriquement la cellule à des échelles microscopiques sont aussi détaillés. Nous décrivons l'évolution de la microélectronique à la microfluidique. Des techniques ayant émergé avec ce domaine sont succinctement présentées. Nous détaillons enfin des travaux importants du domaine de la biodétection électrique intégrée réalisés à la fin du 20^e siècle.

Dans un deuxième temps, nous présentons les avantages des techniques électriques par rapport aux méthodes issues des autres domaines physiques évoquées dans le préambule. Pour illustrer ces arguments, différents dispositifs sont décrits. Ces travaux réalisés ces six dernières années sont issus de l'état de l'art de la biodétection électrique intégrée. Nous nous intéressons ensuite aux points faibles que peuvent présenter les méthodes électriques. Ces points faibles correspondent à des voies d'améliorations actuellement développées dans le domaine des bioMEMS.

I. Développement de l'électrophysiologie et des outils actuels de la biologie cellulaire

I.1. Les premiers liens entre l'électronique et la biologie : l'électrophysiologie

On pourrait situer les premières connections entre l'électronique et la biologie avec les travaux de Volta en 1792 et ses analyses sur les réactions d'une grenouille aux stimuli électriques (1-1). Il a corrigé ainsi les hypothèses de structures biologiques génératrices de courant précédemment formulées par Galvani en 1791 (1-2). Beaucoup d'études, qu'on a regroupées sous le terme d'électrophysiologie, ont par la suite permis de mesurer les différents flux électriques au sein du corps humain (système nerveux, neuronal, réflexes, motricité et les différentes connections entre ces systèmes) tout en essayant d'en comprendre les mécanismes. On peut citer notamment les travaux de Carlos Matteucci en 1842 qui a été le premier à mesurer les courants issus de tissus musculaires (1-3) et ceux de Julius Bernstein en 1912 qui fut à l'origine de la théorie d'une membrane cellulaire semi perméable et sélective (1-4). Ces travaux, alors limités par les moyens technologiques de l'époque, ont mesuré les propagations électriques au sein du corps humain de façon macroscopique et relationnelle entre les différents organes et tissus. Les cellules humaines ont été caractérisées électriquement au travers des différents organes, muscles, nerfs qu'elles constituent. Au 19^e siècle, il est encore technologiquement compliqué d'isoler les cellules, voire même les tissus, pour les caractériser électriquement.

I.2. Développement de la biologie cellulaire et de ses techniques d'analyse

I.2.1. Développement de la biologie cellulaire, de la biochimie et de la biologie moléculaire

Les études biologiques à l'échelle micrométrique ont commencé avec le développement de la microscopie, dans la première partie du 19^e siècle. Ces travaux se sont concrétisés avec l'avènement de ce qu'on a appelé vers 1860 la théorie cellulaire : tous les

organismes sont constitués de petites unités, les cellules (1-5). Grâce aux travaux de William Perkin et le développement en parallèle de nouveaux marqueurs synthétiques (1-6), les biologistes ont considérablement avancé sur la structure cellulaire avec notamment la détermination des chromosomes, du noyau et de la mitochondrie. Le mécanisme de division cellulaire a pu ainsi être révélé pendant la deuxième partie du 19^e siècle. A la même époque, est apparu une nouvelle discipline, désignée comme la biochimie, qui se focalise sur les procédés chimiques se déroulant au sein de la cellule et faisant intervenir les protéines, lipides et autres acides nucléiques. Au début du 20^e siècle, avec l'intérêt grandissant pour la génétique, se développa la biologie moléculaire. Cette science a pour principal objet d'étude l'Acide Désoxyribose Nucléique (ADN) et les diverses protéines exprimées par nos cellules qui forment ainsi le patrimoine génétique et déterminent nombreuses de nos caractéristiques physiologiques.

I.2.2. Les principales techniques de marquage

Pendant ces deux siècles, la biologie moléculaire et la biochimie ont utilisé majoritairement des techniques issues de la chimie, notamment pour la culture cellulaire *in-vitro* (cf lexique), la synthèse de protéines et peptides ou la séparation des différents réactifs. Afin de pouvoir déterminer les différents chemins informationnels au sein des cellules biologiques, des marqueurs fluorescents (ou fluorophores) et radioactifs ont été développés pour marquer les protéines ou les organelles d'intérêt. Aujourd'hui, la radioactivité tend à disparaître afin d'éviter à ses utilisateurs d'être exposés à des rayonnements nocifs. La précision avec laquelle ces marqueurs peuvent être intégrés au sein de la cellule, a permis aux biologistes de décrypter de nombreuses propriétés cellulaires. Ces techniques de marquage ont connu deux évolutions majeures qui leur ont permis de devenir les méthodes prédominantes en biologie cellulaire.

La première, au 20^e siècle, au début des années 40, a été le développement de l'immunomarquage (cf lexique) (Figure 1-1). Les anticorps utilisés sont directement ou indirectement marqués avec des fluophores (1-7). La polyvalence des anticorps a permis de développer de nombreuses analyses cellulaires encore inédites et leur utilisation a rendu possible l'introduction des marqueurs au sein de la cellule par des voies plus naturelles.

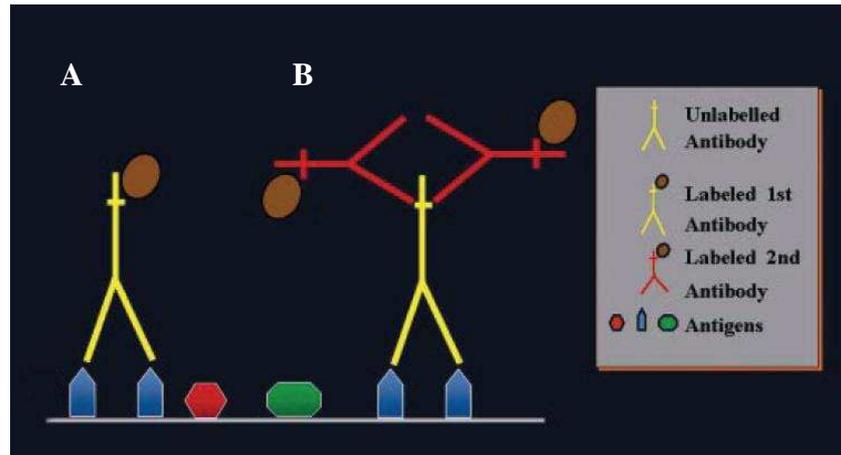


Figure 1- 1 : Schéma explicatif de l'immunomarquage. A : méthode directe, fluorophore (en marron) directement sur l'anticorps (en jaune) qui se fixera à l'antigène ou la protéine étudiée. B : méthode indirecte, fluorophore sur un deuxième anticorps (en rouge) qui se fixera à un premier anticorps lui-même fixé à l'antigène ou la protéine étudiée. (1-8)

La seconde évolution, au début des années 90, a été la synthèse des protéines fluorescentes vertes (cf lexique) (ou GFP de l'anglais Green Fluorescent Protein) (Figure 1-2) (1-9).

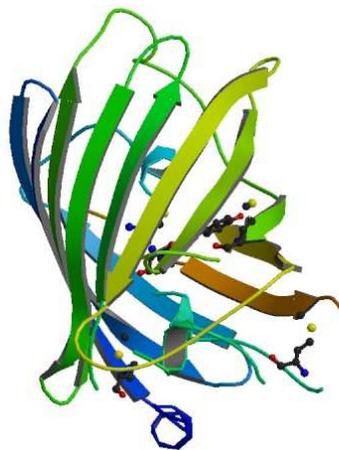


Figure 1- 2 : Représentation 3D de la protéine fluorescente verte. (1-10)

A la différence des immunomarqueurs fluorescents qui sont fixés sur les protéines d'étude déjà synthétisées, les protéines fluorescentes vertes sont synthétisées en même temps que les protéines d'étude, lors de la transcription de l'ADN. A l'aide de microscopes confocaux à fluorescence (cf lexique), la GFP permet ainsi d'analyser fonctionnellement les cellules en

suivant la synthèse des protéines sur des cinétiques extrêmement courtes. La GFP est également moins toxique que certains fluorophores courants comme la fluorescéine.

D'autres techniques de marquages ont été développées comme la technique de transfert d'énergie par résonance de type Förster (FRET, pour l'acronyme anglais "Förster resonance energy transfer") (cf lexique). Elle permet ainsi d'étudier les interactions moléculaires au sein de la cellule.

I.2.3. Limitations des techniques de marquage actuelles

Les anticorps (immunomarquage) ou les protéines fluorescentes (GFP) ont l'inconvénient majeur de présenter un encombrement stérique important. En effet, les anticorps font généralement plus 100 kDa et la GFP une trentaine de kDa. Ces marqueurs peuvent donc facilement perturber le trafic et le fonctionnement des protéines d'étude (1-11). De plus le chemin signalétique au sein des cellules est extrêmement complexe. Retrouver la cascade de réactions à l'origine de la synthèse ou de l'interaction d'une quelconque protéine nécessite obligatoirement l'utilisation de logiciel de simulation informatique puissant et la mise en place d'algorithmes de calcul compliqués. Il est donc impossible de connaître ou de quantifier précisément le caractère invasif de ces marqueurs sur le trafic informationnel intra et extracellulaire.

Peu d'études se sont intéressées à l'influence de ces marquages. Souvent les biologistes partent du postulat difficilement vérifiable que les marqueurs utilisés n'interviennent pas dans le chemin signalétique ou la réaction étudiée. Quelques travaux mettent néanmoins en évidence l'influence des immunomarquages (1-12,1-13,1-14) ou de l'intégration de la GFP (1-15,1-16,1-17,1-11).

En plus de ce caractère invasif, les fluorophores synthétiques utilisés pour les immunomarquages présentent des défauts inhérents à leurs propriétés optiques: une luminescence de courte durée et des recouvrements parasites (notamment avec la fluorescence naturelle des cellules).

I.2.4. Nouvelles techniques d'analyse cellulaire

Considérant les défauts optiques des fluorophores couramment utilisés pour les immunomarquages, de nouveaux types de marqueurs sont actuellement en voie de développement.

Parmi ces voies de recherche, les boîtes quantiques (cf lexique) sont une des plus prometteuses. Ces barrières de potentiel sont donc physiquement créées avec les dimensions nanométriques de la boîte semi-conductrice. Ces nano objets pourraient remplacer à terme les marqueurs fluorescents actuellement utilisés pour l'immunomarquage. Les marquages à l'aide de la GFP ne sont pas concernés car les performances de la fluorescence de la protéine dépendent de la qualité de sa synthèse.

Ces objets pourraient représenter la nouvelle génération de marqueurs biologiques et donc les futurs rivaux des techniques sans marquages. Ils agissent en effet comme des marqueurs fluorescents améliorés : des longueurs d'onde et donc des couleurs facilement modulables (Figure 1-3), une luminescence accrue, un chevauchement des signaux restreint (notamment avec la fluorescence naturelle des cellules biologiques) et surtout une fluorescence d'une grande durabilité (1-18).



Figure 1- 3 : Boîtes Quantiques de CdSe classées selon leur taille. Plus les boîtes sont petites, plus elles émettent vers les bleus. (1-19)

Certaines publications ont même montré que les boîtes quantiques pouvaient rester fluorescentes 4 mois après leur injection *in-vivo* (cf lexique) dans les ganglions lymphatiques de souris (1-20). A noter que dans cette expérience, la localisation des boîtes quantiques n'a pas pu être contrôlée.

Nous voyons que les propriétés optiques de ces boîtes quantiques rendent donc leur potentiel énorme. Cependant, leur probable toxicité ralentit leur application en recherche biologique. En effet les cristaux jusqu'ici majoritairement développés sont les cristaux II-VI qui utilisent du Cadmium et du Sélénium (CdSe). Malheureusement, le Sélénium est cytotoxique (cf lexique). Les cristaux III-V en Galium et Nitrure semblent représenter une voie plus favorable pour l'application des boîtes quantiques en biologie (1-21). Même si ces boîtes quantiques sont dorénavant commercialisées et donc plus facilement accessibles pour les biologistes, leur utilisation doit être encore standardisée et leur neutralité confirmée.

Une autre technique de marquage actuellement développée est celle des cristaux photoniques 3D (cf lexique). Leur réalisation de façon isolée n'est pas encore au point mais on les trouve déjà utilisé sous la forme d'amas (ou cluster). Pour exemple, des amas de cristaux photoniques auto-assemblés en solution ont déjà pu être utilisés pour la détection de glucose dans le sang (1-22). L'adhésion du glucose modifie l'hydrogel incorporant les cristaux et modifie ainsi la diffraction de la lumière traversant ces clusters. L'utilisation concrète des cristaux photoniques 3D dans le domaine du biomédical reste donc encore spéculative mais de nombreuses études sont actuellement menées pour développer ces nouveaux outils.

Enfin les méthodes sans marquages sont également étudiées pour pallier au caractère invasif des techniques optiques de marquage. Les techniques sans marquages issues de l'optique, de l'acoustique et de la mécanique ont été évoquées dans le préambule. Les biodétecteurs électriques sans marquages font l'objet de ce chapitre.

I.3. Les travaux d'électrophysiologie moderne à l'origine des biocapteurs électriques intégrés

I.3.1. Caractérisation des propriétés électrophysiologiques des cellules biologiques

De son côté l'électrophysiologie a profité des avancés technologiques en biologie pour mener les premières caractérisations électriques sur des tissus isolés, voire des cellules isolées révélant ainsi certaines de leurs propriétés électriques intrinsèques. Une des premières études portant sur la caractérisation électrique de cellules isolées a été celle de Fricke en 1926 (1-23) qui s'est intéressé aux propriétés des globules rouges, déterminant leur conductance intérieure (Figure 1-4).

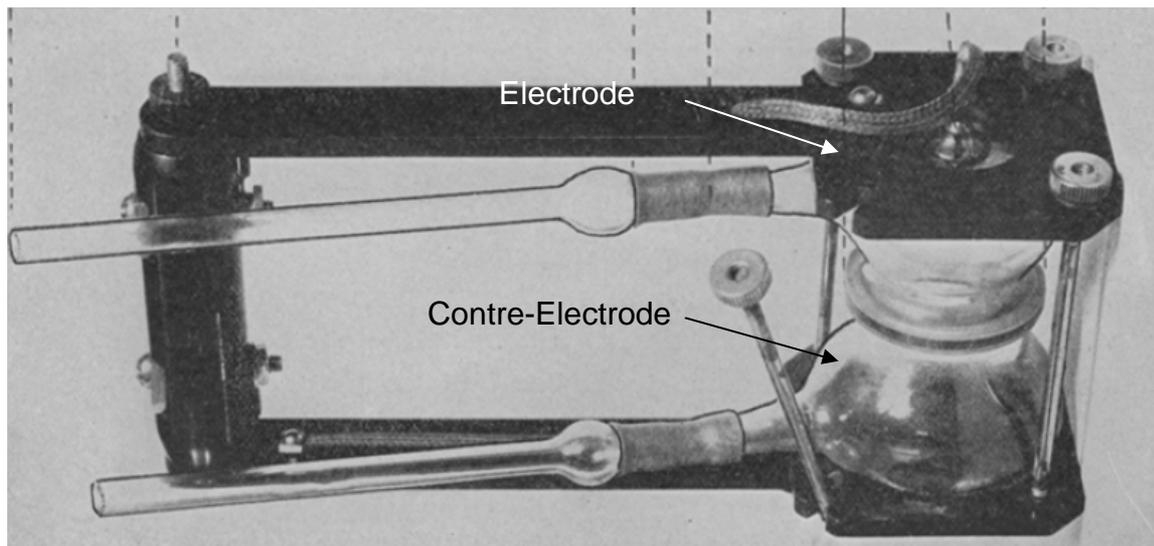


Figure 1- 4 : Système développé par Fricke pour la mesure de conductivité du sang. Les électrodes se situent au sommet et à la base du flacon en verre, les capillaires servent à faire circuler le sang. (1-23)

Il a ainsi démontré le premier la dispersion fréquentielle de la conductivité et de la permittivité électrique caractéristique des cellules biologiques en suspension qu'il désigne comme la dispersion beta (cf lexique). Il se base pour cela sur les travaux de Maxwell (1-24) et de Wagner (1-25) portant sur l'analyse de la conductivité de particules en suspension.

Il a également développé le circuit électrique équivalent de ces suspensions qui consiste en une résistance mise en parallèle avec une capacité représentant respectivement les chemins résistifs et capacitifs de l'électrolyte et des cellules. Le chemin capacitif est créé par la membrane biologique isolante de ces cellules.

En parallèle des premiers travaux de Fricke, Cole a développé un modèle électrique pour représenter l'impédance complexe de ces suspensions. Il a proposé un composant physiquement irréalisable avec une phase constante : le Constant Phase Element (CPE) (cf lexique). Il a également été à l'origine du célèbre diagramme Cole-Cole (cf lexique). Ces différents éléments de circuit électronique servent encore de base dans les publications actuelles pour la modélisation électrique de cellules biologiques. Cole s'est aussi intéressé aussi au potentiel électrique circulant le long des nerfs en utilisant les équations de départ issues de son étude sur les cellules en suspension.

Ces travaux de Cole (1-26) ont en partie inspiré la modélisation analytique de la circulation des potentiels d'action le long des axones formulée par Hodgkin et Huxley (Figure 1-5). Ces derniers ont démontré et quantifié pour la première fois la notion de canaux ioniques en 1952 (1-27), ce qui leur a valu le prix Nobel de Médecine en 1963.

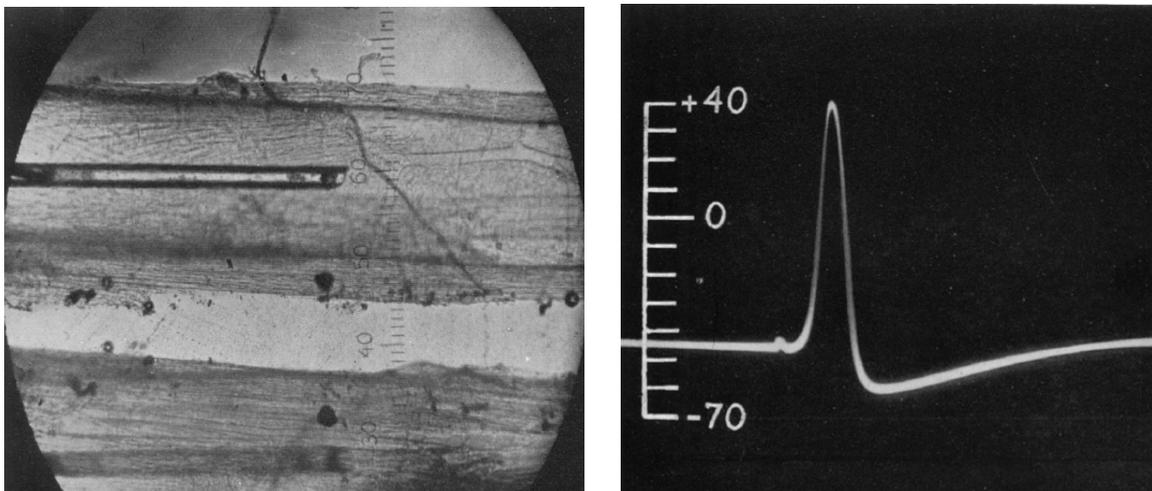


Figure 1- 5 : Photographie des électrodes utilisées par Hodgkin et Huxley à l'intérieur de l'axone d'un calmar et la mesure résultante de l'un de ses potentiels d'action. (1-28)

Plus tard, de nombreux travaux se sont inspirés des études de Fricke pour travailler sur les mêmes types de cellules en affinant les techniques de mesure ou les modèles théoriques. Parmi ceux-ci, on peut nommer les études de Schwan qui a prolongé le domaine d'analyse fréquentiel de suspensions biologiques par spectroscopie diélectrique dans les basses et hautes fréquences (1-29). Il a ainsi déterminé respectivement la dispersion alpha (cf lexique) et la dispersion gamma (cf lexique) (Figure 1-6).

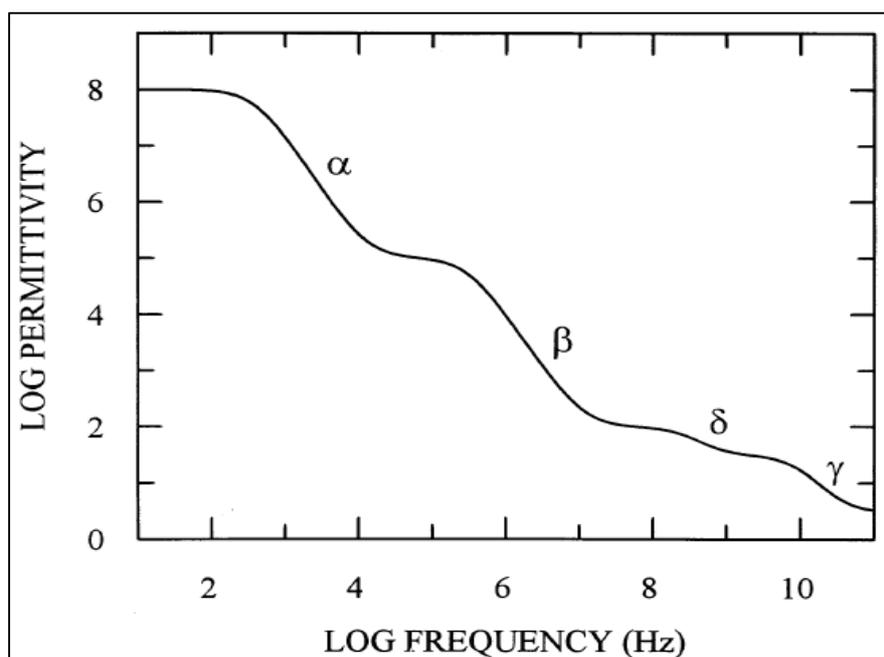


Figure 1- 6: Spectre « idéalisé » de la permittivité diélectrique de suspensions cellulaires et de tissus (1-30).

Asami a également énormément travaillé sur les propriétés électriques des cellules biologiques en suspension. Il a notamment travaillé sur les bactéries d'*E. Coli* en modifiant le modèle analytique de Fricke, considérant les bactéries comme des particules présentant une double couche membranaire (1-31).

I.3.2. Outils importants de l'électrophysiologie moderne

A côté de ces derniers travaux qui se sont focalisé sur les propriétés électriques des cellules en suspension, de nouvelles techniques se sont développées pour étudier électriquement les tissus et les cellules en culture *in-vitro*. Un outil fondamental pour la caractérisation électrique de ces cellules a été la réalisation d'une chambre dédiée à ce type de mesure par Hans Ussing en 1951 (1-32).

Cette chambre est constituée de deux parties en verre reliées entre elles de façon hermétique par le tissu cellulaire à étudier (Figure 1-7). De cette façon, il est possible d'étudier séparément la zone apicale (cf lexique) et la zone basale (cf lexique) des cellules épithéliales, autrement dit de faire une étude vectorielle de la propagation des courants électrochimiques.

Cette technique a connu un essor prodigieux dans la seconde moitié du 20^e siècle. Elle a été par la suite utilisée sous diverses formes améliorées par de nombreux chercheurs pour mesurer ce qui est devenu un paramètre caractéristique des tissus cellulaires : la résistance électrique transépithéliale (TEER) (cf lexique). Ce paramètre a permis d'étudier la physiologie (épaisseur des tissus, jonction intercellulaire, etc..) de différents types de cellules épithéliales (1-33).

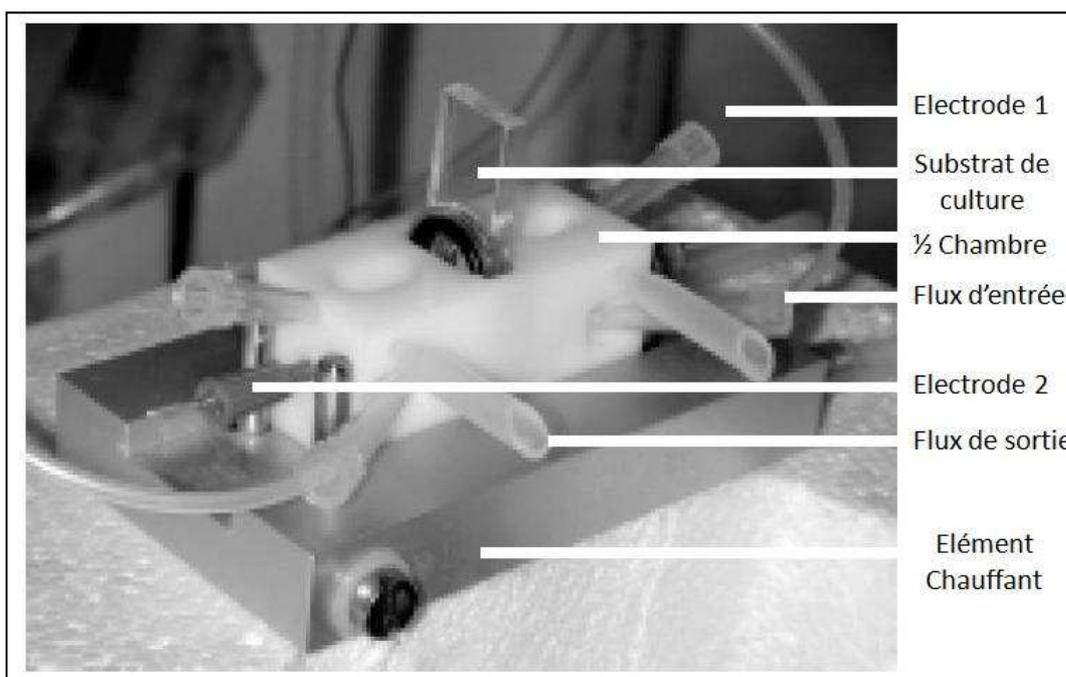


Figure 1- 7 : Photo d'une chambre Ussing. (1-34)

Une des principales innovations techniques qui a révolutionné l'électrophysiologie moderne a été celle du patch-clamp (cf lexique). Cette technique a permis pour la première fois de mesurer des courants ioniques à l'échelle de la cellule unique.

Cette méthode a été développée en 1981 par Neher et son équipe (1-35), ce qui leur a valu l'obtention du prix Nobel de Médecine en 1991. D'autres configurations de contact ont été par la suite développées afin d'étudier différentes caractéristiques des canaux ioniques (Figure 1-8).

La technique de patch-clamp est rapidement devenue la méthode de référence pour la caractérisation des canaux ioniques, essentiels à la communication cellulaire.

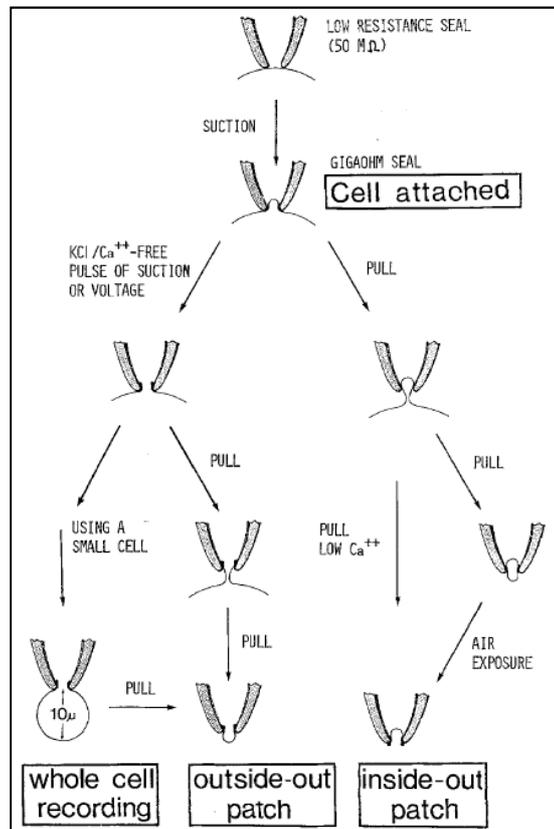
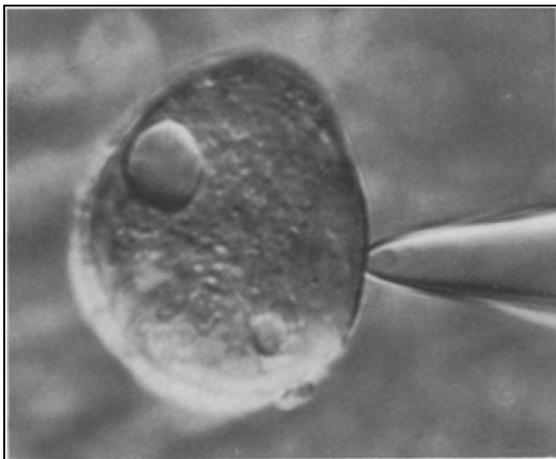


Figure 1- 8 : Observation microscopique d'une cellule prise en patch clamp (configuration cellule attachée) et schéma des différentes configurations de patch clamp. (1-35)

II. De la microélectronique à la microfluidique

II.1. Du premier transistor au premier composant microfluidique

En parallèle de ces avancées biologiques, les technologies de la microélectronique se sont considérablement développées. Depuis l'invention du transistor dans les années cinquante par Bardeen, Shockley, Brattain, la course à sa miniaturisation technologique pour l'informatique et les télécommunications a permis de développer de façon prodigieuse les techniques liées à la microélectronique, et, dans les années quatre-vingt dix, celles des nanotechnologies. Les techniques de microélectroniques les plus répandues sont la lithographie optique et électronique, la gravure humide, sèche à l'aide de plasma, le dépôt de métal par évaporation ou pulvérisation, et les systèmes de microscopie comme le MEB, l'AFM, ou le STM. Après avoir développé les premiers transistors sur germanium, le silicium est devenu le matériau de référence pour la conception de circuits intégrés dû à son faible coût. En effet le silicium est traité à partir d'oxyde de silice, autrement dit du sable. Après ce transfert finalisé au début des années soixante-dix, la complexité des circuits intégrés a doublé tout les deux ou trois ans. Dorénavant avec les techniques d'intégration à grande échelle (ultra-large-scale-integration, ULSI), les circuits les plus complexes (microprocesseurs) sont composés de plusieurs centaines de millions de transistors.

Dans les années soixante-dix, suite à la crise pétrolière, le gouvernement américain a lancé un programme de recherche visant à diminuer la consommation nationale d'essence. Une des solutions proposées par les industriels de l'automobile a été l'incorporation d'un contrôleur de pression pour gérer le ratio air/essence dans les moteurs. Honeywell, un ingénieur de General Motors, a proposé un capteur de pression piezorésistif en silicium. Ce système utilisant les techniques de la microélectronique peut être considéré comme le premier microsystème (ou micro-electro-mechanical systems, MEMS), un système micrométrique associant mécanique et électronique. Maintenant ce type de capteur est couramment utilisé dans les voitures pour réduire leur consommation et leur pollution. En 1995, leur marché a représenté une production de cent millions de détecteurs (1-36). Dans les années quatre-vingt, les premiers accéléromètres miniaturisés ont été développés (1-37) et ont rencontré un grand succès. La

technique de couche sacrificielle a été également développée, elle est aujourd'hui à la base de la conception de la quasi-totalité des microsystèmes.

En 1967, Carter a développé ce qui peut être considéré comme le premier prototype de bioMEMS. Il a décrit une méthode pour réaliser de façon isolée différentes cultures cellulaires sur un même substrat. Il a pour cela utilisé un système de masquage issu de la microélectronique pour délimiter des zones métalliques (Palladium) servant d'ilots de culture à des fibroblastes. Ce travail semble être la première application biologique de méthodes issues de la microélectronique (1-38).

A la fin des années 70, se basant sur les technologies innovatrices de micro-fabrication, Terry a développé pendant sa thèse à Stanford ce qui peut être considéré comme le premier système microfluidique: un chromatographe intégré mêlant technologie silicium et verre (1-39). Malgré ses capacités de séparation et sa taille miniature, ce chromatographe a eu très peu d'écho dans la communauté scientifique des microtechnologues. Ceci a été certainement dû au manque d'expérience de cette dernière pour ce genre d'application (chromatographie). Ce n'est donc que vers le début des années quatre vingt-dix que le domaine de la microfluidique a réellement explosé.

II.2. Développement rapide de la microfluidique

Deux raisons principales peuvent expliquer cet engouement. La première a été le développement de la génomique qui a poussé les chercheurs à concevoir de nouveaux outils permettant l'analyse d'ADN à très haut débit. Les techniques de micro motif sur verre ont permis la conception de ce genre d'outil. En 1987, un premier prototype de puces à ADN a été développé par Kulesh et al. avec la réalisation d'une matrice 8x12 d'ADN complémentaires sur une feuille de Nylon (1-40). Cette matrice a permis de déterminer les gènes dont l'expression est modulée par la protéine d'interféron.

Le terme de puce à ADN n'est réellement apparu qu'en 1995 avec la publication référence de Schena et al. (1-41). Ces derniers ont réduit la matrice d'ADN à une surface de 3,5 mm x 5,5 mm à l'aide d'un système automatisé « fait-maison » et d'une aiguille d'imprimante. La puce à ADN a rendu possible le décryptage rapide de génomes complets à l'aide de multiples

chambres de réaction placées en parallèle (Figure 1-9). La puce à ADN a permis d'effectuer des analyses multiparamétriques avec un gain de temps considérable. Ce genre d'outil technologique réellement exploité à grande échelle par la communauté scientifique en biologie a mis en évidence le potentiel et l'intérêt des technologies BioMEMS.

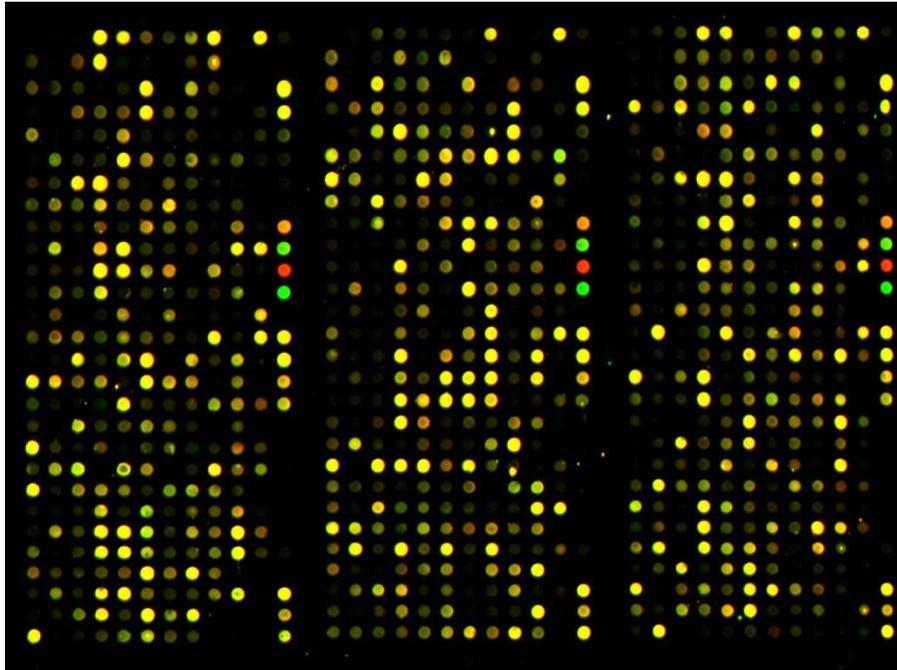


Figure 1- 9 : Exemple de puce à ADN développée par Chipscreen Biosciences (1-42)

Le second facteur du développement de la microfluidique dans les années quatre-vingt dix a été le financement de nombreux travaux de recherche académiques aux USA par la Defense Advanced Research Projects Agency du ministère de la défense, la DARPA. Ces travaux de microfluidique ont été financés dans l'objectif de contrer ou contrôler la menace des armes chimiques et biologiques (1-43).

Accompagnant cet élan, au début des années quatre-vingt dix apparut un des concepts les plus excitants de la microfluidique et de ses applications: celui des laboratoires sur puce (Lab-on-Chip en anglais) ou encore Micro Total Analysis System (μ TAS). Ce concept de microdispositif a été développé par Manz en 1992 (1-44) dans une publication présentant les différents points clés d'un tel dispositif (déplacement des liquides, prétraitement des réactifs et détection), les techniques potentielles et l'avantage d'un tel dispositif micrométrique par rapport aux méthodes macrométriques. Depuis une vingtaine d'années, cette idée de dispositif

regroupant sur une même puce centimétrique toutes les étapes chimiques nécessaires à l'analyse d'un système biologique est devenue la finalité recherchée ou la plus évidente perspective d'une grande partie des travaux en microfluidique.

Bien que de nombreux dispositifs aient été mis au point (1-45,1-46,1-47,1-48) (Figure 1-10), les laboratoires sur puces n'ont pas encore trouvé de réels marchés ni d'applications phares (bien que par extension, les puces à ADN sont souvent associées aux laboratoires sur puce). Le problème vient en partie du manque de transfert de ces dispositifs. Actuellement, peu d'entreprises les développent industriellement.

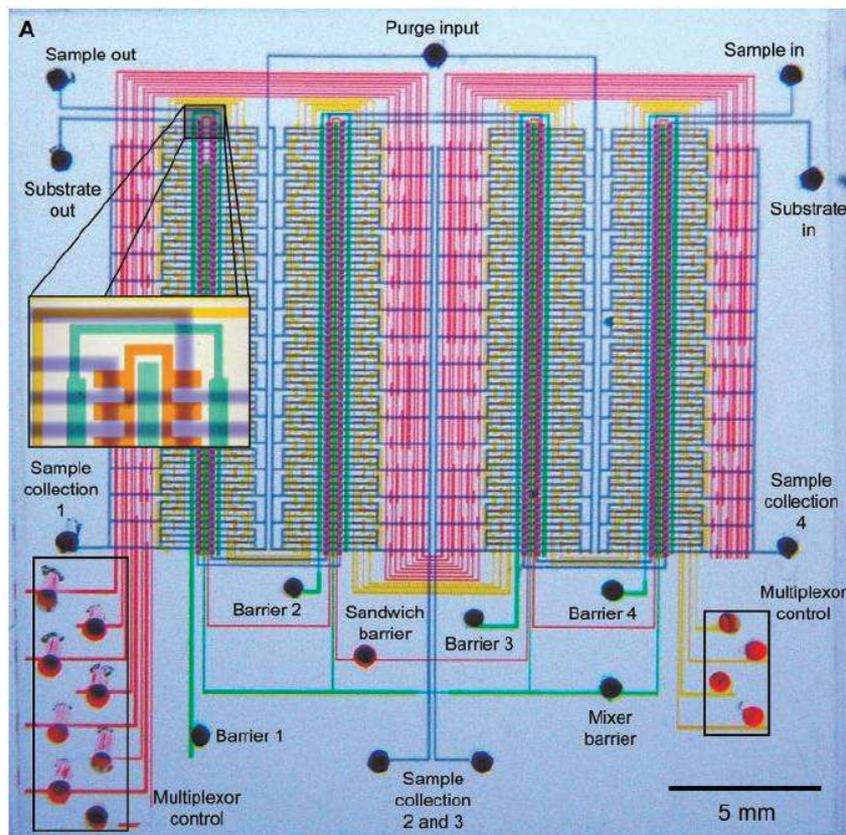


Figure 1- 10 : Exemple de laboratoire sur puce développé par Quake intégrant en parallèle 256 chambres de réactions à l'aide de 2056 valves (1-49).

Une des raisons à ceci peut être la difficulté à obtenir des résultats reproductibles sur des dispositifs qui doivent être soit à usage unique mais avec un très faible coût de fabrication, soit parfaitement régénérable avec un coût de production qui peut être alors être plus élevé.

Une autre cause peut être le manque de généricité des modules de laboratoires sur puces développés. Dans le domaine de la biologie, il est en effet difficile de concevoir des outils qui

puissent être utilisés génériquement pour tous types de solutions, de molécules ou de cellules biologiques.

Enfin, le retour sur investissement des laboratoires sur puce industrialisés nécessitent une étude approfondie du marché représenté par les laboratoires biologiques et pharmaceutiques. Pour que ces outils microfluidiques deviennent rentables, les biologistes doivent être convaincus qu'ils représentent une alternative performante, ergonomique et peu coûteuse aux techniques de laboratoire actuelles.

III. Les nouvelles technologies développées pour la microfluidique

Le développement de la microfluidique et de ses diverses branches n'aurait pu se faire sans la conception de nouveaux matériaux polymères bas coût. L'intérêt porté par de nombreux chimistes érudits pour ce domaine les poussa à utiliser d'autres matériaux aux techniques d'usinage plus accessibles que celles du silicium ou du verre.

Un des principaux polymères utilisés pour la microfluidique est le polydiméthylsiloxane (PDMS). Ce matériau a été utilisé pour la première fois en 1998 par Whitesides pour la conception de dispositifs microfluidiques (1-50). Comparé aux matériaux plus classiques (silicium ou verre), ce polymère présente de nombreux avantages pour le prototypage rapide de composants microfluidiques (cf lithographie douce présentée ci-dessous). Il n'a par contre pas les qualités requises pour la production de masse (problème de vieillissement du PDMS, usinage à grande échelle compliqué).

Whitesides et certains de ses confrères comme Duffy, Mac Donald ou Xia sont aussi à l'origine du concept de « lithographie douce » qui désigne l'ensemble des techniques de microfabrication utilisant des moules et l'auto-assemblage de molécules plutôt que des étapes classiques de lithographie et de gravure. Ces méthodes permettent de fabriquer à moindre coût et plus rapidement des prototypes microfluidiques.

D'après la publication référence de Xia et Whitesides (1-51), la lithographie douce regroupe (Figure 1-11):

- l'impression par micro-contact (microcontact printing, μ CP)
- le moulage de réplique (replica molding, REM, Figure 1-11A.),
- le moulage par micro-transfert (microtransfer molding, μ TM, Figure 1-11B.),
- le micro-moulage dans des capillaires (micromolding in capillaries, MIMIC, Figure 1-11.C.),
- le micro-moulage à l'aide de solvant (solvent-assisted micromolding, SAMIM, Figure 1-11D.)
- l'utilisation de couches auto assemblées (Self Assembled Monolayers, SAM).

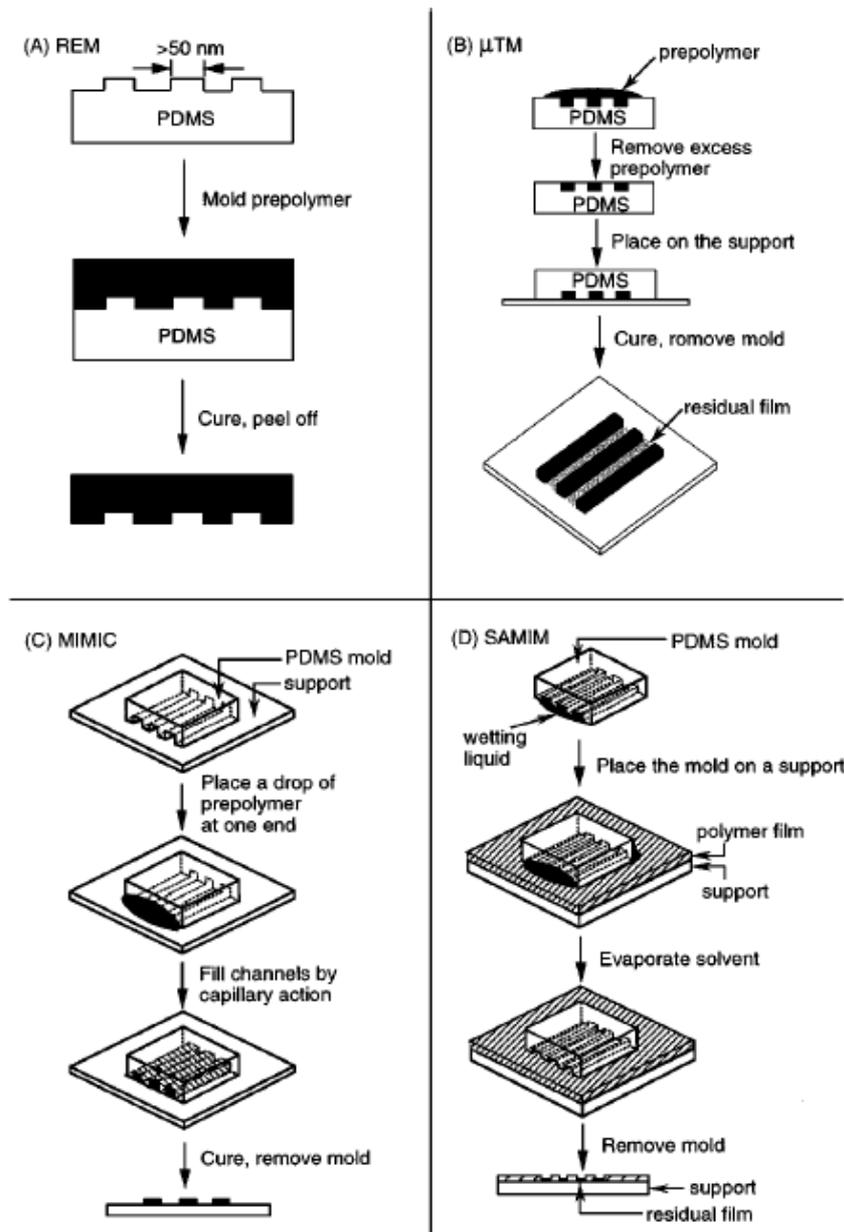


Figure 1- 11 : Schéma des différentes techniques de réplification de micro-motifs présentées par Xia et Whitesides dans la référence (1-51).

La résine photosensible SU-8 est un autre de ces matériaux utilisés à la base dans la microélectronique qui trouva dans la microfluidique un champ d'applications encore plus vaste. En collaborant avec IBM-Zurich, l'Ecole Polytechnique de Lausanne (l'EPFL) a été un des premiers laboratoires à développer des procédés technologiques permettant d'obtenir avec ce polymère des motifs à grand rapport d'aspect (1/18) (1-52). Ce genre de design est souvent exploité en microfluidique. Ce résultat est encore difficilement atteignable avec d'autres types de résines UV. L'usinage de la résine PMMA par technique LIGA (exposition au rayon X et électro dépôt) permet également d'obtenir des motifs avec de tels rapports d'aspects mais cette méthode est beaucoup plus couteuse.

La SU-8 peut être utilisée en lithographie douce avec la technique de REM pour reproduire de nombreuses fois et à faible coût des micro-motifs (1-50). Pour éviter l'adhésion permanente du polymère au moule, la méthode nécessite néanmoins une passivation de la SU-8, avec du silane par exemple. Cette résine peut également être utilisée comme matériau de base pour la réalisation de dispositifs microfluidiques (1-53).

De nombreux autres polymères sont couramment utilisés en microfluidique et dans les bioMEMS. Parmi ceux-ci, nous pouvons citer l'Epoxy (ou Epoxyde), le Parylène, le Benzo Cyclo Butène (BCB), le Paraffine ou la PMMA.

Les matériaux polymères et les techniques de lithographie douce ont en partie permis le développement rapide de la microfluidique pendant ces deux dernières décennies (évolution exponentielle du nombre de publications entre 1985 et 2008 (1-54).

IV. Travaux majeurs de l'analyse cellulaire par techniques électriques intégrées

En 1972, Thomas et al. ont été les premiers à utiliser un réseau de microélectrodes pour mesurer de façon non intrusive l'activité électrique de cellules de cœur de poulet (1-55). Ils ont utilisé des électrodes en platine noire réalisées sur un substrat de verre avec une résine photosensible comme isolant (Figure 1-12).

Thomas a utilisé le platine noir pour diminuer l'impédance liée aux électrodes. Le platine noir étant poreux, il présente en effet une plus grande surface et donc une faible résistance électrique.

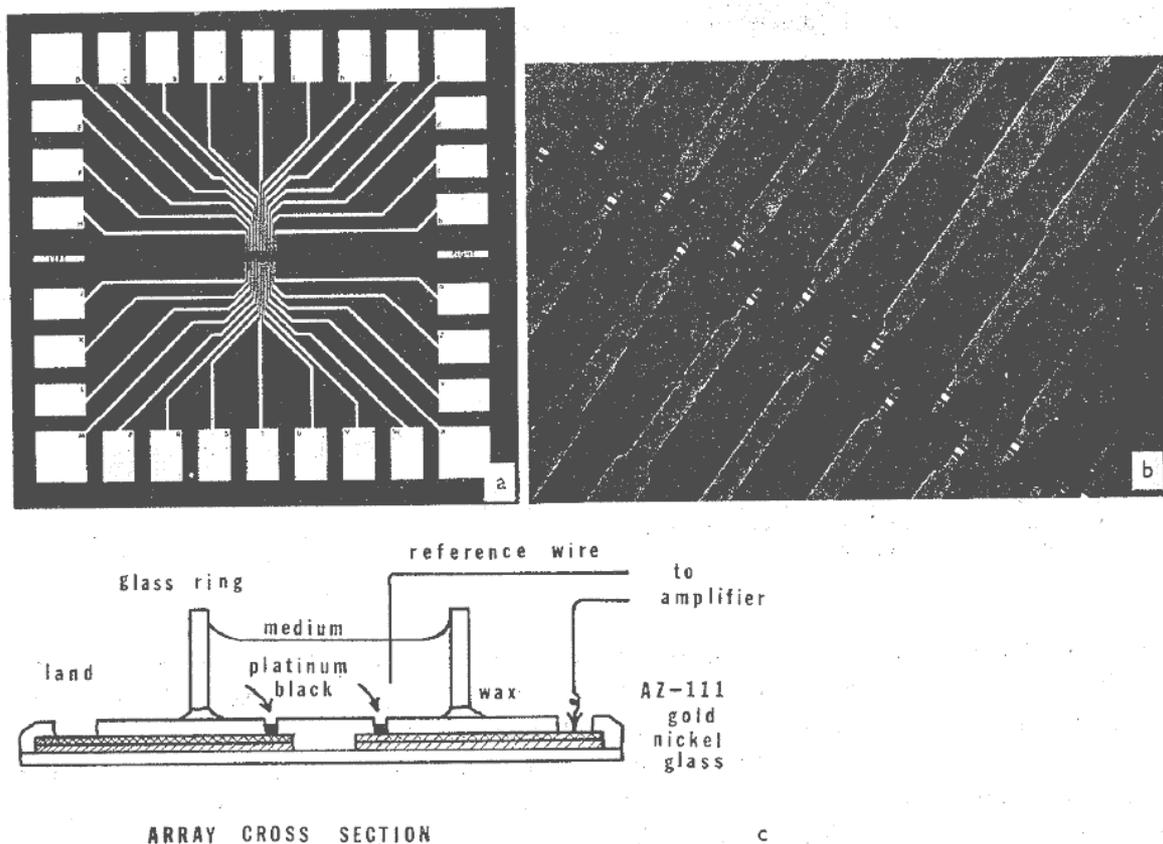


Figure 1- 12 : Dispositif développé par Thomas, a : Photo du microdispositif complet, b : zoom sur les électrodes, c : schéma en coupe des électrodes et de ses interconnexions (1-

55).

Bien qu'à l'époque ce terme, aujourd'hui générique, n'était pas encore employé, on peut désigner ce système comme le premier réseau d'électrodes multiples (Multi Electrode Array en anglais, MEA) qui correspond à une matrice très dense d'électrodes référencées par rapport à un simple fil métallique plongé au dessus des cellules, dans le milieu cellulaire. Thomas a réussi ainsi à mesurer l'activité électrique extracellulaire de cellules cultivées *in-vitro* avec des électrodes de dimensions proches de celles des cellules. Il a ouvert la voie à de nombreuses études cherchant à mesurer l'activité extracellulaire par des techniques électriques tirant profit des microtechnologies.

En 1980, Pine a mesuré pour la première fois le potentiel d'action de neurones cultivés sur un système proche de celui de Thomas (1-56). Il a associé une mesure extracellulaire non invasive avec une mesure intracellulaire classique réalisée avec une micropipette traversant la membrane des neurones. Il a confirmé ainsi l'intérêt des mesures électriques extracellulaires par rapport aux mesures intracellulaires et l'avantage de l'utilisation d'électrodes micrométriques.

En 1985, Gross a développé des microelectrodes en oxyde d'indium-étain (ITO) pour observer par transmission ses cultures de neurones avec un microscope inversé. Ce matériau est en effet transparent et conducteur. Sa conduction est pourtant moins importante que l'or, ce qui a pour effet de diminuer le rapport signal sur bruit du système de mesure (1-57). En 1986, Gross a également étudié l'effet des modifications du milieu sur des cultures de neurones (analyse des signaux électriques propagés et de leurs fréquences) en variant la concentration de $MgCl_2$ (1-58). Au début des années quatre-vingt dix, le même groupe a étudié l'effet de différents agents pharmaceutiques sur l'activité électrique des neurones (1-59) démontrant ainsi une méthode électrique originale pour mesurer l'effet de ce type d'agent.

En 1991, Fromhertz a utilisé comme détecteur électrique un transistor au lieu d'un système d'électrodes classiques. Il a ainsi placé un unique neurone, une cellule de Retz, sur la grille d'un transistor à effet de champ (pMOS) (1-60). Dans ce système, la micropipette utilisée pour placer le neurone est également utilisée pour l'exciter électriquement et pour mesurer son potentiel intracellulaire. Tandis que la source et le drain sont polarisés et le milieu maintenu à la masse, un convertisseur courant-tension est connecté au drain pour mesurer le courant de sortie et déterminer ainsi la caractéristique I-V du transistor en fonction de l'activité neuronale (Figure 1-13).

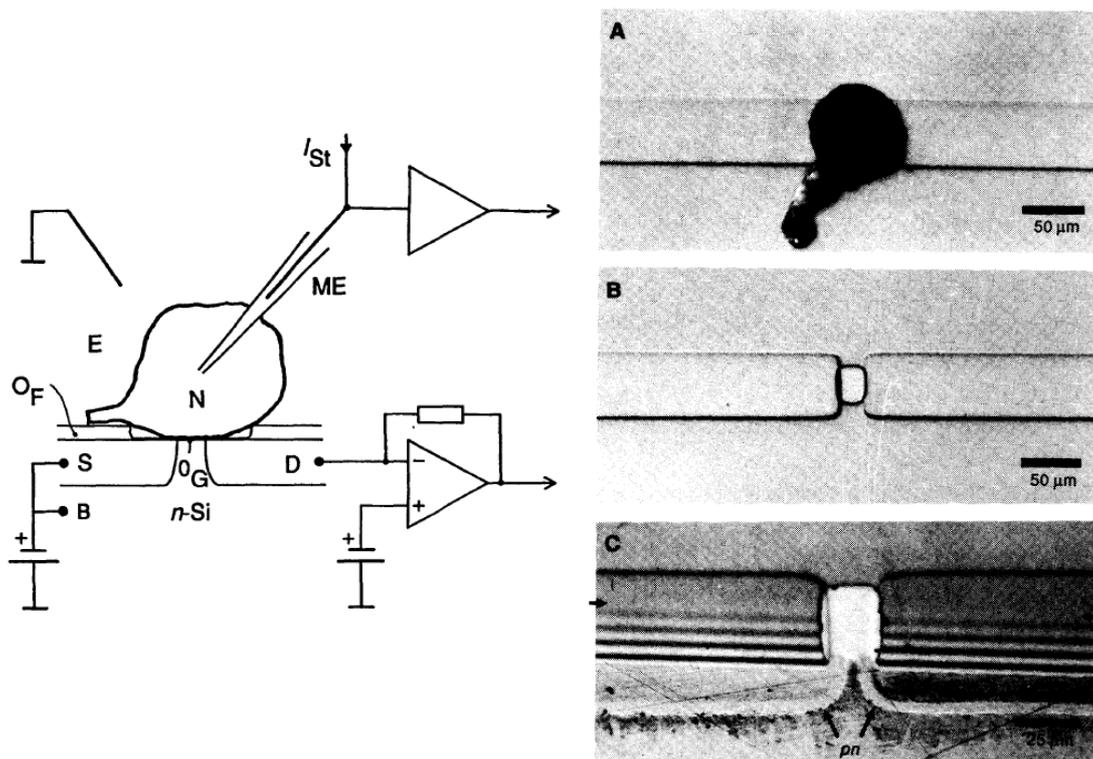


Figure 1- 13 : Sur la gauche, schéma en coupe du transistor développé par Fromhertz ; sur la droite, (A) photo d'une cellule de Retz coincée au dessus de la jonction source/drain, (B) photo vue du dessus de la jonction source/drain, l'ouverture de l'oxyde vers la base est visible en dessous de la jonction, (C) photo en coupe du transistor (1-60).

Cette méthode innovante de mesure électrique sur cellule présente néanmoins l'inconvénient d'une technologie de fabrication plus complexe et d'une détérioration plus rapide du composant de par la diffusion d'espèces ioniques au travers de la couche d'oxyde de la grille.

La même année, des premiers travaux de simulation ont été menés par Grattarola pour modéliser les signaux électriques extracellulaires (1-61). Il a utilisé pour cela un circuit électrique équivalent composé de résistances et de capacités, simulé avec le logiciel SPICE. Il a ainsi prouvé que le signal électrique extracellulaire mesuré est proportionnelle à la dérivée temporelle du potentiel transmembranaire, au couplage résistif cellule-électrode et à la capacité membranaire de la cellule.

En 1984, Giaever et Keese ont réalisé un système intégré comprenant une électrode millimétrique associée à quatre électrodes micrométriques. Ce dispositif est relié à un

détecteur synchrone pour étudier sensiblement la culture *in-vitro* de cellules fibroblastes de poumon humain (1-62) (Figure 1-14).

Ils ont ainsi montré que la prolifération des cellules provoque une augmentation de l'impédance et que les fluctuations en tension de quelques mV observées sont dues à leurs micro-mouvements.

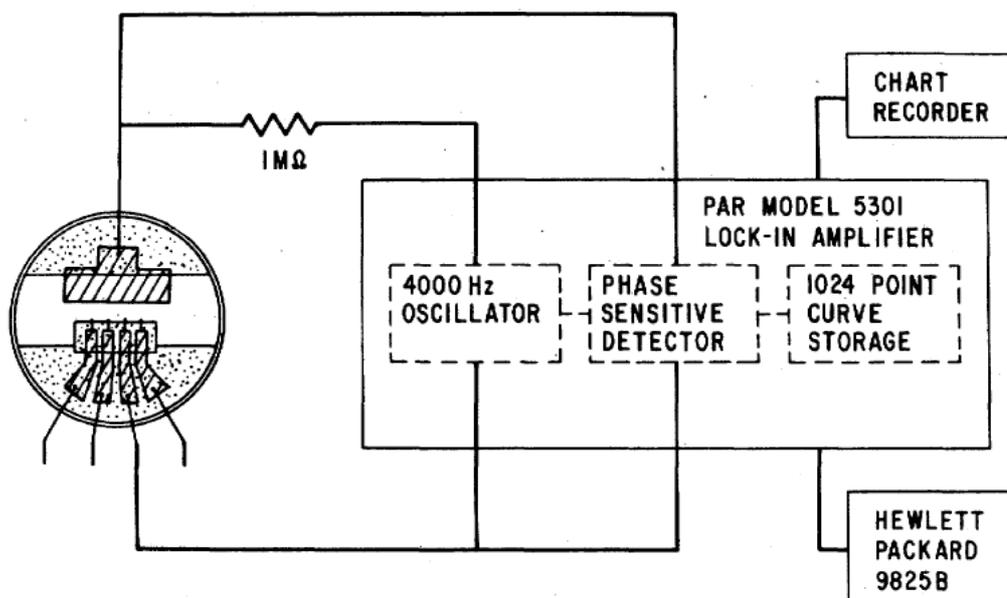


Figure 1- 14 : Schéma du microdispositif et de l'interface de mesure utilisé par Giaever et Keese. Les microélectrodes schématisées sur la gauche ont une extrémité de 130 µm de large, les électrodes sont partiellement recouvertes de cire pour définir la zone d'analyse (1-63).

Dans les années qui ont suivi, ils ont utilisé le même système pour mesurer l'effet de différentes protéines sur l'adhésion, la croissance et la motilité des cellules (1-63,1-64). Ils ont ensuite établi un modèle mathématique qui relie les micro-mouvements cellulaires aux impédances mesurées (1-65), étudié les effets de différents facteurs de l'environnement cellulaire (température, glucose, CO₂) sur ces micromouvements (1-66) et analysé la réponse morphologique des cellules lors de l'application de pulses électriques (1-67).

Ils ont travaillé sur différents types de cellules: des macrophages (1-68), des cellules endothéliales d'artères pulmonaires bovines (1-69) et des cellules endothéliales humaines de vaisseaux ombilicaux (1-70). En 1993, ils ont été les premiers à effectuer l'électroporation de

cellules tout en observant et suivant par impédancemétrie le phénomène avec leur système de microélectrode précédemment développé (1-71).

En développant de façon commerciale leur détecteur par le biais de la compagnie Applied Biophysics, de nombreux autres groupes de recherche en biologie ont utilisé le système électrique de Giaever pour des études variées sur différents types de culture cellulaires *in-vitro*; notamment pour l'étude de la motilité cellulaire chemotaxique (1-72), la cytotoxicité (cf lexique) de différents agents (1-73), la cicatrisation de tissus épithéliaux (1-74) ou l'évolution de tapis cellulaire exposé à différents flux (1-75).

En 1995, ils ont établi un nouveau modèle électrique considérant trois chemins différents pour le passage du courant au travers d'un tapis cellulaire, permettant ainsi de déterminer précisément la capacitance de la partie apicale, basale et latérale de la membrane de cellules MDCK (Madine-Darby canine kidney) (1-76).

Wegener publia aussi des études intéressantes sur la culture *in-vitro* de cellule adhérentes sur des électrodes microfabriquées. En 1996, il présente un modèle électrique plus simple que celui développé par Giaever et Keese pour analyser les spectres d'impédance. Il introduit une méthode pour déterminer la résistance transépithéliale de tissu cellulaire via ce type de biodétecteurs (1-77). En 1998, Wegener a l'idée d'associer deux techniques à l'époque novatrices dans un même système pour mesurer la croissance cellulaire: l'impédancemétrie et une QCM (cf lexique) (1-78). En 1999, Wegener est un des premiers à déterminer par impédancemétrie le coefficient d' EC_{50} (cf lexique) d'une réaction protéique sur un tapis de cellules cultivées *in-vitro* (1-79). La réaction étudiée est la stimulation beta-andrenergique sur un tapis de cellules endothéliales aortiques bovines. Il montre ainsi que la réponse des cellules en fonction de la concentration de protéines injectées est quantifiable par la mesure de leur résistance électrique. D'après Wegener, les variations de résistance observées sont dues à la diminution de l'espace cellule-substrat. Cette diminution serait causée par l'injection de la protéine qui a pour effet d'augmenter l'imperméabilité du tapis cellulaire. Wegener s'associera plus tard à Giaever pour mener des caractéristiques électriques plus poussées à l'aide du biochip commercialisé par Applied Biophysics (1-80).

En 1997, Ehret a cultivé des cellules fibroblastes de rein de singes verts sur des électrodes micrométriques interdigitées connectées à un LCRmètre (1-81). Il a ainsi démontré qu'avec une géométrie interdigitée, il est également possible de suivre la croissance d'un tapis

cellulaire et l'effet de drogues cytotoxiques. Il est intéressant de noter que, similairement à Giaever et Keese, Ehret fonda en 2001 la compagnie Bionas qui commercialise des systèmes d'analyse de cellules par spectroscopie d'impédance (1-82).

En 1998, Gimsa a modélisé des globules rouges en suspension avec un circuit équivalent composé uniquement de résistances et de capacités (1-83). Il a validé avec succès ce modèle en montrant qu'il peut être appliqué pour analyser à la fois des résultats issus d'impédancemétrie, de diélectrophorèse et d'électrorotation. Il suggère ainsi que toute cellule en suspension peut être représentée électriquement par une combinaison de circuit RC parallèle.

En 1998, Borkholder a utilisé des électrodes planaires en développant son propre système de mesure. Il a pour cela réalisé de façon quasi-intégrée un impédancemètre sur circuit imprimé sur lequel est soudé le bioMEMS réalisé en salle blanche (1-84) (Figure 1-15). Ce dispositif a permis de mesurer les potentiels d'action émis par des cellules myocardiques de poulet ainsi que l'effet de bloqueurs de canaux ioniques sur ces potentiels.

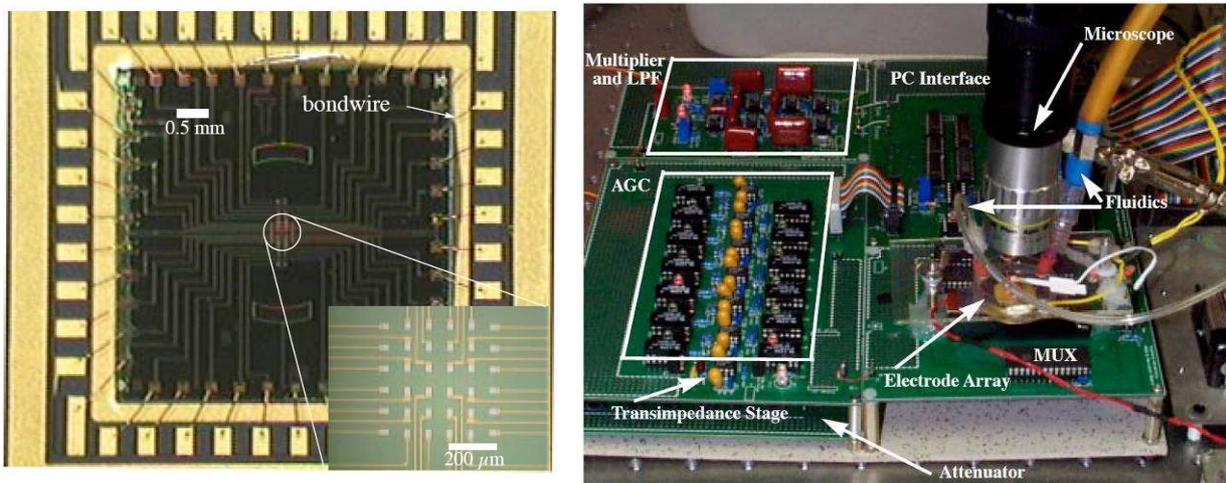


Figure 1- 15 : A gauche, photos de la matrice de microélectrodes et de ses interconnexions réalisés par Borkholder. A droite, photo du circuit d'impédancemétrie « home-made » sur lequel est intégré le microdispositif (1-84).

En 1998, Ayliffe, Rabbitt et Frazier ont été les premiers à caractériser électriquement une cellule unique (globule blanc et rouge) au sein d'un canal microfluidique (1-85) et cela par impédancemétrie.

En 2001, Renaud a réalisé un cytomètre électrique (cf lexique) intégrant des électrodes planaires au sein d'un microcanal en PDMS et effectuant sur des temps très courts des mesures d'impédance différentielles (1-86) (Figure 1-16). Son système a pu ainsi discriminer des billes de latex de différents diamètres et des érythrocytes de leurs fantômes. D'autres publications ont présenté ensuite une modélisation plus précise de la technique (1-87) ou une amélioration de la méthode de discrimination en utilisant la phase de l'impédance et l'opacité des cellules (1-88).

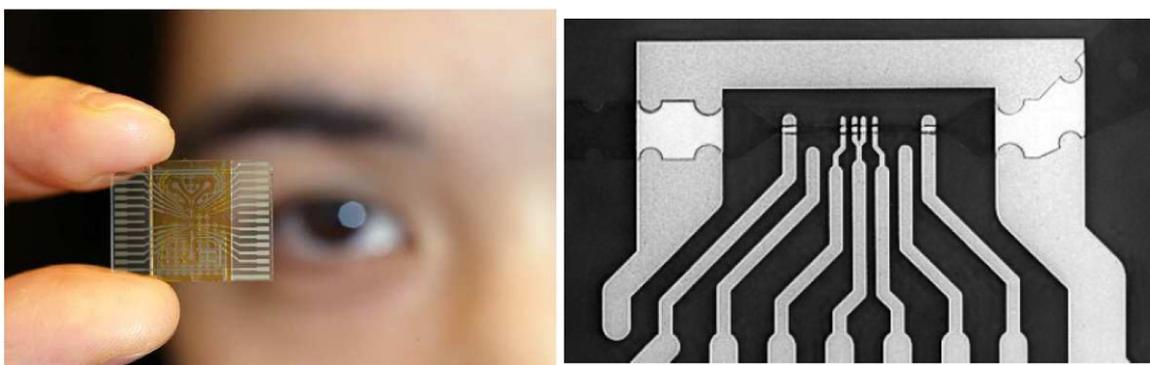


Figure 1- 16 : A gauche, photo du cytomètre électrique développé par Gawad et Renaud (1-89). A droite, image MEB des électrodes de mesures : l'impédance est mesurée de façon différentielle entre 3 électrodes et la vitesse de la particule est calculée en fonction du temps entre les pics d'impédance détectés (1-86).

En 2001, Facer, Sohn et Notterman ont mesuré les propriétés électriques de l'hémoglobine de 40Hz à 26.5 GHz avec un même microdispositif (1-90). Leur bioMEMS consiste en un simple guide d'onde coplanaire dont la zone de détection défini par un réservoir placé au dessus du guide. Ainsi le même dispositif peut être utilisé sur toute la gamme de fréquence en changeant simplement l'instrumentation de mesure : un impédancemètre 4294A d'Agilent pour les basses fréquences et un analyseur de réseau 8510 de Hewlett Packard pour les hautes fréquences. A noter que les électrodes sont enterrées sous une couche d'oxyde de manière à mesurer uniquement les effets capacitifs du système biologique. Ils détectèrent ainsi avec le même dispositif la dispersion alpha et gamma de suspension d'érythrocytes. On peut regretter

cependant que cette étude n'ait pas permis de déterminer le domaine de fréquence apportant la meilleure sensibilité.

En 2002, Heushkel a effectué des mesures d'impédances électriques avec des électrodes en pointes pour pénétrer une culture *in-vitro* de neurones (1-91). Cette géométrie 3-D permet d'augmenter le rapport signal sur bruit en passant au travers de la couche de neurones morts présente à l'interface avec les électrodes.

Toujours en 2002, Frazier utilisa la technique de microimpression pour fixer localement des cellules uniques et étudier leur adhésion quantitativement grâce à un disque en rotation et physiologiquement à l'aide de marqueurs fluorescents intégrés à leur cytosquelette (1-92). Ces travaux correspondent à une des premières utilisations des techniques de micro-motifs pour étudier l'adhésion substrat-cellule à l'échelle de la cellule unique.

V. Atouts des bioMEMS et améliorations envisageables

Nous avons vu dans le préambule qu'il existe différents types de biodétections sans marquages (optique, acoustique, mécanique).

Comparés aux autres techniques, les biodétections électriques présentent des atouts notables. En voici quelques un résumés:

- Afin d'améliorer l'ergonomie et l'exploitation des expériences biologiques, la grande majorité des systèmes d'analyse est maintenant gérée électroniquement et informatiquement. Les biodétections électriques peuvent donc être directement connectés à ces interfaces de mesure sans passer par des étapes de transduction qui diminuent le rapport signal sur bruit de la détection.
- Il existe également de nombreuses techniques électriques de déplacement et de manipulation d'échantillons biologiques. Les techniques les plus développées actuellement sont la diélectrophorèse (DEP) et l'électromouillage (ou EWOD pour ElectroWetting On Dielectric). Nous pouvons également citer l'électroporation qui

peut être utilisée pour introduire des sondes moléculaires, des drogues ou de l'ADN au sein de cellules. Ces techniques électriques de manipulation peuvent être facilement associées aux techniques électriques de détection pour développer des laboratoires sur puces complets (1-93,1-94,1-95).

- le développement de l'électronique et de la microélectronique profite également aux biodétecteurs électriques. Pour exemple, Ferrari et al. ont notamment développé un circuit intégré de technologie C-MOS destiné aux biodétections et permettant de mesurer en courant continu des variations capacitives de l'ordre de l'attofarrad (10^{-18} F) (1-96).

Malgré ces propriétés intéressantes, nous avons vu que ces dispositifs électriques ont encore du mal à s'implanter dans les laboratoires de biologie.

Pour comprendre ce transfert ralenti, il faut aussi considérer que les techniques optiques sont actuellement quotidiennement utilisées par les biologistes via les différents marqueurs spécifiques qu'ils emploient pour leur analyse cellulaire. Elles permettent de plus, dans certains cas, des études intracellulaires locales et spécifiques que les détecteurs électriques ne permettent pas encore d'obtenir.

Afin d'intégrer plus aisément le marché de l'instrumentation biologique, il peut donc être judicieux d'intégrer simultanément des techniques optiques et électriques au sein d'un même dispositif pour créer des bioMEMS opto-électriques. Des matériaux tel que le silicium, le phosphore d'indium, l'oxyde d'indium-étain (ITO) ou encore le nitrure de gallium sont souvent employés au sein des deux domaines, il est donc facile d'intégrer sur un même microdispositif des éléments optiques et électroniques. De tels dispositifs pourraient être utilisés pour comparer objectivement les méthodes optiques et électriques ou pour associer de la meilleure façon possible des techniques issues des deux domaines.

Ainsi, pour convaincre les biologistes de l'intérêt des techniques électriques, certaines études comparatives montrent que ces dernières sont plus sensibles que des procédés optiques déjà employés dans les laboratoires. Pour exemple, Maalouf et al. ont montré que la méthode d'impédancemétrie permettait de détecter la présence de bactérie *E. Coli* a un niveau 10^6 plus faible que le niveau de détection obtenue avec la technique de SPR (cf lexique) (1-97).

Nous présenterons dans le paragraphe suivant d'autres caractéristiques intéressantes des méthodes électriques qui démontrent leur intérêt pour l'ingénierie biomédicale intégrée, la microfluidique ou les laboratoires sur puce. Nous discuterons ensuite de différents aspects clés de ces systèmes qui méritent encore d'être améliorés. Pour se faire, cette discussion s'appuiera sur des travaux à l'état de l'art du domaine publiés ces cinq dernières années.

V.1. Points forts

V.1.1. Différentes techniques de mesures électriques

Il existe différents types de biocapteurs électriques. Nous allons brièvement rappeler ici le principe de chacun d'entre eux.

Les capteurs potentiométriques étudient un système à l'équilibre, c'est-à-dire où aucun courant ne circule. La sonde ne fait donc que mesurer le potentiel continu naturellement généré par le système sans aucune excitation extérieure, comme c'est le cas dans la technique de patch-clamp. En général, ce potentiel évolue linéairement avec l'activité chimique des réactifs comme le décrit l'équation de Nernst (1-98). Les biocapteurs utilisant des transistors à effet de champ comme les ISFET (Ion-selective field effect transistor) sont aussi des capteurs potentiométriques.

Les capteurs voltammétriques ou ampérométriques étudient et quantifient les courants électriques issus des réactions d'oxydoréduction de couples oxydant-réducteur. Ces courants continus sont proportionnels aux concentrations des réactifs. La mesure se fait avec un potentiel d'excitation continu. Quand la mesure du courant se fait graduellement avec l'application d'une rampe de tension, on parle de voltammogramme. A noter aussi que cette technique nécessite l'emploi d'un système de trois électrodes nécessaires pour avoir un potentiel de référence stable malgré le passage du courant: l'électrode de référence donne le potentiel de référence par rapport auquel seront mesurés les autres potentiels, aucun courant ne passe donc au travers, l'électrode de mesure ou de travail permet l'échange de charges et l'application du potentiel d'excitation et enfin l'électrode auxiliaire contrebalance le courant de l'électrode de mesure, c'est ce courant qui sera ensuite étudié.

Les capteurs conductimétriques déterminent la résistance et la capacitance électrique du système biologique. Ces valeurs sont en fait souvent extraites de la mesure d'impédance via un modèle électrique équivalent.

Enfin, comme son nom l'indique, la spectroscopie d'impédance étudie l'impédance électrochimique du système biologique en faisant varier la fréquence du signal électrique d'excitation. Cette technique permet donc d'observer les différents phénomènes de relaxation présents aux interfaces.

Pour exemple de l'application de ces techniques, en 2006, Popovtzer et al. ont réalisé un dispositif comprenant huit systèmes de trois électrodes micrométriques disposées au fond de microcuvettes (1-99) (Figure 1-17). Quelques nanolitres des solutions biologiques à analyser sont ensuite déposés dans ces microcuvettes. Ces trois microélectrodes peuvent être utilisées dans la même configuration que des électrodes macroscopiques de travail, auxiliaire et référence permettant ainsi des mesures de voltammétrie. Popovtzer et al. ont ainsi mesuré des réactions d'oxydoréduction causés par un agent réducteur *p*-aminophenol apparaissant lors de l'attaque du phénol sur des bactéries d'*E. Coli*. Ces bactéries sont stabilisées dans de la gélose au sein des bioréacteurs.

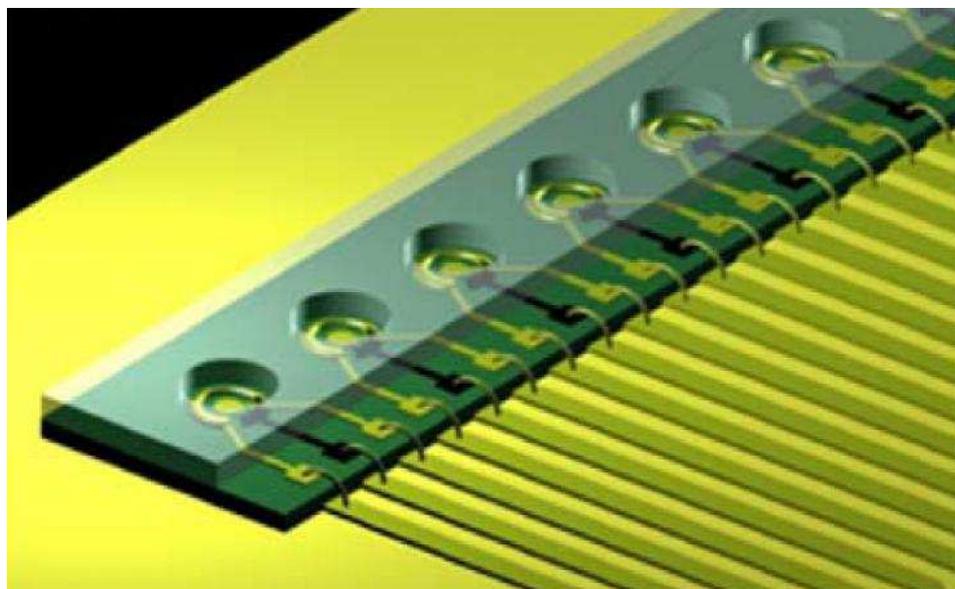


Figure 1- 17 : Schéma des cellules de mesure (800 μ m de rayon) réalisées par Popovtzer et al. (1-99). Ces cellules contiennent les trois électrodes d'ampérométrie intégrées.

En 2009, Trivedi et al. ont utilisé un système constitué d'une électrode plane d'argent recouverte d'une membrane sélective des ions NH_4^+ et d'une électrode de référence Ag/AgCl pour détecter les molécules d'urée dans le lait par potentiométrie (1-100). Leur choix s'est porté sur la technique de potentiométrie car elle permet une détection polyvalente d'ions (seul la membrane sélective en ion doit être modifiée) et utilise du matériel de mesure très peu coûteux. Leur méthode de détection se base sur la décomposition de l'urée par l'urase qui à pH neutre donne du NH_4^+ . Le potentiel ainsi obtenu est détectable jusqu'à des concentrations d'urée de 2.5×10^{-5} mol/L.

En 2007, Mac Cuspis a relié la pointe en platine d'un AFM à un impédancemètre pour comparer de façon isolée et localement (à l'échelle du nanomètre) la capacité de cinq virus différents (1-15). La mesure de la capacitance est directement extraite de l'impédance via un modèle électrique équivalent assez simple : le virus est représenté par une capacité (d'où la valeur de capacitance), l'interface pointe-air par un élément à phase constante et enfin les interconnexions du système par une résistance. Ce système a permis ainsi de caractériser électriquement un unique virus et de montrer que chaque virus présentait des valeurs de capacitance bien distinctes. Ils montrèrent également que l'expression de la GFP au sein d'un virus modifiait sa capacitance.

Concernant les diverses opportunités de caractérisation offertes par les techniques électriques, nous pouvons également citer les mesures de courants harmoniques générés par les changements de configuration spatiale des protéines membranaires ainsi que les mesures de bruit électrique dont l'application biologique est quasi inédite. Ces deux notions seront développées dans le cinquième chapitre.

V.1.2. Intégration aisée

V.1.2.1. Pour les laboratoires sur puces

Les techniques de fabrication de la microfluidique sont issues de la microélectronique. Il est donc naturel de retrouver dans de nombreux bioMEMS des composants microélectroniques dont la technologie est déjà bien maîtrisée. De plus, comme nous l'avons déjà évoqué, la compilation et l'analyse des informations quantitatives se fait souvent par le

biais de microprocesseurs ou de logiciels informatiques dédiés. Avec des détecteurs électriques, la connexion avec ces interfaces de calcul peut se faire de manière beaucoup plus intuitive, sans passer par des étapes de transduction complexes. Il est de ce fait beaucoup plus aisé de concevoir des laboratoires sur puces entièrement électroniques.

Pour exemple, l'équipe de recherche de Motorola a réalisé un laboratoire sur puce permettant de détecter des gènes spécifiques à partir d'une goutte de sang et d'une goutte de particules magnétiques fonctionnalisées (1-101) (Figure 1-18.B et D.). Ce laboratoire sur puce regroupe des étapes de fixation des cellules à analyser sur les particules, une capture magnétique du complexe cellule-particule, un lavage du complexe, une lyse des cellules pour extraire l'ADN, une étape de réaction en chaîne par polymérase (Polymerase Chain Reaction, PCR) pour dupliquer cet ADN et enfin une étape d'hybridation de l'ADN avec une détection électrochimique (voltammétrie). Le tout est contrôlé à l'aide de nombreuses pompes électrochimiques ou thermopneumatiques et de microvalves en paraffine. Cette biopuce nécessite juste l'association à un système extérieur comprenant les éléments chauffants Peltier; une alimentation électrique et le système de lecture du signal électrochimique.

L'équipe de Han a réalisé une biopuce jetable capable de déterminer la concentration sanguine de glucose, lactate et oxygène (1-102) (Figure 1-18.C.). Ce bioMEMS est capable de réaliser une calibration automatique directement sur la puce et la lecture des résultats nécessite juste sa connexion à un système électronique extérieur portatif intégrant une alimentation électrique, l'enregistrement, la conversion des mesures électrochimiques et un système d'affichage digitale.

Nous pouvons aussi citer les travaux de Curtis et al., qui, sans atteindre l'intégration sur puce, ont réalisé un système embarqué de culture *in-vitro* de cellules endothéliales. Ce système permet une analyse de la toxicité de l'eau à partir de cellules biologiques par impédancemétrie (1-103) (Figure 1-18.A.). Le système utilise une biopuce issue de la compagnie Biophysics (Giaever) associé à un réseau microfluidique. Une culture cellulaire peut y être entretenue de façon autonome pendant 4 mois. L'ensemble du système comprenant la biopuce, les réserves de milieu de culture, les capillaires et le système de chauffe et de contrôle du pH est incorporé dans une valise facilement transportable associée à un ordinateur portable enregistrant le résultat des mesures.

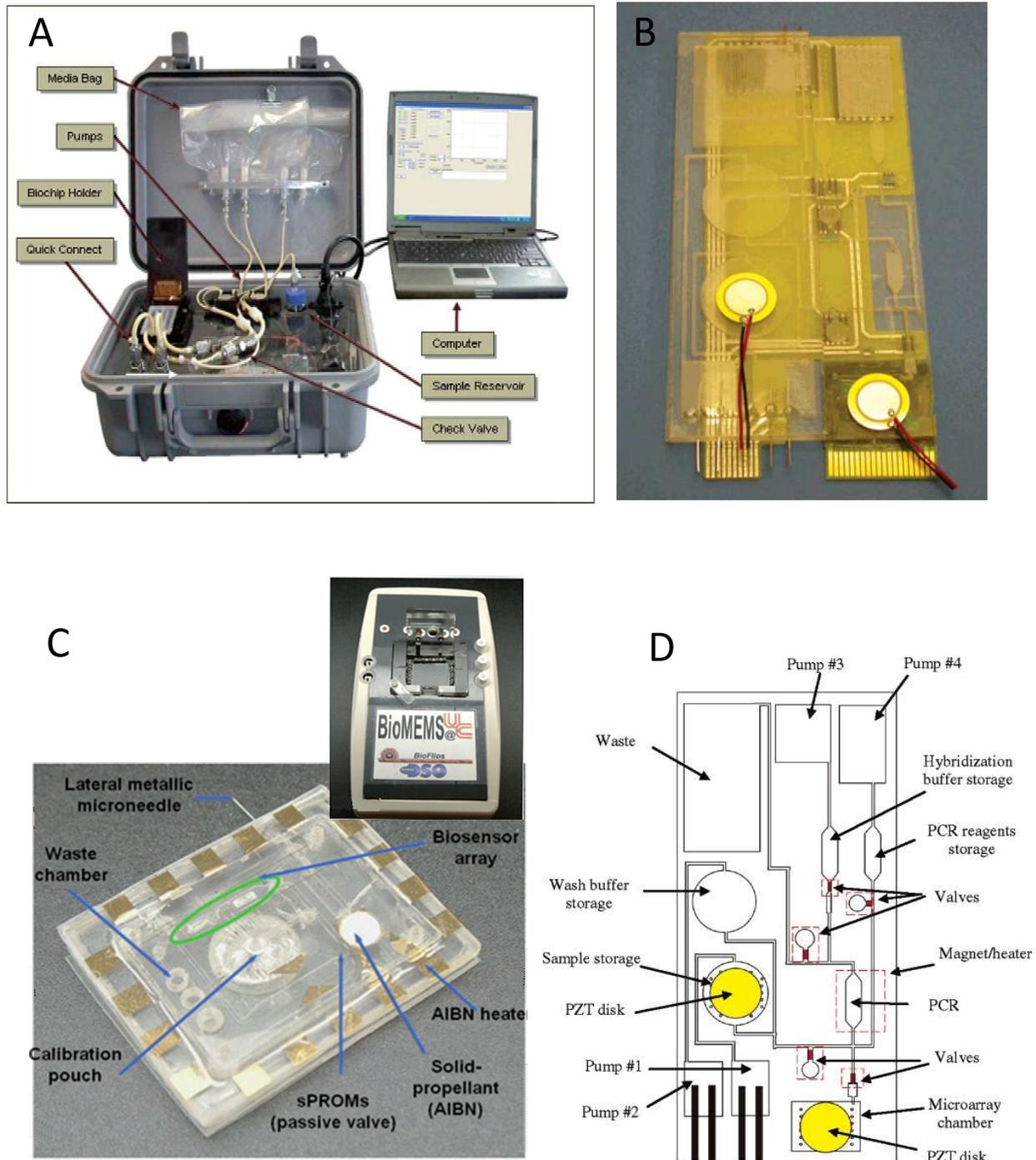


Figure 1- 18 : A : Photo du système embarqué développé par Curtis et al pour l'analyse de l'eau par test sur cellules (1-103). B : Photo du laboratoire sur puce conçu par Motorola pour l'analyse d'ADN et D : Son schéma fonctionnel (1-101). C : BioMEMS jetable élaboré par l'équipe de Han pour l'analyse de la composition du sang. Au dessus, le système électronique embarqué permettant la lecture des résultats et dans lequel est connecté le microdispositif (1-102).

V.1.2.2. Pour les analyses parallèles, statistiques et multiplexées

Le fait que les techniques de biodétection électrique soient technologiquement issues des microtechnologies et plus spécifiquement de la microélectronique permet de développer plus instinctivement des systèmes à l'intégration très poussée. Cette intégration, à la différence de celle évoquée dans le cadre des laboratoires sur puces, permet également la mise en parallèle de nombreux systèmes d'analyse. Sachant qu'en biologie, plus que dans tout autre domaine scientifique, l'étude du vivant nécessite une répétabilité et une reproductibilité des expériences très poussées, cette mise en parallèle est un atout clé des systèmes miniaturisés de détection électrique. La mise en réseau de détecteurs peut aussi permettre d'étudier des cellules de façon multiplexée (études simultanées de différents agents en parallèle) ou statistiques (répétitions simultanées de la même expérience pour obtenir des données sur sa variabilité).

Ceriotti et al. ont notamment réussi à intégrer des réseaux de peignes interdigités au fond de chaque puits d'une plaque de culture 96 puits, des plaques couramment utilisées en biologie pour des expériences parallèles réclamant une grande reproductibilité ou un multiplexage paramétrique important (1-104) (Figure 1-19.A). Les électrodes sont réalisées par lithographie classique sur une plaque de céramique qui est ensuite fixée au dessous d'une plaque de culture 96 puits. Une fois les cellules mises en culture, le dispositif est connecté à un appareil commercial de la société Bionas dirigée par Ehret. Des tests de cytotoxicité ont ainsi été menés permettant de déterminer les coefficients d' IC_{50} (cf lexique) de divers agents toxiques. Ce type de système permet d'automatiser des analyses statistiques ou des expériences réclamant un multiplexage important des paramètres environnementaux cellulaires afin de les effectuer à très haut débit.

En 2009, Elsholz et al. ont réalisé un dispositif permettant la détection d'ADN de quatre bactéries pathogènes différentes en analysant le produit de leur réaction de PCR par ampérométrie (1-105) (Figure 1-19.B). Ce bioMEMS en silicium intègre dans chacun des seize puits un réseau circulaire d'électrodes interdigitées. Ces électrodes sont fonctionnalisées avec des sondes spécifiques des différents agents pathogènes. Au lieu d'utiliser des agents fluorescents, Elsholz et al. ont fonctionnalisé les ADN issus des réactions de PCR avec de la biotine. Si l'ADN se fixe à une sonde, la biotine va réagir avec une enzyme présente dans les

puits pour libérer des ions par oxydo-réduction. Ce sont ces ions libérés spécifiquement qui sont détectés par ampérométrie.

Les techniques d'analyse des réactions de PCR utilisent habituellement des marqueurs fluorescents. Une analyse optique simultanée des résultats de PCR issus de différents agents pathogènes inconnus nécessiterait donc l'utilisation de marqueurs fluorescents à des longueurs d'onde distinctes, ce qui compliquerait la mise en place d'une détection multiplexée. Ce bioMEMS permet ici de détecter simultanément, en temps réel et de façon automatique quatre agents pathogènes sur un même dispositif en vingt-sept minutes, ce qui représente une durée d'analyse extrêmement faible comparée aux méthodes optiques classiques (plusieurs heures).

L'utilisation de réseaux d'électrodes peut aussi être un avantage d'un point de vue statistique, notamment pour diminuer la variabilité des analyses cellulaires. En effet, les cellules biologiques sont des objets d'études extrêmement instables et difficilement contrôlables. Lors de l'étude de culture cellulaire, il peut être intéressant d'enregistrer simultanément les signaux électriques issus de différents endroits du tapis cellulaire. Si les électrodes sont reliées entre elles, les signaux électrochimiques sont ainsi directement moyennés et la variabilité causée par l'inhomogénéité des cellules diminuée.

Pour exemple, Wang et al. ont réalisé en 2008, un système comprenant 49 électrodes circulaires entourant une contre électrode centrale pour mesurer par impédancemétrie la migration cellulaire (1-106) (Figure 1-19.C). Pour cela, une monocouche auto assemblée de molécules inhibant l'adhésion cellulaire est déposée à l'extrémité de ces 49 électrodes. Un courant continu est ensuite appliqué à l'aide d'un fil de platine plongé dans la chambre de culture cellulaire en PDMS pour détacher ces couches des électrodes et permettre la migration cellulaire sur l'extrémité des 49 électrodes. Le signal électrochimique résultant est ainsi directement moyenné sur 49 mesures simultanées permettant une meilleure reproductibilité et une plus faible variabilité des mesures.

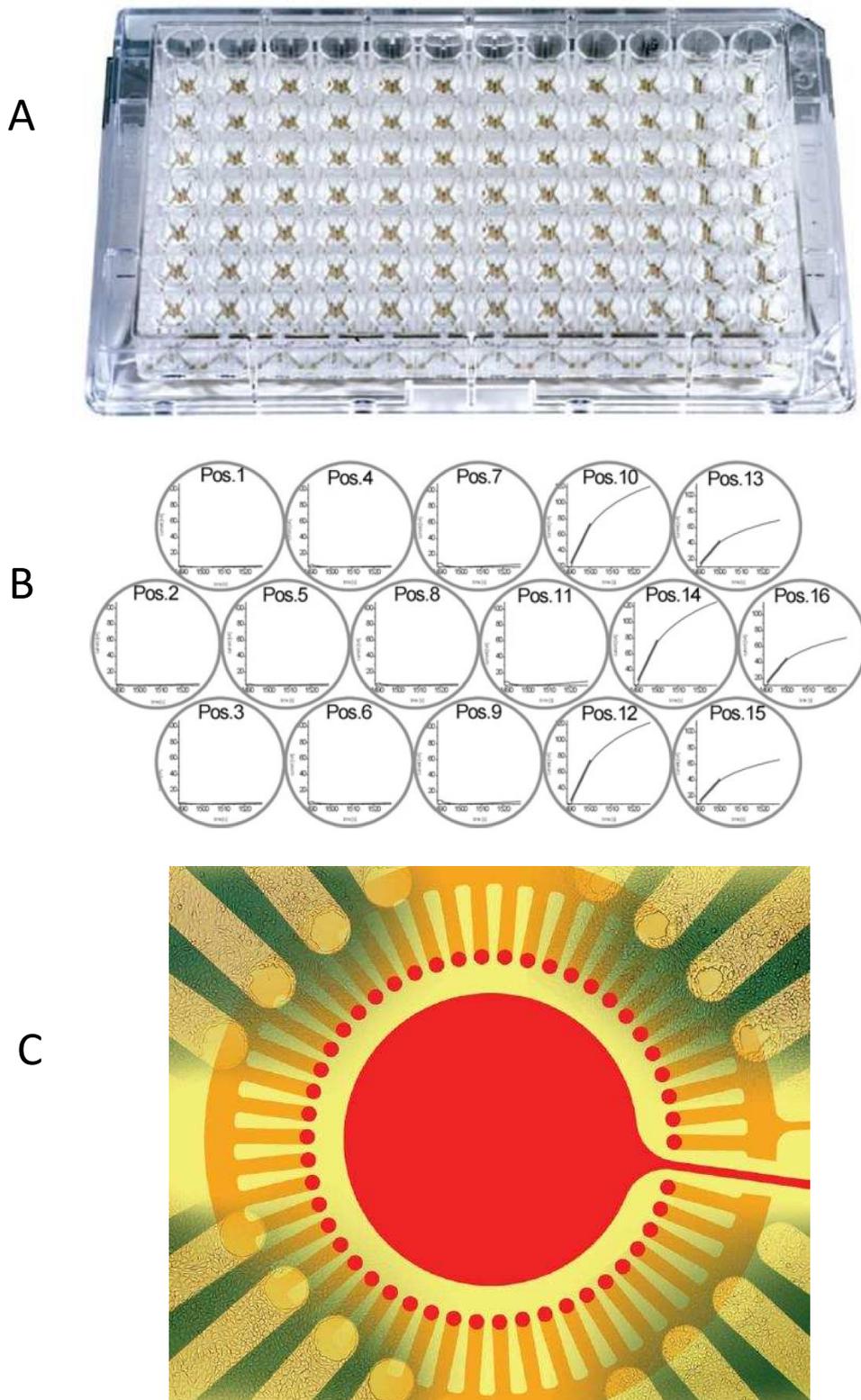


Figure 1- 19 : A: Photo du dispositif développé par Ceriotti et al. intégrant des réseaux de microélectrodes interdigitées dans une plaque 96 puits. (1-104) B: Cinétique des courants obtenus simultanément sur les 16 puits du dispositif de Elsholz et al. pendant l'injection d'un ADN bactérien. Seul les puits spécifiques réagissent. (1-105) C: Photo du réseau d'électrodes développé par Wang et al. La contre électrode est au centre.. (1-100)

V.1.3. Résolution spatiale facilement modulable

Le champ de détection d'un biocapteur électrique dépend des dimensions des électrodes et de la distance les séparant. De manière simplifiée, plus les électrodes sont de petites dimensions et rapprochées, plus le champ électrique est confiné. Avec le développement des techniques de fabrication issues des micro et nano technologies, il est devenu aisé de dimensionner les électrodes à l'échelle des éléments biologiques étudiés.

V.1.3.1. A l'échelle micrométrique : étude de cellules uniques

L'étude électrique de la cellule unique a été réalisée pour la première fois avec la technique de patch-clamp. Dorénavant, avec le développement des micro et nanotechnologies, les électrodes peuvent être facilement dimensionnées à l'échelle de la cellule unique de manière intégrée avec des niveaux de sensibilité suffisant.

Les techniques sans marquages non électrique utilisent des capteurs à la réalisation plus complexe. Leur miniaturisation pour l'étude d'objet unique n'est donc pas aussi triviale. Parmi ces autres méthodes, à notre connaissance, seuls les détecteurs à poutres suspendues sont suffisamment sensibles pour permettre la détection d'une unique bactérie (cf préambule).

S'inspirant de la technique de patch-clamp, Han et Frazier ont réalisé un microsystème comprenant un réseau de cavités pour cellules chromaffines bovines dans lesquelles sont intégrées les électrodes de mesures (1-107) (Figure 1-20.C.). Les cellules sont conduites dans les pièges à l'aide de microcanaux en PDMS. Lorsque la cellule passe au dessus d'une cavité, une pression négative est appliquée au travers de celle-ci pour y coincer la cellule, le tout se faisant à l'aide d'une observation microscopique simultanée. En injectant des réactifs bloquant sélectivement les canaux ioniques de potassium ou de calcium, Frazier a ainsi mesuré quantitativement par impédancemétrie l'influence de chaque type de canaux sur la signature électrique des cellules.

Hua et Pennell ont eux isolé des cellules MDCK à l'aide d'un obstacle mécanique intégré au sein d'un canal microfluidique et de l'injection d'une suspension de cellules à la concentration judicieusement ajustée (1-108) (Figure 1-20.A. et B.). Ce piège est lui entouré successivement de deux électrodes de mesures puis de deux autres électrodes d'excitation (mesure quatre

points). En injectant des solutions isotoniques et hypotoniques, ils ont ainsi fait varier le volume de la cellule et mesurer cette variation de volume par impédancemétrie à l'aide d'un détecteur synchrone.

L'équipe de Baudenbacher a réussi à isoler des myocytes cardiaques de souris au sein d'un canal microfluidique en injectant la suspension de myocytes dans un canal principal et en appliquant une pression négative dans un canal perpendiculaire (1-109). En intégrant en dessous de ce canal de capture des électrodes planaires de mesure et dans le canal principal rempli de liquide de culture, une électrode de référence, ils ont mesuré les contractions et donc le potentiel d'action extracellulaire du myocyte .

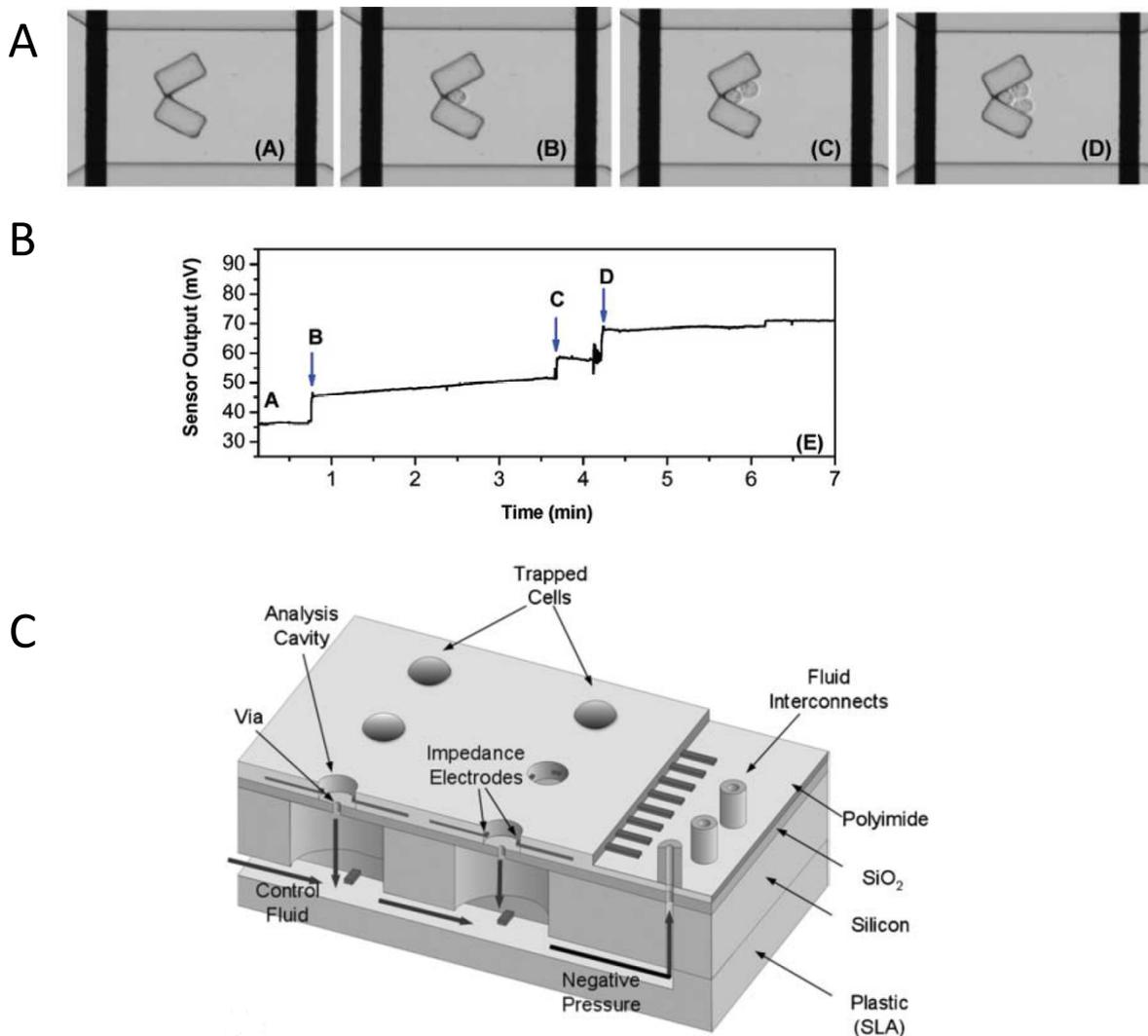


Figure 1- 20 : A: Image microscopique des cellules capturées par le système de Hua et Penell. B: Modification de la résistance de ce système pendant la capture des cellules. (1-102) C: Schéma du système développé par l'équipe de Frazier. (1-107)

V.1.3.1. A l'échelle nanométrique

Les nanofils et les nanotubes représentent un potentiel énorme pour les domaines de l'énergie, des télécommunications ou de la biologie. Ces nanoobjets sont majoritairement synthétisés par des techniques chimiques (i.e. approche bottom-up) comme la méthode de croissance VLS pour Vapeur-Liquide-Solide pour les nanofils (1-110) et le dépôt chimique en phase vapeur (CVD, pour chemical vapor deposition) pour les nanotubes (1-111). Ils peuvent aussi être réalisés avec les techniques issues de la microélectronique (i.e. approche top-down), comme la photolithographie et la gravure humide (1-112). Ils ont de plus été caractérisés électriquement (1-113). Leur association aux biotechniques électriques s'est ainsi faite plus facilement et rapidement qu'avec les autres domaines de biodétection (optique, mécanique ou acoustique).

Les nanofils de silicium et les nanotubes de carbones ont l'avantage de présenter un rapport surface sur volume très important. Considérant que toute leur surface est potentiellement utilisable pour une biodétection, cela leur confère un rapport signal sur bruit très important et un intérêt tout particulier. Leurs dimensions les rendent parfaitement adaptés à la détection de particules biologiques plus petites que les cellules comme de l'ADN ou des protéines. Ils possèdent en effet une faible longueur de Debye (cf lexique). L'équipe de Lieber est certainement le groupe de recherche dont le savoir faire dans la fabrication, la manipulation et l'utilisation des nanofils est le plus unanimement reconnu. En 2005, il a utilisé des transistors à effet de champ à nanofils pour détecter des protéines caractéristiques du cancer de la prostate et plus spécifiquement la télomérase, une protéine exprimée par 80% des cellules cancéreuses (1-114) (Figure 1-21.A.). Le nanofil est connecté entre la source et le drain afin de servir de canal de conduction. Les modulations de tensions de grille sont dues aux protéines se fixant au nanofil. Selon le type de nanofil, p ou n, les protéines négativement chargées vont provoquer respectivement une augmentation ou une diminution de la conductance, c'est-à-dire une accumulation ou une déplétion des charges. Sur une même puce, ils peuvent ainsi intégrer 200 réseaux de transistors pour réaliser des analyses comparatives simultanées.

Les nanotubes peuvent également être utilisés sous la forme de transistors pour des biodétections. En 2007, Maehashi et al. ont réalisé des transistors à base de nanotubes pour la détection d'immunoglobine IgE (1-115) (Figure 1-21.B.). Les biocapteurs électriques intégrés destinés à la détection de protéine sont classiquement fonctionnalisés avec des anticorps. Les transistors développés par Maehashi sont fonctionnalisés avec des aptamères (cf lexique).

L'aptamère ici utilisé pour capturer la protéine a une longueur de 4 nm. Sachant que la longueur moyenne d'un anticorps est de 12 nm, cette aptamère présente l'avantage de fixer la protéine au nanotube à une moindre distance, au sein de la zone de double couche (cf lexique). La comparaison de la technique de fixation avec anticorps et aptamère montre bien que l'utilisation d'aptamère permet une détection de la protéine encore plus sensible. Cette étude montre le potentiel prometteur des transistors à nanotubes et nanofils pour la détection sans marquage de protéines et d'ADN.

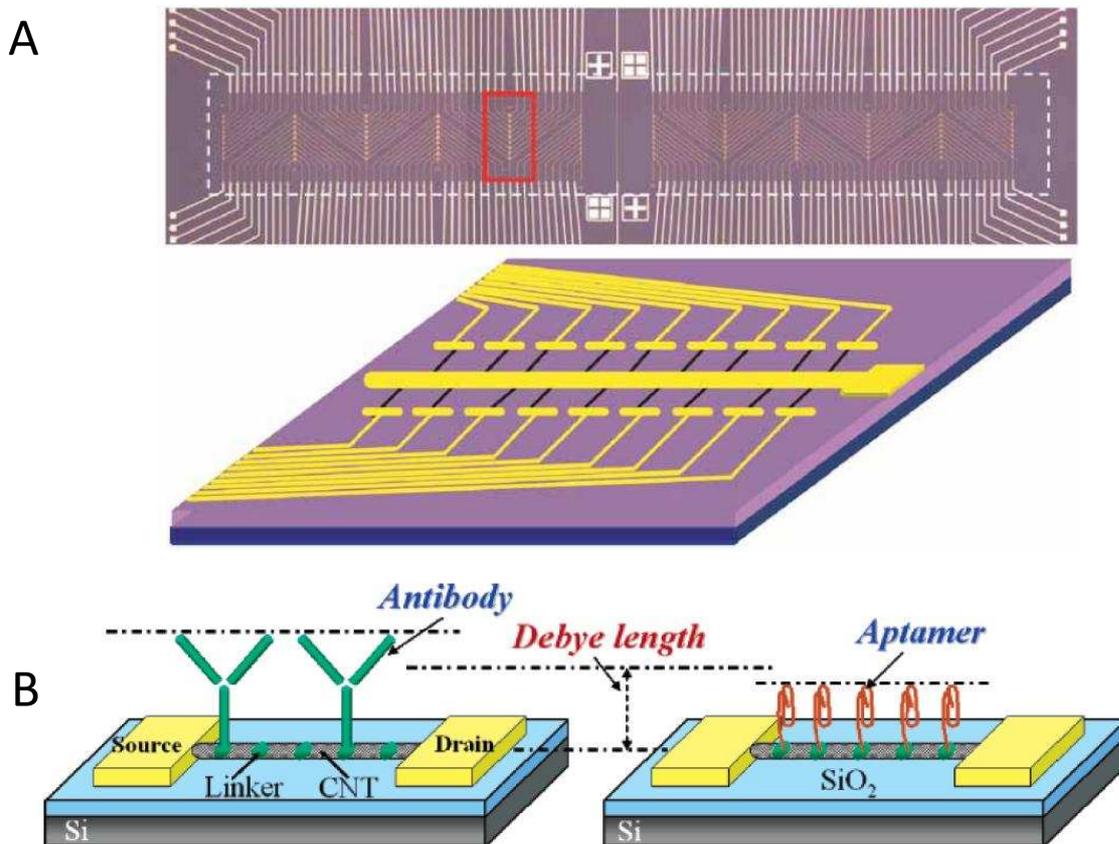


Figure 1- 21 : A: Photo du réseau de transistors à effets de champs à nanofils développée par l'équipe de Lieber. (1-114) Le schéma du dessous correspond à l'encadré rouge de la photo. B: Représentation schématique d'un transistor à effet de champs à nanotube fonctionnalisé avec des anticorps et des aptamères comme réalisé par Maehashi et al. (1-115)

V.1.4. Diversité des cellules analysables par technique électrique

Les électrodes nécessaires aux biodétections électriques miniaturisées peuvent présenter aisément de très nombreuses géométries, configurations ou structures. La mesure électrique ne nécessite en effet rien d'autre qu'un matériau aux propriétés électriques connues (semi-conducteur, métal ou diélectrique), des interconnexions adaptées et un matériel de mesure adéquate. Cette simplicité et cette variété de mise en œuvre permet, plus que tout autre type de biocapteurs, de concevoir des systèmes d'analyse dédiés à de très nombreux types de matériels biologiques.

Les biodétecteurs électriques peuvent bien entendu être utilisés pour étudier des cultures cellulaires. Une des applications aujourd'hui les plus répandues de ce type de système est le capteur à base de cellule (cf lexique). Il est en effet assez facile de mesurer par impédancemétrie les effets d'agents cytotoxiques sur une culture de cellules : les cellules étant isolantes aux basses fréquences, leur détachement augmente l'intensité du courant. Ce genre de microsystèmes permet la détermination quasi automatique des coefficients d'IC₅₀ de tels réactifs. Mesurant l'intérêt des analyses à très haut débit rendues possibles par l'intégration de tels biodétecteurs électriques, quelques entreprises ont développé des systèmes commerciaux. Il est pertinent de remarquer que bon nombres de ces entreprises ont été fondées par des universitaires confiant dans le potentiel économique de tels systèmes. Nous pouvons notamment citer : ACEA Biosciences (1-116,1-117) (Figure 1-22.B.), Applied Biophysics (1-118,1-119) (créée par Ivar Giaever et Charles Keese), CellKey (1-120,1-121), Inphaze (1-122,1-123) (créée par Hans Coster et Terry Chilcott) et Bionas (1-124,1-125) (créée par Ralf Ehret). Les cellules souches commencent elles aussi à être caractérisées électriquement (1-126). Des réseaux de neurones ont été étudiés à l'aide de systèmes miniaturisés comme précédemment évoqués (1-57,1-58,1-59) mais également des neurones isolés (1-127) (Figure 1-22.D.).

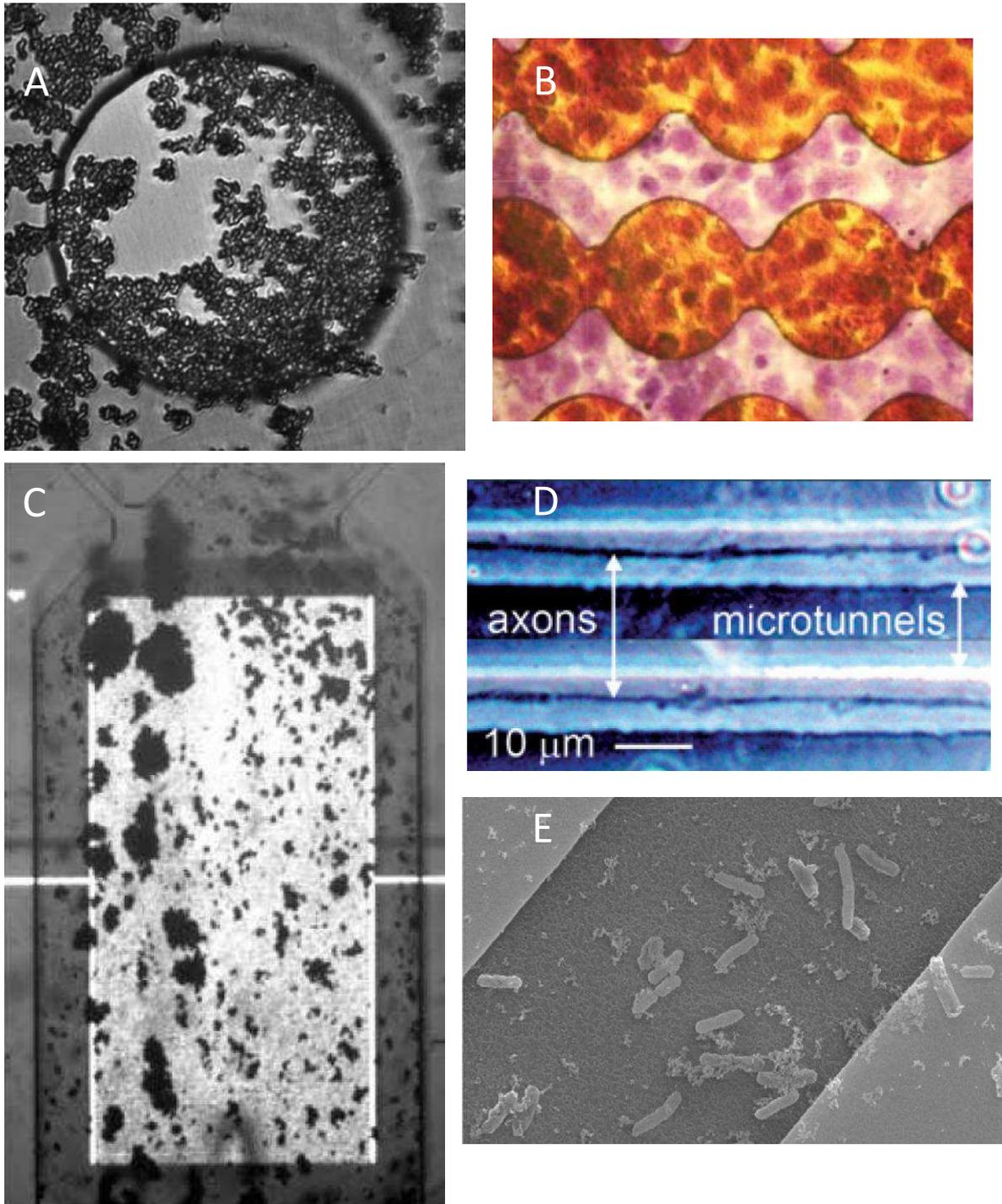


Figure 1- 22 : A: Photo de levure (*Saccharomyces cerevisiae*) cultivées sur une électrode de travail ronde en or (1-123). B: Photo de fibroblastes embryonnaires murins cultivés sur des électrodes rondes planaires (1-129). C : Photo d'un biofilm fongique cultivé sur une électrode de platine passivée (1-130). D : Axone d'un neurone cultivé dans un microcanal en PDMS (1-127). E : Bactéries d'*E. Coli* déposées entre deux électrodes d'or (1-131).

Les systèmes électriques peuvent également être facilement utilisés pour caractériser électriquement des cellules en suspensions comme des globules rouges (1-132) ou des lymphocytes (1-133). Les bactéries sont des systèmes cellulaires qui sont couramment étudiées dans des bioMEMS électriques : *E.coli* (1-131) (Figure 1-22.E.), des levures comme des *Saccharomyces cerevisiae* (1-128) (Figure 1-22.A.), des Salmonelles (1-134), ou même des biofilms de microorganismes comme des biofilms fongiques (1-130) (Figure 1-22.C.). L'équipe d'Ertl a également caractérisé électriquement des virus (1-135).

A une échelle physiologique encore inférieure, Le Pioufle a réussi à synthétiser artificiellement des bicouches lipidiques membranaires au sein de micropuits et à les étudier par conductimétrie en intégrant en dessous de ces bicouches des électrodes planaires (1-136). L'équipe de Gijs a réussi à étudier précisément la cinétique des échanges ioniques au travers de la membrane d'un ovocyte de Xénope cultivé *in-vitro* dans leur biopuce (1-137). L'ADN est également une entité biologique étudiée avec grande attention au sein de la communauté bioMEMS. Pour exemple, l'équipe de Dong a réussi à déterminer les constantes cinétiques de la réaction d'hybridation de l'ADN par méthode électrique, sans utiliser de marqueurs (1-138). La détection de l'hybridation d'ADN peut également être utilisée pour capturer spécifiquement de l'ADN issu de virus dans une micropuce. Ce genre de bioMEMS peut ainsi être utilisé pour le dépistage d'infection virale (1-139). Les méthodes électriques peuvent être utilisées pour analyser des réactions immunitaires anticorps-antigène (1-140) ou des réactions protéiques (1-114).

Les biologistes peuvent être intéressés par l'utilisation des bioMEMS pour leur analyse cellulaire car toutes les expériences réalisées jusqu'ici avec ce type de dispositifs constituent une base de données importante pour la caractérisation électrochimique des différentes espèces biologiques.

V.2. Points faibles et améliorations envisageables

V.2.1. Problèmes liés à la reproductivité des mesures électrochimiques

Les signaux électrochimiques biologiques sont de faibles amplitudes comparés aux signaux couramment analysés en électronique plus classique. English et al. ont ainsi montré que le matériel courant d'électronique pouvait lui-même influencer la détermination de certains paramètres cellulaires électriques, déterminés à l'aide de circuit électrique équivalent, de par des effets capacitifs, l'influence de l'électrode de mesure (effet d'un pont diviseur) ou le recouvrement du bruit blanc (1-141). Le matériel électronique de mesure doit donc être choisi avec beaucoup d'attention. La commercialisation progressive de matériel dédié spécifiquement à la mesure électrochimique permettra d'éviter ce genre de problème.

Les signaux biologiques électrochimiques mesurés seront d'autant plus faibles que la microfluidique est souvent utilisée pour réduire la population de cellules analysées. Il est donc nécessaire de concevoir des systèmes très sensibles pour espérer récupérer un rapport signal sur bruit correct. De plus, les analyses se faisant sur du matériel vivant en constante évolution, il peut être difficile d'obtenir à l'identique des valeurs absolues représentatives de paramètres physiologiques. Pour exemple, les travaux de Frazier précédemment cités concernant l'étude des canaux ioniques de cellules uniques par impédancemétrie présentent des spectres d'impédance moyennés sur sept mesures mais aucuns écarts types (1-107). Constatant que certaines valeurs sont différentes de quelques pourcents seulement (notamment la phase) (Figure 1-23), il aurait été intéressant de confirmer les distinctions étudiées entre les différentes cellules avec davantage de données statistiques qui pourraient révéler d'éventuels recouvrements.

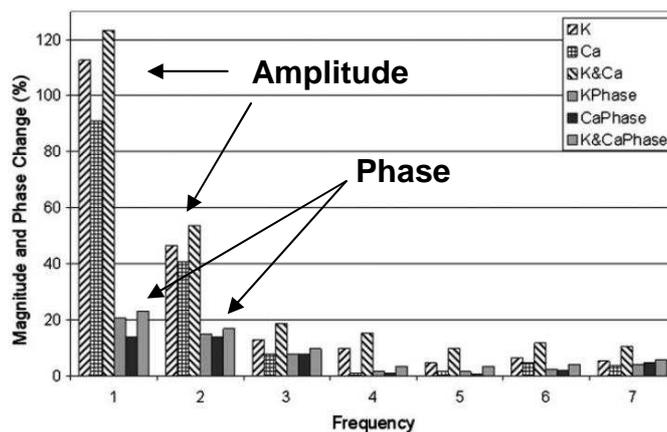


Figure 1- 23 : Différences observées entre des spectres d'impédance de cellules chromaffines bovines avec différents canaux ioniques bloqués (1-107). Résultats moyennés à partir de sept expériences réalisées par l'équipe de Frazier. Les écarts types ne sont pas indiqués.

Les travaux expérimentaux d'ingénierie biomédicale devraient ainsi présenter de façon plus fréquente ce genre d'analyses statistiques, même sur des figures cinétiques ou fréquentielles, en s'inspirant des multiples expériences réalisées en biologie pour confirmer la reproductivité d'un résultat (mesures au moins en triplicate). Le transfert industriel de nombreux bioMEMS développés académiquement pourraient être ainsi facilité en présentant des résultats à la reproductibilité quantitativement avérée, qualité première des instruments scientifiques commercialisables.

S'assurer d'effectuer des manipulations microfluidiques et électrochimiques dans des conditions expérimentales scrupuleusement identiques est une tâche difficile, d'autant plus lorsqu'elles emploient des techniques transversales combinées de manière souvent inédites. Pour exemple, Linderholm et Renaud avait déjà remarqué que les mesures électrochimiques d'eau purifiée était difficile à reproduire car sa contamination et donc sa variation de conductance sont des phénomènes difficilement évitable (1-142). A cette condition, il devient important de mettre en place des systèmes de mesure automatisés nécessitant le minimum d'intervention humaine, notamment lors de la manipulation d'entités biologiques.

Cette sensibilité accrue peut également ramener un bruit de fond indésirable qui peut perturber les mesures. Dans certaines conditions, notamment celles où le milieu cellulaire ramène une conductivité parasite élevée, il peut être judicieux d'ajuster précisément la sensibilité des biodétecteurs, sans forcément chercher à la rendre la plus élevée possible. Pour cela, l'utilisation de matériaux semi-conducteurs voire même diélectrique peut être pertinente, notamment si l'on veut mesurer préférentiellement des paramètres diélectriques (1-82).

V.2.2. Des dispositifs dont le coût peut encore être réduit

En 2008, la publication de Whitesides (1-143) sur les analyses microfluidiques réalisées sur papier a remis au goût du jour un point qui n'avait pas été si clairement et si efficacement adressé depuis longtemps: le coût des technologies laboratoires sur puces. En réalisant un dispositif dont le coût de fabrication n'excède pas 0,03 \$, Whitesides semble avoir trouvé le moyen d'exploiter le substrat peut être le moins onéreux. La Figure 1-24 est une photo du dispositif microfluidique en papier développé par son équipe.

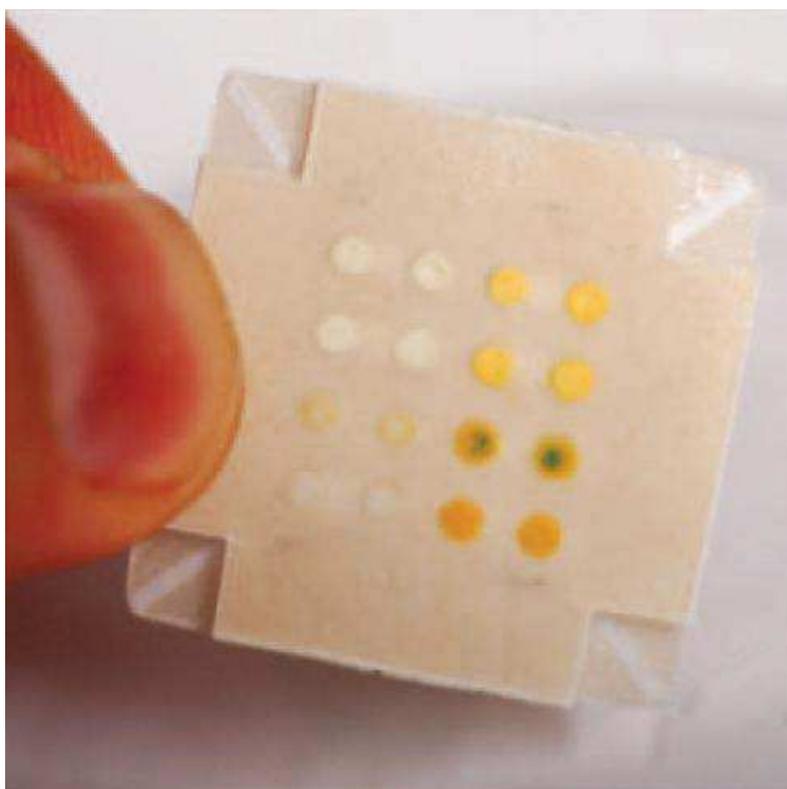


Figure 1- 24 : Dispositif microfluidique en papier développé par l'équipe de Whitesides.

Les coins du dispositif sont trempés dans quatre échantillons d'urine artificielle contenant des concentrations différentes d'albumine de sérum bovin et de glucose. Chaque colonne contient les résultats d'un échantillon. Les 2 lignes supérieures concernent la concentration en glucose et celles du bas la concentration en BSA. Les échantillons sont donc analysés en duplicate par colorimétrie

Le coût est en effet un paramètre primordial des biocapteurs : afin d'assurer une parfaite neutralité de l'instrumentation de mesure et éviter tout recouvrement ou mesures parasites, les biologistes préfèrent travailler avec des dispositifs à usage unique.

Certains travaux d'ingénierie biomédicale électrique s'attachent pourtant à montrer que leurs dispositifs peuvent être réutilisés plusieurs fois s'ils sont correctement « régénérés », souvent à l'aide de solutions acides, comme c'est le cas pour le biodétecteur impédimétrique de bactéries développé par Huang et al. (1-144). Si cette régénération des dispositifs est correctement caractérisée, elle peut permettre d'amortir le coût des bioMEMS classiques.

Une autre solution peut être de fabriquer des dispositifs avec certaines parties à usage unique et jetables. Pour exemple, Schüller et al. ont développé un dispositif dont la partie microfluidique servant à transporter les échantillons d'analyse (de l'ADN) peut être retirée sans toucher à la partie électronique, plus coûteuse (1-145). Pour réaliser cela, les deux parties sont fixées l'une sur l'autre hermétiquement à l'aide d'un socle en polycarbonate les serrant mécaniquement.

Actuellement les bioMEMS se basent principalement sur des dispositifs à la technologie mixte qui utilisent à la fois des matériaux polymères et des substrats tels que le silicium ou le verre.

Les bioMEMS entièrement polymériques sont encore rares : il est en effet délicat de réaliser des dépôts de films minces à leur surface. Mais leur faible coût et leur flexibilité permettent une facilité de manipulation et de transport inédite, ce qui les rend particulièrement attractifs. De plus en plus de groupes de recherche étudient donc actuellement la réalisation de bioMEMS réalisés entièrement sur des matériaux polymères.

Yan et al. ont par exemple réalisé des électrodes d'or (avec une couche d'accroche de titane) sur un substrat de polyéthylène téréphtalate (PET) qui est un matériau flexible et transparent (1-146). Ils ont pour cela utilisé la technique d'implantation ionique par immersion plasma qui leur a permis de déposer une couche de 30 nm d'or. Cette électrode flexible est par la suite intégrée au sein d'un système classique d'ampérométrie comprenant deux autres électrodes. Le système ainsi finalisé détecte la fixation du glucose à la surface de l'électrode flexible préalablement fonctionnalisée.

Abdelgawad et Wheeler ont également réalisé un système de déplacement EWOD sur un substrat de polyimide, utilisé habituellement pour les circuits imprimés (1-147) (Figure 1-25). Ils ont pour cela imprimé leur motif à l'aide d'une imprimante à jet d'encre sur une feuille de cuivre. Ce même substrat sert par la suite de masque pour exposer et graver le cuivre à la surface du substrat de polyamide (1-148).

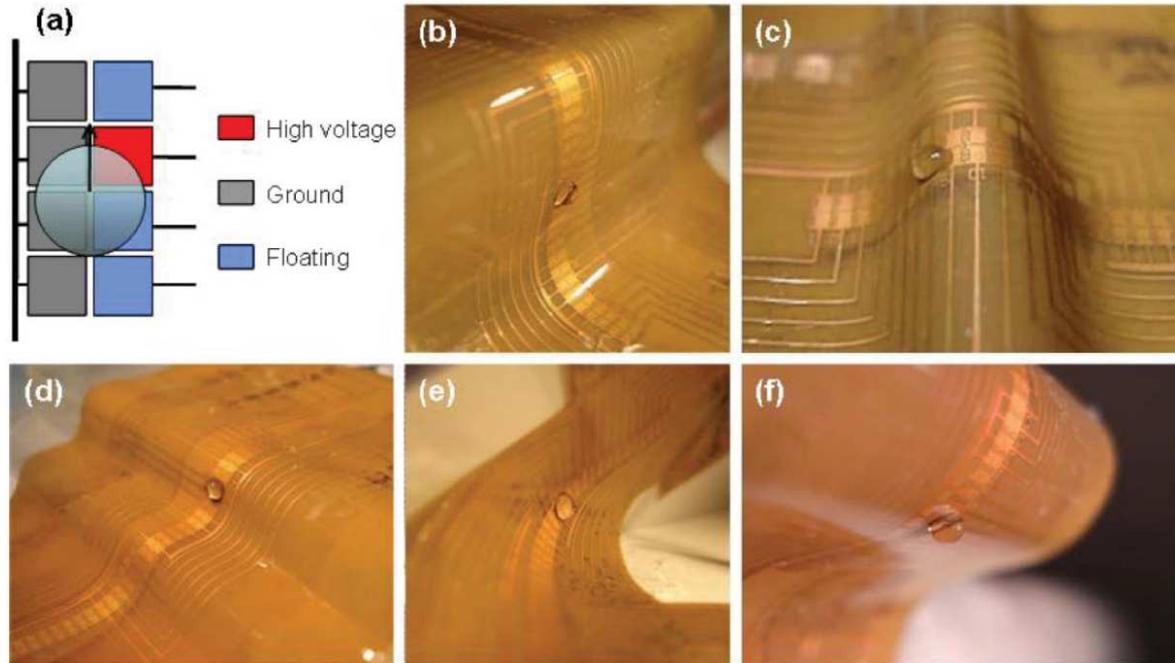


Figure 1- 25 : Différentes configurations de déplacements EWOD réalisés avec le dispositif conçu par Abdelgawad et Wheeler sur substrat souple. (1-147)

Le choix de matériaux des biodétecteurs est quant à lui assez contraint. La sensibilité aux courants de conduction peut être ajustée selon le matériau utilisé. Des semi-conducteurs (silicium dopé), des diélectriques (oxyde) ou des métaux peuvent être utilisés (principalement or, titane et platine ou noir de platine). Tous ces matériaux sont rares et restent donc chers. Par contre leurs techniques de dépôt peuvent être modifiées pour diminuer le coût de fabrication. Les techniques d'évaporation et de pulvérisation issues de la microélectronique pourraient ainsi être remplacées par des méthodes d'impression par jet d'encre conductrice.

Brischwein et al. ont comparé des mesures d'impédance de cultures cellulaires réalisées avec des électrodes en platine déposées soit par jet d'encre, soit par pulvérisation (1-149). Pour le dépôt par jet d'encre, un substrat d'alumine est utilisé. En effet, pour faire prendre l'encre de platine, le substrat et son motif doivent être recuit à 900°C. Pour le dépôt par pulvérisation, un substrat de verre est utilisé. Au final, l'impression par jet d'encre donne une épaisseur de

métal de 8 μm , la pulvérisation une épaisseur de 250 nm. L'épaisseur des électrodes déposées par jet d'encre ne semblent pas influencer la croissance des cellules. Lorsque les cellules sont stimulées à l'aide d'une protéine ou détruite avec un détergent, les électrodes déposées par jet d'encre présentent des variations d'impédance légèrement plus faibles que celles déposées par évaporation même si ces variations restent facilement observables. Il reste maintenant à combiner ces techniques de dépôt par impression avec l'utilisation de substrat souple comme le PDMS ou le PET pour espérer obtenir des bioMEMS au coût le plus faible possible.

V.2.3. Instrumentation macroscopique

De nombreuses publications présentant des dispositifs comme des laboratoires sur puce justifient ce dénominateur par le fait qu'ils concentrent sur un même substrat différentes étapes d'analyse biologique. Seulement, une étude attentive de leur procédure de mesure montre que la miniaturisation de ces techniques d'analyse se limite souvent à la structure contenant le matériel biologique et à la dimension réduite des détecteurs ou systèmes de manipulation environnant. La majeure partie des bioMEMS comprennent en effet des interconnexions macroscopiques les reliant à un matériel expérimental hors-dispositif (off-chip) qui est lui macroscopique. Les plus fréquemment retrouvés sont des générateurs électriques, des microscopes optiques, des poussettes seringues, des ordinateurs ou des appareils de mesure commerciales (impédancemètre, conductimètre, etc...). L'intégration de tel matériel n'est souvent pas discutée car elle est clairement problématique : elle nécessiterait de nombreuses compétences transversales et bien d'avantage de ressources humaines.

La réalisation concrète d'un laboratoire sur puce permettant de vraies analyses sur site, au chevet du patient (point of care en anglais), *in situ* (cf lexique) ou *in vivo* doit pourtant passer par ces étapes d'intégration élargies. On imagine en effet difficilement réaliser une analyse sur site de la présence d'une bactérie en déplaçant avec soi un conductimètre et des poussettes seringues, devant eux même être reliés au secteur. De même il paraît difficile qu'un patient désirent effectuer lui-même son diagnostic à domicile dispose de tels appareils. Enfin, les nouveaux instruments interdisciplinaires proposés aux biologistes doivent englober tout ce matériel de manipulation pour devenir réellement ergonomiques et s'intégrer facilement au sein de leur équipement de recherche actuel.

Pour exemple, l'équipe de Kim a réalisé un dispositif dit « intégré » pour la détection de particules micrométriques présentes dans l'air (1-150). Seulement le dispositif intégré nécessite l'emploi d'un purificateur d'air, d'un atomiseur, d'un filtre (HEPA) et d'un climatiseur pour générer les particules à analyser (Figure 1-26). Les particules sont ensuite filtrées selon leur taille hors dispositif avec un granulomètre. Seules les particules dont le diamètre est inférieur à 600 nm sont ici conservées. La concentration des particules injectées est en même temps déterminée. Après cela, les particules sont enfin injectées dans le microdispositif qui comprend véritablement deux éléments intégrés : un « impacteur virtuel » et un élément corona. L'impacteur virtuel permet de séparer en deux flux distincts les particules au sein du dispositif. Cet impacteur est constitué de deux canaux perpendiculaires dont les dimensions sont rigoureusement calculées selon des équations aérodynamiques et fluidiques. Le dimensionnement de ces canaux font que les plus petites particules se dirigeront préférentiellement dans le canal perpendiculaire alors que les plus grandes se dirigeront vers l'autre extrémité du canal, en vis-à-vis de l'entrée. Après ce tri, les plus petites particules sont dirigées vers les éléments corona qui vont ioniser l'air entourant les particules. Pour réaliser cet ionisation, une électrode en pointe est utilisée en vis-à-vis d'une électrode plane et le tout est connecté à une alimentation externe. Après cela une autre électrode reliée à un électromètre externe va mesurer la charge des particules afin de caractériser leur rapport dimension-charge.

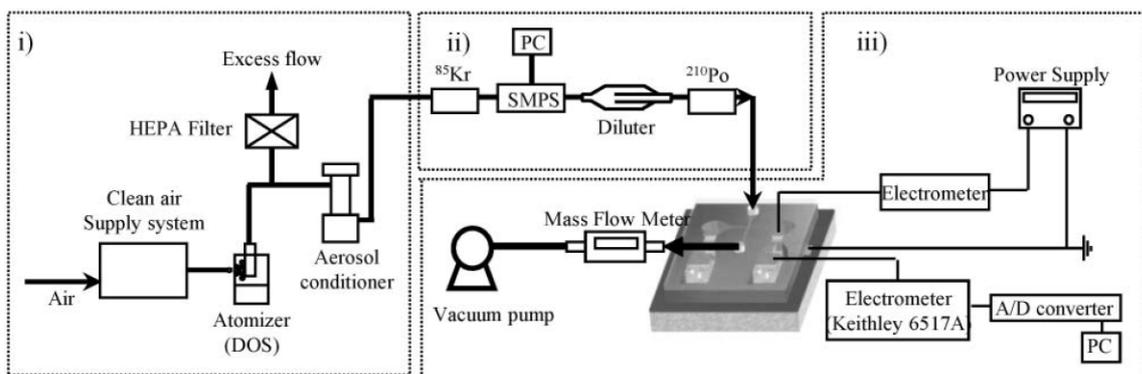


Figure 1- 26 : A: Schéma de la manipulation conçue par l'équipe de Kim (1-150).

Cet exemple montre bien que malgré la miniaturisation de certains composants, bon nombre de laboratoires sur puce ne peuvent se passer d'instruments routiniers qui ne sont pas encore miniaturisés ou miniaturisables.

Un autre exemple, plus en lien avec les travaux ici présentés, est celui des travaux de Odijk et al (1-151). Ceux-ci ont réalisé un bioMEMS permettant d'oxyder ou réduire des substances chimiques. Pour caractériser leur dispositif, ils ont étudié l'influence de diverses vitesses de flux avec des voltammogrammes cycliques des réactifs. La Figure 1-27 illustre le matériel nécessaire pour réaliser cette manipulation électrochimique: un pousse seringue, une valve, un potentiomètre extérieur, des réserves de réactifs et un ordinateur permettant d'enregistrer les mesures. La lampe UV, l'UV mètre et la cellule de mesure servent eux à quantifier l'efficacité de l'oxydation par spectrométrie. Comme la plupart des mesures électrochimiques réalisées en microfluidique, la biopuce ne peut être utilisée sans un pousse seringue et un matériel macroscopique de mesure électrique. Borholder, cité dans le paragraphe IV (1-84), avait lui réalisé son propre système de mesure d'impédance entièrement intégré sur un circuit imprimé, permettant d'y insérer son dispositif afin d'obtenir un système plus ergonomique.

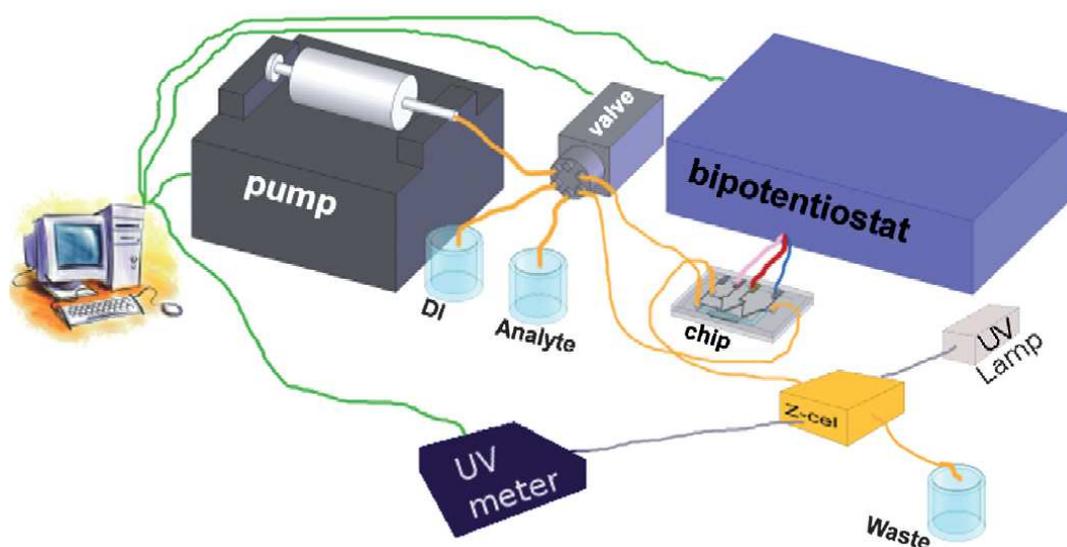


Figure 1- 27 : Schéma de la manipulation réalisée par Odijk et al.. (1-151)

Concernant les mesures sur cellules, comme les analyses à base de cellules, il reste encore compliqué d'intégrer l'incubateur de culture permettant le bon paramétrage des conditions de culture (CO_2 , température, humidité). Souvent le micro-dispositif est placé au sein d'un incubateur et le reste du matériel d'expérimentation placé à l'extérieur via des connectiques électriques et fluidiques consécutivement longs.

Les travaux de Lin et al. (1-152) dont l'installation expérimentale est présentée en Figure 1-28 illustrent bien cette contrainte. Cette étude s'intéresse à la mesure par impédancemétrie de la culture cellulaire 3D de fibroblastes dans des gels de Polyéthylène Glycol photo-réticulés. Le système d'électrodes micrométriques doit être placé dans un incubateur macroscopique.

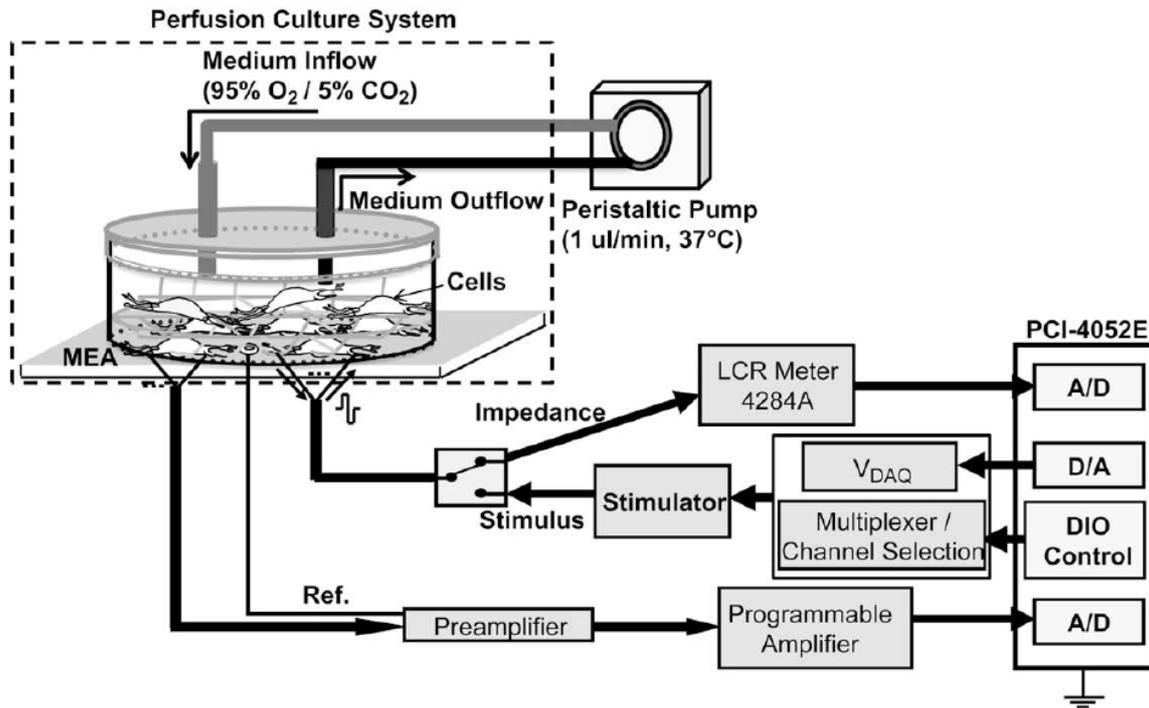


Figure 1- 28 : Schéma de la manipulation développée par Lin et al.. (1-152)

Le contre-exemple pourrait être celui de Curtis et al., (dont les travaux ont été précédemment cités en IV.1.2.1. (1-103), cf Figure 1-18.A) qui, sans atteindre les dimensions des laboratoires sur puce, ont réussi à fabriquer un incubateur embarqué en intégrant des éléments chauffants, des contrôleurs de pH et des solutions de culture cellulaire dans une valise.

Conclusion du chapitre 1

Dans ce chapitre, nous avons étudié les travaux majeurs précurseurs des bioMEMS actuels. Nous avons vu que jusqu'au milieu du 19^e siècle, les courants électrochimiques biologiques étaient étudiés à l'échelle de l'organe. A la même époque, la théorie cellulaire a été formulée. Les principales techniques de marquages se sont développées pendant la deuxième partie du 20^e siècle : l'immunomarquage et la protéine fluorescente verte. Pour palier les défauts optiques des marqueurs actuels, de nouveaux marqueurs sont actuellement développés : les boîtes quantiques et cristaux photonique 3D. Pour éviter le caractère invasif de ces méthodes, les techniques sans marquages sont également étudiées.

Nous avons vu les travaux d'électrophysiologie moderne qui ont établi les principes théoriques actuels souvent appliqués dans les bioMEMS. Fricke puis Schwan ont déterminé les différentes dispersions diélectriques des tissus. Cole a proposé le CPE pour modéliser les mesures électrochimiques des cellules. Hodgkin et Huxley ont déterminé l'existence des canaux ioniques. Nous nous sommes également intéressés à des outils majeurs de l'électrophysiologie moderne comme la chambre de Hüssing et la technique de Patch Clamp.

Nous avons étudié l'évolution de la microélectronique vers la microfluidique avec l'invention du premier transistor et du premier microsystème, les premières applications des microtechnologies pour la biologie et le premier système microfluidique. Nous avons vu les principaux facteurs qui ont provoqué le développement exponentiel de la microfluidique comme la course à la génomique et l'implication importante de la DARPA. Nous avons également discuté des problèmes de transfert de ces techniques.

Nous avons succinctement présenté des techniques liées à la microfluidique comme les méthodes de lithographie douce et l'utilisation de matériaux polymère comme le PDMS et la SU-8. Nous avons ensuite présenté différents travaux précurseurs du domaine des bioMEMS comme les premiers systèmes MEA de Thomas, la confirmation apportée par Pine de l'intérêt de mesurer les signaux électriques extracellulaires et la caractérisation électrique de la croissance cellulaire effectuée par Giaever et Keese.

Nous avons enfin discuté de différents avantages des bioMEMS sur les autres techniques de détection intégrée sans marquage : l'absence d'étapes de transduction, l'association aux

techniques de déplacement, les différentes méthodes de caractérisation, l'intégration aisée, l'adaptabilité de la résolution spatiale et les différents type de cellules analysable. Nous avons finalement proposé différentes voies d'amélioration comme la reproductivité, le coût et l'intégration globale de l'interface de mesure.

Références du chapitre 1

- 1-1. Piccolino M. Animal electricity and the birth of electrophysiology: The legacy of Luigi Galvani. *Brain Research Bulletin*. 1998 Jul 15;46(5):381-407.
- 1-2. Cajavilca C, Varon J, Sternbach GL. Luigi Galvani and the foundations of electrophysiology. *Resuscitation*. 2009 Fév;80(2):159-162.
- 1-3. Moruzzi G. The electrophysiological work of Carlo Matteucci. *Brain Research Bulletin*. 1996;40(2):69-91.
- 1-4. Seyfarth E. Julius Bernstein (1839-1917): pioneer neurobiologist and biophysicist. *Biological Cybernetics*. 2006 Jan;94(1):2-8.
- 1-5. Baluska F, Volkmann D, Barlow PW. Eukaryotic Cells and their Cell Bodies: Cell Theory Revised. *Ann Bot*. 2004 Juillet 1;94(1):9-32.
- 1-6. Holme I. Sir William Henry Perkin: a review of his life, work and legacy. *Coloration Technology*. 2006;122(5):235-251.
- 1-7. Coons A, Creech H, Jones R. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. 1941 Jun;47(2):200-202.
- 1-8. Ramos-Vara JA. Technical Aspects of Immunohistochemistry. *Veterinary Pathology Online*. 2005 Juillet;42(4):405-426.
- 1-9. Shimomura O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology*. 1962;59(3):223-239.
- 1-10. RCSB Protein databank: Green Fluorescent Protein from *Aequorea Victoria* <http://www.rcsb.org/pdb/explore/explore.do?pdbId=1EMA>.
- 1-11. Uttamapinant C, White KA, Baruah H, Thompson S, Fernández-Suárez M, Puthenveetil S, et al. A fluorophore ligase for site-specific protein labeling inside living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Juin 15;107(24):10914-10919.
- 1-12. Weingart CL, Broitman-Maduro G, Dean G, Newman S, Peppler M, Weiss AA. Fluorescent Labels Influence Phagocytosis of *Bordetella pertussis* by Human Neutrophils. *Infect Immun*. 1999 Aoû;67(8):4264-4267.
- 1-13. Rapposch S, Zangerl P, Ginzinger W. Influence of Fluorescence of Bacteria Stained with Acridine Orange on the Enumeration of Microorganisms in Raw Milk. *J. Dairy Sci*. 2000 Déc 1;83(12):2753-2758.
- 1-14. Yu H, Mu Y, Nordenskiöld L, Stock G. Influence of Nitroxide Spin Labels on RNA Structure: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Journal of Chemical Theory and*

Computation. 2008 Oct 14;4(10):1781-1787.

- 1-15. MacCuspie RI, Nuraje N, Lee S, Runge A, Matsui H. Comparison of Electrical Properties of Viruses Studied by AC Capacitance Scanning Probe Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 2008 Jan 1;130(3):887-891.
- 1-16. Allison D, Sattenstall M. The influence of green fluorescent protein incorporation on bacterial physiology: a note of caution. *Journal of Applied Microbiology*. 2007 Aoû;103(2):318-324.
- 1-17. Feng Z, Chen W, Lee P, Liao K, Chan V. The influence of GFP-actin expression on the adhesion dynamics of HepG2 cells on a model extracellular matrix. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(26):5348-5358.
- 1-18. Medintz I, Uyeda H, Goldman E, Mattoussi H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nature Materials*. 2005 Jun;4(6):435-446.
- 1-19. <http://lamp.tu-graz.ac.at/~hadley/nanoscience/week2/2.html>.
- 1-20. Ballou B, Lagerholm BC, Ernst LA, Bruchez MP, Waggoner AS. Noninvasive imaging of quantum dots in mice. *Bioconjug. Chem*. 2004 Fév;15(1):79-86.
- 1-21. Sharma P, Brown S, Walter G, Santra S, Moudgil B. Nanoparticles for bioimaging. *Advances in Colloid and Interface Science*. 2006 Nov 16;123-126:471-485.
- 1-22. Asher SA, Alexeev VL, Goponenko AV, Sharma AC, Lednev IK, Wilcox CS, et al. Photonic crystal carbohydrate sensors: low ionic strength sugar sensing. *J. Am. Chem. Soc*. 2003 Mar 19;125(11):3322-3329.
- 1-23. Fricke H, Morse S. The electric resistance and capacity of blood for frequencies between 800 and 4frac12 million cycles. *J. Gen. Physiol*. 1925 Nov 20;9(2):153-167.
- 1-24. Maxwell JC (1873): *Treatise on electricity and magnetism*. Oxford University Press.
- 1-25. Wagner W (1914): *Explanation of the dielectric fatigue phenomena on the basis of Maxwell's concept*, Arch Electro Technol (Berlin).
- 1-26. Cole KS, Curtis HJ. Electric Impedance of the Squid Giant Axon During Activity. *J. Gen. Physiol*. 1939 Mai 20;22(5):649-670.
- 1-27. Hodgkin AL, Huxley AF. A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve. *J Physiol*. 1952 Aoû 28;117(4):500–544.
- 1-28. Hodgkin AL, Huxley AF. Resting and action potentials in single nerve fibres. *J Physiol*. 1945 Oct 15;104(2):176-195.
- 1-29. Schwan HP. Electrical properties of tissue and cell suspensions. *Adv Biol Med Phys*. 1957;5:147-209.

- 1-30. Markx GH, Davey CL. The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology*. 1999 Aoû;25(3-5):161-171.
- 1-31. Asami K, Hanai T, Koizumi N. Dielectric analysis of Escherichia coli suspensions in the light of the theory of interfacial polarization. *Biophys J*. 1980 Aoû;31(2):215–228.
- 1-32. Ussing HH, Zerahn K. Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. *Acta Physiologica Scandinavica*. 1951;23(2-3):110-127.
- 1-33. Schneeberger EE, Lynch RD. The tight junction: a multifunctional complex. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2004 Juin 1;286(6):C1213-1228.
- 1-34. European Working Group on CTFR expression, Virtual Repository, D.6.1. Cell Physiology, Ussing Chamber Technique, Overview: Transepithelial measurements using the Ussing chamber, Martin J. Hug
<http://central.igc.gulbenkian.pt/cftr/vr/physiology.html>.
- 1-35. Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1981;391(2):85-100.
- 1-36. Bryzek J. Impact of MEMS technology on society. *Sensors and Actuators A: Physical*. 1996 Aoû;56:1-9.
- 1-37. Roylance L, Angell J. A batch-fabricated silicon accelerometer. *Electron Devices, IEEE Transactions on*. 1979;26(12):1911-1917.
- 1-38. Carter SB. Haptotactic islands : A method of confining single cells to study individual cell reactions and clone formation. *Experimental Cell Research*. 1967 Oct;48(1):189-193.
- 1-39. Terry S, Jerman J, Angell J. A gas chromatographic air analyzer fabricated on a silicon wafer. *Electron Devices, IEEE Transactions on*. 1979;26(12):1880-1886.
- 1-40. Kulesh DA, Clive DR, Zarlenga DS, Greene JJ. Identification of interferon-modulated proliferation-related cDNA sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A*. 1987 Déc;84(23):8453-8457.
- 1-41. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray. *Science*. 1995 Oct 20;270(5235):467-470.
- 1-42. Full Moon Biosystems,
<http://www.fullmoonbiosystems.com/Microarray/cDNASlide.htm>.
- 1-43. Whitesides GM. The origins and the future of microfluidics. *Nature*. 2006 Juillet 27;442(7101):368-373.

- 1-44. Manz A, Graber N, Widmer H. Miniaturized total chemical analysis systems: A novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1990 Jan;1(1-6):244-248.
- 1-45. Auroux P, Iossifidis D, Reyes DR, Manz A. Micro Total Analysis Systems. 2. Analytical Standard Operations and Applications. *Analytical Chemistry*. 2002 Juin 1;74(12):2637-2652.
- 1-46. Vilkner T, Janasek D, Manz A. Micro Total Analysis Systems. Recent Developments. *Analytical Chemistry*. 2004 Juin 1;76(12):3373-3386.
- 1-47. Dittrich PS, Tachikawa K, Manz A. Micro Total Analysis Systems. Latest Advancements and Trends. *Analytical Chemistry*. 2006 Juin 1;78(12):3887-3908.
- 1-48. West J, Becker M, Tombrink S, Manz A. Micro total analysis systems: Latest achievements. *Analytical Chemistry*. 2008 Jun 15;80(12):4403-4419.
- 1-49. Thorsen T, Maerkl SJ, Quake SR. Microfluidic Large-Scale Integration. *Science*. 2002 Oct 18;298(5593):580-584.
- 1-50. Duffy DC, McDonald JC, Schueller OJA, Whitesides GM. Rapid Prototyping of Microfluidic Systems in Poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*. 1998 Déc 1;70(23):4974-4984.
- 1-51. Xia Y, Whitesides G. Soft lithography. *Annual Review of Materials Science*. 1998;28:153-184.
- 1-52. Lorenz H, Despont M, Fahrni N, Brugger J, Vettiger P, Renaud P. High-aspect-ratio, ultrathick, negative-tone near-UV photoresist and its applications for MEMS. *Sensors and Actuators A: Physical*. 1998 Jan 1;64(1):33-39.
- 1-53. Heuschkel MO, Guérin L, Buisson B, Bertrand D, Renaud P. Buried microchannels in photopolymer for delivering of solutions to neurons in a network. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 1998 Mai 30;48(1-3):356-361.
- 1-54. Proliferation of microfluidics in literature and intellectual property. *Lab Chip*. 2004;4(2):16N-20N.
- 1-55. Thomas CA, Springer PA, Loeb GE, Berwald-Netter Y, Okun LM. A miniature microelectrode array to monitor the bioelectric activity of cultured cells. *Experimental Cell Research*. 1972 Sep;74(1):61-66.
- 1-56. Pine J. Recording action potentials from cultured neurons with extracellular microcircuit electrodes. *J. Neurosci. Methods*. 1980 Fév;2(1):19-31.
- 1-57. Gross GW, Wen WY, Lin JW. Transparent indium-tin oxide electrode patterns for extracellular, multisite recording in neuronal cultures. *J. Neurosci. Methods*. 1985 Déc;15(3):243-252.
- 1-58. Droge M, Gross G, Hightower M, Czisny L. Multielectrode analysis of coordinated,

- multisite, rhythmic bursting in cultured CNS monolayer networks. *J. Neurosci.* 1986 Juin 1;6(6):1583-1592.
- 1-59. Gross GW, Rhoades B, Jordan R. Neuronal networks for biochemical sensing. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 1992 Jan;6(1-3):1-8.
- 1-60. Fromherz P, Offenhausser A, Vetter T, Weis J. A neuron-silicon junction: a Retzius cell of the leech on an insulated-gate field-effect transistor. *Science.* 1991 Mai 31;252(5010):1290-1293.
- 1-61. Grattarola M, Martinoia S, Massobrio G, Cambiaso A, Rosichini R, Tetti M. Computer simulations of the responses of passive and active integrated microbiosensors to cell activity. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 1991 Juin;4(3-4):261-265.
- 1-62. Giaever I, Keese CR. Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1984 Juin;81(12):3761-3764.
- 1-63. Giaever I, Keese CR. Use of Electric Fields to Monitor the Dynamical Aspect of Cell Behavior in Tissue Culture. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on.* 1986;BME-33(2):242-247.
- 1-64. Mitra P, Keese CR, Giaever I. Electric measurements can be used to monitor the attachment and spreading of cells in tissue culture. *BioTechniques.* 1991 Oct;11(4):504-510.
- 1-65. Giaever I, Keese CR. Fractal motion of mammalian cells. *Physica D Nonlinear Phenomena.* 1989 Sep 1;38:128-133.
- 1-66. Lo C, Keese CR, Giaever I. pH Changes in Pulsed CO₂ Incubators Cause Periodic Changes in Cell Morphology. *Experimental Cell Research.* 1994 Aoû;213(2):391-397.
- 1-67. Ghosh PM, Keese CR, Giaever I. Morphological response of mammalian cells to pulsed ac fields. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* 1994 Mai;33(2):121-133.
- 1-68. Kowolenko M, Keese CR, Lawrence DA, Giaever I. Measurement of macrophage adherence and spreading with weak electric fields. *J. Immunol. Methods.* 1990 Fév 20;127(1):71-77.
- 1-69. Tiruppathi C, Malik AB, Del Vecchio PJ, Keese CR, Giaever I. Electrical method for detection of endothelial cell shape change in real time: assessment of endothelial barrier function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1992;89(17):7919-7923.
- 1-70. Moy AB, Van Engelenhoven J, Bodmer J, Kamath J, Keese C, Giaever I, et al. Histamine and thrombin modulate endothelial focal adhesion through centripetal and centrifugal forces. *J. Clin. Invest.* 1996 Fév 15;97(4):1020-1027.
- 1-71. Ghosh P, Keese C, Giaever I. Monitoring electropermeabilization in the plasma

- membrane of adherent mammalian cells. *Biophysical Journal*. 1993 5;64(5):1602-1609.
- 1-72. Hadjout N, Laevsky G, Knecht DA, Lynes MA. Automated real-time measurement of chemotactic cell motility. *BioTechniques*. 2001 Nov;31(5):1130-1138.
- 1-73. Xiao C, Lachance B, Sunahara G, Luong JHT. Assessment of Cytotoxicity Using Electric Cell–Substrate Impedance Sensing: Concentration and Time Response Function Approach. *Analytical Chemistry*. 2002 Nov 1;74(22):5748-5753.
- 1-74. Lundien MC, Mohammed KA, Nasreen N, Tepper RS, Hardwick JA, Sanders KL, et al. Induction of MCP-1 Expression in Airway Epithelial Cells: Role of CCR2 Receptor in Airway Epithelial Injury. *Journal of Clinical Immunology*. 2002 Mai 1;22(3):144-152.
- 1-75. Phelps JE, DePaola N. Spatial variations in endothelial barrier function in disturbed flows in vitro. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2000 Fév 1;278(2):H469-476.
- 1-76. Lo C, Keese C, Giaever I. Impedance analysis of MDCK cells measured by electric cell-substrate impedance sensing. *Biophysical Journal*. 1995 Déc;69(6):2800-2807.
- 1-77. Wegener J, Sieber M, Galla H. Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*. 1996 Juillet 10;32(3):151-170.
- 1-78. Janshoff A, Wegener J, Sieber M, Galla H. Double-mode impedance analysis of epithelial cell monolayers cultured on shear wave resonators. *European Biophysics Journal with Biophysics Letters*. 1996;25(2):93-103.
- 1-79. Wegener J, Zink S, Rosen P, Galla H. Use of electrochemical impedance measurements to monitor beta-adrenergic stimulation of bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology*. 1999 Mai;437(6):925-934.
- 1-80. Wegener J, Keese C, Giaever I. Electric cell-substrate impedance sensing (ECIS) as a noninvasive means to monitor the kinetics of cell spreading to artificial surfaces. *Experimental Cell Research*. 2000 Aoû 25;259(1):158-166.
- 1-81. Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A, Stegbauer K, Wolf B. Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosensors and Bioelectronics*. 1997;12(1):29-41.
- 1-82. Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A, Wolf B. On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures. *Medical and Biological Engineering and Computing*. 1998 Mai 1;36(3):365-370.
- 1-83. Gimsa J, Wachner D. A unified resistor-capacitor model for impedance, dielectrophoresis, electrorotation, and induced transmembrane potential. *Biophysical Journal*. 1998 Aoû;75(2):1107-1116.
- 1-84. Borkholder, D. A., "Cell Based Biosensors Using Microelectrodes," Ph.D. Thesis,

Stanford University, CA, 1998.

- 1-85. Ayliffe H, Frazier A, Rabbitt R. Electric impedance spectroscopy using microchannels with integrated metal electrodes. *Microelectromechanical Systems, Journal of*. 1999;8(1):50-57.
- 1-86. Gawad S, Schild L, Renaud P. Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. *Lab Chip*. 2001;1(1):76-82.
- 1-87. Gawad S, Cheung K, Seger U, Bertsch A, Renaud P. Dielectric spectroscopy in a micromachined flow cytometer: theoretical and practical considerations. *Lab on a Chip*. 2004;4(3):241-251.
- 1-88. Cheung K, Gawad S, Renaud P. Impedance spectroscopy flow cytometry: On-chip label-free cell differentiation. *Cytometry Part A*. 2005 Jun;65A(2):124-132.
- 1-89. Erickson D, Li D. Integrated microfluidic devices. *Analytica Chimica Acta*. 2004 Avr 1;507(1):11-26.
- 1-90. Facer G, Notterman D, Sohn L. Dielectric spectroscopy for bioanalysis: From 40 Hz to 26.5 GHz in a microfabricated wave guide. *Applied Physics Letters*. 2001 Fév 12;78(7):996-998.
- 1-91. Heuschkel MO, Fejtl M, Raggenbass M, Bertrand D, Renaud P. A three-dimensional multi-electrode array for multi-site stimulation and recording in acute brain slices. *Journal of Neuroscience Methods*. 2002 Mar 15;114(2):135-148.
- 1-92. Gallant N, Capadona J, Frazier A, Collard D, Garcia A. Micropatterned surfaces to engineer focal adhesions for analysis of cell adhesion strengthening. *Langmuir*. 2002 Jul 9;18(14):5579-5584.
- 1-93. Wu J, Ben Y, Chang H. Particle detection by electrical impedance spectroscopy with asymmetric-polarization AC electroosmotic trapping. *Microfluidics and Nanofluidics*. 2005 Mai 1;1(2):161-167.
- 1-94. Liu C, Lin C, Chen L, Fan S, Chang H. An Affinity Sensor Improved by Ewod Actuator-Based Microfluidic Chip. *Biomedical Engineering-Applications Basis Communications*. 2009 Déc;21(6):461-465.
- 1-95. Keese CR, Wegener J, Walker SR, Giaever I. Electrical wound-healing assay for cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004 Fév 10;101(6):1554-1559.
- 1-96. Ferrari G, Gozzini F, Molari A, Sampietro M. Transimpedance Amplifier for High Sensitivity Current Measurements on Nanodevices. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*. 2009 Mai;44(5):1609-1616.
- 1-97. Maalouf R, Fournier-Wirth C, Coste J, Chebib H, Saïkali Y, Vittori O, et al. Label-Free Detection of Bacteria by Electrochemical Impedance Spectroscopy: Comparison to Surface Plasmon Resonance. *Analytical Chemistry*. 2007 Juillet 1;79(13):4879-

4886.

- 1-98. Wei D, Bailey MJA, Andrew P, Ryhanen T. Electrochemical biosensors at the nanoscale. *Lab Chip*. 2009;9(15):2123-2131.
- 1-99. Popovtzer R, Neufeld T, Ron EZ, Rishpon J, Shacham-Diamand Y. Electrochemical detection of biological reactions using a novel nano-bio-chip array. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2006 Déc 7;119(2):664-672.
- 1-100. Trivedi U, Lakshminarayana D, Kothari I, Patel N, Kapse H, Makhija K, et al. Potentiometric biosensor for urea determination in milk. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2009 Juin 18;140(1):260-266.
- 1-101. Liu RH, Yang J, Lenigk R, Bonanno J, Grodzinski P. Self-Contained, Fully Integrated Biochip for Sample Preparation, Polymerase Chain Reaction Amplification, and DNA Microarray Detection. *Analytical Chemistry*. 2004 Avr 1;76(7):1824-1831.
- 1-102. Do J, Lee S, Han J, Kai J, Hong C, Gao C, et al. Development of functional lab-on-a-chip on polymer for point-of-care testing of metabolic parameters. *Lab Chip*. 2008;8(12):2113-2120.
- 1-103. Curtis TM, Widder MW, Brennan LM, Schwager SJ, Schalie WHVD, Fey J, et al. A portable cell-based impedance sensor for toxicity testing of drinking water. *Lab Chip*. 2009;9(15):2176-2183.
- 1-104. Ceriotti L, Ponti J, Broggi F, Kob A, Drechsler S, Thedinga E, et al. Real-time assessment of cytotoxicity by impedance measurement on a 96-well plate. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2007 Mai 21;123(2):769-778.
- 1-105. Elsholz B, Nitsche A, Achenbach J, Ellerbrok H, Blohm L, Albers J, et al. Electrical microarrays for highly sensitive detection of multiplex PCR products from biological agents. *Biosensors & Bioelectronics*. 2009 Fév 15;24(6):1737-1743.
- 1-106. Wang L, Zhu J, Deng C, Xing W, Cheng J. An automatic and quantitative on-chip cell migration assay using self-assembled monolayers combined with real-time cellular impedance sensing. *Lab Chip*. 2008;8(6):872-878.
- 1-107. Han A, Frazier AB. Ion channel characterization using single cell impedance spectroscopy. *Lab Chip*. 2006;6(11):1412-1414.
- 1-108. Hua SZ, Pennell T. A microfluidic chip for real-time studies of the volume of single cells. *Lab Chip*. 2009;9(2):251-256.
- 1-109. Werdich AA, Lima EA, Ivanov B, Ges I, Anderson ME, Wikswo JP, et al. A microfluidic device to confine a single cardiac myocyte in a sub-nanoliter volume on planar microelectrodes for extracellular potential recordings. *Lab Chip*. 2004;4(4):357-362.
- 1-110. Wagner RS, Ellis WC. Vapor-Liquid-Solid Mechanism of Single Crystal Growth. *Appl. Phys. Lett*. 1964;4(5):89.

- 1-111. Cassell A, Raymakers J, Kong J, Dai H. Large scale CVD synthesis of single-walled carbon nanotubes. *JOURNAL OF PHYSICAL CHEMISTRY B*. 1999 Aoû 5;103(31):6484-6492.
- 1-112. Stern E, Klemic J, Routenberg D, Wyrembak P, Turner-Evans D, Hamilton A, et al. Label-free immunodetection with CMOS-compatible semiconducting nanowires. *Nature*. 2007 Fév 1;445(7127):519-522.
- 1-113. Ebbesen T, Lezec H, Hiura H, Bennett J, Ghaemi H, Thio T. Electrical conductivity of individual carbon nanotubes. *Nature*. 1996 Jul 4;382(6586):54-56.
- 1-114. Zheng G, Patolsky F, Cui Y, Wang WU, Lieber CM. Multiplexed electrical detection of cancer markers with nanowire sensor arrays. *Nat Biotech*. 2005 Oct;23(10):1294-1301.
- 1-115. Maehashi K, Katsura T, Kerman K, Takamura Y, Matsumoto K, Tamiya E. Label-free protein biosensor based on aptamer-modified carbon nanotube field-effect transistors. *Anal. Chem*. 2007 Jan 15;79(2):782-787.
- 1-116. <http://www.aceabio.com/index.htm>.
- 1-117. Glamann J, Hansen AJ. Dynamic detection of natural killer cell-mediated cytotoxicity and cell adhesion by electrical impedance measurements. *Assay Drug Dev Technol*. 2006 Oct;4(5):555-563.
- 1-118. <http://www.biophysics.com/>.
- 1-119. McCoy MH, Wang E. Use of electric cell-substrate impedance sensing as a tool for quantifying cytopathic effect in influenza A virus infected MDCK cells in real-time. *Journal of Virological Methods*. 2005 Déc;130(1-2):157-161.
- 1-120. <http://www.cellkey.com/>.
- 1-121. McGuinness RP, Proctor JM, Gallant DL, van Staden CJ, Ly JT, Tang FL, et al. Enhanced Selectivity Screening of GPCR Ligands Using a Label-Free Cell Based Assay Technology. *Combinatorial Chemistry & High Throughput Screening*. 2009 Sep;12:812-823.
- 1-122. <http://www.inphaze.com.au/>.
- 1-123. Kavanagh J, Hussain S, Chilcott T, Coster H. Fouling of reverse osmosis membranes using electrical impedance spectroscopy: Measurements and simulations. *Desalination*. 2009 Jan 31;236(1-3):187-193.
- 1-124. <http://www.bionas.de/en/home.html>.
- 1-125. Thedinga E, Kob A, Holst H, Keuer A, Drechsler S, Niendorf R, et al. Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol*. 2007 Avr 1;220(1):33-44.

- 1-126. Serena E, Figallo E, Tandon N, Cannizzaro C, Gerecht S, Elvassore N, et al. Electrical stimulation of human embryonic stem cells: Cardiac differentiation and the generation of reactive oxygen species. *Experimental Cell Research*. 2009 Déc 10;315(20):3611-3619.
- 1-127. Dworak BJ, Wheeler BC. Novel MEA platform with PDMS microtunnels enables the detection of action potential propagation from isolated axons in culture. *Lab Chip*. 2009;9(3):404-410.
- 1-128. Heiskanen AR, Spégel CF, Kostesha N, Ruzgas T, Emnéus J. Monitoring of *Saccharomyces cerevisiae* Cell Proliferation on Thiol-Modified Planar Gold Microelectrodes Using Impedance Spectroscopy. *Langmuir*. 2008;24(16):9066-9073.
- 1-129. Zhu J, Wang X, Xu X, Abassi YA. Dynamic and label-free monitoring of natural killer cell cytotoxic activity using electronic cell sensor arrays. *J. Immunol. Methods*. 2006 Fév 20;309(1-2):25-33.
- 1-130. Richter L, Stepper C, Mak A, Reinthaler A, Heer R, Kast M, et al. Development of a microfluidic biochip for online monitoring of fungal biofilm dynamics. *Lab Chip*. 2007;7(12):1723-1731.
- 1-131. Varshney M, Li Y. Interdigitated array microelectrode based impedance biosensor coupled with magnetic nanoparticle-antibody conjugates for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in food samples. *Biosensors and Bioelectronics*. 2007 Mai 15;22(11):2408-2414.
- 1-132. Küttel C, Nascimento E, Demierre N, Silva T, Braschler T, Renaud P, et al. Label-free detection of *Babesia bovis* infected red blood cells using impedance spectroscopy on a microfabricated flow cytometer. *Acta Tropica*. 2007 Avr;102(1):63-68.
- 1-133. Wang Y, Kang Y, Xu D, Chon CH, Barnett L, Kalams SA, et al. On-chip counting the number and the percentage of CD4⁺ T lymphocytes. *Lab Chip*. 2008;8(2):309-315.
- 1-134. Yang L, Li Y, Erf GF. Interdigitated Array Microelectrode-Based Electrochemical Impedance Immunosensor for Detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Analytical Chemistry*. 2004 Fév 1;76(4):1107-1113.
- 1-135. Birnbaumer GM, Lieberzeit PA, Richter L, Schirhagl R, Milnera M, Dickert FL, et al. Detection of viruses with molecularly imprinted polymers integrated on a microfluidic biochip using contact-less dielectric microsensors. *Lab Chip*. 2009;9(24):3549-3556.
- 1-136. Le Pioufle B, Suzuki H, Tabata KV, Noji H, Takeuchi S. Lipid Bilayer Microarray for Parallel Recording of Transmembrane Ion Currents. *Analytical Chemistry*. 2008 Jan 1;80(1):328-332.
- 1-137. Dahan E, Bize V, Lehnert T, Horisberger J, Gijs MAM. Rapid fluidic exchange microsystem for recording of fast ion channel kinetics in *Xenopus* oocytes. *Lab Chip*. 2008;8(11):1809-1818.

- 1-138. Li D, Zou X, Shen Q, Dong S. Kinetic study of DNA/DNA hybridization with electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochemistry Communications*. 2007 Fév;9(2):191-196.
- 1-139. Kukol A, Li P, Estrela P, Ko-Ferrigno P, Migliorato P. Label-free electrical detection of DNA hybridization for the example of influenza virus gene sequences. *Analytical Biochemistry*. 2008 Mar 1;374(1):143-153.
- 1-140. Wang G, Xu J, Chen H, Fu S. Label-free photoelectrochemical immunoassay for [alpha]-fetoprotein detection based on TiO₂/CdS hybrid. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009 Déc 15;25(4):791-796.
- 1-141. English AE, Squire JC, Bodmer JE, Moy AB. Endothelial cell electrical impedance parameter artifacts produced by a gold electrode and phase sensitive detection. *IEEE Trans Biomed Eng*. 2007 Mai;54(5):863-873.
- 1-142. Linderholm P, Renaud P. Comment on "AC frequency characteristics of coplanar impedance sensors as design parameters" by Jongin Hong, Dae Sung Yoon, Sung Kwan Kim, Tae Song Kim, Sanghyo Kim, Eugene Y. Pak and Kwangsoo No, *Lab Chip*, 2005, 5, 270. *Lab Chip*. 2005;5(12):1416-1417.
- 1-143. Martinez AW, Phillips ST, Whitesides GM. Three-dimensional microfluidic devices fabricated in layered paper and tape. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2008 12;105(50):19606-19611.
- 1-144. Huang J, Yang G, Meng W, Wu L, Zhu A, Jiao X. An electrochemical impedimetric immunosensor for label-free detection of *Campylobacter jejuni* in diarrhea patients' stool based on O-carboxymethylchitosan surface modified Fe₃O₄ nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*. 2010 Jan 15;25(5):1204-1211.
- 1-145. Schüler T, Kretschmer R, Jessing S, Urban M, Fritzsche W, Möller R, et al. A disposable and cost efficient microfluidic device for the rapid chip-based electrical detection of DNA. *Biosensors and Bioelectronics*. 2009 Sep 15;25(1):15-21.
- 1-146. Yan X, Chen X, Tay B, Khor K. Transparent and flexible glucose biosensor via layer-by-layer assembly of multi-wall carbon nanotubes and glucose oxidase. *Electrochemistry Communications*. 2007 Juin;9(6):1269-1275.
- 1-147. Abdelgawad M, Freire SLS, Yang H, Wheeler AR. All-terrain droplet actuation. *Lab Chip*. 2008;8(5):672-677.
- 1-148. Abdelgawad M, Wheeler A. Rapid Prototyping in Copper Substrates for Digital Microfluidics. *Advanced Materials*. 2007;19(1):133-137.
- 1-149. Brischwein M, Herrmann S, Vonau W, Berthold F, Grothe H, Motrescu ER, et al. Electric cell-substrate impedance sensing with screen printed electrode structures. *Lab Chip*. 2006;6(6):819-822.
- 1-150. Kim Y, Park D, Hwang J, Kim Y. Integrated particle detection chip for environmental monitoring. *Lab Chip*. 2008;8(11):1950-1956.

- 1-151. Odijk M, Baumann A, Lohmann W, Brink FTGVD, Olthuis W, Karst U, et al. A microfluidic chip for electrochemical conversions in drug metabolism studies. *Lab Chip*. 2009;9(12):1687-1693.
- 1-152. Lin S, Kyriakides TR, Chen JJ. On-line observation of cell growth in a three-dimensional matrix on surface-modified microelectrode arrays. *Biomaterials*. 2009 Juin;30(17):3110-3117.

Chapitre 2:
Conception, réalisation des bioMEMS et
notions théoriques

Dans ce chapitre, nous présentons d'abord comment les bioMEMS utilisés au cours de cette thèse ont été élaborés. Pour cela, nous discutons d'abord du choix des différents matériaux et des critères qui ont déterminés la géométrie des dispositifs. Nous décrivons ensuite les procédés de micro-fabrication des électrodes et des réservoirs de cellule. Nous discutons aussi des interfaces de connexion des dispositifs aux appareils de mesure. Nous présentons ensuite les différents types d'analyse réalisables avec les impédancemètres ainsi que les logiciels nous permettant d'enregistrer et de traiter les données issues de leurs mesures.

Nous décrivons enfin les modèles analytiques que nous avons utilisés pour l'étude des mesures électrochimiques. Pour cela, nous présentons d'abord des notions théoriques essentielles de la caractérisation par impédancemétrie ainsi que les modèles employés pour décrire les phénomènes de relaxation diélectrique et des formules de microfluidique. Nous décrivons enfin les méthodes de calcul des constantes de cellules des différents dispositifs et géométries d'électrodes.

I. Conception du composant

Pour concevoir nos composants, nous avons voulu utiliser des procédés technologiques favorisant la rapidité de prototypage. Nous avons aussi désiré développer des microdispositifs permettant d'analyser à la fois des cellules en suspension et des cellules adhérentes (cultivées *in vitro* (cf lexique)). Nous avons dû en prendre en compte les caractéristiques techniques du matériel de mesure utilisé, à savoir les impédancemètres Agilent 4192 et 4294 pour les mesures linéaires.

I.1. Choix des matériaux

I.1.1. Substrat

Pour réaliser nos bioMEMS, nous avons le choix entre trois types de substrat couramment utilisés pour la conception de bioMEMS: le silicium, les polymères (comme le PDMS, le PEN ou le PET) et le verre.

Le silicium présente l'avantage d'être le matériau de prédilection pour la microélectronique. Ces travaux ayant été réalisés dans un laboratoire de microélectronique, le savoir faire dans ces techniques d'usinage y est important. La grande majorité du matériel de salle blanche est dédié à des procédés sur substrat de silicium. Seulement, le silicium n'est pas transparent. Il ne permet donc pas d'observations microscopiques par transmission. Les microscopes utilisés pour nos manipulations travaillent uniquement en transmission. Seule la fluorescence est utilisée par réflexion. Nous avons donc décidé de ne pas travailler avec des substrats en silicium.

Au chapitre 1, nous avons discuté du coût qu'entraîne le choix des différents matériaux. Nous avons vu que les matériaux polymériques restent préférables d'un point de vue financier. Certains matériaux polymères, comme le PDMS, sont de plus transparents. Seulement, le dépôt de métal sur ce genre de substrat est encore en voie de développement. Il est encore difficile de réaliser un dispositif uniquement en polymère.

Le verre est transparent. Il est de plus biocompatible et permet donc la culture cellulaire. Le groupe bioMEMS dans lequel fut effectuée cette thèse possède une certaine expérience dans la fabrication de bioMEMS sur substrat de verre (2-1,2-2).

Le verre a donc été le substrat retenu pour nos composants.

I.1.2. Electrodes

Les bioMEMS développés au cours de cette thèse ont été utilisés pour l'analyse électrique de cellules biologiques en suspension et adhérentes. Les cellules adhérentes étant cultivées directement sur les électrodes, celles-ci ne doivent pas avoir d'effets toxiques sur les cellules.

Nous avons également voulu développer rapidement un procédé technologique concluant. Nous avons donc préféré utiliser des métaux dont le dépôt est couramment réalisé à l'IEMN. Considérant ces deux paramètres, nous avons eu le choix entre trois métaux pour réaliser les électrodes de nos bioMEMS: le platine, le titane et l'or.

Afin de pouvoir mesurer des courants électrochimiques biologiques de faible amplitude, nous avons voulu utiliser un métal le plus conducteur possible. Le Tableau 2- 1 regroupe les conductivités de ces différents métaux :

Tableau 2- 1 : Conductivité électrique du Platine, du Titane et de l'Or.

	σ (10^6 S.m ⁻¹)
Platine	9.66
Titane	2.33
Or	45.2

L'or possédant la conductivité électrique la plus élevée, nous avons choisi ce métal pour réaliser nos électrodes.

I.1.3. Réservoir des cellules biologiques

La principale propriété de nos réservoirs, sous forme de puits ou de micro-canal, est qu'ils doivent eux aussi ne pas être toxiques pour les cellules. De même que pour le substrat, ceux-ci doivent être transparents.

Comme nous avons voulu optimiser la rapidité de prototypage, nous avons considéré l'utilisation de deux matériaux polymériques facilement usinable : le PDMS et la SU-8

L'usage du PDMS pour la culture cellulaire *in-vitro* et son intégration *in-vivo* (cf lexique) a déjà été validé, bien que ces résultats puissent dépendre du type cellulaire et des conditions environnementales (flux, durée de l'expérience) et plus généralement de la méthodologie d'étude et de caractérisation (2-3). Ce matériau est de plus transparent. Pour une observation correcte, il est aussi important de considérer la distance focale des objectifs ainsi que l'épaisseur du PDMS. Le PDMS est enfin très facile à travailler grâce aux techniques de lithographie douce présentées au chapitre 1 (2-4).

Comparé au PDMS, la résine SU-8 présente une viscosité élevée qui complique sa manipulation et son micro-usinage.

Nous avons donc décidé d'utiliser le PDMS pour constituer les réservoirs des cellules biologiques étudiées.

I.2. Géométrie des dispositifs

I.2.1. Dispositif avec puits

Nous avons d'abord conçu des dispositifs avec des puits car ce type de réservoir permet un usage classique des micropipettes et ne requiert pas l'emploi d'instrumentation microfluidique (pousse seringues, capillaires). Les manipulations biologiques effectuées avec ce type de dispositif sont donc plus faciles à mettre en place. Nous verrons par la suite que sa réalisation technologique est également plus aisée.

Les puits permettent aussi aisément d'étudier des cellules en suspension ou en culture *in vitro*. Les manipulations effectuées avec les puits nous permettront donc de valider rapidement

l'utilisation de l'impédancemétrie pour des analyses de parasitologie (cf chapitre 4) et de biologie cellulaire (cf chapitre 5).

I.2.1.1. Géométries des électrodes

Nous avons opté pour la géométrie d'électrodes planaires interdigitées car elle permet de recouvrir le maximum de surface avec un conducteur et donc en théorie de récupérer le maximum de signal tout en assurant une résolution de détection micrométrique. Ce genre de structure se retrouve souvent dans la littérature (2-5,2-6,2-7,2-8).

Ces électrodes interdigitées ont été intégrées au sein de réseaux circulaires de 8mm de diamètre. Cette forme circulaire permet de recouvrir de façon optimale le fond de puits de culture. Il est ainsi possible d'intégrer ces réseaux au fond de plaques de culture multi-puits pour des expériences multiparamétriques (2-9,2-10). Ce format est particulièrement intéressant car il est déjà couramment utilisé dans les laboratoires biologiques pour les analyses cellulaires *in-vitro*. Nous avons choisi de réaliser des réseaux d'électrodes de 8 mm de diamètre car cette dimension correspond à un des diamètres utilisés pour réaliser des plaques 24 ou 96 puits.

Afin d'étudier empiriquement différents types de structure interdigitées, nous avons réalisé quatre géométries d'électrodes distinctes sur un même substrat (Figure 2- 1).

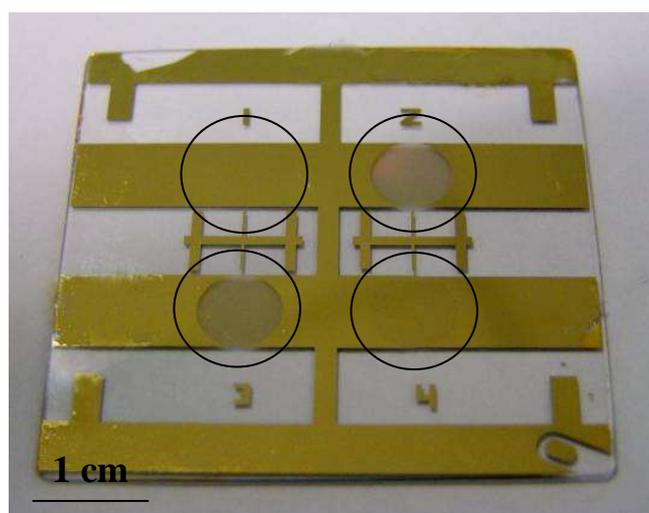


Figure 2- 1 : Photo du dispositif sans les réservoirs en PDMS. Les quatre zones encadrées correspondent aux quatre géométries d'électrodes.

Ces quatre géométries sont constituées de quatre électrodes distinctes et d'une contre électrode commune au centre du substrat comme indiqué sur le schéma de la Figure 2- 2. Les quatre systèmes de mesure sont donc constitués de deux électrodes. Ils correspondent ainsi à une mesure électrique en configuration 2 points : les 2 mêmes électrodes excitent le système biologique en tension et mesurent le courant résultant.

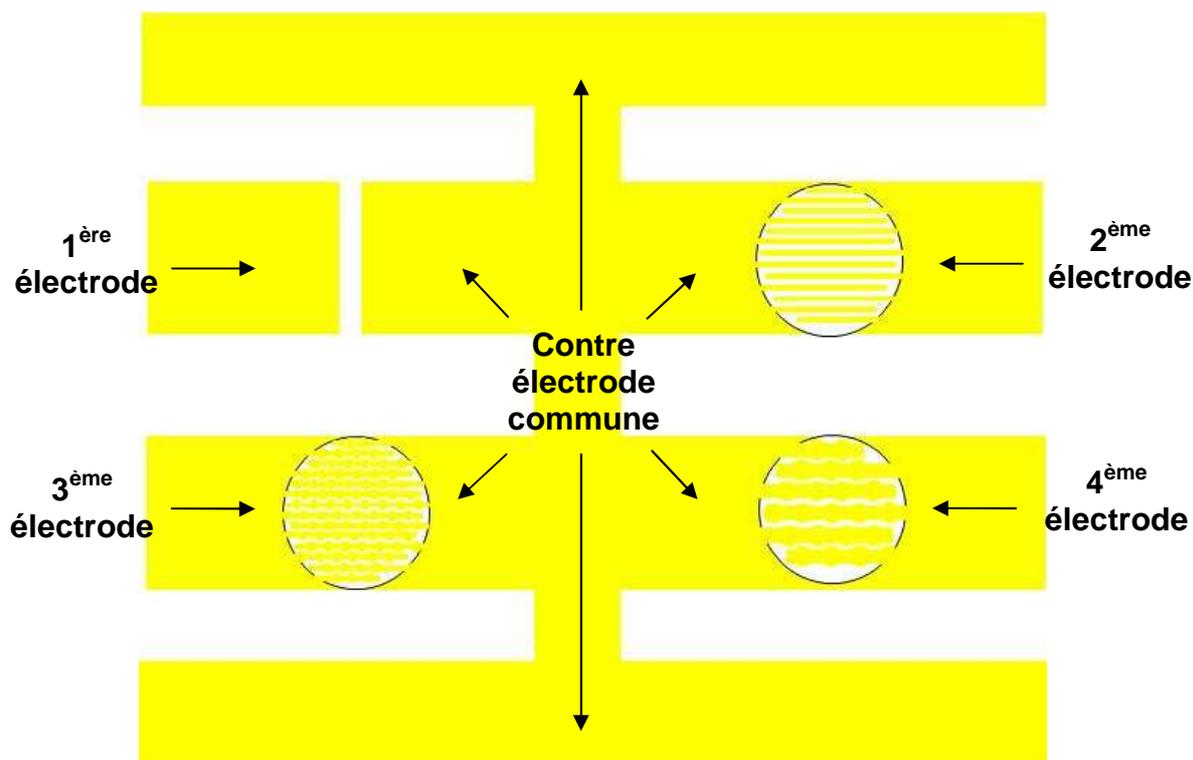


Figure 2- 2 : Schéma du dispositif à puits avec les différentes électrodes indiquées.

Nous avons aussi réalisé des dispositifs comprenant quatre géométries d'électrodes identiques pour effectuer des études comparatives.

Le premier motif correspond à deux électrodes recouvrant la totalité du fond du puits et séparées par un espace de 4 μm (Figure 2- 3). Ces électrodes ne sont pas interdigitées et ont des dimensions millimétriques, elles permettent donc d'évaluer la sensibilité d'électrodes se rapprochant davantage de systèmes macroscopiques et de juger ainsi de la nécessité de miniaturiser les biodétecteurs électriques. L'espace a été choisi de 4 μm car cette dimension est proche de la résolution limite de la lithographie optique obtenue avec les moyens techniques de l'IEMN (1 ou 2 μm).

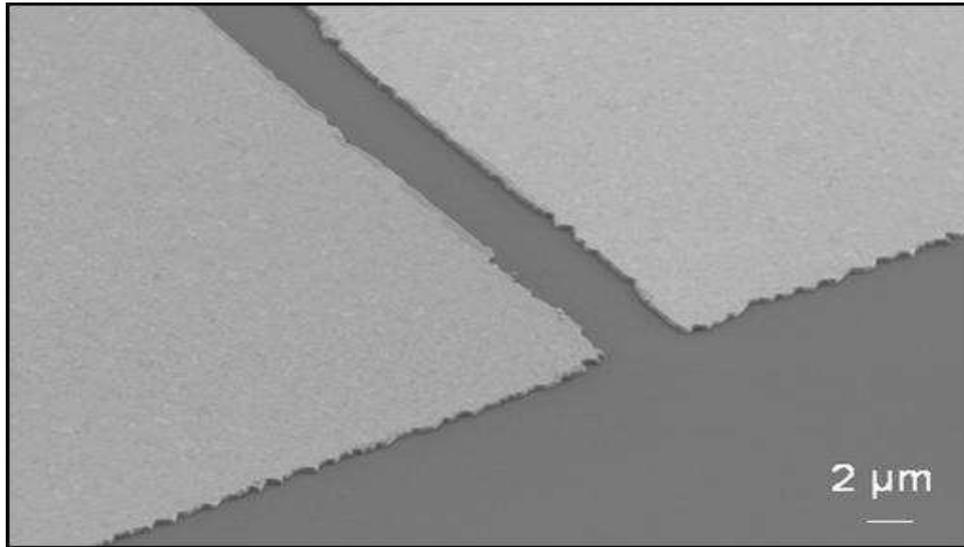


Figure 2- 3 : Photo MEB de la 1^{ère} géométrie d'électrode (Géométrie 1).

Le deuxième motif correspond à un réseau d'électrodes interdigitées droites de 4 μm de large et séparées par un espace de 4 μm également (Figure 2- 4). Cette géométrie interdigitée est donc proche de la densité maximale d'électrodes micrométriques interdigitées réalisable par technique optique.

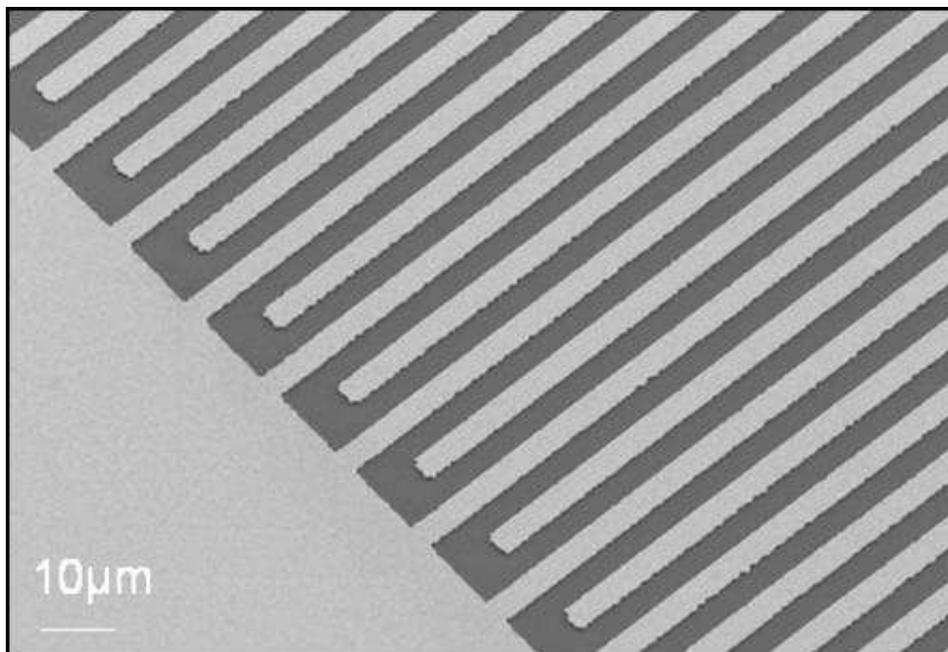


Figure 2- 4 : Photo MEB de la 2^{ème} géométrie d'électrode (Géométrie 2).

La troisième géométrie est identique à la deuxième, excepté la forme des électrodes qui est arrondie (Figure 2- 5).

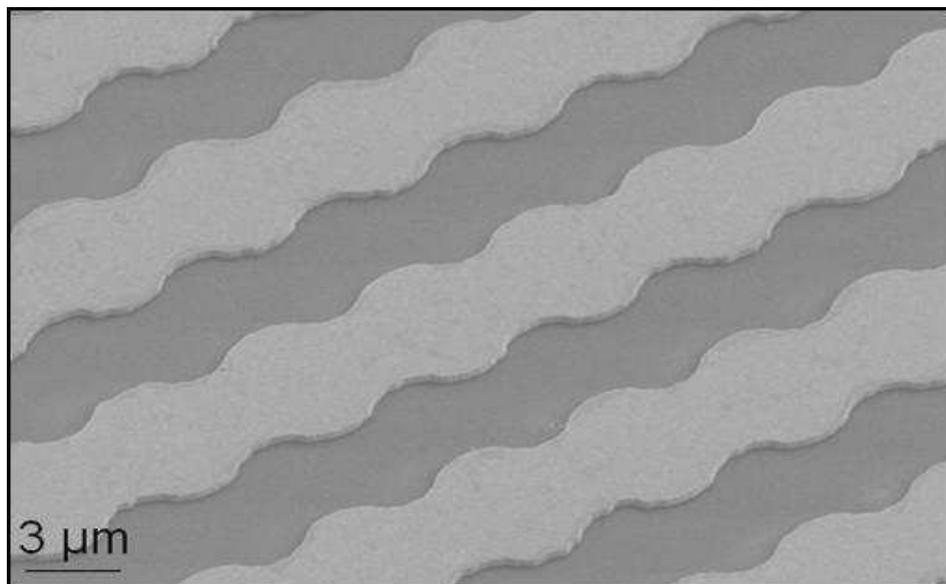


Figure 2- 5 : Photo MEB de la 3^{ème} géométrie d'électrode (Géométrie 3).

Le but est ici d'étudier l'influence de la forme des biodétecteurs sur l'adhésion des cellules. Le dimensionnement spécifique lié aux formes arrondies de ces électrodes est détaillé sur la Figure 2- 6.

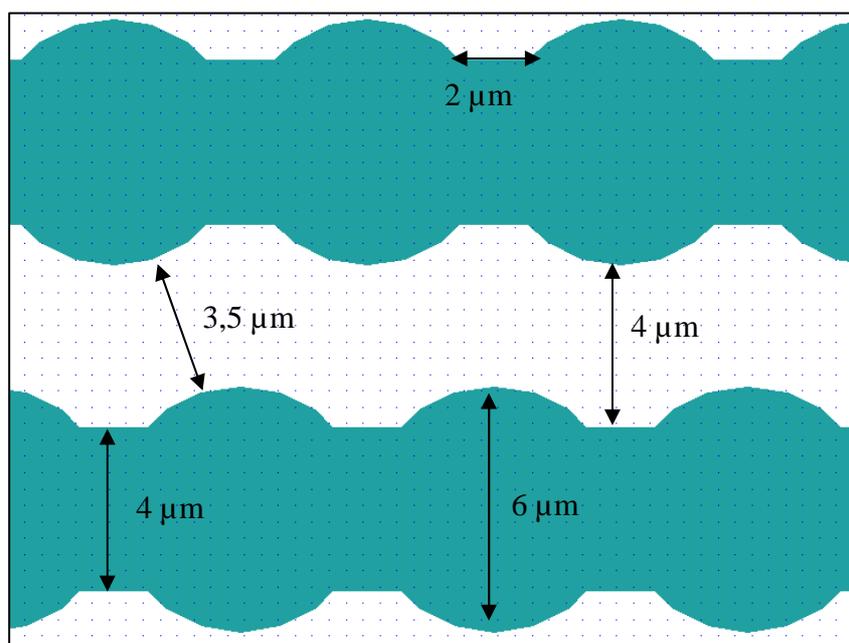


Figure 2- 6 : Schéma issu du fichier informatique du masque du 3^{ème} motif.

La quatrième et dernière forme d'électrodes correspond à un réseau d'électrodes interdigitées de dimensions sub-millimétriques, également arrondi (Figure 2- 7).

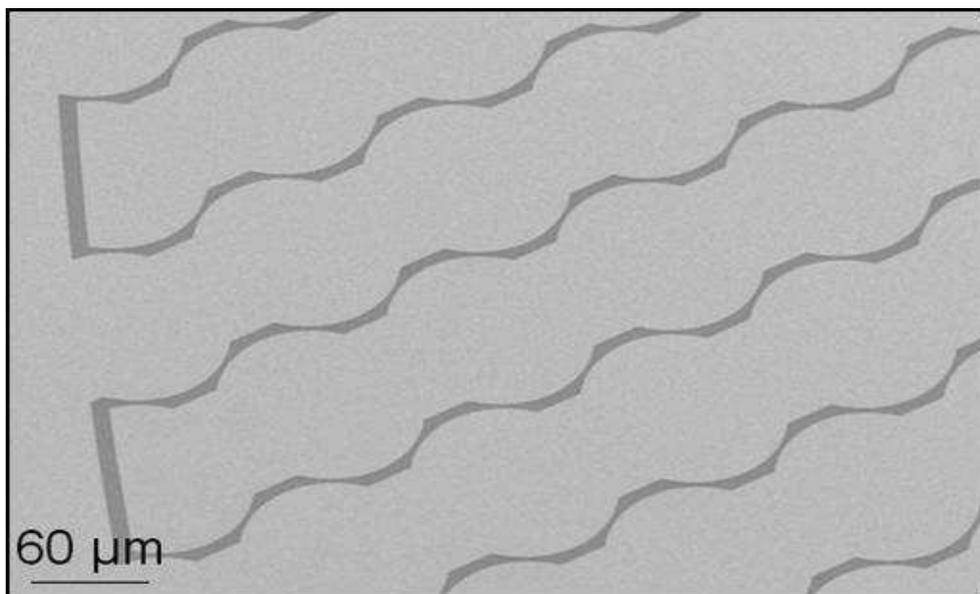


Figure 2- 7 : Photo MEB de la 4^{ème} géométrie d'électrode (Géométrie 4).

Leur largeur d'une centaine de micromètres correspond à une dimension intermédiaire à celle micrométrique des deuxième et troisième motifs et celle millimétrique de la première géométrie. Ce dimensionnement précis est détaillé sur la Figure 2- 8.

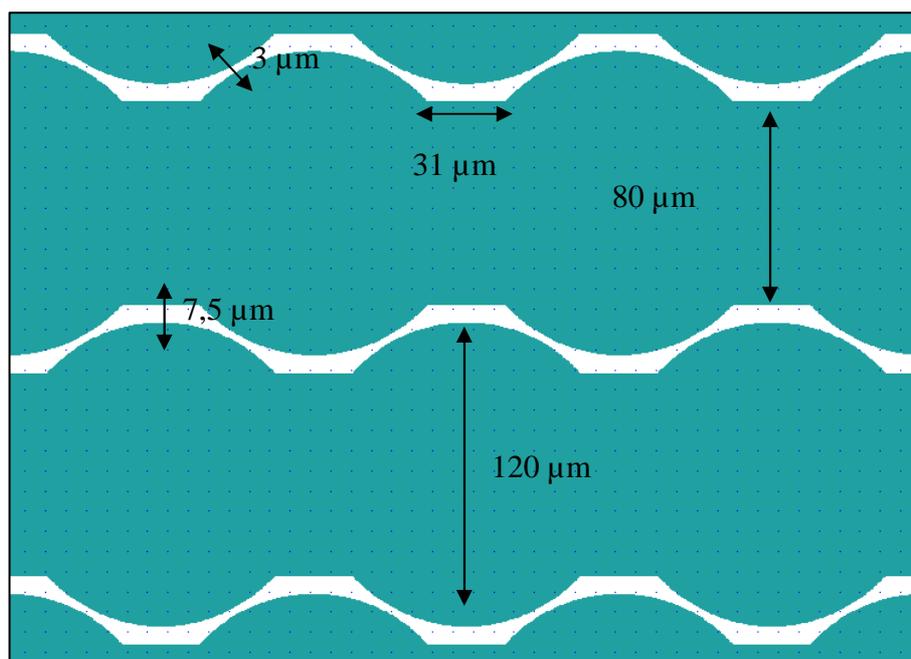


Figure 2- 8 : Schéma issu du fichier informatique du masque du 4^{ème} motif.

I.2.1.2. Géométries des puits

Les puits en PDMS ont d'abord été réalisés avec des diamètres de 8mm puis de 6mm. Ces deux diamètres ont été choisis car ils correspondent à des diamètres utilisés pour réaliser des plaques 24 ou 96 puits. L'influence de ces diamètres est discutée au paragraphe II.2.1.3..

I.2.2. Dispositif avec micro-canaux

Les dispositifs microfluidiques ont été réalisés au vue des premiers résultats obtenus avec le composant à puits sur l'étude de l'interaction de cellules d'ovaires d'hamster chinois (CHO)-Lactoferrine (Lf) (cf chapitre 5). Ces résultats nous ont amenés à concevoir un système d'analyse permettant de modifier le milieu de culture avec le minimum d'interventions humaines et de perturbations de l'environnement cellulaire. La réalisation de canaux microfluidiques permet ce type d'étude puisque l'emploi de pousse seringue automatise l'injection des réactifs. Les microcanaux associés aux capillaires d'accès peuvent également permettre de modifier graduellement le milieu de culture sans exposer les cellules à des changements brusques d'environnement.

I.2.2.1. Géométries des électrodes

Le dispositif comprend sur un même substrat huit réseaux d'électrodes interdigitées droites (Figure 2- 9).

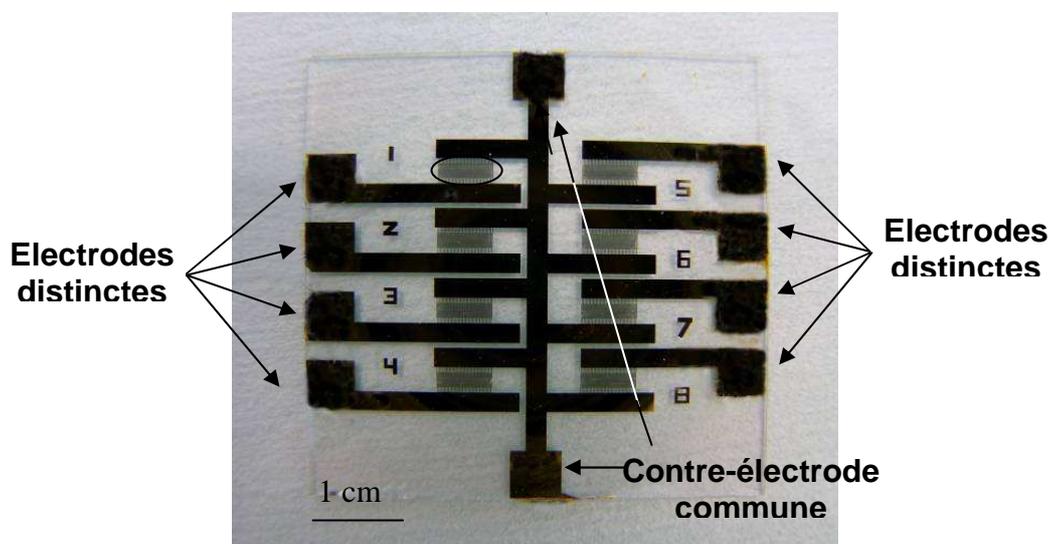


Figure 2- 9 : Photo du dispositif sans les canaux en PDMS. Un des réseaux est encadré.

Comme le dispositif à puits, ces huit réseaux sont constitués de huit électrodes distinctes et d'une contre électrode commune au centre du substrat, comme indiqué sur la Figure 2- 9.

Les électrodes font 50 μm de large et sont espacées de 25 μm (Figure 2- 10). Ces dimensions ont été choisies car, d'après la thèse de Linderholm (2-11), elles permettent d'obtenir une profondeur de champ (cf lexique) de 9 μm parfaitement adaptée à notre étude sur les CHO.

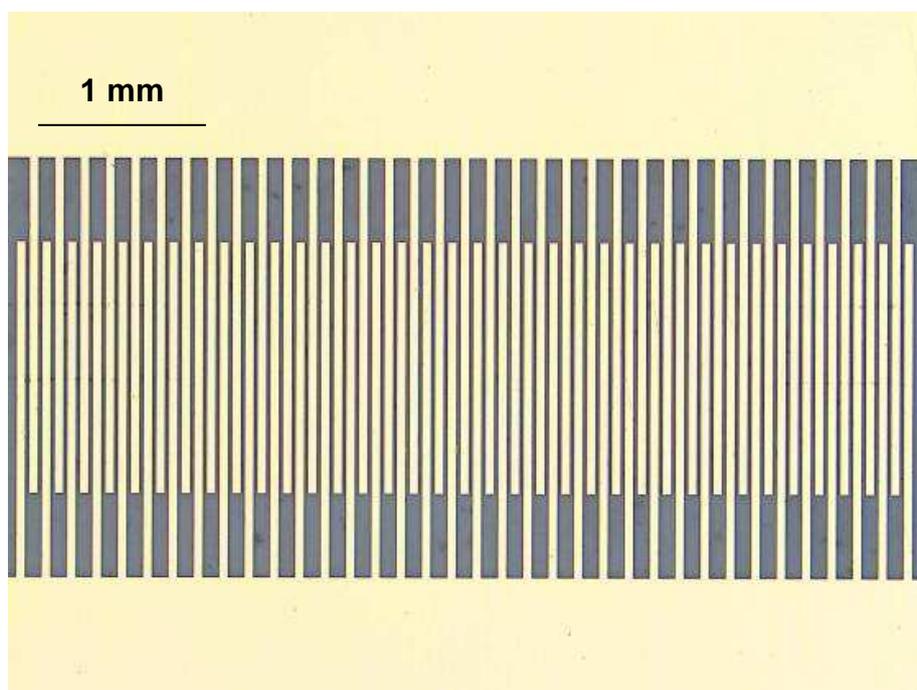


Figure 2- 10 : Photo prise au microscope d'un réseau de micro-électrodes.

Les électrodes mesurent 2000 μm de long mais elles sont en vis-à-vis sur 1500 μm uniquement (Figure 2- 10). Les réseaux d'électrodes font en tout 5,3 mm de long et comprennent donc 71 électrodes.

I.2.2.2. Géométries des micro-canaux

Les microcanaux en PDMS ont une largeur de 400 μm pour une hauteur de 100 μm et une longueur de 6,9 mm. Ils présentent donc un volume de 0,276 mm^3 (0,276 μl). La hauteur et la largeur ont été définies conjointement.

La largeur a été choisie suffisamment grande pour que l'écoulement des flux provoque de faibles forces de cisaillement sur les cellules et que le tapis cellulaire soit constitué d'un

nombre important de cellules. Ainsi le signal cellulaire peut être mesuré et moyenné à partir d'un nombre significatif de cellules (en considérant un diamètre de $15\mu\text{m}$ pour les CHO en culture (2-12), on peut obtenir environ 15845 cellules au sein du canal pour un tapis en pleine confluence (cf lexique)). Cette largeur permettra enfin d'aligner les canaux sur les électrodes à l'œil nu.

En parallèle, la hauteur fut choisie de manière à ce que le canal ne s'affaisse pas sur lui-même. Ceci peut arriver lorsque la largeur du canal est trop grande par rapport à sa hauteur (Figure 2- 11.A). Un rapport de 1/4 a ici été choisi (Figure 2- 11.B). A noter que l'affaissement du canal dépend aussi de l'épaisseur du PDMS dans lequel il est moulé : un PDMS plus épais sera naturellement moins flexible (Figure 2- 11.C). Enfin la hauteur du canal doit être suffisamment faible pour assurer la diffusion rapide des réactifs jusqu'aux cellules tapissant le fond des canaux. Comparativement au diamètre moyen des CHO, la hauteur des canaux reste ici du même ordre de grandeur.

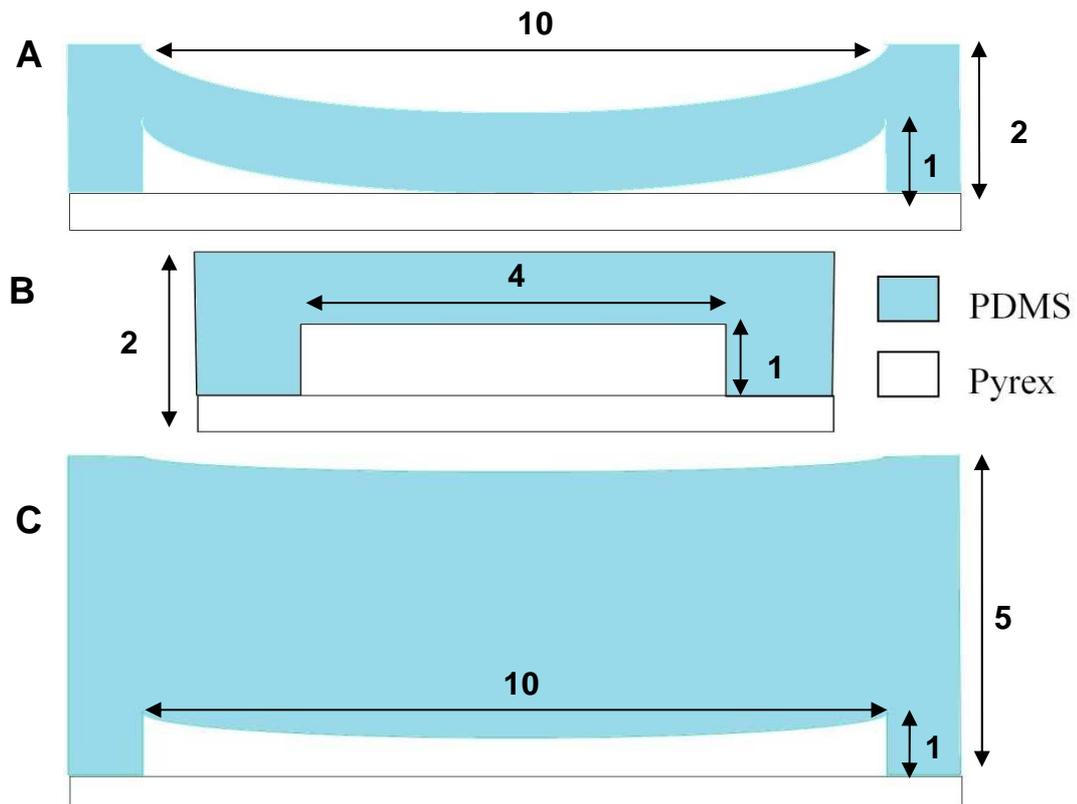


Figure 2- 11 : Schéma des différentes configurations possibles pour la réalisation du canal en PDMS. A : Canal avec un rapport 1/10 entre la hauteur et la largeur. B : Canal avec un rapport 1/4 entre la hauteur et la largeur. C : Canal avec un rapport 1/10 entre la hauteur et la largeur et une épaisseur de PDMS plus importante.

I.2.2.3. Choix des capillaires d'accès

Les capillaires d'accès aux micro-canaux ont été choisis en fonction de leur matériau de fabrication et de leur diamètre extérieur et intérieur.

Concernant le choix des matériaux, les premiers capillaires sélectionnés étaient en polyetheretherketone (PEEK), un polymère dont la rigidité ne permet pas une manipulation aisée et dont la fixation provoquait souvent le détachement du PDMS du substrat. Nous avons donc par la suite choisi des capillaires en Teflon - éthylène propylène fluoré (FEP), un matériau bien plus maniable et flexible.

Le diamètre extérieur des capillaires ne peut être choisi librement. En effet, l'accès aux micro-canaux se fait ici par le dessus, via un trou poinçonné dans le PDMS. Pour éviter tout problème d'étanchéité, le diamètre extérieur des capillaires introduits dans le PDMS doit donc correspondre au diamètre des trous réalisés au travers de ce PDMS. Nous avons au final utilisé des capillaires dont le diamètre extérieur fait 1/32e de pouce (environ 794 μm) et des poinçons (société Eloïse) de 750 μm de diamètre. Le PDMS étant flexible et donc légèrement déformable, la faible différence de diamètre entre le trou d'accès et le capillaire n'est pas gênante.

Il est important de bien choisir le diamètre intérieur des capillaires pour limiter le volume mort (cf lexique) des produits injectés. Ce volume dépend également de la longueur des capillaires.

Le diamètre intérieur des capillaires et la section des micro-canaux déterminent la pression avec laquelle circule le liquide au sein des capillaires et des micro-canaux. Pour un même débit, plus ces dimensions sont petites, plus la pression dans les canaux est élevée et donc plus le cisaillement subi par les cellules est important. Ce cisaillement ne doit pas être trop important pour ne pas endommager le tapis cellulaire au sein des micro-canaux.

Nous avons d'abord utilisé des capillaires avec un diamètre intérieur de 400 μm pour que ce diamètre corresponde à la largeur des canaux. Pour limiter le volume mort, nous avons par la suite utilisé des capillaires avec un diamètre intérieur de 100 μm .

La détermination précise de ces paramètres est discutée plus exhaustivement dans le chapitre 5.

II. Procédé technologique

Nous détaillons dans ce paragraphe les différentes étapes du procédé de fabrication des dispositifs et de leur interface de mesure.

II.1. Fabrication des électrodes

II.1.1. Procédé de fabrication

Les électrodes sont réalisées sur des substrats carrés de Pyrex (5 cm de côté et 0,7 mm d'épaisseur). Avant le dépôt de la résine photosensible, les substrats sont nettoyés successivement avec du Texpure, de l'acétone et de l'isopropanol. Ils sont par la suite déshydratés à 200 °C.

La résine négative AZnLOF 2020 diluée à 70% dans du PGMEA est ensuite déposée à la tournette, capot ouvert, pendant 20 secondes sur les substrats avec une vitesse de 2500 RPM et une accélération de 1000 RPM/min pour obtenir une couche de résine de 1 µm d'épaisseur. Les substrats sont ensuite recuits pendant 1 min à 110°C sur des plaques chauffantes.

Après cela, ils sont exposés pendant 1 min sous une lampe UV à une longueur d'onde de 360 nm avec une puissance 11 mW/cm² au travers d'un masque optique réalisé sur pyrex par lithographie électronique. Après cette exposition, les substrats sont encore une fois recuits pendant une minute à 110 °C.

La résine photosensible exposée est ensuite retirée en immergeant le substrat dans du photodéveloppeur AZ 326 pendant 1 min 35s afin d'obtenir des profils de résine dit « en casquette ». Les substrats sont enfin rincés pendant 10 s dans de l'eau déionisée.

Une fois que la résine a été développée selon les motifs précédemment décrits, un dépôt de titane et d'or est réalisé sur les substrats. 50 nm de titane et 100 nm d'or sont déposés par évaporation, le titane servant de couche d'accroche à l'or. Finalement, l'excès de métal est retiré en même temps que le reste de résine par un procédé classique de lift-off en immergeant les substrats pendant environ 6 heures dans du remover PG.

Ces étapes de micro-fabrication sont schématisées sur la Figure 2- 12.

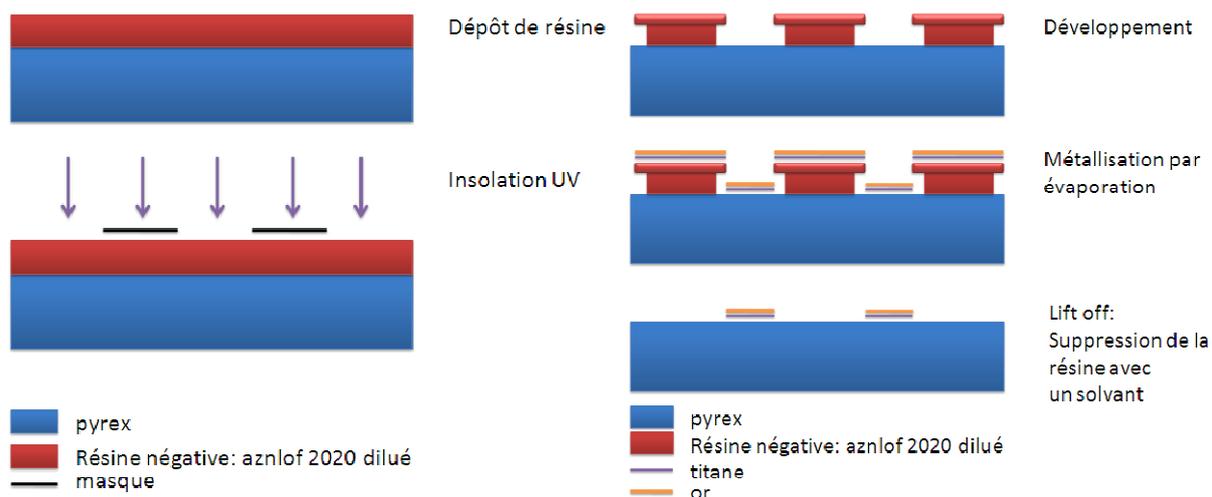


Figure 2- 12 : Etapes technologiques de fabrication des électrodes.

II.1.2. Problème liés aux réseaux d'électrodes court-circuités

Pendant la réalisation des microélectrodes interdigitées, nous avons souvent eu des problèmes de réseau court-circuités. Il est en effet difficile d'éviter le dépôt de la moindre poussière sur une surface de 50 mm^2 (aire d'un cercle de 4 mm de rayon).

Plus les dimensions des électrodes sont petites, plus la présence d'une poussière au sein du réseau a de chances de provoquer une liaison métallique entre les électrodes et donc un court-circuit.

Ce problème devient particulièrement gênant pour la réalisation des réseaux d'électrodes de $4 \mu\text{m}$ qui contiennent dans un diamètre de 8mm mille électrodes. En effet, si une seule électrode sur les 1000 du réseau se court-circuite, le réseau entier devient inutilisable.

Si une poussière se dépose avant l'enduction de la résine, elle empêchera la résine de s'y déposer correctement et risque de la décoller pendant la révélation. Si une poussière se dépose après cette enduction, elle empêchera l'exposition correcte de la résine.

La conséquence de l'une ou l'autre de ces situations est le dépôt accidentel de métal entre deux électrodes (Figure 2- 13.A.), ce qui provoque le court-circuitage de l'ensemble du réseau.

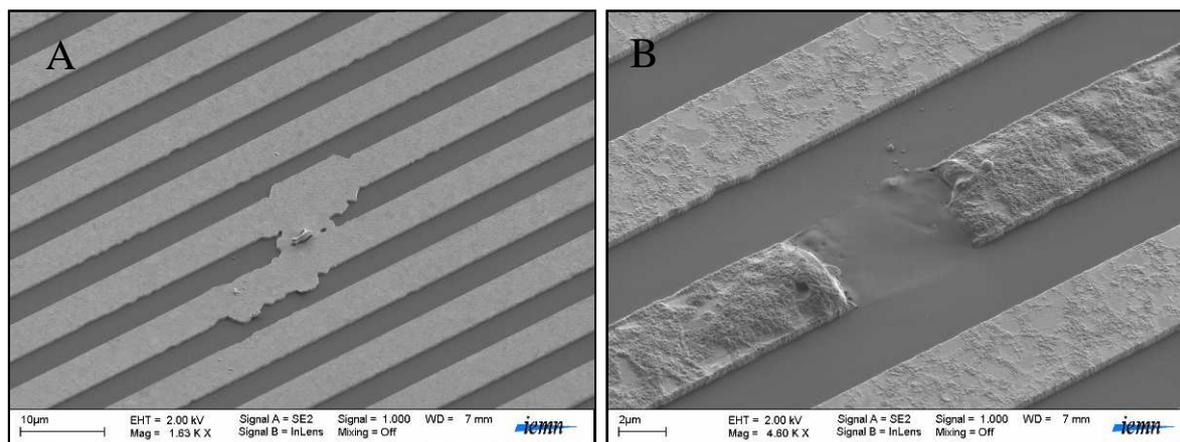


Figure 2- 13 : A : Photo MEB d'électrodes court-circuitées. B : Photo MEB de l'évaporation du métal sur la même électrode à une zone décalée et plus fragile que le court-circuit.

La solution choisie pour résoudre ce problème technique récurrent a été d'injecter dans le réseau un courant suffisamment important pour évaporer le métal à une zone fragilisée de l'électrode court-circuitée (Figure 2- 13.B.). Pour cela, un analyseur de paramètres de semi-conducteur Tektronix 370A a été utilisé pour injecter au sein du réseau d'électrode un courant augmentant progressivement.

En injectant un courant de plus en plus important, l'effet joule augmente la température des électrodes, particulièrement au niveau du court-circuit, de plus petites dimensions. A partir d'un certain courant, la température du métal sera suffisamment élevée pour évaporer l'excès de métal provoquant le court-circuit. Si la zone court-circuitée est trop grande et donc trop résistante, l'électrode court-circuitée va s'évaporer à une autre zone plus fragile.

Ce problème apparaissant quasi exclusivement sur les réseaux d'électrodes de 4 µm (2^e et 3^e géométrie des dispositifs à puits), la perte d'une ou plusieurs électrodes au sein du réseau de 1000 électrodes ne perturbe pas son bon fonctionnement.

II.2. Fabrication des puits et des micro-canaux

II.2.1. Dispositif avec puits

II.2.1.1. Préparation des puits

Les puits sont réalisés en poinçonnant du PDMS moulé dans des boîtes de Pétri en plastique à l'aide de poinçons (biopsy punch, société Eloïse). Pour percer précisément les blocs de PDMS, des pochoirs en métaux ont été usinés.

Les blocs de PDMS sont eux réalisés dans des boîtes de Pétri en plastique car ces dernières sont jetables et assurent donc une excellente reproductibilité. Leur fond est de plus parfaitement plat.

Le PDMS est préparé en le mélangeant à son agent polymérisant avec un rapport 1/10 (au poids). Ce mélange doit être ensuite dégazé avant d'être coulé dans les boîtes de Pétri ou un moule (il faut faire attention à ne pas créer de nouvelles bulles en coulant trop rapidement le PDMS dégazé).

Le PDMS fraîchement coulé sera polymérisé en le plaçant à 60°C dans un four de recuit pendant au moins 3h 30. Cette polymérisation peut prendre moins de temps si le PDMS est davantage chauffé (un peu plus d'une heure à 100°C). Le PDMS n'est ici pas chauffé au dessus de 60°C car il est placé dans une boîte de Pétri plastique qui ne supporte pas les températures supérieures à 65°C.

II.2.1.2. Fixation des puits

Pour assurer la fixation correcte du PDMS sur le verre, la pièce de PDMS ainsi que le substrat sur lequel sont réalisés les électrodes sont nettoyées abondamment avec de l'alcool isopropylique. Le PDMS est ensuite déposé sur le substrat de verre en faisant attention à ne pas capturer de bulles d'air.

Le système final n'étant pas utilisé pour y faire circuler du liquide sous pression mais uniquement pour y déposer des gouttes de solutions biologiques, aucune fixation irréversible n'est nécessaire. Tant que la surface du PDMS est suffisamment plane, les forces de capillarité suffisent pour fixer le polymère sur le verre.

Un schéma en coupe permettant de distinguer les différentes couches de matériaux utilisés pour la réalisation du dispositif est présenté Figure 2- 14.

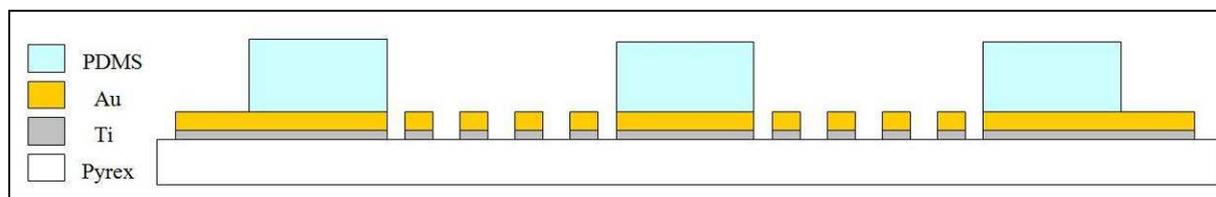


Figure 2- 14 : Schéma en coupe du dispositif à puits.

II.2.1.3. Diamètre des puits

Dans un premier temps, nous avons réalisé des puits de 8 mm de diamètre afin que ceux-ci englobent l'ensemble du réseau circulaire d'électrodes de 8mm de diamètre également (Figure 2- 16.A). Seulement, ces puits étant poinçonnés dans le PDMS et alignés à la main, il est difficile de les disposer parfaitement et de façon reproductible sur la périphérie du réseau circulaire d'électrodes (Figure 2- 16.B). Ce décalage peut créer une dispersion des caractéristiques électriques (Figure 2- 15)

Pour éviter ce genre de variabilité, nous avons au final utilisé des puits de 6 mm de diamètre. Il est ainsi plus facile de centrer correctement et simultanément ces quatre puits par rapport aux réseaux d'électrodes de 8 mm de diamètre (Figure 2- 16.C).

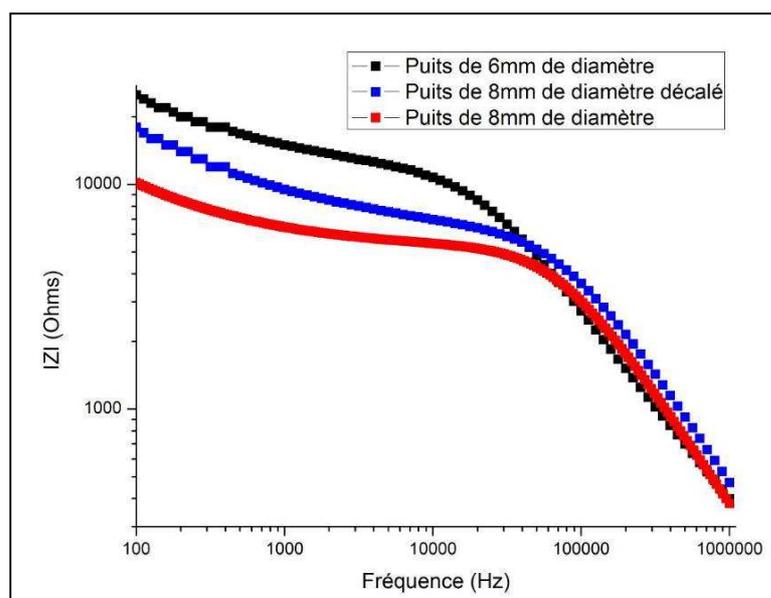


Figure 2- 15 : Magnitude de l'impédance d'eau déionisée mesurée avec les électrodes de 120 µm et différents diamètres de puits en PDMS à diverses positions.

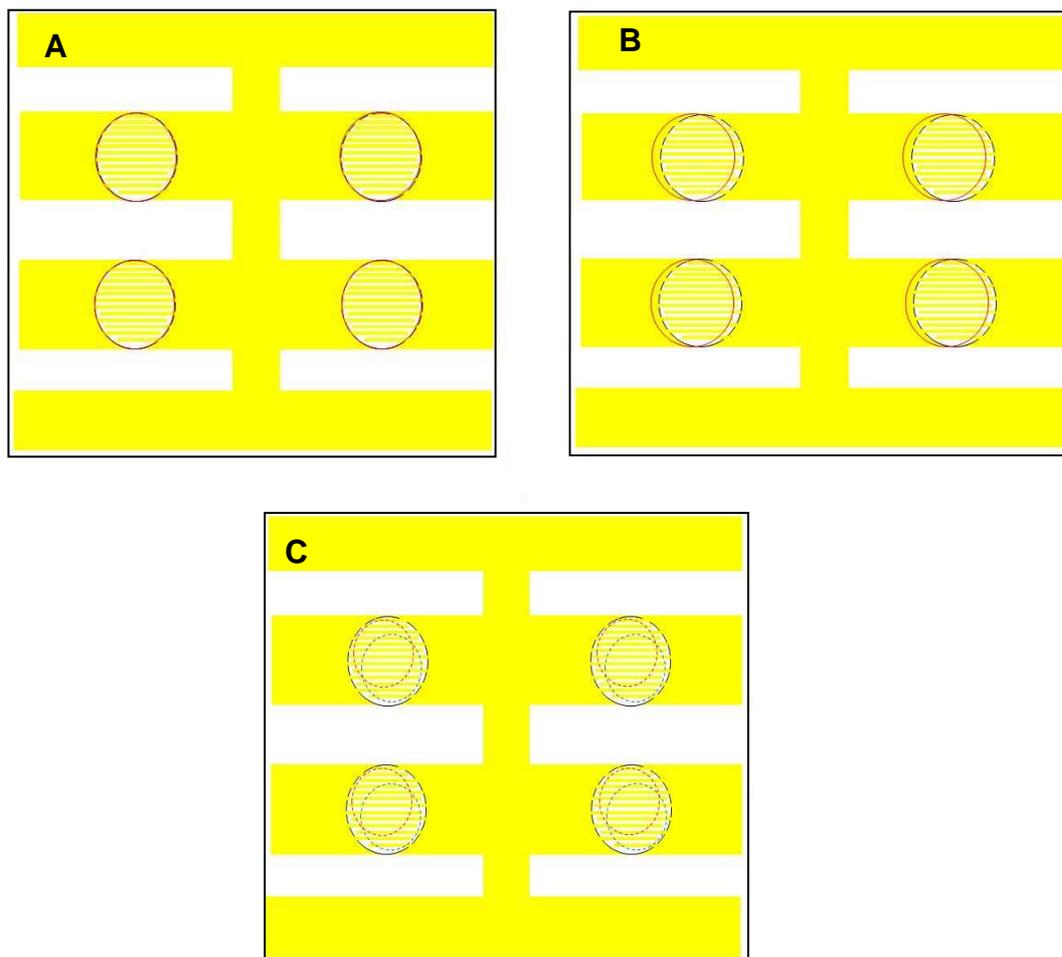


Figure 2- 16 : A et B : Fixation correcte et décalée des puits de 8mm de diamètre sur les réseaux d'électrodes (respectivement). C : Différentes configurations possibles de fixation des puits de 6mm de diamètre sur les réseaux d'électrodes.

II.2.2. Dispositif avec micro-canaux

II.2.2.1. Lithographie du moule

Les microcanaux sont fabriqués par les techniques de lithographie douce : un substrat de silicium micro-usiné sert de moule au PDMS. Le moule utilisé est un substrat de silicium sur lequel sont gravés quatre marches de 400 μm de large, 100 μm de hauteur et 6.9 mm de longueur.

Pour réaliser ce moule, un substrat de silicium 3'' d'orientation cristalline 100 (le type de substrat le plus couramment utilisé) est d'abord déshydraté à 200°C pendant 10 min. De l'Hexamethyldisilazane (HMDS) est ensuite utilisé comme promoteur d'adhérence à la résine photosensible. Il est déposé à la tournette, capot fermé, à 2000 RPM avec une accélération de 1000 RPM/min pendant 20 s. La résine AZ 9260 est ensuite déposée également à la tournette, capot ouvert, à 2000 RPM avec une accélération de 1000 RPM/min pendant 20s. Après cela, un détournage au solvant Edge Bead Removal (EBR) est effectué avec une vitesse de 800 RPM et une accélération de 1000 RPM/min pendant 6s. Le substrat est passé une dernière fois à la tournette pour évaporer les traces de solvants à une vitesse de 1000 RPM et une accélération de 1000 RPM/min pendant 6s.

Le substrat est ensuite recuit sur une plaque chauffante à 110°C pendant 3 min avant d'être laissé à température ambiante pendant 20 min pour qu'il se réhydrate. Après cela, le substrat est insolé pendant 90s sous une lampe UV à une longueur d'onde de 365 nm avec une puissance de 10mW/cm² au travers du masque sur lequel les canaux sont dessinés. Enfin les motifs de « marche » sont révélés par une immersion dans du développeur AZ400K dilué au 1/3,5 pendant 3 min 50.

II.2.2.2. Gravure et préparation du moule

Une fois la résine développée et les motifs apparus, le substrat est gravé au bâti STS par une gravure réactive ou RIE par un gaz C₄F₈ à 100 sccm, O₂ à 45 sccm et SF₆ à 450 sccm. La gravure dure environ 1h avec une observation et vérification intermédiaire pour vérifier son bon déroulement.

Une fois le substrat gravé, la résine est retirée avec un nettoyage acétone-alcool puis le substrat est replacé dans le bati STS pour y déposer une couche de C₄F₈ qui sert de couche de passivation et empêchera au PDMS d'adhérer irréversiblement à la surface du silicium (Figure 2- 17).

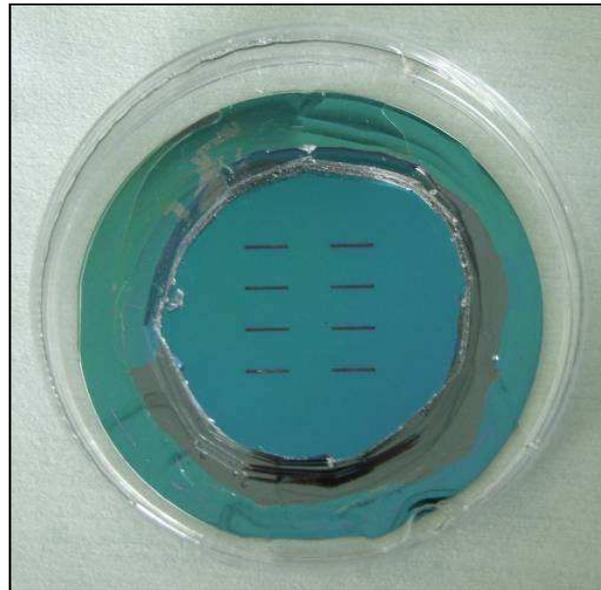


Figure 2- 17 : Photo du moule en silicium servant à réaliser les microcanaux en PDMS avec la zone contenant les marches au milieu. La couleur « essence » à la surface du silicium est due à la passivation au C_4F_8 .

II.2.2.3. Préparation et fixation des canaux

Les canaux sont réalisés en préparant du PDMS comme précédemment décrit pour les puits et en le coulant sur le moule de silicium. Une fois le PDMS polymérisé et les canaux moulés sur le substrat gravé, la zone de PDMS contenant les canaux est détachée du substrat avec un scalpel et poinçonnée au niveau de l'entrée et de la sortie de chaque canal de façon à créer leur accès. Les canaux sont ensuite fixés aux électrodes sur le substrat de verre par oxydation au plasma d'oxygène.

Un schéma en coupe permettant de distinguer les différentes couches de matériaux utilisés pour la réalisation du dispositif est présenté Figure 2- 18.

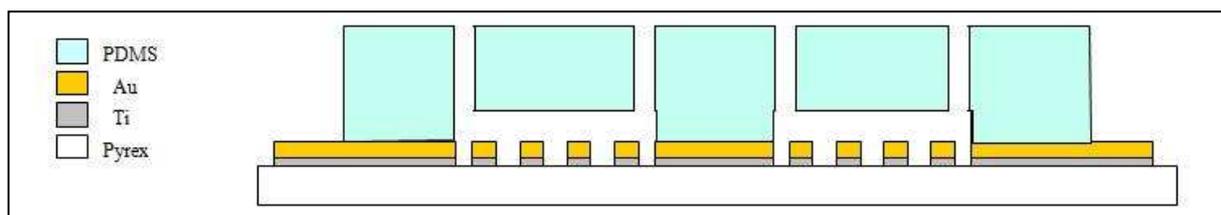


Figure 2- 18 : Schéma en coupe du dispositif à micro-canaux.

Avant le plasma, les électrodes et la pièce de PDMS contenant les micro-canaux sont précautionneusement nettoyées à l'alcool isopropylique et séchées. Les deux pièces sont ensuite placées dans une chambre à plasma et exposées à un plasma d'oxygène sous une pression de 1000 mTorr et une puissance de 20 W pendant 30 s. Ces paramètres ont été déterminées selon les travaux de Bhattacharya (2-13). Ils permettent d'obtenir la fixation la plus forte entre le PDMS et le verre, fixation pouvant subir des pressions maximales de 4,82 Bar.

A la fin du plasma, les deux pièces sont progressivement accolées en faisant attention de ne pas encapsuler des bulles d'air sous le PDMS. Ce procédé assure une fixation permanente du PDMS sur le verre et sur les électrodes en or.

Un exemple de canal fixé aux électrodes est montré Figure 2- 19. Le dispositif réalisé est laissé à l'air libre pendant au moins 30 minutes avant sa première utilisation.

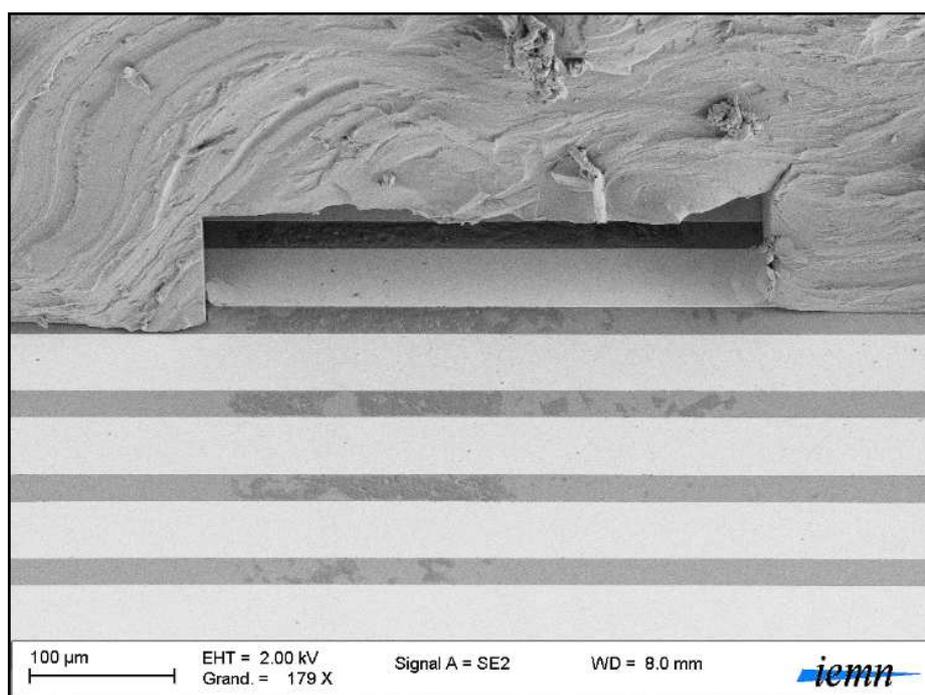


Figure 2- 19 : Image MEB d'un canal fixé aux électrodes et sectionné.

II.3. Connexion des micro-dispositifs au matériel de mesure

II.3.1. Conception et réalisation des différents circuits imprimés

II.3.1.1. Choix du type de connexion des dispositifs aux appareils de mesures

Pour contacter nos microdispositifs, nous avons pu utiliser des pointes couramment employées pour la caractérisation de système microélectronique ou des circuits imprimés. Les pointes présentent l'avantage de pouvoir être contactées très rapidement au dispositif. Seulement ce contact peut être assez fragile et entraîner une variabilité de la résistance de contact difficilement contrôlable.

Nous avons donc opté pour des circuits imprimés qui permettent d'assurer un contact électrique stable et facilite la mise en œuvre des expériences biologiques.

II.3.1.2. Réalisation des circuits imprimés

Au cours de cette thèse, nous avons utilisé deux types d'impédancemètres : l'Agilent 4192 et l'Agilent 4294. Ces impédancemètres ont des caractéristiques très proches. Leurs principales différences sont liées à leur résolution fréquentielle (plus faible pour le 4192) et à l'absence d'écran digitale pour le 4192.

Comme précédemment décrit au paragraphe I.2.1.1. (Figure 2- 2), chaque zone de détection des bioMEMS est constituée de deux électrodes. Nous avons donc utilisé les appareils de mesure en configuration 2 points.

Comme les impédancemètres ne peuvent effectuer qu'une mesure à la fois, il est inutile de prévoir plusieurs réseaux d'électrodes indépendants. Les réseaux de microélectrodes ont donc été réalisés avec une contre-électrode commune, l'électrode au centre de chaque substrat, comme décrit sur la Figure 2- 2.

Comme pour les réseaux d'électrodes des micro-dispositifs, les circuits imprimés des dispositifs à puits et à micro-canaux ont donc été conçus selon cette configuration deux points: une ligne commune pour la contre-électrode et, soit quatre lignes distinctes pour les dispositifs à puits (Figure 2- 20), soit huit lignes pour les dispositifs à micro-canaux (Figure 2- 21).

Les typons de ces circuits ont été réalisés avec le logiciel Eagle. Les circuits imprimés ont été réalisés avec des plaques photosensibles double-face dans les locaux de l'IEMN et au bâtiment P3 de l'Université des Sciences et Techniques de Lille 1 par les techniques classiques d'insolation, révélation et gravure chimique. Des trous ont été usinés au travers des plaques pour permettre des observations microscopiques par transmission.

La Figure 2- 20 présente le dispositif à puits connecté à son circuit imprimé, la Figure 2- 21 le dispositif microfluidique.

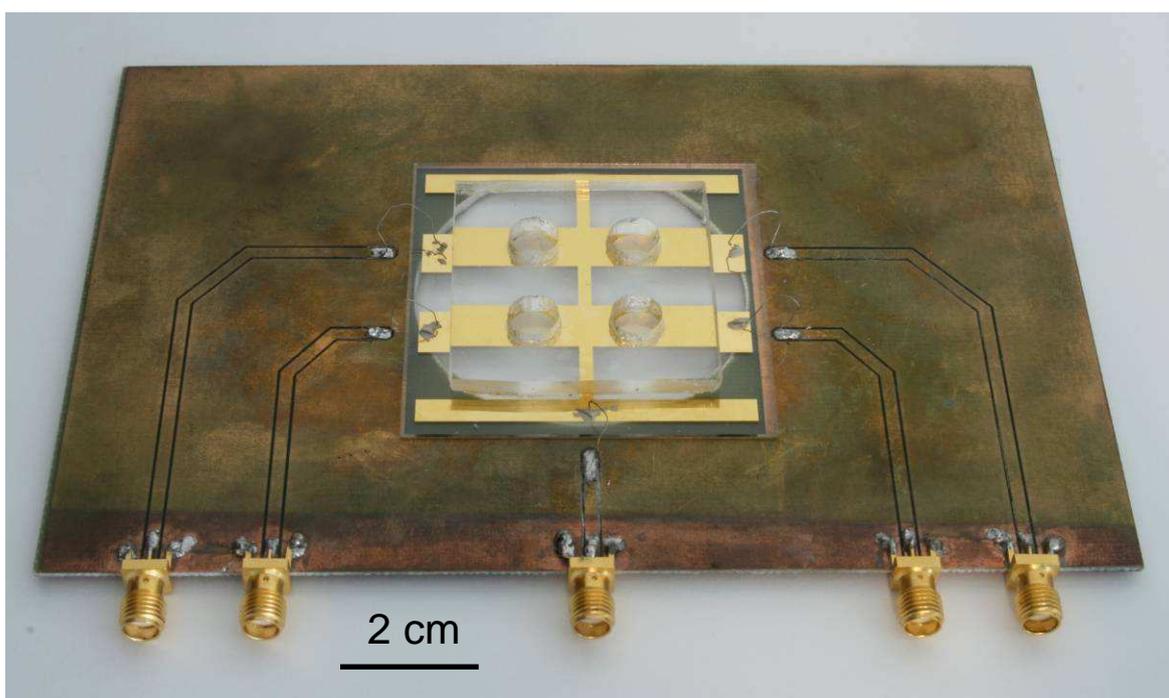


Figure 2- 20 : Photo du micro-dispositif à puits monté sur son circuit imprimé.

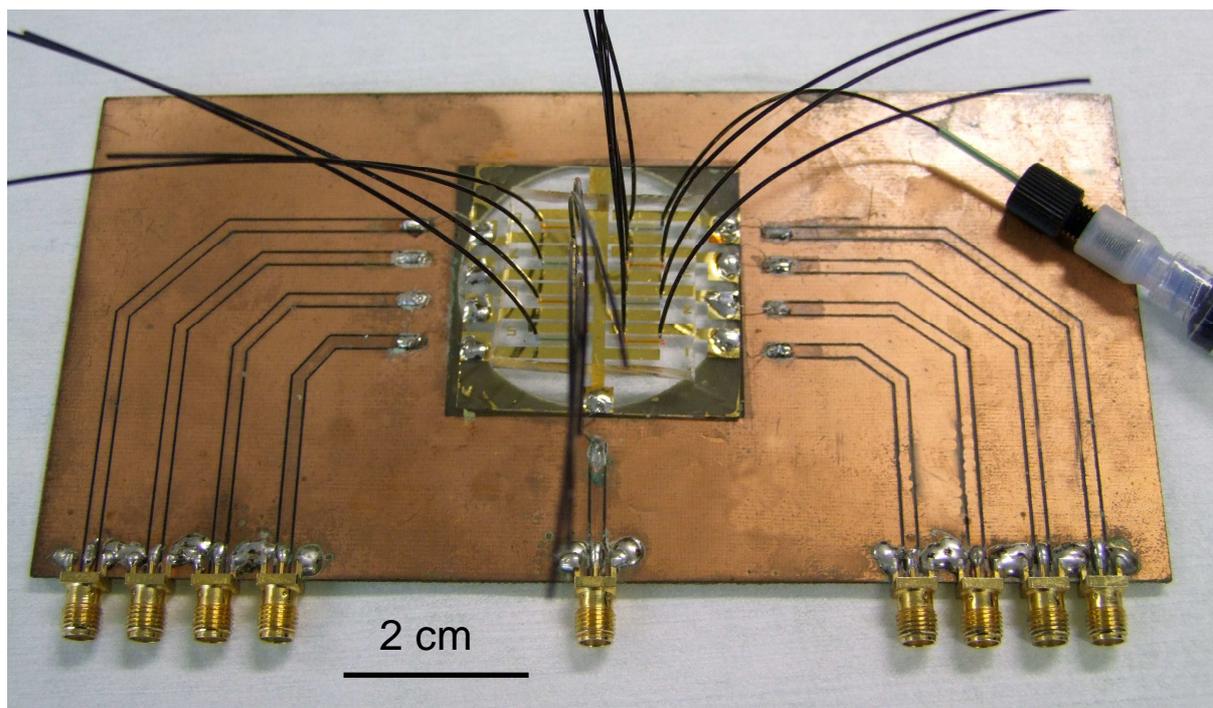


Figure 2- 21 : Photo du micro-dispositif à micro-canaux sur son circuit imprimé. Des colorants bleu et rouge ont été injectés dans les micro-canaux et les capillaires d'accès sont connectés.

II.3.2. Connexion des dispositifs aux circuits imprimés

Dans un premier temps, les dispositifs ont été connectés au circuit imprimé par des fils d'or. Pour réaliser cette soudure, nous avons dû déposer de l'or par dépôt électrolytique sur les pistes des circuits imprimés. Pour connecter ces fils d'or, nous avons d'abord utilisé de la résine électro-conductrice Epoxy.

Les fils d'or se sont rapidement révélés trop fragile, se cassant notamment pendant le transport des dispositifs. Nous avons donc utilisé par la suite des fils de cuivre issu de câbles multibrins. Au lieu d'utiliser de la résine epoxy, nous avons soudé directement les fils de cuivre sur l'or. Ces soudures sont visibles sur les Figure 2- 20 et Figure 2- 21. Lors de ces soudures, il faut faire attention à ne pas chauffer trop longtemps l'étain au contact de l'or sous peine de l'absorber dans l'étain.

II.3.3. Connectiques

Pour relier les impédancemètres à ces circuits imprimés, nous avons choisi d'utiliser des câbles SMA qui sont polyvalents et ergonomiques.

Nous avons utilisé les impédancemètres en configuration deux points mais ils sont à la base prévus pour des mesures en configuration quatre points. Ils possèdent donc quatre terminaux de sorties. Pour passer à une configuration deux points, il suffit de relier les terminaux de sortie deux à deux, comme présenté sur le diagramme de connexion de la Figure 2- 22 : les sorties basses en tension et courant (L_p et L_c respectivement) sont reliées entre elles, comme les sorties hautes en tension et courant (H_p et H_c respectivement).

Pour établir une configuration de mesure 2 points, les câbles SMA issus des quatre terminaux de sortie des impédancemètres doivent avoir leurs points chauds reliés deux à deux et toutes les masses en commun. Pour relier les points chauds, nous utilisons deux Tés SMA (figure 2.22). Pour relier les masses, nous fixons les câbles SMA à des connecteurs SMA de bords de cartes dont les masses sont soudées au plan de masse du circuit imprimé. Ces connecteurs sont visibles sur les Figure 2- 20 et Figure 2- 21 et schématisés sur la Figure 2- 22.

Avec le montage représenté Figure 2- 22, pour changer le puits d'étude, il faut intervertir manuellement le câble SMA connecté à l'électrode « distincte » de l'un des réseaux d'électrodes.

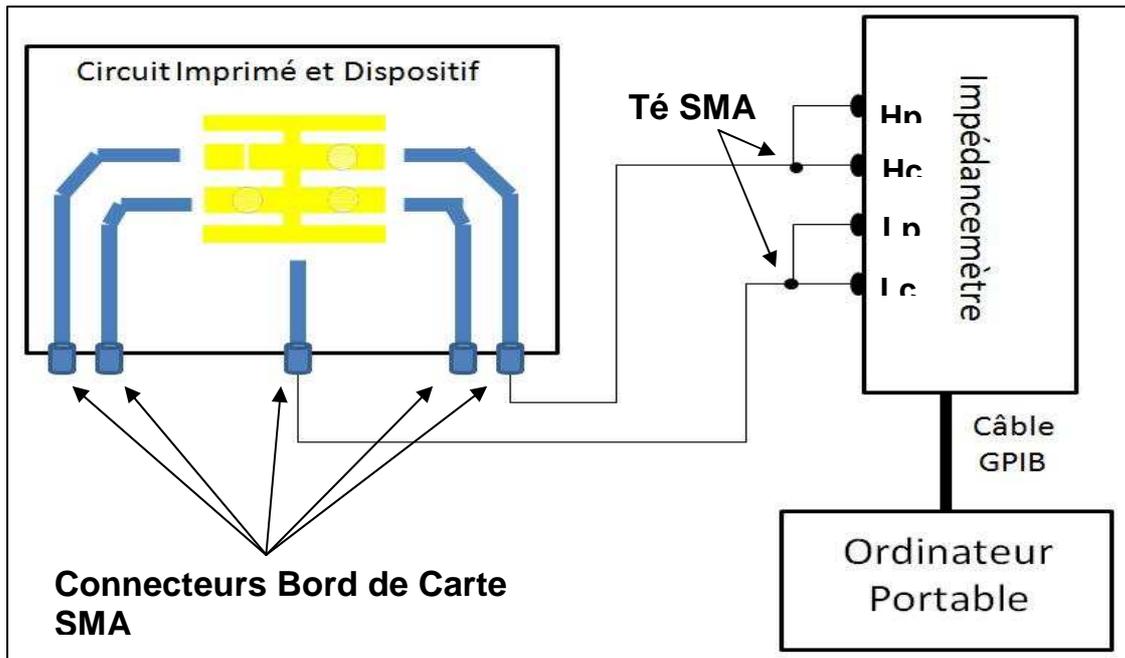


Figure 2- 22 : Diagramme de connexion du montage expérimental pour réaliser des mesures sur un unique puits. Un ordinateur portable est branché sur l'impédancemètre pour gérer automatiquement son utilisation et le rapatriement des données. Le programme utilisé pour cela est présenté au paragraphe III.2.1.

II.3.4. Circuit de multiplexage des mesures

En plus de ces deux circuits imprimés, nous avons réalisé un circuit électronique permettant de changer automatiquement de réseaux d'électrodes.

Comme ces réseaux ont une électrode en commun constamment reliée à la sortie basse de l'impédancemètre, le réseau analysé par l'impédancemètre est celui dont la contre-électrode est reliée à la sortie haute de l'impédancemètre. Pour changer de réseau, il suffit donc de changer cette seule connexion.

Pour réaliser automatiquement ce changement de connexion, nous avons réalisé un circuit sur lequel des relais électrostatiques permettent de commuter l'électrode reliée à la sortie haute de l'impédancemètre et ainsi le réseau analysé.

La commutation de ces relais est commandée par une application Labview (décrite au paragraphe III.2.1) via le port parallèle d'un ordinateur. Ce circuit est connecté en série avec les circuits imprimés des bioMEMS présentés en Figure 2- 23. Il permet d'analyser en parallèle jusqu'à huit réseaux d'électrodes issus de deux dispositifs distincts. Son typon est présenté en annexe (Annexe 1).

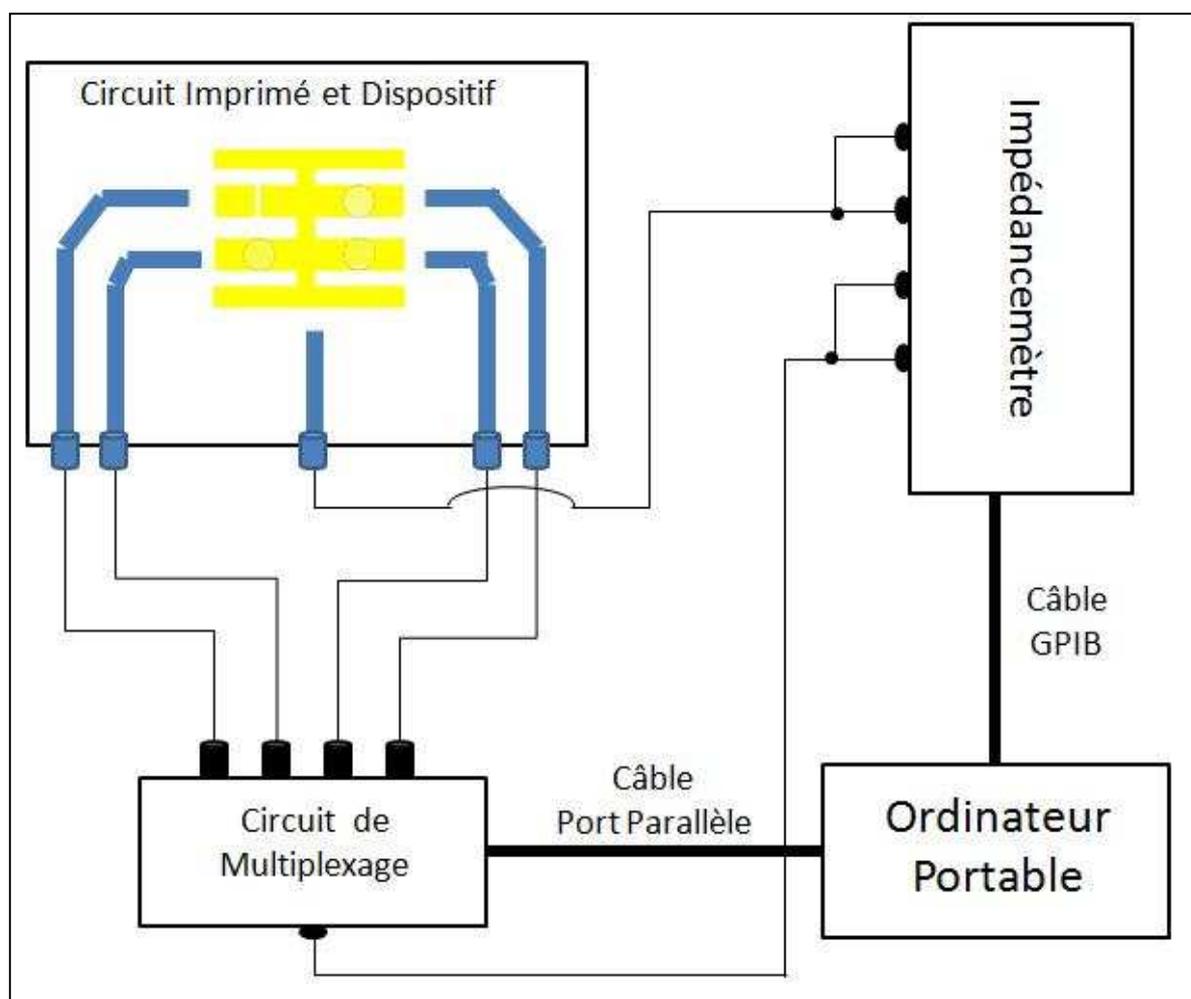


Figure 2- 23 : Diagramme de connexion du montage expérimental permettant d'intervenir automatiquement le puits d'étude.

III. Utilisation et interfaces de mesure des analyseurs d'impédance

III.1. Différents types d'analyse linéaire

Les impédancemètres Agilent 4192 et 4294 permettent d'effectuer différents types de mesure électrique.

III.1.1. Mesure fréquentielle

Pour mesurer une impédance, les impédancemètres enregistrent le courant traversant le système lorsque celui-ci est soumis à une tension alternative d'amplitude connue.

Pour réaliser un spectre d'impédance, le courant est mesuré en faisant varier progressivement la fréquence de la tension alternative d'excitation.

En effectuant pour chaque fréquence le rapport des amplitudes du courant et de la tension et en mesurant leur déphasage, l'évolution fréquentielle de l'impédance complexe peut être déterminée.

La spectroscopie d'impédance correspond à l'étude de cette évolution fréquentielle.

Un spectre d'impédance peut être étudié de différentes façons (cf paragraphe IV.1.) :

- En étudiant l'évolution fréquentielle de l'amplitude et de la phase de l'impédance.
- En étudiant l'évolution fréquentielle de sa partie réelle et de sa partie imaginaire..
- En traçant un diagramme de Cole-Cole qui représente l'évolution de la partie imaginaire en fonction de la partie réelle. Chaque point constituant le graphe correspond à une valeur de la partie réelle et de la partie imaginaire obtenue à une fréquence spécifique. Sur ce type de graphique, l'évolution fréquentielle de la courbe doit donc être précisée.
- En choisissant un circuit électrique équivalent (par exemple une résistance et une capacité en série ou en parallèle) et en étudiant l'évolution fréquentielle de la valeur de chacun de ses composants.

La durée de mesure d'un spectre fréquentielle varie selon la plage de fréquence étudiée, le nombre de points de mesure, le type de moyenne effectuée sur ces points et le type de balayage fréquentiel (linéaire ou logarithmique).

Typiquement, la mesure d'un spectre fréquentielle mesurée avec l'Agilent 4294 prend 45s, avec l'Agilent 4192 1m30s.

III.1.2. Mesure cinétique à fréquence fixe

Les réactions électrochimiques en biologie peuvent avoir des cinétiques rapides, il est donc important de pouvoir les étudier avec des résolutions temporelles élevées.

Les impédancemètres peuvent permettre ce genre d'étude en enregistrant l'impédance d'un système à une fréquence fixe avec une résolution temporelle élevée. Il est ainsi possible d'obtenir des mesures cinétiques précises de l'impédance complexe.

L'Agilent 4294 peut effectuer directement des analyses cinétiques à une fréquence précise avec une résolution temporelle maximale de 1 milli-seconde pendant une durée maximale de 2H48.

L'Agilent 4192 peut effectuer indirectement des analyses cinétiques en modifiant des paramètres de la mesure fréquentielle. Cet impédancemètre ne permet pas de mesurer une impédance à une fréquence fixe. Il peut par contre effectuer un balayage fréquentiel très court autour d'une fréquence précise. En réduisant au minimum cette plage fréquentielle, la fréquence d'étude devient ainsi « quasi » constante.

Le balayage fréquentiel autour de la fréquence d'étude peut être minimisé en utilisant la résolution fréquentielle maximum:

- 1 mHz pour les fréquences allant de 5 Hz à 10 KHz.
- 10 mHz de 10 KHz à 100 KHz.
- 100 mHz de 100 MHz à 1 MHz.
- 1 Hz de 1 MHz à 13 MHz.

La résolution temporelle de la mesure cinétique effectuée avec l'Agilent 4192 dépend du nombre de points mesurés, de la fréquence d'étude et de la plage fréquentielle choisie (normalement la plus petite possible). Elle n'est pas précisée dans les fiches techniques de l'appareil, il est donc important de la paramétrer avant chaque expérience.

Typiquement, la résolution temporelle des mesures cinétiques effectuées avec l'Agilent 4192 est de 50s. Elle est donc beaucoup plus faible que celle de l'Agilent 4294.

III.2. Enregistrement et traitement des données

III.2.1. Enregistrement automatique des données

Afin de rapatrier numériquement les données des mesures effectuées avec les impédancemètres, nous avons développé une application Labview permettant d'enregistrer les valeurs des spectres d'impédance et des mesures cinétiques sous la forme de fichiers texte. Ces applications permettent aussi de lancer automatiquement plusieurs mesures de spectres d'impédance d'affilées avec les mêmes paramètres.

Le logiciel Labview est un programme de développement d'applications dédiées à l'instrumentation permettant d'interagir avec un appareil de mesure par le biais d'un ordinateur.

L'application permettant de mesurer des spectres d'impédance a été développée et modifiée à partir d'une première version écrite par Marc Faucher, chercheur au sein du groupe NAM6 à l'IEMN. La Figure 2- 24 présente une capture d'écran de la fenêtre de commande de ce programme avec un spectre d'impédance mesuré.

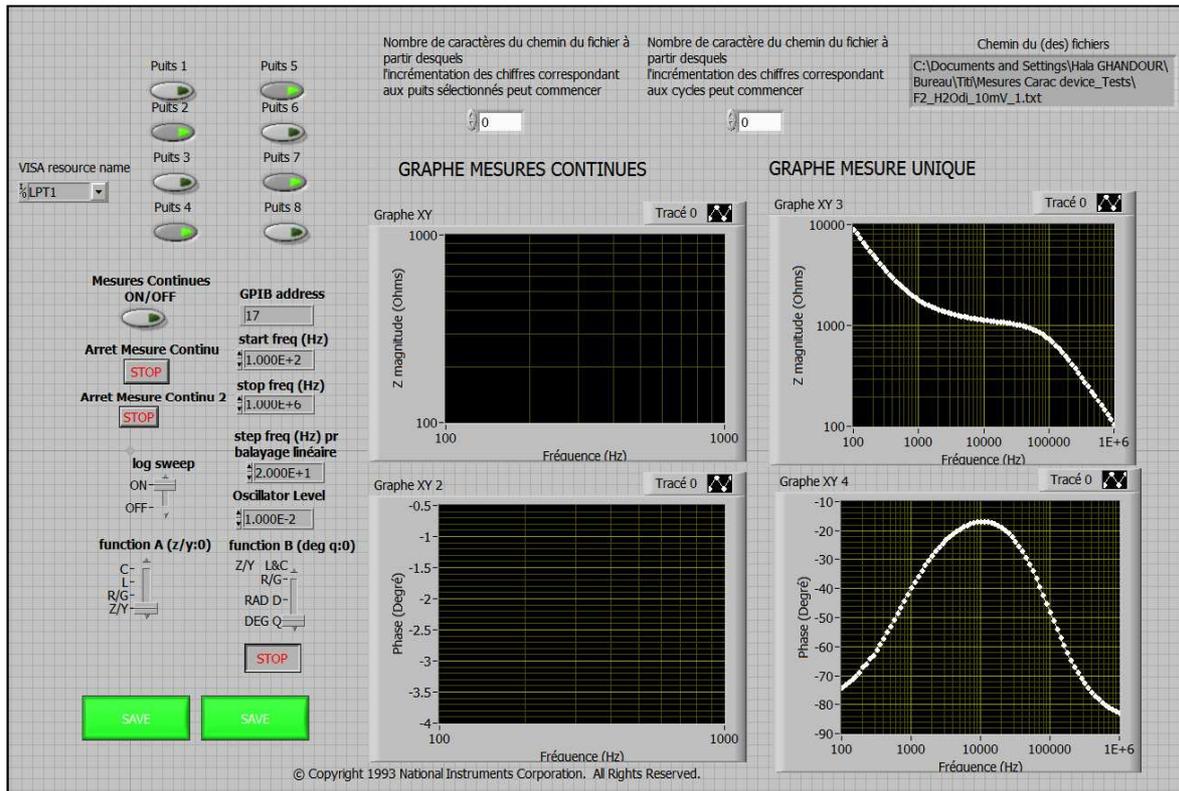


Figure 2- 24 : Capture d'écran de l'application Labview développée pour paramétrer, lancer les mesures et rapatrier leurs données.

Nous pouvons voir sur cette capture d'écran que l'application permet de définir :

- l'amplitude de la tension d'excitation
- la plage fréquentielle de mesure,
- le nombre de points de balayage,
- si la répartition de ces points de mesure est réalisée de façon linéaire ou logarithmique,
- le type de moyenne effectuée sur ces points,
- les différentes électrodes du dispositif activées (quand le dispositif est connecté au circuit de multiplexage précédemment décrit)
- le répertoire où sont créés les fichiers textes regroupant les mesures des spectres d'impédance.
- si les mesures doivent se faire de manière continue ou non.

L'application permettant d'effectuer des mesures cinétiques à fréquence fixe avec l'Agilent 4294 est identique à celle enregistrant les spectres d'impédance. Il suffit de régler le balayage fréquentielle

III.2.2. Traitement des données

III.2.1.1. Comparaison des mesures fréquentielles

Afin d'analyser et de comparer rapidement les impédances répertoriées dans les fichiers textes issus du programme Labview, nous avons utilisé une macro Excel permettant d'afficher automatiquement et simultanément sur les mêmes graphes les spectres d'impédance de plusieurs mesures. Une fois les fichiers textes sélectionnés par l'intermédiaire de la macro, celle-ci génère automatiquement quatre graphes représentant respectivement les modules des impédances, leurs phases, leurs parties réelles et leurs parties imaginaires en fonction de la fréquence, selon une échelle logarithmique. De cette façon, il est très rapide de comparer plusieurs spectres d'impédance.

Cette macro a été développée par Damien Debuissou, doctorant du groupe BioMEMS.

III.2.2.2. Analyse cinétique des spectres d'impédance

Nous avons vu au paragraphe III.1.2 que les impédancemètres peuvent enregistrer des mesures cinétiques à des fréquences fixes. Néanmoins, ces analyses cinétiques ne permettent pas d'effectuer des mesures d'impédance sur des longues périodes. Cette caractéristique peut être intéressante pour l'étude de la croissance cellulaire (sur plusieurs heures, voire plusieurs jours). De plus, les mesures à fréquence fixe ne permettent pas de comparer plusieurs fréquences d'analyse en une même expérience. L'enregistrement continu des spectres d'impédance permet de pallier ces problèmes.

Pour suivre l'évolution temporelle d'un système biologique à différentes fréquences, plusieurs spectres d'impédance doivent être successivement enregistrés. La résolution temporelle obtenue avec ces mesures fréquentielles est alors fonction de la durée de mesure d'un unique spectre. Cette durée dépend du nombre de points de mesure, de l'étendue de la plage fréquentielle et de la manière avec laquelle est moyenné chaque point de mesure.

Seulement, les mesures enregistrées correspondant à plusieurs fichiers successifs de spectres d'impédance, les analyses cinétiques ne sont pas triviales.

Nous avons donc développé une application Matlab permettant de récupérer automatiquement les impédances issues des spectres à des fréquences précises. Cette dernière va automatiquement extraire dans les fichiers de spectres d'impédance des données mesurées à la fréquence choisie. Une fois ces impédances extraites, elles sont automatiquement regroupées dans un nouveau fichier Excel en fonction de leur temps d'acquisition et un graphique cinétique est généré sur une interface graphique.

La Figure 2- 25 présente une capture d'écran de l'interface graphique de commande de ce programme. Cette interface permet de sélectionner les données à rapatrier (module et phase ou partie réelle et imaginaire) ainsi que la fréquence d'analyse.

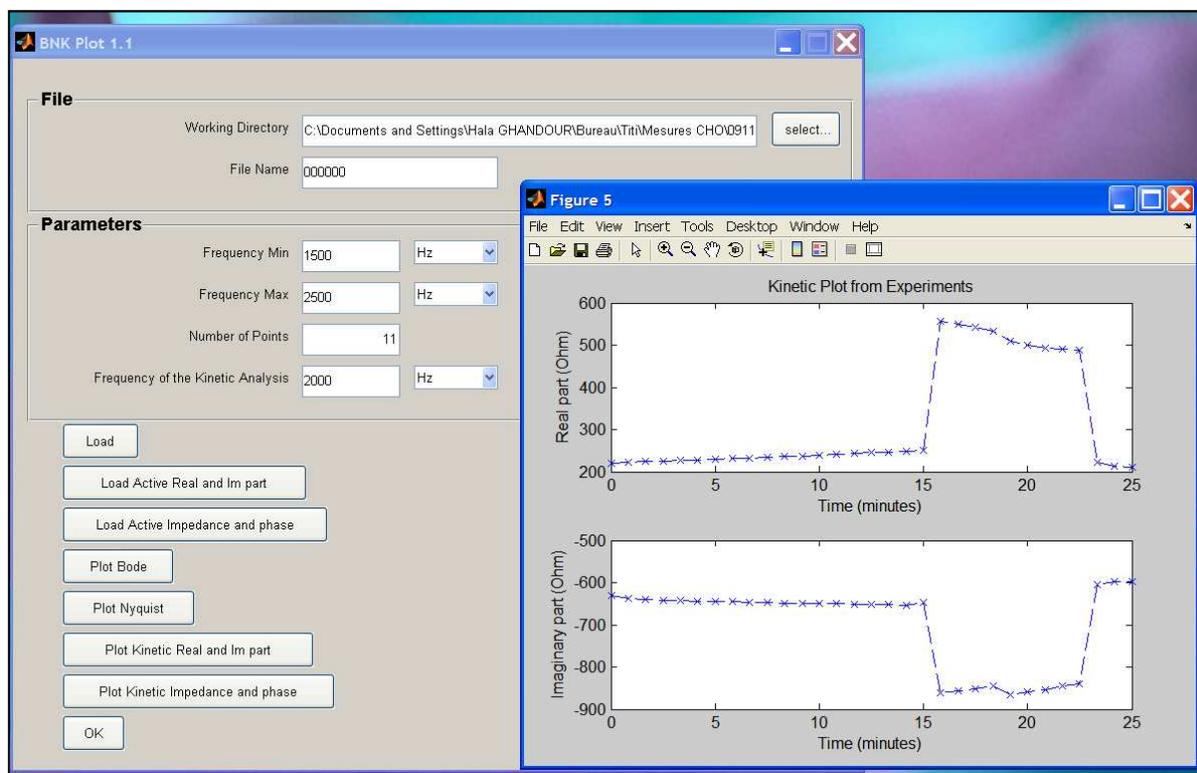


Figure 2- 25 : Capture d'écran de l'application Matlab développée pour analyser cinétiquement les données issues des spectres d'impédance.

IV. Notions théoriques

IV.1. Impédance électrochimique

L'impédance électrochimique d'un système biologique est la mesure de sa résistance électrique au passage d'un courant électrochimique alternatif créé par la mise sous tension de ce système à un potentiel alternatif extérieur. Quand le courant et la tension sont continus, on parle de résistance électrique, quand ils sont alternatifs, on parle d'impédance.

L'impédance $Z(\omega)$ correspond donc au rapport de la tension à laquelle est soumis l'échantillon sur le courant qui le traverse. Cette tension $U(\omega)$ et ce courant $I(\omega)$ étant alternatifs, l'impédance dépend également de la fréquence :

$$Z(\omega) = \frac{U(\omega)}{I(\omega)} \quad (1)$$

Comme le courant et la tension sont alternatifs, ils possèdent une certaine amplitude et oscillent avec un certain déphasage. Ces deux valeurs définissent les paramètres d'une tension ou d'un courant alternatif. Elles peuvent donc être représentées par des grandeurs complexes comprenant un module et une phase. Les équations suivantes correspondent aux représentations complexes du courant et de la tension, sous leur forme exponentielle.

$$I(\omega) = |I(\omega)| \cdot e^{j(\omega t + \theta_i)} \quad (2)$$

$$U(\omega) = |U(\omega)| \cdot e^{j(\omega t + \theta_v(\omega))} \quad (3)$$

Où $|I(\omega)|$ et $|U(\omega)|$ représentent respectivement le module (où l'amplitude) du courant et de la tension du système, ω est la pulsation du courant et de la tension alternatifs ($\omega = 2\pi \cdot f$, où f est la fréquence du courant et de la tension alternatifs), j est l'unité imaginaire tel que $i^2 = -1$ et θ_i et $\theta_v(\omega)$ sont respectivement les phases du courant et de la tension alternatif du système. Si θ_i est choisi comme référence de phase, elle ne varie pas en fonction de la fréquence, au contraire de $\theta_v(\omega)$.

L'impédance complexe est donc égale à :

$$Z(\omega) = \frac{|U(\omega)|}{|I(\omega)|} \cdot e^{j(\theta_v(\omega) - \theta_i)} = |Z(\omega)| \cdot e^{j\varphi(\omega)} \quad (4)$$

Où $|Z(\omega)|$ est le rapport entre l'amplitude de la tension sur l'amplitude du courant et φ correspond au déphasage entre la tension et le courant alternatifs.

Sous sa forme cartésienne, l'impédance complexe s'écrit :

$$Z(\omega) = R(\omega) + jX(\omega) \quad (5)$$

Où R est la partie réelle de l'impédance qui représente sa résistance et X est sa partie imaginaire qui représente sa réactance.

La réactance correspond à l'opposition du système aux variations de courant. Nous pouvons préciser que lorsque $X > 0$, on parle de réactance inductive et lorsque $X < 0$, on parle de réactance capacitive. Si la réactance X est nulle, le système est purement résistif.

Pour les systèmes biologiques, en basse fréquence, les membranes sont isolantes (cf chapitre 1, paragraphe I.3.1). La réactance X est donc négative, c'est une réactance capacitive.

X peut donc s'écrire :

$$X(\omega) = -\frac{1}{C(\omega) \cdot \omega} \quad (6)$$

De façon générale, R et X représentent respectivement l'ensemble des phénomènes s'opposant à la propagation des courants électrochimiques de conduction et l'ensemble des phénomènes s'opposant à la propagation des courants électrochimiques de déplacement au sein du système biologique.

Quand on représente une impédance complexe sous sa forme cartésienne, on modélise implicitement cette impédance par une résistance en série avec une réactance, comme représenté sur la figure suivante.

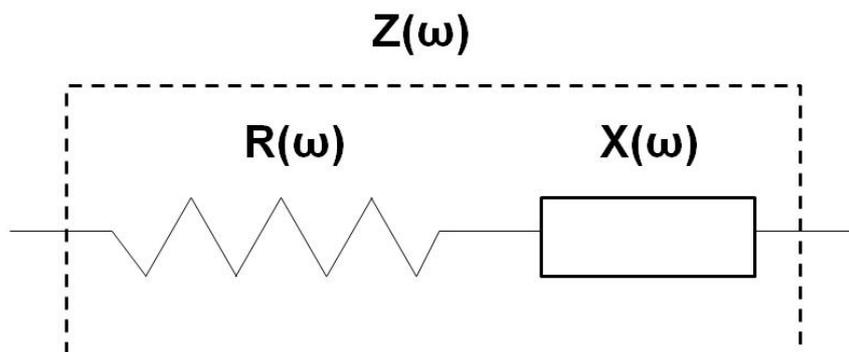


Figure 2- 26 : Circuit électrique d'une impédance complexe sous sa forme série.

L'impédance complexe peut être représentée dans le plan complexe (Figure 2- 27) :

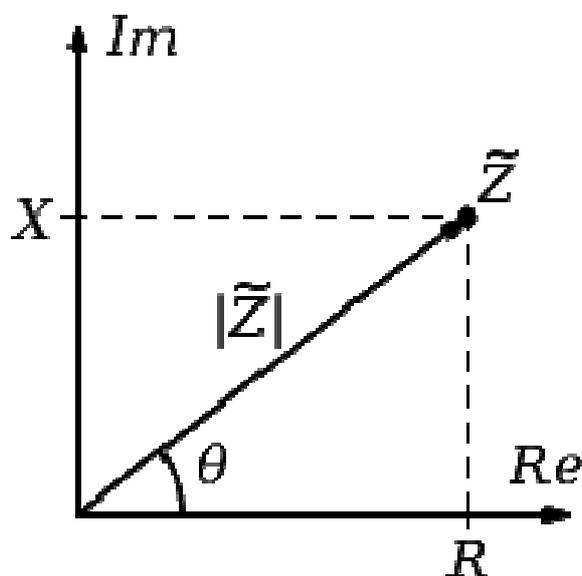


Figure 2- 27 : Représentation graphique d'une impédance complexe dans le plan complexe. (2-14)

Nous avons donc :

$$|Z(\omega)| = \sqrt{R(\omega)^2 + X(\omega)^2} \quad (7)$$

et

$$\varphi(\omega) = \arctan\left(\frac{X(\omega)}{R(\omega)}\right) = \arccos\left(\frac{R(\omega)}{|Z(\omega)|}\right) = \arcsin\left(\frac{X(\omega)}{|Z(\omega)|}\right) \quad (8)$$

Et inversement,

$$R(\omega) = |Z(\omega)| \cdot \cos(\varphi(\omega)) \quad (9)$$

et

$$X(\omega) = |Z(\omega)| \cdot \sin(\varphi(\omega)) \quad (10)$$

Pour déterminer exhaustivement l'impédance complexe d'un système, il nous suffit donc de connaître soit la magnitude et la phase de l'impédance, soit sa résistance et sa réactance.

IV.2. Permittivité complexe et conductivité

La grande majorité des matériaux ne sont jamais parfaitement conducteurs ou diélectriques. Un matériau considéré conducteur électrique perd une partie de sa puissance sous la forme de courant de déplacement et inversement, un matériau diélectrique laisse toujours passer une partie du courant sous la forme de courant de conduction.

Pour représenter ces pertes, une notation complexe peut être utilisée.

Pour un matériau diélectrique non idéal, la permittivité complexe ε^* s'écrit (2-15) :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon(\omega) - j \frac{\sigma(\omega)}{\omega} \quad (11)$$

Où ε représente la permittivité diélectrique du matériau, en $C.V^{-1}.m^{-1}$ et σ sa conductivité électrique, en $S.m^{-1}$.

Rappelons que $\varepsilon = \varepsilon_r \cdot \varepsilon_0$ où ε_r est la permittivité diélectrique relative et ε_0 la permittivité diélectrique du vide ($8,854187 \cdot 10^{-12} C.V^{-1}.m^{-1}$).

Quand un matériau diélectrique est considéré comme idéal, les courants se propagent uniquement sous la forme de courant de déplacement. Le circuit électrique équivalent à un matériau diélectrique idéal est donc une réactance négative, c'est-à-dire à une capacité.

Quand un matériau diélectrique est considéré comme non idéal (e.g. une suspension biologique), les courants de conduction se propagent en parallèle des courants de déplacement. Le circuit électrique équivalent à un matériau diélectrique non idéal est donc une réactance négative $X_{//}$, c'est-à-dire à une capacité $C_{//}$, mise en parallèle avec une résistance $R_{//}$. Pour étudier un matériau diélectrique, il est donc utile de représenter l'impédance complexe directement sous la forme d'un circuit électrique parallèle (Figure 2- 28) plutôt que série (Figure 2- 26).

Le circuit électrique parallèle équivalent à l'impédance d'un matériau diélectrique non idéal est représenté sur la figure suivante :

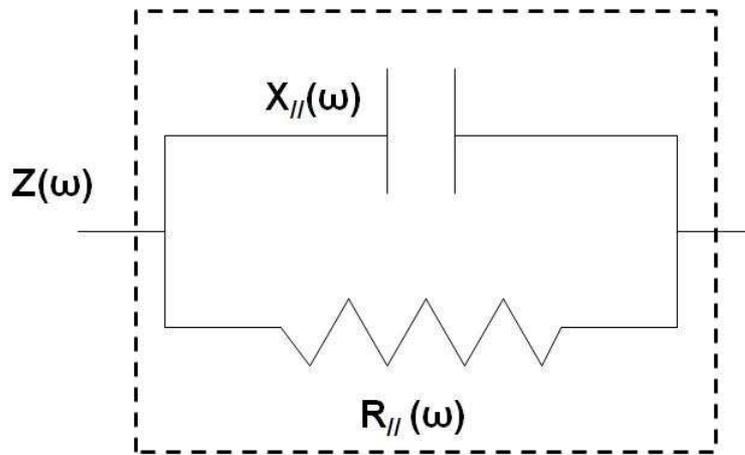


Figure 2- 28 : Circuit électrique équivalent à un matériau diélectrique non idéal

IV.3. Constante de cellule

La permittivité complexe d'un matériau ou d'un système biologique est ainsi liée à son impédance complexe par la formule :

$$\varepsilon^*(\omega) = \frac{\kappa}{j.\omega.Z(\omega)} \quad (12)$$

où κ est la constante de cellule en m^{-1} .

La constante de cellule κ (ou facteur de cellule) est un facteur dépendant uniquement des dimensions et de la géométrie du biodétecteur.

Ce paramètre est important car, en utilisant l'équation (12), il permet de déterminer les propriétés électriques intrinsèques du système (σ et ϵ_r) en mesurant sa capacitance et sa résistance.

En effet, en développant l'expression (12) et en l'identifiant avec l'expression (11) de la permittivité diélectrique complexe, nous obtenons pour la conductivité électrique σ et pour la permittivité diélectrique relative ϵ_r :

$$\sigma(\omega) = \kappa \frac{R(\omega)}{R(\omega)^2 + X(\omega)^2} \quad (13)$$

et

$$\epsilon_r(\omega) = -\frac{\kappa}{\epsilon_0 \cdot \omega} \frac{X(\omega)}{X(\omega)^2 + R(\omega)^2} \quad (14)$$

Par rapport au modèle de circuit électrique équivalent à un matériau diélectrique non idéal (Figure 2- 28), la conductivité électrique σ et la permittivité diélectrique relative ϵ_r sont directement proportionnelles à $R_{//}$ et $X_{//}$ respectivement selon les formules (2-16):

$$\sigma(\omega) = \frac{\kappa}{R_{//}(\omega)} \quad (15)$$

et

$$\epsilon_r(\omega) = \frac{\kappa}{\epsilon_0 \cdot \omega \cdot X_{//}(\omega)} = \frac{\kappa \cdot C_{//}(\omega)}{\epsilon_0} \quad (16)$$

Ces expressions se rapprochent de celles classiquement utilisées pour une résistance et une capacité idéales.

En effet, pour un matériau parfaitement conducteur, filiforme et homogène avec une conductivité électrique σ , présentant une résistance R , nous avons $\sigma = \frac{1}{R} \cdot \frac{L}{A}$, où L est la longueur du matériau et A l'aire de sa section. Le facteur κ est donc ici égal à $\frac{L}{s}$.

Pour un condensateur idéal de capacité C constitué d'un matériau diélectrique de permittivité relative ϵ_r , nous avons $C = \frac{S}{e} \cdot \epsilon_r \cdot \epsilon_0$, où d est la distance entre les armatures et S la surface des armatures en vis-à-vis, avec les effets de bords négligés. Le facteur κ est donc ici égal à $\frac{e}{S}$.

Comme la représentation série (Figure 2- 26) et parallèle (Figure 2- 28) d'une impédance complexe sont liées par les relations :

$$R_{//}(\omega) = \frac{R(\omega)^2 + X(\omega)^2}{R(\omega)} \quad (17)$$

et

$$X_{//}(\omega) = \frac{R(\omega)^2 + X(\omega)^2}{X(\omega)} \quad (18)$$

Les équations (13), (14), (15) et (16) sont donc bien équivalentes.

Pour un condensateur plan dont les armatures ont une surface de S et sont espacées de e , Batalioto et al. ont récemment démontré que la permittivité complexe d'un matériau diélectrique est liée à son impédance complexe par les relations (2-17):

$$R(\omega) = \frac{1}{\omega} \frac{\frac{\sigma(\omega)}{\omega}}{\varepsilon(\omega)^2 + \left(\frac{\sigma(\omega)}{\omega}\right)^2} \frac{e}{S} \quad (19)$$

et

$$X(\omega) = -\frac{1}{\omega} \frac{\varepsilon(\omega)}{\varepsilon(\omega)^2 + \left(\frac{\sigma(\omega)}{\omega}\right)^2} \frac{e}{S} \quad (20)$$

D'après ces relations, pour un condensateur plan, ε et σ peuvent se calculer :

$$\sigma(\omega) = \frac{e}{S} \frac{R(\omega)}{R(\omega)^2 + X(\omega)^2} \quad (21)$$

et

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_r(\omega) \cdot \varepsilon_0 = -\frac{1}{\omega} \frac{e}{S} \frac{X(\omega)}{X(\omega)^2 + R(\omega)^2} \quad (22)$$

Dans les relations (21) et (22), les propriétés électriques du diélectrique sont déterminées dans le cas d'un condensateur plan.

Les équations (13) et (14) correspondent donc à la généralisation de ces équations à d'autres types de capteur électrique.

IV.4. Relaxation de Debye

IV.4.1. Modèle du 1^{er} ordre

Quand des charges électriques sont soumises à un champ électrique dont l'intensité et la direction dépendent du temps, la polarisation et le déplacement des charges ne se font pas instantanément. Si la fréquence d'excitation est suffisamment faible, toutes les charges ont le temps nécessaire pour changer de position, la polarisation est alors maximale. Si la fréquence augmente, la polarisation et la permittivité diminuent.

Cette dépendance fréquentielle est caractérisée par le concept de relaxation. Ce concept a été appliqué en électrochimie par Debye pour décrire le temps nécessaire aux molécules dipolaires pour s'orienter selon le champ électrique (2-18). La relaxation dipolaire au sens de Debye est un processus purement visqueux, sans force de rappel élastique. Il correspond donc à un système du premier ordre (2-19).

Le modèle de Debye décrit l'évolution fréquentielle de la permittivité diélectrique complexe ε^* d'un matériau diélectrique constitué de dipôles idéaux n'interagissant pas entre eux par l'expression:

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad (23)$$

Où ε_s est la permittivité diélectrique mesurée en continu, ε_∞ est la permittivité diélectrique mesurée en haute fréquence et τ est la constante de temps du phénomène de relaxation observé.

En multipliant la relation de Debye (23) par le facteur de cellule κ , la capacitance du diélectrique devient égale à :

$$C(\omega) = C_\infty + \frac{\Delta C}{1 + j\omega\tau} \quad (24)$$

Où $C_\infty = \kappa \cdot \varepsilon_\infty$ et $\Delta C = \kappa \cdot (\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)$

Nous pouvons définir τ par $\tau = R\Delta C$.

Ainsi, la relation de Debye est équivalente au circuit électrique suivant (2-15,2-20):

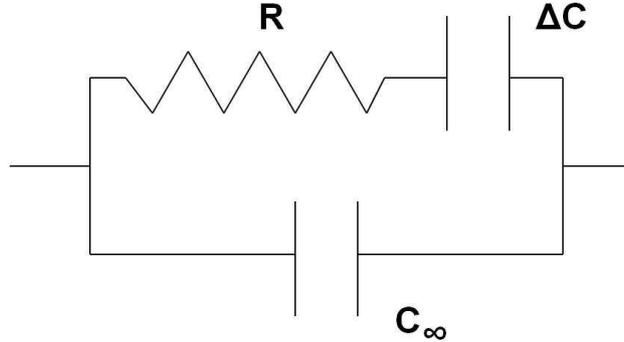


Figure 2- 29 : Circuit électrique équivalent au modèle de relaxation de Debye du 1^{er} ordre.

Lorsque le matériau diélectrique présente une conductivité statique σ_{DC} , la relation de Debye devient :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{1 + j\omega\tau} - j \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \quad (25)$$

Il suffit alors de rajouter une résistance R_{DC} en parallèle du précédent circuit électrique équivalent (Figure 2- 29), tel que $R_{DC} = \frac{\kappa}{\sigma_{DC}}$.

Le développement de l'expression (25) donne :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{1 + (\omega\tau)^2} - j \left(\omega\tau \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{1 + (\omega\tau)^2} + \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \right) \quad (26)$$

En identifiant cette expression de ε^* avec celle de la relation (11), nous obtenons :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{1 + (\omega\tau)^2} \quad (27)$$

et

$$\sigma(\omega) = \omega^2 \tau \frac{\epsilon_s - \epsilon_\infty}{1 + (\omega\tau)^2} \cdot \epsilon_0 + \sigma_{DC} \quad (28)$$

Un exemple d'évolution fréquentielle de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative suivant un modèle de Debye au premier ordre est présenté Figure 2- 30.

Dans cet exemple, $\epsilon_s = 10000$, $\epsilon_\infty = 1000$, $\tau = 1,592 \text{ ms}$ $\left(f_c = \frac{1}{2\pi\tau} = 100\text{Hz} \right)$, $\sigma_{DC} = 0$.

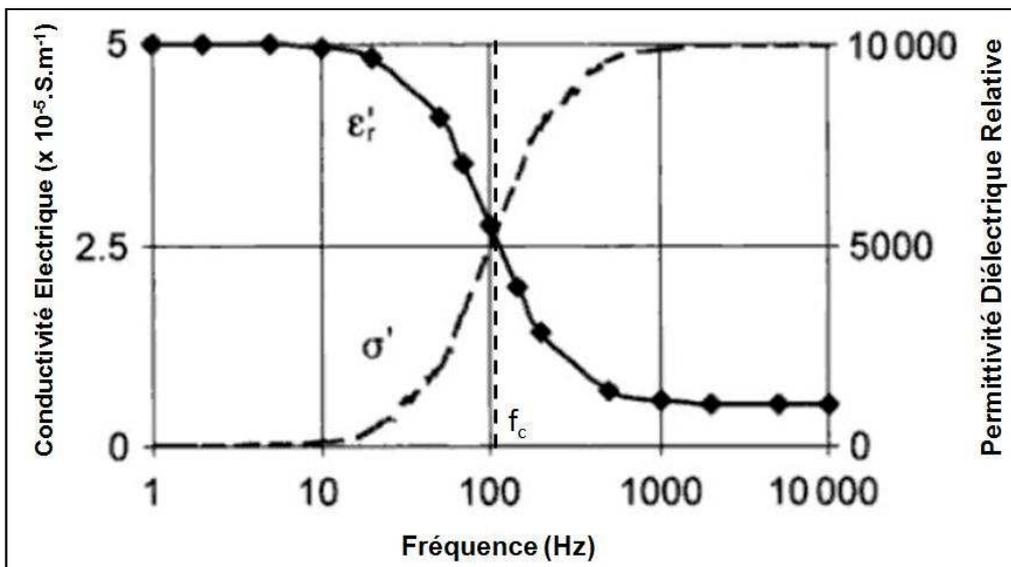


Figure 2- 30 : Evolutions fréquentielles de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative selon l'équation du modèle de relaxation de Debye au premier ordre. Adapté de (2-15).

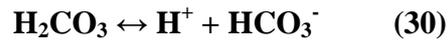
IV.4.2. Modèle du 2nd ordre

Se basant sur les travaux de MacDonald (2-20), Batalioto et al. (2-17) ont suggéré que dans le domaine des basses fréquences (< GHz), la relaxation de Debye peut être modélisée avec plusieurs temps de relaxation. Ces temps de relaxation sont dus à différents groupes d'ions avec des mobilités distinctes présents dans l'eau.

La présence de ces différents ions peut s'expliquer par la contamination de l'eau déionisée dont la pureté est difficile à conserver (2-21).

L'eau déionisée contient naturellement des ions H^+ et OH^+ mais lorsqu'elle est exposée à l'air ambiant, le CO_2 se diffuse dans l'eau et se combinent aux molécules d' H_2O pour former de l'acide carbonique H_2CO_3 (2-22,2-23).

Les réactions de dissociation suivantes ont lieu :



La contamination de l'eau déionisée par le CO_2 de l'air entraîne la présence d'autres types d'ions au sein du liquide. Ces ions peuvent présenter des temps de relaxation qui justifient l'emploi du modèle de Debye à un ordre supérieur.

Dans des domaines de fréquences supérieurs (Ghz et Thz), de nombreuses publications (2-24,2-25,2-26,2-27,2-28) ont montré que le modèle de Debye avec deux temps de relaxation pouvait être utilisé pour modéliser plus précisément les résultats expérimentaux.

Dans ce cas, la relaxation bimodale de Debye s'écrit (2-25):

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{MF}}{1 + j\omega\tau_1} + \frac{\varepsilon_{MF} - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau_2} - j \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \quad (32)$$

Où ε_{MF} est la permittivité diélectrique obtenue aux fréquences intermédiaires et τ_1 et τ_2 sont les constantes de temps des différents phénomènes de relaxation observés.

Le développement de cette expression donne :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{MF}}{1 + (\omega\tau_1)^2} + \frac{\varepsilon_{MF} - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau_2)^2} - j \left(\omega\tau_1 \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{MF}}{1 + (\omega\tau_1)^2} + \omega\tau_2 \frac{\varepsilon_{MF} - \varepsilon_\infty}{1 + (\omega\tau_2)^2} + \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \right) \quad (33)$$

Comme pour le modèle simple de Debye, si nous identifions cette expression avec la relation (11), nous obtenons pour le modèle de Debye bimodale:

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{MF}}{1 + (\omega\tau_1)^2} + \frac{\varepsilon_{MF} - \varepsilon_{\infty}}{1 + (\omega\tau_2)^2} \quad (34)$$

et

$$\sigma(\omega) = \omega^2\tau_1 \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{MF}}{1 + (\omega\tau_1)^2} \cdot \varepsilon_0 + \omega^2\tau_2 \frac{\varepsilon_{MF} - \varepsilon_{\infty}}{1 + (\omega\tau_2)^2} \cdot \varepsilon_0 + \sigma_{DC} \quad (35)$$

IV.4.3. Modèle de Cole-Cole

Comme évoqué au chapitre 1, en 1941, les frères Cole proposèrent un modèle empirique pour décrire les propriétés diélectriques de certains liquides (2-29). Ce modèle se base sur l'utilisation d'un composant électronique physiquement irréalisable : le CPE (cf lexique).

Selon cette théorie, les temps de relaxation observés lors d'un phénomène de dispersion ne suivent pas un modèle de Debye simple avec plusieurs temps de relaxation distincts mais une distribution continue de temps de relaxation. Cette distribution correspond à une gaussienne. Elle ne permet donc pas de distinguer les différents temps de relaxation mais permet d'obtenir une modélisation plus fidèle des mesures expérimentales et de définir une moyenne précise des différents temps de relaxation issus des molécules de l'électrolyte.

D'après cette théorie, la permittivité diélectrique complexe est égale à (2-29) :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_{\infty}}{1 + (j\omega\tau)^{1-a}} - j \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \quad (36)$$

Comme pour le modèle de Debye, ε_s est la permittivité diélectrique mesurée en continu et ε_{∞} est la permittivité diélectrique mesurée en haute fréquence. τ est la constante de temps correspondant à la moyenne de la distribution gaussienne, c'est-à-dire à la constante de temps moyenne autour de laquelle les autres temps de relaxation se répartissent. a est le facteur de dispersion, un nombre réel compris entre 0 et 1 déterminant la largeur de la gaussienne.

Le développement de cette expression donne :

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \cdot \left(1 + \sin\left(\frac{\pi}{2}a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a}\right)}{1 + 2 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2}a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} + (\omega\tau)^{2(1-a)}} - j \cdot \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \cdot \left(\cos\left(\frac{\pi}{2}a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a}\right)}{1 + 2 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2}a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} + (\omega\tau)^{2(1-a)}} - j \frac{\sigma_{DC}}{\omega} \quad (37)$$

Si nous identifions cette expression avec la relation (11), nous obtenons pour le modèle de Cole-Cole :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \cdot \left(1 + \sin\left(\frac{\pi}{2}a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a}\right)}{1 + 2 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2}a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} + (\omega\tau)^{2(1-a)}} \quad (38)$$

et

$$\sigma(\omega) = (\varepsilon_0 \cdot \omega) \cdot \frac{(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty) \cdot \left(\cos\left(\frac{\pi}{2}a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a}\right)}{1 + 2 \cdot \sin\left(\frac{\pi}{2}a\right) \cdot (\omega\tau)^{1-a} + (\omega\tau)^{2(1-a)}} + \sigma_{DC} \quad (39)$$

IV.5. Résistance hydrodynamique

Pour déterminer les pressions dans les canaux microfluidiques, il est important de connaître de déterminer leur résistance hydrodynamique. Pour nos systèmes microfluidiques, nous avons utilisé des capillaires et des microcanaux.

Les capillaires ont des formes cylindriques, leur résistance hydrodynamique (en Pa.s.m⁻³) est égale à :

$$R_H = \frac{128 \cdot \eta \cdot L}{\pi \cdot D^4} \quad (40)$$

Où η est la viscosité du liquide (celle de l'eau est égale à 0,001 Pa.s), L est la longueur des capillaires en m et D leur diamètre.

Les microcanaux ont des formes rectangulaires, leur résistance hydrodynamique est environ égale à :

$$R_H = \frac{12.\eta.L}{l.h^3.(1-0.63\frac{h}{l})} \quad (41)$$

Où L est la longueur des microcanaux, l leur largeur et h leur hauteur.

La pression hydrodynamique (en Pa) est égale à :

$$P = R_H.Q \quad (42)$$

Où Q est le débit volumique du fluide (en $m^3.s^{-1}$), rappelons que $1 \mu l = 1 mm^3 = 10^{-9} m^3$.

V. Calcul des différentes constantes de cellule

Pour un réseau d'électrodes planaires interdigitées de longueur constante, Olthuis a montré que la constante de cellule κ peut s'écrire (2-30):

$$\kappa = \frac{2}{(N-1)L} \times \frac{I_{elliptique}(k)}{I_{elliptique}(k')} \quad (43)$$

Où N est le nombre d'électrodes du réseau, L la longueur des électrodes et $I_{elliptique}(k)$ une intégrale elliptique du premier ordre.

Cette intégrale est définie par :

$$I_{elliptique}(k) = \int_{t=0}^1 \frac{dt}{\sqrt{(1-t^2)(1-k^2t^2)}} \quad (44)$$

Pour un réseau d'électrodes planaires interdigitées périodiques de plus de deux électrodes, le module k de cette intégrale peut être défini par (2-31):

$$k = \cos\left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l}\right) \quad (45)$$

Où l est la largeur des électrodes et e l'espace inter-électrode (cf Figure 2- 31).

k' est un module lié à k par la relation (2-32):

$$k^2 + k'^2 = 1 \quad (46)$$

Nous avons donc ici:

$$k' = \sqrt{1 - \cos^2\left(\frac{\pi l}{2e+l}\right)} \quad (47)$$

L'intégrale elliptique n'a pas de solutions analytiques mais Hilberg a montré que dans le cas où $0 \leq k \leq \frac{1}{\sqrt{2}}$, elle peut être approximée avec une erreur inférieure à 3.10^{-6} par l'expression (2-32):

$$\frac{I_{\text{elliptique}}(k)}{I_{\text{elliptique}}(k')} = \frac{\pi}{\ln\left(2 \frac{1+\sqrt{k'}}{1-\sqrt{k'}}\right)} \quad (48)$$

En considérant l'équation (47) du module k' , l'équation (48) peut s'écrire :

$$\frac{I_{\text{elliptique}}(k)}{I_{\text{elliptique}}(k')} = \frac{\pi}{\ln\left(2 \frac{1 + \left(1 - \cos^2\left(\frac{\pi l}{2e+l}\right)\right)^{1/4}}{1 - \left(1 - \cos^2\left(\frac{\pi l}{2e+l}\right)\right)^{1/4}}\right)} \quad (49)$$

D'après l'équation (43), pour un réseau d'électrodes planaires interdigitées de longueur constante, la constante de cellule κ peut donc s'écrire :

$$\kappa = \frac{2}{(N-1)L} \times \frac{\pi}{\ln\left(2 \frac{1 + \left(1 - \cos^2\left(\frac{\pi l}{2e+l}\right)\right)^{1/4}}{1 - \left(1 - \cos^2\left(\frac{\pi l}{2e+l}\right)\right)^{1/4}}\right)} \quad (50)$$

V.1. Calcul des différentes constantes de cellule du dispositif à puits

Pour utiliser l'approximation développée par Olthuis (2-30) (équation (48)), vérifions d'abord la valeur des modules k de chaque géométrie d'électrodes.

Pour rappel, la 2^{ème} géométrie possède des électrodes avec une largeur de $4\mu\text{m}$ et un espace inter-électrodes de $4\mu\text{m}$ également (cf paragraphe I.2.1.1.).

D'après l'équation (45), nous avons donc le module $k_{W_2} = \cos\left(\frac{\pi}{2} \frac{4}{4+4}\right) = \cos\left(\frac{\pi}{4}\right) = \frac{1}{\sqrt{2}}$

Les 3^{ème} et 4^{ème} géométries ont des formes arrondies, pour calculer leur facteur de cellule de courant de conduction, nous avons donc moyenné approximativement leur largeur en la considérant égale à la moyenne de la largeur maximale et minimale (cf Figure 2- 6 et Figure 2- 8).

Les électrodes micrométriques rondes ont donc été considérées avec une largeur de $5\mu\text{m}$ et des espaces inter-électrodes de $4\mu\text{m}$.

D'après l'équation (45), nous avons donc le module :

$$k_{W_3} = \cos\left(\frac{\pi}{2} \frac{4}{4+5}\right) = \cos\left(\frac{2.\pi}{9}\right) = 0,64279$$

Les électrodes submillimétriques avec une largeur de $100\mu\text{m}$ et des espaces inter-électrodes de $7,5\mu\text{m}$.

D'après l'équation (45), nous avons donc le module :

$$k_{W_4} = \cos\left(\frac{\pi}{2} \frac{100}{100+7,5}\right) = \cos\left(\frac{50.\pi}{107,5}\right) = 0,1094$$

Tous ces modules sont inférieurs ou égales à $\frac{1}{\sqrt{2}}$, l'approximation (48) de l'intégrale elliptique développée par Hilberg peut donc être utilisée et les constantes de cellules calculées avec la relation (50).

Concernant les micro-dispositifs à puits, les électrodes n'ont pas une longueur constante puisqu'elles suivent un réseau circulaire. Le facteur dépendant de la longueur dans l'expression (50) du facteur de cellule doit donc être modifiée.

Ce facteur correspond à $\frac{2}{(N-1)L}$.

En négligeant, l'espace séparant la pointe des électrodes au bord de la contre-électrode opposée ($\approx 4\mu\text{m}$), les longueurs de nos électrodes correspondent à la longueur de cordes sous tendues par différents angles dans un cercle de 4mm de rayon. On rappelle que dans un cercle de rayon R , la longueur L d'une corde sous tendue par un angle α est égale à:

$$L = 2R \sin\left(\frac{\alpha}{2}\right) \quad (51)$$

Pour chaque électrode, cet angle sous-tendu peut être calculé à partir de sa position dans le réseau. Nous avons considéré cette position comme égale à la distance entre le milieu de l'électrode et le centre du cercle. Comme nos électrodes sont régulièrement déposées, cette distance peut être calculée comme représenté sur le schéma de la Figure 2- 31.

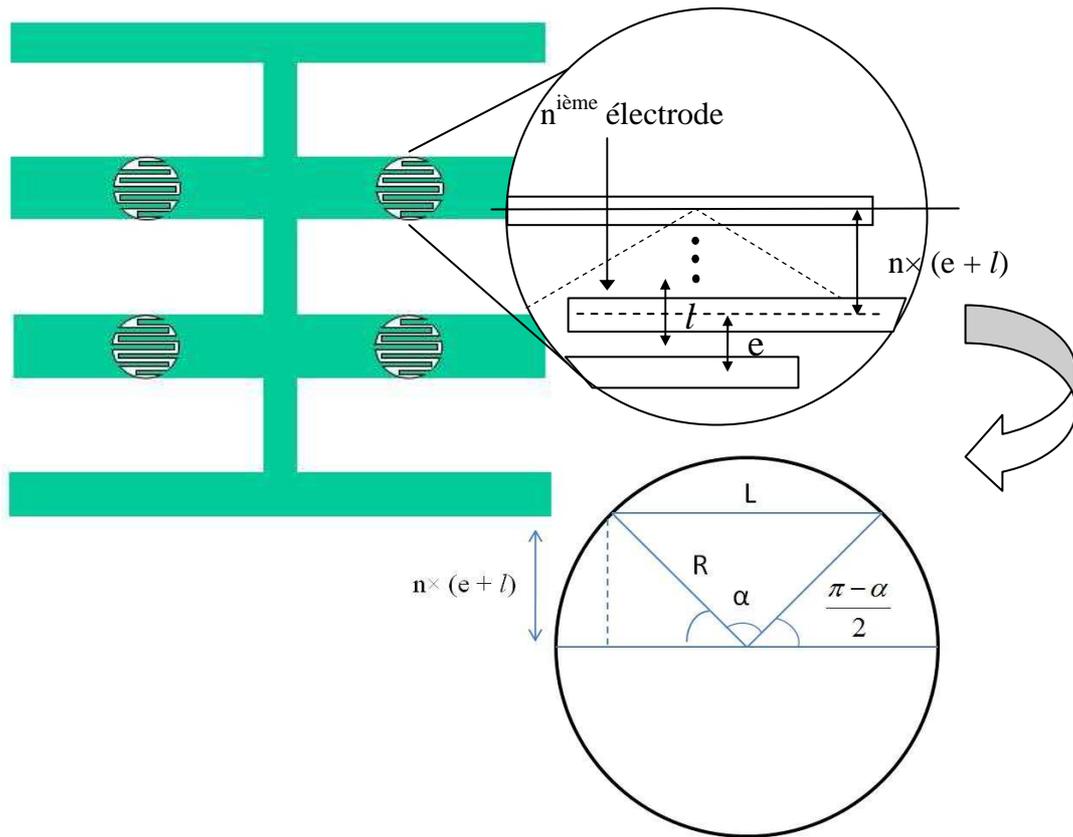


Figure 2- 31 : Schéma des réseaux circulaires d'électrodes interdigitées. Les encarts présentent les calculs permettant de déterminer la distance entre une électrode et le centre du réseau.

La distance entre le centre du cercle et la $n^{\text{ième}}$ électrode est donc égale à $n(e+l)$.

Concernant l'angle sous tendu α , nous avons (cf Figure 2- 31):

$$\sin\left(\frac{\pi-\alpha}{2}\right) = \frac{n(e+l)}{R} \quad (52)$$

La longueur L_n de la $n^{\text{ième}}$ électrode sous-tendue par un angle α peut donc s'écrire :

$$L_n = 2R \sin\left[\frac{\pi}{2} - \arcsin\left(\frac{n(e+l)}{R}\right)\right] \quad (53)$$

L'expression (53) peut être modifiée :

$$2R \sin \left[\frac{\pi}{2} - \arcsin \left(\frac{n(e+l)}{R} \right) \right] \rightarrow 2R \cos \left[\arcsin \left(\frac{n(e+l)}{R} \right) \right] \rightarrow 2R \sqrt{1 - \left(\frac{n(e+l)}{R} \right)^2} \quad (54)$$

En considérant la somme discrète de ces longueurs, le facteur de longueur de l'équation (50) peut ainsi être adapté à un réseau circulaire :

$$(N-1)L \approx NL \rightarrow \sum_{i=1}^{i=N} L_i = 2 \cdot \sum_{i=1}^{i=\frac{N}{2}-1} 2R \sqrt{1 - \left(\frac{i(e+l)}{R} \right)^2} \quad (55)$$

La première approximation est possible car nos réseaux possèdent 1000 électrodes pour les géométries micrométriques et au moins 55 pour le réseau sub-millimétrique.

Finalement, la constante de cellule d'un réseau circulaire de peignes interdigités peut donc s'écrire :

$$\kappa = \frac{2}{2 \cdot \sum_{i=1}^{i=\frac{N}{2}-1} 2R \sqrt{1 - \left(\frac{i(e+l)}{R} \right)^2}} \frac{\pi}{\ln \left(\frac{1 + \left(1 - \cos^2 \left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l} \right) \right)^{1/4}}{1 - \left(1 - \cos^2 \left(\frac{\pi}{2} \frac{l}{e+l} \right) \right)^{1/4}} \right)} \quad (56)$$

Sur cette expression, nous voyons que la constante de cellule κ est inversement proportionnelle au rayon des puits R et au nombre d'électrodes N . Pour une même surface, plus les électrodes sont de petites dimensions, plus leur nombre est important et donc plus la constante de cellule est faible.

Nous voyons également que la constante est fonction du rapport de grandeur entre l et e .

L'expression (56) nous permet donc de calculer les facteurs de cellule des 2^{ème}, 3^{ème} et 4^{ème} géométries. Ces expressions ont été calculées avec le logiciel Maple.

Pour le calcul de ces constantes, nous avons considéré le nombre total d'électrodes $N = 499$ pour la 2^e géométrie, $N = 888$ pour la 3^e géométrie, $N = 74$ pour la 4^{ème} géométrie avec un puits de 8 mm et $N = 54$ pour la 4^{ème} avec un puits de 6 mm de diamètre.

Ces constantes sont regroupées dans le Tableau 2- 2.

Tableau 2- 2 : Constantes de cellules des différentes configurations de peignes interdigités.

	Electrodes micrométriques Droites (Diamètre puits = 8mm)	Electrodes micrométriques Rondes (Diamètre puits = 8mm)	Electrodes submillimétriques Rondes (Diamètre puits = 8mm)	Electrodes submillimétriques Rondes (Diamètre puits = 6mm)
Constante de cellule (m ⁻¹)	.3187256641	.3310362864	1.899484439	3.404932583

Ces valeurs confirment les précédentes remarques faites sur l'influence des paramètres géométriques sur la valeur du facteur de cellule.

Pour un même diamètre de 8mm, les électrodes micrométriques sont plus nombreuses que les submillimétriques, leur facteur de cellule est ainsi plus faible.

Pour un diamètre de 6mm, la longueur apparente des électrodes est plus faible que pour un diamètre de 8mm. Le facteur de cellule étant inversement proportionnel à cette longueur, le facteur de cellule est plus faible pour un diamètre de 8mm que pour un diamètre de 6mm.

V.2. Calcul des différentes constantes de cellule du dispositif microfluidique

Les dispositifs à micro-canaux présentent des électrodes droites de longueur constante.

Sachant que ces électrodes présentent une largeur de 50 µm et sont espacées de 25 µm,

d'après l'équation (45), le module $k = \cos\left(\frac{\pi}{2} \frac{50}{50+25}\right) = \cos\left(\frac{\pi}{3}\right) = \frac{1}{2} \leq \frac{1}{\sqrt{2}}$.

L'équation (50) peut donc être directement utilisée pour déterminer les constantes de cellules des dispositifs à micro-canaux.

Nous avons vu au paragraphe I.2.2.1 que le dispositif comprend 71 électrodes.

Comme schématisé sur la Figure 2- 32, les électrodes sont en vis-à-vis sur une longueur L_1 de $1500 \mu\text{m}$ mais lorsqu'un liquide biologique avec une conductivité importante circule dans les micro-canaux, nous supposons que le champ électrique s'y retrouve confiné. Les électrodes sont alors en vis-à-vis d'une longueur L_2 de $400 \mu\text{m}$.

Nous pouvons donc calculer deux constantes de cellules pour chacune de ces longueurs.

Nous avons $\kappa_{L_1} = 14,8895 \text{ m}^{-1}$ et $\kappa_{L_2} = 55.83578 \text{ m}^{-1}$.

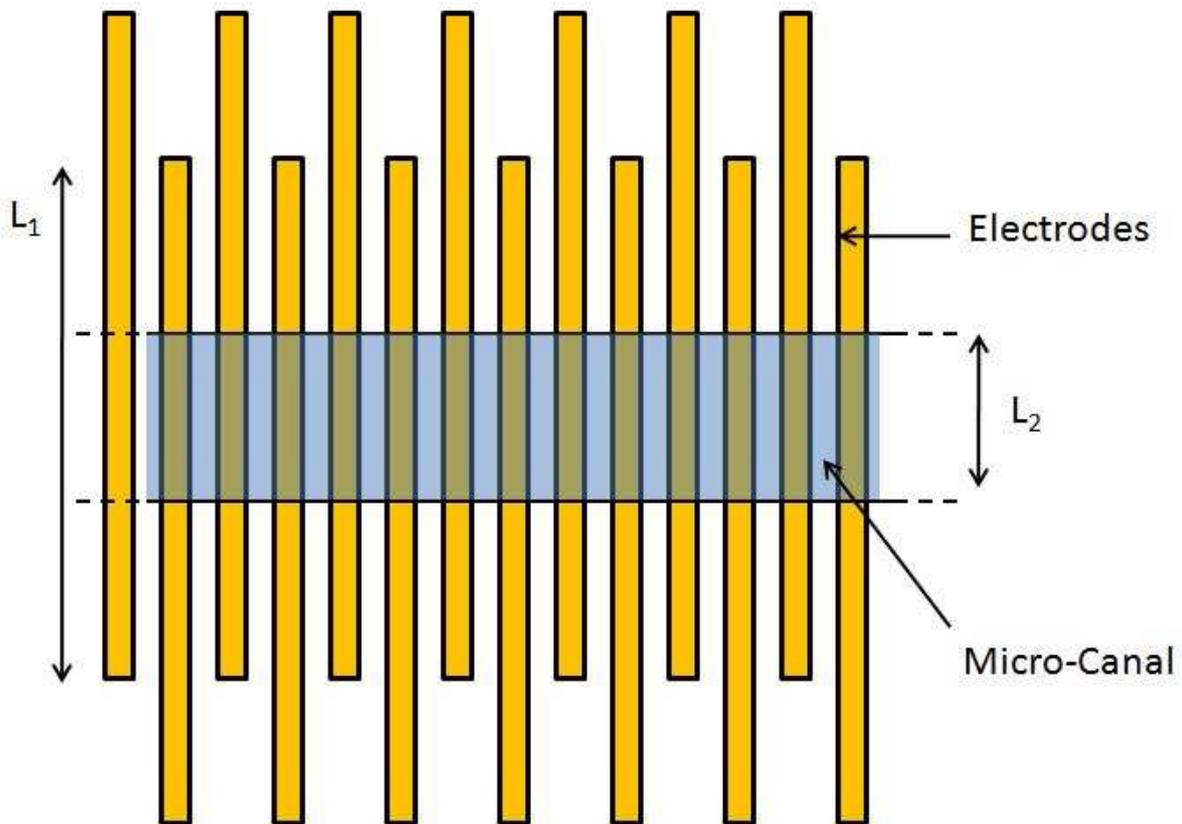


Figure 2- 32 : Schéma du réseau d'électrodes interdigitées des dispositifs à micro-canaux.

Conclusion du chapitre 2

Dans ce chapitre, nous avons présentons les différents critères qui ont guidé la conception des bioMEMS utilisés pour nos mesures d'impédancemétrie. Concernant le choix des matériaux, nous avons utilisé des substrats en verre car ils sont transparents et ont déjà été précédemment utilisé par notre équipe de recherche, nous avons choisi de réaliser des électrodes en or car c'est l'un des métaux les plus conducteurs et pour les réservoirs des cellules biologiques, le PDMS car c'est un matériau transparent et facilement micro-usinable grâce aux techniques de lithographie douce.

Nous avons ensuite présenté les deux types de dispositifs qui ont été réalisé au cours de cette thèse: un capteur impédimétrique avec des réservoirs pour les cellules en forme de puits et un autre capteur impédimétrique microfluidique. Le dispositif avec puits nous a permis de mettre en place facilement des expériences sur les cellules biologiques alors que le dispositif à canaux s'est révélé nécessaire au cours des manipulations sur les CHO. Pour définir la géométrie des électrodes du dispositif à puits, nous avons utilisé différentes dimensions d'électrodes allant du micromètre au millimètre pour évaluer empiriquement leur influence sur nos mesures. Pour la géométrie des électrodes du dispositif à canaux, nous avons défini une géométrie correspondant à une sensibilité optimale pour l'étude électrochimique des CHO. Pour concevoir les microcanaux, nous avons voulu pouvoir y cultiver un nombre important de cellules tout en les exposant à un faible cisaillement. D'un point de vue technique, nous avons également voulu que leurs dimensions soient suffisamment grandes pour les aligner avec les électrodes sans microscope.

Pour connecter nos microdispositifs aux appareils de mesures, nous avons utilisé des soudures en étain classiques et des circuits imprimés pour assurer une résistance de contact minimale et reproductible. Nous avons également réalisé un circuit de multiplexage pour analyser automatiquement plusieurs capteurs en parallèle.

Nous avons présenté les différents types de mesures réalisées avec les impédancemètres, à savoir les mesures fréquentielles et cinétiques. Nous avons aussi décrit le programme Labview nous permettant de piloter automatiquement les impédancemètres ainsi que le programme Matlab et la macro Excel utilisés pour traiter les données des expériences.

Nous avons défini des notions théoriques importantes de l'analyse par impédancemétrie : l'impédance électrochimique, la permittivité complexe et le facteur de cellule. Nous avons également décrit différents modèles analytiques de relaxation diélectrique : ceux de Debye au 1^{er} et 2^{ème} ordre et celui de Cole-Cole. Le modèle de Debye au 1^{er} ordre ne considère qu'un seul temps de relaxation alors que le modèle au 2nd ordre prend en compte deux temps de relaxation issus de deux types de molécules différents. Nous avons utilisé ce modèle car des précédents travaux d'électrochimie ont montré que l'eau déionisée se contamine en acide carbonique au contact du dioxyde de carbone de l'air ambiant. Le modèle de Cole-Cole est un modèle de relaxation empirique considérant différents temps de relaxation se dispersant selon une distribution gaussienne autour de la moyenne de ces temps. Ce modèle ne permet cependant pas de distinguer les différents temps de relaxation. Nous avons également présenté quelques formules de microfluidique.

A partir de ces notions, nous avons enfin calculé les différentes constantes de cellules de nos dispositifs en introduisant une nouvelle méthode de calcul pour des réseaux d'électrodes interdigitées circulaires. Nous avons ainsi montré comment les paramètres géométriques des électrodes influencent ces facteurs de cellule.

Références du chapitre 2

- 2-1. Senez V, Treizebre A, Debuissou D, Houssin T, Ghandour H, Legrand D, Bocquet B, Mazurier J. Dielectric spectroscopy of biological cells in microfluidic devices. Proceedings of the 13th International Conference on Electrical Bioimpedance and the 8th Conference on Electrical Impedance Tomography, ICEBI 2007, Graz, Austria. 2007 august 29-september 2; Part 4, 90-93.
- 2-2. Senez V., Treizebré A., Lennon E., Legrand D., Ghandour H., Bocquet B., Fujii T., Mazurier J. Fenotip: Microfluidics and nanoelectrodes for the electromagnetic spectroscopy of biological cells,., Proceedings of the 11th Mediterranean Conference on Medical and Biomedical Engineering and Computing 2007, MEDICON 2007, Ljubljana, Slovenia. 2007, june 26-30; Part 6, 170-173.
- 2-3. Bélanger M, Marois Y. Hemocompatibility, biocompatibility, inflammatory and <I>in vivo</I> studies of primary reference materials low-density polyethylene and polydimethylsiloxane: A review. Journal of Biomedical Materials Research. 2001;58(5):467-477.
- 2-4. Xia Y, Whitesides GM. Soft Lithography. Annu. Rev. Mater. Sci. 1998 8;28(1):153-184.
- 2-5. Radke S, Alocilja E. Design and fabrication of a microimpedance biosensor for bacterial detection. IEEE Sensors Journal. 2004 Aoû;4(4):434-440.
- 2-6. Varshney M, Li Y. Double interdigitated array microelectrode-based impedance biosensor for detection of viable Escherichia coli O157 : H7 in growth medium. Talanta. 2008 Jan 15;74(4):518-525.
- 2-7. Goral V, Zaytseva N, Baeumner A. Electrochemical microfluidic biosensor for the detection of nucleic acid sequences. Lab on a Chip. 2006 Mar;6(3):414-421.
- 2-8. Yang L, Li Y, Erf GF. Interdigitated Array microelectrode-based electrochemical impedance immunosensor for detection of Escherichia coli O157:H7. Anal. Chem. 2004 Fév 15;76(4):1107-1113.
- 2-9. Ceriotti L, Ponti J, Broggi F, Kob A, Drechsler S, Thedinga E, et al. Real-time assessment of cytotoxicity by impedance measurement on a 96-well plate. Sensors and Actuators B: Chemical. 2007 Mai 21;123(2):769-778.
- 2-10. Elsholz B, Wörl R, Blohm L, Albers J, Feucht H, Grunwald T, et al. Automated detection and quantitation of bacterial RNA by using electrical microarrays. Anal. Chem. 2006 Jul 15;78(14):4794-4802.
- 2-11. Olof Pontus Linderholm. "Two-dimensional microimpedance imaging for cell culture monitoring". Thèse EPFL, no 3604 (2006). Dir.: Philippe Renaud.
- 2-12. Han Y, Liu X, Liu H, Li S, Wu B, Ye L, et al. Cultivation of recombinant Chinese hamster ovary cells grown as suspended aggregates in stirred vessels. J. Biosci.

- Bioeng. 2006 Nov;102(5):430-435.
- 2-13. Shantanu Bhattacharya. Plasma Bonding of Poly (dimethyl) Siloxane and Glass Surfaces and Its Application to Microfluidics. 2003 Déc;
 - 2-14. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Complex_Impedance.svg.
 - 2-15. Grimnes S, Martinsen OG. Bioimpedance and Bioelectricity Basics. 1er éd. Academic Press; 2000.
 - 2-16. Markx G.H., Davey C.L. The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology - introducing electrorotational light scattering. Enzyme and Microbial Technology. 1999 Aoû;25:161-171.
 - 2-17. Batalioto F, Duarte AR, Barbero G, Neto AMF. Dielectric dispersion of water in the frequency range from 10 mHz to 30 MHz. J Phys Chem B. 2010 Mar 18;114(10):3467-3471.
 - 2-18. Davies M. Debye, Peter (1884-1966) - a centenary appreciation. Journal of Physical Chemistry. 1984;88(26):6461-6463.
 - 2-19. Coelho R. Sur la relaxation d'une charge d'espace. Rev. Phys. Appl. (Paris). 1983;18(3):137-146.
 - 2-20. Macdonald JR. Frequency response of unified dielectric and conductive systems involving an exponential distribution of activation energies. J. Appl. Phys. 1985;58(5):1955.
 - 2-21. Linderholm P, Renaud P. Comment on "AC frequency characteristics of coplanar impedance sensors as design parameters" by Jongin Hong, Dae Sung Yoon, Sung Kwan Kim, Tae Song Kim, Sanghyo Kim, Eugene Y. Pak and Kwangsoo No, Lab Chip, 2005, 5, 270. Lab Chip. 2005 Déc;5(12):1416-1417; author reply 1418.
 - 2-22. Carrique F, Ruiz-Reina E. Effects of water dissociation and CO₂ contamination on the electrophoretic mobility of a spherical particle in aqueous salt-free concentrated suspensions. J Phys Chem B. 2009 Jun 25;113(25):8613-8625.
 - 2-23. Arroyo F, Carrique F, Ruiz-Reina E, Delgado A. Double layer polarization in "realistic" aqueous salt-free suspensions. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects; Article In Press, Corrected Proof.
 - 2-24. Barthel J, Hetzenauer H, Buchner R. Dielectric Relaxation of Aqueous Electrolyte Solutions II. Ion-Pair Relaxation of 1:2, 2:1, and 2:2 Electrolytes. Berichte der Bunsengesellschaft für physikalische Chemie. 1992;96(10):1424-1432.
 - 2-25. Buchner R, Barthel J, Stauber J. The dielectric relaxation of water between 0°C and 35°C. Chemical Physics Letters. 1999 Jun 4;306(1-2):57-63.
 - 2-26. Kaatze U. Dielectric spectroscopy of aqueous solutions. Hydration phenomena and hydrogen-bonded networks. Journal of Molecular Liquids. 1993 Juillet;56:95-115.

- 2-27. Rønne C, Thrane L, Åstrand P, Wallqvist A, Mikkelsen KV, Keiding SR. Investigation of the temperature dependence of dielectric relaxation in liquid water by THz reflection spectroscopy and molecular dynamics simulation. *J. Chem. Phys.* 1997;107(14):5319.
- 2-28. Barthel J, Bachhuber K, Buchner R, Hetzenauer H. Dielectric spectra of some common solvents in the microwave region. Water and lower alcohols. *Chemical Physics Letters.* 1990 Jan 19;165(4):369-373.
- 2-29. Cole KS, Cole RH. Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics. *J. Chem. Phys.* 1941;9(4):341.
- 2-30. Olthuis W, Streekstra W, Bergveld P. Theoretical and experimental determination of cell constants of planar-interdigitated electrolyte conductivity sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 1995 Mar;24(1-3):252-256.
- 2-31. Engan H. Excitation of elastic surface waves by spatial harmonics of interdigital transducers. *Electron Devices, IEEE Transactions on.* 1969;16(12):1014-1017.
- 2-32. Hilberg W. From Approximations to Exact Relations for Characteristic Impedances. *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on.* 1969;17(5):259-265.

Chapitre 3:

Caractérisation des dispositifs et modélisation

Dans ce chapitre, nous présentons d'abord le modèle utilisé pour analyser nos mesures d'impédance électrochimique. Ce modèle analytique consiste en un circuit électrique équivalent. Nous discutons également de l'intérêt de différents circuits équivalents envisageables, de l'influence précise des éléments de ces circuits et des limitations des mesures d'impédance en hautes fréquences en les étudiant à l'aide de ces circuits.

Nous caractérisons ensuite les dispositifs à puits en analysant les mesures issues de différents milieux : l'air ambiant, l'eau déionisée et le milieu cellulaire. Les mesures d'impédance de l'eau DI nous permettent de déterminer ses propriétés électriques : la conductivité et la permittivité diélectrique. Nous analysons ces propriétés à l'aide des modèles de relaxation définis au deuxième chapitre. Nous étudions également l'influence du volume de liquide et l'effet de la tension d'excitation sur les mesures d'impédance réalisées avec ce type de dispositif.

Nous caractérisons enfin le dispositif à microcanaux en étudiant les impédances des différents milieux. Comme pour le dispositif à puits, les mesures d'impédance de l'eau DI nous permettent de déterminer ses propriétés électriques et de les analyser avec les modèles de relaxation précédemment présentés.

I. Premières mesures et modélisation

I.1. Mesure d'impédance de l'eau déionisée

Les dispositifs réalisés, nous avons effectué les premières mesures avec des liquides biologiques. Nous avons d'abord utilisé le dispositif à puits car leur utilisation est plus simple à mettre en œuvre. Sur la Figure 3- 1 est présenté un spectre d'impédance obtenu avec la 2^e géométrie d'électrode (électrodes de 4 μm de large et droites) sur 110 μl d'eau DI (DI) et une tension d'excitation de 10 mV.

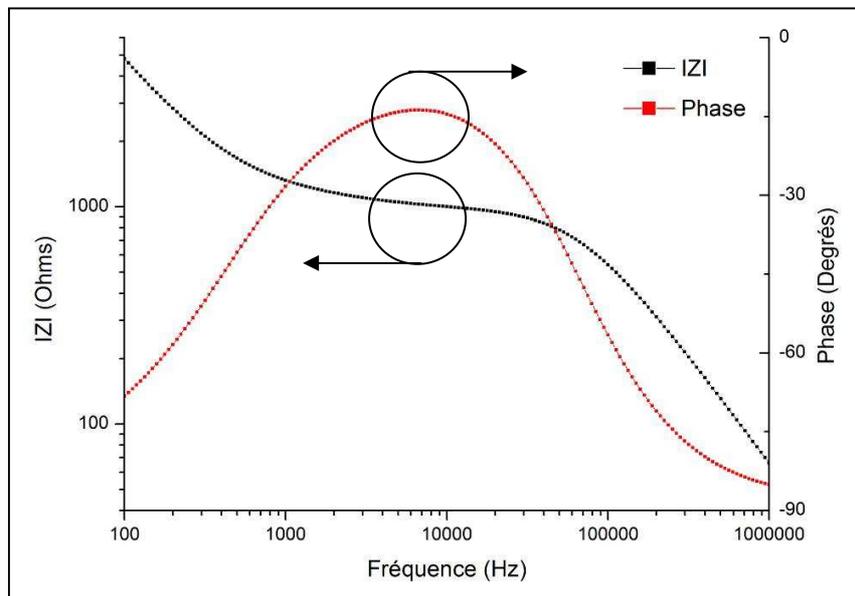


Figure 3- 1 : Exemple d'une mesure de l'impédance d'eau DI avec le dispositif à puits et les électrodes de 4 μm droites (Géométrie 2).

Nous reconnaissons en basse fréquence (100 Hz-1 KHz) une chute du module de l'impédance en $1/f$ caractéristique d'une capacité avec une phase légèrement supérieure à -90° . L'impédance se stabilise ensuite aux moyennes fréquences (1Khz- 50KHz) avec une phase se rapprochant de 0° . Cette phase proche de zéro avec le module de l'impédance quasi-constant caractérise une impédance électrique résistive. Enfin, à hautes fréquences (50 KHz-1MHz), nous retrouvons un deuxième comportement capacitif avec une phase plus proche des -90° .

Cette impédance est donc caractérisée par deux évolutions fréquentielles capacitives et un comportement résistif. Notre modèle doit ainsi comprendre au moins deux capacités et une résistance.

I.2. Modélisation

Nous présentons dans ce paragraphe un modèle analytique précédemment utilisé par Linderholm et al (3-1), Timmer et al (3-2) et par Hong et al (3-3). Ce circuit comprend les composants permettant de modéliser les différents comportements fréquentiels observés sur le spectre d'impédance de la Figure 3- 1. Nous avons modélisé nos mesures électrochimiques en considérant le circuit équivalent présenté en Figure 3- 2.

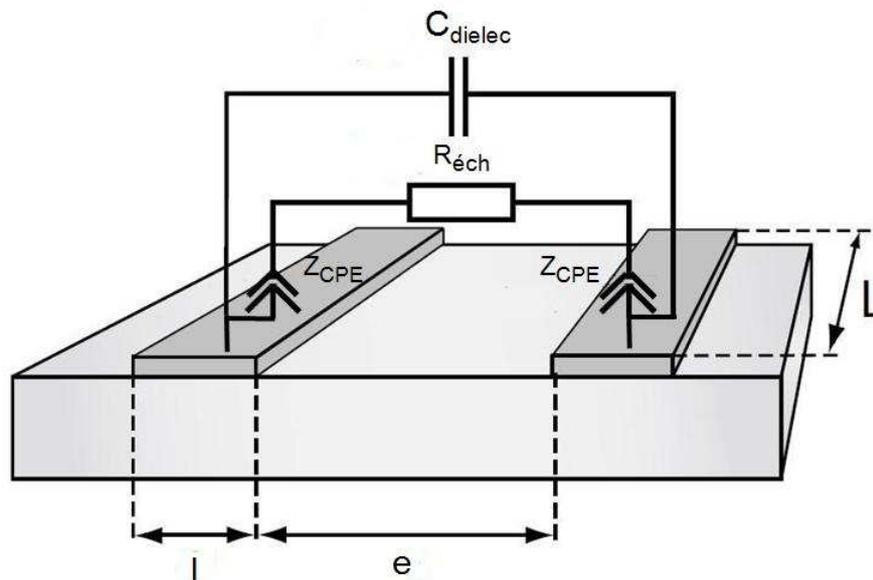


Figure 3- 2 : Schéma du modèle de circuit électrique équivalent utilisé pour l'analyse des mesures expérimentales, adapté de (3-1).

Ce circuit équivalent s'inspire du circuit de Randles (3-4) couramment utilisé pour les mesures de voltammétrie utilisant un système à 3 électrodes (cf chapitre 1, paragraphe V.1.1. (3-5,3-6,3-7)).

Ce circuit consiste en une capacité $C_{\text{diélec}}$ modélisant les propriétés diélectriques de l'échantillon biologique analysé placée en parallèle d'une résistance $R_{\text{éch}}$ décrivant les propriétés de conduction électrique de l'échantillon. Cette résistance est en série avec un

élément à phase constante CPE présentant une impédance Z_{CPE} pour modéliser le phénomène de double couche électrique (cf lexique) aux interfaces électrodes/électrolyte.

$R_{\text{éch}}$ et $C_{\text{diélec}}$ sont placées en parallèle car les courants se propagent à la fois sous la forme de courants de conduction et de déplacement.

Théoriquement, l'interface de double couche électrique peut être modélisée par une capacité mais ce composant électronique ne permet pas de modéliser correctement les mesures électrochimiques. Warburg a donc proposé un composant électronique fictif permettant de modéliser plus fidèlement cette interface : l'élément de Warburg (cf lexique).

L'impédance de l'élément Warburg s'écrit (3-8):

$$Z_w = \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} + \frac{A_w}{j\sqrt{\omega}} \quad (57)$$

Nous avons donc bien pour l'amplitude et la phase de l'élément Warburg:

$$|Z_w| = \sqrt{2} \cdot \frac{A_w}{\sqrt{\omega}} \quad (58)$$

et

$$\varphi_{Z_w} = \frac{\pi}{4} \quad (59)$$

avec A_w en $\Omega \cdot s^{-0.5}$.

Ce composant est utilisé pour simuler l'effet de la diffusion des molécules ou des ions présents dans un électrolyte sur les phénomènes d'interface aux électrodes (3-9).

L'élément à phase constante (CPE de l'anglais Constant Phase Element) (cf lexique) est un autre composant fictif couramment utilisé en électrochimie.

L'impédance du CPE s'écrit :

$$Z_{CPE} = \frac{1}{K.(j.\omega)^n} \quad (60)$$

Où K est en $S \cdot s^n$ (siemens×secondⁿ) et n un réel entre 0 et 1.

Pour calculer l'impédance équivalente du circuit de modélisation, il est intéressant de développer l'impédance du CPE :

$$Z_{CPE} = \frac{1}{K \cdot \omega^n} \cdot \frac{1}{j^n} = \frac{1}{K \cdot \omega^n} \cdot e^{-j \cdot n \cdot \pi/2} = \frac{1}{K \cdot \omega^n} \left(\cos\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right) - j \cdot \sin\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right) \right) \quad (61)$$

L'élément Warburg est donc un cas particulier de l'élément à phase constante pour lequel :

$$K = \frac{\sqrt{2}}{A_w} \text{ et } n = \frac{1}{2}.$$

Une capacité peut être aussi considérée comme un cas particulier de CPE pour lequel $n=1$ et la résistance un cas particulier pour lequel $n=0$. Pour $0 < n < 1$, l'impédance d'un CPE présente donc simultanément un comportement résistif et réactif.

Afin d'être assuré de modéliser nos mesures expérimentales, nous avons donc utilisé dans notre circuit équivalent un élément à phase constante au lieu de l'élément de Warburg.

Sur le schéma de la Figure 3- 2, chaque interface électrode/électrolyte est représentée par un CPE distinct. Ces CPE étant en série, afin de simplifier les calculs des impédances équivalentes, nous avons regroupé ces éléments dans un unique composant. Le circuit équivalent finalement utilisé est donc :

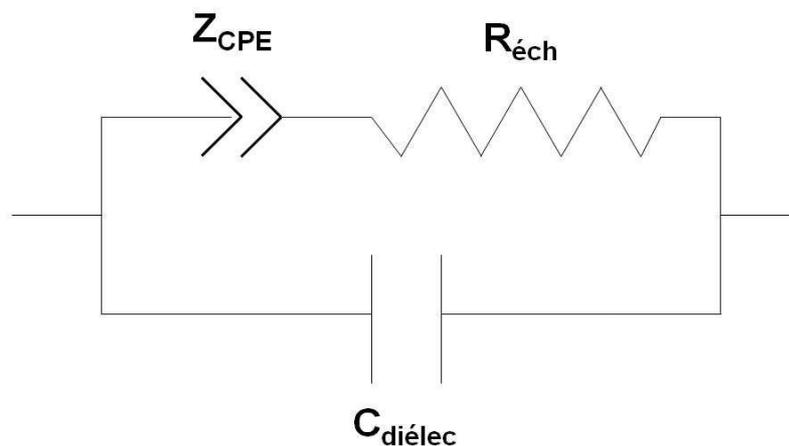


Figure 3- 3 : Schéma du circuit électrique équivalent utilisé pour modéliser les spectres d'impédance expérimentaux

L'impédance globale de ce circuit de modélisation est égale à :

$$Z(f) = \frac{\frac{R_{éch}}{C_{diélec}^2 \cdot (2\pi \cdot f)^2} + \frac{\cos\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right)}{K \cdot C_{diélec}^2 \cdot (2\pi \cdot f)^{n+2}}}{R_{éch}^2 + \frac{1}{K^2 \cdot (2\pi \cdot f)^{2n}} + \frac{1}{C_{diélec}^2 \cdot (2\pi \cdot f)^2} + \frac{2 \cdot R_{éch} \cdot \cos\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right)}{K \cdot (2\pi \cdot f)^n} + \frac{2 \cdot \sin\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right)}{K \cdot C_{diélec} \cdot (2\pi \cdot f)^{n+1}}} - j \frac{\frac{R_{éch}^2}{C_{diélec} \cdot (2\pi \cdot f)} + \frac{1}{K^2 \cdot C_{diélec} \cdot (2\pi \cdot f)^{2n+1}} + \frac{2 \cdot R_{éch} \cdot \cos\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right)}{K \cdot C_{diélec} \cdot (2\pi \cdot f)^{n+1}} + \frac{\sin\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right)}{K \cdot C_{diélec}^2 \cdot (2\pi \cdot f)^{n+2}}}{R_{éch}^2 + \frac{1}{K^2 \cdot (2\pi \cdot f)^{2n}} + \frac{1}{C_{diélec}^2 \cdot (2\pi \cdot f)^2} + \frac{2 \cdot R_{éch} \cdot \cos\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right)}{K \cdot (2\pi \cdot f)^n} + \frac{2 \cdot \sin\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right)}{K \cdot C_{diélec} \cdot (2\pi \cdot f)^{n+1}}} \quad (62)$$

La formule de l'impédance complexe a été ici développée afin de distinguer la partie réelle et imaginaire et de pouvoir ainsi déterminer les deux paramètres de l'impédance complexe (Magnitude/Phase ou Partie Réelle/Imaginaire).

I.3. Discussion sur la modélisation des impédances électrochimiques avec un circuit équivalent

En cherchant à modéliser les impédances électrochimiques avec un circuit électrique équivalent, nous nous sommes interrogés sur le placement du CPE dans ce circuit.

En effet dans le circuit de la Figure 3- 3, le CPE est placé en série uniquement avec la résistance $R_{éch}$. De cette façon, les courants de déplacements issus des propriétés diélectriques de l'échantillon ne sont pas exposés aux phénomènes de double couche, au contraire des courants de conduction.

Cependant les courants de déplacement peuvent être également influencés par cette capacité interfaciale puisque, dans la zone de double couche, les molécules d'eau intervenant dans la propagation des courants de déplacement (proportionnels à $\frac{\partial E}{\partial t}$) hydratent une partie des contre-ions responsables de la capacité de double couche. Les courants de déplacement et le phénomène de double couche peuvent donc être corrélés.

Pour représenter cette interdépendance, nous avons également modélisé nos mesures avec un circuit électrique équivalent comprenant un CPE (pour le phénomène de double couche) en série avec une résistance $R_{éch}$ et une capacitance $C_{diélec}$ toutes deux mises en parallèle. Comme dans le précédent circuit électrique, ces composants représentent respectivement les propriétés de conduction électrique et les propriétés diélectriques de l'échantillon. Ce circuit électrique équivalent a déjà été précédemment utilisé par Olthuis pour modéliser des spectres d'impédances électrochimiques (3-10). Ce circuit électrique est représenté sur la Figure 3- 4.

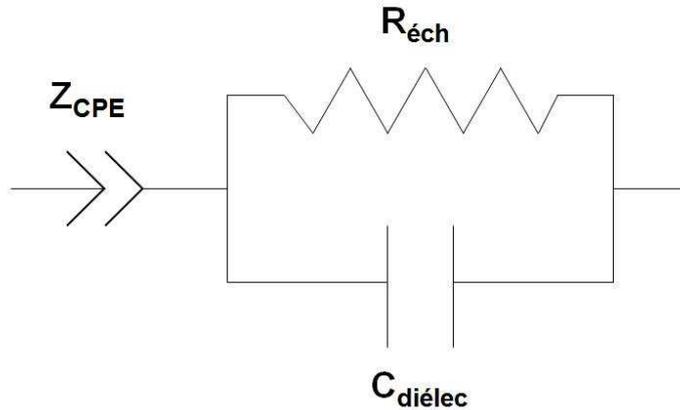


Figure 3- 4 : Circuit électrique équivalent utilisé par Olthuis (3-10).

Dans le circuit équivalent présenté en Figure 3- 4, l'élément à phase constante Z_{CPE} est placé en série avec $R_{éch}$ et $C_{diélec}$. De cette façon, les courants de conduction traversant $R_{éch}$ et les courants de déplacements traversant $C_{diélec}$ sont tous les deux sujets aux phénomènes de double couche car ils se propagent dans l'échantillon au travers de l'élément à phase constante Z_{CPE} .

L'impédance globale de ce circuit de modélisation est égale à :

$$Z(f) = \frac{R_{éch}}{\left(1 + 4 \cdot R_{éch}^2 \cdot C_{diélec}^2 \cdot \pi^2 \cdot f^2\right)} + \frac{\cos\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right)}{K \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^n} + j \cdot \left(\frac{\sin\left(n \cdot \frac{\pi}{2}\right)}{K \cdot (2 \cdot \pi \cdot f)^n} - 2 \cdot \frac{R_{éch}^2 \cdot C_{diélec} \cdot \pi \cdot f}{\left(1 + 4 \cdot R_{éch}^2 \cdot C_{diélec}^2 \cdot \pi^2 \cdot f^2\right)} \right) \quad (63)$$

Concernant la modélisation des spectres d'impédance électrochimique avec des circuits équivalents, Ehret et al. (3-11) remarque, sans le démontrer, que pour n'importe quel circuit électrique équivalent constitué de trois composants ou plus, un autre circuit équivalent peut être déterminé à partir de ces même composants mais connectés de manière différente.

Nous allons démontrer que ces deux modèles de circuit électrique équivalents sont en fait équivalents.

Sans développer les impédances de chaque composant, l'impédance globale du circuit électrique représenté sur la Figure 3- 3 est égale à :

$$Z_A = \frac{Z_{C_{diélec}} \times (Z_{CPE} + Z_{R_{éch}})}{Z_{C_{diélec}} + Z_{CPE} + Z_{R_{éch}}}$$

$$Z_A = \frac{Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{CPE} + Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{R_{éch}}}{Z_{C_{diélec}} + Z_{CPE} + Z_{R_{éch}}} \quad (64)$$

De même, l'impédance globale du circuit électrique représenté sur la Figure 3- 4 est égale à :

$$Z_B = Z_{CPE} + \frac{Z_{R_{éch}} \times Z_{C_{diélec}}}{Z_{R_{éch}} + Z_{C_{diélec}}} = \frac{Z_{CPE} \cdot Z_{R_{éch}} + Z_{CPE} \cdot Z_{C_{diélec}} + Z_{R_{éch}} \cdot Z_{C_{diélec}}}{Z_{R_{éch}} + Z_{C_{diélec}}}$$

$$Z_B = \frac{Z_{CPE} \cdot Z_{C_{diélec}} + Z_{R_{éch}} \cdot (Z_{CPE} + Z_{C_{diélec}})}{Z_{R_{éch}} + Z_{C_{diélec}}} \quad (65)$$

Nous savons que la capacité de double couche est très élevée comparée aux autres capacités, notamment celle représentant les propriétés diélectriques de l'échantillon. Nous verrons que les résultats de modélisation vérifient quantitativement cette différence d'ordre de grandeur (la capacité de double couche est de 100 à 10000 fois supérieure à la capacité représentant les propriétés diélectrique de l'échantillon). Les impédances correspondantes présentent donc un ordre de grandeur inverse :

$$C_{diélec} \ll K \rightarrow Z_{C_{diélec}} \gg Z_{CPE} \quad (66)$$

Nous avons donc :

$$Z_{CPE} + Z_{C_{diélec}} \approx Z_{C_{diélec}} \quad (67)$$

Selon l'approximation (67), le dénominateur de l'équation (64) peut se simplifier et l'impédance du circuit de modélisation de la Figure 3- 3 peut être approximée par l'expression :

$$Z_A \approx \frac{Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{CPE} + Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{R_{éch}}}{Z_{R_{éch}} + Z_{C_{diélec}}} \quad (68)$$

De même, selon l'approximation (67), le numérateur de l'équation (65) peut se simplifier et l'impédance du circuit de modélisation de la Figure 3- 4 peut être approximée par l'expression :

$$Z_B \approx \frac{Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{CPE} + Z_{C_{diélec}} \cdot Z_{R_{éch}}}{Z_{R_{éch}} + Z_{C_{diélec}}} \quad (69)$$

Si l'impédance de la double couche Z_{CPE} est négligeable par rapport à celle issue des propriétés diélectriques de l'échantillon $Z_{C_{diélec}}$, le modèle développé dans les références (3-1,3-2,3-3) (Figure 3- 3) est donc équivalent au modèle développé par Olthuis (3-10) (Figure 3- 4).

Cette équivalence montre que, si la capacité de double couche est élevée par rapport à la capacité issue des propriétés diélectriques du milieu, ces deux types de circuit électrique donnent des résultats de modélisation quasi-identiques. Le placement en série du CPE par rapport à la capacité de l'échantillon n'est donc pas déterminant pour la valeur de l'impédance globale du système.

Les modélisations issus de ces deux circuits équivalents sont très proches mais les valeurs théoriques issues du modèle développé par Linderholm et al. (3-1) (Figure 3- 3) sont légèrement plus proches des valeurs expérimentales. Ce modèle a donc été conservé.

I.4. Influence des paramètres du circuit électrique équivalent sur les spectres d'impédance

Hong et al. ont montré que les comportements fréquentiels observés sur le spectre d'impédance de la Figure 3- 1 dépendent majoritairement de certains composants du circuit électrique équivalent. Ces dépendances sont schématisées sur la Figure 3- 5.

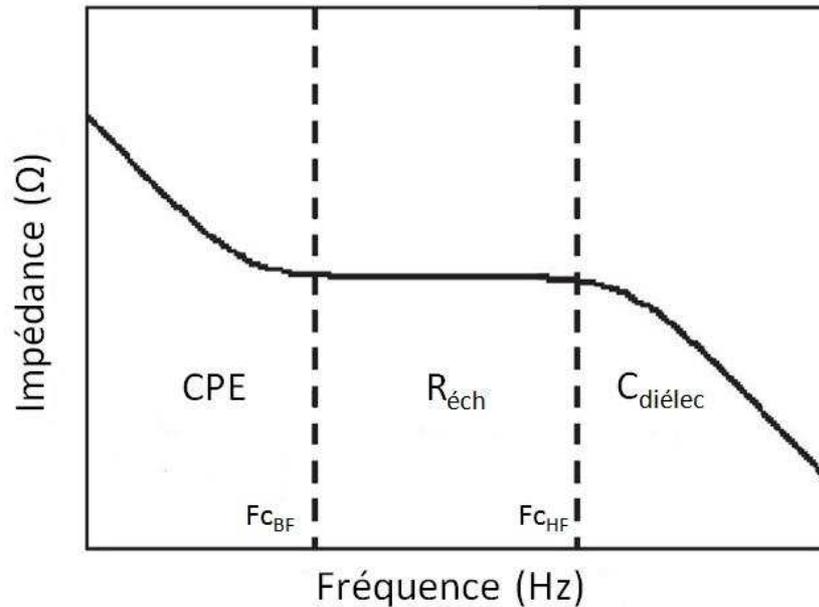


Figure 3- 5 : Schéma d'un spectre d'impédance divisé selon ses différents comportements fréquentiels. Les composants du circuit de modélisation associés à ces comportements fréquentiels sont indiqués. Adapté de (3-3).

Ces comportements fréquentiels peuvent s'expliquer avec le circuit équivalent électrique de la Figure 3- 3. Ces explications sont aussi valables pour le circuit électrique équivalent développé par Olthuis (3-10) et représenté Figure 3- 4.

En basse fréquence, l'impédance Z_{CPE} issue de la double couche est beaucoup plus élevée que la résistance $R_{éch}$. L'impédance de ces deux composants mis en série est donc dominée par l'impédance du CPE. Le CPE se retrouve ainsi en parallèle de la capacité $C_{diélec}$ issue des propriétés diélectriques de l'échantillon. Le CPE présentant une capacité beaucoup plus élevée que $C_{diélec}$, l'impédance du CPE est beaucoup plus faible que celle de $C_{diélec}$ (cf relation (66)). En basse fréquence, le courant passe donc majoritairement au travers de la capacité de double couche. Son impédance domine alors l'impédance globale du système

L'impédance du CPE diminue ensuite avec la fréquence jusqu'à la fréquence de coupure basse fréquence F_{CBF} , fréquence où l'impédance du CPE devient négligeable par rapport à celle de la résistance $R_{éch}$. Cette impédance domine alors l'impédance globale du système qui devient quasi-constante avec la fréquence.

Timmer et al. ont montré que cette fréquence de coupure en basse fréquence est environ égale à (3-2):

$$F_{CBF} \approx \frac{1}{\pi \cdot R_{éch} \cdot C_{dl}} \quad (70)$$

Le terme C_{dl} correspond à la capacité de double couche. Comme nous avons ici modélisé cette capacité de double couche par un élément à phase constante, pour appliquer cette formule, nous remplaçons la valeur de capacité par la valeur du facteur K du CPE.

$$F_{CBF} \approx \frac{1}{\pi \cdot R_{éch} \cdot K} \quad (71)$$

Au dessus de la fréquence de coupure haute fréquence F_{CHF} , la capacité $C_{diélec}$ présente une impédance suffisamment faible par rapport à $R_{éch}$ pour laisser passer le courant en parallèle de cette résistance.

Cette fréquence de coupure en haute fréquence est égale à (3-2):

$$F_{CHF} \approx \frac{1}{2\pi \cdot R_{éch} \cdot C_{diélec}} \quad (72)$$

En hautes fréquences, au dessus de F_{CHF} , l'impédance $C_{diélec}$ devient tellement faible qu'elle court-circuite la résistance $R_{éch}$ et la capacité de double couche. L'impédance globale du système est alors dominée par $C_{diélec}$.

I.5. Limitations des mesures d'impédance en hautes fréquences

Lors des premières mesures effectuées sur de l'eau DI, nous avons effectué des mesures en plus hautes fréquences. Ces mesures nous ont révélé des défauts liés à notre système de mesure.

La Figure 3- 6 présente un spectre d'impédance obtenu avec la 2^e géométrie d'électrode (électrodes de 4 μm de large et droites) sur 110 μl d'eau DI et une tension d'excitation de 10 mV. La plage fréquentielle étudiée va de 100 Hz à 10 MHz.

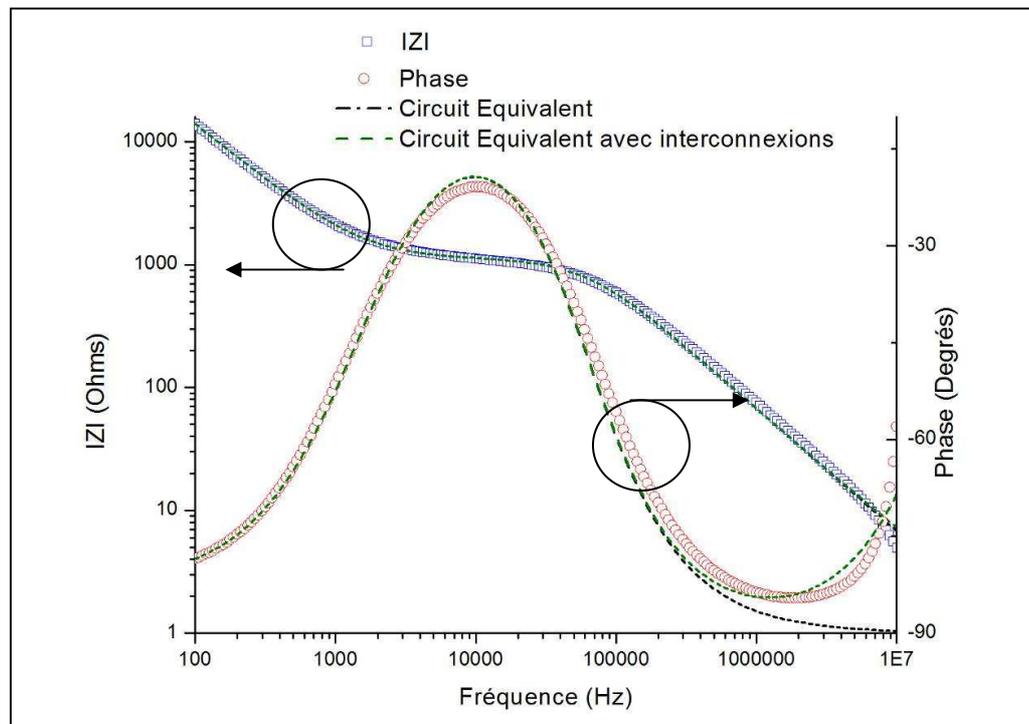


Figure 3- 6 : Mesure de l'impédance d'eau DI effectuée jusqu'à 10 MHz avec le dispositif à micropuits et ses électrodes micrométriques droites (Géométrie 2).

Nous constatons qu'au-delà de 1 MHz, la phase augmente à nouveau, comme si l'impédance adopte un nouveau comportement résistif.

Pour analyser ce spectre, nous avons cherché à le modéliser avec le circuit équivalent précédemment décrit (Figure 3- 3). Cette modélisation est représentée en pointillés noirs sur la Figure 3- 6. Nous constatons que ce circuit ne permet pas de modéliser l'augmentation de l'impédance en hautes fréquences.

Nous avons également étudié un circuit équivalent prenant en compte les résistances de contact et les résistances liés aux interconnexions de nos dispositifs. Pour cela, nous avons ajouté une résistance en série du précédent circuit équivalent. Ce circuit équivalent est schématisé sur la Figure 3- 7.

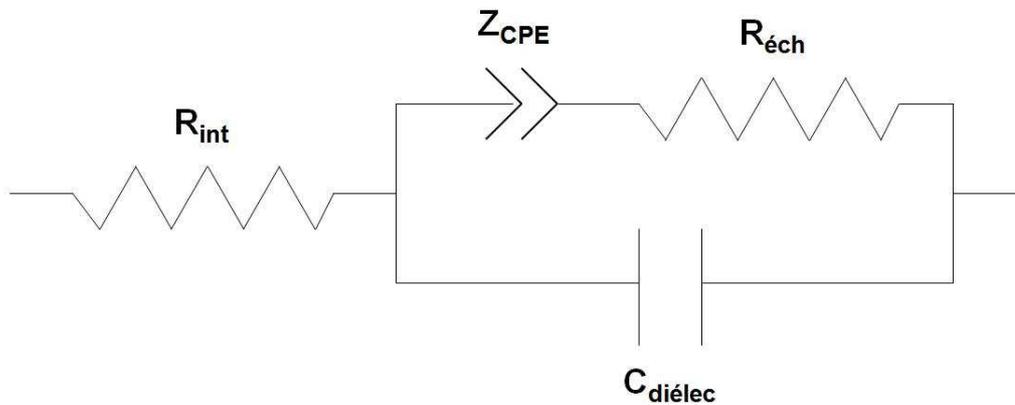


Figure 3- 7 : Schéma du circuit électrique équivalent utilisé pour modéliser les spectres d'impédance expérimentaux avec les interconnexions des dispositifs.

La modélisation de ce circuit équivalent est représenté sur la Figure 3- 6 en pointillés verts. Nous voyons que la présence de la résistance d'interconnexion permet de modéliser l'augmentation de la phase en hautes fréquences. Cette résistance reste faible puisqu'elle mesure 2.6Ω . Elle peut être négligée aux plus basses fréquences mais lorsque l'impédance globale du système devient plus faible, au dessus de 1 MHz, elle doit être prise en compte.

Ces phénomènes apparaissant au dessus de 1 MHz sont dus aux interconnexions et sont donc des phénomènes parasites. Nous avons ainsi décidé de limiter nos études fréquentielles à 1 MHz.

II. Caractérisation du dispositif à puits

Dans ce paragraphe :

- les électrodes millimétriques (cf Chapitre 2, Figure 2-3) sont désignées par « Géométrie 1 ».
- Les électrodes micrométriques droites (cf Chapitre 2, Figure 2-4) sont désignées par « Géométrie 2 »
- Les électrodes micrométriques rondes (cf Chapitre 2, Figure 2-5 et Figure 2-6) sont désignées par « Géométrie 3 »
- Les électrodes submillimétriques rondes (cf Chapitre 2, Figure 2-7 et Figure 2-8) sont désignées par « Géométrie 4 ». Quand le diamètre du puits en PDMS recouvrant ces électrodes varie (cf Chapitre 2, paragraphe II.2.1.3.), la valeur de ce diamètre est précisée. Ainsi les électrodes submillimétriques recouvertes par un puits en PDMS de 6mm de diamètre sont désignées par « Géométrie 4, 6mm » et de la même manière, les électrodes submillimétriques recouvertes par un puits en PDMS de 8mm de diamètre sont désignées par « Géométrie 4, 8mm ».

II.1. Mesure des différents milieux et analyse des différentes géométries

Dans cette partie de caractérisation, les spectres, les valeurs et les écarts types sont issus de la moyenne d'au moins trois mesures. Toutes les mesures de liquides biologiques ici présentées ont été réalisées avec les conditions de mesure suivantes :

- Un volume de 110 μ l pour les puits avec des diamètres de 8mm ou 80 μ l pour les puits avec des diamètres de 6mm.
- Une tension d'excitation sinusoïdale avec une amplitude de 10 mV.

II.1.1. Mesure de l'impédance à vide

La figure suivante présente les spectres d'impédance obtenus avec les quatre géométries d'électrodes du dispositif à puits avec des diamètres de 8mm lors de mesure à vide. La plage fréquentielle étudiée va de 100Hz à 1 MHz.

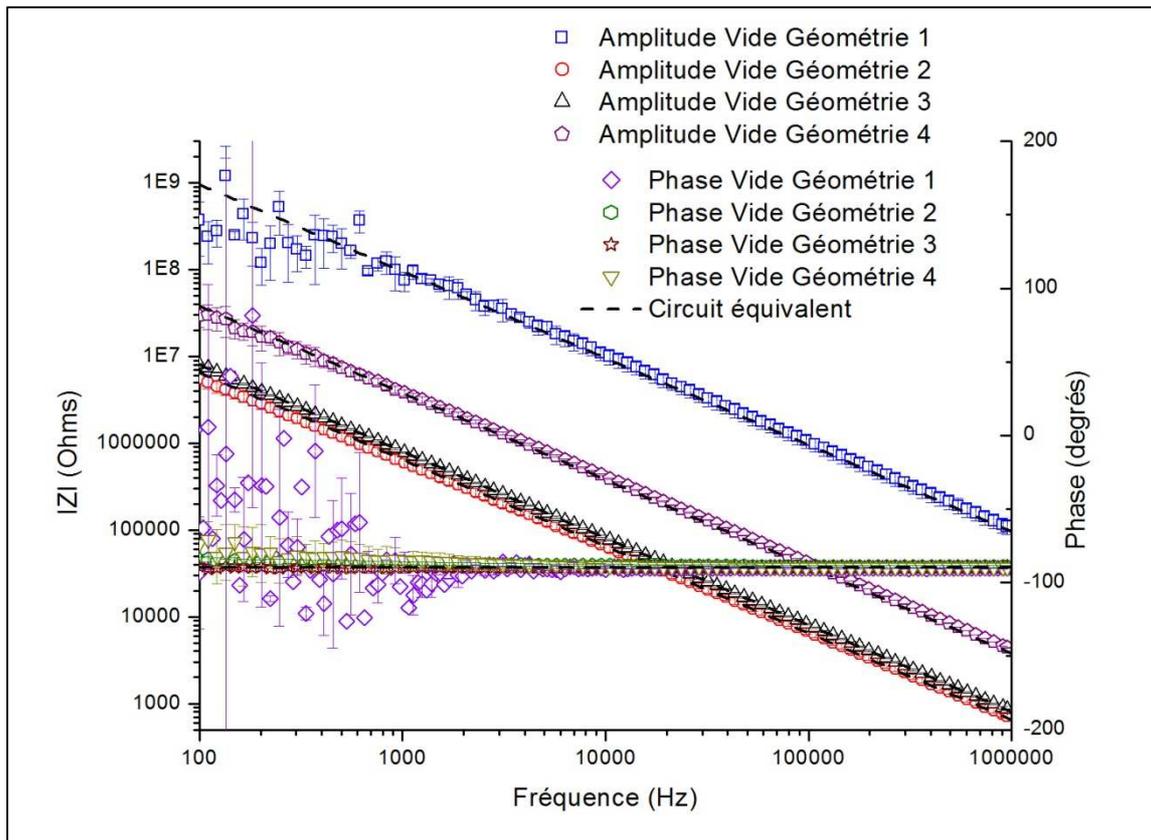


Figure 3- 8 : Mesures moyennées de l'impédance électrochimique à vide des différentes géométries d'électrode des dispositifs à puits.

Toutes ces mesures montrent les caractéristiques fréquentielles d'une capacité avec une décroissance linéaire de l'impédance en $1/f$ et une phase constante de -90° .

Cette capacité est provoquée par l'air ou le substrat de pyrex qui agissent comme des isolants entre les électrodes de polarisations opposées. Ces spectres d'impédance confirment en même temps l'absence de tout court-circuit dans les réseaux d'électrodes.

Sur les graphiques, nous constatons que les écarts types issus des spectres de la 1^{ère} et de la 4^{ème} géométrie sont plus élevés aux basses fréquences que pour les autres géométries d'électrodes. Ces variations importantes sont dues aux impédances mesurées très élevées (> 10 MΩ). Comme ces impédances sont grandes, les impédancemètres mesurent un très faible niveau de courant, avec un rapport signal sur bruit faible. Ce faible rapport entraîne la présence de bruit perturbant les analyses à vide en basse fréquence.

Pour déterminer la capacité équivalente de ces systèmes ouverts, nous avons calculé la capacité issue de l'amplitude de ces spectres à différentes fréquences (100 Hz, 1 KHz, 10 KHz, 100 KHz et 1 MHz) selon la formule :

$$|Z| = \frac{1}{C_{diélec} \cdot \omega} \quad (73)$$

Nous avons ensuite moyenné les différentes valeurs obtenues.

D'après cette analyse, les électrodes millimétriques présentent une capacité de 1,6657 pF ± 283,67 fF.

Les électrodes micrométriques droites une capacité de 0,245 nF ± 11,92 pF.

Les électrodes micrométriques rondes une capacité de 0.198 nF ± 1.2 pF.

Les électrodes sub-millimétriques rondes une capacité de 41,972 pF ± 6.8 pF.

D'après l'équation (16) et le Tableau 2- 2 (cf chapitre 2), ces valeurs de capacité nous permettent de calculer la permittivité relative du milieu diélectrique mesuré. Le Tableau 3- 1 présente les permittivités diélectriques relatives obtenues avec les différentes géométries interdigitées :

Tableau 3- 1 : Permittivités diélectriques relatives mesurées à vide avec les différentes configurations de peignes interdigités.

	Géométrie 2	Géométrie 3	Géométrie 4
ϵ_r à vide	8.82	7.4	9

Ces permittivités diélectriques relatives ne correspondent pas à celle de l'air (=1) mais correspondent aux permittivités diélectriques du verre (entre 3.7 et 10) (3-12).

Ces résultats montrent que les lignes de champ électriques ne circulent pas dans l'air mais bien dans le verre.

Ceci peut s'expliquer par leurs propriétés électriques respectives:

- le verre possède une permittivité diélectrique relative comprise entre 3,7 et 10 et une résistivité électrique comprise entre 1.10^9 et $3.98.10^{11}$ $\Omega.m$ (3-13).
- l'air sec possède à 18°C une permittivité diélectrique relative de 1 et une résistivité électrique d'environ 4.10^{14} $\Omega.m$ (3-14).

Pour les courants de déplacement, d'après l'équation (16), l'air présente donc une capacité plus faible que celle du verre. L'impédance présentée par l'air est ainsi plus élevée que celle présentée par le verre (cf relation (66)). Les courants de déplacement ont donc tendance à davantage se propager dans le verre que dans l'air.

De même pour les courants de conduction, ici très faibles, l'air possède une résistivité électrique au moins 1000 fois supérieure au verre. Les courants de conduction passent donc préférentiellement par le substrat en verre plutôt que par l'air ambiant.

Pour confirmer ce résultat, nous avons appliqué différents diamètres de puits en PDMS sur les électrodes. Nous avons ainsi constaté que, à vide, la signature électrique des électrodes est identique pour tous les diamètres de puits. L'exposition plus ou moins importante des électrodes à l'air ambiant n'influence pas la signature électrique. Ceci confirme que tout le courant électrique passe par le verre.

De même le PDMS possède une permittivité diélectrique relative de 2,7 (3-15). Il présente donc une capacité plus faible que celle du verre et une impédance plus élevée. Les courants de déplacement ont donc tendance à davantage se propager dans le verre. De même, le PDMS possède une conductivité de 4.10^{13} $\Omega.m$ (3-16), ce matériau possède donc une conductivité au moins 100 fois plus élevée que celle du verre.

II.1.2. Mesure de l'impédance de l'eau déionisée

La Figure 3- 9 présente les spectres de l'amplitude et la Figure 3- 10 ceux de la phase de l'impédance de l'eau DI obtenus avec les quatre géométries du dispositif à puits. Pour la 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} géométrie, nous avons utilisé des dispositifs avec des puits de 8 mm ; pour la 4^{ème} géométrie, des puits de 6 et 8 mm de diamètre.

La modélisation des mesures a été réalisée avec le circuit électrique équivalent présenté au paragraphe I.2 (Figure 3- 3). La modélisation des interconnexions n'améliore pas la correspondance entre les courbes expérimentales et analytiques, elle n'a donc pas été réalisée. Les composants du circuit ont été déterminés à partir des mesures expérimentales par la formule (62) et la méthode des moindres carrés non-linéaires réalisée avec le logiciel Origin.

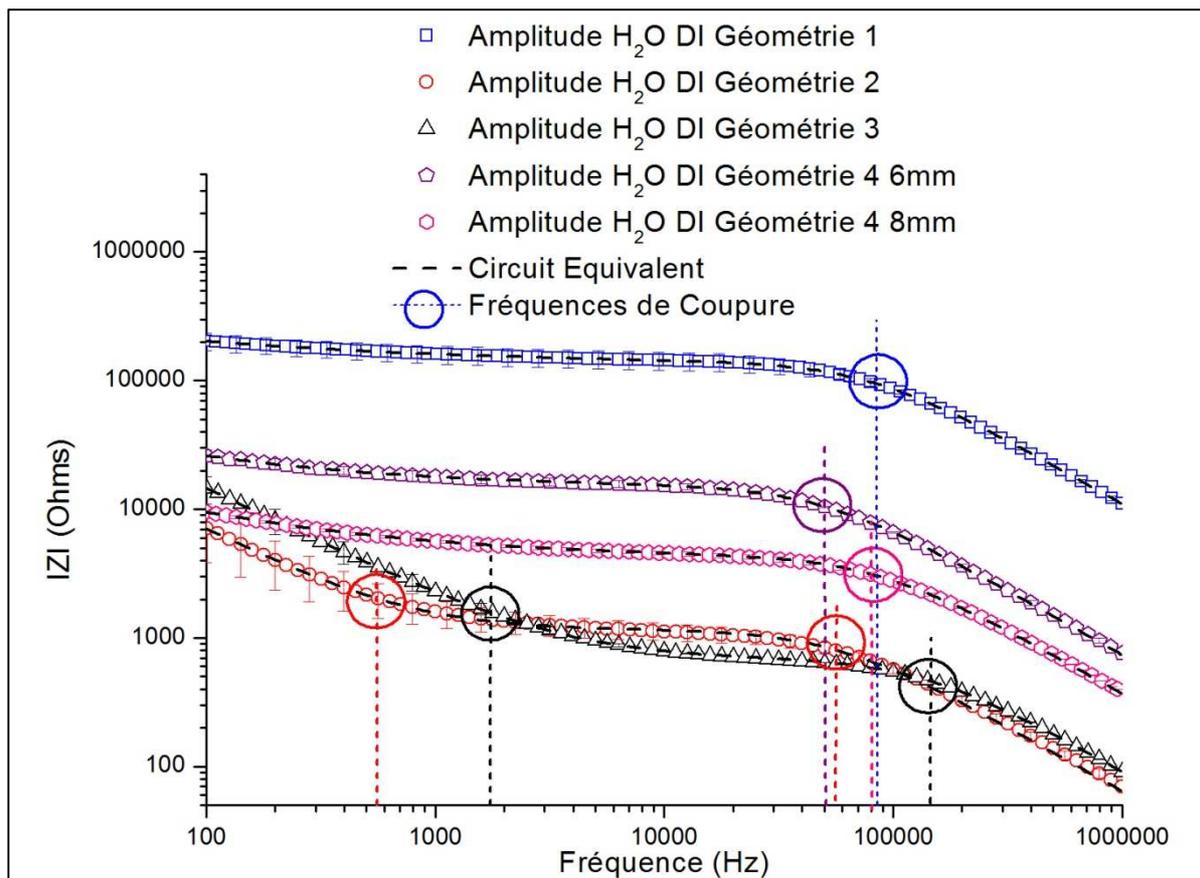


Figure 3- 9 : Mesures moyennées de l'amplitude des impédances d'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits.

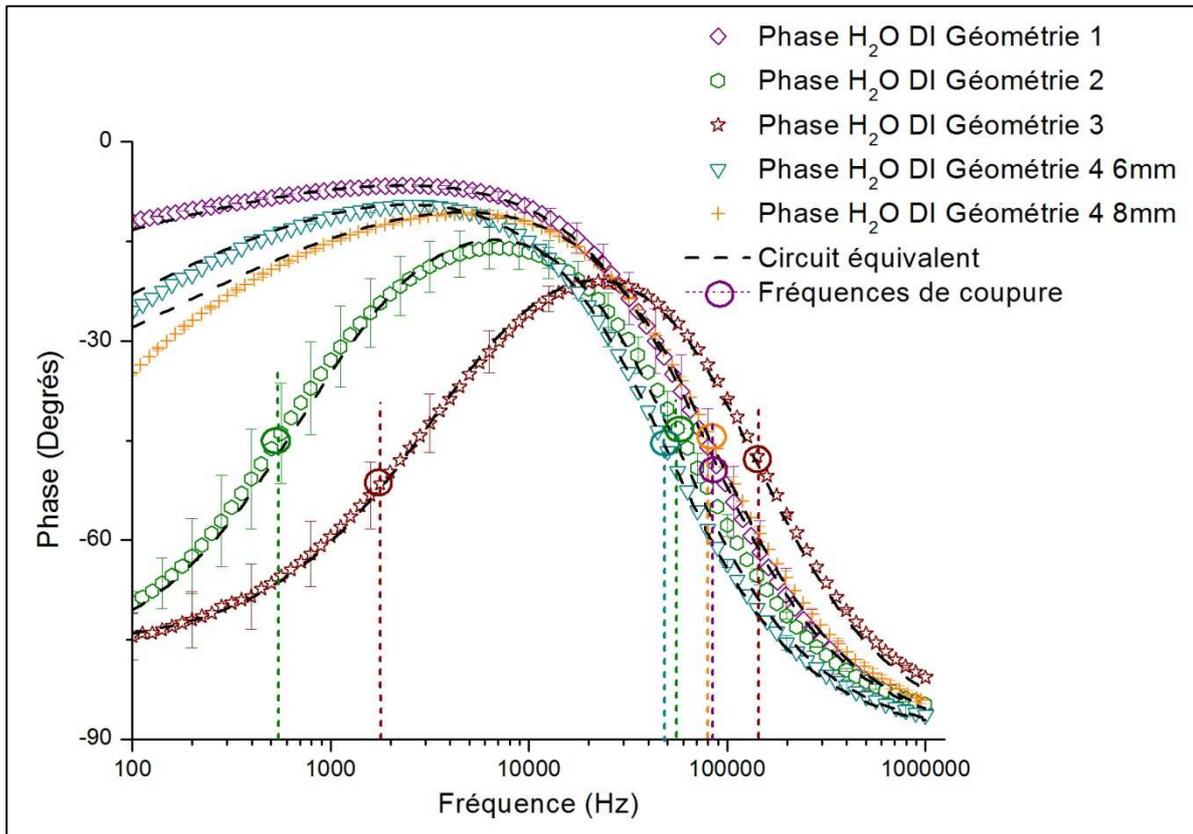


Figure 3- 10 : Mesures moyennées de la phase des impédances d'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits.

Concernant la Géométrie 1, nous voyons qu'en basses fréquences le comportement capacitif du au phénomène de double couche n'apparaît quasiment pas. Ce comportement est donc décalé vers les très basses fréquences. Par contre, la partie résistive correspondant à $R_{\text{éch}}$ et le comportement capacitif du à $C_{\text{diélec}}$ en hautes fréquences sont bien visibles.

Pour la Géométrie 2, les deux comportements capacitifs sont bien visibles tout comme le comportement résistif. L'amplitude est aussi beaucoup plus faible : la partie résistive atteint ici 1 k Ω contre 100 k Ω pour la précédente géométrie.

Pour la Géométrie 3, on remarque que le spectre est très proche de celui de la 2^e géométrie. Les formes arrondies ne semblent donc pas influencer la mesure d'impédance de l'eau DI.

Concernant la Géométrie 4, 8mm, comme pour la 1^{ère} géométrie, le comportement capacitif basse fréquence apparaît moins distinctement et semble donc être décalé vers les plus basses fréquences. La partie résistive atteint un niveau intermédiaire des trois autres géométries (10 k Ω).

Pour la Géométrie 4, 6mm, le comportement résistif atteint des valeurs d'impédance plus élevées que pour la même géométrie, avec un diamètre de puits plus grand.

Nous constatons que les spectres issus de la modélisation avec le circuit équivalent électrique de la Figure 3- 3 sont très proches des spectres expérimentaux.

Les valeurs des paramètres de modélisation sont regroupées dans le Tableau 3- 2.

Tableau 3- 2 : Comparaison des paramètres de modélisation de l'impédance de l'eau DI obtenus avec les différentes géométries.

	K (S.s ⁿ)	n	R _{éch} (Ω)	C _{diélec} (F)
Géométrie 1	9,24123.10 ⁻⁷ ± 1,06164.10 ⁻⁸	0,41083 ± 0,00167	136035,41851 ± 101,99161	1,43968.10 ⁻¹¹ ± 1,31992.10 ⁻¹⁴
Géométrie 2	4,92066.10 ⁻⁷ ± 5,07603.10 ⁻⁹	0,88334 ± 0,00145	1157,35687 ± 2,80802	2,46326.10 ⁻⁹ ± 1,76847.10 ⁻¹¹
Géométrie 3	2,85538.10 ⁻⁷ ± 2,83529.10 ⁻⁹	0,84948 ± 0,00142	698,37469 ± 6,46483	1,72592.10 ⁻⁹ ± 4,76967.10 ⁻¹¹
Géométrie 4, 8mm	5,77907.10 ⁻⁶ ± 3,30384.10 ⁻⁸	0,51891 ± 8,05942.10 ⁻⁴	4243,61858 ± 2,73172	4,28589.10 ⁻¹⁰ ± 5,00023.10 ⁻¹³
Géométrie 4, 6mm	2,39121.10 ⁻⁶ ± 5,4521.10 ⁻⁸	0,53076 ± 0,00318	14977,04549 ± 23,84849	2,14501.10 ⁻¹⁰ ± 5,54989.10 ⁻¹³

Comme leurs spectres d'impédance, les électrodes micrométriques droites et rondes ont des paramètres de modélisation très proches.

Concernant le comportement résistif des spectres obtenus avec les différentes géométries d'électrodes, nous voyons que R_{éch} détermine bien le niveau d'impédance où le spectre se stabilise en fréquence. La valeur de R_{éch} correspond approximativement à la valeur du module d'impédance obtenue au minimum de phase (en valeur absolue). Nous voyons que R_{éch} diminue avec les dimensions géométriques. Cela est dû à la constante de cellule qui diminue avec les plus faibles dimensions d'électrodes (cf relation (56)). Cette diminution de R_{éch} avec le nombre d'électrodes correspond aussi à la mise en parallèle de différents chemins résistifs qui diminuent la résistance globale du système.

Concernant les comportements capacitifs en hautes fréquences, plus les électrodes sont de grandes dimensions, plus C_{dielec} diminue. Comme pour $R_{\text{éch}}$, cela est dû aux propriétés de la constante de cellule (cf relation (56)). Cette augmentation de C_{dielec} avec le nombre d'électrode correspond également à la mise en parallèle de différentes voies capacitives qui augmentent la capacitance globale du système.

Concernant les géométries submillimétriques et l'influence du diamètre du puits, nous constatons que pour les électrodes avec le puits de 6 mm de diamètre, $R_{\text{éch}}$ est plus élevée et C_{dielec} plus petite que pour les électrodes avec le puits de 8mm de diamètre. Comme le facteur de cellule κ est inversement proportionnel aux longueurs des électrodes, ces résultats sont concordants avec la précédente relation (56).

Pour les comportements capacitifs en basses fréquences, l'évolution de K n'est pas liée aux dimensions des électrodes puisque $K_{W3} < K_{W2} < K_{W1} < K_{W4}$.

Pour les électrodes micrométriques, n se rapproche de 1, la valeur correspondant à une capacité, mais la modélisation précise des données expérimentales nécessite de diminuer légèrement ce facteur de phase ($\approx 0,9$). Plus on s'éloigne des dimensions micrométriques, plus le facteur de phase n se rapproche de $\frac{1}{2}$. Cette valeur de facteur de phase correspond à celle de l'élément Warburg précédemment décrit.

Le composant Warburg modélisant les effets de la diffusion des molécules ou des ions présents dans un électrolyte sur les phénomènes d'interface aux électrodes, ceci montre que ces phénomènes de diffusion augmentent avec les dimensions des électrodes.

Cette diffusion accrue peut s'expliquer par des phénomènes d'électrophorèse alternative qui permettent de déplacer des ions sous l'application d'un champ électrique alternatif (3-17,3-18,3-19) ou à des phénomènes de DEP agissant sur les molécules d'eau.

Nous avons calculé les profondeurs de champ (cf lexique) des différentes géométries d'électrode d'après la thèse de Linderholm (3-20), ces profondeurs de champ sont regroupés dans le Tableau 3- 3.

Tableau 3- 3 : Profondeur de champ des différentes géométries d'électrodes.

	Géométrie 1	Géométrie 2	Géométrie 3	Géométrie 4
Profondeur de champ (μm)	80	1,04	1,2	7,525

Le champ électrique issu des électrodes de plus grandes dimensions interagit donc avec davantage d'ions et de molécules. Ceci pourrait expliquer des phénomènes d'électrophorèse alternative et de DEP plus importants pour ces électrodes.

D'après les équations (71) et (72) développées par Timmer et al (3-2), ces paramètres de modélisation nous permettent de déterminer les fréquences de coupure basse fréquence F_{CBF} et haute fréquence F_{CHF} des spectres d'impédance pour les différentes géométries d'électrodes. Ces fréquences sont regroupées dans le Tableau 3- 4 et sont indiquées sur les Figure 3- 9 et Figure 3- 10 par des pointillés courts.

Tableau 3- 4 : Fréquences de coupure basse fréquence et haute fréquence des spectres d'impédance de l'eau DI déterminées à partir des différentes modélisations.

	F_{CBF} (Hz)	F_{CHF} (Hz)
Géométrie 1	2.53023	81264.7
Géométrie 2	558.933	55826.8
Géométrie 3	1596.25	132042
Géométrie 4, 8mm	12.9794	87507
Géométrie 4, 6mm	8.88805	49951

Nous constatons sur les spectres d'impédance que, pour toutes les géométries d'électrodes, ces fréquences de coupures calculées à partir de la modélisation correspondent bien aux fréquences délimitant les différents comportements fréquentiels observés sur les spectres d'impédance de l'eau DI.

La comparaison des différentes géométries d'électrodes montre que pour mesurer l'impédance de cellules biologiques suspendues dans une solution faiblement conductrice, comme l'eau DI, il est préférable d'utiliser les électrodes micrométriques qui présentent les impédances les plus faibles. En effet les variations d'impédance générées par les cellules sont ainsi plus facilement détectables (3-2).

II.1.3. Détermination des propriétés électriques de l'eau DI par impédancemétrie

Les relations (13) et (14) et les constantes de cellules obtenues pour les configurations d'électrodes interdigitées présentées dans le Tableau 2- 2 permettent de déterminer l'évolution fréquentielle de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative de l'eau DI à partir des mesures d'impédance présentées au paragraphe II.1.2..

II.1.3.1. Etude avec un circuit électrique équivalent

II.1.3.1.1. Modélisation avec un circuit électrique équivalent

Sur la page suivante, la Figure 3- 11 présente l'évolution fréquentielle de la conductivité électrique et la Figure 3- 12 ceux de la permittivité diélectrique relative de l'eau DI obtenus avec les différentes géométries du dispositif à puits.

En appliquant les relations (13) et (14) sur les données issues des précédentes modélisations de l'impédance, nous pouvons analyser ces spectres avec le circuit équivalent décrit au paragraphe I.2. (Figure 3- 3). Ces modèles sont représentés en superposition des données expérimentales.

En utilisant des électrodes macroscopiques, Batalioto et al. (3-21) ont récemment obtenu dans le domaine des basses et moyennes fréquences (< 3 MHz) des évolutions fréquentielles de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative proches des spectres présentés sur ces figures.

Ils ont également montré que ce type d'évolution fréquentielle suit le modèle de relaxation décrit par Debye (3-22) (cf chapitre 2, paragraphe IV.4.).

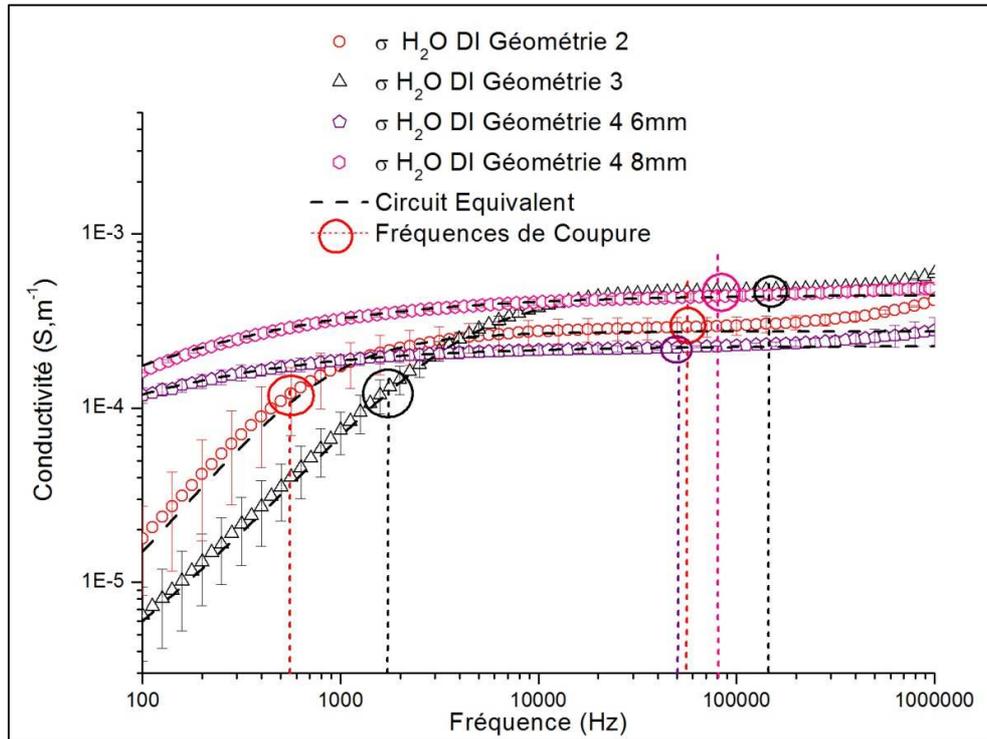


Figure 3- 11 : Evolutions fréquentielles de la conductivité électrique d'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits et modélisations avec le circuit électrique équivalent.

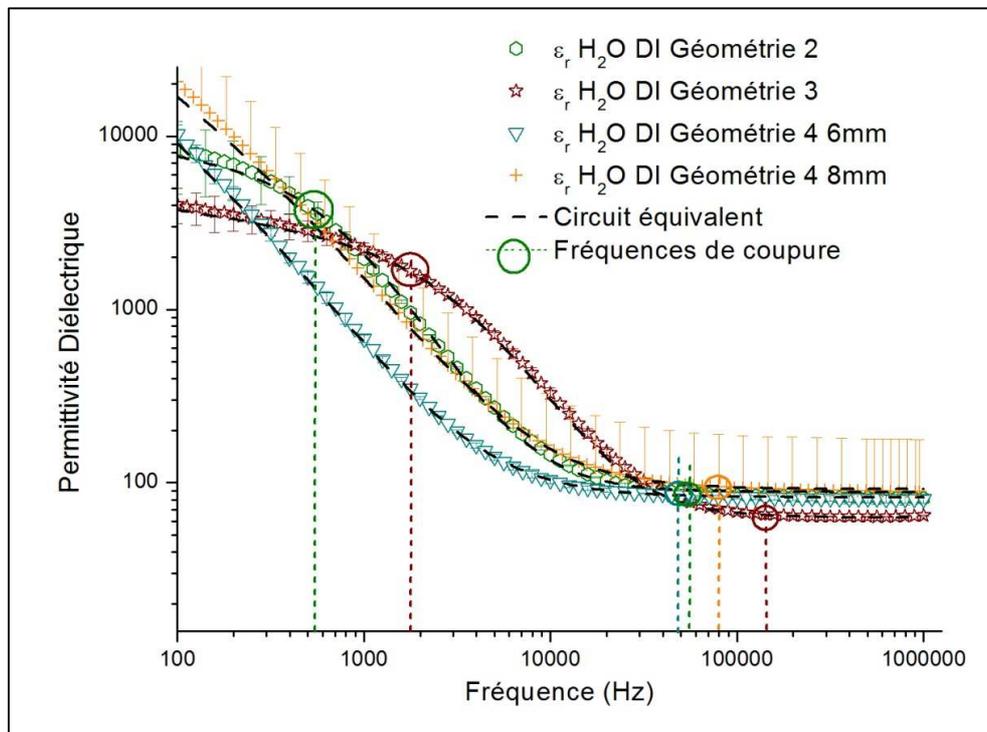


Figure 3- 12 : Evolutions fréquentielles de la permittivité diélectrique d'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits et modélisations avec le circuit électrique équivalent.

Les spectres de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique des précédentes figures ont été déterminés à partir des constantes de cellules calculées au chapitre 2. Ces constantes de cellule sont censées permettre de ne plus considérer les aspects géométriques des électrodes. Seulement, nous constatons que les spectres de conductivité et de permittivité obtenus avec les différentes géométries d'électrode sont encore différents, notamment aux basses fréquences (< 10 KHz).

Les relaxations observées à ces basses fréquences sont en fait dues aux effets de double couche (3-23). Comme les électrodes présentent des surfaces différentes, ces effets se manifestent sur la conductivité et la permittivité de façon différentes. Sans ces effets, Prodan et al. ont montré qu'aucune relaxation ne doit apparaître en dessous de 1 MHz (3-24).

La conductivité augmente en basses fréquences pour atteindre une valeur quasi-constante vers les hautes fréquences entre 10 KHz et 300 KHz. Au-delà, la conductivité augmente légèrement.

Pour toutes les géométries d'électrodes, en B.F. (< 1 KHz), la permittivité diélectrique est élevée et atteint un niveau beaucoup plus faible et stable en fréquence vers les H.F. (> 100 KHz). Pour les électrodes micrométriques (Géométrie 2 et Géométrie 3), en B.F., la permittivité diélectrique est stable en fréquence. Pour les électrodes submillimétriques (Géométrie 4, 6mm et Géométrie 4, 8mm), en B.F., la permittivité diélectrique n'atteint pas de valeur constante.

Sur les Figure 3- 11 et Figure 3- 12, nous avons indiqué en pointillés courts les fréquences de coupure regroupées dans le Tableau 3- 4.. Il est intéressant de constater que les fréquences de coupures précédemment décrites par Timmer et al. (3-2) (cf. paragraphe I.4) pour les spectres d'impédance correspondent également à des fréquences de transition sur ces spectres de conductivité et de permittivité.

En effet pour les électrodes micrométriques, en dessous de F_{CBF} , i.e. dans la plage fréquentielle où C_{dielec} domine l'impédance globale du système (cf paragraphe I.4), la conductivité diminue de façon importante et la permittivité se stabilise en fréquence.

Entre F_{CBF} et F_{CHF} pour les électrodes micrométriques et en dessous de F_{CHF} pour les électrodes submillimétriques, i.e. dans la plage fréquentielle où $R_{éch}$ domine l'impédance globale du système (cf paragraphe I.4), la conductivité devient quasi-constante avec la fréquence et atteint des valeurs proches pour les différentes géométries d'électrodes.

Au dessus de F_{cHF} , pour toutes les géométries d'électrodes, la conductivité augmente légèrement et la permittivité devient stable en fréquence et atteint des valeurs proches pour les différentes géométries d'électrodes.

Le tableau suivant regroupe les valeurs de permittivité diélectrique obtenues en basses fréquences, à 100 Hz (ϵ_{BF}) et en haute fréquence, à 1 MHz (ϵ_{HF}), ainsi que la valeur stabilisée de la conductivité électrique mesurée à 50 KHz (σ). Nous avons déterminé la conductivité à 50 KHz car cette fréquence se situe juste en dessous de la fréquence de coupure haute fréquence pour l'ensemble des géométries d'électrodes.

Tableau 3- 5 : Comparaison des paramètres électriques de l'eau DI déterminés à partir des spectres de conductivité électrique et de permittivité relative pour les différentes géométries d'électrodes.

	ϵ_{BF}	ϵ_{HF}	σ (S.m ⁻¹)
Géométrie2	8323	81,31	$2,91.10^{-4}$
Géométrie 3	4063	64,76	$4,64.10^{-4}$
Géométrie 4, 8 mm	20474	88	$4,33.10^{-4}$
Géométrie 4, 6 mm	10208	80,48	$2,23.10^{-4}$

Nous constatons que les valeurs de permittivité obtenues en basse fréquence sont différentes selon la géométrie d'électrode. Comme nous l'avons précisé précédemment, cette dispersion est due au phénomène de polarisation des électrodes, le phénomène de double couche. Les électrodes présentent des surfaces différentes et donc des phénomènes de polarisation divergents qui expliquent ces dispersions.

En hautes fréquences, pour la 2^{ème} et 4^{ème} géométrie avec un puits de 8mm de diamètre, la permittivité relative atteint bien la valeur de la permittivité de l'eau : 80 (3-21,3-25). La 4^{ème} géométrie avec le puits de 8 mm diamètre atteint une valeur de permittivité légèrement supérieure : 88. La 3^e géométrie d'électrode atteint une valeur de permittivité plus faible : 64. Cette différence peut être issue des approximations faites sur la géométrie des électrodes pour calculer la constante de cellule. Cette approximation amène davantage d'erreur que celle faite sur les électrodes rondes de 120 μ m car elles concernent davantage d'électrodes (888 électrodes au lieu de 54).

Les conductivités mesurées de l'eau DI sont comprises entre $2,23.10^{-4}$ et $4,64.10^{-4}$ S.m⁻¹. Ce niveau de conductivité correspond bien à une pureté d'eau de niveau 2, c'est-à-dire à une eau DI utilisée pour les applications en électrochimie (3-26). On retrouve ce niveau de conductivité dans la littérature (3-27).

II.1.3.1.2. Détermination des propriétés électriques à partir des composants du circuit électrique équivalent

Nous avons comparé ces valeurs de conductivité et de permittivité diélectrique avec les valeurs déterminées à partir des différents composants du circuit électrique équivalent. Pour calculer σ , nous avons utilisé la relation (15) avec les valeurs de κ issues du Tableau 2- 2 et la valeur de $R_{\text{éch}}$. Pour calculer ϵ_{BF} , nous avons utilisé la relation (16) et ces mêmes valeurs de facteur de cellule en utilisant la valeur de K . Pour calculer ϵ_{HF} , nous avons fait de même avec la valeur de $C_{\text{diélec}}$.

Les paramètres électriques ainsi déterminés sont regroupés dans le Tableau 3- 6.

Tableau 3- 6 : Comparaison des paramètres électriques de l'eau DI issus du circuit électrique équivalent pour les différentes géométries d'électrodes.

	$K \rightarrow \epsilon_{\text{BF}}$	$C_{\text{dl}} \rightarrow \epsilon_{\text{HF}}$	$R_{\text{int}} \rightarrow \sigma$ (S.m ⁻¹)
Géométrie 2	17712,9828669	88,67	$2,754.10^{-4}$
Géométrie 3	10675	64,527	$4,74.10^{-4}$
Géométrie 4, 8 mm	1239781	91.94	$4,476.10^{-4}$
Géométrie 4, 6 mm	919554.6515	82.487692	$2,273.10^{-4}$

Nous constatons que la modélisation de l'impédance avec le circuit équivalent permet d'obtenir des valeurs de conductivité électrique et de permittivité diélectrique en hautes fréquences proches de celles déterminées en traçant les spectres complets de ces paramètres.

Concernant la permittivité diélectrique basse fréquence, nous observons une différence importante entre les valeurs obtenues à partir de la modélisation avec le circuit équivalent des spectres d'impédance (Tableau 3- 6) et les valeurs obtenues en traçant les spectres expérimentaux de la conductivité et de la permittivité (Tableau 3- 5).

Nous observons par contre une correspondance entre les valeurs de conductivité et de permittivité en hautes fréquences.

Ces correspondances sont issues des similitudes entre le circuit électrique que nous avons utilisé pour modéliser les spectres d'impédance (Figure 3- 3) et le circuit électrique correspondant au modèle de Debye présenté au chapitre 2 (Figure 2-29).

Pour comparer ces deux circuits équivalents, nous les avons regroupés sur la figure suivante.

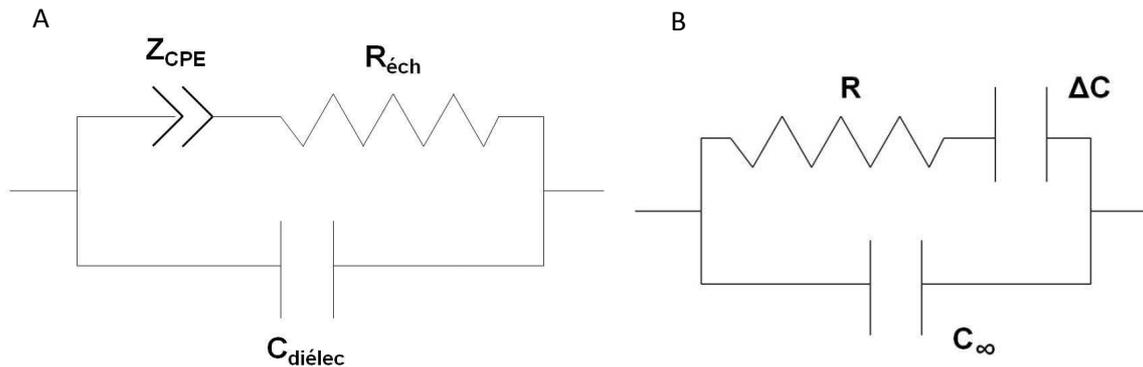


Figure 3- 13 : Comparaison du circuit électrique équivalent utilisé pour les modélisations des impédances (A) et du circuit électrique équivalent issu du modèle de Debye au 1^{er} ordre (B).

Nous constatons que la seule différence entre ces circuits se situe au niveau de la modélisation du phénomène de double couche, responsable de la valeur de permittivité diélectrique en basse fréquence. Le circuit électrique équivalent correspondant au modèle de Debye décrit ce phénomène avec une capacité alors que nous avons modélisé ce phénomène avec un CPE, ajoutant ainsi un degré de liberté supérieur à nos modélisations. Cette différence peut expliquer pourquoi les deux méthodes précédemment utilisées ne permettent pas d'obtenir des valeurs identiques de permittivité en basse fréquence.

Le composant $R_{éch}$ du circuit électrique de l'encart A est équivalent à R du circuit de l'encart B. Le composant $C_{diélec}$ du circuit électrique de l'encart A est équivalent à C_{∞} du circuit de l'encart B. Ces équivalences expliquent pourquoi une modélisation de l'impédance avec le circuit équivalent de l'encart A permet d'obtenir des valeurs de conductivité électrique et de permittivité diélectrique en hautes fréquences proches de celles déterminées en traçant les spectres complets de ces paramètres.

Le circuit électrique équivalent présenté en Figure 3- 3 et Figure 3- 13.A. peut donc être utilisé pour modéliser l'impédance électrochimique d'un électrolyte présentant un phénomène de relaxation proche du modèle de Debye. Cette modélisation permet de déterminer rapidement les valeurs de conductivité et de permittivité diélectrique en haute fréquence de cet électrolyte (Tableau 3- 6). Le tracé des spectres de conductivité et de permittivité n'est donc pas obligatoire pour la détermination de ces valeurs.

II.1.3.2. Modélisation avec la relaxation de Debye et de Cole-Cole

Les précédents spectres nous ont permis de vérifier qualitativement que l'évolution fréquentielle de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative de l'eau DI suivait le modèle de relaxation de Debye. Nous allons maintenant déterminer quantitativement les paramètres de ces phénomènes de relaxation.

Les modèles de relaxation de Debye du 1^{er} et du 2nd ordre ainsi que le modèle de Cole-Cole présentés au chapitre 2 ont été déterminés à partir des mesures expérimentales par la méthode des moindres carrés non-linéaires réalisée avec le logiciel Origin.

II.1.3.2.1. Analyse avec le modèle de Debye au 1^{er} ordre

Pour modéliser au 1^{er} ordre la relaxation de la conductivité et de la permittivité diélectrique, nous avons respectivement utilisé l'équation (28) et (27) en fixant la valeur de permittivité diélectrique en hautes fréquences à la valeur expérimentale.

Cette modélisation est représentée à la page suivante, sur la Figure 3- 14, en pointillé noir avec les spectres expérimentaux de conductivité et de permittivité.

Nous constatons que les modélisations de Debye au 1^{er} ordre suivent l'allure des spectres mais présentent une déviation quantitative notable avec les valeurs expérimentales, principalement au niveau de la phase de relaxation de la permittivité diélectrique relative.

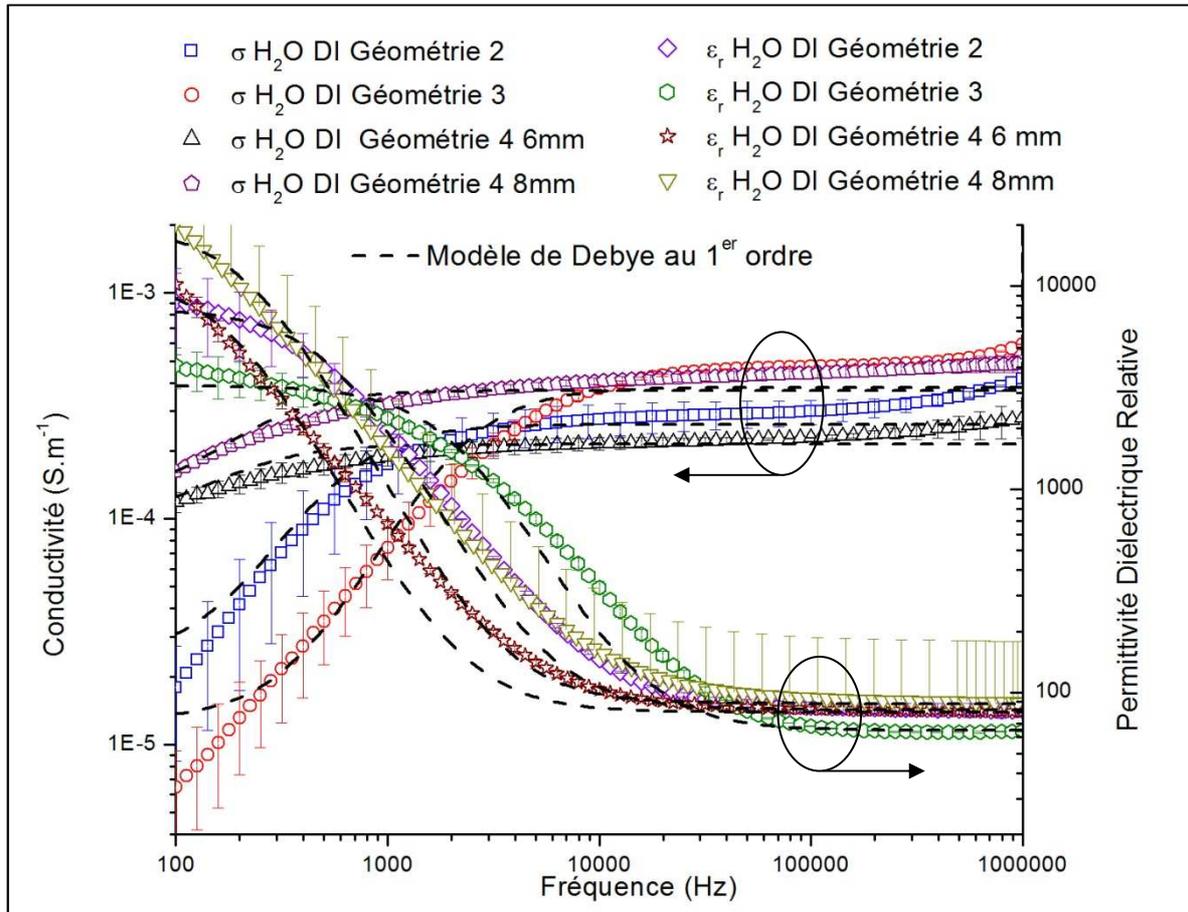


Figure 3- 14 : Mesures moyennées de l'évolution fréquentielle de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique de l'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits. Modélisations effectuées avec le modèle de Debye au 1^{er} ordre.

A la page suivante, le Tableau 3- 7regroupe les différents paramètres issus de la modélisation au 1^{er} de la relaxation de Debye.

Nous y constatons que les temps de relaxation issus du phénomène de double couche sont compris entre $7,57.10^{-5}$ et $8,67.10^{-4}$ s.

Les dispersions observées entre ces temps de relaxation sont issues des phénomènes de double couche spécifiques à chaque géométrie d'électrode et à leur surface.

La conductivité statique de l'eau DI est comprise entre $1,2.10^{-5}$ et $1,42 10^{-4}$ S.m⁻¹.

Les permittivités diélectriques en basse fréquence sont comprises entre 3000 et 21000, comme les valeurs expérimentales.

Tableau 3- 7 : Paramètres de la modélisation au 1^{er} ordre de la relaxation de Debye sur les spectres de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative pour les différentes géométries d'électrodes.

	ϵ_{BF}	ϵ_{HF}	τ (s)	σ_{DC} (S.m ⁻¹)
Géométrie 2	7704,91237 ±	82	2,83094.10 ⁻⁴ ±	2,34776.10 ⁻⁵ ±
	64,00516		3,31042.10 ⁻⁶	0,0024
Géométrie 3	3223,3464 ±	65	7,57673.10 ⁻⁵ ±	1,28031.10 ⁻⁵ ±
	48,3615		2,23008.10 ⁻⁶	0,00293
Géométrie 4, 8 mm	20105,31716 ±	88	7,12026.10 ⁻⁴ ±	1,42552.10 ⁻⁴ ±
	425,72456		1,50886.10 ⁻⁵	0,00764
Géométrie 4, 6 mm	11290,04554 ±	80	8,6711.10 ⁻⁴ ±	9,88865.10 ⁻⁵ ±
	354,63641		2,54237.10 ⁻⁵	0,00516

Pour les électrodes sub-millimétriques, les temps de relaxation mesurés se rapprochent de ceux déterminés par Teschke et al. avec un AFM (environ 1 ms) (3-28). Pour les électrodes micrométriques, les temps de relaxation sont un peu plus faibles.

Les temps de relaxation déterminés ici diffèrent de celui déterminé par Batalioto et al. avec un modèle de Debye au 1^{er} ordre: 0,9 s (3-21).

Pour mesurer ce temps de relaxation, Batalioto a utilisé deux électrodes planes macroscopiques placées en vis-à-vis dans l'eau DI. Le temps de relaxation qu'il a ainsi déterminé confirme la tendance observée avec nos géométries d'électrodes : le temps de relaxation associé au phénomène de double couche augmente avec les dimensions des électrodes.

Nous voyons sur les graphiques que les modèles de relaxation de Debye au 1^{er} ordre ne permettent pas de décrire de manière suffisamment précise les données expérimentales.

L'utilisation d'un modèle de relaxation de Debye au 2nd ordre peut donc améliorer la modélisation de ces données. Comme décrit au chapitre 2 (paragraphe IV.4.2.), le 2^{ème} temps de relaxation est du à la contamination de l'eau DI par le CO₂.

II.1.3.2.2. Analyse avec le modèle de Debye au 2nd ordre

Pour modéliser au 2nd ordre la relaxation de la conductivité et de la permittivité diélectrique, nous avons respectivement utilisé l'équation (35) et (34) en fixant la valeur de permittivité diélectrique en hautes fréquences à la valeur expérimentale.

Cette modélisation est représentée à la page suivante, sur la Figure 3- 15, en pointillé noir avec les spectres expérimentaux de conductivité et de permittivité.

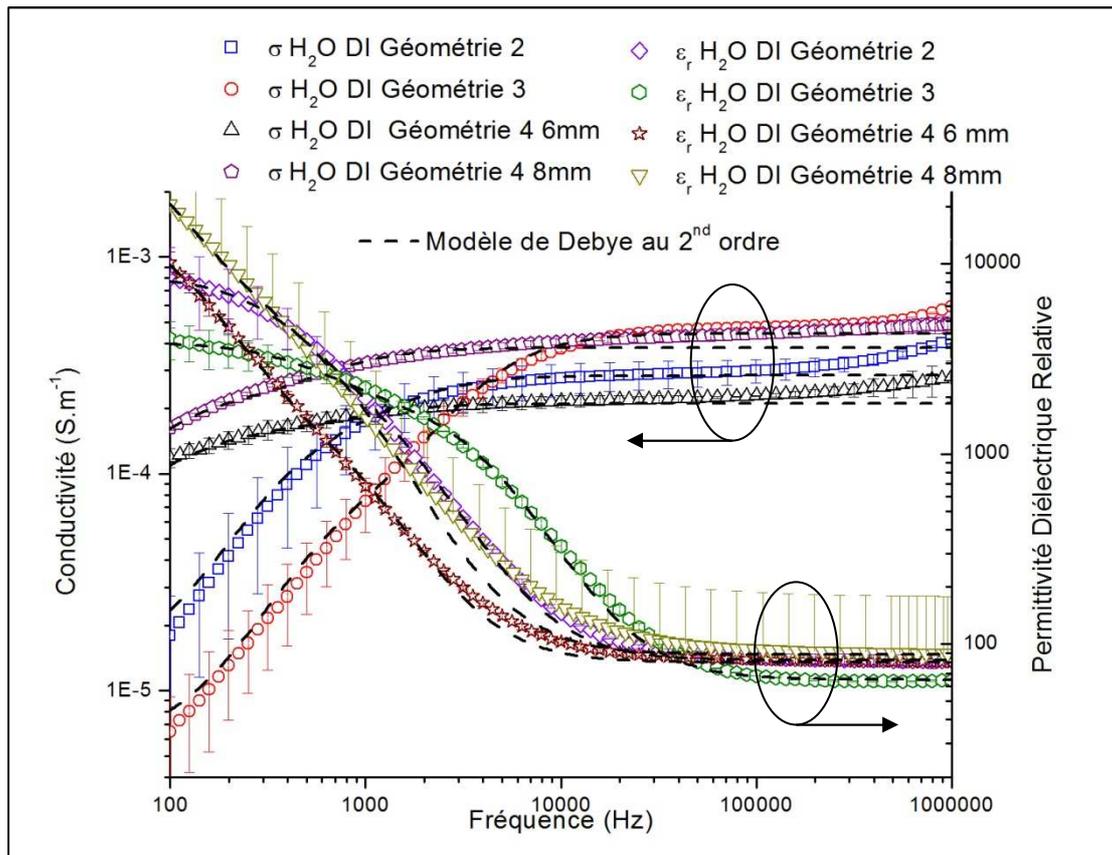


Figure 3- 15 : Mesures moyennées de l'évolution fréquentielle de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique de l'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits. Modélisations effectuées avec le modèle de Debye au 2nd ordre.

Nous voyons que les modèles de relaxation de Debye au 2nd ordre sont très proches des spectres expérimentaux de conductivité électrique et de permittivité diélectrique relative. Ils présentent cependant des légères déviations à la fin de la phase de relaxation de la permittivité (aux environs de 10 KHz), ainsi qu'avec la conductivité en H.F. (\approx 60 KHz).

Le tableau suivant regroupe les différents paramètres issus de la modélisation au 2nd ordre de la relaxation de Debye.

Tableau 3- 8 : Paramètres de la modélisation au 2nd ordre de la relaxation de Debye sur les spectres de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative pour les différentes géométries d'électrodes.

	ϵ_{BF}	ϵ_{MF}	ϵ_{HF}	τ_1 (s)	τ_2 (s)	σ_{DC} (S.m ⁻¹)
Géométrie 2	8581,50842 ± 29,87747	1481,7388 ± 54,42471	82	$4,298.10^{-4}$ ± $4,987.10^{-6}$	$9,924.10^{-5}$ ± $2,355.10^{-6}$	$1,29.10^{-5}$ ± $6,32.10^{-4}$
Géométrie 3	3851,38446 ± 25,80801	1772,1466 ± 36,92413	65	$2,92.10^{-4}$ ± $1,019.10^{-5}$	$4,026.10^{-5}$ ± $7,850.10^{-7}$	$5,82.10^{-6}$ ± $7,59.10^{-4}$
Géométrie 4, 8 mm	57409,5919 ± 608,9802	4519,0863 ± 118,7438	88	0,00239 ± $3,182.10^{-5}$	$2,398.10^{-4}$ ± $5,523.10^{-6}$	$4,53.10^{-5}$ ± 0,00294
Géométrie 4, 6 mm	18140,99803 ± 418,85656	1032,6416 ± 41,09546	80	0,00153 ± $3,365.10^{-5}$	$1,68.10^{-4}$ ± $5,543.10^{-6}$	$6,15.10^{-5}$ ± 0,00119

Nous constatons que les 1^{er} temps de relaxation sont compris entre $2,9.10^{-4}$ s et $2,4.10^{-3}$ s. Ces temps se rapprochent davantage des valeurs déterminés mécaniquement par Teschke et al. (3-28).

Les 2nd temps de relaxation sont compris entre 4.10^{-5} s et $2,4.10^{-4}$ s.

Pour la 2^{ème} géométrie d'électrodes et la 4^{ème} géométrie d'électrodes avec des puits de 6mm, les temps de relaxation modélisés avec le 1^{er} ordre correspondent environ aux moyennes des deux temps de relaxation issus du modèle au 2^{ème} ordre. Pour la 3^{ème} géométrie et la 4^{ème} géométrie avec des puits de 8mm, les temps de relaxation modélisés avec le 1^{er} ordre sont du même ordre de grandeur que la moyenne des deux temps de relaxation issus du modèle au 2^{ème} ordre.

Les conductivités statiques sont comprises entre $5,8.10^{-6}$ et $7,24.10^{-5}$ S.m⁻¹ et sont ainsi légèrement plus faibles que les conductivités statiques issues des modélisations au 1^{er} ordre.

Cette diminution permet de corriger les déviations observées en basse fréquence avec le modèle au 1^{er} ordre.

Les permittivités diélectriques en basses fréquences sont du même ordre de grandeur que celles issues du modèle au 1^{er} ordre. Elles sont comprises entre 3800 et 54400 et sont donc légèrement supérieures.

Les permittivités diélectriques aux moyennes fréquences sont comprises entre 1000 et 4500.

Comme discuté au chapitre 2, les bonnes modélisations issues du modèle de relaxation de Debye au 2nd ordre confirment la présence d'autres types de molécules dans l'eau, molécules qui entraînent un second temps de relaxation (3-21). La contamination de l'eau DI à l'air ambiante entraînant la présence d'acide carbonique, nous pouvons supposer que ces molécules sont responsables de cet autre temps de relaxation (3-29,3-30).

Comme les temps de relaxation situés entre $2,9.10^{-4}$ s et $2,4.10^{-3}$ s sont proches de ceux déterminés par Teschke et al. pour l'étude du phénomène de double couche dans de l'eau DI, nous pouvons les attribuer à la relaxation provoquée par l'interface électrode/électrolyte. Les temps de relaxation situés entre 4.10^{-5} s et $2,4.10^{-4}$ s sont donc dus à la présence acide carbonique.

Pour corriger les déviations observées, nous avons modélisé les spectres de conductivité et de permittivité avec le modèle de relaxation de Cole.

II.1.3.2.3. Analyse avec le modèle de Cole-Cole

Pour modéliser la relaxation de la conductivité selon le modèle de Cole-Cole, nous avons utilisé l'équation (39) en fixant les valeurs de permittivité diélectrique en hautes fréquences aux valeurs expérimentales. Pour modéliser la relaxation de la permittivité selon ce même modèle, nous avons appliqué les paramètres issus de la modélisation de la conductivité à la permittivité en utilisant l'équation (38). Nous n'avons pas effectué la méthode du moindre carré sur les deux paramètres expérimentaux simultanément car cette procédure ne permet pas d'obtenir des modélisations correctes de la conductivité.

Cette modélisation est représentée à la page suivante, sur la Figure 3- 16, en pointillé noir avec les spectres expérimentaux de la conductivité et de la permittivité.

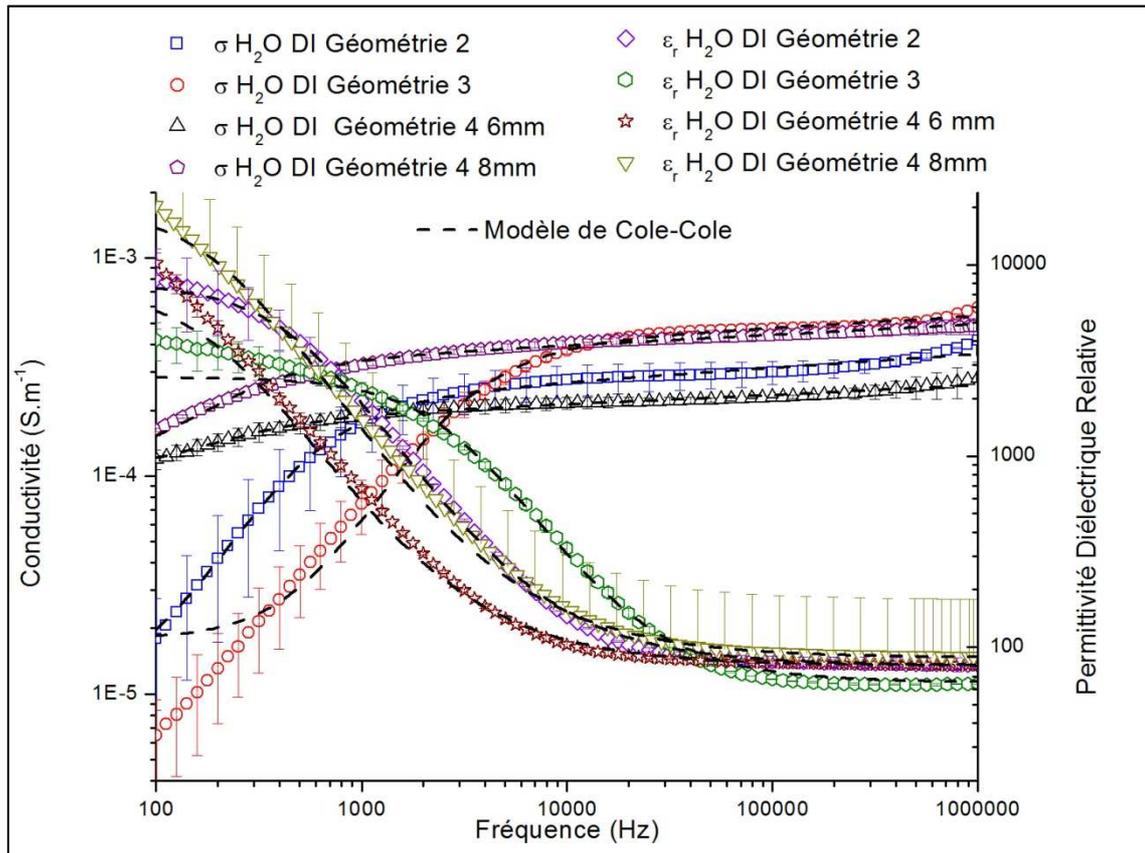


Figure 3- 16 : Mesures moyennées de l'évolution fréquentielle de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique de l'eau DI mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits. Modélisations effectuées avec le modèle de Cole-Cole.

Nous voyons que le modèle de Cole-Cole, de par sa prise en compte de la dispersion des temps de relaxation via le facteur de dispersion α (cf équation (36)), permet une modélisation plus fidèle des mesures.

A la page suivante, le Tableau 3- 9 regroupe les différents paramètres issus de la modélisation de la relaxation de Cole-Cole..

Nous y constatons que les temps de relaxation moyen issus du modèle de Cole-Cole se rapprochent des valeurs des temps de relaxation issu du modèle de Debye au 1^{er} ordre. Néanmoins la distribution continue des autres temps de relaxation (paramètre a) permet une meilleure modélisation des données expérimentales. Ce paramètre est très proche pour toutes les géométries d'électrodes.

Tableau 3- 9 : Paramètres de la modélisation du modèle de Cole-Cole sur les spectres de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique relative pour les différentes géométries d'électrodes.

	ϵ_{BF}	ϵ_{HF}	τ (s)	α	σ_{DC} (S.m ⁻¹)
Géométrie 2	8099,34902 ± 428,15062	82	3,29676.10 ⁻⁴ ± 1,59338.10 ⁻⁵	0,06509 ± 0,00195	8,08225.10 ⁻⁶ ± 1,79652.10 ⁻⁶
Géométrie 3	2585,07531 ± 77,09311	65	5,84562.10 ⁻⁵ ± 2,04796.10 ⁻⁷	0,05389 ± 0,00276	1,78639.10 ⁻⁵ ± 2,90692.10 ⁻⁶
Géométrie 4, 8mm	20679,75 ± 321,56439	88	8,11917.10 ⁻⁴ ± 9,23198.10 ⁻⁶	0,06452 ± 0,00119	1,09433.10 ⁻⁴ ± 1,68916.10 ⁻⁶
Géométrie 4, 6 mm	7817,56448 ± 1369,3463	80	8,50415.10 ⁻⁴ ± 1,08756.10 ⁻⁴	0,07832 ± 0,00375	1,04361.10 ⁻⁴ ± 6,288.10 ⁻⁶

Les permittivités diélectriques basse fréquence sont proches des valeurs expérimentales et les conductivités statiques sont également proches de celles obtenues avec le modèle de Debye au 1^{er} ordre.

La conductivité est ici mieux modélisée (notamment en H.F.) car le modèle de Cole-Cole correspond au circuit équivalent développé par Debye (chapitre 2, Figure 2-29) avec un CPE remplaçant l'élément résistif (3-31). Via le facteur α , le CPE offre un degré de liberté supplémentaire pour modéliser les comportements résistifs.

Le modèle de Cole Cole permet de définir des temps de relaxation moyen qui se rapproche de ceux obtenus avec le modèle de Debye au 1^{er} ordre. Ces temps de relaxation moyens correspondent environ ou sont légèrement inférieurs à la moyenne des temps de relaxation obtenus avec le modèle du 2nd ordre.

Il semble cependant assez trivial que les temps de relaxation moyens obtenus avec le modèle de Cole-Cole sont corrélés avec les temps de relaxation issus du modèle de Debye à plusieurs ordres d'une façon plus complexe que par la moyenne de ces temps.

Le modèle empirique de Cole-Cole permet d'obtenir des temps de relaxation moyen précis et de modéliser les spectres sur l'ensemble de la plage fréquentielle. Il ne permet cependant pas de décorréliser les différents temps de relaxation puisque d'après ce modèle ils se répartissent de façon continue selon une distribution gaussienne. Pour déterminer précisément les différents temps de relaxation, un modèle de Debye avec plusieurs ordres doit être utilisé.

II.1.4. Mesure de l'impédance de milieu cellulaire

Pour l'analyse de l'interaction CHO-Lactoferrine, nous avons analysé les cellules en culture *in-vitro* dans leur milieu cellulaire de base, le milieu F-12K avec 10% de sérum fœtal bovin. Nous avons donc caractérisé nos électrodes avec ce milieu cellulaire.

La figure suivante présente les spectres d'impédance de ce milieu obtenus avec les quatre géométries du dispositif à puits. Ces dispositifs possèdent tous des puits de 8 mm de diamètre. Les mesures ont été effectuées avec 110 μ l de milieu biologique et une tension de 10 mV.

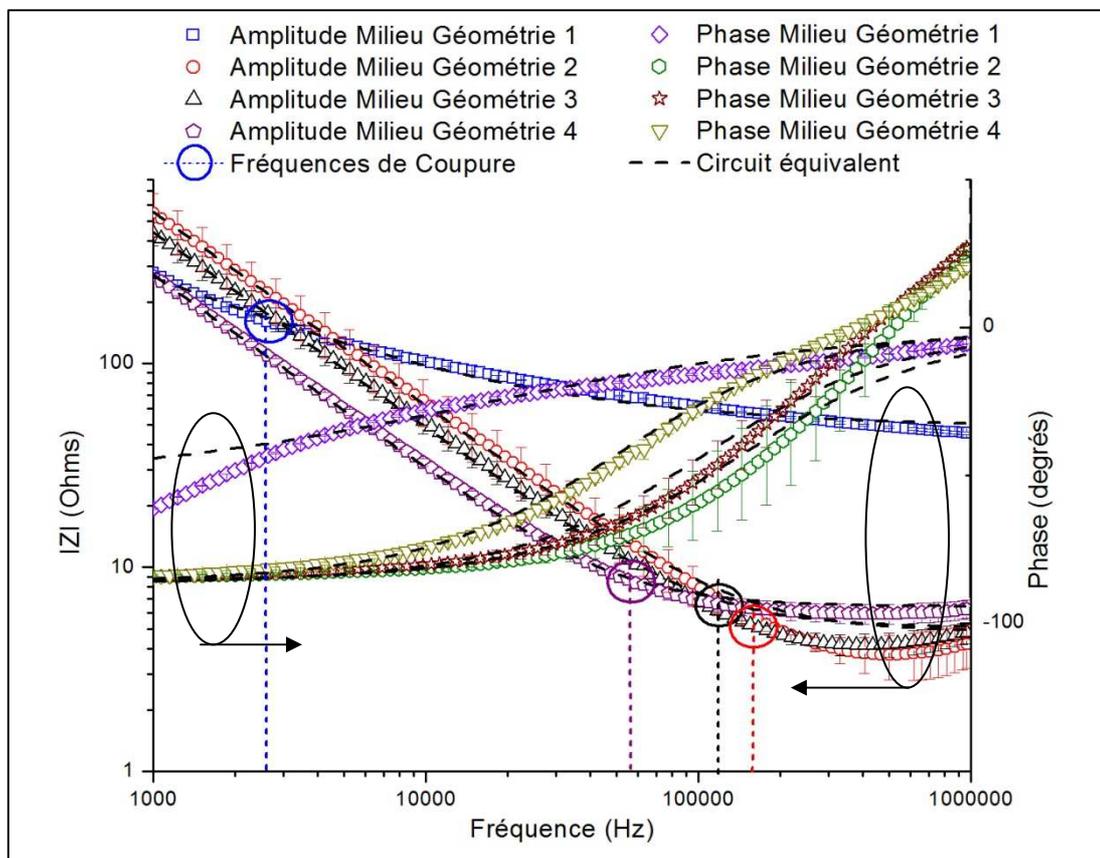


Figure 3- 17 : Mesures moyennées de l'impédance électrochimique du milieu F12-K mesurées avec les différentes géométries d'électrode du dispositif à puits.

On remarque que les diagrammes de Bode des géométries 2, 3 et 4 d'électrodes sont très proches. De façon générale, les spectres présentent une chute du module de l'impédance en $1/f$, comme une capacité, jusqu'à atteindre vers les 100 KHz un plateau résistif de faible

valeur. Ce plateau semble même évoluer vers un comportement inductif aux environs des 300-400 KHz puisque la phase passe d'environ -90° aux BF vers les valeurs positives en HF. Le premier puits (électrode millimétrique) présente une évolution fréquentielle plus singulière puisque à 1 MHz sa phase n'a pas encore atteint les valeurs positives et son évolution fréquentielle semble se faire de façon logarithmique au contraire des autres géométries (allures de faible exponentielle).

Ce comportement capacitif suivi d'un comportement résistif montre que ces spectres d'impédances peuvent être modélisés par une capacité et une résistance en série. En basses fréquences, les phases sont légèrement supérieures à -90° . Au lieu d'une capacité, nous avons donc utilisé un CPE. Ce circuit équivalent est représenté sur la figure suivante :

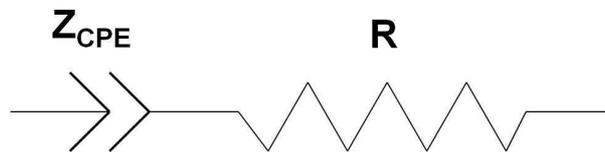


Figure 3- 18 : Circuit équivalent utilisé pour modéliser l'impédance du milieu cellulaire

Ce type de circuit consistant en une résistance en série avec un CPE a déjà été utilisé précédemment par Wegener et al. pour modéliser l'impédance électrochimique d'un milieu cellulaire (3-32).

Comme nous le constatons sur la Figure 3- 17, cette modélisation donne des résultats satisfaisants pour les géométries 2, 3 et 4, excepté pour le comportement inductif de la phase en H.F.. Pour la 1^{ère} géométrie, le modèle correspond aux données expérimentales excepté pour la phase en B.F..

L'utilisation de ce circuit équivalent montre que, dans la plage fréquentielle étudiée (1 KHz - 1 MHz), la conduction du PBS est tellement élevée que ses propriétés diélectriques n'apparaissent plus dans le spectre d'impédance. Le comportement capacitif apparaissant autour des 100 KHz pour l'eau est décalé vers les fréquences plus élevées pour le milieu cellulaire. Entre 1 KHz et 1 MHz, tout le courant passe donc uniquement par la voie résistive ($R_{éch}$) au travers de l'interface de double couche (Z_{CPE}).

Pour analyser ces mesures et comparer les différentes géométries, nous avons regroupé dans le tableau suivant les valeurs des paramètres de modélisation.

Tableau 3- 10 : Comparaison des paramètres de modélisation de l'impédance du milieu F12-K avec 10% de sérum fœtal bovin obtenue avec les différentes géométries.

	R (Ω)	K (S.s ⁿ)	n
Géométrie 1	47,99463 $\pm 0,5855$	$2,59691.10^{-5}$ $\pm 1,34204.10^{-6}$	0,58372 $\pm 0,00554$
Géométrie 2	4,80962 $\pm 0,15927$	$4,29935.10^{-7}$ $\pm 1,77478.10^{-8}$	0,95408 $\pm 0,00451$
Géométrie 3	5,05344 $\pm 0,16862$	$5,09371.10^{-7}$ $\pm 2,46824.10^{-8}$	0,96094 $\pm 0,00529$
Géométrie 4	6,40877 $\pm 0,13826$	$8,37331.10^{-7}$ $\pm 3,48271.10^{-8}$	0,95932 $\pm 0,00451$

Ces résultats de modélisation confirment que la conductivité du milieu est élevée.

A partir des valeurs de K et R, nous avons déterminé les fréquences de coupure en basse fréquence selon la formule (71) et les avons indiquées sur les spectres d'impédance du milieu cellulaire en pointillés courts.

Ces valeurs de fréquence de coupure sont regroupées dans le tableau suivant :

Tableau 3- 11 : Fréquences de coupure basse fréquence des spectres d'impédance du milieu F12-K déterminées à partir des paramètres de modélisation.

	F _{C_{BF}} (Hz)
Géométrie 1	255,388
Géométrie 2	153935
Géométrie 3	123660
Géométrie 4	59316,9

Excepté pour la 1^{ère} géométrie, les valeurs de K et R déterminent une fréquence de coupure en basse fréquence $f_{c_{BF}}$ très élevée. Cette fréquence de coupure décale le comportement capacitif issu des propriétés diélectrique du milieu en dehors de la plage de fréquences étudiée.

Les valeurs des résistances R des différentes géométries d'électrodes sont proches et sont du même ordre de grandeur que les résistances d'interconnexions (cf paragraphe I.5). Pour ne pas mesurer des phénomènes parasites, il vaut mieux donc étudier l'impédance du milieu cellulaire plus bas en fréquence, en considérant son comportement capacitif.

Pour la 1^{ère} géométrie, la valeur élevée de capacité de double couche diminue considérablement la fréquence de coupure en basse fréquence $f_{c_{BF}}$.

Néanmoins aucun comportement résistif n'apparaît sur le spectre, uniquement un comportement capacitif (avec un facteur de phase différent de 1).

Pour expliquer ce phénomène, nous pouvons supposer que la fréquence de coupure haute fréquence $f_{c_{HF}}$ est très proche de celle en basse fréquence, laissant ainsi apparaître un unique comportement capacitif « pseudo-continu ». Pour que $f_{c_{HF}}$ soit faible, il faut que la capacité issue du milieu soit élevée. Le milieu de culture contient des protéines, des particules chargées. La présence accrue de ces charges au sein de l'électrolyte augmente de façon importante la capacité du milieu ce qui pourrait expliquer pourquoi la $f_{c_{HF}}$ est faible et recouvre le comportement résistif du milieu pour la 1^{ère} géométrie d'électrode.

Nous avons donc vu que les différentes électrodes donnent des spectres d'impédance du milieu cellulaire très proches, excepté pour la géométrie 1. Le choix de la géométrie optimale doit donc se faire selon les résultats obtenus sur les cultures de cellules CHO. La forme des électrodes peut également avoir une influence sur l'adhésion et la culture cellulaire.

II.2. Influence du volume de liquide

Pour déterminer si nos systèmes d'électrodes intégrées au fond de puits nécessitent un volume optimal de liquide biologique pour effectuer correctement les mesures de leur impédance, nous avons étudié l'influence de ce volume en analysant différentes quantités d'eau DI (60, 80 et 100 μl) avec les électrodes rondes sub-millimétriques, un diamètre de puits de 6 mm et une tension de 10 mV.

Ces résultats sont présentés sur la Figure 3- 19.

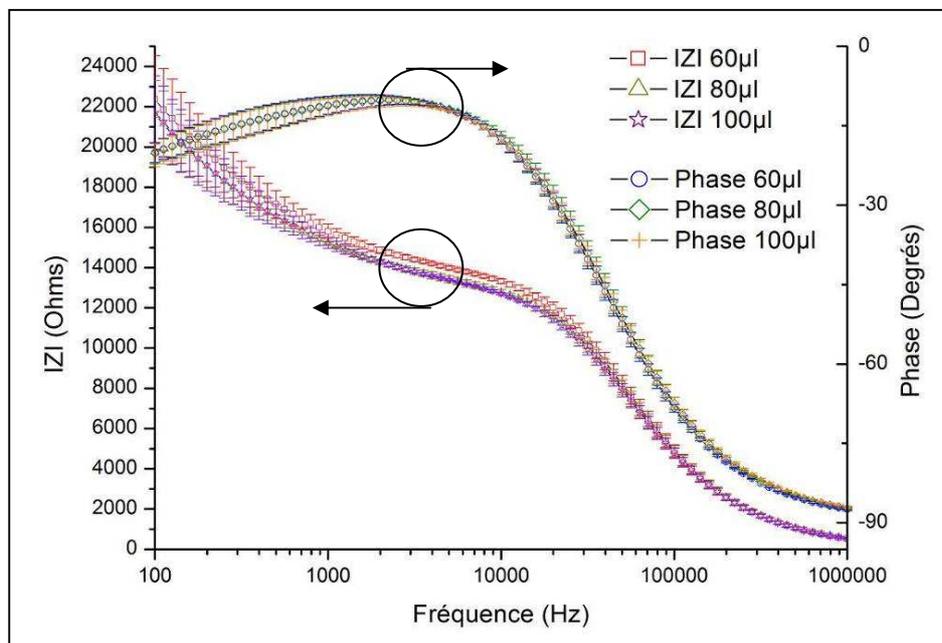


Figure 3- 19 : Mesures moyennées de l'impédance de différents volumes d'eau DI obtenues avec le dispositif à puits et ses électrodes sub-millimétriques rondes à une tension de 10mV.

Ces mesures montrent que le volume de liquide analysé n'a pas d'influence sur sa signature électrique.

D'après les travaux de Linderholm précédemment cités (3-20) et le Tableau 3- 3, ce résultat s'explique par le fait que le champ électrique émis par les électrodes planaires n'est pas influent à plus de 8 μm des électrodes. Les différences de hauteur de quelques millimètres causées par les variations de volume de liquide apparaissent trop loin des électrodes et n'ont donc pas d'influence sur l'impédance électrochimique du système. De façon triviale, l'expérience effectuée avec du milieu de culture donne des résultats similaires.

Au cours des mesures de caractérisation, nous avons remarqué que le système pouvait être très sensible. En effet, alors que les puits sont supposés être vidés de toute eau DI, nous avons mesuré des impédances présentant encore des comportements résistifs sur certaines plages de fréquences. Ces courants de conduction sont en fait provoqués par quelques microgouttes d'eau DI restant à la surface des électrodes.

Nous avons ainsi essayé de mesurer l'évaporation d'une goutte d'eau DI en temps réel par impédancemétrie. Pour cela 5 μl d'eau DI ont été déposés au fond d'un puits contenant des électrodes sub-millimétriques (Géométrie 4) et l'impédance du système a été enregistrée en continu, pendant l'évaporation de la goutte. Cette mesure est présentée sur la Figure 3- 20.

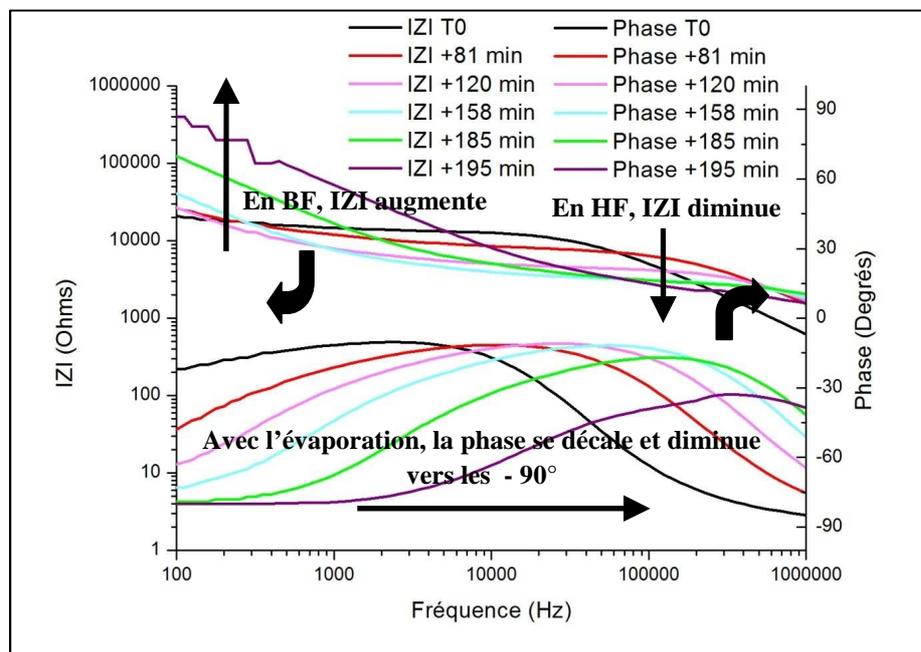


Figure 3- 20 : Mesure de l'évaporation d'une goutte d'eau DI par impédancemétrie avec le dispositif à puits et des électrodes sub-millimétriques rondes.

Nous voyons sur cette figure que, lors de l'évaporation, le module de l'impédance augmente en BF et diminue en HF et que la résistance disparaît doucement pour laisser place à une chute capacitive comme observée lors d'une mesure à vide. De même, la phase atteint les 90° en BF et la fréquence au minimum de phase se décale vers les H.F.. Ce minimum s'éloigne progressivement de zéro degré, valeur caractéristique d'un comportement résistif.

Nous mesurons donc ici l'évolution en temps réel de l'impédance de nos dispositifs d'un système électrochimique en partie résistif vers un système uniquement capacitif (mesure à vide).

II.3. Effet de la tension d'excitation

L'application de tensions plus élevées peut augmenter le rapport signal-bruit et donc améliorer la sensibilité du système de mesure. Avant d'utiliser nos micro-dispositifs à des tensions supérieures à 10 mV, nous avons d'abord voulu connaître l'influence de tensions plus élevées sur les impédances mesurées.

Nous avons donc mesuré l'impédance des différents milieux analysés en faisant varier la tension d'excitation.

La Figure 3- 21 présente les spectres d'impédance de 80 μ l d'eau DI obtenu avec les électrodes sub-millimétriques rondes, des puits de 6mm et des tensions de 10 mV, 140 mV et 500 mV.

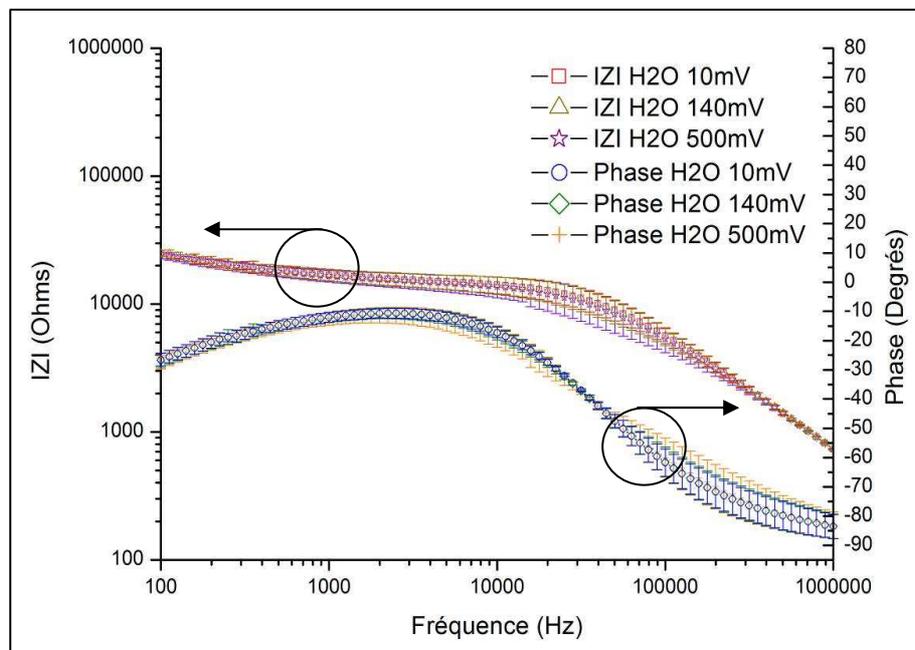


Figure 3- 21 : Mesures moyennées de l'impédance de 80 μ l d'eau DI obtenues avec le dispositif à puits et ses électrodes sub-millimétriques rondes (Géométrie 4) pour des tensions de 10, 140 et 500 mV.

Nous constatons que les différentes tensions n'influent pas sur la mesure d'impédance de l'eau DI.

L'expérience similaire effectuée avec du milieu de culture donne le même résultat.

Afin d'augmenter au maximum le rapport signal sur bruit, nous avons poussé l'amplitude des tensions d'excitation au-delà des 500 mV.

Nous avons ainsi constaté que les électrodes peuvent se court-circuiter sous l'effet d'une trop grande tension.

La Figure 3- 22 montre un exemple de ce court-circuitage progressif.

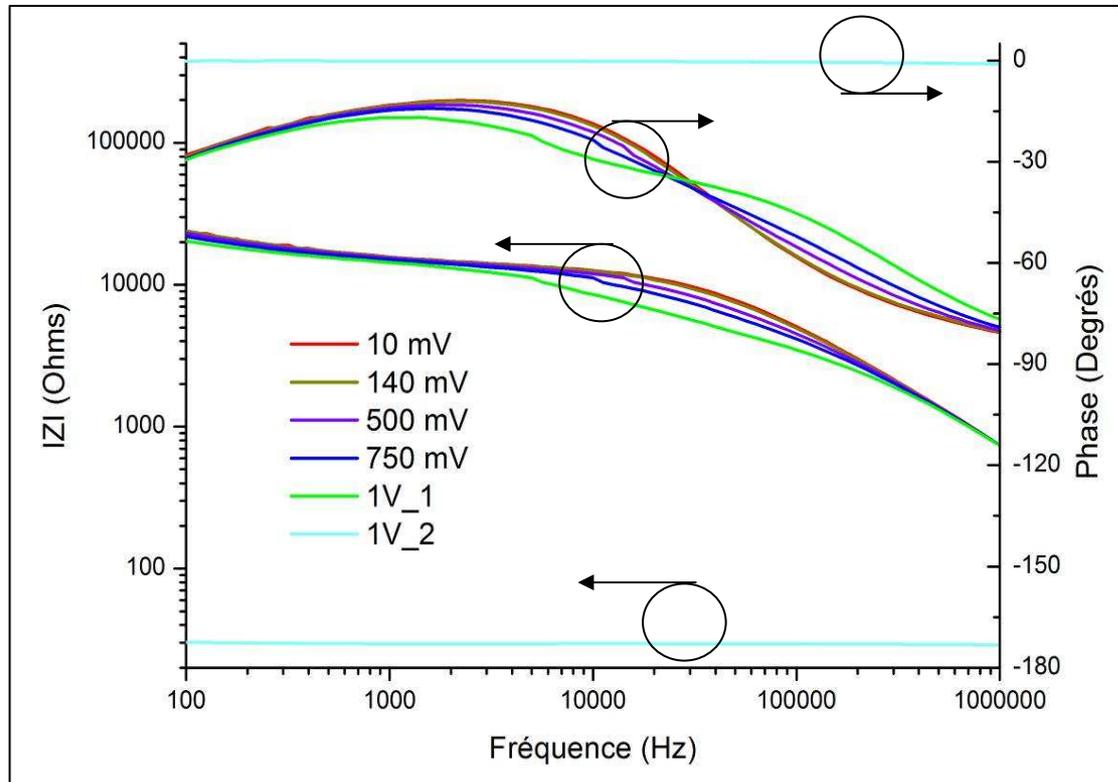


Figure 3- 22 : Exemple de court circuit provoqué par l'application de trop grandes tensions. Mesure effectuée sur 80 μ l d'eau DI avec le dispositif à puits et ses électrodes sub-millimétriques rondes à différentes tensions.

Nous voyons sur cette figure que les spectres du module de l'impédance et sa phase restent à peu près stable pour des tensions comprises entre 10 et 500mV. A 750 mV, les niveaux d'amplitude et de phase semblent avoir déjà nettement diminué par rapport aux basses tensions. La première mesure à 1 V montre un diagramme de Bode déformé alors que la deuxième montre le court-circuit du système (phase nulle et module de quelques Ohms).

Nous pouvons supposer que ce court-circuit est dû au claquage diélectrique de l'eau. Ce phénomène a été étudié de façon statique (3-33) ou transitoire (pulse de tension) (3-34) mais, à notre connaissance, les études sur le claquage de l'eau provoqué par des tensions alternatives sont inexistantes. Afin de garantir la pérennité de nos dispositifs et en même

temps la reproductibilité de nos mesures, nous avons donc décidé de ne pas dépasser les 500 mV d'amplitude pour la tension d'excitation.

La tension a également un effet sur les mesures à vide. Les mesures à vide sont effectuées sur un système capacitif, très isolant en basse fréquence. Aussi pour une faible tension, le courant mesuré par l'impédancemètre est très faible, diminuant le rapport signal sur bruit et provoquant des mesures apparemment bruitées.

La Figure 3- 23 illustre ce phénomène avec une mesure à vide effectuée sur les électrodes sub-millimétriques à une tension de 10 et 500 mV.

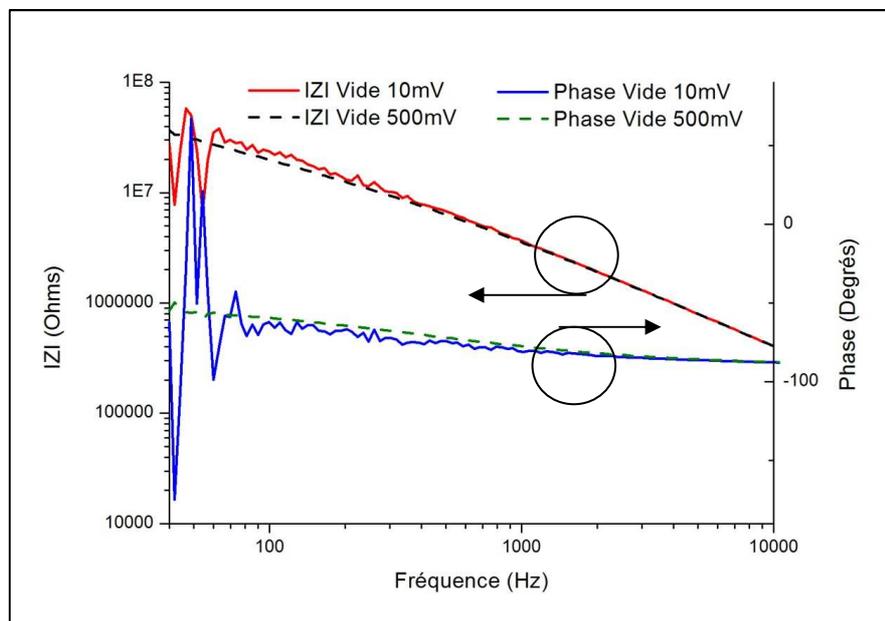


Figure 3- 23 : Exemple de mesure à vide effectuée avec des tensions d'excitation de 10 et 500 mV avec le dispositif à puits et ses électrodes sub-millimétriques rondes.

Le spectre de 500 mV présente des valeurs d'impédance stables, même en basse fréquence, car le courant généré par l'excitation en tension est important. Au contraire, le spectre obtenu à 10 mV est bruité car le courant généré par l'excitation en tension est trop faible et le rapport signal sur bruit devient ainsi également trop faible pour mesurer un signal non bruité.

III. Caractérisation du dispositif à microcanaux

Après avoir caractérisé le premier dispositif avec puits, nous avons caractérisé le dispositif microfluidique. Nous verrons que ce dispositif présente de nombreuses analogies avec le dispositif précédemment étudié.

Nous nous sommes ici uniquement intéressés aux mesures de différents liquides biologiques. Ces liquides biologiques ont été introduits dans les canaux à l'aide d'un pousse seringue à un débit de 10 $\mu\text{l}/\text{min}$. L'effet du volume n'a pas de sens puisque les canaux sont continuellement remplis de la même quantité de liquide. L'effet de la tension n'a pas été évalué puisque le dispositif est destiné à des mesures sur des cellules adhérentes nécessitant l'application de faibles tensions pour garder les cellules intactes.

L'effet du flux du liquide a été évalué. Aucune différences d'impédance n'apparaissent entre un flux d'eau DI stoppé ou circulant à 10 $\mu\text{l}/\text{min}$.

III.1. Mesure de l'impédance à vide

A la page suivante, la Figure 3- 24 présente les spectres d'impédance moyennés obtenus avec le système microfluidique à vide et une tension de 10 mV.

Les spectres sont ici tronqués car ils ont été mesurés avec l'impédancemètre 4192 qui ne peut mesurer des impédances de plus de 2 M Ω . Ils ont donc été prolongés selon la même pente (courbe circuit équivalent).

Comme pour le dispositif à puits, ces spectres d'impédance montrent les caractéristiques fréquentielles d'une capacité avec une décroissance du module d'impédance en $1/f$ et une phase à -90° .

En appliquant la même méthode qu'au paragraphe II.1.1 sur les mesures à vide des dispositifs à puits, nous avons calculé la capacité du système. Celle-ci est égale à 6 pF.

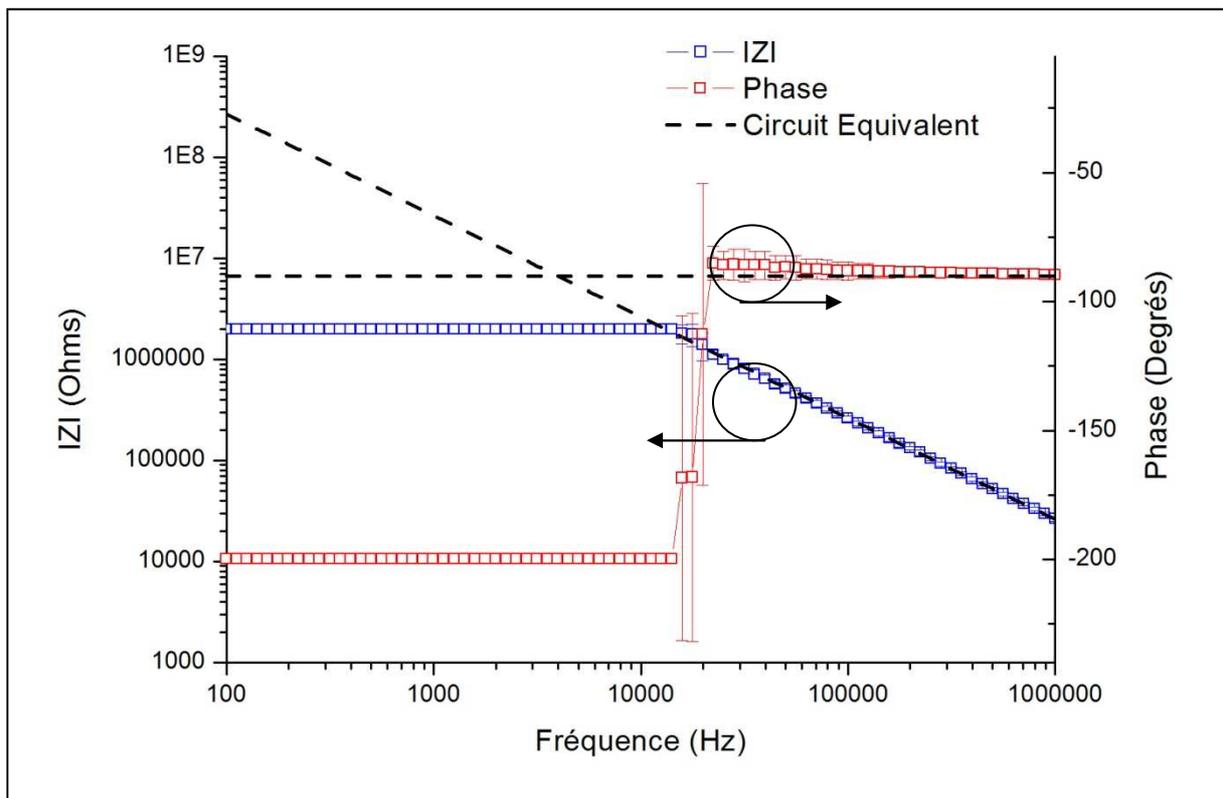


Figure 3- 24 : Mesures moyennées de l'impédance obtenue à vide avec le dispositif microfluidique

D'après la caractérisation des dispositifs à puits, nous savons que lorsque les électrodes sont exposées à l'air, le champ électrique se propage au travers du verre. Dans ces conditions, les électrodes sont en vis à vis sur les $\frac{3}{4}$ de leurs longueurs (voir chapitre 2, paragraphes I.2.2.1. et I.2.2.2.).

Au chapitre 2, paragraphe V.2., nous avons déterminé la constante de cellule du dispositif à microcanaux correspondante à cette situation, la constante de cellule κ_{L_1} : $\kappa_{L_1} = 14,8895 \text{ m}^{-1}$.

En utilisant cette valeur de facteur de cellule, d'après l'équation (16), la permittivité diélectrique relative correspondante à une capacité de 6 pF est égale à 10,08 ce qui correspond à la permittivité diélectrique du verre (3-12).

Ceci confirme que lorsque les électrodes sont exposées à l'air, le champ électrique se propage dans le verre.

III.2. Mesure de l'impédance de l'eau déionisée

La Figure 3- 25 présente les spectres d'impédance moyennés obtenus avec le système microfluidique dont les canaux ont été remplis avec de l'eau DI et une tension de 10 mV. Les composants du circuit équivalent électrique ont été déterminés à partir des mesures expérimentales par la formule (62) et la méthode des moindres carrés non-linéaires réalisée avec le logiciel Origin.

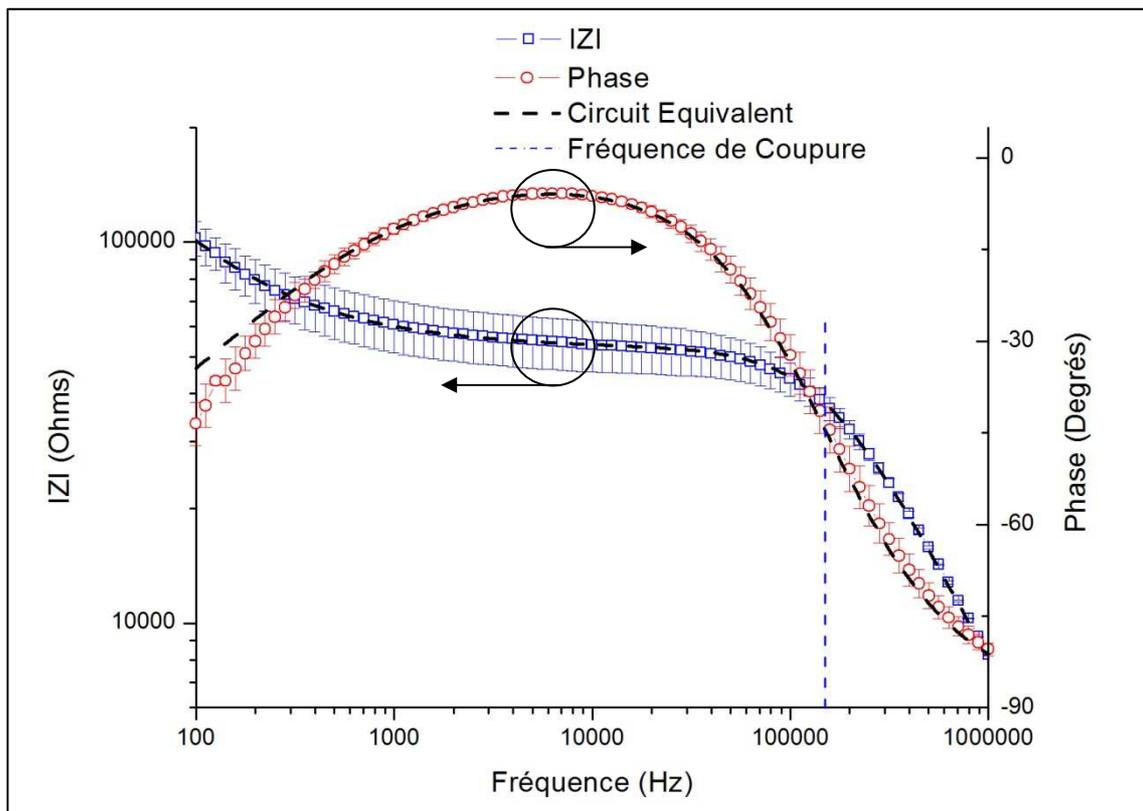


Figure 3- 25 : Mesures moyennées de l'impédance d'eau DI obtenues avec le dispositif microfluidique.

Nous remarquons que ce spectre est très proche de ceux obtenus avec le dispositif à puits avec deux phases capacitives et une résistive. Le comportement capacitif dû au phénomène de double couche en B.F. s'étale sur très faible plage fréquentielle. Le comportement résistif et le comportement capacitif en H.F. dû aux propriétés diélectriques de l'eau sont bien observables sur la plage fréquentielle étudiée.

Pour modéliser le spectre d'impédance, nous avons employé le circuit de modélisation précédemment utilisé (Figure 3- 3).

Les paramètres de modélisation obtenus sont :

- $C_{\text{diélec}} = 1,95691.10^{-11} \pm 9,15422.10^{-14} \text{ F}$
- $K = 1,86408.10^{-7} \pm 5,81457.10^{-9} \text{ S.s}^n$
- $n = 0,68521 \pm 0,00411$
- $R_{\text{éch}} = 52742,17596 \pm 82,61523 \ \Omega$.

Nous constatons sur le diagramme de Bode une bonne corrélation entre notre modèle et les données expérimentales sauf pour la phase en dessous de 300 Hz.

Nous constatons que la valeur de résistance est plus élevée et les valeurs de capacité en B.F. (K) et en H.F. ($C_{\text{diélec}}$) plus faibles que celles obtenues pour le dispositif à puits avec les électrodes micrométriques et sub-millimétriques.

Ceci s'explique par le fait que, pour un même électrolyte, comme le facteur de cellule du dispositif à microcanaux est plus élevé, la valeur de résistance mesurée est plus élevée et les valeurs de capacité plus faibles (cf relation (15) et (16)).

A partir de ces paramètres, nous avons calculé les fréquences de coupure basse fréquence et haute fréquence avec les formules (71) et (72): $F_{\text{C}_{\text{BF}}} = 32,38 \text{ Hz}$ et $F_{\text{C}_{\text{HF}}} = 154202,44 \text{ Hz}$.

La fréquence de coupure haute fréquence est indiquée en pointillés bleus sur le précédent spectre. Nous constatons que cette fréquence délimite bien le comportement résistif et le comportement capacitif haute fréquence de l'impédance.

III.3. Détermination des propriétés électriques de l'eau déionisée

III.3.1. Etude avec un circuit équivalent

III.3.1.1. Modélisation avec un circuit équivalent

Pour déterminer les propriétés électriques de l'eau DI à partir des mesures d'impédance du dispositif microfluidique, nous avons, comme pour le dispositif à puits, appliqué les relations (13) et (14) avec la constante de cellules déterminée au chapitre 2, paragraphe V.2., dans des conditions où les canaux sont remplis avec un liquide biologique. Pour rappel cette constante κ_{L2} est égale à 55.83578 m^{-1} .

En appliquant les relations (13) et (14) sur les données issues de la précédente modélisation de l'impédance, nous pouvons analyser ces spectres avec le circuit équivalent décrit au paragraphe I.2. Ce modèle est représenté en superposition des données expérimentales de relaxation sur la figure suivante

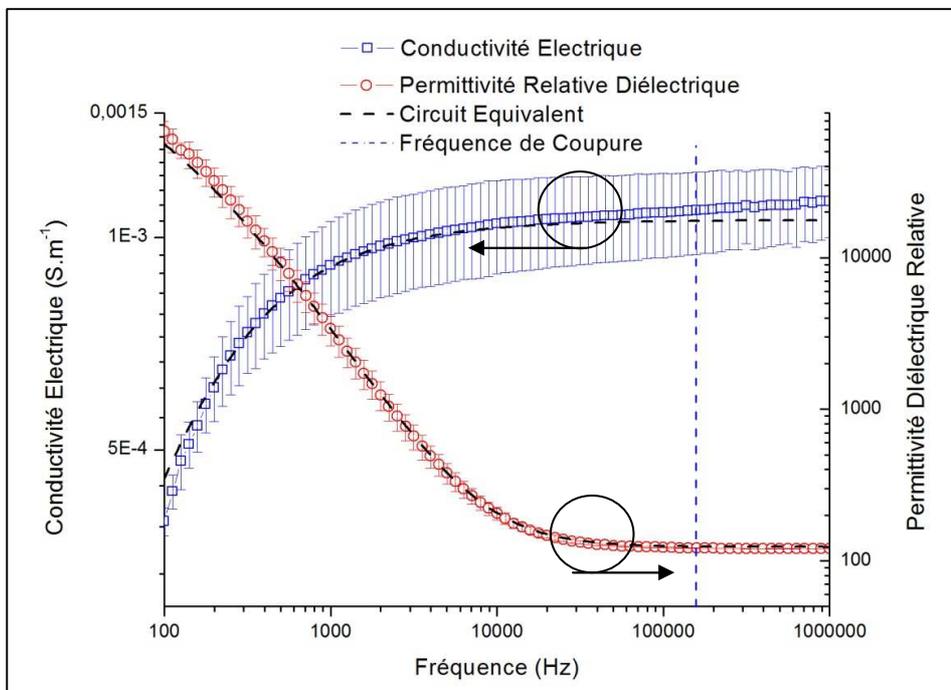


Figure 3- 26 : Evolutions fréquentielles de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique d'eau ionisée obtenues avec le dispositif microfluidique. Résultats présentés avec la modélisation issue du circuit équivalent électrique.

Nous voyons sur la précédente figure que les spectres de conductivité électrique et de permittivité diélectrique suivent bien le modèle de Debye (cf chapitre 2, paragraphe IV.4.).

En B.F., la permittivité diélectrique ne se stabilise pas et atteint une valeur élevée. En H.F., la permittivité atteint une valeur beaucoup plus faible et se stabilise en fréquence.

La conductivité augmente en basse fréquence pour atteindre une valeur quasi-constante dans les hautes fréquences, au dessus de 10 KHz.

Sur la Figure 3- 26, nous avons indiqué en pointillés bleus la fréquences de coupure précédemment déterminée. Comme pour le dispositif à puits, nous constatons que cette fréquence délimite environ le domaine fréquentiel où la permittivité diélectrique devient quasi-constante avec la fréquence, i.e. quand les comportements capacitifs issus des propriétés diélectriques de l'eau dominant l'impédance globale du système.

Nous avons déterminé les valeurs de permittivité diélectrique obtenue en basse fréquence, à 100 Hz (ϵ_{BF}) et en haute fréquence, à 1 MHz (ϵ_{HF}), ainsi que la valeur stabilisée de la conductivité électrique mesurée à 50 KHz (σ). Nous avons déterminé la conductivité à 50 KHz, comme pour le dispositif à puits.

- $\epsilon_{BF} = 51004$
- $\epsilon_{HF} = 120$
- $\sigma = 1.10^{-3} \text{ S.m}^{-1}$

Nous voyons que la valeur de permittivité diélectrique en haute fréquence est trop élevée, de même que la conductivité électrique. Bien que ces valeurs soient du bon ordre de grandeur, elles sont environ 50% trop élevées.

Comme l'allure des spectres correspond bien au modèle de relaxation de Debye, les valeurs erronées de ces paramètres sont dues à une mauvaise détermination de la constante de cellule et non pas aux mesures expérimentales. Cette erreur issue du facteur de cellule peut s'expliquer par l'approximation faite pour son calcul.

Pour calculer ce facteur, nous avons considéré que les électrodes sont en vis-à-vis d'une longueur correspondant à celle du canal en PDMS c'est-à-dire 400 μm (cf chapitre 2, paragraphe IV.2.2).

Seulement pour obtenir à partir des mesures d'impédance des valeurs de conductivité et de permittivité en haute fréquence correctes, d'après la formule (50), il faudrait que les électrodes soient en vis-à-vis sur une longueur de 600 μm au lieu de 400 μm .

Deux phénomènes peuvent expliquer cette longueur effective sur laquelle les électrodes seraient réellement en vis à vis :

- des pertes de courants via le couplage inter-électrode au travers du substrat de verre.
- des effets de bords aux limites du canal.

En effet sous le canal en PDMS large de 400 μm , les électrodes sont en vis-à-vis sur une longueur de 1500 μm (cf chapitre 2, paragraphe V.2., Figure 2-32).

Comme nous avons précédemment vu qu'une partie du champ électrique peut se propager dans le verre sous la forme de courant de déplacement, il se peut que, malgré la conductivité et la permittivité plus élevées de l'eau DI, une faible partie du courant se propage entre les électrodes en dehors du canal, au travers du verre.

De la même manière, l'eau DI contenue dans le canal peut interagir au travers du PDMS ou du verre avec la partie des électrodes proche du bord du canal.

Dans les deux cas, cette fuite de courant augmente la longueur effective sur laquelle les électrodes sont en vis-à-vis. C'est cette longueur effective qui devrait être prise en compte pour le calcul du facteur de cellule.

Pour empêcher les couplages inter-électrodes au travers du substrat, le verre pourrait être passivé avec un matériau possédant une constante diélectrique plus élevée.

Pour éviter les effets de bords, la partie des électrodes au dessus de laquelle le canal ne passe pas pourrait être également passivée. Seulement cette passivation compliquerait l'alignement du canal au dessus des électrodes.

III.3.1.2. Détermination des paramètres électriques à partir du circuit électrique équivalent

Comme pour les dispositifs à puits, nous avons comparé les valeurs de conductivité et de permittivité avec les valeurs déterminées à partir des différents composants du circuit électrique équivalent.

De la même manière, pour calculer σ , nous avons utilisé la relation (15) avec la valeur de κ_{L_2} et la valeur de $R_{\text{éch}}$. Pour calculer ϵ_{BF} , nous avons utilisé la relation (16) et cette même valeur de facteur de cellule en utilisant la valeur de K . Pour calculer ϵ_{HF} , nous avons fait de même avec la valeur de $C_{\text{diélec}}$.

Les paramètres électriques ainsi déterminés sont :

- $K \rightarrow \epsilon_{\text{BF}} : 1,17552 \cdot 10^6$
- $C_{\text{dl}} \rightarrow \epsilon_{\text{HF}} : 123,406$
- $R_{\text{int}} \rightarrow \sigma : 1,059 \cdot 10^{-3} \text{ (S.m}^{-1}\text{)}$

Comme pour le dispositif à puits, la modélisation de l'impédance avec le circuit équivalent permet d'obtenir des valeurs de conductivité électrique et de permittivité diélectrique en hautes fréquences proches de celles déterminées en traçant les spectres complets de ces paramètres. L'erreur issue du calcul du facteur de cellule se répercute encore une fois sur les valeurs de permittivité et de conductivité.

III.3.2. Modélisation avec la relaxation de Debye et de Cole-Cole

Comme pour les dispositifs à puits, nous avons déterminé quantitativement les paramètres des phénomènes de relaxation.

Pour ces modélisations, nous avons appliqué les mêmes méthodes que celles décrites au paragraphe II.1.3.2.. Les modélisations issues des différents modèle de relaxation sont représentées à la page suivante, sur la Figure 3- 27, en pointillé et en superposition des spectres expérimentaux de conductivité et de permittivité.

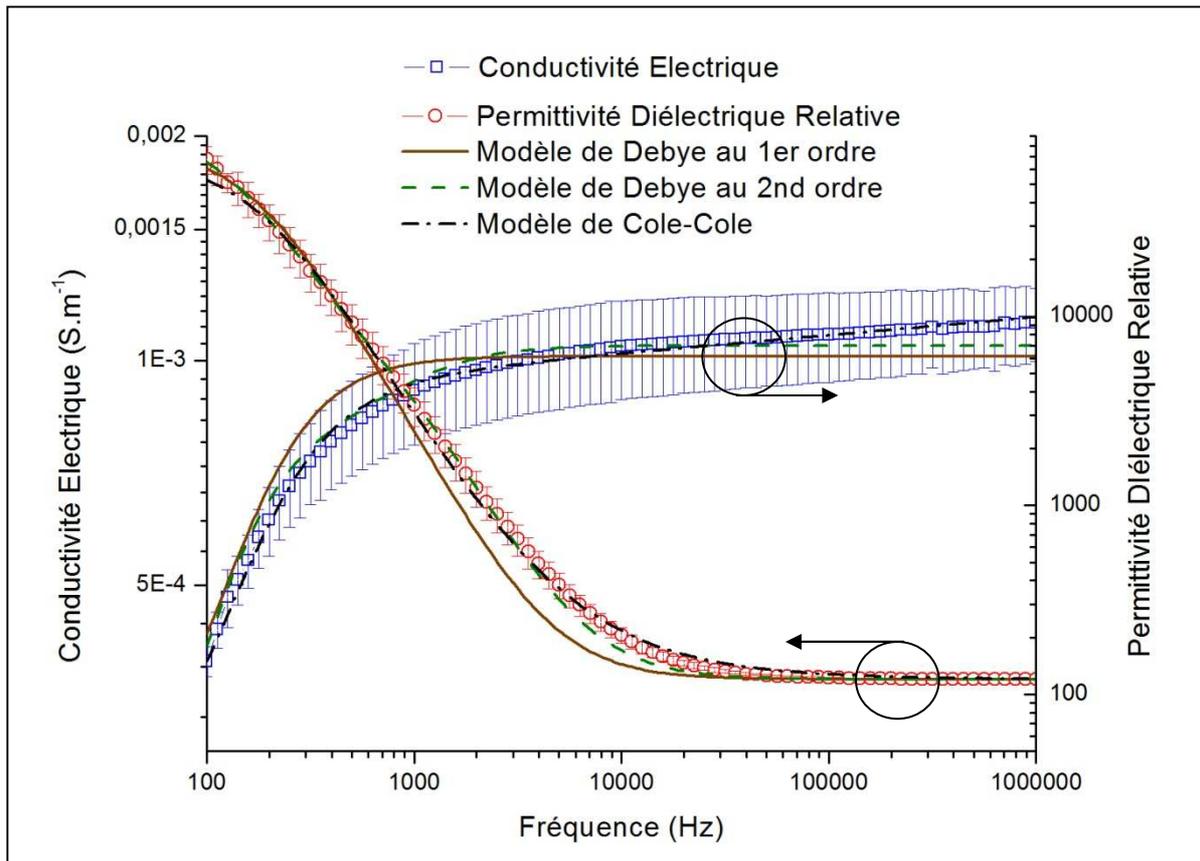


Figure 3- 27 : Evolutions fréquentielles de la conductivité électrique et de la permittivité diélectrique d'eau ionisée obtenues avec le dispositif microfluidique. Résultats présentés avec le modèle de relaxation de Debye au 1^{er} et au 2nd ordre et le modèle de Cole-Cole.

III.3.2.1.1. Analyse du modèle de Debye au 1^{er} ordre

Comme pour le dispositif à puits, le modèle de Debye au 1^{er} ordre suit l'allure des spectres mais présente une déviation quantitative notable avec les valeurs expérimentales de la conductivité et au niveau de la phase de la permittivité diélectrique relative.

Les différents paramètres issus de la modélisation au 1^{er} ordre de la relaxation de Debye sont :

- $\epsilon_{BF} = 80601,55075 \pm 1857,01567$
- $\epsilon_{HF} = 120$
- $\tau = 9,17054 \cdot 10^{-4} \text{ s} \pm 1,89254 \cdot 10^{-5}$
- $\sigma_{DC} = 2,36982 \cdot 10^{-4} \text{ S.m}^{-1} \pm 0,02054$

Le temps de relaxation mesuré est compris dans la même gamme que les temps de relaxation mesurés avec le dispositif à puits. Il se rapproche également de celui déterminé par Teschke et al. (3-28).

La conductivité statique se rapproche de celle mesurée avec les dispositifs à puits.

La permittivité diélectrique en basses fréquences est du même ordre de grandeur que celles mesurées avec les dispositifs à puits mais est plus élevée. La valeur issue du modèle au 1^{er} ordre se rapproche de celle déterminée expérimentalement.

Comme pour le dispositif à puits, le modèle de relaxation de Debye au 1^{er} ordre ne permet pas de décrire de manière suffisamment précise les données expérimentales.

III.3.2.1.2. Analyse du modèle de Debye au 2nd ordre

Nous voyons que la modélisation au 2nd ordre est très proche des spectres expérimentaux.

Les différents paramètres issus de la modélisation au 2nd ordre de la relaxation de Debye sont :

- $\epsilon_{BF} = 105587,38245 \pm 1555,54137$
- $\epsilon_{MF} = 4241,33133 \pm 252,56282$
- $\epsilon_{HF} = 120$
- $\tau_1 = 0,00128 \pm 2,02701.10^{-5}$
- $\tau_2 = 1,7187.10^{-4} \text{ s} \pm 7,12873.10^{-6}$
- $\sigma_{DC} = 1,08894.10^{-4} \text{ S.m}^{-1} \pm 5,06167.10^{-6}$

Les 1^{er} et 2^{ème} temps de relaxation sont respectivement compris dans les mêmes gammes que les 1^{er} et 2^{ème} temps de relaxation mesurés avec le dispositif à puits.

La permittivité diélectrique en basse fréquence est du même ordre de grandeur que celle issue du modèle au 1^{er} ordre.

La permittivité diélectrique en basse fréquence et celle aux moyennes fréquences sont respectivement du même ordre de grandeur que celles mesurées avec le dispositif à puits.

Comme pour le dispositif à puits, les bons résultats issus de cette modélisation au 2^{ème} ordre confirme la présence d'acide carbonique dans l'eau DI. Rappelons que τ_1 correspond au temps de relaxation de la double couche et τ_2 celui des molécules d'acide carbonique.

Les temps de relaxation ici obtenues correspondent bien à ceux précédemment déterminés avec le dispositif à puits.

III.3.2.1.3. Analyse du modèle de Cole-Cole

Comme pour le dispositif à puits, nous avons également modélisé les spectres avec le modèle de Cole-Cole.

Nous constatons sur les précédents spectres de conductivité et de permittivité que la modélisation de Cole-Cole est très proche des valeurs empiriques et donne les meilleurs résultats de modélisation.

Les différents paramètres issus de la modélisation de Cole-Cole :

- $\epsilon_{BF} = 70700 \pm 2668,62261$
- $\epsilon_{HF} = 120$
- $\tau = 8,93823.10^{-4} \pm 9,75405.10^{-6} \text{ s}$
- $\alpha = 0,03079 \pm 0,00113$
- $\sigma_{DC} = 2,33567.10^{-4} \pm 5,06167.10^{-6} \text{ S.m}^{-1}$

Comme pour le dispositif à puits, le temps de relaxation du dispositif à puits est proche du temps de relaxation issu du modèle de Debye au 1^{er} ordre. Le paramètre de dispersion a est du même ordre de grandeur que ceux obtenus pour le dispositif à puits mais légèrement plus faible. La permittivité diélectrique basse fréquence est proche de la valeur expérimentale et la conductivité statique est également proche de celle obtenue avec le modèle de Debye au 1^{er} ordre.

III.4. Mesure de l'impédance de milieu cellulaire

La Figure 3- 28 présente les spectres d'impédance moyennés obtenus avec le système microfluidique dont les canaux ont été remplis avec du milieu de culture des CHO, du milieu F-12K avec 10% de sérum fœtal bovin. La tension d'excitation a une amplitude de 10 mV.

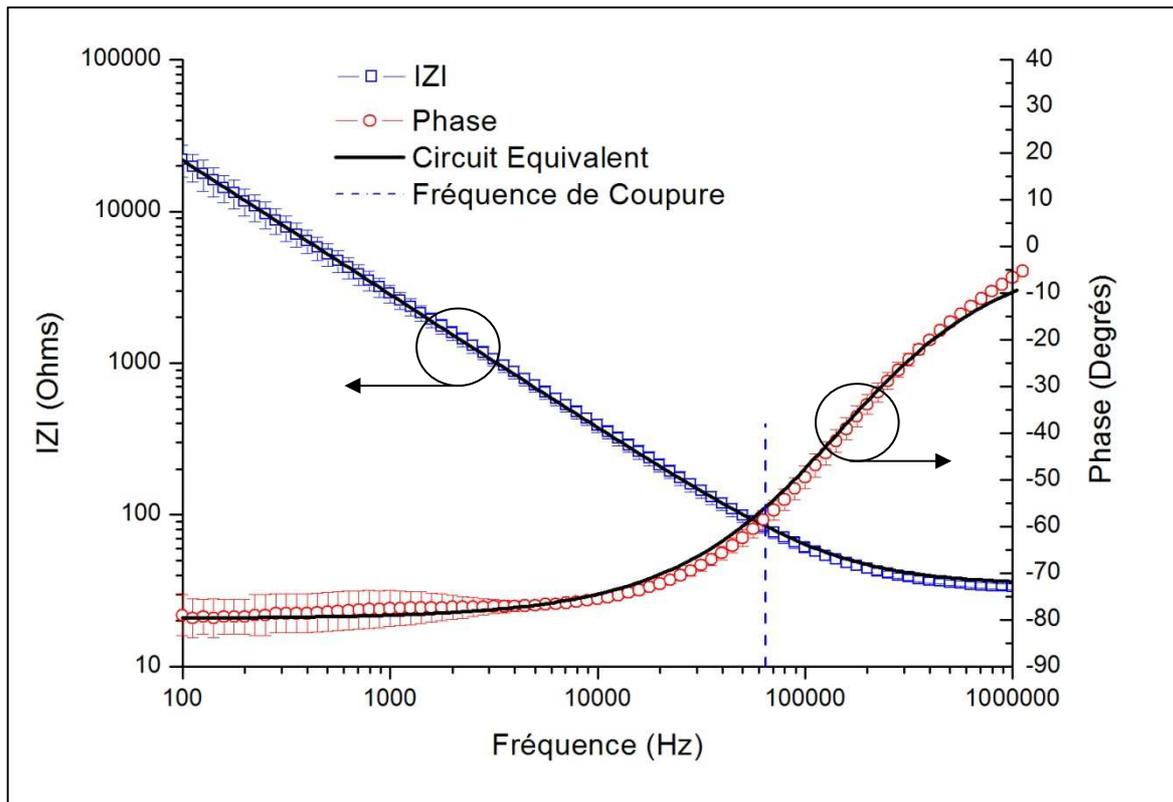


Figure 3- 28 : Mesures moyennées de l'impédance de milieu de culture des cellules CHO obtenues avec le dispositif microfluidique

Nous voyons que le spectre a la même allure que le spectre du milieu cellulaire mesuré avec le dispositif à puits : une chute capacitive et un plateau résistif.

Nous avons modélisé cette impédance avec le même modèle que les dispositifs à puits (cf Figure 3- 18), i.e. une résistance en série avec un élément à phase constant.

Voici les paramètres de ces composants : - $K = 1,53007 \cdot 10^{-7} \pm 1,16904 \cdot 10^{-9} \text{ S} \cdot \text{s}^n$

- $n = 0,88524 \pm 0,00111$

- $R = 34,66836 \pm 4,32594 \ \Omega$

Cette modélisation donne des résultats satisfaisants.

Comme pour le dispositif à puits, cette modélisation montre que la conduction du PBS est tellement élevée que ses propriétés diélectriques n'apparaissent plus dans le spectre d'impédance.

A partir des valeurs de K et R , nous avons déterminé la fréquence de coupure selon la formule (71) et l'avons représentée sur le spectre d'impédance du milieu cellulaire. Cette fréquence est égale à 60007,5 Hz. Comme pour le dispositif à puits, cette fréquence de coupure élevée décale le comportement capacitif issu des propriétés diélectrique du milieu en dehors de la plage de fréquences étudiée.

La valeur de résistances R est du même ordre de grandeur que les résistances d'interconnexions (cf paragraphe I.5). Comme pour le dispositif à puits, pour ne pas mesurer des phénomènes parasites, il vaut mieux donc étudier l'impédance du milieu cellulaire plus bas en fréquence, en considérant son comportement capacitif.

Conclusion du chapitre 3

Dans ce chapitre, nous avons présenté le circuit équivalent que nous avons utilisé pour modéliser nos mesures d'impédance électrochimiques. Ce circuit précédemment développé par Linderholm et Renaud (3-1) comprend un élément à phase constante pour modéliser le phénomène de double et une résistance et une capacité représentant respectivement les propriétés résistive et diélectriques de l'échantillon. Nous avons montré que pour les modélisations d'impédance électrochimique, le phénomène de double couche peut être décorrélé des propriétés diélectriques de l'échantillon. En se référant aux travaux de Timmer (3-2) et Hong (3-3), nous avons vu comment chacun de ces composants et donc chacune des caractéristiques électriques de l'échantillon déterminent précisément l'évolution fréquentielle de son impédance et les fréquences de coupure caractéristiques. Nous avons également montré que les interconnexions des dispositifs parasitent les mesures d'impédance au dessus de 1 MHz.

En caractérisant les dispositifs à puits avec différents milieux, nous avons montré que le champ électrique généré dans les dispositifs à vide se propage, non par l'air, mais par le verre. Les spectres d'impédance de l'eau DI et leur modélisation ont montré que les mesures obtenues avec nos bioMEMS suivent bien les propriétés électrochimiques mises en évidence dans des précédents travaux d'impédancemétrie (3-2,3-3). Nous avons ainsi vu que les géométries micrométriques sont les mieux adaptées pour les électrolytes de faible conductivité.

A partir des spectres de l'eau DI, nous avons déterminé l'évolution fréquentielle de sa conductivité et de sa permittivité diélectrique. Nous avons vu que ces évolutions suivent le modèle de relaxation décrit par Debye et les avons analysées avec le précédent circuit électrique équivalent. Nous avons ainsi vu que ce circuit équivalent permet de retrouver rapidement la conductivité électrique et la constante diélectrique de l'électrolyte. Les fréquences de coupures déterminées à partir des composants correspondent également à des fréquences de transition des relations de dispersions diélectriques.

Nous avons ensuite analysé ces spectres avec les modèles de Debye et de Cole-Cole. Le modèle de Debye au 1^{er} ordre ne permet pas de modéliser correctement les relations de

dispersion de la conductivité et de la permittivité. Le modèle au 2nd ordre apporte des modélisations satisfaisantes de ces relations et permet de déterminer les temps de relaxation causées par la double couche et ceux issues des molécules d'acide carbonique contaminant l'eau DI. Ce modèle dévie encore légèrement des mesures expérimentales. En considérant la dispersion des temps de relaxation, le modèle de Cole-Cole permet de modéliser l'ensemble des géométries sur toute la plage de fréquence étudiée et détermine la moyenne des différents de relaxation observés dans l'eau DI.

Les mesures d'impédance du milieu cellulaire ont montré que les propriétés conductrices de ce milieu sont tellement faibles que les propriétés diélectriques n'apparaissent pas dans la gamme de fréquence étudiée. En hautes fréquences, les propriétés conductrices du milieu cellulaire provoquent une impédance de faible valeur et du même ordre de grandeur que les résistances d'interconnexions. Pour les analyses électriques des CHO, il est donc préférable d'étudier les spectres d'impédances aux fréquences intermédiaires. Les différentes électrodes présentant des impédances du milieu cellulaire proches, le choix de la géométrie la mieux adaptée à l'étude des CHO doit se faire selon les résultats obtenus sur la culture cellulaire.

Nous avons également montré que le volume de liquide n'influence pas la mesure de son impédance. L'impédancemétrie permet cependant de suivre en continu l'évaporation d'une goutte au fond des puits.

Nous avons analysé l'effet de la tension d'excitation sur les mesures d'impédance. En dessous d'une amplitude de 500 mV, la tension n'a aucun effet, au dessus les électrodes se dégradent progressivement. A une amplitude de 1 V, les électrodes se court-circuitent. Nous supposons que ce court-circuitage est dû au claquage diélectrique de l'eau.

Nous avons ensuite caractérisé de la même manière le dispositif microfluidique. L'étude de l'influence du volume n'a pas de sens puisque les canaux sont continuellement remplis. L'étude de la tension ne peut s'appliquer car ces bioMEMS sont dédiés à l'étude de cellules adhérentes qui nécessitent l'application de faibles tensions. Nous avons mesuré l'impédance de différents milieux. Comme pour le dispositif à puits, les mesures à vide montrent que le champ électrique se propage dans le verre. Les mesures d'eau DI montrent les mêmes caractéristiques que celles issues du dispositif à puits. Ces mesures permettent également de déterminer les spectres de conductivité et de permittivité diélectrique de l'eau DI. L'analyse de ces spectres effectuée avec le circuit équivalent électrique, les modèles de relaxation de

Debye au 1^{er} et au 2nd ordre et le modèle de Cole-Cole permet de déterminer les mêmes caractéristiques et les mêmes temps de relaxation que l'étude réalisée avec les dispositifs à puits. De la même manière, les mesures d'impédance du milieu cellulaire montrent que la conductivité élevée du milieu nécessite d'étudier les CHO aux fréquences intermédiaires.

Références du chapitre 3

- 3-1. Linderholm P, Bertsch A, Renaud P. Resistivity probing of multi-layered tissue phantoms using microelectrodes. *Physiol Meas.* 2004 Jun;25(3):645-658.
- 3-2. Timmer B, Sparreboom W, Olthuis W, Bergveld P, Berg AVD. Optimization of an electrolyte conductivity detector for measuring low ion concentrations. *Lab Chip.* 2002;2(2):121-124.
- 3-3. Hong J, Yoon DS, Kim SK, Kim TS, Kim S, Pak EY, et al. AC frequency characteristics of coplanar impedance sensors as design parameters. *Lab Chip.* 2005;5(3):270-279.
- 3-4. J.E. Randles. "Kinetics of rapid electrode reactions." *Discuss. Faraday Soc.* 1 (1947) 11.
- 3-5. Long Y, Li C, Kraatz H, Lee JS. AC Impedance Spectroscopy of Native DNA and M-DNA. *Biophysical Journal.* 2003 Mai;84(5):3218-3225.
- 3-6. Peng H, Soeller C, Vigar NA, Caprio V, Travas-Sejdic J. Label-free detection of DNA hybridization based on a novel functionalized conducting polymer. *Biosensors and Bioelectronics.* 2007 Avr 15;22(9-10):1868-1873.
- 3-7. Yang L, Li Y. AFM and impedance spectroscopy characterization of the immobilization of antibodies on indium-tin oxide electrode through self-assembled monolayer of epoxysilane and their capture of *Escherichia coli* O157:H7. *Biosensors and Bioelectronics.* 2005 Jan 15;20(7):1407-1416.
- 3-8. Geddes L. Historical evolution of circuit models for the electrode-electrolyte interface. *Annals of Biomedical Engineering.* 1997 Fév;25(1):1-14.
- 3-9. Bisquert J, Compte A. Theory of the electrochemical impedance of anomalous diffusion. *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2001 Fév 23;499(1):112-120.
- 3-10. Olthuis W, Streekstra W, Bergveld P. Theoretical and experimental determination of cell constants of planar-interdigitated electrolyte conductivity sensors. *Sensors and Actuators B: Chemical.* 1995 Mar;24(1-3):252-256.
- 3-11. Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A, Stegbauer K, Wolf B. Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosensors and Bioelectronics.* 1997;12(1):29-41.
- 3-12. Dielectric Constants of Materials (2007). Clipper Controls. [Internet]. Available from: <https://www.clippercontrols.com/pages/dielectric-constant-values>
- 3-13. MEMS and Nanotechnology Clearinghouse. Material: Glass (SiO₂), bulk. <http://www.memsnet.org/material/glasssi2bulk/>.
- 3-14. Retalis D, Pitta A, Psallidas P. The conductivity of the air and other electrical parameters in relation to meteorological elements and air pollution in Athens. *Meteorology and Atmospheric Physics.* 1991;46(3):197-204.

- 3-15. Kuo ACM. *Polymer Data Handbook*. Oxford University Press; 1999.
- 3-16. PDMS Material Property DataBase [Internet]. Available from: <http://web.mit.edu/6.777/www/matprops/pdms.htm>
- 3-17. Morgan H, Green N. *AC Electrokinetics: Colloids and Nanoparticles*. Research Studies Press; 2002.
- 3-18. Gardeshzadeh AR, Raissi B, Marzbanrad E. Electrophoretic deposition of SnO₂ nanoparticles using low frequency AC electric fields. *Materials Letters*. 2008 Avr 15;62(10-11):1697-1699.
- 3-19. Lin C, White RE, Ploehn HJ. Modeling the Effects of Ion Association on Alternating Current Impedance of Solid Polymer Electrolytes. *J. Electrochem. Soc.* 2002 Juillet 0;149(7):E242-E251.
- 3-20. Olof Pontus Linderholm. "Two-dimensional microimpedance imaging for cell culture monitoring". Thèse EPFL, no 3604 (2006). Dir.: Philippe Renaud.
- 3-21. Batalioto F, Duarte AR, Barbero G, Neto AMF. Dielectric dispersion of water in the frequency range from 10 mHz to 30 MHz. *J Phys Chem B*. 2010 Mar 18;114(10):3467-3471.
- 3-22. Grimnes S, Martinsen OG. *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*. 1er éd. Academic Press; 2000.
- 3-23. Grasso F, Musumeci F, Triglia A. Impedance spectroscopy of pure water in the 0.01 Hz to 100 kHz range. *Il Nuovo Cimento D*. 1990;12(8):1117-1130.
- 3-24. Prodan C. Low-frequency, low-field dielectric spectroscopy of living cell suspensions. *J. Appl. Phys.* 2004;95(7):3754.
- 3-25. Buchner R, Barthel J, Stauber J. The dielectric relaxation of water between 0°C and 35°C. *Chemical Physics Letters*. 1999 Juin 4;306(1-2):57-63.
- 3-26. <http://www.elgalabwater.com/water-quality-en.html>.
- 3-27. Yang L, Li Y, Erf GF. Interdigitated Array microelectrode-based electrochemical impedance immunosensor for detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Anal. Chem.* 2004 Fév 15;76(4):1107-1113.
- 3-28. Teschke O, de Souza EF, Ceotto G. Double Layer Relaxation Measurements Using Atomic Force Microscopy. *Langmuir*. 1999;15(15):4935-4939.
- 3-29. Linderholm P, Renaud P. Comment on "AC frequency characteristics of coplanar impedance sensors as design parameters" by Jongin Hong, Dae Sung Yoon, Sung Kwan Kim, Tae Song Kim, Sanghyo Kim, Eugene Y. Pak and Kwangsoo No, *Lab Chip*, 2005, 5, 270. *Lab Chip*. 2005 Déc;5(12):1416-1417; author reply 1418.
- 3-30. Carrique F, Ruiz-Reina E. Effects of water dissociation and CO₂ contamination on the

- electrophoretic mobility of a spherical particle in aqueous salt-free concentrated suspensions. *J Phys Chem B*. 2009 Jun 25;113(25):8613-8625.
- 3-31. Cole KS, Cole RH. Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics. *J. Chem. Phys.* 1941;9(4):341.
- 3-32. Wegener J, Zink S, Rösen P, Galla H. Use of electrochemical impedance measurements to monitor β -adrenergic stimulation of bovine aortic endothelial cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1999 Avr 7;437(6):925-934.
- 3-33. Szklarczyk M, Kainthla RC, Bockris JO. On the Dielectric Breakdown of Water: An Electrochemical Approach. *J. Electrochem. Soc.* 1989;136(9):2512-2521.
- 3-34. Jones H, Kunhardt E. The Influence of Pressure and Conductivity on the Pulsed Breakdown of Water. *Ieee Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation*. 1994 Déc;1(6):1016-1025.

Chapitre 4:
BioMEMS pour l'analyse du parasite
***C. parvum* par impédancemétrie**

Ce chapitre présente les travaux d'impédancemétrie effectués avec les bioMEMS décrits au second chapitre pour l'analyse du parasite *C. parvum*.

Nous décrivons d'abord les enjeux de la détection de ce parasite pour les problèmes mondiaux d'accès à l'eau potable, l'infection qu'il provoque et les moyens actuels et émergents de sa détection. Nous détaillons ensuite les tests effectués pour mettre au point un protocole de préparation et d'analyse des *C. parvum* nous permettant d'obtenir des mesures d'impédance stables et reproductibles. Nous étudions l'effet du milieu de suspension sur la signature électrique des parasites. Nous présentons également une méthode impédimétrique pour déterminer la concentration de *C. parvum* suspendus dans de l'H₂O ppi. Nous nous intéressons enfin à la discrimination électrique de la viabilité des parasites.

I. *Cryptosporidium parvum* : un problème de santé publique

I.1. Problème mondial d'accès à l'eau potable

Aujourd'hui, les problèmes écologiques liés au réchauffement climatique prévu par les scientifiques du groupe d'experts intergouvernemental sur l'évolution du climat (GIEC) laisse envisager le pire sur l'accès aux ressources vitales que sont l'eau et la nourriture (4-1). Il prévoit que 3,2 milliards d'humains seront exposés à des pénuries d'eau sévères en raison des sécheresses, de la dégradation et de la salinisation des sols.

Actuellement déjà, un rapport récent des Nations Unies (4-2) fait état de 1,1 milliard de personnes qui n'ont pas accès à de l'eau potable et de 2,6 milliards qui n'ont pas accès à de l'eau leur permettant de vivre dans des conditions sanitaires correctes. Ces chiffres correspondent respectivement à 17% et 40% de la population mondiale. Ces problèmes d'accès à l'eau potable et de conditions sanitaires correctes entraînent une augmentation du taux de mortalité, notamment chez la population infantile. Toujours en lien avec cette situation critique, le rapport mentionne également la mort de 1,6 millions d'enfants chaque année à cause de graves diarrhées.

Ces chiffres et prévisions rendent chaque source d'eau vitale. Dans les pays du tiers-monde, une des principales causes de la non potabilité de l'eau issue de sources naturelles est la présence de parasites infectieux. Ces mêmes parasites sont en effet, dans la majeure partie des cas, la cause des diarrhées infantiles mortelles précédemment mentionnées (3-2). Ce genre d'infection touchant particulièrement les pays pauvres, il devient important de développer des techniques de détection et de désinfection pratiques et à faible coût. L'accès à des sources d'eau potable dans les pays du tiers monde pourrait être grandement facilité par la détection rapide de ces parasites avec des techniques simples et peu coûteuses.

Les pays développés ne sont pas épargnés même s'ils sont moins exposés. Pour exemple, la ville de Milwaukee, dans l'état du Wisconsin aux U.S.A., a connu en 1993 une grave épidémie de contamination parasitaire avec 400 000 personnes touchées par de sévères diarrhées et 69 morts (4-3). Cette épidémie montre que les technologies actuellement

employées pour la désinfection de l'eau sont perfectibles non seulement concernant leur coût mais aussi leur sensibilité (4-4).

I.2. Infection due au parasite *Cryptosporidium parvum*

Le *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) est un de ces parasites infectieux contaminants de nombreuses sources d'eau, les rendant non potables. Ce parasite cause la cryptosporidiose chez l'humain et l'animal, une sévère diarrhée dont les symptômes principaux sont de violentes crampes d'estomac, de fortes nausées, de graves diarrhées, de la déshydratation, une importante fièvre et une perte de poids (4-5).

Chez les personnes au système immunitaire affaibli, comme les personnes séropositives ou les jeunes enfants, la cryptosporidiose peut même être mortelle (4-6). Ce parasite est aussi présent dans les pays développés : l'exemple précédemment cité de Milwaukee concerne une épidémie de cryptosporidiose. Depuis vingt ans, le parasite est même reconnu comme la première cause d'infection due à l'eau aux U.S.A. (4-5). Enfin, aucun traitement spécifique ne permet de traiter cette infection. Seuls les symptômes de diarrhée peuvent être traités avec les médicaments adéquats. Le seul moyen de se prévenir de la cryptosporidiose est donc une détection du parasite en amont.

Le parasite *C. parvum* est un protozoaire (eucaryote unicellulaire se nourrissant de constituants organiques par phagocytose), un parasite qui est infectieux sous sa forme d'oocyste. L'oocyste est une entité biologique de 5 μm de diamètre possédant une coquille épaisse permettant au *C. parvum* de contaminer l'eau et de rester actif pendant de nombreux mois sans avoir trouvé d'hôte. Une fois l'oocyste ingéré, il libère quatre sporozoïtes qui infecteront les cellules épithéliales de l'intestin causant ainsi la diarrhée (Figure 4- 1).

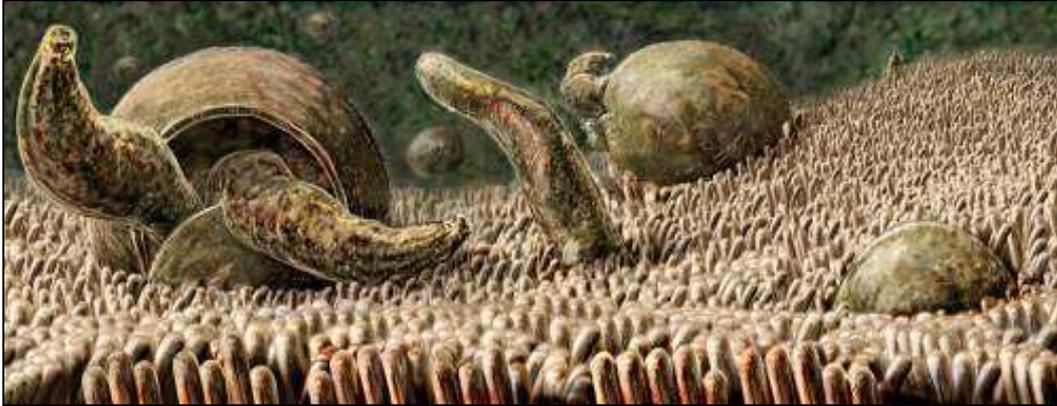


Figure 4- 1 : Illustration d'ocystes de *C. parvum* libérant leurs sporozoïtes dans l'intestin.

Habituellement, l'ingestion d'une centaine de parasites peut provoquer la cryptosporidiose (4-7) mais la maladie peut aussi être causée par seulement quelques ocystes issus de souches particulièrement virulentes (4-8).

La période d'incubation de l'infection est de deux à dix jours. La maladie dure de une à deux semaines chez les patients au système immunitaire sain.

I.3. Méthodes de détection actuelles du parasite *C. parvum*

La procédure de détection du parasite *C. parvum* est précisément décrite par l'Agence de Protection Environnementale des U.S.A. (l'E.P.A.) et est désignée par la méthode 1622 (4-9). C'est la méthode référence suivie par les différents centres de surveillance de la qualité de l'eau à travers le monde. La méthode 1623 décrit une procédure très proche pour détecter également le *Giardia muris*, un autre parasite infectant l'eau (4-10).

Avant que toute détection du parasite soit possible, il est impératif de filtrer des volumes importants d'eau (plusieurs dizaines de litres) pour pouvoir récupérer un nombre significatif de parasites *C. parvum*. En effet les concentrations réelles d'ocystes de *C. parvum* sont d'environ 10 ocystes/L voire moins (4-11). Une fois l'eau filtrée, la solution analysée est centrifugée pour faire sédimenter les parasites et retirer le surnageant.

Les parasites sont ensuite capturés à l'aide d'une séparation immuno-magnétique (IMS). Cette méthode consiste à utiliser des billes magnétiques sur lesquelles sont attachées des anticorps anti-*C.parvum*. Ces anticorps sont capables de se fixer aux antigènes présents à la surface des oocystes pour que ceux-ci soient capturés par les billes magnétiques. Les complexes parasites-billes sont ensuite récupérés à l'aide d'un aimant.

Après leur capture, les parasites sont séparés des billes magnétiques pour être marqués avec des anticorps fluorescents et colorés au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI).

Le marquage fluorescent va permettre de compter automatiquement les parasites à l'aide d'un cytomètre en flux (cf lexique).

Si le comptage est effectué manuellement avec une chambre de comptage (cellule de malassez ou hémocytomètre), une lame avec puits ou une membrane filtrante, le marquage permettra d'effectuer ce comptage à l'aide d'observations au microscope à fluorescence et à contraste interférentiel différentiel (méthode Nomarski). Ces différentes étapes de détection sont résumées et schématisées sur la Figure 4- 2 .

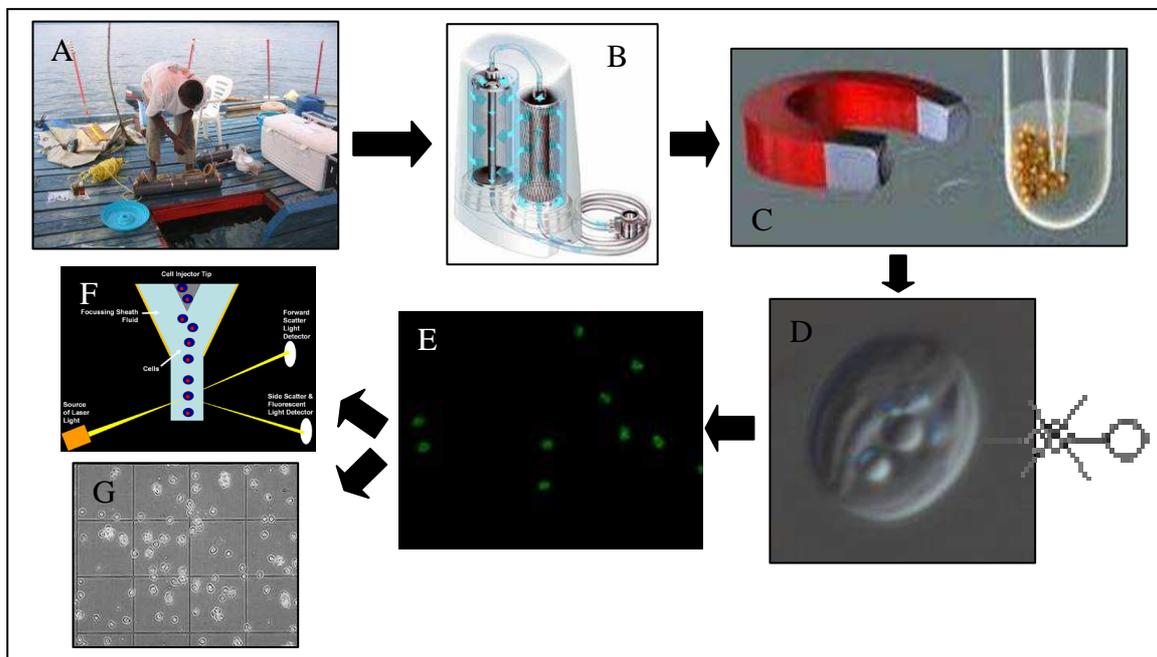


Figure 4- 2 : Schéma de la procédure actuelle de détection des parasites *C. parvum*, A : Echantillonnage ; B : Filtration, C : Séparation immuno-magnétique, D : Séparation des billes aux parasites ; E : Marquage par fluorescence (FITC) et DAPI ; F : Comptage automatique par cytométrie en flux ; G : Comptage manuel avec cellule de Malassez.

Cette méthode reste complexe et lourde. Le comptage est une étape qui pourrait être particulièrement améliorée.

En effet s'il est effectué de façon automatique, il requiert l'utilisation d'un cytomètre en flux. Comme les parasites sont des cellules infectieuses nécessitant des précautions de manipulation et des installations de sécurité de 2^e niveau, il faut que ce cytomètre soit exclusivement dédié au comptage de ces parasites ou qu'il soit précautionneusement désinfecté avant de pouvoir être utilisé pour une autre application. Son usage dédié est particulièrement coûteux puisque un cytomètre en flux est un appareil de laboratoire extrêmement cher. Le réserver exclusivement pour la détection de parasite est donc un luxe que peu de laboratoires peuvent se permettre, encore moins ceux de pays en développement. Son nettoyage requiert lui beaucoup de précautions pour ne pas risquer la contamination des prochains échantillons analysés et une immobilisation de la machine sur plusieurs jours. D'un autre côté, le comptage manuel est une technique fastidieuse qui réclame beaucoup de temps d'analyse et une expertise élevée.

Nous voyons donc que le comptage, qu'il soit effectué automatiquement ou manuellement, mérite d'être amélioré pour faciliter la procédure globale de détection du parasite et de désinfection de l'eau.

I.4. Méthodes innovantes et émergentes de détection

Avec les problèmes mondiaux d'accès à l'eau potable précédemment évoqués, des travaux d'ingénierie biomédicale se sont intéressés à développer de nouvelles méthodes de détection du parasite.

Parmi ces études, nous pouvons citer les travaux de Kang et al. qui ont utilisé les techniques optiques en adaptant un SPR (cf lexique) dont la surface a été spécifiquement modifiée pour la détection de *C. parvum* (4-12). Son niveau de détection reste lui élevé puisque sa sensibilité minimum est de 100 oocystes/ml (0,1 oocystes/ μ l). L'intégration de la technique SPR au sein d'un système d'analyse sur site (Point of Care en anglais ou test décentralisé) reste néanmoins complexe.

Campbell et Mutharasan ont utilisé les techniques mécaniques en fonctionnalisant de la même manière une micro-poutre pour capturer et détecter le parasite (4-13). Le seuil de sensibilité est identique à celui obtenu par SPR.

Taguchi et al. ont utilisé un système uniquement microfluidique pour capturer les parasites au travers d'une micro-grille en acier dont la dimension des pores est inférieure au diamètre du parasite (4-14). Cette méthode permet de ne pas utiliser la séparation immuno-magnétique mais requiert encore l'usage de marqueurs fluorescents et un comptage manuel.

A notre connaissance, aucune étude n'a encore utilisé les propriétés électriques des parasites pour leur détection. L'impédancemétrie est pourtant une technique facilement exploitable, au potentiel énorme (détection en temps réel, sans marqueur, non invasive et permettant des analyses à haut-débit (4-15) et facilement applicable à la détection des parasites (cf chapitre 1)). Elle pourrait être intégrée à la méthode 1622 pour améliorer son rendement et sa reproductibilité.

Les détecteurs électriques peuvent aussi être facilement intégrés au sein d'un laboratoire sur puce pour réaliser des analyses sur site de la potabilité de l'eau. Pour ce type de système intégré, comme les concentrations naturelles en parasites sont très faibles, une étape de concentration préalable à celle de détection est obligatoire. Ce concentrateur électrique permettrait ainsi de réduire la sensibilité requise du système de détection électrique.

Nous nous sommes donc intéressés à utiliser les systèmes précédemment caractérisés pour détecter les parasites de *C. parvum*.

Pour ces manipulations sur *C. parvum*, nous avons préféré utiliser des dispositifs à puits car ils conviennent mieux à l'analyse de cellules en suspension. Leur nettoyage et manipulation sont en effet beaucoup plus aisés.

II. Mise en place d'un protocole de mesure et de préparation des oocystes

Lors des premières mesures effectuées sur le parasite *C. parvum*, nous avons cherché à définir un protocole de manipulation nous permettant d'obtenir des impédances électriques stables dans le temps et reproductibles. Comme le décrit la méthode 1622, après que l'eau d'origine ait été filtrée, le *C. parvum* est suspendu dans de l'eau purifiée. Pour effectuer ces premiers tests, nous avons donc d'abord utilisé ce milieu de suspension.

Comme le parasite est un agent infectieux, toutes nos manipulations ont été effectuées sous une hotte à flux laminaire dans une salle dédiée à la manipulation de ce parasite à l'Institut Supérieur d'Agriculture (ISA) de Lille sous la supervision de Jérôme Follet, maître de conférence à l'ISA.

Dans ce paragraphe, sauf précisé, toutes les mesures présentées ont été effectuées avec une tension de 10mV d'amplitude, un volume de solutions biologiques de 110 μ l et des puits de 8mm de diamètre. Les graphiques ne comportent pas d'écart type car ils sont présentés à titre d'exemple.

II.1. Stabilité des mesures

L'injection de cellules biologiques en suspension dans des puits suggère que ces cellules vont sédimenter au fond des puits. Ce phénomène devrait modifier l'impédance du système au cours du temps. Nous avons donc mesuré en continu l'impédance électrique au sein de nos micro-puits après y avoir injecté une suspension d'eau pour préparation injectable (H_2O ppi) avec 10 oocystes/ μ l afin de vérifier si leur sédimentation a un effet sur l'évolution temporelle de la conduction du système.

La Figure 4- 3 présente l'évolution temporelle de la partie réelle de l'impédance lors de l'injection successive d' H_2O ppi et d'oocystes d' H_2O ppi avec un dispositif à micropuits recouverts ou non de Parafilm (cf lexique).

Pour cette manipulation, nous avons utilisé la 4^e géométrie d'électrodes, les sub-millimétriques (cf chapitre 2, paragraphe I.2.1.1., Figure 2-7) et la plage fréquentielle va de 100 Hz à 1MHz. Les impédances ici présentées sont celles obtenues à 10 KHz.

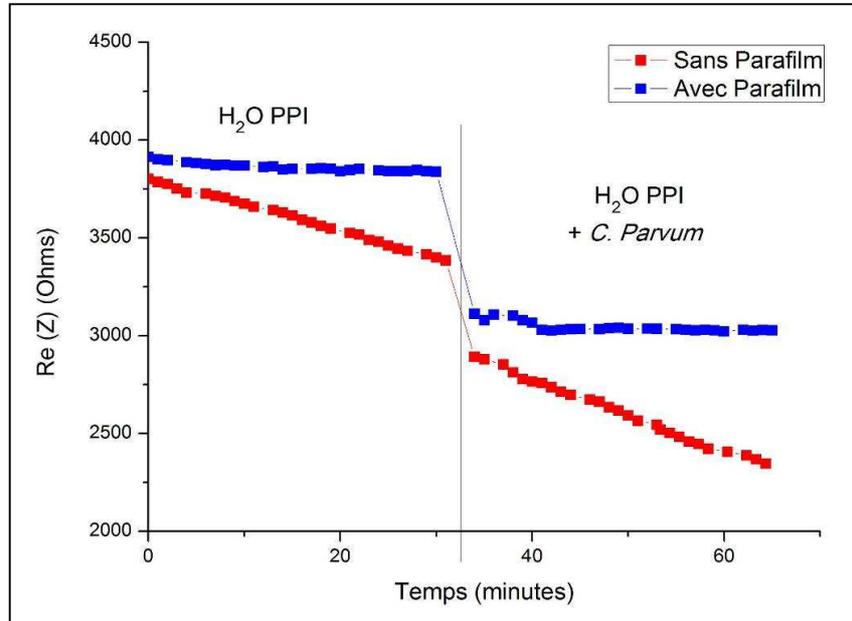


Figure 4- 3 : Evolution temporelle de la partie réelle de l'impédance à une fréquence de 10 KHz lors de l'injection de *C. parvum* suspendus dans de l' H₂O ppi avec un dispositif recouvert ou non de Parafilm. La concentration de parasites est de 10 oocystes/µl.

Nous observons sur le graphique une évolution temporelle de la partie réelle de l'impédance quand le puits n'est pas couvert. Cette évolution temporelle disparaît quand on couvre le puits. Les tests faits avec et sans parasites permettent de conclure que la sédimentation, même si elle se produit, ne modifie pas l'impédance électrochimique du système.

Nous avons évoqué au deuxième chapitre le fait que l'eau purifiée pouvait être facilement contaminée par le dioxyde de carbone présent dans l'air ambiant. Cette contamination a pour effet d'augmenter la conductivité de l' H₂O ppi (4-16).

La Figure 4- 3 montre bien que l'utilisation d'un tel film diminue considérablement les variations d'impédance au cours du temps. Le Parafilm laissant passer très peu de gaz, il semble donc diminuer la contamination de l' H₂O ppi en CO₂. Cette expérience montre que le flux de la hotte sous laquelle sont effectuées les mesures n'empêche pas cette contamination. Pour le reste des manipulations, nous avons donc recouvert nos puits d'un film de Parafilm afin d'obtenir des impédances stables au cours du temps.

II.2. Régénération du dispositif

Une des conditions pour avoir des mesures comparables entre différentes analyses sur les parasites est que le système d'analyse, notre bioMEMS, ne soit lui-même pas modifié entre les mesures. Pour vérifier que le système reste identique au cours des manipulations, nous avons choisi de vérifier l'impédance du milieu de suspension entre chacune de nos mesures, ici l' H_2O ppi. Si le système de mesure n'est pas modifié, cette impédance doit rester identique tout au long de la manipulation et nos analyses sur parasites restent comparables.

Lors des premières manipulations sur *C. parvum*, nous nous sommes rendu compte que l'injection des parasites modifie le conditionnement des électrodes. En effet, si aucune procédure de nettoyage intermédiaire n'est appliquée, l'impédance de l'eau avant et après l'injection des parasites présente des valeurs différentes (Figure 4- 4).

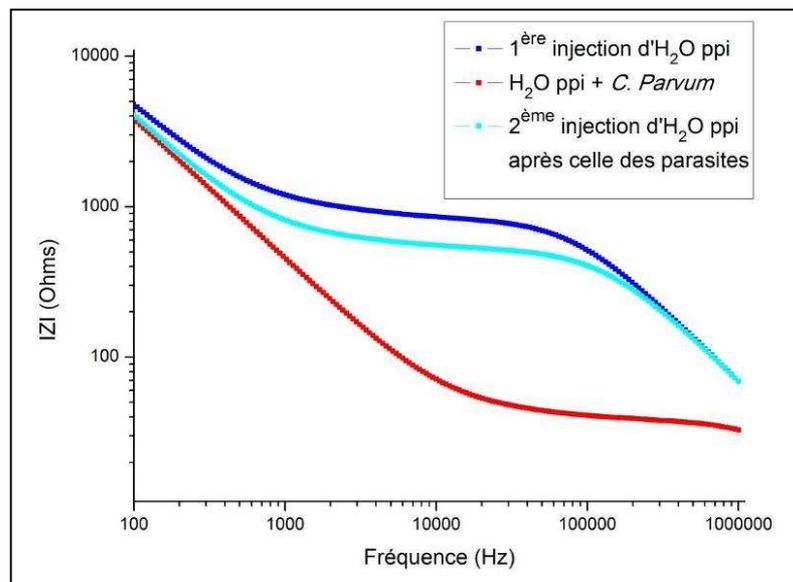


Figure 4- 4 : Impédances d' H_2O ppi avant et après l'injection de *C. parvum* suspendus à 200 oocystes/ μl mesurées avec les électrodes micrométriques rondes.

L'impédance de l' H_2O ppi a tendance à diminuer après la mesure sur les parasites. Il semble donc que certains parasites ne soient pas retirés du puits en même temps que leur milieu de suspension ou qu'ils laissent des espèces chargées au fond du puits.

Nous avons donc essayé d'utiliser divers produits de nettoyage pour régénérer les électrodes : de l'acide chlorhydrique concentré à 1%, de l'éthanol et une solution de nettoyage dédiée au matériel scientifique : l'Elma Clean.

Avant d'utiliser ces produits pour les analyses de parasites, nous avons d'abord évalué leur effet sur les électrodes en mesurant l'impédance d'H₂O ppi avant et après leur utilisation. Pour se faire les produits ont été minutieusement appliqués dans les micro-puits avec une dizaine de pipetage. Ces produits sont ensuite rincés avec le même nombre de pipetage d'H₂O ppi. Après cela, l'eau est une nouvelle fois injectée dans les puits pour mesurer son impédance.

La Figure 4- 5 présente les résultats de ce test effectué avec de l'Elma Clean. Il est clair que l'application du produit de nettoyage dans les puits diminue l'impédance de l'H₂O ppi. Comme le produit est hautement chargé en ions, ceci montre qu'il en reste également des traces dans les puits et cela malgré les nombreux pipetages de rinçage effectués avec l'H₂O ppi. Les autres produits provoquent une chute d'impédance équivalente. Leur utilisation a donc été par la suite évitée.

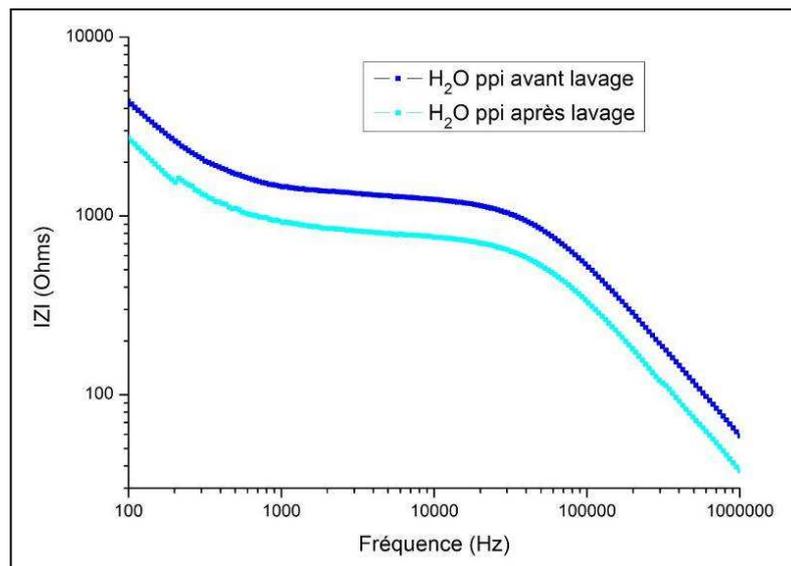


Figure 4- 5 : Impédances d' H₂O ppi avant et après l'utilisation d'Elma Clean mesurées avec les électrodes micrométriques rondes.

Finalement, le protocole de nettoyage qui a donné les meilleurs résultats de reproductibilité consiste au simple rinçage des puits avec de l'H₂O ppi, sans utilisation d'autres produits de nettoyage. Pour que le pipetage entre les mesures sur parasites soit réellement effectif, il doit être effectué au moins trois fois, en faisant attention de récupérer entre chaque pipetage le volume entier de liquide.

Un exemple de nettoyage réussi est présenté Figure 4- 6 où deux mesures successives de parasites ont pu être effectuées dans le même puits tout en conservant un niveau d'impédance identique pour leur milieu de suspension (l'H₂O ppi).

On peut supposer que la réussite de ce nettoyage est due à la dilution successive des espèces ioniques encore présentes dans le puits et à la surface des électrodes. Pour la suite des manipulations, ce protocole de nettoyage a donc été conservé de façon à pouvoir réutiliser plusieurs fois le même puits au cours des manipulations et y obtenir des mesures reproductibles et comparables.

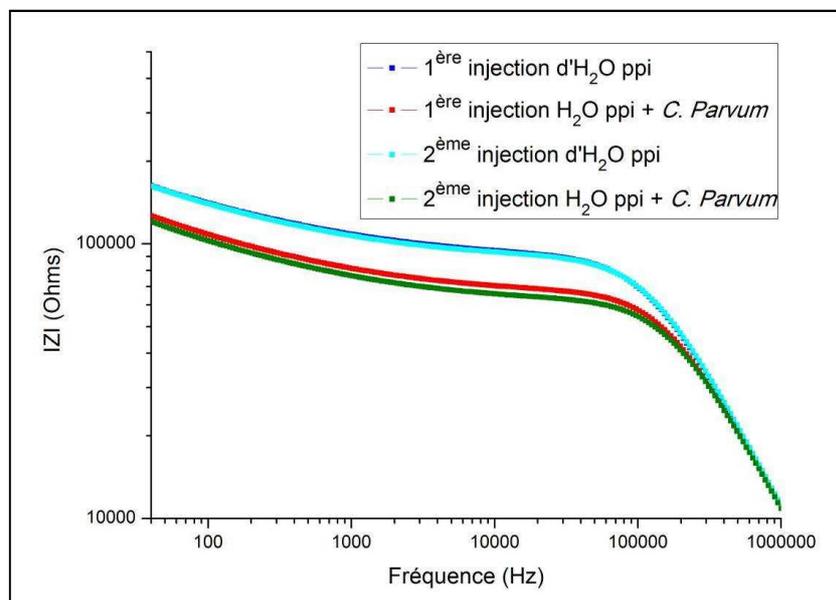


Figure 4- 6 : Impédances d' H₂O ppi et de parasites suspendus dans de l' H₂O ppi à une concentration de 10 oocystes/µl mesurées successivement dans le même puits avec un pipetage intermédiaire à l'H₂O ppi. Mesures effectuées avec les électrodes millimétriques droites.

II.3. Préparation des suspensions de *C. parvum*

Une fois le protocole de régénération des dispositifs établi, nous avons réussi à retrouver des mesures d'impédance d'H₂O ppi identiques entre plusieurs analyses successives sur les *C. parvum*. Ceci nous a permis de nous assurer que nos mesures sur les parasites étaient bien comparables.

En effectuant ainsi plusieurs mesures sur des préparations différentes de parasites, nous avons été cette fois confrontés à un problème de reproductibilité sur les mesures d'impédance des parasites.

Un exemple de spectre d'impédance avec des mesures d'H₂O ppi proches et des mesures sur les parasites divergentes est présenté sur la Figure 4- 7.

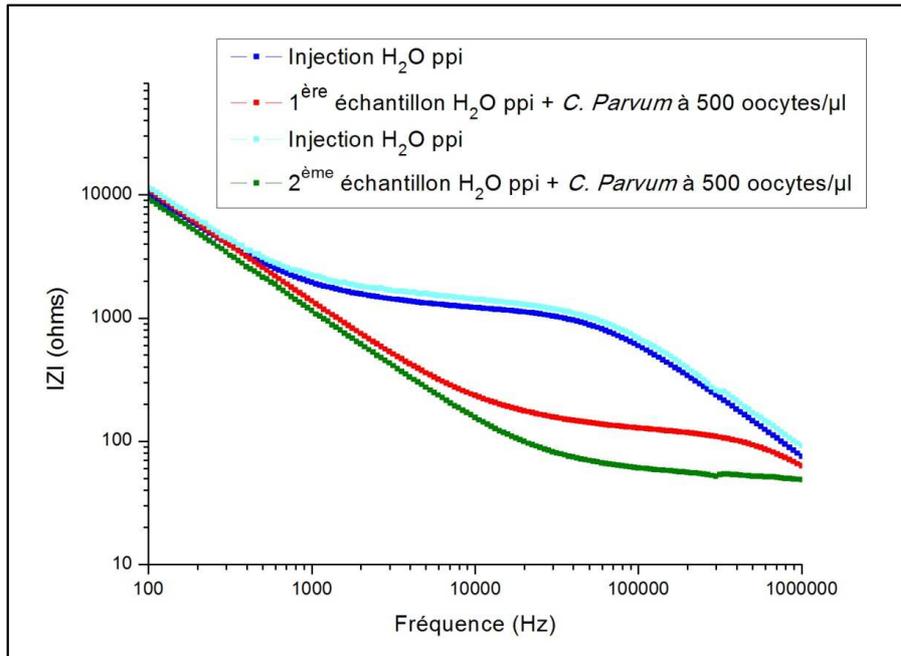


Figure 4- 7 Impédances d' H₂O ppi et de deux suspensions différentes de parasites à une concentration de 500 oocystes/µl mesurées. Mesures effectuées avec les électrodes micrométriques droites.

Comme les mesures de deux préparations distinctes de parasites divergent, la variabilité de leurs impédances ici observée semble être due à un paramètre variant involontairement au cours de leur préparation. Ces préparations manuelles impliquent inéluctablement des possibles variations. Nous avons donc étudié une éventuelle cause de ces dispersions : le milieu de suspension d'origine des parasites et leur nettoyage.

Les parasites sont commandés chez Waterborne Incorporation (Waterborne Inc.) qui les maintient dans les conditions physiologiques d'origine en les stabilisant dans du tampon phosphate salin (PBS pour Phosphate Buffer Saline).

Le protocole de préparation des parasites utilisé au début de nos manipulations sur *C. parvum* consistait à prélever un volume de la suspension d'origine, la centrifuger pour faire sédimenter les parasites, retirer le PBS à l'aide d'une micropipette et suspendre les parasites cette fois dans de l' H₂O ppi. Ce protocole est schématisé sur la Figure 4- 8. L'ajustement des concentrations se fait après ces étapes via plusieurs comptages avec une cellule de comptage Malassez et des dilutions.

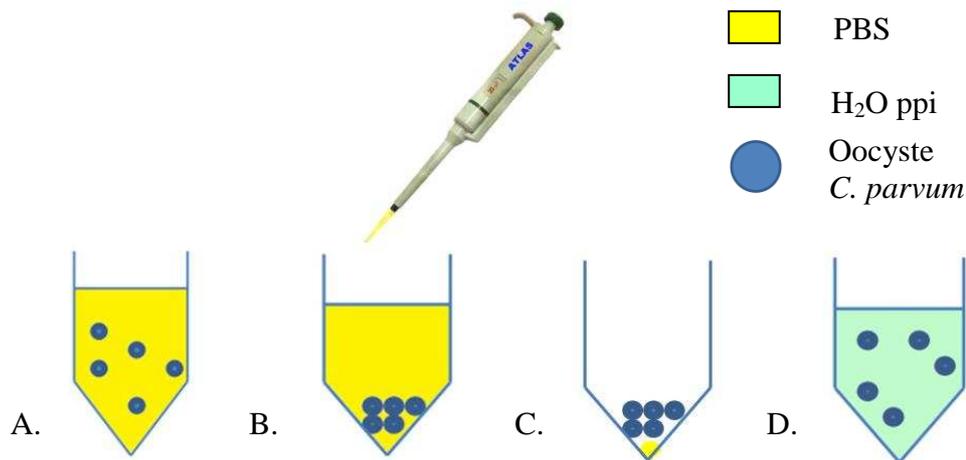


Figure 4- 8 : Schéma du protocole de préparation des suspensions de parasites

A : Prélèvement d'un échantillon de parasites suspendus dans du PBS.

B et C: Centrifugation des parasites et surnageant retiré manuellement à l'aide d'une micropipette. Quelques μ l de PBS restent dans le tube Eppendorf au sein du culot de parasites. D : Les parasites sont resuspendus dans de l' H₂O ppi.

Les manipulations sur les parasites et nos analyses de caractérisation nous ont permis de constater la sensibilité élevée des bioMEMS électriques ici présentés. En constatant ces résultats, nous nous sommes ainsi interrogés sur l'effet que pouvaient avoir les quelques μ l de PBS pouvant rester dans les tubes de centrifugation après le pipetage sur la mise en suspension des parasites dans de l'H₂O ppi.

Pour étudier cet effet, nous avons mesuré l'impédance de plusieurs dilutions de PBS dans de l'H₂O ppi. Ces mesures sont présentées sur la Figure 4- 9.

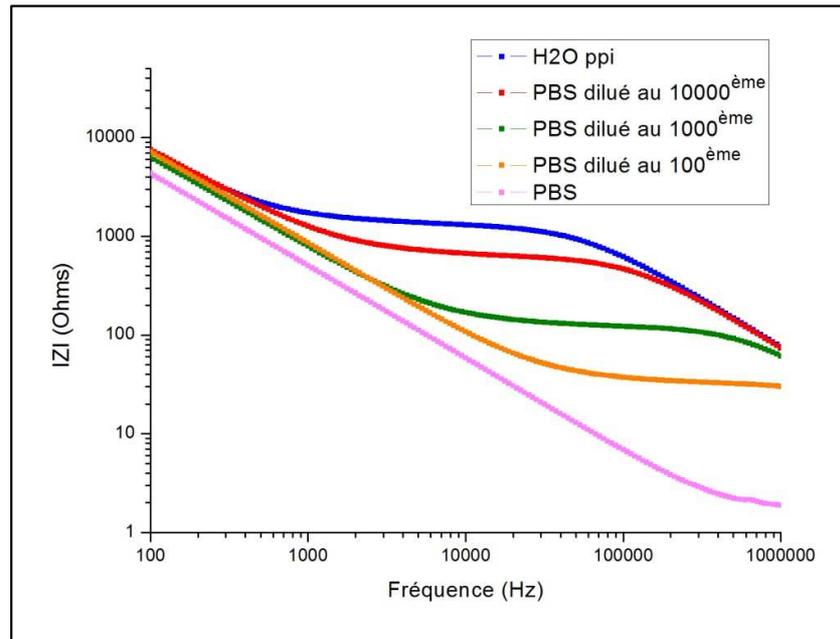


Figure 4- 9 : Impédances d' H₂O ppi et de différentes dilutions de PBS dans de l' H₂O ppi. Mesures effectuées avec les électrodes micrométriques droites.

Nous voyons sur ces spectres que même 1 µl de PBS dilué dans 10 ml d' H₂O ppi peut être détecté par impédancemétrie. Ceci prouve la sensibilité extrême des mesures électrochimiques et des bioMEMS utilisés. Les *C. parvum* étant resuspendus dans un volume maximal d' H₂O ppi de 1,5 ml au sein des tubes eppendorf, il paraît évident que les quelques µl de PBS n'ayant pu être retirés du culot de parasites influencent l'impédance de la suspension finale de parasite obtenue après une centrifugation.

Pour vérifier que le milieu de suspension de nos parasites correspond bien à de l' H₂O ppi sans traces de PBS, nous avons centrifugé plusieurs fois notre préparation en mesurant après chaque centrifugation l'impédance du surnageant et le changeant si nécessaire. Ce prélèvement doit être effectué avec beaucoup de précautions pour laisser le culot de parasites intact. Ces mesures sont présentées sur la Figure 4- 10.

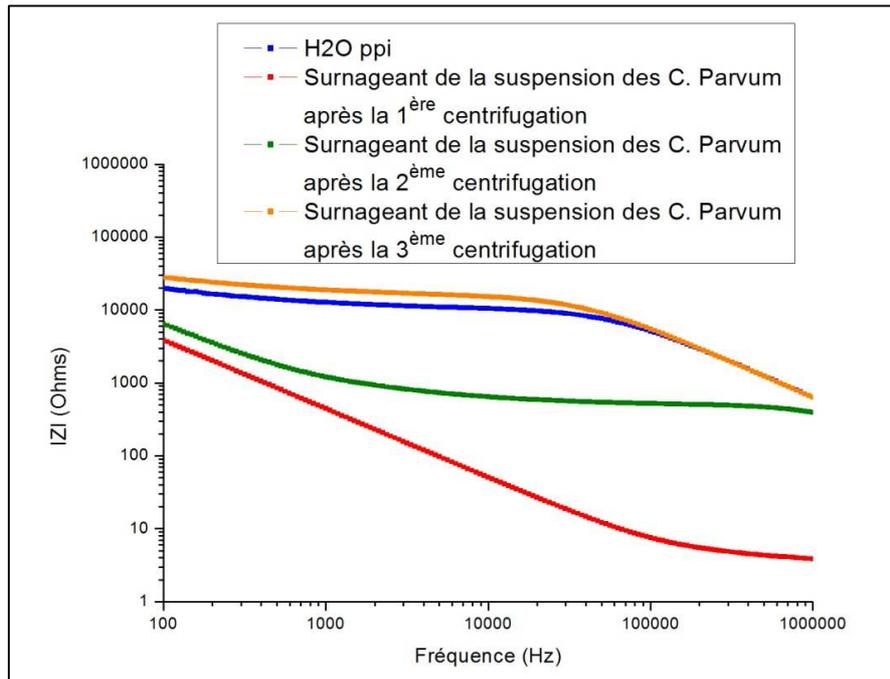


Figure 4- 10 : Impédances d' H₂O ppi et des surnageants issus des centrifugations successives d'une même préparation de suspensions de parasites. Mesures effectuées avec les électrodes submillimétriques rondes.

L'analyse de ce graphe montre qu'il faut au moins trois centrifugations pour que le surnageant atteigne le niveau d'impédance de l' H₂O ppi et que les traces de PBS issus de la première centrifugation soient donc suffisamment diluées.

La bonne préparation des suspensions de parasites peut ainsi être vérifiée en mesurant l'impédance du surnageant après chaque centrifugations.

Le nombre de centrifugation nécessaire au parfait nettoyage des parasites dépend bien sur de la qualité des pipetages. Concernant nos manipulations, nous nous sommes fixés un minimum de trois centrifugations avant la vérification du niveau d'impédance du surnageant.

Ces différentes expériences nous ont permis de définir les paramètres de préparation et de manipulation nécessaires à la stabilité et la reproductibilité de nos mesures d'impédancemétrie sur parasites.

II.4. Protocole final de préparation des parasites et de leur analyse électrochimique

Après ces différentes expériences qui nous ont permis de déterminer les paramètres influents sur l'obtention de spectres électrochimiques stables et reproductibles, nous avons pu définir un protocole de préparation des suspensions de parasites et un protocole expérimental de mesure de leur impédance.

Pour la préparation des suspensions de *C. parvum* dans de l'H₂O ppi, voici le protocole détaillé :

- Prélèvement d'un volume d'au moins 1 ml de la préparation de parasites d'origine suspendue dans du PBS.
- Centrifugation de ce prélèvement pendant 15 min à 1000g.
- Le surnageant est retiré à la pipette en faisant attention à laisser le culot de parasites intact.
- Ces deux étapes sont encore répétées successivement deux fois d'affilées pour que les parasites subissent en tout trois centrifugations.
- Une fois la 3^e centrifugation terminée, un volume de surnageant est prélevé de la préparation de parasites tout de suite après et son impédance est mesurée. Si cette impédance est égale à celle de l'H₂O ppi, la préparation peut être utilisée, sinon une nouvelle centrifugation est opérée.
- La concentration de la préparation de parasite est vérifiée à l'aide de comptages effectués au microscope Nikon 80i x200 avec une cellule de Malassez (1µl total).
- La préparation est ensuite aliquotée, diluée (pour préparer des gammes de concentration) ou inactivée (pour préparer des gammes de viabilité) selon les tests à effectuer.
- Les mesures d'impédance électrochimique des parasites sont réalisées 15h après leur préparation (le lendemain matin).

Ce protocole est résumé sur la Figure 4- 11.

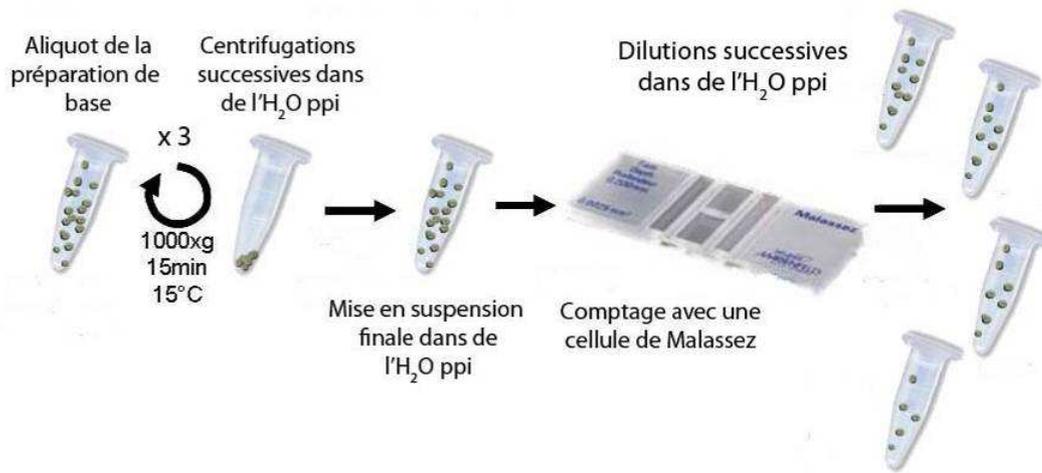


Figure 4- 11 : Schéma présentant le protocole de préparation des suspensions de *C. parvum* dans de l'H₂O ppi. La dernière étape correspond à la préparation des gammes de concentrations.

Concernant, le protocole expérimental de mesure :

Pour éviter les phénomènes de contamination, les puits dans lesquels sont effectuées les analyses sont recouverts de Parafilm.

- Injection de 110 µl d'H₂O ppi pour une première hydratation des électrodes. Stabilisation 5 minutes sans mesures.
 - Mesures électriques pendant 6 minutes.
 - Injection d'un volume de suspension de parasites dans de l'H₂O ppi. Stabilisation 5 minutes sans mesures (sédimentation observable sur la Figure 4- 12).
 - Mesures électriques pendant 6 minutes.
 - Pipetage à l'H₂O ppi en 3 étapes pendant au moins 5 minutes pour nettoyer le puits de toutes traces d'ions ou de parasites.
 - Injection d'un volume d'une nouvelle suspension de parasites dans de l'H₂O ppi. Stabilisation 5 minutes sans mesures électriques.
 - Mesures électriques pendant 6 minutes.
 - Pipetage à l'H₂O ppi en 3 étapes pendant au moins 5 minutes.
- Etc...

- En fin de manipulation, injection d'H₂O ppi, Stabilisation 5 minutes sans mesures.
- Mesures électriques pendant 6 minutes pour vérifier l'impédance de l'H₂O ppi et ainsi la stabilité des électrodes au cours de la manipulation.

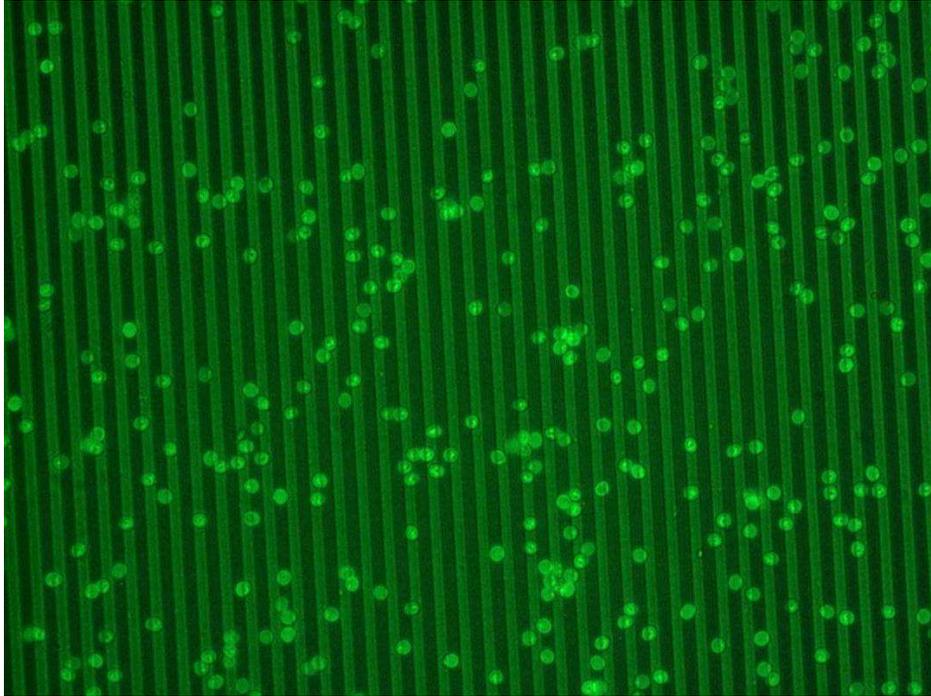


Figure 4- 12 : Photo des *C. parvum* marqués par fluorescence qui ont sédimentés sur les électrodes droites de 4 μ m.

III. Effet du milieu de suspension

Les parasites *C. parvum* contaminent l'eau naturelle. Leur détection selon la méthode 1622 se fait dans une solution tampon ne correspondant pas à leur environnement de base. Afin d'améliorer cette méthode, nous pouvons modifier ce nouveau milieu de suspension. Comme nous utilisons une méthode électrique, nous avons analysé l'influence de la conductivité du milieu de suspension.

Pour cela, nous avons donc utilisé deux milieux de suspensions, l'un très conducteur : du tampon phosphate salin (PBS pour Phosphate Buffer Saline), l'autre peu conducteur : l'H₂O ppi. La mesure de la conductivité de ses milieux avec un conductimètre LF-96 (WTW, Weilheim, Germany) donne des valeurs de 14,12 mS/cm (14.12×10^{-1} S/m) (pH 7,3, mesuré au pH mètre) pour le PBS et 1.65 S/cm ($1,65 \times 10^{-4}$ S/m) pour l'H₂O ppi.

Pour effectuer ces tests, nous avons utilisé les électrodes micrométriques droites, une tension d'excitation de 10mV, des volumes de liquides biologiques de 110 μ l et des puits de 8mm de diamètre. La préparation et la mesure ont été faites selon les protocoles précédemment décrits.

La Figure 4- 13 montre le spectre d'impédance d'H₂O ppi et d'une suspension de *C. parvum* dans de l'H₂O ppi à une concentration de 1000 oocystes/ μ l. L'impédance du surnageant de la suspension a bien été mesurée comme identique à celle de l' l'H₂O ppi. La modification de conduction détectée est donc uniquement due à la présence des parasites.

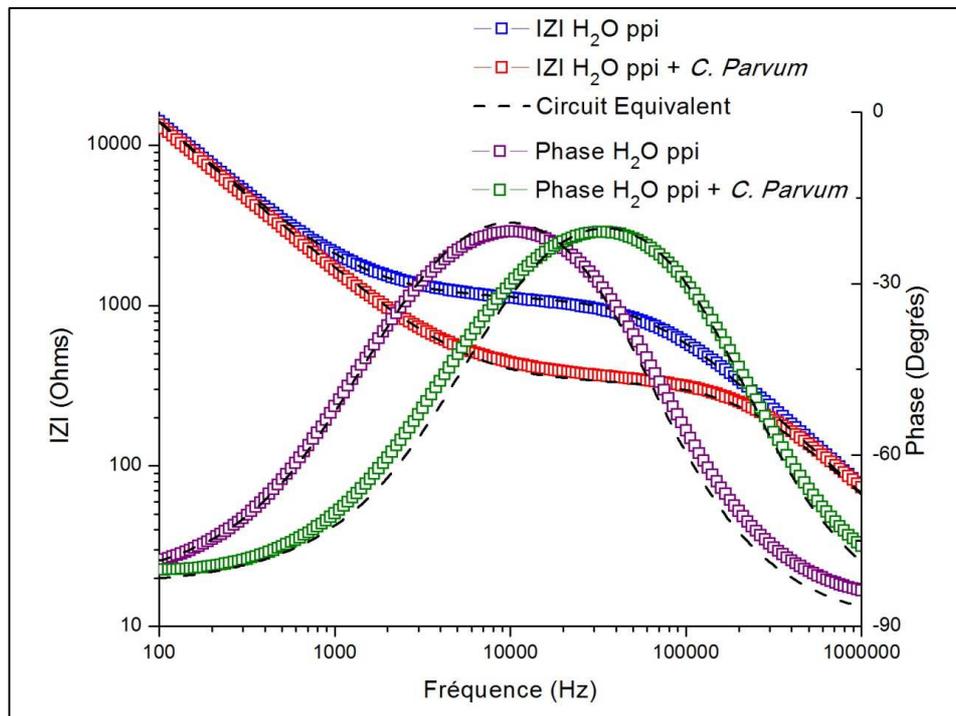


Figure 4- 13 : Spectres d'impédance d' H₂O ppi et d'une suspension de parasites à une concentration de 1000 oocystes/ μ l.

Nous voyons sur ces spectres que l'impédance des parasites est clairement distinguable de celle de l'H₂O ppi. Le spectre des parasites a une allure très proche de celle de l'impédance de l'eau pure avec un niveau résistif plus bas et une phase qui est décalée vers les HF.

La Figure 4- 14 présente le spectre d'impédance de PBS et d'une suspension de *C. parvum* dans du PBS à une concentration de 1000 oocystes/ μ l.

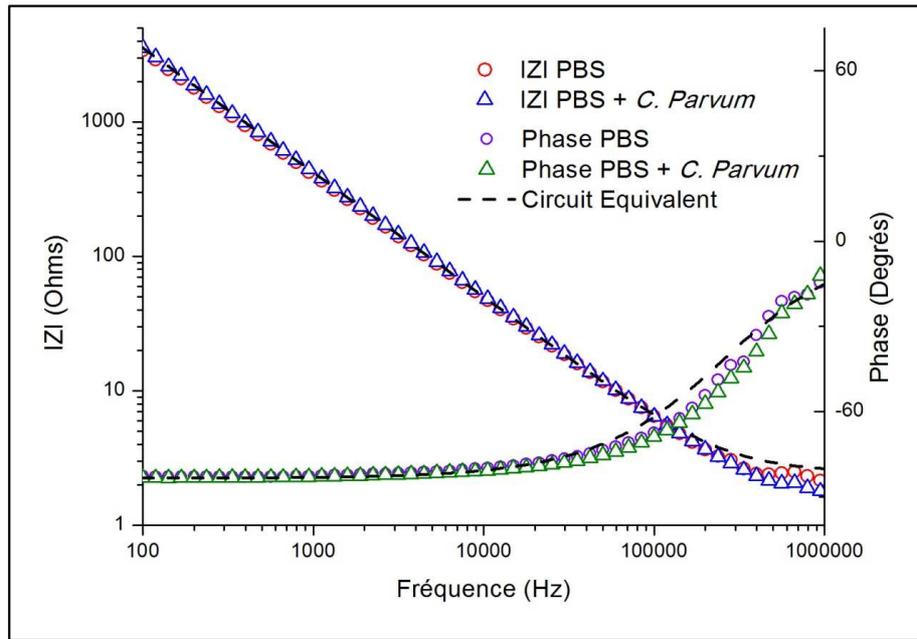


Figure 4- 14 : Spectres d'impédance de PBS et d'une suspension de parasites à une concentration de 1000 oocystes/ μ l.

On voit sur la Figure 4- 14 que les spectres d'impédance du PBS pur et de la suspension de parasites sont confondus, les parasites ne sont pas détectables dans le PBS.

La comparaison de ces deux analyses montre que la détection des parasites nécessite un milieu faiblement conducteur et que dans ce milieu faiblement conducteur, les parasites ont tendance à diminuer l'impédance du milieu et donc à augmenter sa conductivité.

Pour modéliser les mesures effectuées dans l' H_2O ppi, nous avons utilisé le circuit électrique équivalent présenté dans le troisième chapitre (paragraphe I.2., Figure 3-3) et utilisé entre autres par Linderholm. Pour le spectre de la suspension de parasite, nous avons gardé les mêmes paramètres de modélisation que pour l' H_2O ppi en faisant varier uniquement la résistance de l'échantillon $R_{éch}$.

Les paramètres du circuit équivalent communs à l' H_2O ppi et à la suspension de parasites sont :

- $K = 1,88704 \cdot 10^{-7} \pm 9,48923 \cdot 10^{-9} \text{ S} \cdot \text{s}^n$
- $n = 0,91991 \pm 7,13366 \cdot 10^{-4}$
- $C_{diélec} = 2,34401 \cdot 10^{-9} \pm 1,70985 \cdot 10^{-11} \text{ F}$

Les variations de $R_{\text{éch}}$ sont présentées dans le Tableau 4- 1.

Tableau 4- 1 : Comparaison des valeurs de résistance des suspensions issues de la modélisation de l'impédance de l'H₂O ppi et d'une suspension de parasites à une concentration de 1000 oocystes/ μ l.

	H ₂ O ppi	H ₂ O ppi + <i>C. parvum</i>
$R_{\text{éch}}$ (Ω)	1137,20821 \pm 2,867	337,52746 \pm 13,12658

Le fait que $R_{\text{éch}}$ soit le seul paramètre modifié par la présence des parasites montre que les oocystes modifient uniquement les propriétés de conduction de l' H₂O ppi. Les autres paramètres, à savoir ceux de la double couche (cf lexique) et des propriétés diélectriques restent identiques et sont donc uniquement dépendant du milieu de suspension, l'H₂O ppi. Les variations de la résistance de l'échantillon suggèrent que les parasites relâchent des ions dans l'H₂O ppi, à la base, peu conductrice.

L'allure des spectres obtenus avec le PBS se rapprochant de ceux obtenus avec le milieu de culture cellulaire (cf chapitre 3, II.1.4), la modélisation commune pour les manipulations dans le PBS a donc été effectuée avec une simple résistance en série avec un CPE (cf lexique). L'utilisation du CPE est justifiée car la phase diffère légèrement des 90° en basse fréquence.

Les valeurs de ces paramètres sont :

- $R = 2,46552 \pm 0,21576 \Omega$
- $K = 7,09165 \cdot 10^{-7} \pm 1,15146 \cdot 10^{-8} \text{ S.s}^n$
- $n = 0,92798 \pm 0,00235$

Comme avec le milieu de culture cellulaire, la résistance du PBS est tellement faible que le courant se propage uniquement par conduction et non par déplacement, comme si la capacité $C_{\text{diélec}}$ était court-circuitée par $R_{\text{éch}}$. Les effets capacitifs ici observés sont donc uniquement dus à l'effet de double couche.

Le PBS étant à la base déjà très conducteur, nous pouvons supposer que les ions relâchés par les parasites n'influencent pas sa conductivité et l'impédance globale du système biologique reste inchangée.

Après ces manipulations, nous avons donc effectué nos mesures sur la détection du parasite uniquement dans de l'H₂O ppi.

Nous pouvons noter que cette méthode de détection électrique des parasites n'est pas spécifique puisque elle est réalisée dans de l'eau purifiée. Elle reste néanmoins applicable à la méthode 1622 actuellement utilisée puisque celle-ci nécessite aussi une étape de séparation immuno-magnétique pour récupérer spécifiquement les parasites et les mettre en suspension dans un nouveau milieu.

Nous nous sommes par la suite intéressés à la discrimination de différentes concentrations de parasites.

IV. Détermination de la concentration en *C. parvum*

Après avoir confirmé la possibilité de détecter le parasite dans de l'H₂O ppi, nous avons essayé de distinguer des concentrations différentes de parasites. Pour réaliser cette étude, nous avons conservé les électrodes micrométriques droites. Comparées aux autres géométries, ces électrodes présentent une impédance de l'H₂O ppi plus faible (cf chapitre 3, paragraphe II.1.2). Le bruit de fond apporté par le milieu de suspension étant plus faible, l'injection de parasites y est davantage susceptible de présenter des modifications d'impédance aisément détectables (4-17).

Pour toutes ces expériences, nous avons utilisé des diamètres de puits de 8mm, une tension d'excitation de 10mV et un volume de liquide biologique de 110 µl.

IV.1. Gamme de concentrations de *C. parvum*

Pour réaliser les expériences présentées dans ce sous paragraphe, nous avons préparé une gamme de concentration allant de 100 à 1000 oocystes/µl selon le protocole décrit au paragraphe II.3. La Figure 4- 15 présente les modules des impédances de ces différentes dilutions. La Figure 4- 16 présente les phases de ces mêmes impédances.

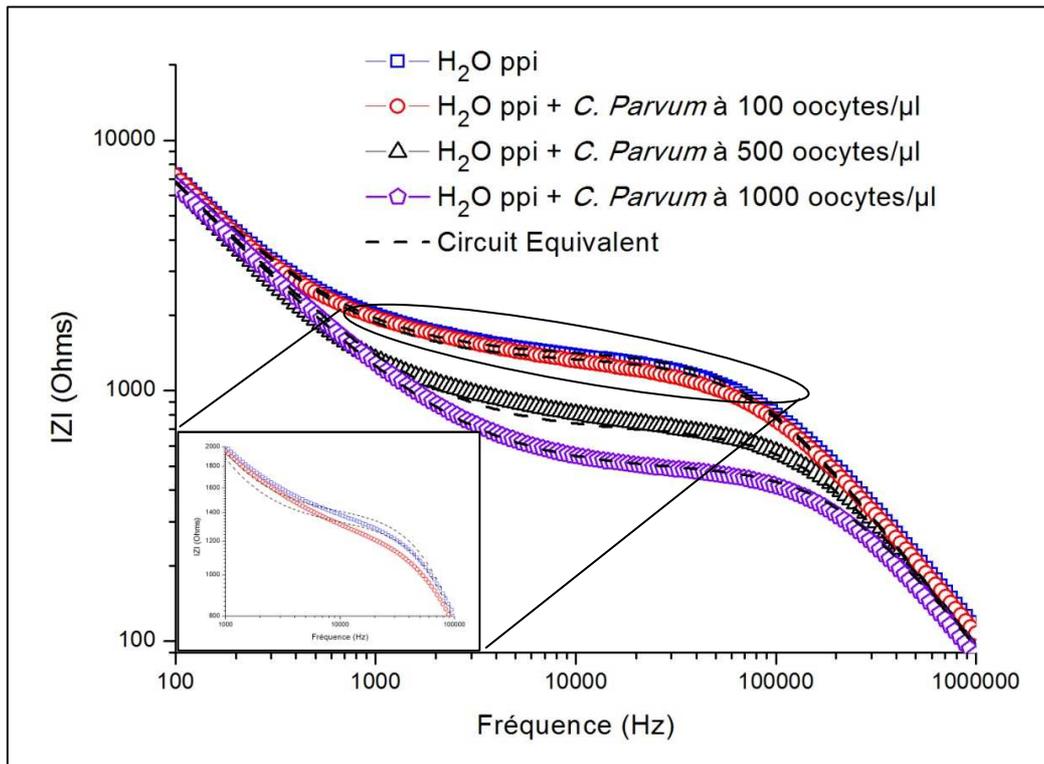


Figure 4- 15 : Amplitude des impédances de suspensions de *C. parvum* dans de l'H₂O ppi à des concentrations allant de 100 à 1000 oocystes/μl.

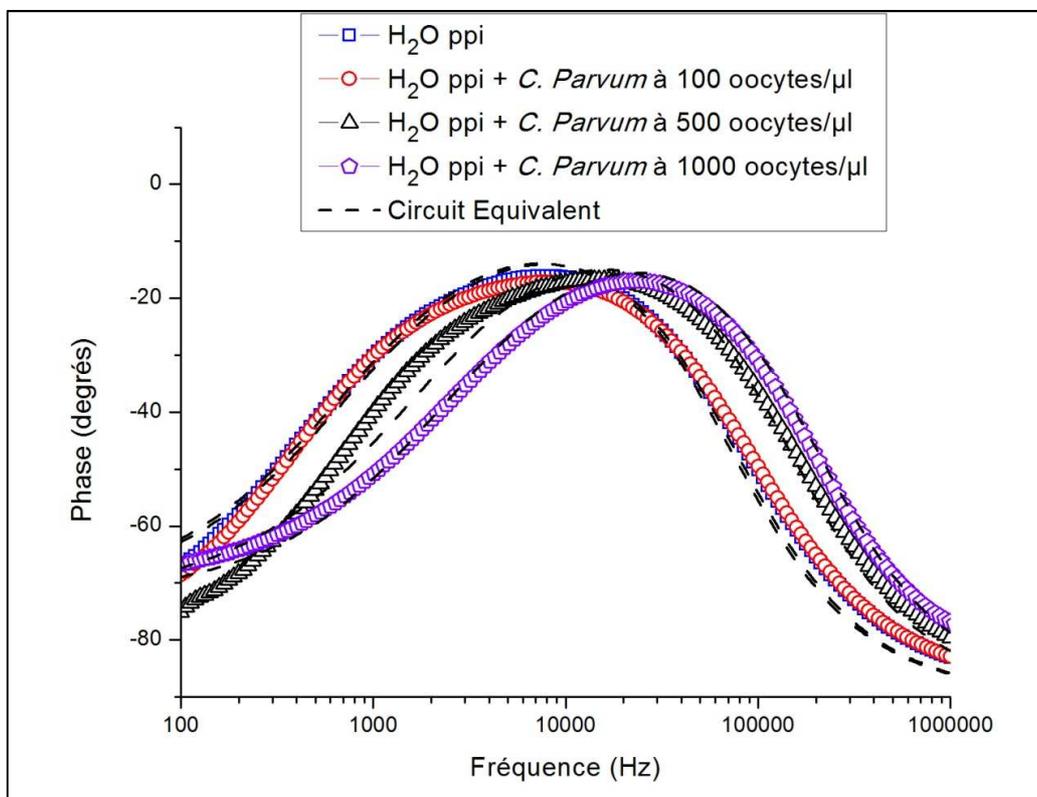


Figure 4- 16 : Phase des impédances de suspensions de *C. parvum* dans de l'H₂O ppi à des concentrations allant de 100 à 1000 oocystes/μl.

Sur ces graphiques, nous constatons que l'impédance diminue avec la concentration en parasite. Quand la concentration en parasite augmente, la valeur des paliers résistifs diminue et se décale vers les HF en même temps que la phase. Le seuil de détection des parasites se situe aux environs des 100 oocystes/ μ l.

Cette sensibilité est 1000 fois supérieure à celle obtenue par Kang et al. avec un SPR (4-12) et celle obtenue par Campbell et Mutharasan (4-13) en utilisant une micro-poutre.

Néanmoins, nous pouvons remarquer que ces différentes sensibilités sont trop faibles pour détecter une concentration naturelle de parasite (10 oocystes/L). Une étape de concentration préalable est donc nécessaire. Vu la sensibilité plus faible obtenue par impédancemétrie, cette concentration doit être plus importante pour détecter les parasites par cette méthode. Un concentrateur électrique est actuellement en cours de développement dans notre équipe de recherche.

Ces différents spectres d'impédance ont été encore une fois modélisés avec le circuit équivalent présenté au 3^e chapitre (Figure 3-3). Comme pour l'étude du milieu de suspension, nous avons gardé pour les suspensions de parasites les mêmes paramètres de modélisation que pour l' H_2O ppi en faisant uniquement varier la résistance de l'échantillon $R_{éch}$.

Les paramètres du circuit équivalent communs à l' H_2O ppi et aux suspensions de parasites sont :

- $K = 8,27086 \cdot 10^{-7} \pm 1,66717 \cdot 10^{-8} \text{ S.s}^n$
- $n = 0,80737 \pm 0,00281$
- $C_{diélec} = 1,63288 \cdot 10^{-9} \pm 1,95085 \cdot 10^{-11} \text{ F}$

Les valeurs de $R_{éch}$ obtenues lors des modélisations sont présentées dans le Tableau 4- 2. Les écarts types sont issus de la méthode des moindres carrés non-linéaires réalisée avec le logiciel Origin.

Tableau 4- 2 : Comparaison des valeurs de $R_{\text{éch}}$ issues de la modélisation des impédances des suspensions d'H₂O ppi sans traces de PBS avec différentes concentrations de parasites

	H ₂ O ppi	100 oocystes/μl	500 oocystes/μl	1000 oocystes/μl
$R_{\text{éch}}$ (Ω)	1391,58383 ± 5,76478	1308,33127 ± 5,14263	687,60873 ± 8,41785	488,09942 ± 3,22339

Ces résultats confirment bien que les parasites relâchent des espèces ioniques dans l'eau proportionnellement à leur concentration. L'augmentation consécutive de l'impédance est détectable à partir d'une concentration de 100 oocystes/μl.

IV.2. Explication physique des modifications de conductivité

Nous avons vu que les parasites *C. parvum* ont tendance à augmenter la conduction électrique de l'eau purifiée. Cette augmentation de la conductivité peut s'expliquer par le fait que les parasites relâchent des ions dans un milieu de suspension à faible conductivité électrique.

En effet, dans de l'eau purifiée, les oocystes sont en conditions hypo-osmotiques. Dalton et al. ont précédemment montré que le *Giardia intestinalis* (*G. intestinalis*), un autre parasite protozoaire intestinal à la structure physiologique très proche, a une conductivité interne très élevée ($0.8 \pm 0.2 \text{ S.m}^{-1}$) (3-18). De plus, Park et al. ont précédemment montré que le *G. intestinalis* relâchent des ions inorganiques (K^+ et Cl^-) quand ils sont suspendus dans des conditions hypo-osmotiques (3-19).

Bien que la conductivité interne du *C. parvum* n'est pas encore été déterminée, les similitudes entre la structure physiologique du *C. parvum* et *G. intestinalis* supposent que les changements de conduction précédemment observés sont dus aux chocs osmotiques subis par les *C. parvum*.

Des effets similaires ont été observés par Yang et al. (3-20) avec des suspensions de bactéries dans de l'eau déionisée.

Enfin, le fait que le PBS soit isosmotique explique pourquoi il ne s'y produit pas de changement de conduction : dans ces conditions osmotiques, les *C. parvum* n'y relâchent pas d'ions.

IV.3. Détermination précise de la concentration en oocystes

Nous avons expliqué qu'il est possible de détecter différentes concentrations de parasites dans de l'H₂O ppi. Nous avons vu également que les oocystes modifient uniquement les propriétés de conduction de ce milieu de suspension. Nous nous sommes donc intéressés à étudier précisément l'évolution de la conductivité des suspensions de parasites précédemment analysées en fonction de leur concentration.

Nous avons vu au chapitre 3, paragraphe II.1.3.1.2., comment obtenir les propriétés électriques d'un échantillon à partir de ces mesures d'impédance électrochimique. L'équation (15) nous permet d'obtenir une valeur stable en fréquence de la conductivité électrique à partir de la modélisation effectuée avec le circuit électrique équivalent et plus particulièrement de la valeur de $R_{éch}$.

En utilisant cette équation et le facteur de cellule de la deuxième géométrie d'électrode (cf chapitre 2, Tableau 2- 2), nous avons déterminé la conductivité électrique des suspensions de parasites à partir des différentes valeurs de $R_{éch}$ (cf Tableau 4- 2). $R_{éch}$ est représenté en fonction de la concentration en parasites sur la Figure 4- 17.

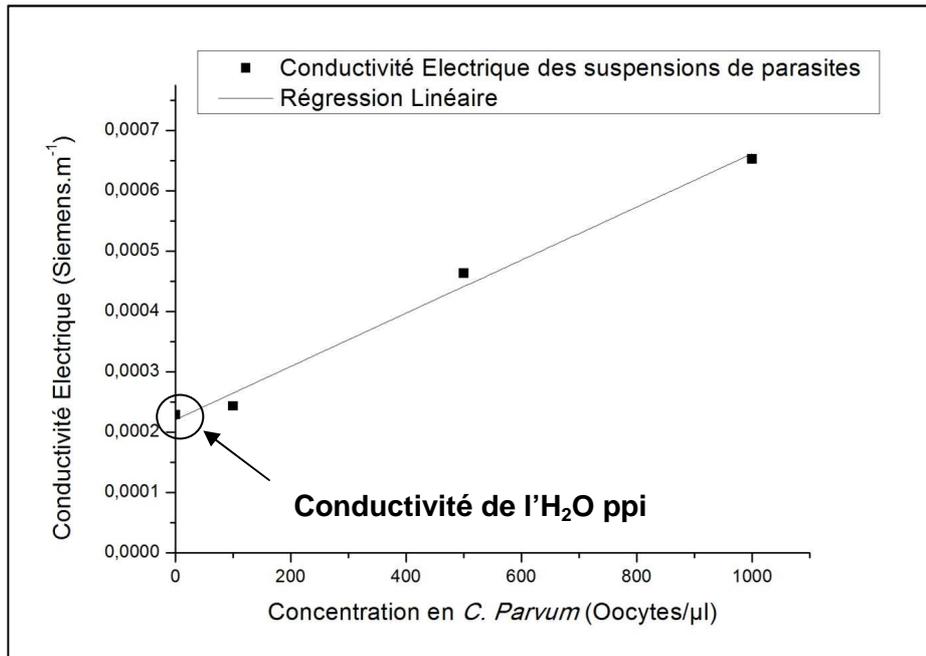


Figure 4- 17 : Conductivité de suspensions de *C. parvum* dans de l'H₂O ppi à des concentrations allant de 100 à 1000 oocystes/ μ l.

Nous constatons sur cette figure que la conductivité des suspensions évolue linéairement avec la concentration en parasite.

La régression linéaire issue des données expérimentales correspond à :

$$\sigma \text{ (S.m}^{-1}\text{)} = 2,20874.10^{-4} + 4,41048.10^{-7} \times C_{C. parvum} \quad (74)$$

Où σ est la conductivité en Siemens par mètre des suspensions de parasites *C. parvum* et $C_{C. parvum}$ la concentration des suspensions de parasites *C. parvum* en oocystes/ μ l.

La relation (74) possède un coefficient de détermination (R^2) de 0.99183.

Ce coefficient est proche de 1, ce qui montre une très bonne linéarité de l'évolution de la conductivité en fonction de la concentration en *C. parvum*.

La pente correspond à l'augmentation théorique de la conductivité d'un microlitre d'eau pour préparation injectable avec l'ajout d'un oocyste.

L'ordonnée à l'origine correspond à la conductivité de l'H₂O ppi servant à la mise en suspension des parasites lors des expériences: $2,20874 \cdot 10^{-4} \text{ S.m}^{-1}$. Cette valeur est proche de celle mesurée avec un conductimètre commercial, le WTW LF 96 Pocket Conductivity meter : $1.65 \times 10^{-4} \text{ S/m}$.

Nous avons démontré que les parasites *C. parvum* relâchent des ions dans l'H₂O ppi. Ce phénomène électrochimique doit présenter un paramètre cinétique. La cinétique de cette libération d'ions n'a pas été ici étudiée puisque tous les échantillons de parasites ont été analysés environ 15h après leur préparation.

Les travaux de Yang précédemment cités présentent une étude cinétique de la libération d'ions par les bactéries dans l'H₂O déionisée (3-20). Cette étude cinétique effectuée sur une durée de 25h montre que les bactéries libèrent continuellement des ions dans l'H₂O déionisée sans que la résistance de la suspension se stabilise.

L'étude de Yang montre que la sensibilité des mesures impédimétriques pourrait être améliorée en laissant les parasites suspendus plus longtemps dans l'H₂O ppi avant leur analyse électrochimique. L'étude de la cinétique de la libération d'ion par les *C. parvum* dans l'H₂O ppi constitue donc une perspective intéressante de ces travaux.

IV.4. Application de la technique d'impédancemétrie à la méthode 1622 de détection des parasites et perspectives

La technique ici présentée est basée sur la mesure de l'impédance électrochimique de suspensions de parasites et permet de détecter rapidement (10 minutes de mesures) la concentration en *C. parvum* dans des microvolumes de solutions faiblement conductrices.

La relation linéaire observée entre la conductivité de la suspension et sa concentration en oocyste peut en effet être utilisée comme abaque de référence pour déterminer la concentration en parasites d'une suspension à partir de la mesure sans marquage de sa conductivité.

Concernant la méthode de détection 1622, la technique d'impédancemétrie constitue ainsi une alternative plus rapide et moins coûteuse à leur comptage effectué manuellement ou par cytométrie de flux. Ces deux méthodes nécessitent en effet un marquage des parasites qui n'est pas nécessaire pour l'impédancemétrie.

De plus, l'usage d'électronique intégrée associée à la mesure assistée par ordinateur pourrait permettre une automatisation de la méthode évitant les problèmes de variabilité dus aux interventions humaines. Cela permettrait également d'effectuer rapidement plusieurs comptages avec des analyses statistiques.

En outre, Yang a précédemment utilisé la séparation immuno-magnétique pour capturer spécifiquement des bactéries de *Salmonelle* mélangées à des bactéries de *E. Coli* avant leur analyse par impédancemétrie (3-20). Il a montré ainsi que la fixation des billes magnétiques ne modifie pas la quantité d'ions relâchés par les bactéries et qu'elle n'interfère pas sur les mesures d'impédance. La méthode 1622 utilise une séparation immuno-magnétique pour capturer spécifiquement les *C. parvum*. L'expérience de Yang suggère qu'avec la méthode d'impédancemétrie, les parasites pourraient être comptés directement après leur capture magnétique, sans avoir à détacher les billes.

Cette technique électrique pourrait donc permettre d'éviter trois étapes délicates de la méthode de détection actuelle : la séparation des oocystes aux billes magnétiques, le marquage immuno-fluorescent et le comptage optique ou par cytométrie de flux. Ainsi la spectroscopie d'impédance électrochimique pourrait être intégrée à la méthode 1622 de l'E.P.A. comme une alternative à trois de ces étapes critiques afin de rendre la détection de *C. parvum* plus rapide, plus simple et moins coûteuse.

Une autre perspective intéressante de ce travail serait l'intégration de la technique d'impédancemétrie dans des laboratoires sur puces ou des μ TAS. Ces systèmes miniaturisés seraient très utiles pour les analyses de potabilité faite directement à la source d'eau, sans avoir besoin d'envoyer des échantillons à un laboratoire d'analyse extérieur.

Enfin, comme cette détection électrique est basée sur la libération d'ions par les parasites dans des conditions hypo-osmotiques, elle pourrait s'appliquer à d'autres types de parasites contaminant l'eau et se présentant sous la forme de kyste comme les *G. Intestinalis* ou les *Entamoeba histolytica*.

V. Détermination de la viabilité des *C. parvum*

V.1. Moyens actuels

La détection des oocystes de *C. parvum* n'est pas suffisante pour déterminer la contamination de l'eau. Un parasite mort n'est pas un parasite infectieux. Concernant une possible contamination parasitaire, l'analyse complète de la potabilité d'une eau doit déterminer la concentration en parasite mais également leur viabilité et leur infectiosité. Il est important de distinguer ici la viabilité de l'infectiosité. En effet, il est possible qu'un parasite vivant ne contamine pas son hôte. Néanmoins la viabilité donne une bonne approximation de l'infectiosité.

Pour le moment, les méthodes actuelles de détection de la viabilité sont les essais d'infections d'animaux (de souris notamment) (3-21) ou le désenkystement *in-vitro* (cf lexique) (3-22).

Les tests sur animaux sont éthiquement controversés et obligent le développement de méthodes alternatives. Le désenkystement nécessite l'incubation des oocystes dans des réactifs acides. Cette incubation reproduit l'effet de l'environnement gastrique et provoque la sortie des sporozoïtes des oocystes. L'estimation de la viabilité se fait ensuite par un comptage précis des oocystes ouverts au microscope optique (Figure 4- 18).



Figure 4- 18 : Photo prise au microscope d'oocystes ayant subi le traitement de désenkystement. L'ocyste plein comprend des sporozoïtes morts. Le vide est un oocyste « fantôme » dont les sporozoïtes ont réagi aux acides et sont sortis.

L'infectivité peut être évaluée par des analyses sur des cultures de cellules (3-23). Toutes ses méthodes restent techniquement compliquées et fastidieuses. Les méthodes électriques pourraient faciliter et améliorer les analyses de viabilité parasitaire.

Goater et al. ont déjà utilisé un microdispositif électrique pour détecter la viabilité de *C. parvum* par électro-rotation (3-18). Cette méthode requiert néanmoins une observation microscopique simultanée qui complique son application concrète pour des analyses haut-débit. Nous nous sommes donc intéressés à employer les techniques d'impédancemétrie pour la détection de la viabilité du *C. parvum*.

V.2. Protocole de préparation des parasites pour les tests de viabilité

Pour étudier la viabilité des parasites, il est évidemment nécessaire d'avoir des parasites vivants. L'échantillon de parasites *C. parvum* commandé chez Waterborne Inc. ne possède pas un taux de viabilité de 100%. La compagnie ne garantit pas de taux de viabilité minimum. Il est donc nécessaire de vérifier ce taux de viabilité avant la première utilisation d'un lot de parasites. La mise en suspension dans le PBS permet entre autre de ralentir la mortalité des parasites.

Pour déterminer la viabilité des parasites, nous avons procédé au test de désenkystement. Voici le protocole détaillé de ce test :

- Préparation du produit de désenkystement en injectant dans du PBS 1X de la trypsine à 2,5 mg/ml et du taurocholate à 7,5 mg/ml.
- Injection des parasites dans la solution à une concentration donnée.
- Incubation du mélange à 37°C pendant 12h.
- Prélèvement de 5µl de l'échantillon.
- Observation microscopique du prélèvement par contraste interférentielle différentielle (méthode Nomarski) avec un grossissement de 600 pour énumérer les oocystes vides et le nombre total d'oocystes.

- Le pourcentage de viabilité est calculé à partir de l'observation d'au moins 500 oocystes selon l'équation :

$$\%_{\text{viabilité}} = \frac{\text{nombre d'oocystes vides}}{\text{nombre total d'oocystes (pleins et vides)}} \times 100 \quad (75)$$

Pour faire varier le taux de viabilité d'un échantillon de parasite et pouvoir ainsi étudier la relation entre la signature électrique des parasites et leur viabilité, il est nécessaire d'en inactiver un certain nombre. Cette inactivation est réalisée par choc thermique. Ce choc thermique a pour effet de tuer les sporozoïtes et donc d'inactiver les oocystes.

Voici le protocole détaillé de cette inactivation :

- Injection des parasites à inactiver dans un tube Eppendorf.
- Le tube Eppendorf est plongé dans un bain marie à 70°C pendant 1 min.
- Directement après, le même tube est placé à 4°C dans de la glace pendant 1 min.

Précisons que pour comparer deux populations de parasites, morts et vivants, il est nécessaire de vérifier que leurs concentrations sont identiques avec une cellule de Malassez.

Le protocole de détermination de la viabilité et l'inactivation des oocystes est schématisé sur la Figure 4- 19 :

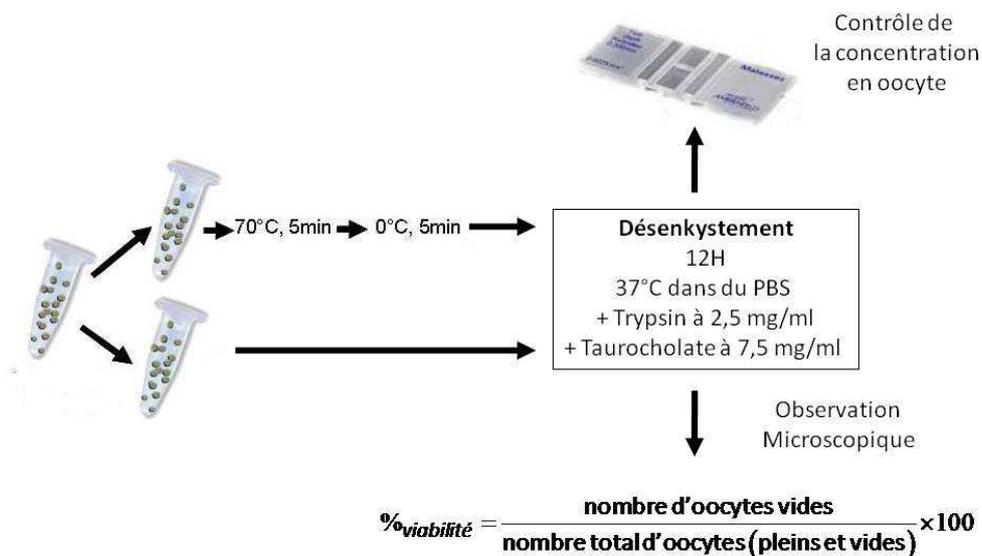


Figure 4- 19 : Schéma présentant le protocole de préparation des suspensions de *C. parvum* dans de l'H₂O ppi pour les tests de viabilité.

V.3. Discrimination de la viabilité par impédancemétrie

V.3.1. Application de faibles tensions

Considérant les complications inhérentes aux tests de viabilité par désenkystement, nous nous sommes intéressés à une méthode électrique de détection de la viabilité laissant les oocystes de *C. parvum* intacts.

La Figure 4- 20 présente les spectres d'impédance de suspension de parasites à 1000 oocystes/ μ l morts et vivants. La suspension de parasites vivants a un taux de viabilité de 70% et celles de morts de 0%. Pour ces mesures, les électrodes micrométriques droites ont été utilisées avec un volume de solutions biologiques de 110 μ l, des puits de 8 mm de diamètre et une tension d'excitation de 10mV.

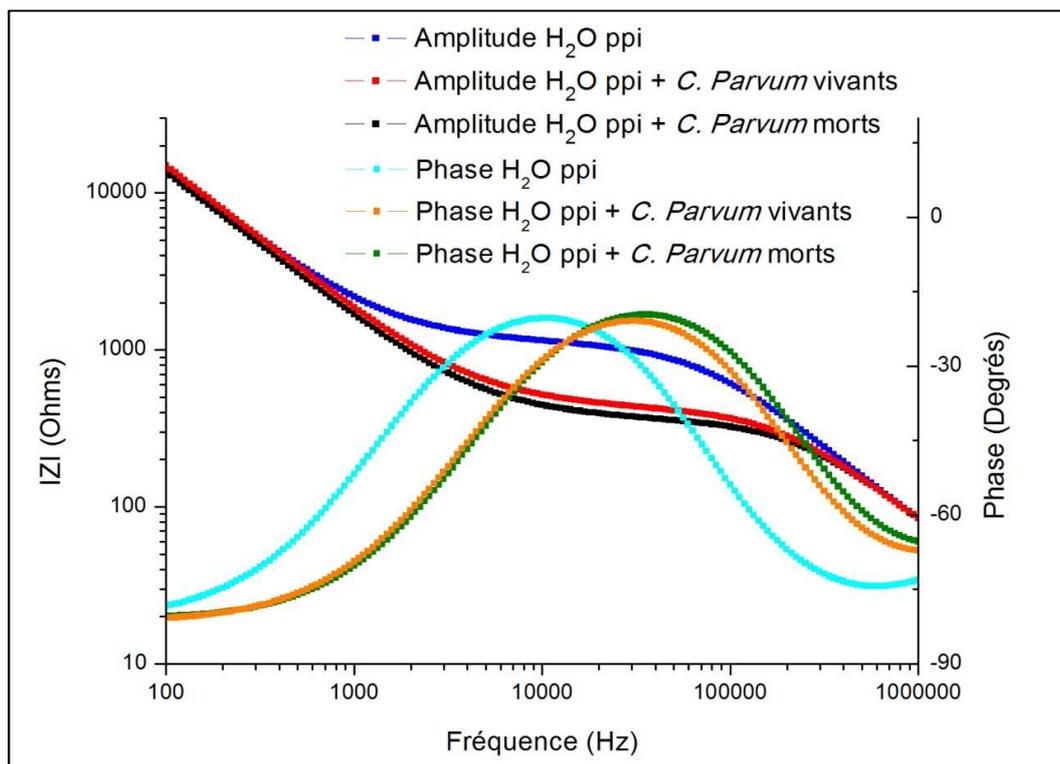


Figure 4- 20 : Spectre d'impédance de suspensions de *C. parvum* vivants (70% de viabilité) et morts (0% de viabilité) dans de l'H₂O ppi à 1000 oocystes/ μ l avec une tension d'excitation de 10mV.

Nous constatons que les parasites morts présentent une impédance plus faible que les vivants. La suspension de parasites vivants possède une résistance $R_{\text{éch}}$ de 435.77 Ω et celle de parasites morts 369.7231 Ω . Pour déterminer ces résistances, nous avons considéré l'impédance des parasites à leur minimum de phase (cf chapitre 3, paragraphe II.1.2.). La suspension de *C. parvum* vivants présente donc une résistance 15 % plus faible que celle de parasites morts. On peut remarquer que les spectres des deux suspensions de parasites ne se distinguent clairement qu'au niveau de leur comportement résistive, entre 10 KHz et 100 KHz.

Il est à noter que le niveau de viabilité des parasites vivants a été mesuré après les mesures électriques et que celui-ci reste inchangé. Les courants électriques ne dégradent donc pas l'état des parasites.

V.3.2. Explication biologique

On voit ici que les parasites morts relâchent plus d'ions que les parasites vivants. Ce résultat correspond à celui obtenu par Jenkins et al. qui ont démontré que les oocystes de *C. parvum* inactivés présentaient une plus grande perméabilité (4-24). Le test de perméabilité au colorant est en effet un indicateur de l'inactivité des parasites morts. Cette plus grande perméabilité pourrait augmenter le flux d'ions circulant vers l'extérieur des oocystes, ce qui expliquerait l'impédance plus faible obtenues avec la suspension de parasites morts.

Les différences observées sont ici obtenues avec des populations de parasites à la viabilité bien distinctes (0 et 70%). Pour analyser quantitativement la viabilité d'échantillons naturels de parasites et distinguer une gamme de viabilité complète, ces différences sont trop faibles.

V.3.3. Application de tensions élevées

Nous avons également effectué des analyses électriques de la viabilité des parasites en appliquant des tensions plus élevées.

Pour réaliser ces tests, nous avons utilisé cette fois des électrodes submillimétriques rondes. Ces électrodes présentent l'avantage d'être plus facile à réaliser que les électrodes micrométriques grâce à leurs dimensions supérieures. Lors de l'application de tensions élevées, elles sont également moins sujettes à l'apparition de court-circuit (cf. chapitre 2, paragraphe II.3.) et présentent donc une meilleure reproductibilité. Nous avons ainsi préféré utiliser ces électrodes pour un gain de temps.

Ces électrodes submillimétriques ont été utilisées avec des puits de 6 mm de diamètre, des tensions d'excitation de 450 mV et des volumes de solutions biologiques de 80µl.

La Figure 4- 21 présente les spectres d'impédance de suspension de parasites à 1000 oocystes/µl morts et vivants. La suspension de parasites vivants a un taux de viabilité de 64% et celles de morts de 0%.

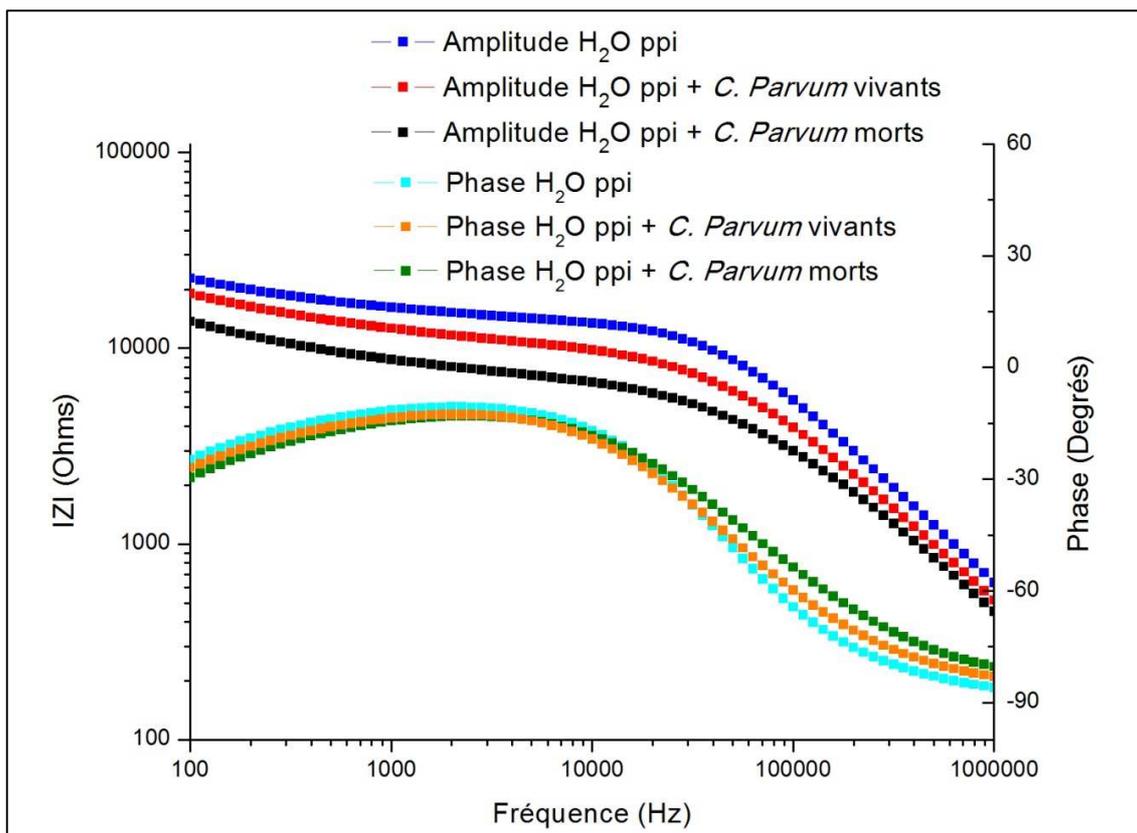


Figure 4- 21 : Spectre d'impédance de suspensions de *C. parvum* vivants (64% de viabilité) et morts (0% de viabilité) dans de l' H_2O ppi à 1000 oocystes/µl avec une tension d'excitation de 450mV.

Les parasites morts présentent encore une impédance plus faible que celle des vivants. La suspension de parasites morts possède une résistance $R_{éch}$ de 11653 Ω et celle de parasites vivants de 7838 Ω . Pour déterminer ces résistances, nous avons considéré l'impédance des parasites à leur minimum de phase (cf chapitre 3, paragraphe II.1.2.). La suspension de *C. parvum* vivants présente donc une résistance 32.7 % plus faible que celles des parasites morts. La différence absolue de résistance est de 3815 Ω . Comme on a pu précédemment remarquer, les spectres des deux suspensions de parasites ne se distinguent clairement qu'au niveau de leur comportement résistif, en dessous des 40 KHz.

Il est à noter que le niveau de viabilité des parasites vivants a été mesuré après les mesures électriques et que celui-ci reste inchangé, malgré les tensions plus élevées.

On constate ici que l'application de tensions plus élevées a permis d'obtenir des plus grandes différences d'impédance entre les suspensions de parasites morts et vivants.

Par rapport à la manipulation précédente (Figure 4- 20), nous avons utilisé une géométrie d'électrode différente (à faible tension, des électrodes de 4 μm droites ; aux tensions élevées, des électrodes sub-millimétriques). Les deux manipulations ne sont donc pas comparables. Faute de temps, nous n'avons pu réaliser les expériences à des tensions d'excitation différentes avec des électrodes semblables.

Cependant, nous avons vu au troisième chapitre, paragraphe II.1.2., que plus les dimensions des électrodes sont grandes, plus les constantes de cellule sont faibles et plus l'impédance de l'eau déionisée mesurée est donc élevée. Dans un milieu faiblement conducteur, pour mesurer des variations de conductance, l'électrolyte doit présenter l'impédance la plus faible possible (4-17). L'impédance de l'eau déionisée mesurée avec les électrodes sub-millimétriques est plus élevée que celle mesurée avec les électrodes micrométriques. Nous pouvons donc supposer que les variations de conduction ici mesurée avec des électrodes sub-millimétriques entre les parasites morts et vivants à des tensions élevées pourraient être encore plus importantes pour des électrodes micrométriques. L'expérience doit cependant être effectuée pour confirmer l'intérêt de l'application de tensions plus élevée.

Pour expliquer la plus grande différence d'impédance obtenue entre les parasites morts et vivants avec des tensions élevées, nous pouvons étudier une éventuelle électroperméabilisation des oocystes.

En effet, la tension transmembranaire U_m d'une cellule sphérique est égale à (3-25):

$$U_m = \frac{3}{2} E_0 R \cos \theta \quad (76)$$

Où E_0 est le champ électrique appliqué, R le rayon de la cellule et θ l'angle entre la direction du champ électrique et le rayon vecteur à un point donnée de la membrane.

La membrane cellulaire devient perméable à partir d'une tension seuil qui a été estimée comprise entre 200 mV et 1V (3-26,3-27,3-28,3-29).

D'après la formule (76), pour un oocyste de 5 μm de diamètre, le champ électrique minimum pour provoquer l'électroperméabilisation de sa membrane est égale à : 53333 V.m^{-1} .

Pour ce calcul, nous avons considéré que $\theta = 0$ de façon à obtenir une valeur minimale de champ électrique.

Concernant la 4^e géométrie d'électrode, l'espace inter-électrode est égale à 7,5 μm (cf chapitre 2, paragraphe I.2.1.1.). Pour une tension d'excitation de 450 mV, dans cette espace inter-électrode, là où le champ électrique est maximum, celui-ci est égal à 60000 V.m^{-1} .

Selon le positionnement et l'orientation des oocystes ($\theta \neq 0$), certains oocystes peuvent donc être soumis à une électroperméabilisation de leur membrane, accentuant ainsi la libération d'ions dans l' H_2O ppi et l'augmentation de sa conductivité. Ceci pourrait expliquer pourquoi une tension plus élevée permet d'accroître les différences observées entre les impédances de parasites morts et vivants.

Pour confirmer cette hypothèse, il serait intéressant d'étudier l'application de champs électriques élevés sur des durées plus longues. Si l'électroperméabilisation est responsable de cette plus grande variation d'impédance, la différence d'impédance entre les morts et les vivants devrait être plus importante pour une plus longue durée d'expérience.

La différence d'impédance semble ici suffisamment importante pour distinguer des gammes de viabilité intermédiaire. L'expérience n'a malheureusement pas pu être menée, faute de temps. Néanmoins, nous voyons ici le potentiel prometteur de l'impédancemétrie pour détecter la viabilité des parasites *C. parvum*.

Le développement de cette technique pourrait donc représenter une future alternative aux méthodes actuelles de désenkystement et de tests sur souriceaux.

Concernant l'utilisation de la méthode de désenkystement pour les tests de viabilité, afin d'étudier une alternative au comptage manuel des oocystes désenkystés ou non, nous avons également analysé électriquement des suspensions de parasites avec différents taux de parasites vivants et donc différents taux de parasites désenkystés, à concentration en oocystes identiques.

Pour effectuer ces manipulations et caractériser ainsi le comptage électrique du désenkystement, il est nécessaire de compter au préalable un nombre très important de parasites (une dizaine de milliers) manuellement et précisément.

La complexité de ce protocole expérimental ne nous a pas permis d'étudier correctement la reproductibilité de ce type de mesure. Les mesures correspondantes à ces analyses ne sont donc pas présentées.

Conclusion du chapitre 4

Dans ce chapitre, nous avons étudié la détection et l'analyse de parasites *C. parvum* par impédancemétrie à l'aide de systèmes électroniques miniaturisés.

Nous avons montré que l'infection de ce parasite représente un problème écologique majeur puisqu'il contamine de nombreuses sources d'eau, notamment dans les pays sous développés. Nous avons vu que les méthodes actuelles de détection de sa présence et de sa viabilité sont compliquées et difficilement exportables dans les pays en développement.

Nous avons présenté le protocole de préparation et de mesure des parasites que nous avons utilisé pour obtenir des mesures d'impédance biologique stables et reproductibles.

Nous avons ensuite étudié l'effet du milieu de suspension sur la détection électrique des parasites et nous avons vu que celle-ci nécessite un milieu faiblement conducteur.

Nous avons par la suite détecté différentes concentrations de *C. parvum* suspendus dans de l'H₂O ppi. Nous avons vu que le bioMEMS ici présenté peut détecter une concentration minimum de 100 oocystes/ μ l. En modélisant les différents spectres d'impédance obtenus avec un circuit équivalent, nous avons vu que la conductance de l'H₂O ppi est le seul paramètre électrique modifié par l'injection des parasites. En utilisant la constante de cellule du système précédemment déterminée, nous avons pu montrer la relation linéaire existant entre la conductivité de l'H₂O ppi et sa concentration en parasites. Cette augmentation de la conductivité de l'H₂O ppi avec la présence des parasites peut s'expliquer par une libération d'ions consécutive aux conditions hypo-osmotiques subies par les parasites. Nous avons enfin montré comment cette méthode électrique peut permettre de remplacer trois étapes critiques de la méthode actuelle de détection, la méthode 1622.

Enfin nous avons étudié la viabilité des parasites par impédancemétrie. Nous avons montré que l'application d'une faible tension permet bien de distinguer par impédancemétrie deux populations de parasites morts et vivants avec une différence de 15% alors que l'application d'une tension élevée permet d'augmenter cette différence pour atteindre les 30%. Nous avons ainsi démontré le potentiel des méthodes d'impédancemétrie pour l'analyse de la viabilité des parasites *C. parvum*.

Références du chapitre 4

- 4-1. Intergovernmental Panel on Climate Change (IPCC) 4th report. Available from: http://www.ipcc.ch/publications_and_data/publications_ipcc_fourth_assessment_report_wg2_report_impacts_adaptation_and_vulnerability.htm
- 4-2. United Nations Development Program, 2006. Human Development Report 2006, United Nations Development Program. Available from: <http://hdr.undp.org/en/reports/global/hdr2006/>
- 4-3. Mac Kenzie WR, Hoxie NJ, Proctor ME, Gradus MS, Blair KA, Peterson DE, et al. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 1994 Jul 21;331(3):161-167.
- 4-4. Karanis P, Kourenti C, Smith H. Waterborne transmission of protozoan parasites: a worldwide review of outbreaks and lessons learnt. *J Water Health.* 2007 Mar;5(1):1-38.
- 4-5. Center for Disease Control and Prevention, Cryptosporidiosis Fact Sheet for the General Public. Available from: <http://www.cdc.gov/crypto/>
- 4-6. Petersen C. Cryptosporidiosis in patients infected with the human immunodeficiency virus. *Clin. Infect. Dis.* 1992 Déc;15(6):903-909.
- 4-7. DuPont HL, Chappell CL, Sterling CR, Okhuysen PC, Rose JB, Jakubowski W. The infectivity of *Cryptosporidium parvum* in healthy volunteers. *N. Engl. J. Med.* 1995 Mar 30;332(13):855-859.
- 4-8. Okhuysen PC, Chappell CL, Crabb JH, Sterling CR, DuPont HL. Virulence of three distinct *Cryptosporidium parvum* isolates for healthy adults. *J. Infect. Dis.* 1999 Oct;180(4):1275-1281.
- 4-9. U.S. EPA, 2001a. Method 1622: *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. EPA 821-R01-026.
- 4-10. U.S. EPA, 2001b. Method 1623: *Giardia* and *Cryptosporidium* in water by filtration/IMS/FA. United States Environmental Protection Agency. Office of Water, Washington, DC. EPA 821-R01-025.
- 4-11. DiGiorgio CL, Gonzalez DA, Huitt CC. *Cryptosporidium* and *Giardia* Recoveries in Natural Waters by Using Environmental Protection Agency Method 1623. *Appl Environ Microbiol.* 2002 Déc;68(12):5952-5955.
- 4-12. Kang CD, Cao C, Lee J, Choi IS, Kim BW, Sim SJ. Surface plasmon resonance-based inhibition assay for real-time detection of *Cryptosporidium parvum* oocyst. *Water Res.* 2008 Mar;42(6-7):1693-1699.

- 4-13. Campbell GA, Mutharasan R. Near real-time detection of *Cryptosporidium parvum* oocyst by IgM-functionalized piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever biosensor. *Biosens Bioelectron.* 2008 Fév 28;23(7):1039-1045.
- 4-14. Taguchi T, Arakaki A, Takeyama H, Haraguchi S, Yoshino M, Kaneko M, et al. Detection of *Cryptosporidium parvum* oocysts using a microfluidic device equipped with the SUS micromesh and FITC-labeled antibody. *Biotechnol. Bioeng.* 2007 Fév 1;96(2):272-280.
- 4-15. Spegel C, Heiskanen A, Skjolding L, Emnéus J. Chip Based Electroanalytical Systems for Cell Analysis. *Electroanalysis.* 2008;20(6):680-702.
- 4-16. Linderholm P, Renaud P. Comment on "AC frequency characteristics of coplanar impedance sensors as design parameters" by Jongin Hong, Dae Sung Yoon, Sung Kwan Kim, Tae Song Kim, Sanghyo Kim, Eugene Y. Pak and Kwangsoo No, *Lab Chip*, 2005, 5, 270. *Lab Chip.* 2005 Déc;5(12):1416-1417; author reply 1418.
- 4-17. Timmer B, Sparreboom W, Olthuis W, Bergveld P, Berg AVD. Optimization of an electrolyte conductivity detector for measuring low ion concentrations. *Lab Chip.* 2002;2(2):121-124.
- 4-18. Dalton C, Goater AD, Burt JPH, Smith HV. Analysis of parasites by electrorotation. *J. Appl. Microbiol.* 2004;96(1):24-32.
- 4-19. Park JH, Schofield PJ, Edwards MR. *Giardia intestinalis*: Volume Recovery in Response to Cell Swelling. *Experimental Parasitology.* 1997 Mai;86(1):19-28.
- 4-20. Yang L. Electrical impedance spectroscopy for detection of bacterial cells in suspensions using interdigitated microelectrodes. *Talanta.* 2008 Fév 15;74(5):1621-1629.
- 4-21. Certad G, Ngouanesavanh T, Guyot K, Gantois N, Chassat T, Mouray A, et al. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infectious Agents and Cancer.* 2007;2(1):22.
- 4-22. Guyot K, Follet-Dumoulin A, Gireaudot-Liepmann M, Verdier R, Caillez J, Dei-Cas E. Molecular Tool's Contribution to the Detection of *Cryptosporidium*. *Journal of Eukaryotic Microbiology.* 2001;48(s1):23s-23s.
- 4-23. Slifko T, Friedman D, Rose J, Jakubowski W. An in vitro method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. *Appl. Environ. Microbiol.* 1997 Sep 1;63(9):3669-3675.
- 4-24. Jenkins MB, Anguish LJ, Bowman DD, Walker MJ, Ghiorse WC. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl Environ Microbiol.* 1997 Oct;63(10):3844-3850.
- 4-25. Pavlin M, Miklavcic D. Theoretical and experimental analysis of conductivity, ion diffusion and molecular transport during cell electroporation--relation between short-lived and long-lived pores. *Bioelectrochemistry.* 2008 Nov;74(1):38-46.

- 4-26. Zimmermann U. Electric field-mediated fusion and related electrical phenomena. *Biochim. Biophys. Acta.* 1982 Nov 30;694(3):227-277.
- 4-27. Tsong TY. Electroporation of cell membranes. *Biophys J.* 1991 Aoû;60(2):297-306.
- 4-28. Weaver J, Chizmadzhev Y. Theory of electroporation: A review. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics.* 1996 Déc;41(2):135-160.
- 4-29. Teissié J, Rols MP. An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electropermeabilization. *Biophys. J.* 1993 Jul;65(1):409-413.

Cinquième chapitre:
BioMEMS pour l'étude de l'interaction
cellule-protéine par impédancemétrie

Ce chapitre présente les travaux d'impédancemétrie effectuée avec les bioMEMS présentés au second chapitre pour l'analyse de l'interaction cellule-protéine.

Nous décrivons d'abord les limitations des outils actuels utilisés pour la détection des interactions cellule-protéine. Nous présentons ensuite les modèles de protéine et de cellule utilisées et de protéines : la lactoferrine (Lf) et les cellules d'ovaires de hamster chinois (CHO).

Dans une première partie, nous montrons les expériences réalisées sur les CHO avec les dispositifs à puits. Nous étudions d'abord les effets éventuels spécifiques de la culture de cellules *in-vitro* dans des bioMEMS. Le protocole de préparation de cellules est présenté. Les différentes géométries d'électrodes des dispositifs à puits sont comparées. Les interfaces développées spécialement pour l'étude comparative et continue des cultures cellulaires sont ensuite présentées. Les influences du changement de milieu et de la densité cellulaire sur l'impédance sont étudiées. La modélisation des impédances des cultures est décrite. L'analyse de l'interaction CHO-Lf par impédance est présentée.

Dans une seconde partie, nous présentons les expériences réalisées avec le dispositif microfluidique. Le dispositif et son matériel de mesure sont détaillés. Les différents protocoles de stérilisation, d'injection des cellules et de leur culture sont présentés et discutés. La croissance cellulaire est ensuite effectuée et suivie par impédancemétrie. Une modélisation des mesures avec un circuit électrique équivalent est expliquée. Les expériences effectuées sur l'interaction de la CHO et de la Lf dans les microcanaux sont finalement présentées.

I. Enjeux et intérêts de l'analyse cellulaire *in-vitro* par techniques interdisciplinaires.

I.1. Outils actuels pour l'analyse de l'interaction cellule protéine.

Il existe de nombreuses techniques biochimiques pour étudier l'interaction de protéines avec des protéines membranaires. La plupart utilise des marqueurs. L'inconvénient principal de ces marqueurs a déjà été évoqué dans le premier chapitre, il concerne leur influence biochimique difficilement analysable et incontrôlée sur le trafic informationnel intra ou inter cellulaire. Les marqueurs fluorescents principalement utilisés sont les immunomarqueurs (cf lexique) et la GFP (cf lexique) qui ont été décrits au premier chapitre. Malgré certains travaux qui montrent la potentielle influence de ces marqueurs sur l'environnement cellulaire (5-1,5-2,5-3,5-4,5-5,5-6,5-7), leur utilisation se fait toujours avec le postulat qu'ils n'interviennent pas dans l'interaction étudiée.

Différentes méthodes existent pour détecter cette fluorescence. Le cytomètre en flux (cf lexique) est l'une d'elle. Elle permet d'automatiser la détection de la fluorescence des cellules et de faire plus rapidement des analyses statistiques.

Le cytométrie de flux nécessite cependant de détacher les cellules de leur substrat pour les suspendre dans une solution physiologique au moment de la détection de la fluorescence. La fluorescence n'est donc pas mesurée dans des conditions de culture *in-vitro* (cf lexique). De plus, les analyses cinétiques sont complexes à mettre en œuvre de part la préparation des cellules pour leur injection dans le cytomètre.

La résonance de plasmons de surface (SPR) (cf lexique) est une technique d'étude sans marquage des interactions protéiniques plus récemment implantée dans les laboratoires (vers le début des années 90). Cette méthode optique a déjà été décrite en préambule. Elle permet des analyses quantitatives automatiques et parallèles (selon certains modèles de SPR) de l'interaction ligand-protéine.

Les protéines des cellules cultivées *in-vitro* sont purifiées et injectées via des canaux microfluidiques vers la surface fonctionnalisée avec les anticorps spécifiques. Là encore,

l'interaction cellule-protéine n'est donc pas quantifiée dans son environnement cellulaire régulier. Yanase et al. ont néanmoins réussi à fixer directement des cellules de basophile mises en suspension à la surface d'un biodétecteur au sein d'un système SPR (5-8). Cette expérience montre qu'il est donc possible d'étudier directement les interactions protéiniques des cellules d'étude par SPR mais que celles-ci ne peuvent alors être conservées dans leurs conditions de culture *in-vitro* régulières.

La fluorescence peut aussi être observée à l'aide de la microscopie confocale à fluorescence (cf lexique). Cette technique est simple d'accès et donne des observations très précises avec des échantillons bien préparés.

Elle peut présenter néanmoins l'inconvénient de nécessiter une observation humaine scrupuleuse qu'il peut être difficile d'automatiser. Il est également courant d'avoir des recouvrements fluorescents entre des émissions spécifiques et non spécifiques. Les fluophores ne permettent pas non plus d'études sur de longues périodes puisque les marqueurs perdent vite de leur intensité (phénomène de blanchiment ou *bleaching* en anglais). Les études cinétiques des interactions sont difficilement quantifiables et les analyses statistiques sont lourdes à mettre en place.

Les protéines étudiées peuvent aussi être fixées par des marqueurs radioactifs. L'évaluation de la fixation se fait en mesurant la radioactivité de la lyse des cellules. Cette analyse est donc destructive et ne se fait donc pas en temps réel sur la cellule.

Nous avons donc vu que, exceptée la microscopie confocale, les techniques d'étude de l'interaction protéique cellulaire actuelles ne caractérisent pas ces liaisons dans un environnement cellulaire intact. Certaines de ces méthodes permettent pourtant des mesures à haut débit, ce qui est difficilement réalisable par microscopie.

Concernant les dispositifs impédimétriques intégrés, nous avons vu au premier chapitre que de nouveaux types de micro-dispositifs électroniques récemment commercialisés sont des capteurs à base de cellule (cf lexique) (5-9,5-10,5-11,5-12,5-13,5-14,5-15,5-16,5-17,5-18).

Ces analyses consistent à étudier l'évolution d'une population de cellules exposée à différents réactifs, souvent toxiques. Elles permettent d'étudier l'interaction de cellules biologiques avec différentes protéines cytotoxique (cf lexique) provoquant l'apoptose (cf lexique) de ces cellules. En intégrant ces biodétecteurs électriques, il est possible de mesurer en temps réel le

métabolisme d'une population de cellules à haut débit et de façon automatique. Les analyses à base de cellule sont très utiles pour les études pharmaceutiques puisqu'elles permettent dans un premier temps de faire un tri rapidement dans une bibliothèque importante de drogues ou de vérifier la biocompatibilité de produits ou solutions destinés à l'homme (5-19). Elles permettent également des analyses quantitatives précises servant à déterminer des coefficients critiques pour les études toxicologiques tels que l' IC_{50} (cf lexique). L'effet mesuré ici est l'inhibition de la prolifération cellulaire, un phénomène qui est donc facilement mesurable par les techniques électriques ou optiques.

Nous pouvons également évoquer l'étude par impédancemétrie de facteur de croissance (5-20). Comme les drogues cytotoxiques, l'injection de facteur de croissance a un effet radical sur les cellules puisqu'ils stimulent la croissance et la prolifération cellulaire. Se rapprochant de ce type de mesures, nous pouvons également citer les études par impédancemétrie des récepteurs membranaires couplés aux protéines G (cf lexique) (5-21,5-22). Les protéines G provoquent une cascade de réactions modifiant profondément le métabolisme de la cellule, notamment le transport d'enzymes, le transfert d'ions via les canaux ioniques, la transcription, la motilité et la contractilité cellulaire. Encore une fois, les réactions cellulaires liées aux protéines G sont manifestes et sont donc caractérisées, comme les drogues cytotoxiques, par des EC_{50} (cf lexique) et IC_{50} .

Seulement, les études biologiques moins applicatives et plus fondamentales ont besoin d'outils permettant une analyse plus fine de l'interaction protéine-cellule. Les exemples précédemment cités s'intéressent uniquement à l'interaction cellulaire de composants ayant des effets radicaux sur la cellule comme son apoptose ou sa contractilité. Certaines protéines n'ont pas d'effet aussi flagrant mais sont impliquées dans des cascades de réactions biochimiques intracellulaires dans lesquelles leur rôle direct ou indirect est difficilement distinguable. Pour étudier en amont la potentielle utilisation de telles protéines, il est important de connaître les protéines cellulaires avec lesquelles elles interagissent au niveau de la membrane. En effet, la connaissance de ces récepteurs permet de comprendre le mécanisme de transduction signalétique des protéines d'intérêt et de pouvoir ainsi contrôler spécifiquement leur adhésion cellulaire.

Pour caractériser ces interactions et distinguer le rôle des différents récepteurs, il est important de quantifier l'affinité avec laquelle une protéine se fixe sur un ligand. Ce paramètre

correspond à la constante de dissociation K_d (cf lexique). Comme ce type d'interaction ténue ne produit pas de modifications cellulaires remarquables, le seul effet qui peut être détecté et utilisé pour la détermination des concentrations d' EC_{50} ou d' IC_{50} est l'interaction protéine-cellule elle-même et non ses conséquences sur le métabolisme cellulaire.

Les bons résultats obtenus dans l'analyse toxicologique par impédancemétrie montrent que cette technique permet d'étudier la physiologie cellulaire *in-vitro*. Les mesures électrochimiques pourraient donc être appliquées également à l'étude d'interactions protéiques plus discrètes que celles provoquant l'apoptose cellulaire. Nous nous sommes donc intéressés au développement d'un nouvel outil d'analyse permettant l'étude quantitative de l'interaction cellule-protéine par impédancemétrie.

I.2. Modèle biologique d'étude

I.2.1. Choix de la protéine

Pour étudier les interactions cellule-protéine, nous avons choisi la protéine de Lactoferrine (Lf). La Lf est une glycoprotéine connue pour son affinité avec le fer. La Lf n'appartient pas au système immunitaire mais joue un rôle primordial dans la défense contre les corps étrangers. Elle possède également des propriétés lytiques qui lui permettent de dégrader les particules étrangères lorsqu'elle s'y fixe. Son action précise sur les cellules n'est pas encore parfaitement connue. Certains travaux ont montré qu'une fois internalisée, la Lf se fixe à une séquence précise de l'ADN et active la transcription de gènes spécifiques (5-23). Ceci suggère que la Lf agirait sur le génome pour modifier certaines fonctions de la cellule comme l'arrangement de son cytosquelette. Il a été aussi rapporté que la Lf module la migration, la maturation et les fonctions des cellules immunitaires (5-24). Son action sur les cellules semble donc bien plus discrète que celle provoquée par des agents cytotoxiques ou des facteurs de croissance, tout en ayant au final des implications physiologiques critiques. L'étude fondamentale des interactions cellulaires de la Lf représente donc un intérêt énorme pour l'immunologie.

La Lf est abondamment exprimée par l'organisme humain. Elle est issue de cellules épithéliales qui l'expriment dans la plupart des sécrétions exocrines (cf lexique), particulièrement le lait. On remarque que le taux de Lf augmente de façon très importante dans l'organisme lors d'inflammation et dans certaines pathologies, ce qui prouve encore une fois son implication dans la défense de l'organisme.

I.2.2. Choix de la cellule d'étude

Pour étudier l'interaction cellulaire de la Lf, nous avons choisi les cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO pour Chinese Hamster Ovary cells en anglais). Les CHO sont des cellules couramment utilisées en biologie et en recherche médicale car elles sont faciles à cultiver et leur croissance est rapide. Les CHO sont commandées à l'American Type Culture Collection (ATCC). Les modèles classiques de CHO sont les CHO-K1.

Les CHO-K1 possèdent les principaux récepteurs de la Lf, à savoir les chaînes sulfatées de protéoglycanes et la nucléoline, qui représentent respectivement et approximativement 80% et 20% des récepteurs membranaires de la protéine. Une fois, la protéine fixée à ces récepteurs, elle est endocytée vers l'intérieur de la cellule. Lors de sa fixation aux protéoglycanes, la Lf est présentée aux récepteurs de lipoprotéine (LRP) qui vont l'internaliser. Cette endocytose déclenche une réaction signalétique intracellulaire. Si la Lf se fixe à la nucléoline, les deux protéines sont internalisées par une vésicule et dirigées vers le noyau de la cellule (5-25). Il est à préciser que les travaux de D. Legrand ont montré que l'endocytose de la Lf nécessite la présence simultanée des deux types de récepteurs, à savoir les protéoglycanes et la nucléoline (5-26).

Les interactions membranaires de la Lf avec les cellules CHO-K1 sont résumées sur la Figure 5- 1.

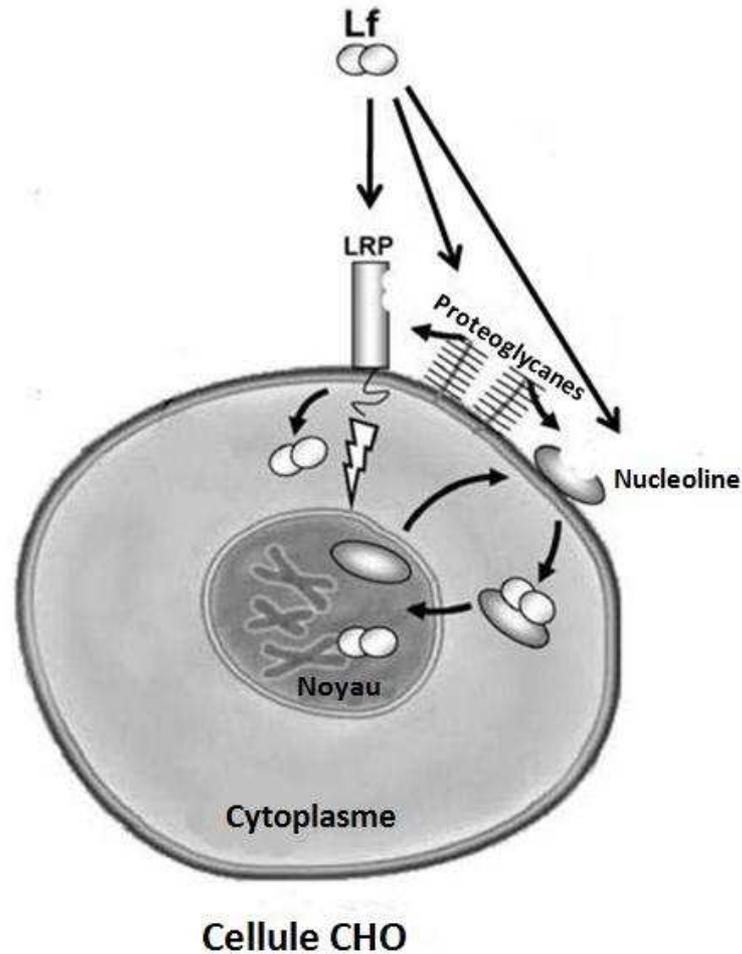


Figure 5- 1 : Représentation schématique des interactions moléculaire de la Lf avec les récepteurs membranaires des CHO-K1, adaptée de (5-25).

La connaissance de ces récepteurs membranaires (les protéoglycanes et la nucléoline) met en évidence un autre intérêt de l'étude la Lf. Il a été en effet montré que le VIH s'attache à la membrane cellulaire par une interaction coordonnée avec les protéoglycanes de sulfate d'héparane et la nucléoline (5-27). Ainsi la fixation de la Lf sur ces récepteurs membranaires peut empêcher l'adhésion cellulaire du VIH. La Lf pourrait ainsi être utilisée comme un agent inhibiteur du VIH. Certaines études ont en effet déjà montré que la Lf avait un effet inhibiteur sur l'adhésion du VIH (5-26,5-28,5-29).

Un autre intérêt d'utiliser les CHO pour étudier l'interaction cellulaire de la lactoferrine est que l'ATCC fournit également deux autres types de cellules CHO mutantes, à savoir les CHO-677 et les CHO-618. Ces autres lignées cellulaires peuvent être intéressantes pour notre étude car elles présentent une proportion de récepteurs membranaires de la Lf différente de la

lignée K1. Les CHO-677 n'expriment pas les récepteurs sulfate d'héparane qui constituent l'une des deux classes de protéoglycanes. Les CHO-618 sont totalement déficientes en protéoglycanes, et présentent donc uniquement la nucléoline comme récepteurs de la Lf.

Les différentes lignées de CHO possédant des quantités différentes de récepteurs membranaires de la Lf, elles présentent des constantes de dissociation à l'équilibre distinctes :

- $K_d = 2,6 \mu\text{M}$ pour les CHO-K1
- $K_d = 2,1 \mu\text{M}$ pour les CHO-677
- $K_d = 430 \text{ nM}$ pour les CHO-618

Si l'analyse de la fixation de la Lf sur les CHO-K1 par impédancemétrie donne des bons résultats, les différentes lignées de CHO permettraient d'évaluer la précision de cette méthode pour des cellules présentant des affinités plus réduites et éventuellement de déterminer et de distinguer les différentes constantes de dissociation associées.

Après avoir présenté les intérêts de l'étude de l'interaction CHO-Lf, nous allons maintenant présenter les résultats obtenus lors des manipulations effectuées avec le dispositif à puits.

II. Etude de l'interaction CHO-Lf avec les dispositifs à puits.

Toutes les manipulations sur les CHO ont été effectuées à l'unité de glycobiologie structurale et fonctionnelle (UMR 8576) de l'U.S.T.L. en collaboration avec Dominique Legrand. Celui-ci a effectué toutes les cultures de cellule sous une hotte à flux laminaires dans des conditions stériles et a entretenu les cultures des différentes lignées de CHO tout au long des expériences. Celui-ci a également réalisé l'injection des cellules dans tous les microdispositifs. Les différentes expériences décrites dans ce chapitre ont été permises grâce à sa collaboration.

Les cellules de CHO ont été marquées par fluorescence avec de la GFP afin de faciliter leurs observations.

II.1. Culture cellulaire

II.1.1. Etude des conditions de culture cellulaire spécifiques aux bioMEMS

Les mesures d'impédance des CHO dans les microdispositifs nécessitent des conditions de culture différentes de celles classiquement utilisées pour la culture cellulaire en boîtes de Pétri. Nous avons étudié qualitativement l'influence des différents paramètres de culture en observant au microscope l'état de cellules cultivées selon ces conditions.

II.1.1.1. Influence du substrat de culture

Pour valider la culture des CHO sur les électrodes, nous avons comparé une culture de cellules CHO-K1 effectuée sur les électrodes submillimétriques et une culture sur un substrat de verre vierge. Les cultures sur les électrodes ont été faites sans mesures électriques. Le but de cette manipulation est de vérifier si les CHO poussent correctement sur l'or et si le relief et l'épaisseur des électrodes (150 nm) influencent leur croissance. Les deux cultures se sont révélées identiques, à savoir confluentes et avec des cellules en bon état. Le motif des électrodes ne perturbe donc pas la culture des cellules.

II.1.1.2. Validation de l'incubateur de culture

A cause des risques de contamination liés à la connexion des câbles au dispositif de culture, les bioMEMS ne peuvent être placés au sein de l'incubateur de culture commun de l'UMR 8576. Cet incubateur contient les cultures cellulaires d'autres membres de l'équipe qui ne sont pas impliqués dans le projet. Nous n'avons pas voulu prendre le risque de contaminer leurs cultures au cours de nos manipulations d'impédancemétrie.

D. Legrand a donc du concevoir un incubateur de culture spécifique. Pour cela, il a récupéré un caisson métallique hermétique qu'il a placé dans une étuve qui sert à contrôler la température de culture. Pour augmenter l'inertie thermique du système, plusieurs dizaines de litres d'eau ont été placés dans des conteneurs au sein de l'étuve.

Pour apporter le CO₂ nécessaire aux cellules (teneur en CO₂ d'environ 5%), un mélange d'acide citrique et de bicarbonate de soude est inséré dans le caisson métallique où est placé le dispositif contenant les cellules.

Une photo de cet incubateur est présentée sur la Figure 5- 2.

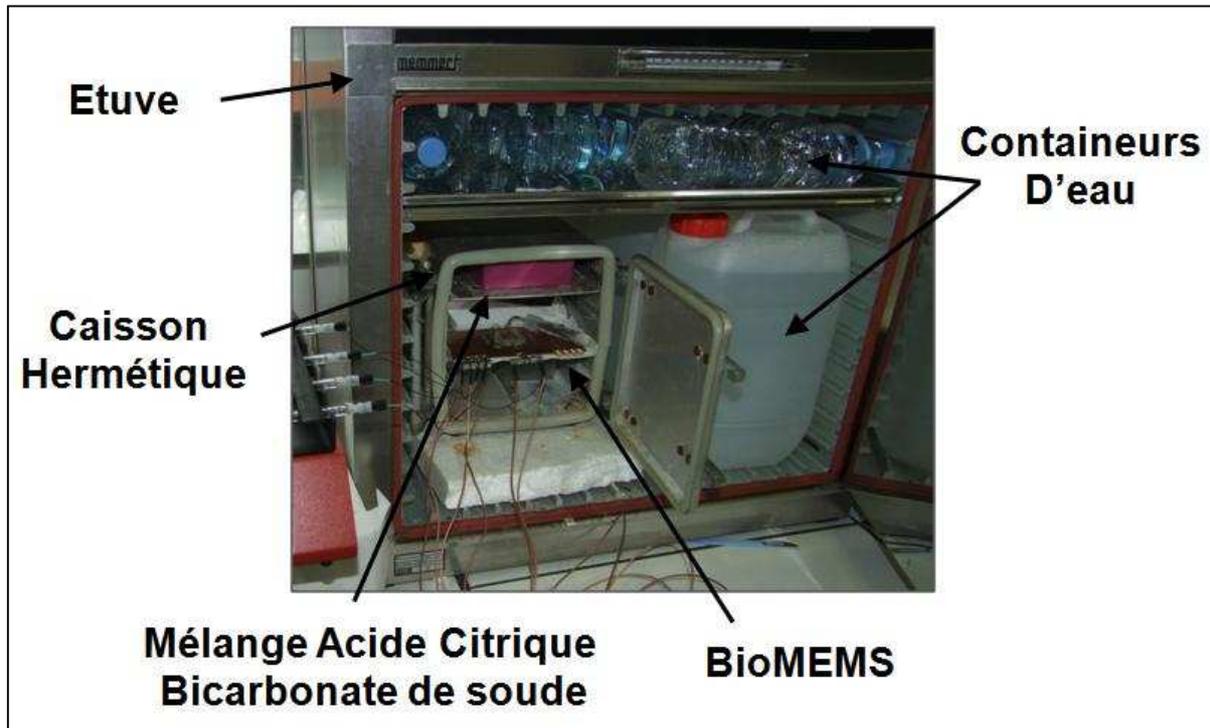
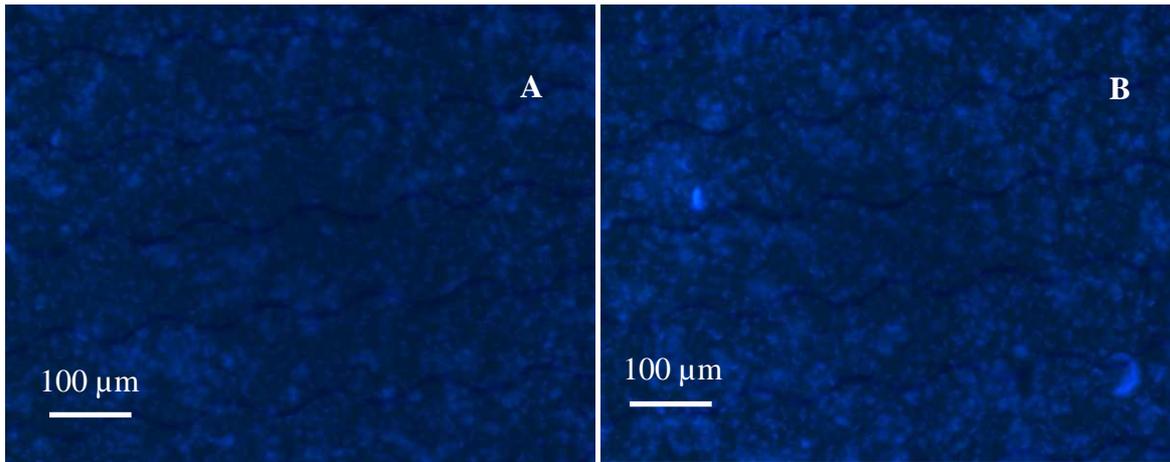


Figure 5- 2 : Photo de l'incubateur de culture des CHO dédié aux manipulations d'impédancemétrie.

Pour vérifier que la validité de cet incubateur pour les cultures de CHO-K1, nous avons effectué une culture de cellule dans cet incubateur spécifique et une culture dans l'incubateur commun de l'équipe du laboratoire de glycobioologie, l'incubateur servant habituellement aux cultures de CHO. Les deux cultures de cellule ont été réalisées sur des électrodes sub-millimétriques, sans aucunes mesures d'impédance.

La Figure 5- 3 montre le résultat de chaque culture, 16h après leur injection.



**Figure 5- 3 : Photo prise au microscope confocal à fluorescence des cultures de CHO
A) dans un incubateur classique, B) dans l'incubateur « fait-maison ».**

La fluorescence observée sur la Figure 5- 3 est la fluorescence naturelle des CHO. On remarque également que les électrodes sub-millimétriques sont visibles au travers du tapis cellulaire.

Nous voyons sur ces photos que les cellules cultivées dans les deux incubateurs sont confluentes et en bon état. L'incubateur cellulaire spécifique peut donc être utilisé pour nos cultures cellulaires.

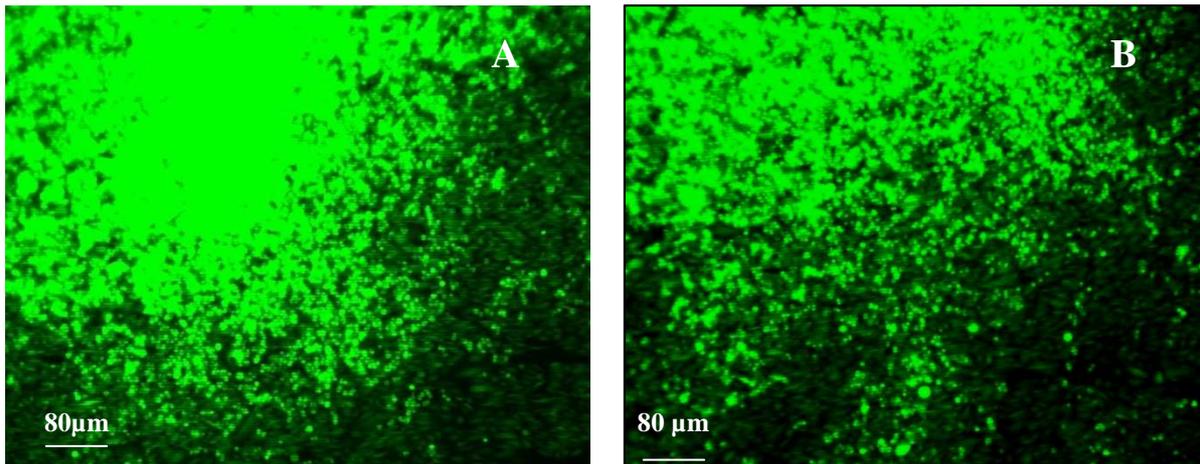
II.1.1.3. Effet des mesures électriques

Afin de valider l'utilisation des mesures électriques pour l'enregistrement de la croissance cellulaire, nous avons comparé des cultures cellulaires effectuées sans appliquer de courants électriques et des cultures cellulaires dont l'impédance a été mesurée pendant la croissance. Les cultures ont été effectuées sur des électrodes micrométriques droites. Les mesures d'impédance ont été réalisées avec une tension minimale d'excitation de 10mV.

Pour analyser l'effet des mesures électriques, nous avons enregistré en parallèle les spectres d'impédance de quatre cultures cellulaires effectuées dans différents puits à l'aide du circuit relais présenté au deuxième chapitre. Ces spectres possèdent 201 points de mesure et s'étendent de 100 Hz à 1MHz.

Les mesures d'impédance ont été effectuées pendant dix heures d'affilée avec une mesure sur une même culture toutes les 3 minutes. Les observations microscopiques des cellules ont été effectuées six heures après la fin des mesures.

La Figure 5- 4 présente le résultat des deux cultures obtenues sur les électrodes micrométriques droites, 16h après leur injection dans les micropuits.



**Figure 5- 4 : Photo prise au microscope confocal à fluorescence des cultures de CHO.
A : avec mesures électriques B : sans mesures électriques.**

Nous voyons sur les photos de la Figure 5- 4. que les tapis sont confluents et les cellules correctement allongées. Dans les conditions dans lesquelles les mesures électriques ont été effectuées, aucune modification de la croissance cellulaire n'est observée.

II.1.2. Protocole de préparation des cellules

II.1.2.1. Premier protocole de préparation des cellules

Le premier protocole de préparation des cellules utilisé a été le suivant :

- Stériliser les micro-dispositifs à l'alcool, séchage et lavage avec du milieu F12/K (avec 10% de sérum de veau fœtal).
- Nettoyer le tapis cellulaire à confluence (cf lexique) cultivé dans les boîtes de Pétri avec 2 ml de Trypsine/EDTA pour les détacher du substrat. Retirer immédiatement la Trypsine/EDTA.

- Placer dans l'incubateur les boîtes de Pétri contenant les cellules avec 1ml de nouvelle Trypsine pendant 5min à 37°C.
- Prélever la suspension de cellule dans la boîte de Pétri et l'injecter dans un tube avec 3ml de nouveau milieu cellulaire F12/K (avec 10% de sérum de veau fœtal).
- Centrifuger le tube pendant 5min à 1100 RPM puis retirer le surnageant de Trypsine.
- Suspendre à nouveau les cellules dans un volume V_1 de milieu F12/K frais.
- Injecter un volume V_2 de la suspension de cellule dans chaque puits et placer le dispositif dans l'incubateur.

II.1.2.2. Variation du nombre de cellules injectées dans les puits

Nous avons étudié l'effet du nombre de cellules injectées dans les puits. Une fois injectées dans les puits, ces cellules recouvrent une certaine surface. Le nombre de cellules injectées dans les puits a été calculé en fonction de cette surface. Il détermine ainsi un taux de recouvrement de la surface au fond des puits (i.e. des électrodes).

Par exemple, si les cellules recouvrent la totalité de la surface au fond des puits, elles sont en situation de confluence. Le taux de recouvrement de la surface au fond des puits par les cellules est alors de 100%.

Pour réaliser nos cultures cellulaires dans les puits, nous utilisons des cultures à confluence avec N_1 cellules dans des boîtes de Pétri présentant une surface S_1 . Ces tapis cellulaires sont constitués d'une monocouche de cellules.

Pour déterminer le nombre de cellules N_2 nécessaire à recouvrir une surface S_2 au fond des puits, nous effectuons une règle de trois en fonction du nombre de cellules N_1 constituant le tapis cellulaire à confluence dans les boîtes de Pétri:

$$N_2 = \frac{N_1}{S_1} \times S_2 \quad (77)$$

Le nombre N_2 de cellules injectées dans les puits peut être ajusté avec le volume V_1 de repiquage des cellules.

Le schéma suivant représente les quatre derniers étapes du protocole décrit au paragraphe II.1.2.1.. L'ajustement du nombre de cellules injectées se fait pendant ces étapes :

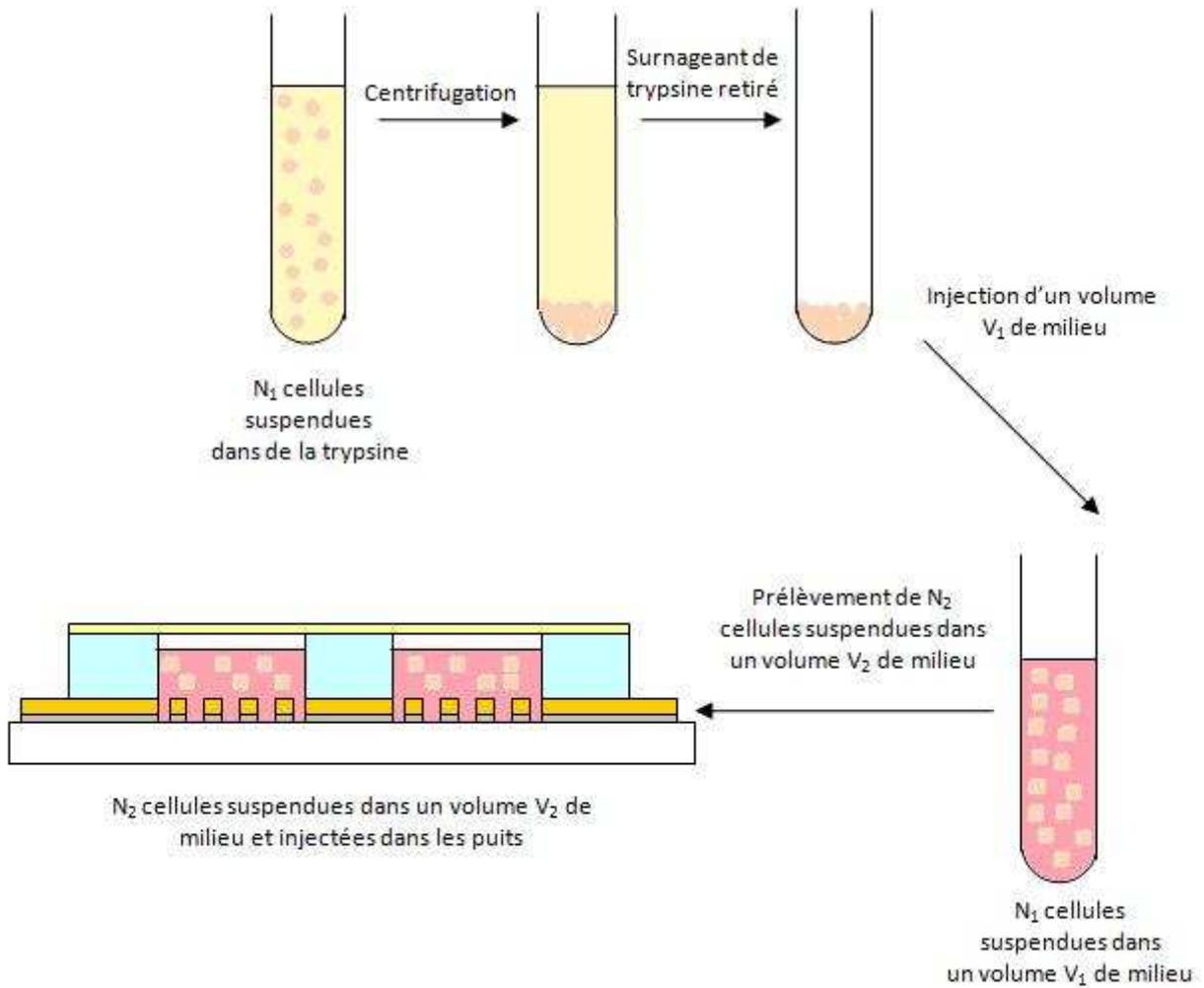


Figure 5- 5 : Schéma du protocole de préparation des suspensions de cellules

Dans les puits du micro-dispositif, les cellules prélevées du tube sont suspendues avec une concentration identique à celle de la suspension dans les tubes.

On a donc :

$$\frac{N_1}{V_1} = \frac{N_2}{V_2} \quad (78)$$

D'après les équations (77) et (78), nous avons donc :

$$\frac{S_1}{S_2} = \frac{V_1}{V_2} \quad (79)$$

$$\leftrightarrow S_2 = \frac{V_2}{V_1} \times S_1 \quad (80)$$

S_1 correspond à la surface de la boîte de Pétri et est donc fixe. De même, V_2 est le volume de suspension de cellule injecté dans les puits que nous avons gardé fixe (100 μ l pour les puits de 8mm de diamètre et 80 μ l pour les puits de 6mm de diamètre).

La surface S_2 recouverte par les cellules dépend donc uniquement du volume V_1 qui sert à resuspendre les cellules après la centrifugation (cf Figure 5- 5). Pour faire varier cette surface S_2 , nous modifions donc le volume V_1 de la suspension de cellules dans les tubes.

II.1.2.3. Influence du protocole de préparation des cellules sur les mesures d'impédance électrochimique

Nous avons effectué les premières mesures d'impédancemétrie en utilisant le protocole de préparation de cellules décrit au paragraphe II.1.2.1..

Pour la suite du chapitre, sauf précisé, toutes les cultures cellulaires ont été réalisées en injectant dans les puits un nombre de cellules permettant d'obtenir un taux de recouvrement cellulaire initial égal à 80% de la surface totale du fond des puits.

Une première mesure d'impédance a été effectuée juste après l'injection des cellules dans les puits. Une nouvelle mesure a été effectuée après une nuit de culture, 16h après leur injection dans les puits. Ces impédances ont été mesurées avec une tension d'excitation de 10 mV.

La Figure 5- 6 présente les spectres d'impédance de ces deux mesures réalisées avec les électrodes submillimétriques et des puits de 8mm de diamètre.

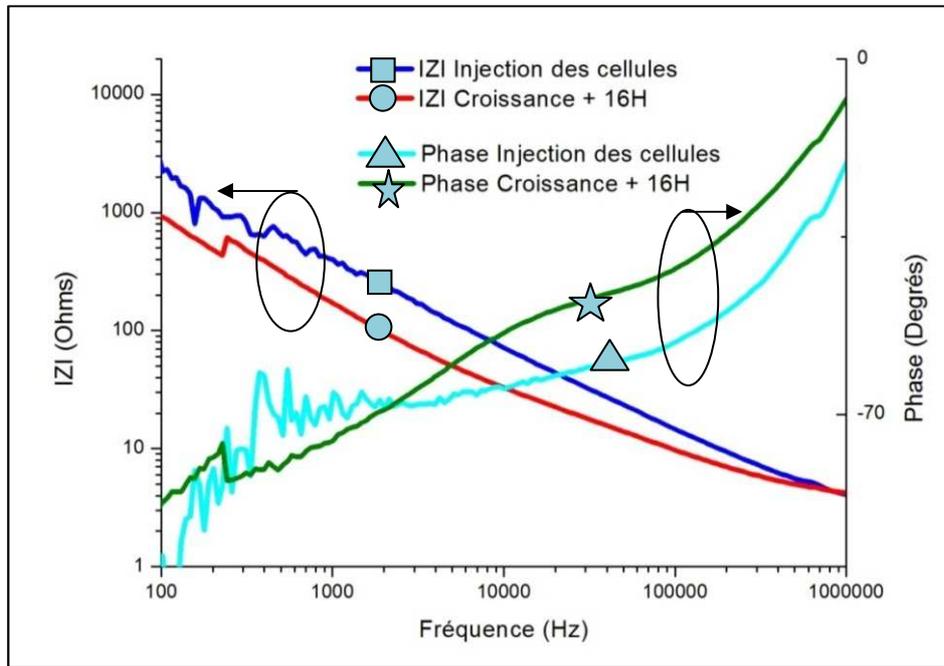


Figure 5- 6 : Spectre de la magnitude et de la phase de l'impédance de cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h après leur croissance avec le premier protocole de repiquage des cellules.

Nous voyons sur ces spectres que l'impédance électrochimique diminue avec la croissance des cellules. Ce résultat est contradictoire avec l'état de l'art des analyses cellulaires par impédancemétrie (5-21,5-30,5-31,5-32,5-33). Tous ces travaux ont montré le caractère isolant des cellules en basse fréquence. La croissance des cellules est donc censée augmenter l'impédance globale du capteur. Les observations microscopiques du tapis cellulaire montrent pourtant un tapis cellulaire qui semble confluent avec des cellules correctement « allongées ».

Cependant, il est important de considérer que les courants électriques de conduction se propagent dans le milieu cellulaire au travers des interstices cellulaires. Nous avons constaté au 4^{ème} chapitre que les capteurs impédimétriques sont très sensibles à la conductivité du milieu biologique (faibles traces de PBS mesurables dans l'eau déionisée, chapitre 4, paragraphe II.3.). Nous nous sommes donc demandés si la diminution d'impédance précédemment observée n'est pas provoquée par des traces de trypsine encore présentes dans le milieu cellulaire.

Dans le protocole de préparation des cellules décrit au paragraphe II.1.2.1., l'étape de centrifugation est supposée retirer la trypsine qui a servi à détacher les cellules des boites de

Pétri pour les resuspendre dans un nouveau milieu cellulaire. Seulement, comme nous l'avons déjà montré au 4^{ème} chapitre, il est difficile de retirer complètement le liquide d'un tube avec un pipetage manuel; surtout quand les cellules constituant un culot compact au fond de ce tube ne doivent pas être endommagées.

Pour vérifier si les éventuelles traces de trypsine sont bien responsables de la chute d'impédance au cours de la culture, nous avons utilisé le même protocole que celui décrit au paragraphe II.1.2.1. en ajoutant une étape de centrifugation supplémentaire avec des paramètres identiques afin de diluer davantage les éventuelles traces de trypsine dans le milieu. Pour ce nouveau protocole, nous avons donc effectué deux étapes de centrifugation d'affilée.

Comme pour la précédente expérience, nous avons mesuré l'impédance des cellules juste après leur injection dans les puits et 16h après.

La Figure 5- 7 présente les spectres d'impédance de ces deux mesures réalisées avec les électrodes submillimétriques et des puits de 8mm de diamètre

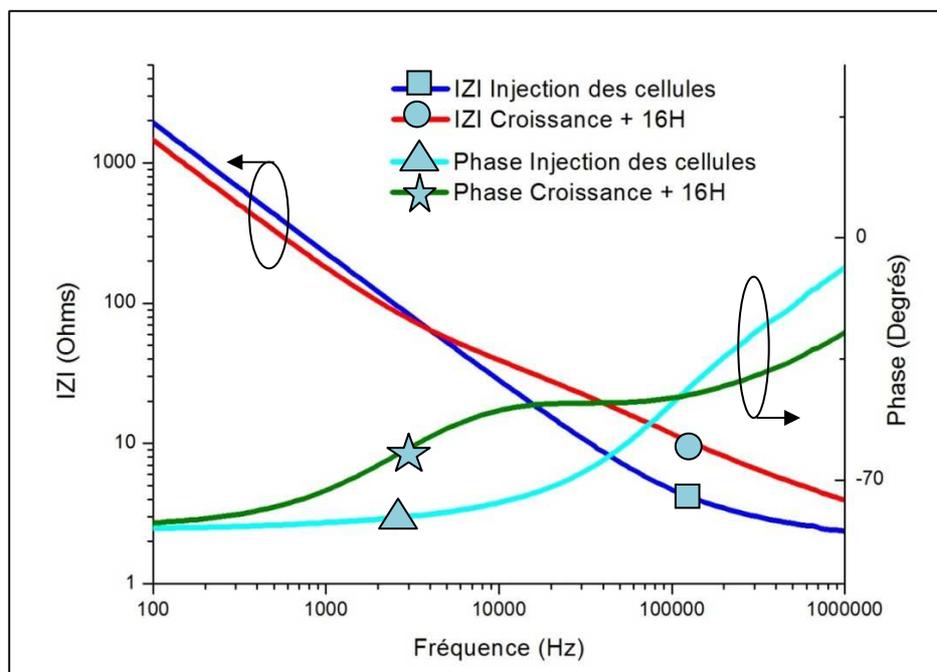


Figure 5- 7 : Spectre de la magnitude et de la phase de l'impédance de cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h après leur croissance avec le protocole final de repiquage des cellules.

Nous voyons sur ces spectres qu'au dessus de 4 KHz l'impédance a bien augmenté au cours de la croissance cellulaire. Nous obtenons donc ici des résultats en accord avec l'état de l'art.

Ce résultat prouve qu'en utilisant le protocole décrit au paragraphe II.1.2.1, les cellules et le milieu injecté dans les puits contiennent encore des traces de trypsine qui diminuent l'impédance du capteur au cours de la croissance cellulaire. Pour la suite des expériences, nous avons donc utilisé le protocole précédemment décrit en ajoutant une deuxième étape de centrifugation.

L'amplitude de l'impédance prenant en compte l'amplitude des courants résistifs et de déplacement, le caractère isolant des cellules devrait être plus visible sur le spectre de la partie réelle de l'impédance, i.e. la résistance. Nous avons donc étudié l'évolution des spectres de résistance au cours de la croissance cellulaire. Cette évolution est représenté sur la Figure 5-8.

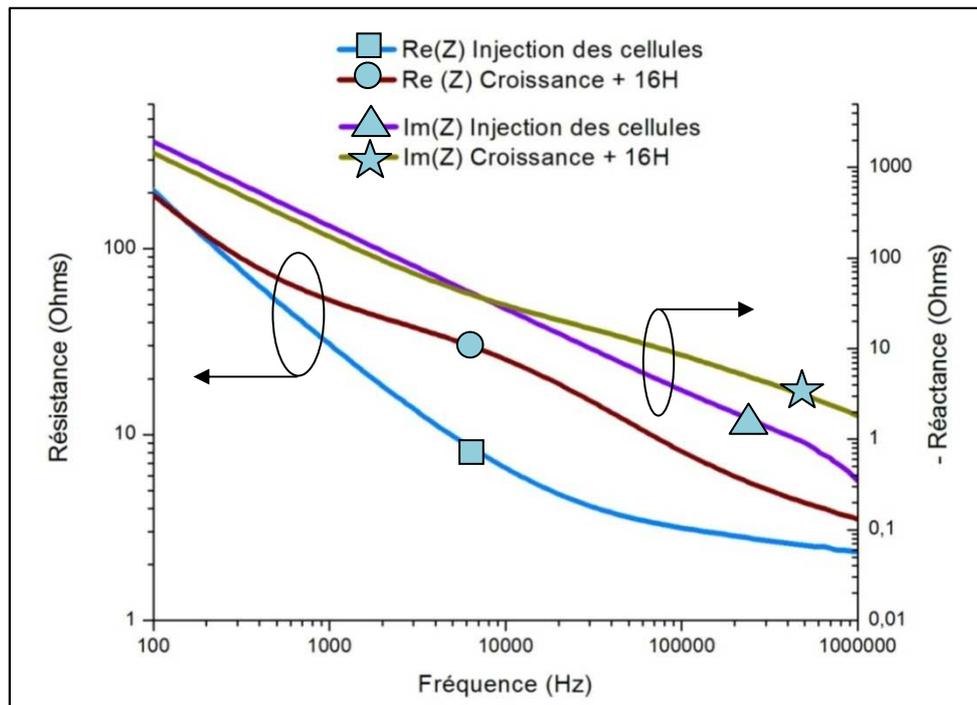


Figure 5- 8 : Spectre de la résistance et de la réactance des cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h après leur croissance avec le protocole final de repiquage des cellules.

Pour calculer et comparer les variations d'amplitude et de résistance, nous déterminons la variation d'un paramètre X en pourcentage ($= \Delta X_{\%}$) selon la formule :

$$\Delta X_{\%} = \frac{|X_{T_0} - X_{T_{final}}|}{|X_{T_0}|} \times 100 \quad (81)$$

Où X_{T_0} est la valeur du paramètre en début de croissance et $X_{T_{final}}$ est la valeur du paramètre en fin de croissance.

Les fréquences auxquelles ces paramètres ont été extraits ont été déterminées de manière à obtenir les variations les plus importantes :

- à 94574 KHz, $\Delta|Z|_{\%} = 150 \%$
- à 15598 Hz, $\Delta R_{\%} = 296 \%$

La résistance est donc le paramètre électrique le plus sensible à la croissance cellulaire. Pour comparer les différentes géométries d'électrodes, nous allons donc étudier ce paramètre.

II.1.3. Comparaison des différentes géométries d'électrodes

Pour déterminer la géométrie d'électrode optimale pour l'étude de l'interaction protéine-cellule, nous avons cultivé les cellules CHO dans un dispositif présentant les quatre géométries d'électrodes sur un même substrat avec des puits de 8mm de diamètre.

Pour cette expérience, nous avons mesuré l'impédance des cellules 30 min après leur injection dans les puits et 16H plus tard, après avoir renouvelé le milieu cellulaire de chaque puits. Nous avons attendu 30 min entre l'injection des cellules et la première mesure d'impédance pour laisser au système le temps de se stabiliser (température et sédimentation des cellules). 16H après l'injection des cellules, nous avons renouvelé le milieu de culture en retirant à la pipette le milieu ayant servi à la croissance des cellules et en injectant de la même manière un milieu frais. L'impédance est mesurée 30 minutes après le renouvellement du milieu pour laisser le temps au système de se stabiliser. La plage fréquentielle étudiée va de 1 KHz à 1 MHz. Les figures suivantes présentent la résistance et la réactance de ces cultures.

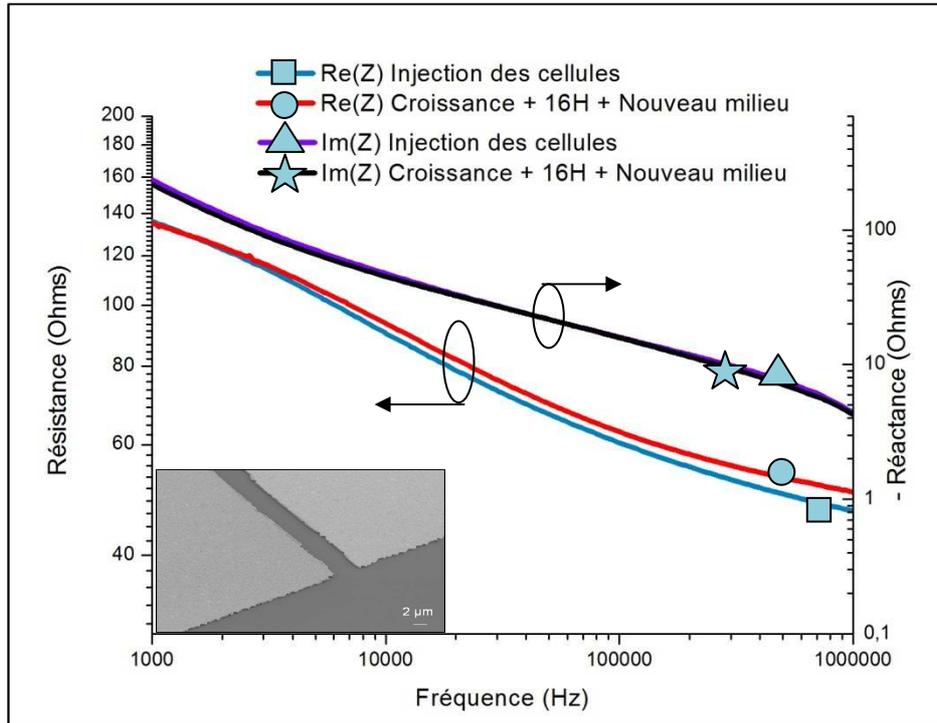


Figure 5- 9 : Spectre de la résistance et de la réactance des cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h plus tard, avec un nouveau milieu. Mesures effectuées avec les électrodes millimétriques (photo MEB en encart).

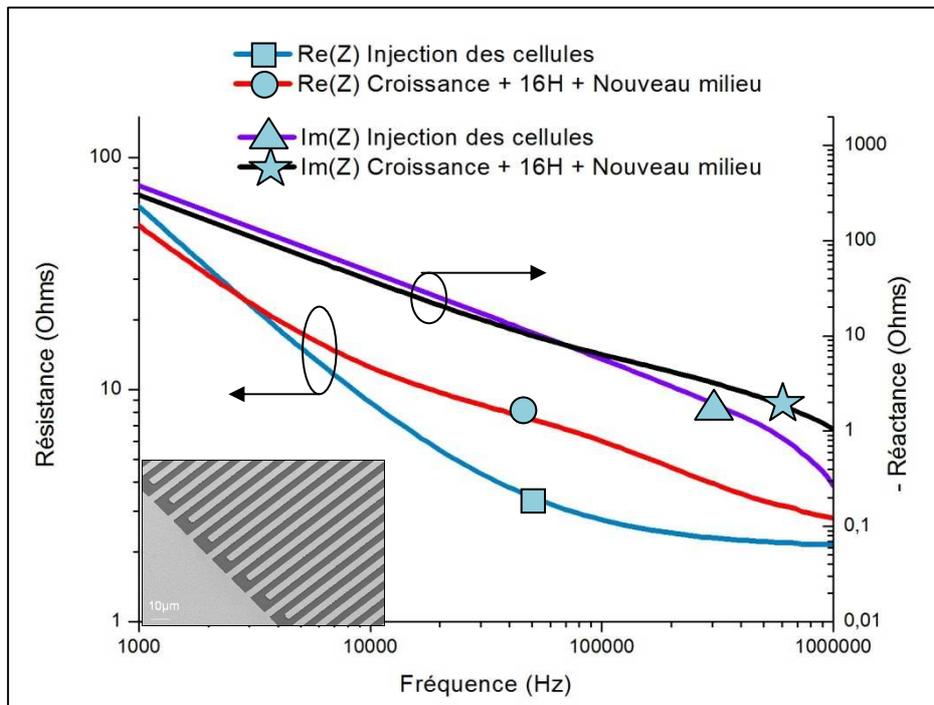


Figure 5- 10 : Spectre de la résistance et de la réactance des cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h plus tard, avec un nouveau milieu. Mesures effectuées avec les électrodes micrométriques droites (photo MEB en encart).

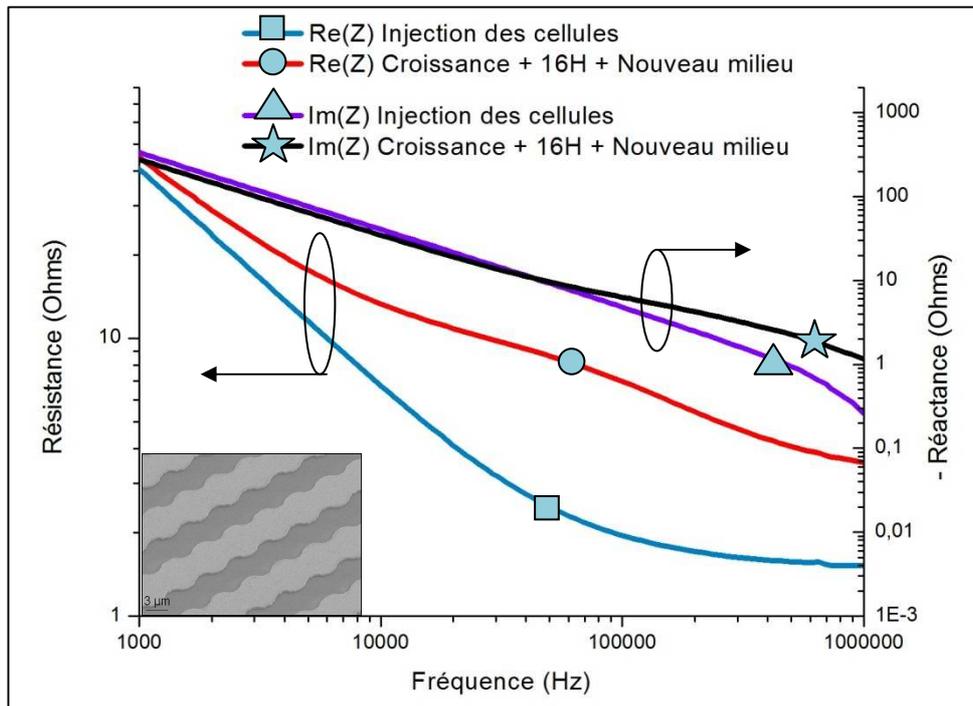


Figure 5- 11 : Spectre de la résistance et de la réactance des cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h plus tard, avec un nouveau milieu. Mesures effectuées avec les électrodes micrométriques rondes (photo MEB en encart).

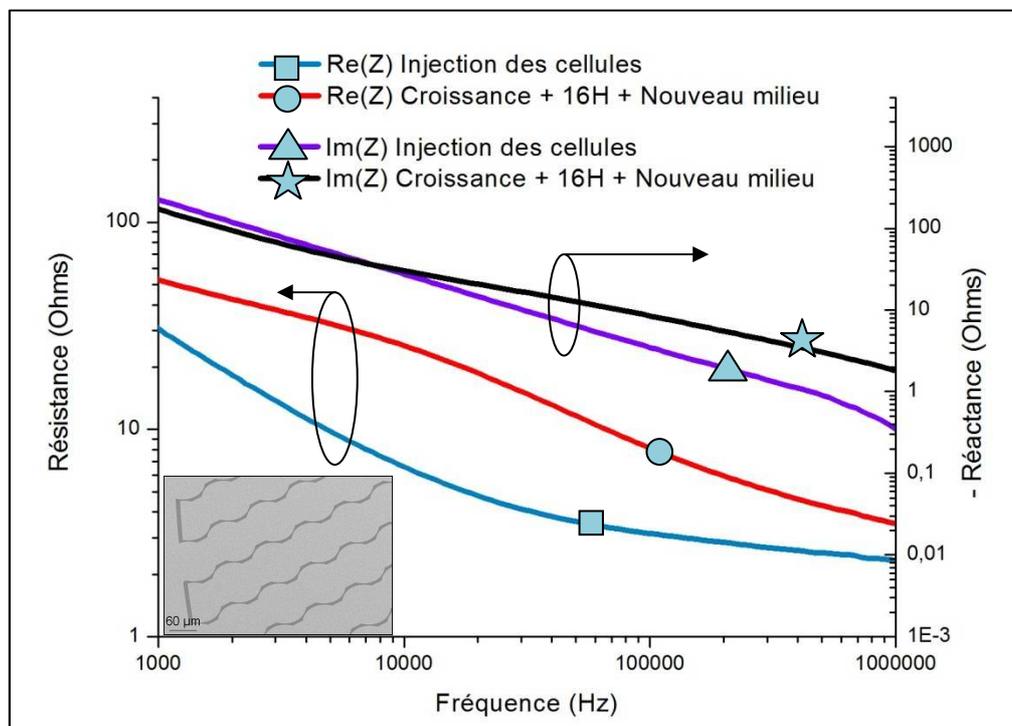


Figure 5- 12 : Spectre de la résistance et de la réactance des cellules CHO après leur injection dans les puits et 16h plus tard, avec un nouveau milieu. Mesures effectuées avec les électrodes submillimétriques (photo MEB en encart).

Comme précédemment, nous voyons sur les figures que la résistance augmente au cours de la croissance pour toutes les géométries.

Pour comparer les électrodes, nous avons calculé le taux de variation des résistances en considérant les fréquences auxquelles ces variations sont les plus importantes. Les taux de variations sont comme précédemment calculés d'après l'équation (81) et regroupés dans le tableau suivant :

Tableau 5- 1 : Taux de variations des résistances mesurées avec les différentes géométries d'électrodes au cours de la croissance cellulaire.

	Electrodes millimétriques	Electrodes micrométriques droites	Electrodes micrométriques rondes	Electrodes submillimétriques
$\Delta Re_{\%}$ en fin de culture, après le changement de milieu	7,2 % à 1 MHz	122% à 69,3 KHz	263% à 78,5 KHz	295% à 15,6 KHz

Nous voyons que les électrodes submillimétriques correspondent à la géométrie d'électrode la plus sensible.

Pour analyser les évolutions des impédances mesurées avec les différentes géométries d'électrodes au cours de la croissance cellulaire, il est important de prendre en compte les profondeurs de champ (cf lexique) de chaque géométrie d'électrodes. Ces profondeurs de champ ont été déterminées au 3^e chapitre au paragraphe II.1.2. et regroupées dans le Tableau 3- 3.

Il est également important de connaître l'épaisseur d'une cellule CHO en culture. D'après Li et al. (5-34), le volume des CHO se situe entre 1000 et 1500 μm^3 . En considérant que le diamètre d'une cellule CHO en culture est de 15 μm (5-35) et que, de façon schématique, une cellule en culture peut s'apparenter à un cylindre, l'épaisseur des cellules CHO en culture se situe entre 5,7 μm et 8,5 μm . Cette ordre de grandeur correspond bien à l'épaisseur d'autres cellules épithéliales en culture (5-36).

Concernant la première géométrie d'électrode, le champ électrique se propage beaucoup plus haut dans le puits que pour les autres géométries (profondeur de champ $\approx 80 \mu\text{m}$). Ce champ électrique interagit donc davantage avec le milieu cellulaire et est moins sensible à la croissance cellulaire en surface des électrodes. Il est donc préférable de réduire les dimensions des électrodes pour confiner le champ électrique au niveau des cellules.

En comparant les variations de résistance issues des électrodes micrométriques droites et celles issues des électrodes micrométriques rondes, nous constatons que la forme arrondie des électrodes favorise bien l'attachement des cellules.

Pour expliquer les différences de variation de résistance entre les électrodes micrométriques rondes et les électrodes submillimétriques, nous devons considérer leurs profondeurs de champ et l'épaisseur des cellules. Rappelons qu'aux fréquences inférieures ou égales à 1 MHz, le champ électrique ne passe pas au travers des membranes cellulaires (5-37).

Quand les électrodes micrométriques sont en contact avec les cellules, la profondeur de champ de cette géométrie ($\approx 1 \mu\text{m}$) montre que le champ électrique interagit avec le milieu cellulaire en dessous des cellules ainsi qu'avec leur zone basale (cf lexique).

Pour les électrodes submillimétriques, la profondeur de champ de cette géométrie ($\approx 7,5 \mu\text{m}$) montre que le champ électrique interagit avec la zone basale des cellules, leur zone apicale (cf lexique) ainsi qu'avec le milieu cellulaire en dessous, au dessus et sur les côtés des cellules (i.e. les interstices cellulaires).

Le champ électrique interagissant davantage avec les cellules pour les électrodes submillimétriques, cette géométrie est plus sensible à la croissance cellulaire.

Elle a donc été conservée pour la suite des expériences. Toutes les expériences réalisées avec des dispositifs à puits qui sont par la suite présentées ont donc été effectuées avec des dispositifs comprenant sur un même substrat quatre réseaux d'électrodes submillimétriques.

II.1.4. Amélioration du protocole de mesure d'impédance

II.1.4.1. Suivi continu

Nous avons évoqué au 1^{er} chapitre l'intérêt des mesures électriques pour les analyses biologiques multiplexées (au paragraphe IV.1.2.2.). Ce type d'analyse permet aussi d'effectuer rapidement des études statistiques. De tels systèmes nécessitent l'automatisation de l'acquisition des mesures.

Jusqu'ici, pour étudier la croissance cellulaire, nous avons mesuré l'impédance des cellules en début et en fin de culture. L'impédancemètre ne permet pas de suivre en continu la croissance cellulaire en lançant automatiquement les mesures.

Par rapport aux observations microscopiques classiques, les mesures électriques permettent d'analyser quantitativement les cultures cellulaires. Des systèmes d'imagerie incorporant des incubateurs permettent de suivre en continu la croissance cellulaire mais de façon qualitative. Wegener, Keese et Giaever (5-38) ainsi que Ehret et al. (5-39) ont déjà présenté des systèmes permettant de suivre quantitativement et en continu la croissance cellulaire par impédancemétrie.

Nous avons donc modifié l'interface Labview décrite au 2^{ème} chapitre, au paragraphe III.2.1., afin qu'elle puisse lancer automatiquement l'acquisition des mesures de l'impédancemètre pour suivre en continu la croissance des cellules sur un réseau d'électrodes.

II.1.4.2. Mesure en parallèle

Comme nous l'avons évoqué au 2^{ème} chapitre, les impédancemètres ne permettent pas de réaliser plusieurs mesures simultanément. Pour pouvoir étudier parallèlement plusieurs réseaux d'électrodes au cours d'une même expérience, nous avons dû réaliser un circuit imprimé comprenant des relais électrostatiques (cf 2^{ème} chapitre, paragraphe II.3.4.). Pour rappel, ce circuit permet de multiplexer les expériences en changeant automatiquement les réseaux d'électrodes analysés par l'impédancemètre.

En associant ce circuit relais avec le logiciel Labview permettant d'automatiser l'acquisition des mesures, nous avons pu mesurer en continu la croissance cellulaire des CHO sur plusieurs réseaux d'électrodes en parallèle.

La Figure 5- 13 présente les spectres de résistance issus du suivi de quatre cultures de cellules CHO réalisées sur un même dispositif avec des électrodes submillimétriques et des puits en PDMS de 6mm de diamètre.

Les cultures ont été effectuées sur 46H. Le nombre initial de cellules injectées dans les puits permet d'obtenir un taux de recouvrement cellulaire initial égal à 66% de la surface totale au fond des puits. La résistance de chaque puits a été mesurée toutes les 33 minutes mais par soucis de clarté seuls trois spectres (par puits) ont été représentés.

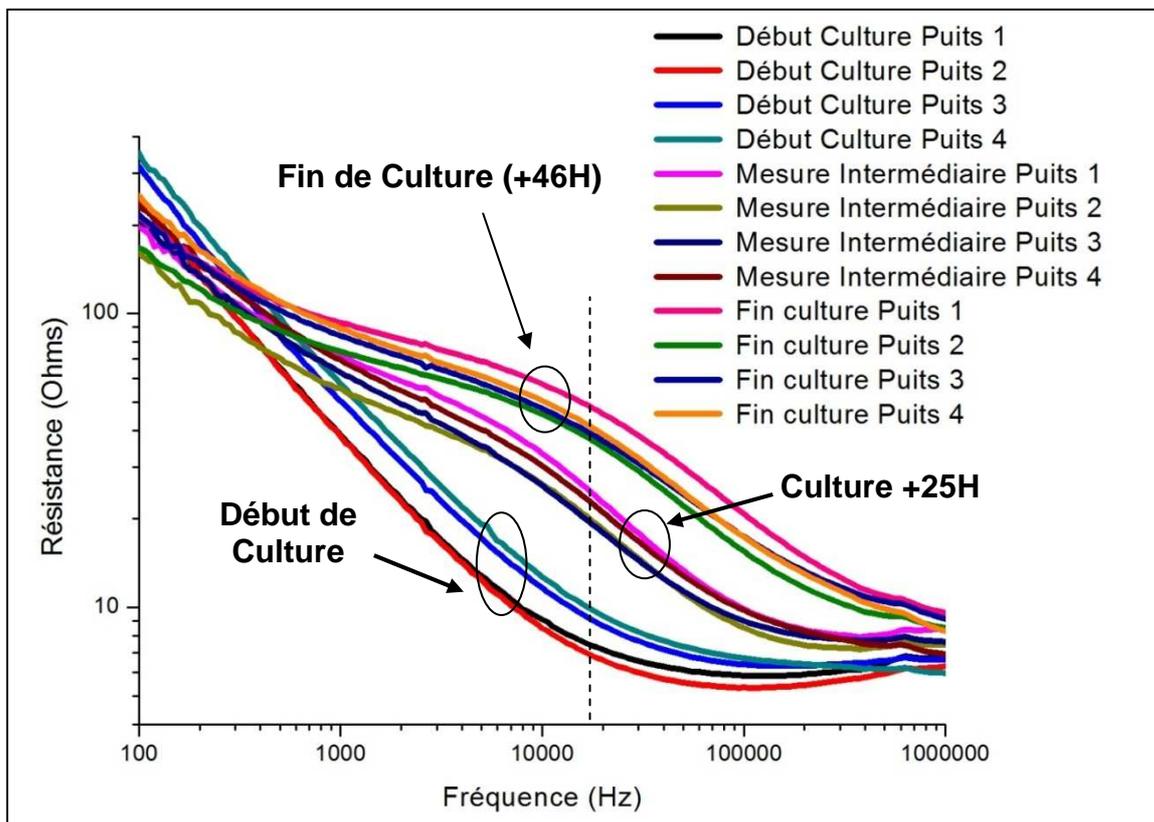


Figure 5- 13 : Spectre de la résistance de quatre cultures de cellules CHO après leur injection dans les puits, 25h plus tard et 46h plus tard en fin de croissance. Les pointillés indiquent la fréquence à laquelle a été effectuée l'analyse cinétique.

Nous voyons sur ces spectres que la résistance augmente progressivement et de façon similaire pour les quatre cultures.

A partir de ces différents spectres, nous pouvons effectuer une analyse cinétique de la résistance à une fréquence fixe. Pour cela, nous utilisons le programme Matlab décrit au 2^{ème} chapitre, paragraphe III.2.2.2.. La fréquence d'étude correspond à la fréquence à laquelle les variations de résistance sont les plus importantes, c'est-à-dire à la fréquence pour laquelle le rapport entre la résistance en fin de culture et celle en début de culture est maximal. Cette fréquence est indiquée en pointillé sur la Figure 5- 13 et égale à 15 KHz

L'analyse cinétique de ces spectres a donc été effectuée à 15 KHz. L'évolution temporelle de la résistance des cultures cellulaires est représentée sur la Figure 5- 14.

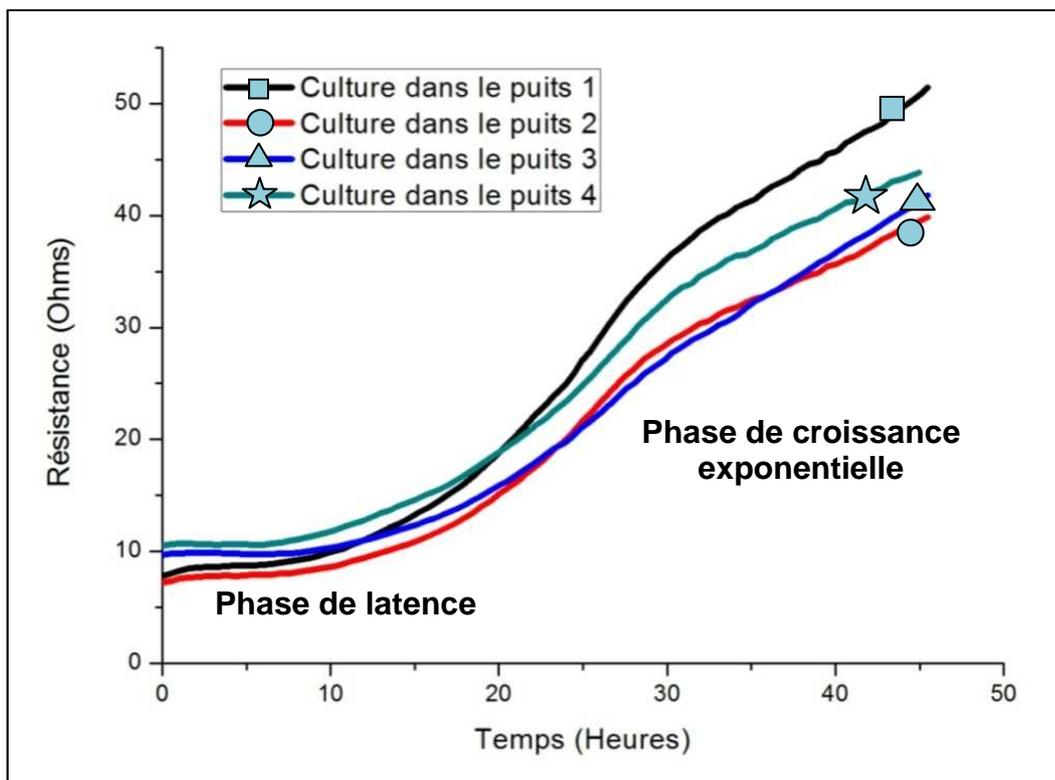


Figure 5- 14 : Evolutions temporelles de la résistance à 15 KHz de quatre cultures de cellules CHO.

Nous voyons que la croissance cellulaire se déroule globalement en deux phases : une phase avec une faible croissance correspondant à la phase de latence où les cellules s'adaptent à leur nouvel environnement et adhèrent au substrat (de 0 à 20H) et une phase de croissance exponentielle de 20 à 46H.

La cinétique de la Figure 5- 14 se rapproche de celle mesurée par Leelavatcharamas et al. sur des CHO recombinantes par cytométrie en flux (5-40) (en détachant les cellules de leur substrat) avec une phase de latence et une phase de croissance exponentielle.

Cette phase de croissance présente deux pentes distinctes : de 20 à 30H et de 30 à 46H. Arias et al., qui ont récemment analysé électriquement des cultures de cellules cancéreuses de cavité buccales (5-41), expliquent ces deux pentes différentes par une première phase d'étalement des cellules suivie par une phase de prolifération. Leur étude a été effectuée à l'aide de photos prises au microscope à réflexion en parallèle des mesures électriques.

Cette expérience montre qu'il est possible de quantifier électriquement la croissance cellulaire de façon continue. Elle montre aussi qu'il est possible de suivre par mesure électrique la croissance cellulaire sur plusieurs jours sans que celle-ci soit endommagée.

II.2. Mise en place d'un protocole d'étude de l'interaction des cellules CHO avec la lactoferrine

Pour étudier l'interaction des cellules CHO avec la lactoferrine et mettre au point un protocole expérimental précis, nous avons étudié différents paramètres biologiques pouvant influencer sur l'interaction de la protéine avec le tapis cellulaire.

II.2.1. Influence du changement de milieu cellulaire

Pour l'étude de l'interaction de la Lf avec les CHO, nous avons dilué la protéine dans le milieu cellulaire F12-K, le milieu cellulaire utilisé pour la croissance des cellules CHO. Pour injecter la Lf dans nos puits, nous devons donc retirer le milieu de base des cellules pour injecter un nouveau milieu dans lequel la protéine est diluée.

Pour cela, les cellules sont d'abord retirées de l'incubateur. Le milieu de base est ensuite retiré à la pipette, laissant les cellules exposées à l'air ambiant. Un nouveau milieu est ensuite injecté à la pipette. Les cellules sont enfin replacées dans l'incubateur.

Ces différentes étapes peuvent perturber l'environnement et l'état électrochimiques des cellules. Nous avons donc étudié l'effet d'un changement de milieu, sans protéine, effectué dans ces conditions sur l'impédance du tapis cellulaire.

II.2.1.1. Analyse à fréquence fixe

Pour évaluer les effets d'un changement de milieu, nous avons mesuré la résistance électrique à une fréquence fixe, 4 KHz, sur quatre cultures de CHO.

Ces cultures de CHO ont été réalisées en injectant dans les puits un nombre de cellules correspondant à un taux de recouvrement initial égal à 80% de la surface totale du fond des puits. L'expérience a été effectuée après 16H de culture.

Comme nous l'avons vu au chapitre 2, paragraphe III.1.2., la mesure impédimétrique à fréquence fixe permet d'enregistrer l'impédance d'un système biologique avec une résolution temporelle élevée. Pour cette expérience, la résolution temporelle utilisée est de 5s.

La résistance normée présentée sur la Figure 5- 15 correspond à la moyenne de quatre expériences distinctes dont sont aussi issues les écarts types.

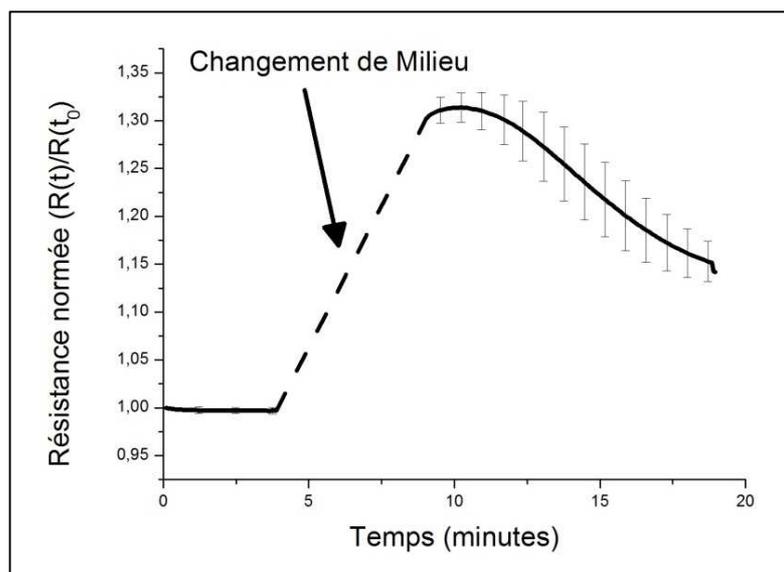


Figure 5- 15 : Cinétique de la résistance normée à 4 KHz, moyennée à partir de quatre cultures cellulaires dans les puits, dont le milieu a été renouvelé.

Nous constatons sur ce graphique que, suite à l'injection du nouveau milieu, la résistance augmente. Elle décroît ensuite de façon quasi-linéaire.

Sur cette expérience, la résistance ne se stabilise pas. Nous devons étudier ce phénomène sur une durée plus importante.

Nous constatons également que cette cinétique ne correspond pas à un processus électrochimique rapide. Nous pouvons donc étudier ce phénomène par spectroscopie d'impédance, méthode présentant une résolution temporelle moins élevée (≈ 45 s, cf chapitre 2, paragraphe III.1.1.). Nous pouvons également étudier ainsi si la fréquence d'analyse influence les variations de résistance.

II.2.1.2. Analyse fréquentielle

Nous avons mesuré les effets d'un changement de milieu par spectroscopie d'impédance sur une culture réalisée en injectant dans les puits un nombre de cellules permettant d'obtenir un taux de recouvrement cellulaire initial égal à 66% de la surface totale du fond des puits.

Pour comparer cette manipulation avec la précédente expérience, la résistance de ce tapis cellulaire a été mesurée jusqu'à ce qu'elle soit égale à celle d'une culture réalisée avec un taux de recouvrement cellulaire initial de 80%, 16H après l'injection des cellules dans les puits (cf annexe 3). Le changement de milieu a donc été effectué 46H après l'injection des cellules.

Pour obtenir les cinétiques de la résistance aux différentes fréquences, les spectres de résistance ont été mesurés successivement sur les cultures de CHO lors d'un changement de milieu avec une résolution temporelle de 37s. Ces spectres ont été ensuite traités avec le logiciel Matlab présenté au deuxième chapitre, au paragraphe III.2.2.2..

Les cinétiques de résistance aux différentes fréquences sont représentées sur la Figure 5- 16.

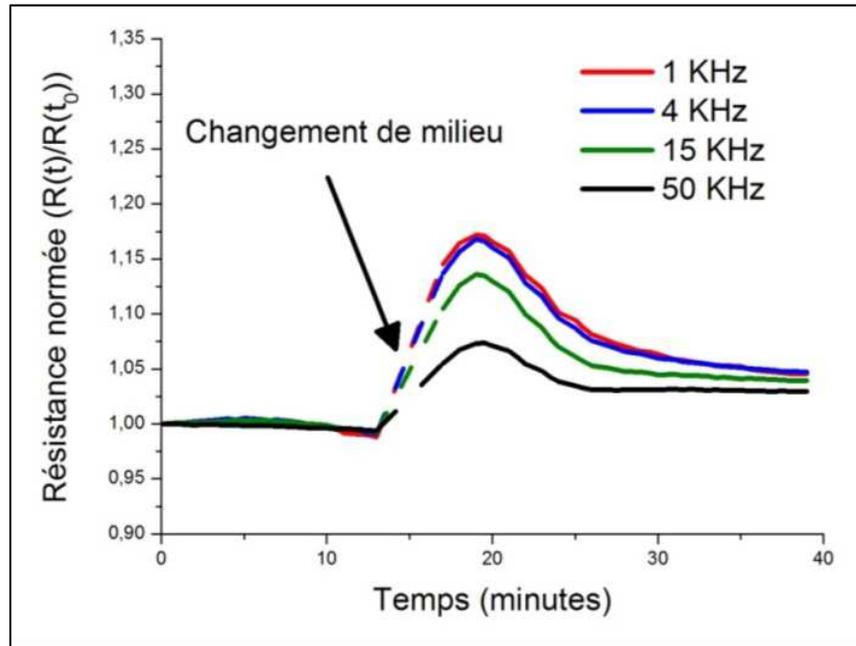


Figure 5- 16 : Evolutions temporelles des résistances électriques normées à différentes fréquences lors d'un changement de milieu

Comme sur la Figure 5- 15, nous voyons que le changement de milieu augmente la résistance du système. Cette résistance diminue ensuite de façon quasi-linéaire pour se stabiliser à une valeur de résistance plus élevée que celle initiale et cela pour toutes les fréquences d'étude (de 1 KHz à 50 KHz). L'augmentation de résistance due au changement de milieu diminue pour les fréquences plus élevées. La chute de résistance successive diminue également avec les fréquences plus élevées.

Les résistances normées aux différentes fréquences se stabilisent ainsi à des valeurs proches. Après le changement de milieu, la résistance électrique des cellules met environ 10 minutes à se stabiliser.

II.2.1.3. Discussion et interprétation électrochimique

Nous avons vu que le changement de milieu provoque une augmentation de la résistance. Cette résistance diminue ensuite pour se stabiliser environ 10 minutes plus tard.

Pour comprendre cette évolution temporelle de la résistance, nous devons analyser les différentes perturbations électrochimiques subies par les cellules au cours de l'injection d'un milieu frais.

Le bioMEMS contenant les cellules est d'abord retiré de l'incubateur, le système subit donc une baisse de température. Quand le milieu est retiré à la pipette, les cellules sont soumises à des forces de cisaillement. Lorsque le milieu de base est retiré et avant que le nouveau milieu soit injecté, les cellules sont exposées à l'air ambiant et leur température diminue encore. L'injection d'un nouveau milieu à la pipette fait subir aux cellules des nouvelles forces de cisaillement. Ce nouveau milieu est conservé dans l'incubateur de culture servant aux mesures, cependant son injection en dehors de l'incubateur avec des pointes de micropipette conservées à température ambiante abaisse également légèrement sa température. Ce nouveau milieu présente aussi un pH plus neutre. Enfin les cellules sont replacées dans l'incubateur où elles doivent à nouveau se stabiliser en température.

La méthode d'injection utilisé pour changer le milieu, avec ou sans protéine, abaisse la température des cellules. Armitage et al. (5-42) ainsi que Moyes et al. (5-43) ont montré que ces conditions de changement de température augmentent la TEER (cf lexique) des cellules épithéliales cultivées *in-vitro*. La TEER mesure électriquement l'espace intercellulaire et ainsi la confluence des cellules. Quand les cellules sont à l'air ambiant, les jonctions entre les cellules diminuent donc et la TEER augmente.

Ceci explique pourquoi après le renouvellement du milieu, quand le bioMEMS est replacé dans l'incubateur, la résistance augmente de façon importante. Après une dizaine de minutes, le système se stabilise à la température de l'incubateur (37,5° C) et la résistance diminue jusqu'à devenir constante.

L'injection d'un nouveau milieu dans les puits, avec ou sans protéine, perturbe l'environnement cellulaire et entraîne donc intrinsèquement l'évolution temporelle de la résistance précédemment mesurée. Pendant les quelques minutes suivant l'injection d'un nouveau milieu, l'impédance électrochimique du tapis cellulaire passe par un état transitoire qui doit être décorrélé des effets électrochimiques liés à l'interaction de la Lf avec les CHO.

Les mesures électrochimiques de l'interaction entre les CHO et la Lf sont donc parasitées par cette stabilisation électrochimique. Ces phénomènes perturbateurs ont été également

remarqués dans des précédents travaux d'impédancemétrie sur des cellules biologiques (5-21,5-44,5-45).

Pour minimiser ces effets, le milieu contenant les protéines est placé dans l'incubateur de culture au moins 30 minutes avant leur injection dans les puits. Les produits injectés sont ainsi à la même température que celle des cellules (37,5°C).

Le changement de milieu est effectué en gardant autant que possible le dispositif au sein de l'incubateur de culture.

II.2.2. Influence de la densité cellulaire initiale

Nous avons également étudié l'influence de la densité cellulaire initiale. Cette densité peut influencer la croissance cellulaire et les mesures électrochimiques de l'interaction de la Lf avec les cellules. Pour cela, nous avons injecté dans nos dispositifs des concentrations initiales de cellules différentes dans des dispositifs avec des puits de 6mm de diamètre.

Selon le protocole décrit au paragraphe II.1.2.2., le nombre de cellules injectées dans les puits a été déterminé de manière à obtenir des taux de recouvrement cellulaire initiaux égaux à 66%, 80 % et 100% de la surface totale au fond des puits (à 100% les cellules sont donc placées dans une situation de confluence). Les cultures cellulaires dans les puits ont été suivies électriquement avec des balayages fréquentielles allant de 100Hz à 1 MHz.

Sur la Figure 5- 17, nous avons représenté la cinétique des résistances électriques normées des cultures de CHO aux différents taux de recouvrement initiaux dans les puits, à 15 KHz, sur une durée de 16H. Ces résistances sont normées par rapport aux résistances en début de culture, juste après l'injection des cellules.

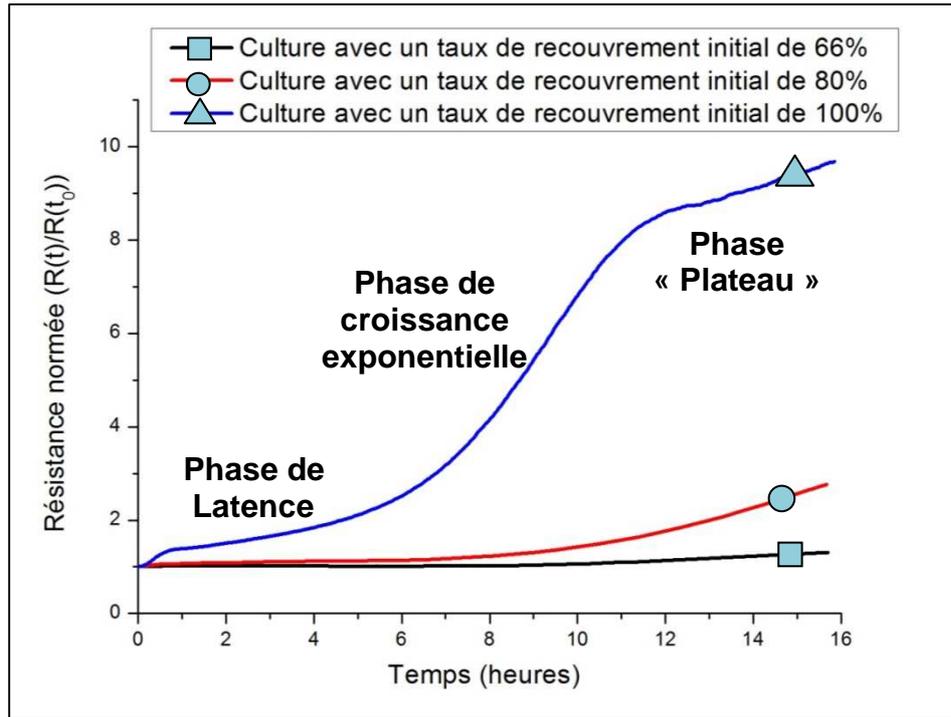


Figure 5- 17 : Evolutions temporelles des résistances électriques normées mesurées à 15 KHz sur des cultures de CHO avec des taux de recouvrement initiaux différents.

Nous voyons sur cette figure que la seule culture se stabilisant au bout de 11H est celle réalisée avec des cellules injectées dans des conditions de confluence. En effet, nous observons un plateau après la phase exponentielle de croissance.

Comme les cellules sont ici déjà placées en confluence, la croissance exponentielle correspond bien à la création des liaisons peptidiques des cellules entre elles et entre le substrat, c'est-à-dire à la phase d'étalement déjà caractérisée par Arias et al. (5-41).

Nous n'observons pas de deuxième phase de prolifération cellulaire caractérisée par une augmentation de la résistance avec une pente plus faible, comme c'est le cas pour la culture sur 46 H avec une densité cellulaire initiale à 66% de confluence (cf Figure 5- 14), car nous sommes ici déjà à confluence. Les cellules ne se divisent donc pas

Il est intéressant de constater que ces mesures électriques permettent de quantifier et d'analyser la densité cellulaire d'une culture beaucoup plus précisément que les observations microscopiques.

La Figure 5- 18 présente des photos prises au microscope à fluorescence de cultures réalisées avec des taux de recouvrement cellulaire initiaux de 80% et de 100%, 16H après l'injection

des cellules. Sur ces photos, les tapis cellulaires présentent des densités cellulaires apparemment très proches. La mesure de leur impédance révèle néanmoins que la culture réalisée un taux de recouvrement initial de 80% n'est pas encore stabilisée et donc que les cellules sont encore en pleine croissance. L'observation microscopique d'une telle culture semble pourtant présenter les critères d'une culture à confluence.

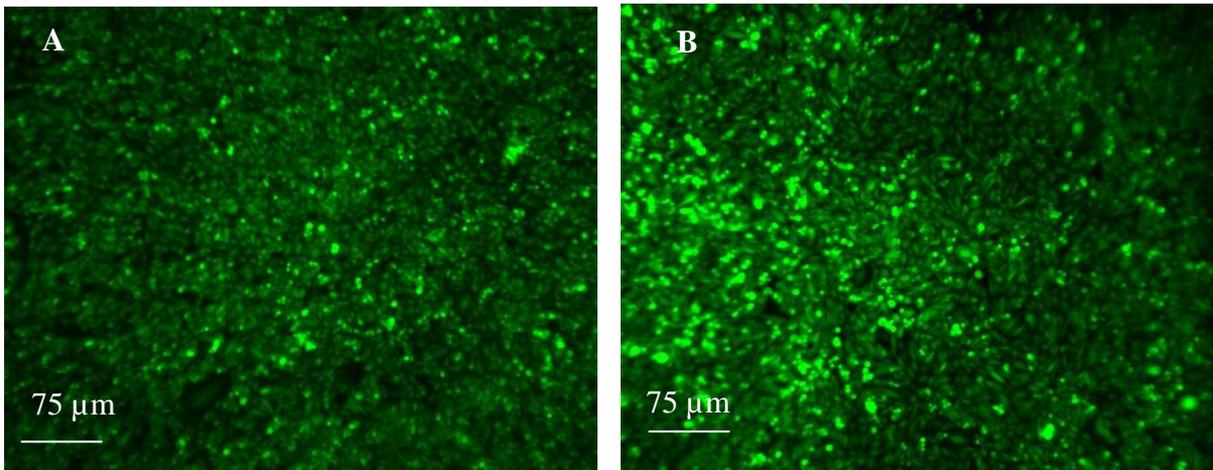


Figure 5- 18 : Photo prise au microscope confocal à fluorescence de cultures de cellules CHO effectuées avec un taux de recouvrement initial de 80% (A) et de 100% (B), 16H après l'injection des cellules.

Il est donc plus précis de juger de la confluence d'un tapis cellulaire en mesurant sa résistance électrique.

II.3. Modélisation

Comme nous l'avons fait pour les mesures d'impédance des parasites *C. parvum* (chapitre 4, paragraphe III et IV), nous avons cherché à modéliser les spectres d'impédance des cultures cellulaires avec un circuit électrique équivalent. Nous avons pour cela utilisé le circuit électrique équivalent présenté sur la Figure 5- 19.

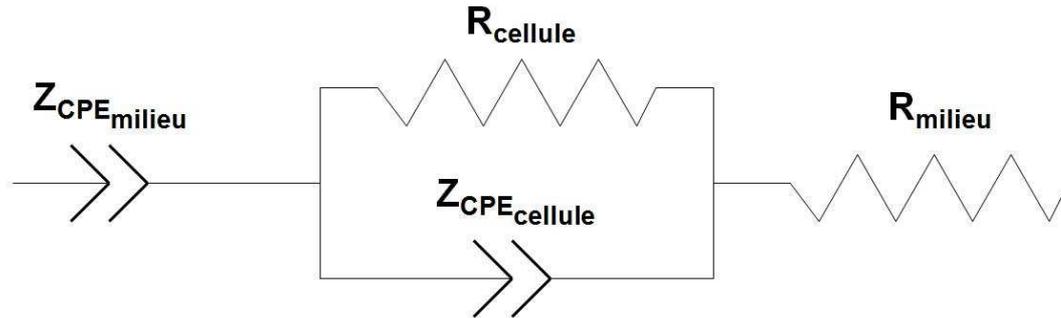


Figure 5- 19 : Circuit électrique équivalent utilisé pour la modélisation des impédances de culture de cellules CHO.

Le milieu est modélisé par un CPE ($Z_{CPE_{milieu}}$) (cf lexique) placé en série avec une résistance (R_{milieu}). Ce circuit correspond à celui que nous utilisons au troisième chapitre pour les spectres d'impédance du milieu cellulaire des CHO (chapitre 3, paragraphe II.1.4.). Pour modéliser les cellules, nous avons utilisé un CPE ($Z_{CPE_{cellule}}$) placée en parallèle d'une résistance ($R_{cellule}$). Le CPE correspond aux propriétés diélectriques des cellules, la résistance aux propriétés conductrices issues du milieu présent aux interstices intercellulaires.

La correspondance biologique de ce circuit électrique équivalent est schématisée sur la Figure 5- 20. Sur ce schéma, la distance cellule-électrode est délibérément exagérée et les représentations ne sont pas à l'échelle.

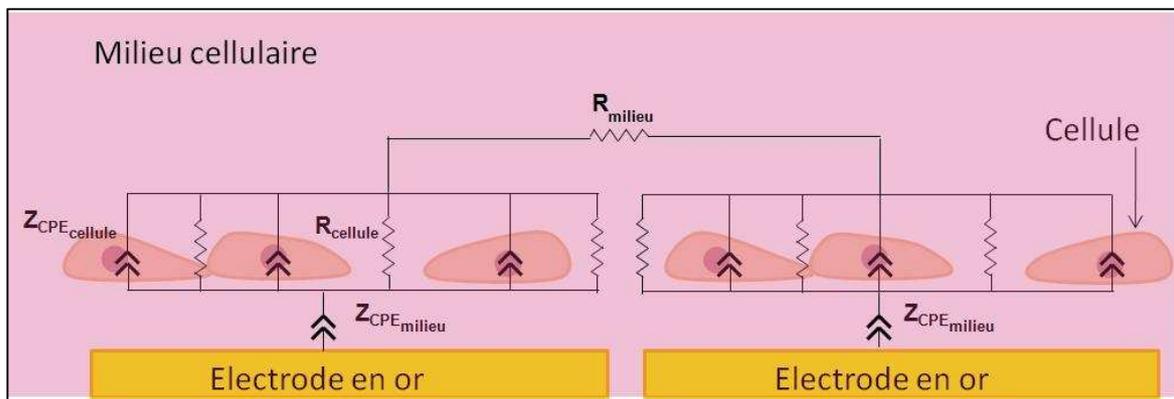


Figure 5- 20 : Schéma des correspondances biologiques des différents composants du circuit électrique équivalent.

Ce circuit de modélisation a déjà utilisé par Cho et Thielecke (5-46) pour modéliser l'analyse impédimétrique de cellules souches mésenchymateuses. Rahman et al. (5-47,5-48) ainsi que Qui et al. (5-49) ont utilisé ce circuit électrique équivalent en ajoutant, en parallèle des composants correspondant au milieu cellulaire, une résistance pour la couche protéinique servant à l'adhésion cellulaire.

Ce circuit électrique équivalent est une adaptation de celui utilisé par Wegner et al. (5-50,5-51) avec les propriétés diélectriques des cellules qui sont modélisées par un CPE au lieu d'une capacité (qui est un cas particulier de CPE, cf chapitre 3, paragraphe I.2.).

La Figure 5- 21 présente les spectres de résistance et de réactance du milieu cellulaire des CHO (aucune cellule) et des cultures de cellules CHO, 16H après leur injection, avec des taux de recouvrement initiaux différents : 66%, 80% et 100% (confluence). Ces spectres et leurs écarts types sont issus de la moyenne de trois expériences distinctes.

Sur ces spectres, les modélisations issues des circuits équivalents de la Figure 5- 19 sont représentées en superposition des spectres expérimentaux.

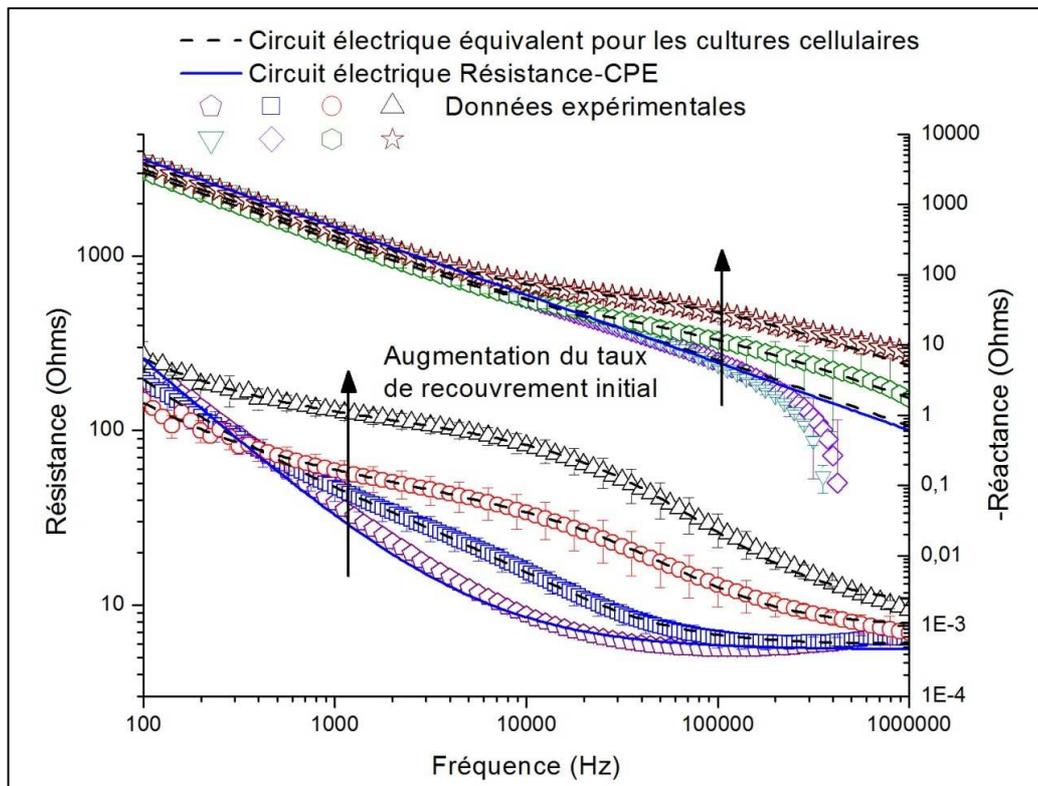


Figure 5- 21 : Résistance et réactance du milieu cellulaire et des cultures de CHO avec des taux de recouvrement initiaux différents, 16H après leur injection dans les puits. Spectres modélisés avec le circuit équivalent utilisé pour les cultures cellulaires.

Nous constatons que le circuit équivalent de la Figure 5- 19 modélise correctement les spectres expérimentaux. Pour les différents taux de recouvrement cellulaire initiaux, nous avons regroupé les coefficients de détermination (R^2) et les valeurs des composants du circuit équivalent dans le Tableau 5- 2.

Tableau 5- 2 : Comparaison des paramètres de modélisation de l'impédance des cultures avec différents taux de recouvrement initiaux. Modélisations obtenues avec le circuit équivalent utilisé pour les cultures cellulaires.

Taux de recouvrement cellulaire initial	66 %	80 %	100 %
R^2	1	0,99992	0,99995
$K_{\text{milieu}} (S.s^n)$	$6,07788.10^{-7}$ $\pm 7,55748.10^{-10}$	$6,31783.10^{-7}$ $\pm 3,90335.10^{-9}$	$4,80186.10^{-7}$ $\pm 2,04581.10^{-9}$
n_{milieu}	0,96865 $\pm 2,06748.10^{-4}$	0,98013 $\pm 9,81245.10^{-4}$	0,97704 $\pm 6,57914.10^{-4}$
$R_{\text{milieu}} (\Omega)$	5,29315 $\pm 0,16112$	4,59724 $\pm 1,65047$	3,43783 $\pm 1,75318$
$K_{\text{cellule}} (S.s^n)$	$4,03748.10^{-5}$ $\pm 5,47799.10^{-6}$	$2,50529.10^{-5}$ $\pm 1,49115.10^{-5}$	$4,40186.10^{-6}$ $\pm 1,15143.10^{-6}$
n_{cellule}	0,67685 $\pm 0,01346$	0,5946 $\pm 0,05475$	0,64511 $\pm 0,02638$
$R_{\text{cellule}} (\Omega)$	37,51378 $\pm 1,10075$	54,64608 $\pm 4,71098$	122,319 $\pm 3,75137$

Nous constatons que les coefficients de déterminations sont très proches de 1, ce qui montre que le modèle correspond bien aux mesures expérimentales.

R_{cellule} augmente avec la densité cellulaire initiale, K_{cellule} et R_{milieu} diminuent.

R_{cellule} augmente car les interstices intercellulaires deviennent moins nombreux avec l'augmentation du taux de recouvrement cellulaire. La conductance de ces interstices diminue donc.

La résistance du milieu R_{milieu} diminue avec le taux de recouvrement cellulaire initial. Cette diminution peut s'expliquer par l'acidification du milieu par les cellules au cours de leur développement. Plus les cellules sont nombreuses, plus cette acidification est élevée.

Comme ici le facteur de phase du CPE lié aux cellules n_{cellule} est supérieur à 0,5, le CPE se rapproche d'un comportement capacitif (cf équation (61) et chapitre 3, paragraphe I.2.). La diminution du facteur d'amplitude du CPE lié aux cellules K_{cellule} n'est pas triviale. Les cellules ne laissent pas passer les courants de conduction en basse fréquence. En se développant, leur croissance correspond donc à la mise en parallèle de plusieurs capacités. La capacité cellulaire devrait donc augmenter. Au contraire nous voyons ici qu'elle diminue avec la densité cellulaire.

Cette diminution de capacité peut donc correspondre à des capacités mise en série, autrement dit, à des cellules en surconfluence qui se superposent. Cette éventuelle surconfluence pourrait expliquer la fluorescence plus intense du tapis cellulaire avec un taux de recouvrement cellulaire initial de 100% par rapport à celle issue du tapis cellulaire avec un taux de recouvrement cellulaire initial de 80% d'une densité cellulaire à 80% (la fluorescence de la Figure 5- 18 B semble plus intense que celle de la Figure 5- 18 A).

Pour un tapis cellulaire avec une densité cellulaire initiale de 100%, le seul type de culture présentant une électrochimie stable au bout de 16H (cf Figure 5- 17), il est intéressant de constater que si nous considérons le facteur d'amplitude du CPE lié aux cellules K_{cellule} ($4,40186 \cdot 10^{-6}$ F) et que nous divisons cette valeur de capacité par la surface de nos puits ($\pi \cdot R^2$, où $R=0,3$ cm), nous obtenons une capacité surfacique de $16 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ qui correspond à la capacité surfacique des membranes cellulaires déterminée classiquement par technique de patch-clamp (cf lexique) ($\approx 20 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ (5-52)).

II.4. Interaction des cellules CHO avec la lactoferrine

Les précédentes expériences nous ont permis de caractériser électriquement la culture cellulaire au sein des dispositifs à puits, d'étudier des paramètres biologiques pouvant modifier l'analyse électrochimique de l'interaction des CHO avec la Lf et de modéliser théoriquement l'impédance d'une culture cellulaire. L'interaction des cellules CHO avec la Lf peut maintenant être étudiée.

Pour toutes les expériences, la protéine est diluée dans le milieu avec une concentration de 5 μM . Cette concentration est environ deux fois supérieure à la constante de dissociation à l'équilibre des CHO-K1 avec la Lf (2,6 μM , cf paragraphe I.2.2).

Pour cette concentration de Lf, 50% des récepteurs membranaires des CHO sont occupés par la protéine. En effectuant une règle de trois, nous déterminons qu'une concentration en Lf de 5 μM permet d'occuper 96,2% des récepteurs membranaires des CHO spécifiques de la protéine.

Afin de pouvoir comparer aisément les différentes expériences ou les mesures effectuées à des fréquences d'étude distinctes, nous avons représentés des valeurs normées plutôt que des valeurs absolues. Les valeurs sont normées par rapport aux valeurs prises en début d'expérience, avant l'injection de protéine. De même, les variations sont calculées en pourcentage.

Dans ce paragraphe, les analyses cinétiques (à fréquence fixe) ont été effectuées avec l'Agilent 4292.

II.4.1. Etude de l'interaction CHO-Lf sans protéine témoin

II.4.1.1. Etude fréquentielle sur un tapis cellulaire à confluence

L'injection de la Lf a d'abord été étudiée sur un tapis cellulaire à confluence. En effet, cette densité cellulaire nous permet d'obtenir une résistance électrique quasiment stable au cours du temps (cf Figure 5- 17). Pour cela, les cellules ont été injectées dans les puits de manière à obtenir un taux de recouvrement cellulaire initial de 100% (situation de confluence) et l'expérience a été effectuée 16H après leur injection.

Avant l'expérience, au lendemain de la culture, le milieu cellulaire a été renouvelé. L'injection de la Lf a été effectuée 30 minutes après ce changement de milieu.

Pour analyser l'interaction Lf-CHO, nous avons mesuré les spectres de résistance du tapis cellulaire à confluence en continu avec une résolution temporelle de 107s.

Les cinétiques des résistances mesurées aux différentes fréquences ont été déterminées à partir de ces spectres à l'aide du programme Matlab.

La Figure 5- 22 présente l'évolution temporelle de la résistance normée par rapport à sa valeur avant l'injection de la Lf. La réactance n'est pas représentée car elle présente des variations plus faibles.

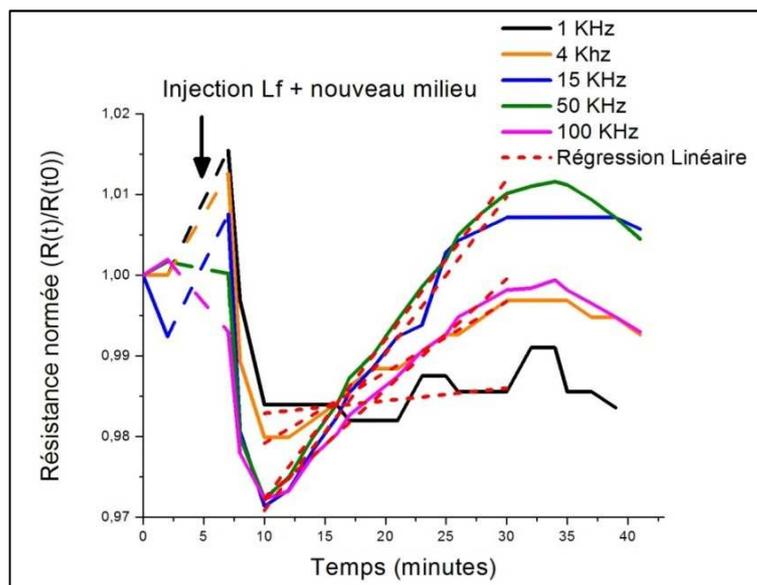


Figure 5- 22 : Suivi cinétique à différentes fréquences des résistances normées d'une culture de CHO à confluence après l'injection de Lf.

Pour les fréquences de 1 KHz, 4 KHz, et 15 KHz, après l'injection du nouveau milieu contenant la Lf, la résistance augmente comme pour un changement de milieu sans Lf (cf Figure 5- 15 et Figure 5- 16). Pour les fréquences supérieures, la résistance reste égale ou diminue légèrement. A 15 KHz, la résistance augmente de 1,52 %.

Tout de suite après l'augmentation brusque de résistance causée par l'injection de Lf, la résistance diminue rapidement (≈ 1 min). A 15 KHz, la résistance diminue de 2,67 %.

Après cette diminution rapide, la résistance ne se stabilise pas comme c'est le cas lors d'un changement de milieu, mais augmente linéairement. Les régressions linéaires correspondantes sont représentées sur les figures en pointillés rouges (cette représentation est utilisée pour les différentes expériences décrites dans ce paragraphe).

Cette augmentation linéaire est la plus importante à 15 KHz. Cette fréquence est identique à la fréquence à laquelle les variations de résistance issues de la croissance cellulaire sont maximales (cf Tableau 5- 1).

La méthode utilisée pour caractériser et quantifier cette augmentation linéaire est expliquée en annexe 4. Durant cette phase, la résistance augmente de la résistance de 0,2 %/min

Comme la résistance électrique est le paramètre le plus affecté par l'injection de protéine, la détection électrochimique de l'interaction Lf-CHO se fait principalement par les courants de conduction et non par les courants de déplacement.

D'après la modélisation des cultures cellulaires avec le circuit électrique équivalent de la Figure 5- 19, nous savons que la résistance du tapis cellulaire dépend principalement du milieu de culture présent dans les interstices intercellulaires (cf paragraphe II.3, Figure 5- 20 et Tableau 5- 2).

Les variations de résistance ici observées sont de faibles amplitudes. Le tapis cellulaire étant à confluence, il présente peu d'interstices intercellulaires. Les variations de résistance sont donc difficilement détectables.

Afin de mesurer plus sensiblement les variations de résistance, nous avons donc décidé d'étudier l'interaction CHO-Lf avec des tapis cellulaire qui ne sont délibérément pas en confluence.

II.4.1.2. Analyse à fréquence fixe sur un tapis cellulaire non confluente

Pour étudier l'interaction de la Lf avec des cellules qui ne sont pas à confluence, les CHO ont été injectées dans les puits de manière à obtenir un taux de recouvrement cellulaire initial égal à 80% de la surface totale du fond des puits. L'expérience a été effectuée après 16H de culture.

Le milieu cellulaire a été renouvelé avant l'expérience. L'injection des protéines a été effectuée 25 minutes après ce changement de milieu.

Les analyses biologiques sont classiquement effectuées avec des résolutions temporelles élevées. Pour satisfaire cette condition, nous avons effectué notre analyse avec une mesure d'impédance à fréquence fixe. D'après la précédente expérience, les variations de résistance provoquées par l'injection de Lf sont maximales à la fréquence à laquelle les variations de résistance issues de la croissance cellulaire sont maximales. Nous avons donc mesuré ici l'impédance du tapis cellulaire lors de l'injection de Lf à 15 KHz avec une résolution de 1,1s.

La cinétique normée de la résistance à 15 KHz est représentée sur la Figure 5- 23.

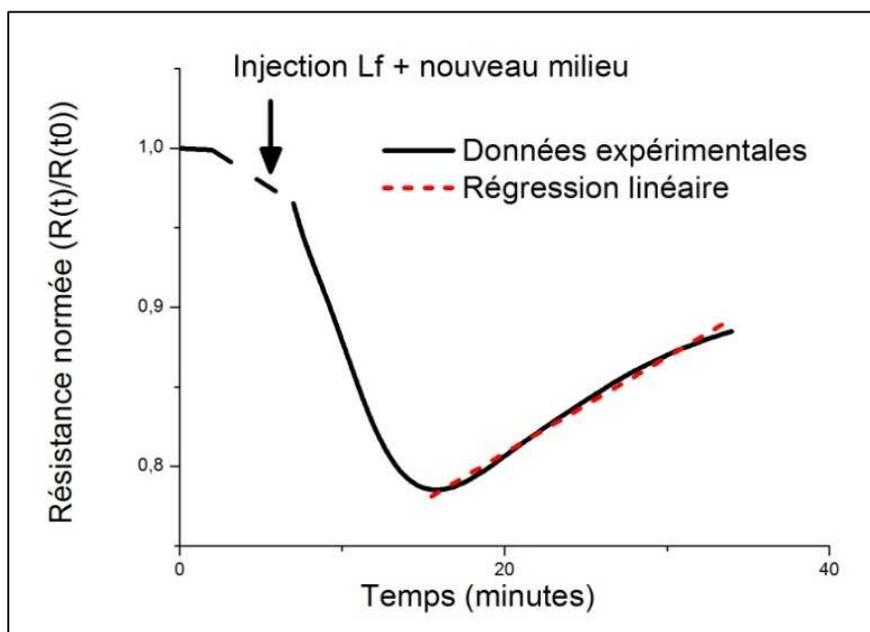


Figure 5- 23 : Suivi cinétique de la résistance normée à 15 KHz d'une culture de CHO non confluente après l'injection de Lf.

Contrairement à la précédente expérience, après l'injection de Lf, la résistance n'augmente pas mais diminue de 3,36%.

Tout de suite après l'injection de la protéine, la résistance diminue de façon importante puisqu'elle décroît de 18,67 % en 8 minutes après l'injection de la Lf. Ce temps correspond environ au temps mis par une culture cellulaire qui n'est pas à confluence pour se stabiliser après un changement de milieu (cf Figure 5- 16).

La résistance augmente ensuite linéairement au cours du temps, comme nous l'avons observé lors de l'injection de Lf sur un tapis cellulaire à confluence (cf .Figure 5- 22). L'augmentation de la résistance est ici de 0,77 %/min.

Nous constatons donc que les variations de résistance obtenues sur un tapis cellulaire non confluent sont de plus grande amplitude que celles obtenues sur un tapis cellulaire confluent.

II.4.2. Etude de l'interaction CHO-Lf avec une protéine témoin

Pour confirmer la spécificité de la détection électrochimique de l'interaction CHO-Lf, nous avons utilisé une protéine témoin développée par l'équipe de glycobiologie structurale et fonctionnelle de l'USTL (5-53). Cette protéine est une Lf non spécifique qui ne possède les acides aminés lui permettant de se fixer aux protéoglycanes des CHO (5-54). L'endocytose de la Lf par les CHO nécessite la fixation de la Lf aux protéoglycanes et à la nucléoline (5-26) (cf paragraphe I.2.2). La Lf non spécifique ne peut donc pas être endocytée par les CHO.

La Lf non spécifique est une protéine qui peut ainsi être utilisée pour les expériences témoin à l'interaction et à l'endocytose de la Lf par les CHO.

Considérant les meilleures sensibilités obtenues avec la culture cellulaire non confluite, nous avons continué à étudier l'interaction de la Lf spécifique et non spécifique sur des cultures cellulaires non confluentes. Comme la Lf spécifique, la Lf non spécifique est injectée dans les puits à une concentration de 5 μ M.

II.4.2.1. Analyse fréquentielle

Pour cette expérience, la culture cellulaire a été réalisée en injectant dans les puits un nombre de cellules permettant d'obtenir un taux de recouvrement cellulaire initial égal à 66% de la surface totale du fond des puits.

Comme au paragraphe II.2.1.2., l'expérience a été effectuée 46H après le début de la culture afin que la résistance du tapis cellulaire soit égale à celle d'une culture réalisée avec un taux de recouvrement cellulaire initial de 80%, 16H après le début de la culture (cf annexe 3). Cette expérience est donc comparable à celle présentée sur la Figure 5- 23.

Le milieu cellulaire a été renouvelé avant l'expérience. L'injection des protéines a été effectuée 30 minutes après ce changement de milieu.

Après l'injection des protéines, les spectres de résistance ont été mesurés avec une résolution temporelle de 37s.

La figure suivante présente le suivi cinétique de la résistance des cellules après l'injection des protéines à différentes fréquences.

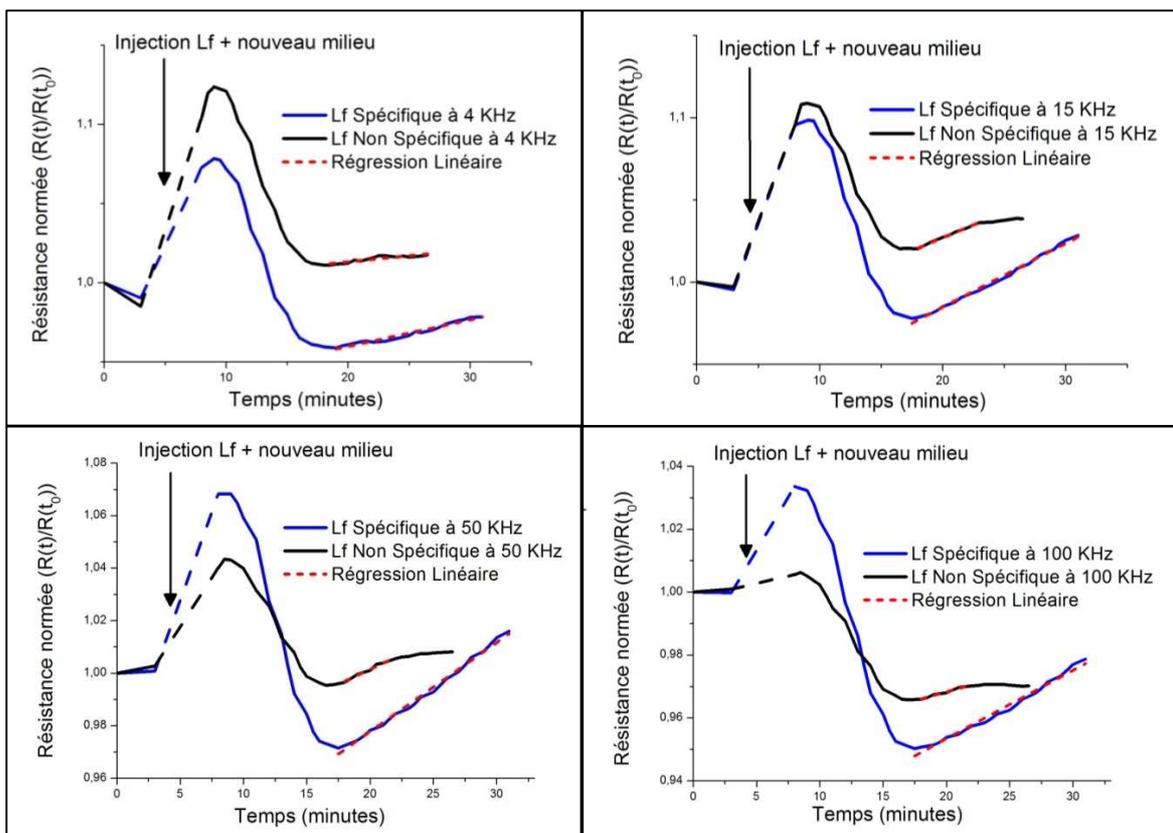


Figure 5- 24 : Suivi cinétique à différentes fréquences des résistances normées d'une culture de CHO non confluente après l'injection de Lf spécifique et non spécifique

Pour toutes les fréquences, l'injection de Lf spécifique provoque une première augmentation brusque de la résistance. A 15 KHz, la résistance augmente de 10%.

De même, l'injection de Lf non spécifique provoque une augmentation instantanée de la résistance pour toutes les fréquences. A 15 KHz, cette augmentation est de 9,92 %.

Pour toutes les fréquences et pour les deux types de protéine, après cette augmentation rapide, la résistance diminue progressivement sur environ 8 minutes. Comme pour l'expérience de la Figure 5- 23, ce temps correspond environ au temps mis par une culture cellulaire non confluente pour se stabiliser après un changement de milieu (cf Figure 5- 16). Pour la Lf spécifique, à 15 KHz, cette diminution est de 10,75 %. Pour la Lf non spécifique, à 15 KHz, cette diminution est de 8 %.

Concernant l'injection de Lf spécifique, pour toutes les fréquences, après avoir diminué, la résistance augmente linéairement comme nous l'avons observé lors des précédentes expériences. De même, la variation de résistance la plus importante est obtenue à 15 KHz, à la fréquence à laquelle les variations de résistance issues de la croissance cellulaire sont maximales. A cette fréquence, la résistance augmente de 0,4%/min.

Concernant l'injection de Lf non spécifique, pour toutes les fréquences, après avoir diminué, la résistance augmente faiblement pour rapidement se stabiliser.

II.4.2.2. Analyse à fréquence fixe

Nous avons effectuée l'analyse de l'injection de Lf spécifique et de Lf non spécifique à fréquence fixe afin d'obtenir des mesures d'impédance avec une résolution temporelle plus élevée et confirmer les précédents résultats.

Pour cette expérience, nous avons réalisé quatre cultures de cellule en injectant dans les puits un nombre de cellules correspondant à un taux de recouvrement initial égal à 80% de la surface totale du fond des puits. L'expérience a été effectuée après 16H de culture.

L'injection des protéines a été effectuée 30 minutes après un premier changement de milieu, le lendemain de la culture.

Au cours de la croissance cellulaire, les maximums de variation de résistance ont été mesurés aux environ de 4 KHz. Nous avons donc effectué l'analyse cinétique à 4 KHz avec une résolution de 5s.

Nous avons injecté la Lf sur deux cultures et la Lf non spécifique sur les deux autres cultures afin de mesurer les cinétiques des résistances en doublon. Les mesures présentées sur la Figure 5- 25 correspondent aux moyennes respectives de ces cinétiques. Les écarts types représentés ont également été déterminés à partir de ces doublons.

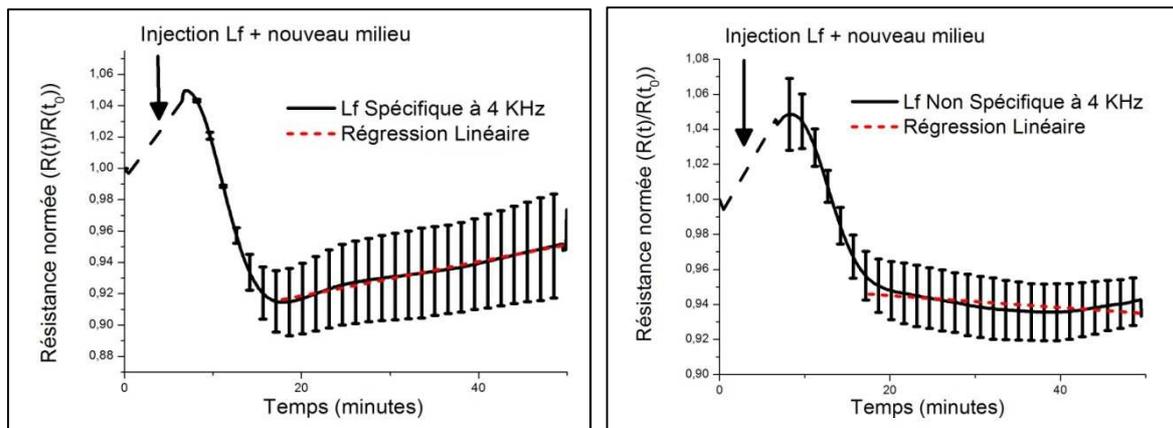


Figure 5- 25 : Suivi cinétique de la résistance normée à 4 KHz et moyennée sur deux cultures de CHO non confluentes après l'injection de Lf et de Lf non spécifique.

Comme précédemment, nous constatons que les injections des deux types de protéines provoquent des augmentations brusques de résistance. Pour la Lf spécifique, la résistance augmente de 4,5%. Pour la Lf non spécifique, elle augmente de 3,5%.

Après cette augmentation rapide, pour les deux types de protéine, la résistance diminue progressivement sur environ 11 minutes. Pour la Lf spécifique, la résistance diminue de 13,6%. Pour la Lf non spécifique, elle diminue de 9,3 %.

Concernant l'injection de Lf spécifique, après avoir diminué, la résistance augmente linéairement comme nous l'avons observé lors des précédentes expériences. La pente est alors de 0,12%/min.

Concernant l'injection de Lf non spécifique, après avoir diminué, la résistance varie beaucoup plus lentement. D'abord, elle diminue légèrement puis augmente. Elle semble ainsi se stabiliser autour d'une valeur moyenne.

II.4.3. Discussion et interprétation électrochimique

Les précédentes expériences, nous ont montré que l'injection de protéine provoque d'abord une augmentation brusque de la résistance suivie d'une diminution. Pour un tapis cellulaire non confluent, cette diminution dure environ 10 minutes. Cette évolution temporelle est identique à celle constatée lors d'un changement de milieu (cf paragraphe II.2.1). Elle est donc provoquée par les variations de température subie par les cellules lors de l'injection d'un nouveau milieu à la pipette.

Lors de l'injection de Lf spécifique, après la phase transitoire inhérente au changement de milieu, la résistance augmente progressivement et linéairement.

Pour l'injection de Lf non spécifique, la résistance se stabilise ensuite rapidement.

La résistance dépend principalement du milieu présent dans les interstices intercellulaires (cf modélisation du paragraphe II.3). L'augmentation de résistance mesurée lors de l'injection de Lf est donc due à la diminution de la conductivité du milieu dans ces interstices.

Nous savons que la Lf spécifique adhère à 96,2 % des récepteurs membranaires des CHO (ie les protéoglycanes et la nucléoline, cf paragraphe I.2.2) ce qui lui permet de se faire endocytée. La Lf non spécifique adhère uniquement à la nucléoline et ne peut donc se faire endocytée par les CHO.

Quand un milieu contenant de la Lf spécifique est injecté dans les puits, la Lf spécifique est endocytée par les CHO et le milieu contient progressivement moins de protéines. Les protéines étant des particules chargées, la conductivité du milieu diminue et la résistance mesurée augmente. L'endocytose de la Lf spécifique entraîne donc l'augmentation linéaire précédemment mesurée.

Comme la Lf non spécifique n'est pas endocytée par les CHO, le milieu ne voit pas sa conduction modifiée suite à l'adhésion de la protéine aux CHO. Une fois le système stabilisé en température, la résistance se stabilise également rapidement.

Les différentes analyses effectuées nous ont permis de déterminer une tendance électrochimique liée à l'interaction de la Lf avec les CHO et à son endocytose. En étudiant de façon comparative l'interaction des CHO avec une protéine Lf spécifique et non spécifique, nous avons eu la confirmation que l'augmentation de résistance observée lors de l'injection de Lf est bien caractéristique de son interaction et de son endocytose par les CHO.

Au cours des précédentes expériences, nous avons caractérisé l'augmentation linéaire de l'impédance due à l'injection de Lf par des taux de variations (cf annexe 4). Ces taux de variation sont regroupés dans les tableaux suivants :

Tableau 5- 3 : Taux de variation des résistances lors des différentes injections de Lf.

	$\Delta R/\text{min}$		$\Delta R/\text{min}$
Analyse à fréquence fixe à 4 KHz (paragraphe II.4.2.2)	0,18 %/min	Analyse à fréquence fixe à 15 KHz (paragraphe II.4.1.2)	0,77 %/min
Analyse par spectroscopie d'impédance à 4 KHz (paragraphe II.4.2.1)	0,12 %/min	Analyse par spectroscopie d'impédance à 15 KHz (paragraphe II.4.2.1)	0,4 %/min

Nous voyons que malgré des paramètres électrochimiques identiques (même impédance), les taux de variation de résistance liés à l'endocytose de la Lf varient.

Nous avons également vu que les changements de milieu effectués pour injecter la protéine influencent les évolutions temporelles de la résistance. Ces changements de milieu entraînent des variations de résistance difficilement contrôlable. L'influence précise de ces perturbations sur la mesure électrique de l'endocytose de la protéine n'est ni quantifiable, ni contrôlable. Elles diminuent donc la reproductivité des variations de résistance mesurées lors de cette endocytose (cf Tableau 5- 3) et empêche de mesurer des cinétiques électrochimiques semblables.

Une technique d'injection des réactifs manuelle diminue donc la reproductivité des expériences. Cette méthode est couramment employée pour injecter des réactifs cytotoxiques ou des facteurs de croissance (cf paragraphe I.1) qui entraînent des changements importants

des propriétés électriques du tapis cellulaire. Elle n'est cependant pas adaptée lorsque les réactions électrochimiques détectées sont ténues.

La microfluidique permet d'injecter automatiquement des réactifs sur des cultures cellulaires *in-vitro* sans que les cellules soient exposées à l'air ambiant ou qu'elles subissent des changements de température. Les techniques microfluidiques évitent la manipulation manuelle de pipette puisque l'injection de réactifs se fait automatiquement par des pousses seringues reliées à des capillaires. Les capillaires permettent également de conserver les cellules au sein de l'incubateur au cours de l'injection des réactifs. La microfluidique permet ainsi d'injecter des réactifs sur les cellules avec beaucoup moins de perturbations qu'une injection manuelle.

Nous inspirant du système SPR présenté au paragraphe I.1, nous avons réalisé un dispositif microfluidique pour analyser l'interaction CHO-Lf sans intervention humaine.

III. Etude de l'interaction CHO-Lf avec les dispositifs microfluidiques

Pour rappel, nous avons décrit la conception du dispositif microfluidique au 2^{ème} chapitre, dans le paragraphe I.2.2. et sa fabrication au paragraphe II de ce même chapitre. Ce dispositif est représenté fixé sur son circuit imprimé sur la Figure 2-21.

Ce dispositif a été caractérisé au paragraphe III du 3^{ème} chapitre avec notamment du milieu cellulaire.

Nous allons maintenant décrire son utilisation dans le cadre de l'étude de l'interaction CHO-Lf pour pallier aux défauts du système à puits liés au changement de milieu.

III.1. Matériel de mesure pour la microfluidique

L'utilisation de la microfluidique nécessite du matériel spécifique à ce domaine :

- les pousse-seringues pour injecter automatiquement les liquides et réactifs
- les capillaires à l'intérieur desquels circulent les liquides et réactifs
- des seringues adaptées au pousse seringue et aux faibles volumes utilisés

- des connectiques reliant les seringues aux capillaires
- des éventuelles connectiques reliant les capillaires au composant microfluidique

Pour nos mesures d'impédancemétrie, en plus de ce matériel, nous avons utilisé un impédancemètre, un ordinateur portable avec le programme Labview et un circuit relais permettant d'analyser parallèlement plusieurs canaux (décrit au chapitre 2, au paragraphe II.3.4.) comme pour les mesures effectuées avec les dispositifs à puits.

Une fois que les cellules sont injectées dans le dispositif, ce dernier est placé dans l'incubateur de culture. Les seringues injectant le milieu de culture dans les dispositifs sont placées sur le pousse seringue, à l'extérieur de l'incubateur.

Une photo du dispositif microfluidique relié au matériel de mesure et placé dans l'incubateur est présentée en Figure 5- 26.

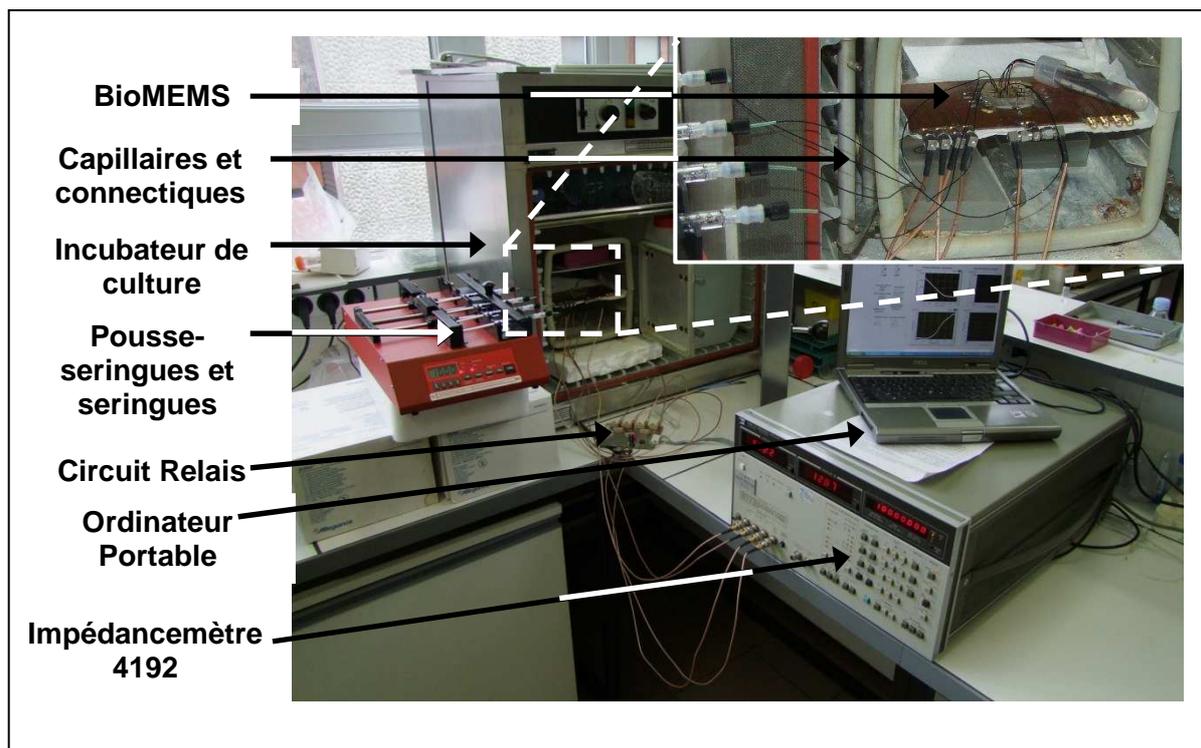


Figure 5- 26 : Photo du banc de montage des manipulations microfluidiques

III.2. Croissance cellulaire

Pour étudier l'interaction de la Lf avec les CHO dans les dispositifs microfluidiques, nous avons du cultiver les cellules dans les microcanaux. Ces expérience ont nécessité la mise au point de protocoles de culture particulier.

III.2.1. Protocole de culture

III.2.1.1. Protocole de stérilisation et de préparation du dispositif

Comme pour le dispositif à puits, il est important de stériliser les dispositifs pour qu'aucune bactérie ne contamine la culture cellulaire.

Il est aussi important de conditionner les électrodes avec du milieu cellulaire pour que les cellules adhèrent plus aisément aux électrodes lors de leur injection.

Le protocole de stérilisation des dispositifs microfluidiques utilisée est le suivant :

- Alcool versé sur le dispositif microfluidique sans les capillaires et les capillaires (avec leur connectique déjà fixé).
- Connexion des capillaires au dispositif.
- Injection en parallèle d'alcool dans chacun des canaux à l'aide d'un pousse seringue avec un débit de 10 μ l/min pendant 10 minutes.
- Injection en parallèle d'eau stérile dans chacun des canaux à l'aide d'un pousse seringue avec un débit de 10 μ l/min pendant 10 minutes.
- Injection en parallèle continue de milieu cellulaire F12-K dans chacun des canaux à l'aide d'un pousse seringue avec un débit de 10 μ l/min pendant 16H (pendant la nuit). Des mesures du milieu cellulaire sont effectuées en parallèle sur tous les canaux par spectroscopie d'impédance pendant la nuit. Ces mesures sont prises toutes les 3heures.

III.2.1.2. Protocole d'injection des cellules

Le protocole d'injection des cellules a été modifié trois fois. Les deux premiers protocoles ne nous ont pas permis d'obtenir suffisamment de cellules dans les canaux. Si trop peu de cellules sont injectées dans les canaux, les cellules peuvent ne pas s'y développer. La densité cellulaire a en effet une influence importante sur la croissance des cellules (5-55).

- Injection des cellules avec des seringues manipulées manuellement et connectées au dispositif par les capillaires.

Les cultures réalisées avec ce protocole n'ont pas données de résultats satisfaisants. Des fuites sur les bords des canaux ont été souvent observées après l'injection des cellules. Ces fuites sont causées par le détachement du PDMS sur le verre.

En poussant manuellement la seringue contenant les cellules, leur injection dans les canaux se fait à un débit élevé de plusieurs dixièmes de ml/minutes. Ce débit créé une pression élevée dans les microcanaux qui peut éventuellement provoquer la rupture du scellement du PDMS. Pour rappel, au chapitre 3, paragraphe III, les caractérisations des dispositifs microfluidiques avec différents liquides ont été effectuées en injectant les liquides à l'aide d'un pousse seringue (débit 10 μ l/min).

Pour rappel également, au chapitre 2, nous avons évoqué les travaux de Bhattacharya. Ces travaux montrent que les paramètres d'oxydation plasma que nous avons utilisés (cf chapitre 2, paragraphe II.2.2.3.) permettent à la fixation du PDMS sur le verre de subir des pressions maximales de 4,82 Bar.

Pour connaître le débit maximal permettant de ne pas dépasser une pression hydrodynamique de 4,82 Bar dans les microcanaux en PDMS fixés au substrat en verre, nous avons utilisé les formules (40), (41) et (42).

Pour ces calculs, nous avons considéré une longueur de capillaire d'entrée de 40 cm et un diamètre de 100 μ m. Une largeur de canal de 400 μ m, une hauteur de 100 μ m et une longueur de 0,62 cm (cf chapitre 2, paragraphe I.2.2.2.). Une longueur de capillaire de sortie de 10 cm et un diamètre de 100 μ m (pour transporter les réactifs du canal vers un tube remplie d'eau

servant de réservoir de sortie). Nous avons considéré une viscosité du milieu égale à celle de l'eau (0,001 Pa.s).

La résistance hydrodynamique du capillaire est très élevée car sa longueur est importante. La longueur du capillaire ne peut être réduite car elle correspond à la distance minimum pouvant séparer le pousse seringue du bioMEMS (le pousse seringue ne peut pas être placé à l'intérieur de l'incubateur). En conséquence de cette longueur importante, le diamètre du capillaire doit être le plus petit possible pour minimiser le volume mort (cf lexique). Ce volume est déterminant pour les injections de réactifs. Ce point est discuté dans le paragraphe concernant le protocole d'injection des réactifs.

Le débit maximal ainsi calculé est de 177,5 $\mu\text{l}/\text{min}$ (environ 3 $\mu\text{l}/\text{s}$). En manipulant manuellement la seringue, il est difficile d'assurer un débit aussi lent. Ceci explique pourquoi les injections des cellules effectuées manuellement provoquent ces fuites aux bords des canaux.

Nous avons donc décidé d'effectuer les injections de cellules avec un pousse-seringue pour éviter de provoquer des fuites dans nos dispositifs microfluidiques qui peuvent contaminer les cultures cellulaires.

Cette méthode d'injection est schématisé sur la Figure 5- 27, encart A.

- Injection des cellules avec des seringues manipulées à l'aide de pousse seringue et connectées au dispositif par les capillaires.

Pour effectuer ces injections, nous avons réglé le pousse seringue à un débit inférieur à 177,5 $\mu\text{l}/\text{min}$: 10 $\mu\text{l}/\text{min}$ (0.16667 $\mu\text{l}/\text{s}$) puis à 60 $\mu\text{l}/\text{min}$ (1 $\mu\text{l}/\text{s}$).

Les injections ont été effectuées en observant les microcanaux au microscope. L'injection des cellules est stoppée quand une concentration suffisante est présente dans les microcanaux.

En utilisant ce protocole d'injection, à ces faibles débits, il est difficile d'obtenir une concentration cellulaire suffisante dans les canaux, il semble qu'une partie importante des cellules reste et sédimente dans les seringues, les capillaires d'injection ou les connectiques microfluidiques. Les cultures effectuées avec le peu de cellules présentes dans les canaux ont donné des résultats mitigés.

Ce phénomène de sédimentation a déjà été remarqué par l'équipe du Pr. Lee. (5-56,5-57). Pour l'éviter, une bille magnétique stérilisée est placée à l'intérieur de la seringue, dans les réactifs injectés. Un aimant est placé contre la paroi extérieure de la seringue et est déplacé latéralement de manière à mouvoir la bille à l'intérieur de la seringue. Le déplacement de la bille va ainsi permettre d'agiter les cellules et de les garder en suspension malgré le faible débit (5-57). Nous avons pris connaissance de ces travaux après les expérimentations et n'avons pu l'essayer.

Pour éviter ce phénomène de sédimentation, nous avons placé le porte seringue à la verticale au dessus du bioMEMS afin de se servir de la gravité pour diminuer ce phénomène de sédimentation.

Cette manipulation n'a pas obtenu de résultats vraiment concluants.

Il est aussi possible que les cellules soient bloquées dans certains espaces présents entre les diverses connectiques microfluidiques.

Cette méthode d'injection est schématisée sur la Figure 5- 27, encart B.

Nous avons donc décidé de nous passer des connectiques microfluidique pour l'injection des cellules.

- Injection des cellules avec des seringues manipulées manuellement et connectées directement au dispositif (sans capillaires).

Pour injecter les cellules dans les microcanaux, nous avons finalement retiré les capillaires à l'entrée des canaux microfluidiques et nous y avons inséré directement les aiguilles des seringues.

Pour effectuer cette opération, les capillaires ne doivent pas être fixés de façon permanente aux dispositifs (avec de la colle ou du PDMS par exemple). Il faut donc choisir des capillaires dont le diamètre est très proche du diamètre du poinçon permettant de créer les accès aux canaux pour que les capillaires puissent être fixés au dispositif sans adhésifs supplémentaires.

Pour injecter les cellules dans N microcanaux, le protocole d'injection des cellules finalement utilisé est le suivant :

- A la fin de la phase de stérilisation, verser de l'alcool sur le dispositif microfluidique et sur les capillaires (avec leur connectique déjà fixé).
- Préparation d'un papier imbibé d'alcool.
- Changer toutes les seringues par de nouvelles seringues avec du nouveau milieu et les connecter à l'entrée des capillaires.
- Nettoyage du tapis cellulaire cultivés dans les N boîtes de Pétri avec 2 ml de Trypsine/EDTA pour les détacher du substrat. Retirer immédiatement la Trypsine/EDTA.
- Placer dans l'incubateur les N boîtes de Pétri contenant les cellules avec 1ml de nouvelle Trypsine pendant 5min à 37°C.
- Prélever la suspension de cellule de chaque boîte de Pétri et injecter chacune dans un tube avec 9ml de nouveau milieu cellulaire F12/K (avec 10% de sérum de veau fœtal).
- Centrifuger les tubes pendant 5min à 1100 RPM puis retirer le surnageant.
- Suspendre à nouveau les cellules de chaque tube dans 3 ml de milieu F12/K frais et les centrifuger à nouveau pendant 3min à 1100 RPM puis retirer le surnageant.
- Suspendre à nouveau les cellules dans 100µl ml de milieu F12/K frais (V_1) et rassembles les N suspensions dans un tube.
- Verser les $N \times 100\mu\text{l}$ de suspension de cellule dans un bouchon de tube Falcon de 15 ml.
- Retirer les capillaires d'entrée et de sortie d'un des N canaux et les poser sur le papier imbibé d'alcool.
- Introduire 100µl de la suspension de cellule issue du bouchon de tube dans une seringue de 1ml avec aiguille et injecter ces 100µl dans les canaux
- Vider l'air des capillaires en poussant légèrement les seringues contenant le nouveau milieu et les replacer sur le dispositif tout de suite après l'injection des cellules.
- Répéter les trois dernières étapes pour les autres canaux.
- Observation au microscope à fluorescence de la densité cellulaire des canaux.

Dans ce protocole, il est bien entendu très important de réussir à garder les capillaires stériles pendant l'injection des cellules.

Les différents protocoles d'injection sont schématisés sur la Figure 5- 27. La méthode d'injection ici utilisée est schématisée dans l'encart C.

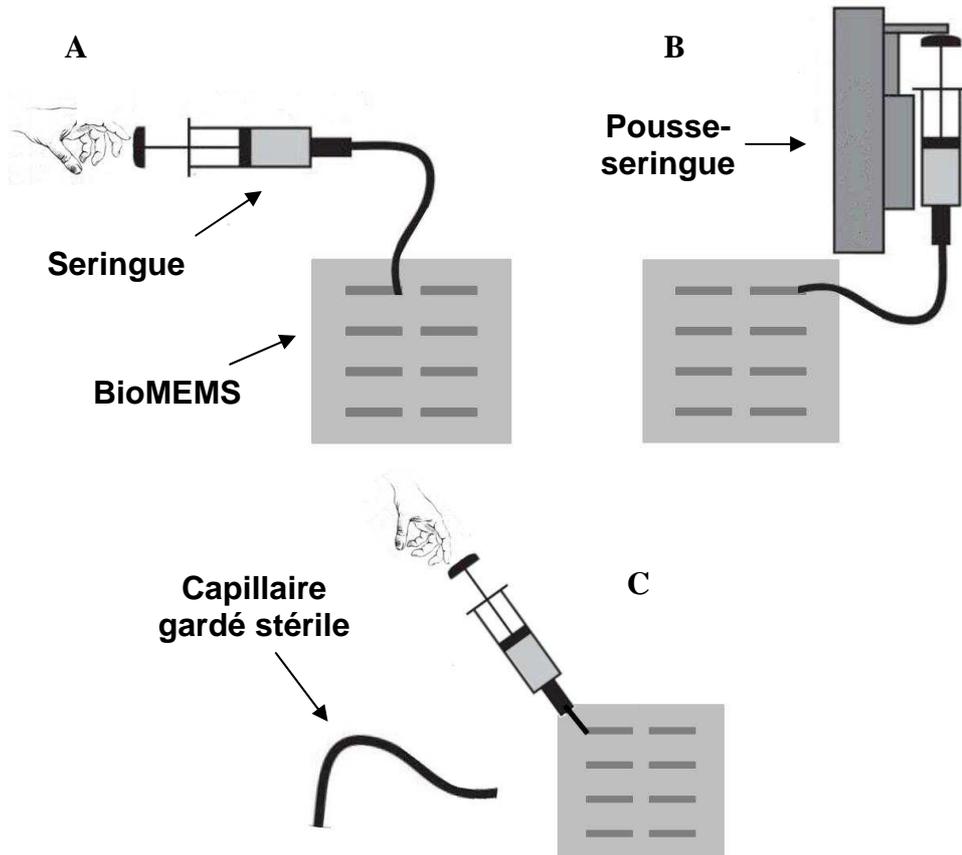


Figure 5- 27 : Schéma des différentes méthodes d'injection des cellules dans les microcanaux

III.2.1.3. Discussion sur les méthodes d'injection des cellules dans les microcanaux

Concernant l'état de l'art des méthodes d'injections des cellules dans des microcanaux, de nombreux travaux de microfluidique ont déjà réussi à cultiver des cellules dans des microcanaux (5-58,5-59,5-60,5-61). Souvent les auteurs de ces publications ne précisent pas si l'injection des cellules se fait avec ou sans les capillaires, avec ou sans pousse seringue. Les difficultés liées à ces injections dépendent de la géométrie et du type de microdispositif utilisé.

Dans notre cas, pour les études impédimétriques, le PDMS est fixé à la fois sur du verre et sur du métal. D'après Nevill et al.(5-56), le PDMS ne peut se fixer de façon permanente au métal et les lignes de métal sont donc souvent à l'origine des fuites. Dans notre cas, avec les paramètres de fixation définis au 2^{ème} chapitre, paragraphe II.2.2.3., le PDMS est fixé au verre et au métal de façon permanente. Seulement, cette fixation ne peut supporter des pressions trop élevées.

La méthode développée (cf Figure 5- 27.C) nécessite de garder les capillaires stériles au cours de l'injection des cellules. Cette technique requiert une certaine expérience dans la culture cellulaire *in-vitro* et entraîne une disparité dans la concentration de cellules injectées. Une méthode originale a récemment été développée par Morel et al. (5-62). Cette technique permet de cultiver des cellules sur un substrat complet pour venir ensuite fixer un microcanal sur cette culture à l'aide d'une résine photosensible. Nous avons pris connaissance de ces travaux après les expérimentations et n'avons pu l'essayer.

III.2.1.4. Protocole de culture des cellules dans les microcanaux et suivi de leur culture par impédancemétrie

Une fois les cellules injectées en nombre suffisant dans les canaux, les cellules sont cultivées dans les canaux selon le protocole suivant :

- Après avoir injecté les cellules dans les canaux et déterminer qualitativement leur nombre par observation microscopique, le bioMEMS est placé dans l'incubateur et les seringues fixées au pousse-seringue en dehors de l'incubateur.

- Les cellules sont laissées sans flux pendant 4 heures pour les laisser adhérer aux électrodes.
- Du milieu frais est injecté à un flux de 167 nl/min durant la nuit. Ainsi le milieu du canal est renouvelé toutes les 1min12s.
- Des mesures d'impédance sont effectuées dans chaque canal toutes les 3h.
- Le lendemain, la confluence des canaux est vérifiée au microscope à fluorescence.

III.2.2. Suivi de la culture cellulaire dans des microcanaux par impédancemétrie

III.2.2.1. Comparaison quantitative des cultures

La mesure en parallèle des spectres d'impédance de plusieurs microcanaux dans lesquelles les CHO ont été injectées nous permet de comparer et de quantifier la confluence des tapis cellulaires.

La figure suivante montre les résistances mesurées juste après l'injection des cellules dans les microcanaux et 24H après.

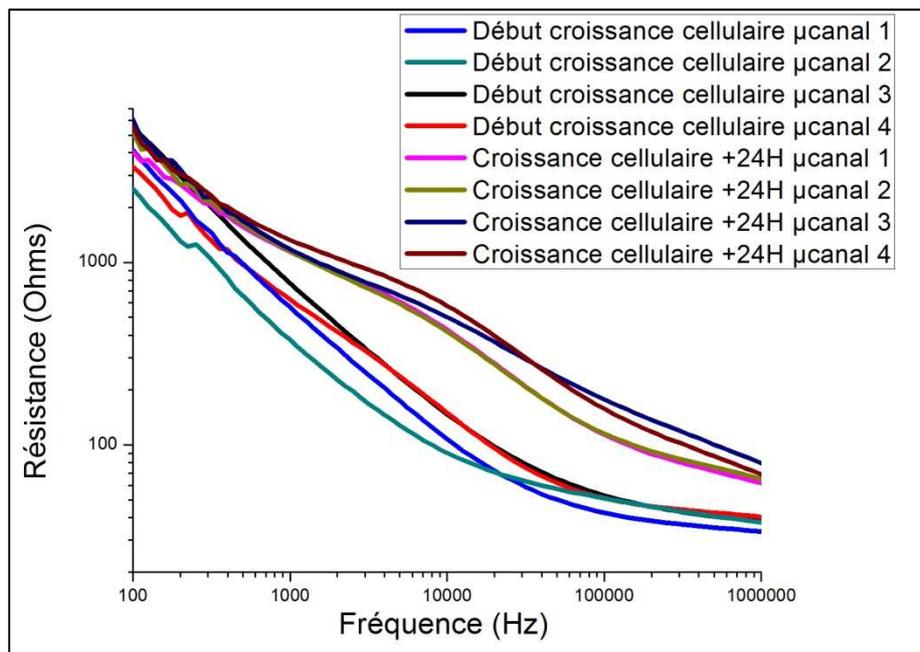


Figure 5- 28 : Résistances de quatre cultures de CHO effectuées dans des µcanaux en début et en fin de culture

Comme pour la croissance dans les puits, nous voyons que la partie réelle augmente au cours de la croissance. L'allure spectrale des résistances en fin de culture se rapproche de celle mesurée dans des puits (cf Figure 5- 13).

Beaucoup de travaux ont déjà utilisé des canaux microfluidiques avec des systèmes de mesure électrique pour étudier des cellules uniques (cf chapitre 1, paragraphe V.1.3.1.). A notre connaissance, ces travaux correspondent aux premières mesures électriques du développement de tapis cellulaire au sein de microcanaux.

III.2.2.2. Suivi cinétique de la résistance des CHO cultivées dans les microcanaux

En effectuant des mesures de résistance pendant la croissance cellulaire, il est possible de suivre quantitativement la croissance cellulaire. La résolution temporelle de ces mesures est de 180 minutes.

La figure suivante présente l'évolution temporelle de la résistance à 18 KHz de deux cultures effectuées dans des microcanaux et suivies en parallèle sur 26H. Les photos sont prises en retirant le bioMEMS de l'incubateur et en observant les microcanaux avec un microscope confocal à fluorescence.

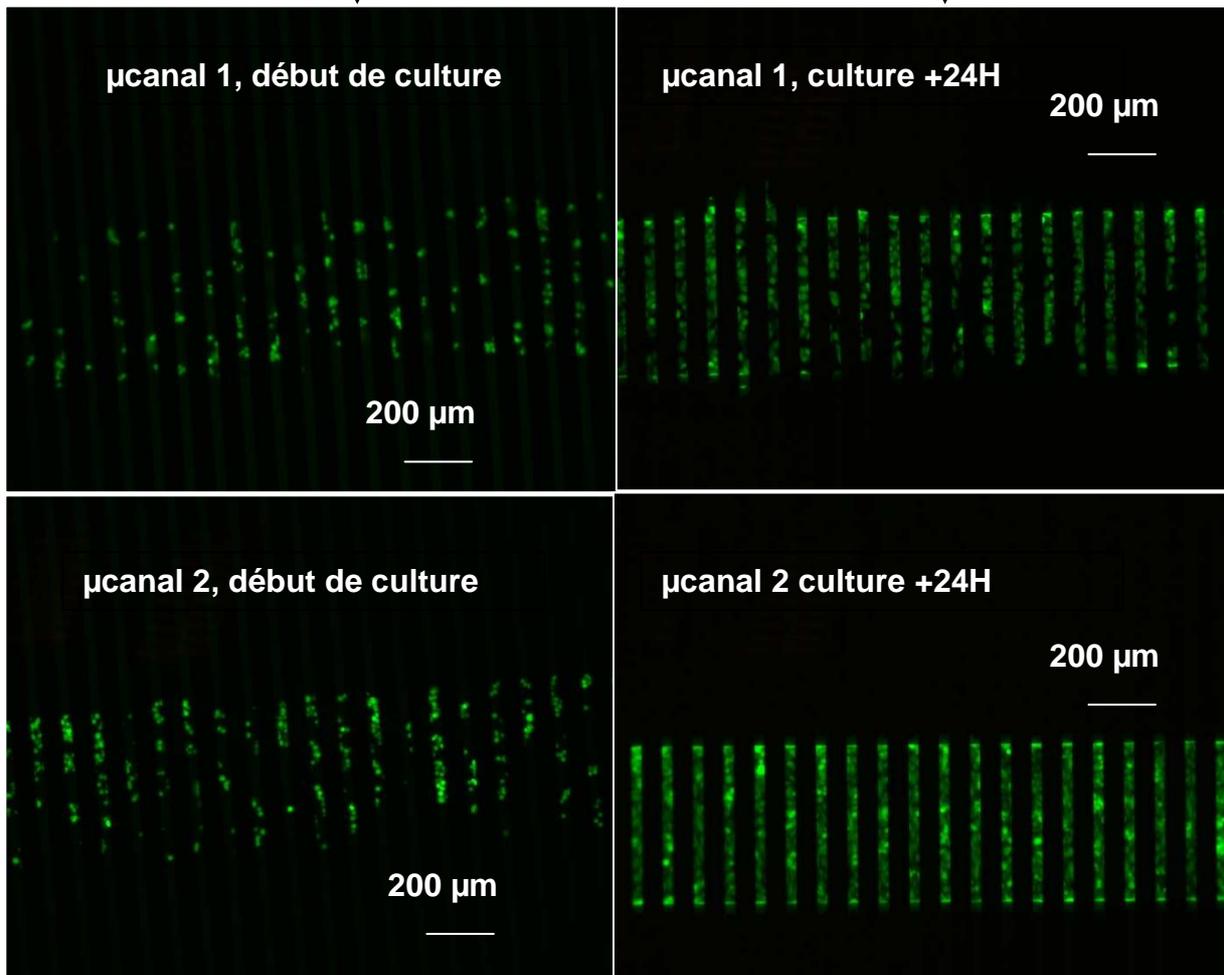
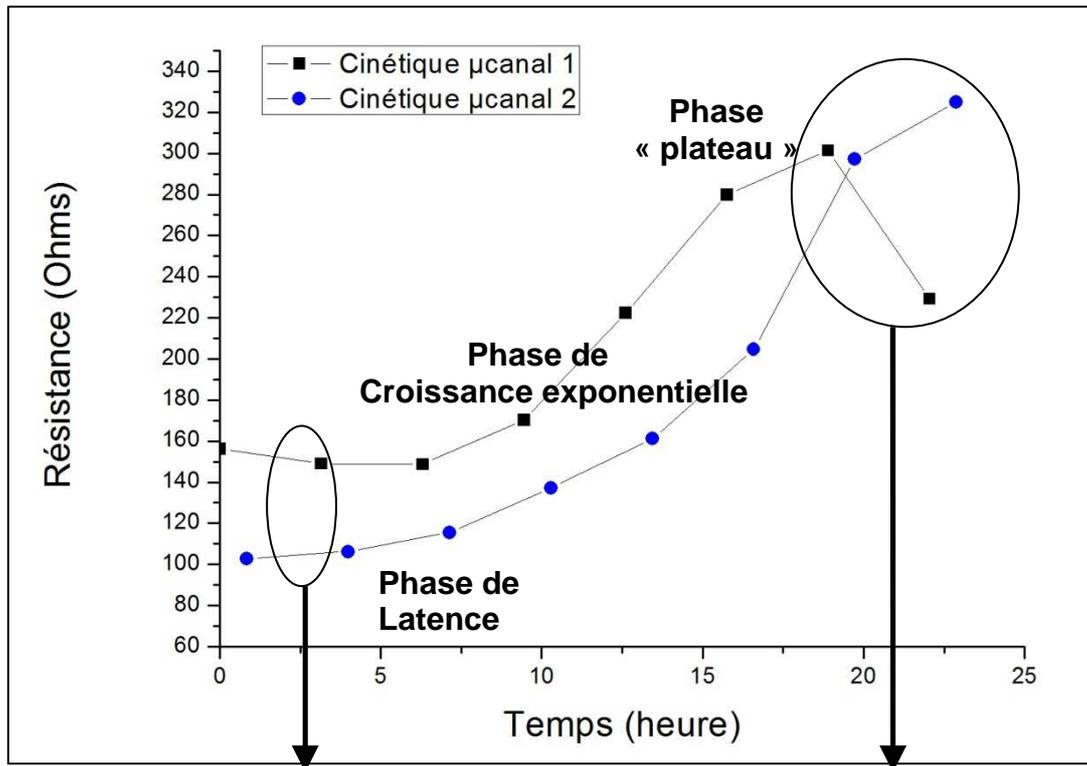


Figure 5- 29 : Cinétique de la résistance de deux cultures mesurées en parallèle et comparaison avec leurs observations microscopiques par fluorescence

Sur la figure précédente, la comparaison des mesures de résistance et des photos prises au microscope à fluorescence montre bien que la mesure de la résistance permet de suivre quantitativement la croissance cellulaire.

Au contraire de la croissance cellulaire mesurée dans les puits (cf Figure 5- 14), la phase d'étalement et de division cellulaire ne génère pas de pente différente, il n'est donc pas possible de distinguer ces deux phases de croissance.

La culture en canaux microfluidiques permet aussi d'effectuer des cultures cellulaires sur plusieurs jours sans avoir besoin de renouveler le milieu cellulaire puisque celui-ci est renouvelé automatiquement grâce au pousse-seringue.

La figure suivante présente l'évolution temporelle de la résistance à 18 KHz d'une culture avec une densité cellulaire initial assez faible effectuée dans un μ canal sur 48H.

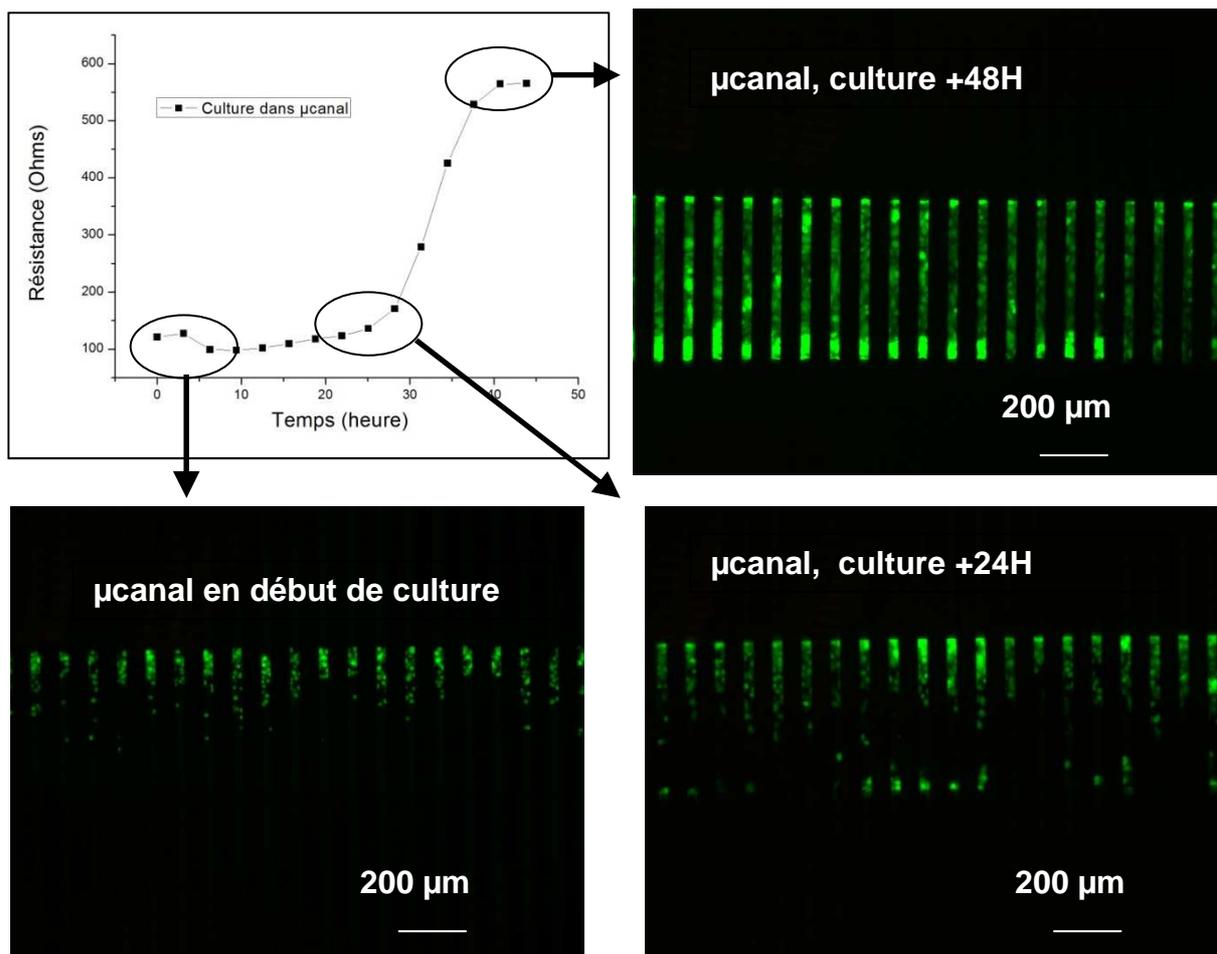


Figure 5- 30 : Cinétique de la résistance d'une culture de CHO effectuée dans un μ canal sur 48H et comparaison avec les observations microscopique par fluorescence.

III.2.2.3. Modélisation de la résistance des CHO cultivées dans les microcanaux

Pour modéliser la croissance cellulaire dans les microcanaux, nous avons utilisé le même circuit équivalent que celui utilisé pour les cultures effectuées dans les puits (cf Figure 5- 19).

La figure suivante présente les spectres de résistance et de réactance du milieu cellulaire des CHO (aucunes cellules) et d'une culture de cellules CHO juste après leur injection dans un microcanal, 18 H après leur injection et 24H après.

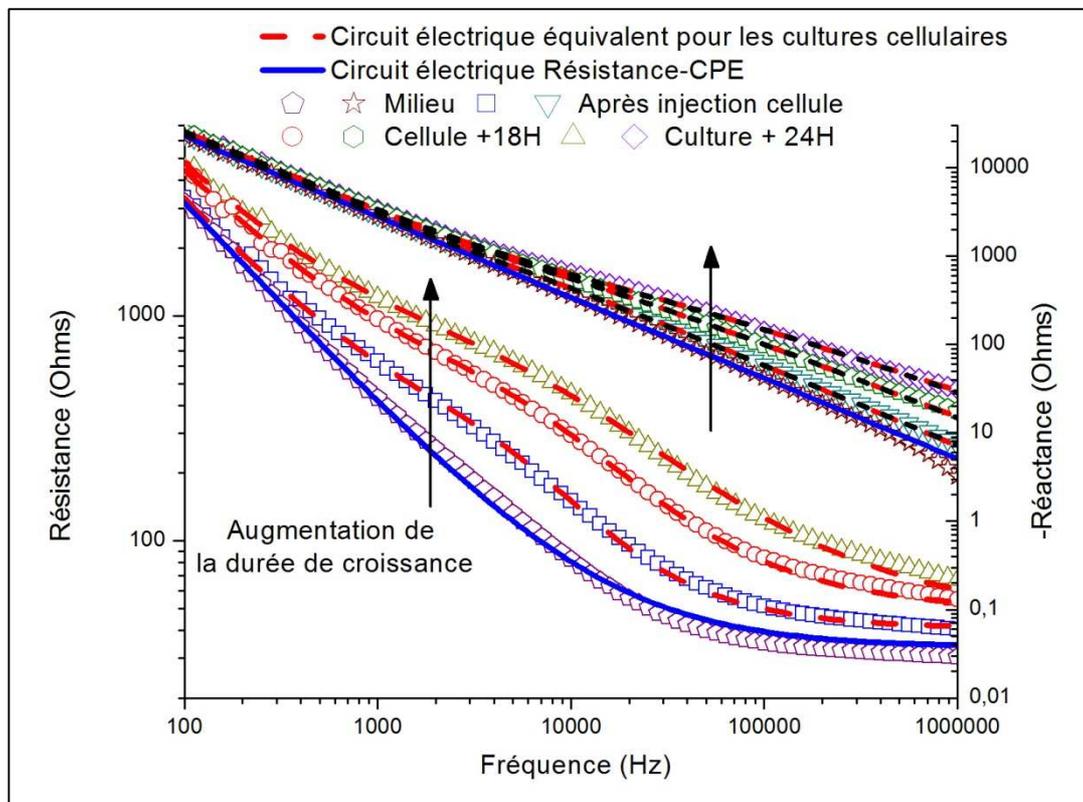


Figure 5- 31 : Résistance et réactance du milieu cellulaire et d'une cultures de CHO dans un microcanal à différents moments de leur croissance, avec les différentes configurations de circuit équivalent

Pour modéliser l'impédance du milieu cellulaire, nous avons utilisé le circuit électrique présenté au troisième chapitre, figure 3-31. Pour rappel, ce modèle consiste en un CPE en série avec une résistance.

Nous constatons que le circuit équivalent modélise correctement les spectres expérimentaux. Nous avons regroupé les coefficients de détermination (R^2) et les différentes valeurs des composants dans le tableau suivant.

Tableau 5- 4 : Comparaison des paramètres de modélisation de l'impédance des cultures avec différentes densités cellulaire initiales. Modélisation obtenue avec le circuit équivalent avec un modèle d'interface.

Circuit électrique avec un modèle d'interface	Après injection des cellules	Culture + 18H	Culture + 24H
R^2	0,99976	0,99971	0,99962
K_{milieu}	$1,10037E.10^{-7}$ $\pm 9,7342.10^{-10}$	$1,14223.10^{-7}$ $\pm 1,1715.10^{-9}$	$1,14228.10^{-7}$ $\pm 1,45144.10^{-9}$
n_{milieu}	$0,91945\pm$ $0,00137$	$0,90313\pm$ $0,00162$	$0,90222\pm$ $0,00204$
R_{milieu}	$40,69925\pm$ $8,51589$	$49,01366\pm$ $11,3811$	$45,5412\pm$ $15,15001$
$K_{cellule}$	$3,59218.10^{-7}$ $\pm 4,87395.10^{-7}$	$4,96466.10^{-7}$ $\pm 4,24872.10^{-7}$	$9,0735.10^{-7}$ $\pm 5,97033.10^{-7}$
$n_{cellule}$	$0,8999\pm$ $0,12924$	$0,78281\pm$ $0,07882$	$0,67564\pm$ $0,05928$
$R_{cellule}$	$225,78444\pm$ $32,96373$	$465,4957\pm$ $47,03353$	$769,78697\pm$ $70,6539$

Nous voyons avec ces paramètres que, comme avec les puits pour l'effet de la densité cellulaire, la résistance liée aux cellules $R_{cellule}$ augmente. Par contre, la capacité liée aux cellules $K_{cellule}$ augmente. Ceci confirme bien que la diminution de la capacité $K_{cellule}$ observée avec les systèmes à puits est due à une densité cellulaire initiale élevée (80% et 100% de confluence) qui entraîne une sur confluence en fin de croissance.

Comme pour les systèmes à puits, si nous considérons la capacité $K_{cellule}$ en fin de croissance (à 24H) et que nous divisons cette capacité par la surface recouvertes par les électrodes (5,3

mm x 400 µm, cf chapitre 2, paragraphe I.2.2.1 et I 2.2.2), nous obtenons pour les cellules une capacité membranaire surfacique de 43 µF/cm² qui se rapproche de la capacité membranaire surfacique précédemment déterminée (5-52).

Nous allons maintenant étudier l'évolution des paramètres de modélisation issus du circuit équivalent avec deux modèles d'interface.

III.3. Etude de l'interaction avec la Lf

Après avoir réussi à cultiver les cellules dans les microcanaux et à mesurer leur croissance par impédancemétrie, nous avons étudié l'interaction de la Lf avec les cellules par l'intermédiaire de la microfluidique. Cette interface microfluidique doit nous permettre d'injecter la protéine sur les cellules sans perturber leur environnement électrochimique.

III.3.1. Détermination du débit d'injection maximum des réactifs

La microfluidique diminue les perturbations mécaniques et électrochimiques de l'environnement cellulaire mais le passage des flux au dessus des cellules créé néanmoins des forces de cisaillement qui, si elles sont trop importantes, peuvent détériorer les cellules ou les détacher de leur substrat de culture.

Il est donc important de régler correctement le débit d'injection des réactifs. Anthony Treizebré a déjà étudié la culture de CHO dans des canaux microfluidiques pour des études avec une sonde THz (5-63). D'après sa thèse, le cisaillement dans un microcanal est égale à:

$$C_s = \frac{6 \times \eta \times Q}{h^2 \times l} \quad (82)$$

Où η est la viscosité du liquide, Q son débit, h la hauteur du canal et l sa largeur.

Les simulations numériques microfluidiques effectuées dans cette thèse avec COMSOL ont montré que des cisaillements de l'ordre de 0,04 Pa permettent de ne pas abimer les cellules CHO au sein des microcanaux.

D'après la formule (82), ce cisaillement maximal correspond pour nos canaux à un débit maximal de 1,6 $\mu\text{l}/\text{min}$ (96 $\mu\text{l}/\text{h}$).

Une fois les cellules cultivées dans les microcanaux, elles ne doivent donc pas être exposées à un débit supérieur à 1,6 $\mu\text{l}/\text{min}$.

III.3.2. Minimisation du volume mort

Nous avons évoqué au paragraphe III.2.1.2 l'importance du volume mort lié aux capillaires. Ce volume retardant l'arrivée des réactifs à la zone de détection et étant une éventuelle source de contamination, il doit être minimisé. Comme nous l'avons évoqué au même paragraphe, la longueur du capillaire ne peut être réduite (cf Figure 5- 26). Seul le diamètre intérieur du capillaire peut être minimisé.

Parallèlement à ce paramétrage, le diamètre intérieur des capillaires détermine aussi la pression avec laquelle les liquides sont amenés au canal contenant les cellules.

Pour exemple, si nous choisissons des capillaires avec un diamètre intérieur de 200 μm et une longueur de 40cm, à un débit de 1,6 $\mu\text{l}/\text{min}$, les réactifs mettront environ 7min51s pour atteindre le canal contenant les cellules.

Si nous choisissons un diamètre intérieur de 100 μm avec une même longueur, les réactifs mettront environ 1min58s à atteindre les cellules.

Le diamètre de 100 μm étant le plus petit disponible chez notre fournisseur (Upchurch), nous avons choisi ce diamètre.

III.3.3. 1^{er} Protocole d'injection de la Lf et ses résultats

Pour détecter l'interaction de la Lf avec les CHO avec une résolution temporelle élevée, nous avons utilisé l'impédancemètre 4192 en effectuant un balayage de deux points (cf chapitre 2, paragraphe III.1.2.). La résolution temporelle ainsi obtenue est de 52s.

Pour être sûr de ne pas endommager les cellules, nous avons utilisé un débit de 1,17 μ l/min. Ainsi les réactifs mettent environ 2min40s pour atteindre les cellules.

Comme pour les manipulations sur les puits, la Lf et Lf non spécifique ont été suspendues à une concentration de 5 μ M.

Le premier protocole utilisé pour l'étude de l'interaction Lf est le suivant :

- Etude des spectres de croissance (début, milieu, fin) pour choisir une fréquence fixe d'étude.
- Vérification de la stabilité de la croissance par les mesures d'impédances et leur analyse cinétique pendant une heure sous un flux de 167 nl/min.
- Mesures en parallèle sur 2 canaux avec respectivement injection de Lf, Lf mutante, changement de seringue.
- Mesures pendant 30 minutes sur chaque canal avec injection des protéines à un débit de: 0.07 ml/h (changement de milieu toutes les 10s dans les canaux). Début de l'interaction environ 2 minute 40s après injection.
- Observation des cellules après l'injection des protéines.

Après l'injection des protéines, le tapis cellulaire est très endommagé comme on peut le constater sur les photos suivantes :

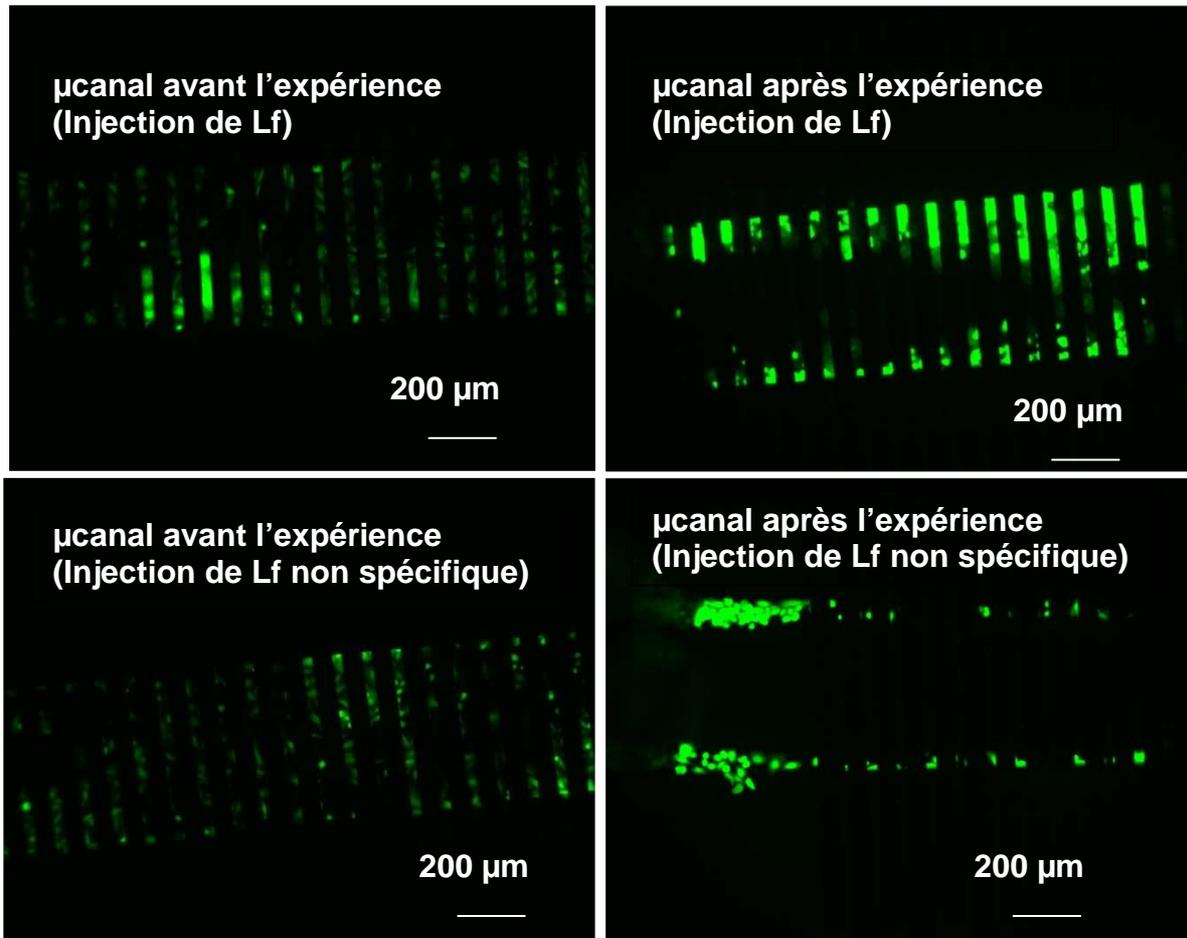


Figure 5- 32 : Comparaison des cultures cellulaires avant et après l'injection des protéines. Photos prises au microscope à fluorescence.

Nous voyons sur les photos que le canal dans lequel on a injecté la Lf contient davantage de cellules que celui dans lequel on injecté la Lf non spécifique.

Cette observation confirme l'augmentation des propriétés anti-inflammatoire induite par la Lf (5-24).

Les mesures électriques enregistrées pendant les manipulations ne donnent pas des résultats cohérents avec les manipulations sur les puits comme on peut le voir sur la Figure 5- 33.

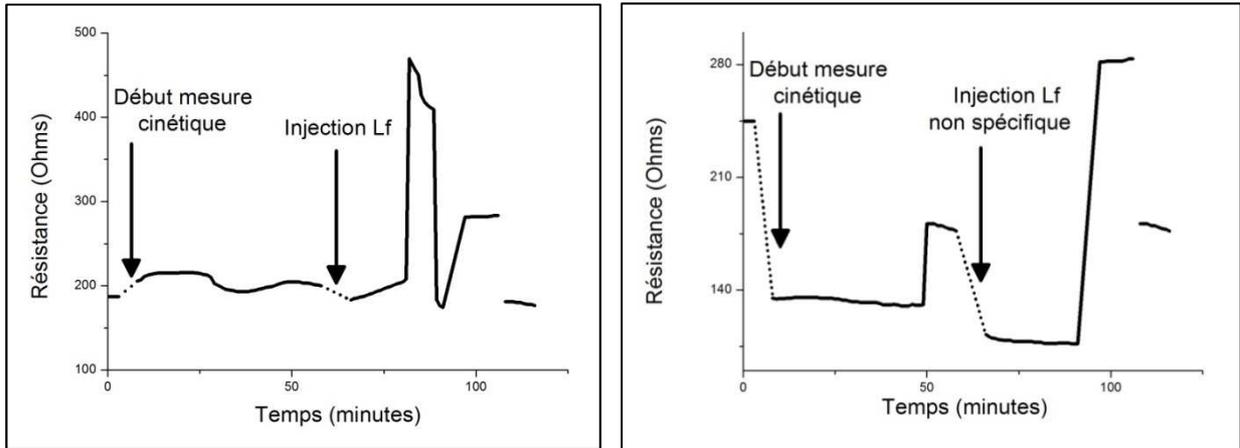


Figure 5- 33 : Evolutions temporelles des résistances électriques des canaux pendant l'injection de protéine (ici à 20 KHz)

Nous voyons que les résistances ont une tendance à diminuer au de la mesure, ce qui confirme le détachement des cellules.

Les augmentations brusques de résistance peuvent être attribuées au passage d'une bulle d'air dans les microcanaux.

Le passage de ces bulles est visibles sur les photos des Figure 5- 34 et Figure 5- 35. Quand la bulle d'air passe au dessus, le tapis cellulaire semble devenir plus homogène avec les différentes cellules qui sont plus difficilement distinguables. Cette déformation optique est causée par le changement d'indice optique du au passage d'air au lieu de milieu cellulaire.

Ce phénomène parasite peut être corrigé (5-64,5-65) mais nous n'avons pas eu le temps de mettre en place un système rectificatif. Une observation microscopique simultanée pourrait corrélérer de façon évidente les augmentations de résistivité avec le passage de ces bulles.

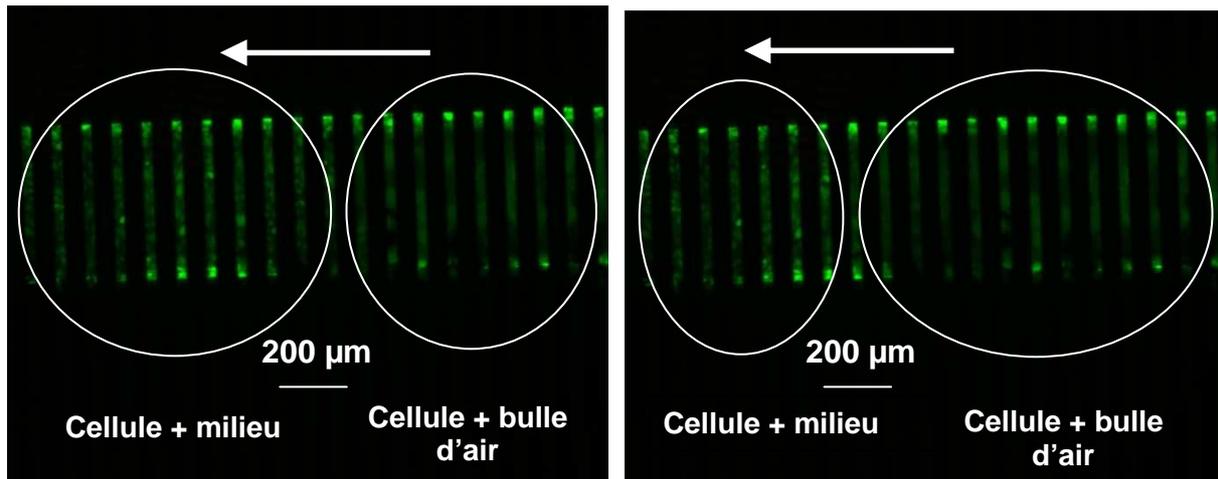


Figure 5- 34 : Photo prise au microscope à fluorescence du passage d'une bulle d'air dans un microcanal

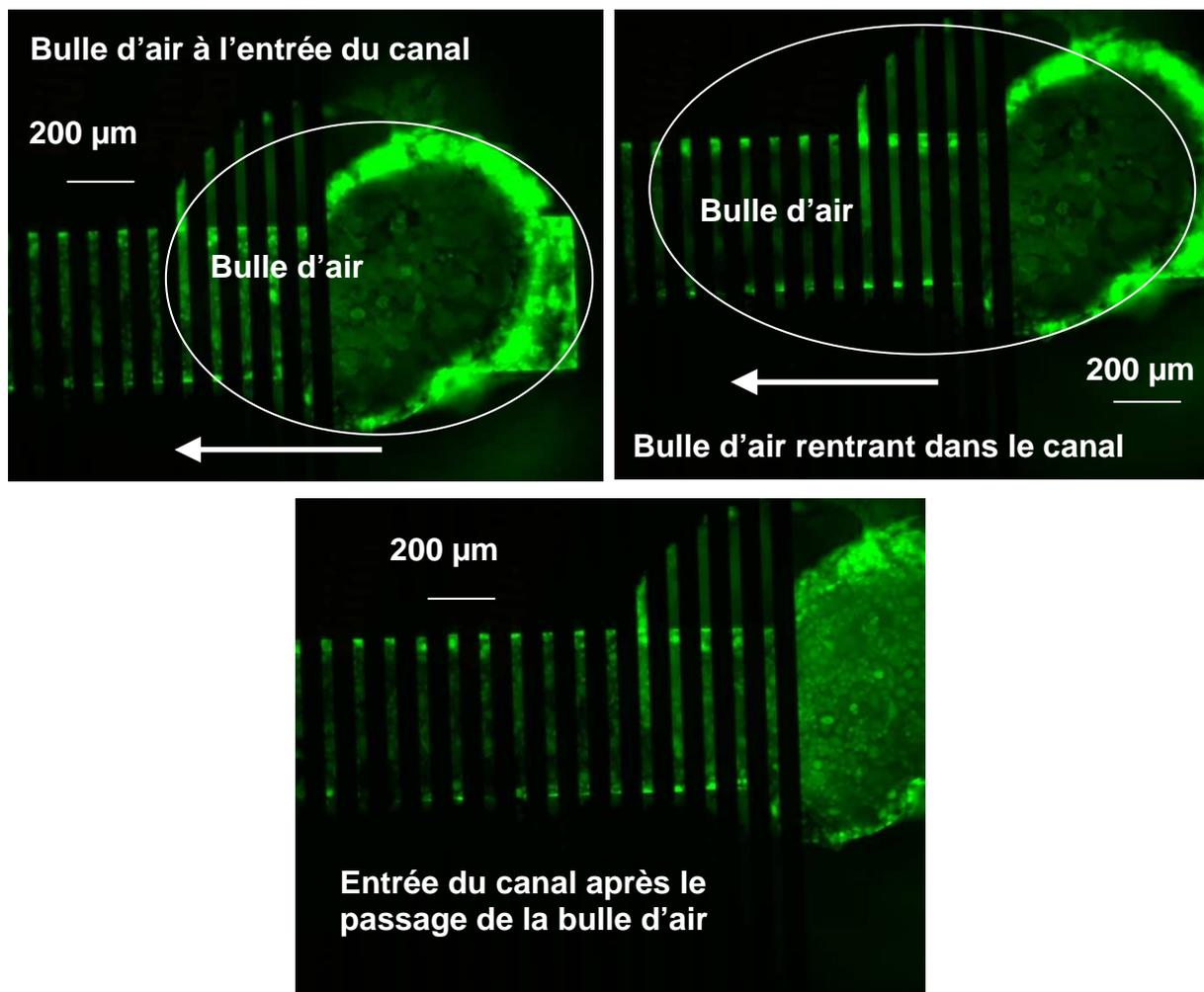


Figure 5- 35 : Photo prise au microscope à fluorescence avant, pendant et après le passage d'une bulle d'air à l'entrée du canal.

Les photos de la Figure 5- 32 montrent que les mesures effectuées sont invasives puisque beaucoup de cellules se sont détachées.

Nous avons donc modifié le protocole de mesure pour éviter ce phénomène.

III.3.4. 2^{ème} protocole d'injection de la Lf et ses résultats

Pour éviter une possible détérioration du tapis cellulaire au cours de l'expérience, nous avons diminué la durée de l'expérience.

Nous avons diminué le débit des liquides en supposant qu'il est trop élevé et provoque des forces de cisaillement trop important pour les cellules.

Le nouveau protocole utilisé est le suivant :

- Etude des spectres de croissance (début, milieu, fin) pour choisir une fréquence fixe d'étude.
- Vérification de la stabilité de la croissance par les mesures d'impédances et leur analyse cinétique pendant 20 minutes à un débit de 167 nl/h.
- Mesures en parallèle sur deux canaux avec respectivement injection de Lf et Lf non spécifique, changement de seringue.
- Mesures pendant 30 minutes sur chaque canal avec injection des milieux à un débit de 833 nl/min (changement de milieu toutes les 14s). Début de l'interaction environ 3 minute 47s après injection.
- Observation des cellules après l'injection des protéines.

La Figure 5- 36 présente les observations des tapis cellulaires avant et après l'expérience. On remarque que les cellules sont moins endommagées qu'à la précédente expérience mais que le tapis cellulaire est encore une fois abimé. Le protocole a donc permis de davantage préserver les cellules.

On remarque, comme pour la précédente expérience, que les cellules ayant réagit avec la Lf ont été davantage protégées que les cellules exposées à la Lf non spécifique. Cette nouvelle observation confirme le caractère anti-inflammatoire induit par la Lf.

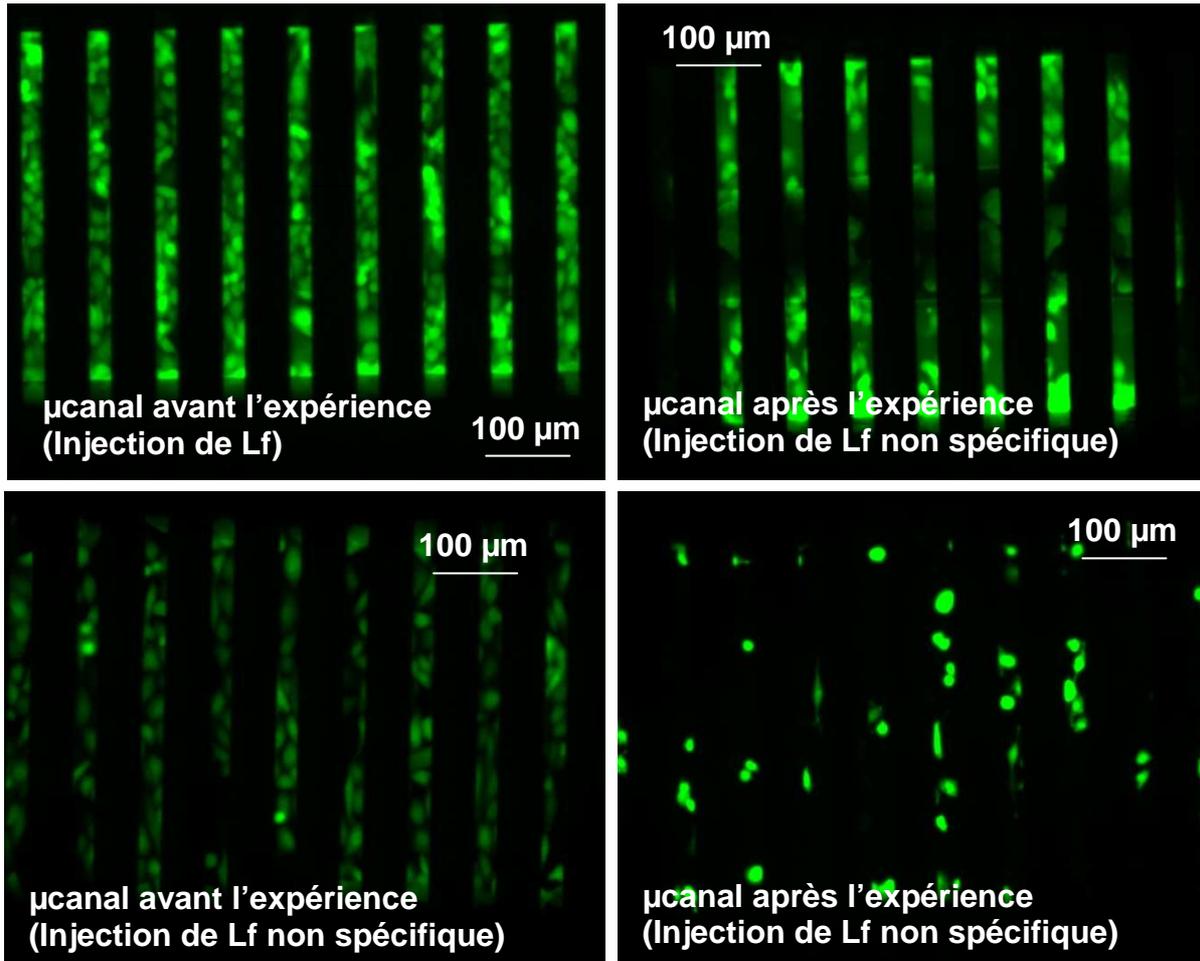


Figure 5- 36 : Comparaison des cultures cellulaires avant et après l'injection des protéines avec le nouveau protocole. Photos prises au microscope à fluorescence.

Les mesures électriques enregistrées pendant les manipulations ne donnent pas des résultats cohérents avec les manipulations sur les puits comme on peut le voir sur la Figure 5- 37.

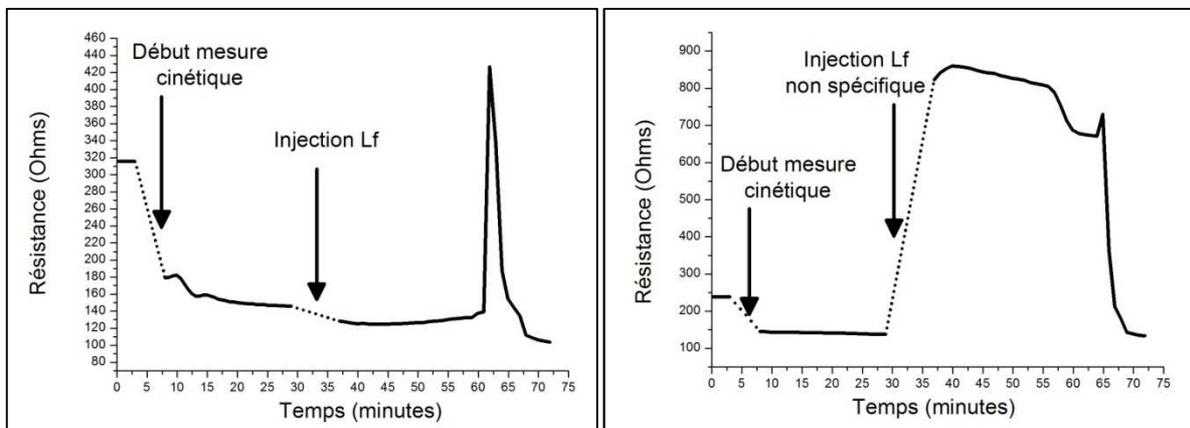


Figure 5- 37 : Evolutions temporelles des résistances électriques des microcanaux pendant l'injection de protéine avec le nouveau protocole (ici à 50KHz).

Encore une fois nous voyons que la résistance a tendance à diminuer, ce qui est dû au détachement des cellules. Les augmentations brusques de résistance peuvent encore une fois s'expliquer par la présence de bulles d'air dans les microcanaux (cf Figure 5- 34 et Figure 5- 35).

Nous avons ensuite décidé d'effectuer un test d'injection d'un nouveau milieu en ne modifiant aucun paramètre d'injection par rapport à ceux utilisés lors de la culture cellulaire.

III.3.5. Injection d'un nouveau milieu

Pour ces expériences, le débit a été conservé identique à celui utilisé lors de la culture cellulaire.

Le protocole d'injection utilisé est le suivant :

- Etude des spectres de croissance (début, milieu, fin) pour choisir une fréquence fixe d'étude.
- Vérification de la stabilité de la croissance par les mesures d'impédances et leur analyse cinétique pendant 10 minutes sous un flux constant de 167 nl/min (idem croissance). Balayage fréquentielle réduit à 2 fréquences.
- Mesures en parallèle sur deux canaux avec injection de milieu frais (nouvel seringue).
- Mesures pendant 15 minutes sur chaque canal avec injection des milieux à un débit de 167 nl/min. Début de l'interaction environ 18 minutes 50s après l'injection donc lancement des mesures d'impédance 15 minutes après.
- Observation des cellules après l'injection du milieu frais.

La Figure 5- 38 présente les observations des tapis cellulaires avant et après l'expérience. On remarque que malgré les débits similaires à ceux utilisés lors de la culture cellulaire, les cellules sont encore une fois endommagées.

Les seuls paramètres ayant changé entre les deux phases de l'expérience sont la résolution temporelle des mesures et leur plage fréquentielle d'étude.

Cette expérience montre donc que les mesures électriques peuvent endommager les cellules.

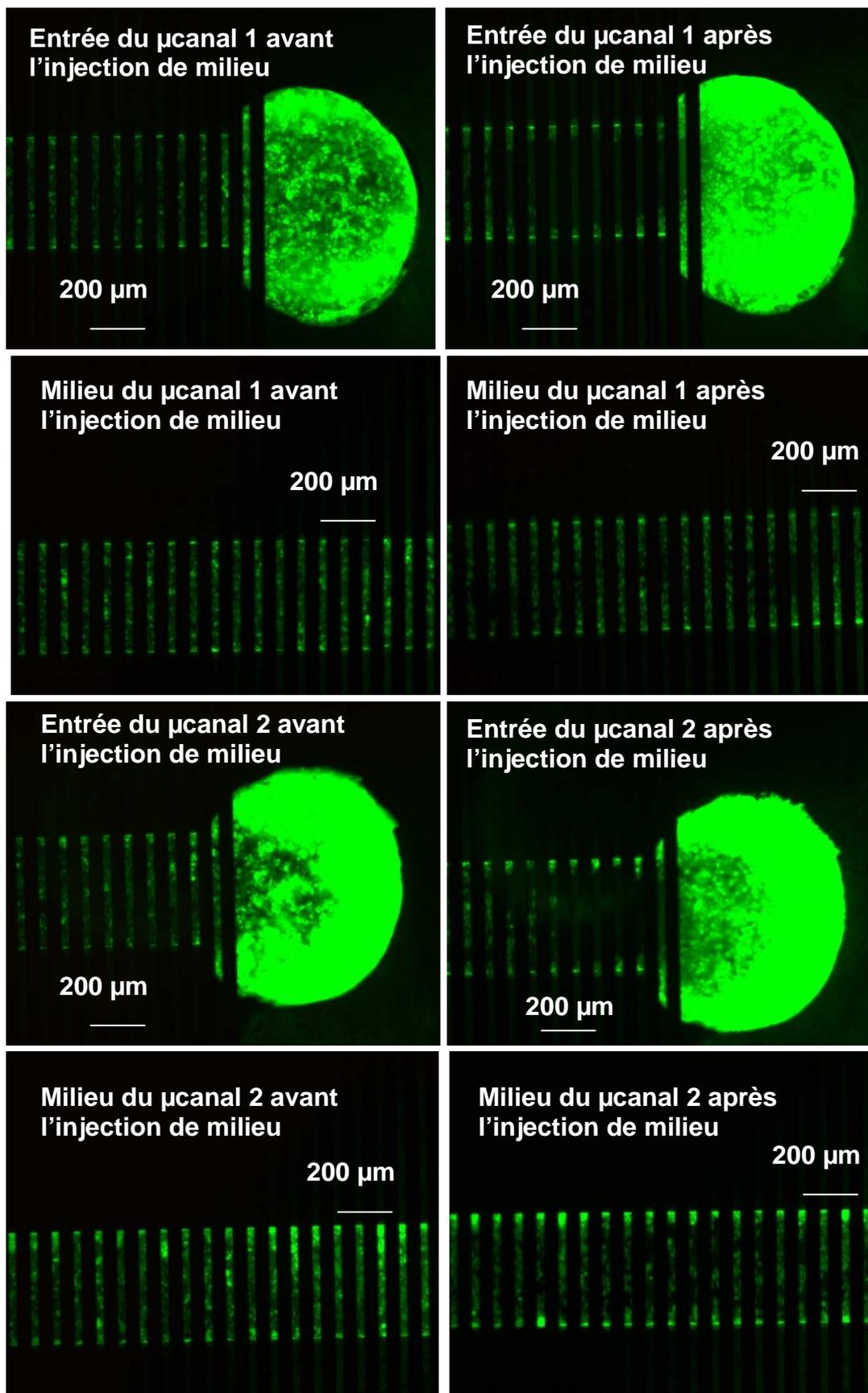


Figure 5- 38 : Comparaison des cultures cellulaires avant et après l'injection d'un nouveau milieu. Photos prises au microscope à fluorescence.

Les figures suivantes présentent les évolutions temporelles des résistances des deux microcanaux.

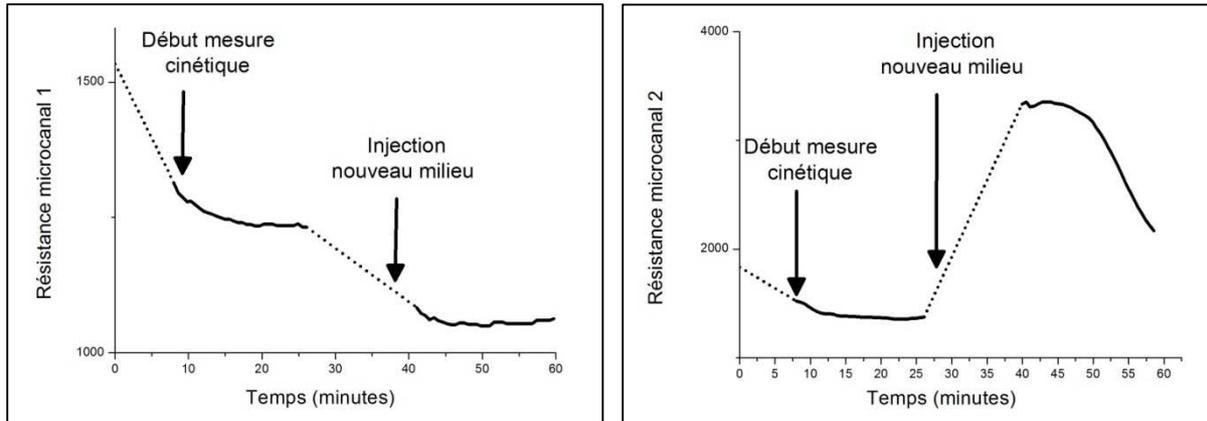


Figure 5- 39 : Evolutions temporelles des résistances électriques des canaux pendant l'injection d'un nouveau milieu (ici à 1KHz)

Les mesures électriques montrent, comme précédemment, que la résistance diminue au cours du temps pour les deux canaux. Une augmentation de résistance est encore une fois observée pour le microcanal 2 après l'injection de nouveau milieu, cette augmentation doit être due au passage d'une bulle d'air présente dans la nouvelle seringue.

L'équation (76) utilisée à la fin du 4^{ème} chapitre permet de déterminer le potentiel transmembranaire d'une cellule en fonction du champ électrique.

D'après cette équation, pour nos géométries d'électrodes, avec une tension de 10 mV et un angle θ de 0° , la tension transmembranaire maximale subie par les CHO est de 4,5 mV.

Cette tension est bien inférieure à la tension transmembranaire minimale de 200mV provoquant une électroporation de la cellule (cf chapitre 4, paragraphe V.3.3).

Cette expérience a été renouvelée deux fois et à chaque fois les cellules ont été abimées. En prolongeant la durée de l'expérience et des mesures électriques, le tapis cellulaire peut être complètement détruit.

Ces expériences montrent donc que si les mesures électriques sont effectuées avec une trop grande résolution temporelle, elles peuvent abimer les cellules et être invasives.

Une autre géométrie d'électrodes ou une tension encore plus faible pourraient éviter ce problème mais nous n'avons pas eu le temps d'effectuer des tests supplémentaires.

Conclusion du chapitre 5

Dans ce chapitre, nous avons d'abord présenté les outils actuellement utilisés dans les laboratoires pour détecter les interactions protéines-cellules qui n'ont pas de conséquences physiologiques évidentes mais qui peuvent avoir des rôles cruciaux dans la signalétique intracellulaire. Ces méthodes utilisent des marqueurs ou nécessitent la mise en suspension de cellules cultivées *in-vitro*. Nous avons également décrit les techniques d'impédancemétrie intégrée appliquées à l'étude de culture cellulaire *in-vitro*. Nous avons vu que la grande majorité des expériences étudie la cytotoxicité de drogues ou analyse des facteurs de croissance. Il est donc important de chercher à détecter et à quantifier par des méthodes non-invasives et miniaturisées les interactions protéines-cellules ténues.

Nous avons choisi d'étudier la protéine Lactoferrine car c'est une protéine essentielle pour le système immunitaire. Il a été démontré que la Lf possède de nombreuses propriétés anti-inflammatoires, cette protéine pourrait même éventuellement être utilisée comme un agent inhibiteur du VIH. Son action précise sur la cellule n'est cependant pas encore tout à fait connue. Pour étudier cette protéine, nous avons choisi les cellules d'ovaires d'hamster chinois car c'est une lignée cellulaire couramment utilisée pour la culture cellulaire *in-vitro*. L'interaction des récepteurs membranaires des CHO avec la Lf a déjà été étudiée et décrite. Les CHO présentent également différentes lignées mutantes qui pourraient se révéler intéressantes pour des caractérisations futures.

Nous avons présenté les expériences réalisées avec les dispositifs à puits. Nous avons d'abord vu que les conditions spécifiques de la culture cellulaire *in-vitro* dans des bioMEMS (substrat et incubateur de culture différents, mesures électriques) n'influent pas sur la croissance des CHO. Nous avons décrit un protocole de culture précis avec plusieurs centrifugations des cellules qui permet de mesurer des impédances conformes aux résultats de l'état de l'art de l'impédancemétrie intégrée. Les différentes géométries d'électrodes ont été comparées en mesurant la croissance des CHO. Les électrodes sub-millimétriques se sont révélées les plus sensibles. Les interfaces de mesures permettant de suivre électriquement en parallèle et en continue la croissance de plusieurs tapis cellulaires ont été décrites : un circuit relais et un paramétrage spécifique du logiciel de contrôle Labview.

L'effet du changement de milieu sur la résistance des cultures cellulaires a été analysé. L'injection d'un nouveau milieu effectuée manuellement avec une micropipette provoque un

choc thermique et une instabilité électrochimique du tapis cellulaire. Ce phénomène provoque une augmentation parasite de la résistance suivie d'une diminution rapide. Quand la température du système se stabilise, la résistance devient constante. L'effet de la densité cellulaire a également été étudié.

Un circuit électrique équivalent a été utilisé pour modéliser les spectres d'impédance des cultures de CHO.

L'interaction de la Lf avec les CHO a été analysée. L'injection de Lf sur un tapis de CHO à confluence provoque une légère augmentation de la résistance au contraire du changement de milieu. L'étude est ensuite effectuée sur des tapis non confluent. L'augmentation de résistance provoquée par l'interaction avec la Lf est alors plus importante. L'injection de Lf est comparée avec celle d'une protéine non spécifique qui peut se fixer à seulement 20% des récepteurs membranaires des CHO et qui ne peut se faire endocyter. Comparativement, cette protéine ne provoque pas d'augmentation de la résistance. Cette augmentation de la résistance du système est donc spécifique de l'interaction avec la Lf. L'endocytose de la Lf par les CHO est supposée être la cause de cette diminution de la conductivité. Le changement de milieu complique la reproductibilité des mesures quantitatives de l'interaction Lf-CHO et de l'endocytose de la protéine. Nous avons donc décidé d'utiliser un dispositif microfluidique permettant d'automatiser l'injection des réactifs.

Le matériel de mesure du bioMEMS microfluidique est présenté. Les différents protocoles de stérilisation, d'injection de cellules et de cultures sont détaillés. Les problèmes liés à la pression élevée dans les microcanaux ont été discutés. Ces problèmes correspondent à la création de fuite dans le dispositif ou la dégradation possible des cellules. La croissance cellulaire a été quantifiée par impédancemétrie en continu et en parallèle sur plusieurs canaux. A notre connaissance, c'est la première fois que la culture cellulaire dans des canaux microfluidiques est mesurée par impédancemétrie. La modélisation des spectres d'impédance des cultures a été effectuée avec les mêmes circuits équivalents que ceux utilisés pour les dispositifs à puits. L'interaction de la Lf et de la Lf non spécifique avec les CHO a été étudiée dans les microcanaux à fréquence constante, de façon cinétique. Les mesures se sont révélées être destructrices pour les cellules, peu importe le débit des réactifs utilisés. Cette dégradation semble donc être due aux mesures électriques effectuées avec une résolution beaucoup plus élevée que lors de la croissance cellulaire.

Références du chapitre 5

- 5-1. Uttamapinant C, White KA, Baruah H, Thompson S, Fernández-Suárez M, Puthenveetil S, et al. A fluorophore ligase for site-specific protein labeling inside living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2010 Juin 15;107(24):10914-10919.
- 5-2. Weingart CL, Broitman-Maduro G, Dean G, Newman S, Pepler M, Weiss AA. Fluorescent Labels Influence Phagocytosis of *Bordetella pertussis* by Human Neutrophils. *Infect Immun*. 1999 Aoû;67(8):4264-4267.
- 5-3. Rapposch S, Zangerl P, Ginzinger W. Influence of fluorescence of bacteria stained with acridine orange on the enumeration of microorganisms in raw milk. *J. Dairy Sci*. 2000 Déc;83(12):2753-2758.
- 5-4. Yu H, Mu Y, Nordenskiöld L, Stock G. Influence of Nitroxide Spin Labels on RNA Structure: A Molecular Dynamics Simulation Study. *Journal of Chemical Theory and Computation*. 2008 Oct 14;4(10):1781-1787.
- 5-5. MacCuspie RI, Nuraje N, Lee S, Runge A, Matsui H. Comparison of Electrical Properties of Viruses Studied by AC Capacitance Scanning Probe Microscopy. *Journal of the American Chemical Society*. 2008 Jan 1;130(3):887-891.
- 5-6. Allison D, Sattenstall M. The influence of green fluorescent protein incorporation on bacterial physiology: a note of caution. *Journal of Applied Microbiology*. 2007;103(2):318-324.
- 5-7. Feng Z, Ning Chen W, Vee Sin Lee P, Liao K, Chan V. The influence of GFP-actin expression on the adhesion dynamics of HepG2 cells on a model extracellular matrix. *Biomaterials*. 2005 Sep;26(26):5348-5358.
- 5-8. Yanase Y, Suzuki H, Tsutsui T, Uechi I, Hiragun T, Mihara S, et al. Living cell positioning on the surface of gold film for SPR analysis. *Biosens Bioelectron*. 2007 Nov 30;23(4):562-567.
- 5-9. ACEA Biosciences. Available from: <http://www.aceabio.com/index.htm>
- 5-10. Glamann J, Hansen AJ. Dynamic detection of natural killer cell-mediated cytotoxicity and cell adhesion by electrical impedance measurements. *Assay Drug Dev Technol*. 2006 Oct;4(5):555-563.
- 5-11. Applied Biophysics. Available from: <http://www.biophysics.com/>
- 5-12. McCoy MH, Wang E. Use of electric cell-substrate impedance sensing as a tool for quantifying cytopathic effect in influenza A virus infected MDCK cells in real-time. *J. Virol. Methods*. 2005 Déc;130(1-2):157-161.
- 5-13. CellKey. Available from: <http://www.cellkey.com/>

- 5-14. McGuinness RP, Proctor JM, Gallant DL, van Staden CJ, Ly JT, Tang FL, et al. Enhanced selectivity screening of GPCR ligands using a label-free cell based assay technology. *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 2009 Sep;12(8):812-823.
- 5-15. Inphaze. Available from: <http://www.inphaze.com.au/>
- 5-16. Kavanagh J, Hussain S, Chilcott T, Coster H. Fouling of reverse osmosis membranes using electrical impedance spectroscopy: Measurements and simulations. *Desalination.* 2009 Jan 31;236(1-3):187-193.
- 5-17. Bionas. Available from: <http://www.bionas.de/en/home.html>
- 5-18. Thedinga E, Kob A, Holst H, Keuer A, Drechsler S, Niendorf R, et al. Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2007 Avr 1;220(1):33-44.
- 5-19. Curtis TM, Widder MW, Brennan LM, Schwager SJ, Schalie WHVD, Fey J, et al. A portable cell-based impedance sensor for toxicity testing of drinking water. *Lab Chip.* 2009;9(15):2176-2183.
- 5-20. Atienza JM, Yu N, Wang X, Xu X, Abassi Y. Label-free and real-time cell-based kinase assay for screening selective and potent receptor tyrosine kinase inhibitors using microelectronic sensor array. *J Biomol Screen.* 2006 Sep;11(6):634-643.
- 5-21. Wegener J, Zink S, Rosen P, Galla H. Use of electrochemical impedance measurements to monitor beta-adrenergic stimulation of bovine aortic endothelial cells. *Pflugers Archiv-European Journal of Physiology.* 1999 Mai;437(6):925-934.
- 5-22. Yu N, Atienza JM, Bernard J, Blanc S, Zhu J, Wang X, et al. Real-time monitoring of morphological changes in living cells by electronic cell sensor arrays: an approach to study G protein-coupled receptors. *Anal. Chem.* 2006 Jan 1;78(1):35-43.
- 5-23. Ashida K, Sasaki H, Suzuki YA, Lönnerdal B. Cellular internalization of lactoferrin in intestinal epithelial cells. *Biometals.* 2004 Jun;17(3):311-315.
- 5-24. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Lactoferrin: a modulator of immune and inflammatory responses. *Cell. Mol. Life Sci.* 2005 Nov;62(22):2549-2559.
- 5-25. Legrand D, Ellass E, Carpentier M, Mazurier J. Interactions of lactoferrin with cells involved in immune function. *Biochem. Cell Biol.* 2006 Jun;84(3):282-290.
- 5-26. Legrand D, Vigie K, Said EA, Ellass E, Masson M, Slomianny M, et al. Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells. *European Journal of Biochemistry.* 2004;271(2):303-317.
- 5-27. Nisole S, Said EA, Mische C, Prevost M, Krust B, Bouvet P, et al. The anti-HIV pentameric pseudopeptide HB-19 binds the C-terminal end of nucleolin and prevents anchorage of virus particles in the plasma membrane of target cells. *J. Biol. Chem.* 2002 Jun 7;277(23):20877-20886.

- 5-28. Harmsen MC, Swart PJ, de Béthune MP, Pauwels R, De Clercq E, The TH, et al. Antiviral effects of plasma and milk proteins: lactoferrin shows potent activity against both human immunodeficiency virus and human cytomegalovirus replication in vitro. *J. Infect. Dis.* 1995 Aoû;172(2):380-388.
- 5-29. Berkhout B, van Wamel JLB, Beljaars L, Meijer DKF, Visser S, Floris R. Characterization of the anti-HIV effects of native lactoferrin and other milk proteins and protein-derived peptides. *Antiviral Res.* 2002 Aoû;55(2):341-355.
- 5-30. Giaever I, Keese CR. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 Sep 1;88(17):7896-7900.
- 5-31. Yeon JH, Park J. Cytotoxicity test based on electrochemical impedance measurement of HepG2 cultured in microfabricated cell chip. *Anal. Biochem.* 2005 Jun 15;341(2):308-315.
- 5-32. Liu Q, Yu J, Xiao L, Tang JCO, Zhang Y, Wang P, et al. Impedance studies of bio-behavior and chemosensitivity of cancer cells by micro-electrode arrays. *Biosens Bioelectron.* 2009 Jan 1;24(5):1305-1310.
- 5-33. Wang L, Wang L, Yin H, Xing W, Yu Z, Guo M, et al. Real-time, label-free monitoring of the cell cycle with a cellular impedance sensing chip. *Biosensors and Bioelectronics.* 2010 Jan 15;25(5):990-995.
- 5-34. Li J, Sun X, Zhang Y. Improvement of hepatitis B surface antigen expression by dimethyl sulfoxide in the culture of recombinant Chinese hamster ovary cells. *Process Biochemistry.* 2006 Fév;41(2):317-322.
- 5-35. Han Y, Liu X, Liu H, Li S, Wu B, Ye L, et al. Cultivation of recombinant Chinese hamster ovary cells grown as suspended aggregates in stirred vessels. *J. Biosci. Bioeng.* 2006 Nov;102(5):430-435.
- 5-36. Gregg JL, McGuire KM, Focht DC, Model MA. Measurement of the thickness and volume of adherent cells using transmission-through-dye microscopy. *Pflugers Arch.* 2010 Nov;460(6):1097-1104.
- 5-37. Huang X, Nguyen D, Greve D, Domach M. Simulation of microelectrode impedance changes due to cell growth. *Sensors Journal, IEEE.* 2004;4(5):576-583.
- 5-38. Wegener J, Keese CR, Giaever I. Electric Cell-Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces. *Experimental Cell Research.* 2000 Aoû 25;259(1):158-166.
- 5-39. Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A, Stegbauer K, Wolf B. Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosensors & Bioelectronics.* 1997;12(1):29-41.
- 5-40. Leelavatcharamas V, Emery AN, Al-Rubeai M. Growth and interferon- γ production in batch culture of CHO cells. *Cytotechnology.* 1994;15(1-3):65-71.

- 5-41. Arias L, Perry C, Yang L. Real-time electrical impedance detection of cellular activities of oral cancer cells. *Biosensors & Bioelectronics*. 2010 Jun 15;25(10):2225-2231.
- 5-42. Armitage WJ, Juss BK, Easty DL. Response of epithelial (MDCK) cell junctions to calcium removal and osmotic stress is influenced by temperature. *Cryobiology*. 1994 Oct;31(5):453-460.
- 5-43. Moseley P, Gapen C, Wallen E, Walter M, Peterson M. Thermal-Stress Induces Epithelial Permeability. *American Journal of Physiology*. 1994 Aoû;267(2):C425-C434.
- 5-44. Ehret R, Baumann W, Brischwein M, Schwinde A, Wolf B. On-line control of cellular adhesion with impedance measurements using interdigitated electrode structures. *Med. Biol. Eng. Comput.* 1998 5;36(3):365-370.
- 5-45. Wang L, Wang L, Yin H, Xing W, Yu Z, Guo M, et al. Real-time, label-free monitoring of the cell cycle with a cellular impedance sensing chip (supplemental material). *Biosens Bioelectron*. 2010 Jan 15;25(5):990-995.
- 5-46. Cho S, Thielecke H. Electrical characterization of human mesenchymal stem cell growth on microelectrode. *Microelectronic Engineering*. Mai;85(5-6):1272-1274.
- 5-47. Rahman ARA, Price D, Bhansali S. Effect of electrode geometry on the impedance evaluation of tissue and cell culture. *Sensors and Actuators B: Chemical*. 2007 Oct 20;127(1):89-96.
- 5-48. Rahman A, Lo C, Bhansali S. A Detailed Model for High-Frequency Impedance Characterization of Ovarian Cancer Epithelial Cell Layer Using ECIS Electrodes. *IEEE Transactions on Biomedical Engineering*. 2009 Fév;56(2):485-492.
- 5-49. Qiu Y, Liao R, Zhang X. Real-time monitoring primary cardiomyocyte adhesion based on electrochemical impedance spectroscopy and electrical cell-substrate impedance sensing. *Anal. Chem*. 2008 Fév 15;80(4):990-996.
- 5-50. Wegener J, Zink S, Rösen P, Galla H. Use of electrochemical impedance measurements to monitor β -adrenergic stimulation of bovine aortic endothelial cells. *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*. 1999 Avr 7;437(6):925-934.
- 5-51. Wegener J, Abrams D, Willenbrink W, Galla H, Janshoff A. Automated multi-well device to measure transepithelial electrical resistances under physiological conditions. *BioTechniques*. 2004 Oct;37(4):590, 592-594, 596-597.
- 5-52. Grimnes S, Martinsen OG. *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*. 1er éd. Academic Press; 2000.
- 5-53. Legrand D, Mazurier J, Aubert JP, Loucheux-Lefebvre MH, Montreuil J, Spik G. Evidence for interactions between the 30 kDa N- and 50 kDa C-terminal tryptic fragments of human lactotransferrin. *Biochem J*. 1986 Jun 15;236(3):839-844.

- 5-54. Legrand D, van Berkel PH, Salmon V, van Veen HA, Slomianny MC, Nuijens JH, et al. The N-terminal Arg2, Arg3 and Arg4 of human lactoferrin interact with sulphated molecules but not with the receptor present on Jurkat human lymphoblastic T-cells. *Biochem. J.* 1997 Nov 1;327 (Pt 3):841-846.
- 5-55. Ruaan RC, Tsai GJ, Tsao GT. Monitoring and modeling density-dependent growth of anchorage-dependent cells. *Biotechnol. Bioeng.* 1993 Fév 5;41(3):380-389.
- 5-56. Nevill JT, Cooper R, Dueck M, Breslauer DN, Lee LP. Integrated microfluidic cell culture and lysis on a chip. *Lab Chip.* 2007;7(12):1689.
- 5-57. Cooper R, Lee L. Preventing suspension settling during injection. *Chips & Tips, Lb on a Chip* [Internet]. 2007 Aout 21; Available from: http://www.rsc.org/Publishing/Journals/lc/Chips_and_Tips/suspension_injection.asp. This
- 5-58. Korin N, Bransky A, Dinnar U, Levenberg S. A parametric study of human fibroblasts culture in a microchannel bioreactor. *Lab Chip.* 2007;7(5):611.
- 5-59. Morel M, Bartolo D, Galas J, Dahan M, Studer V. Microfluidic stickers for cell- and tissue-based assays in microchannels. *Lab Chip.* 2009;9(7):1011-1013.
- 5-60. Cesaro-Tadic S, Dernick G, Juncker D, Buurman G, Kropshofer H, Michel B, et al. High-sensitivity miniaturized immunoassays for tumor necrosis factor alpha using microfluidic systems. *Lab Chip.* 2004 Déc;4(6):563-569.
- 5-61. Walker G, Ozers M, Beebe D. Insect Cell Culture in Microfluidic Channels. *Biomedical Microdevices.* 2002 Juillet 1;4(3):161-166.
- 5-62. Morel M, Bartolo D, Galas J, Dahan M, Studer V. Microfluidic stickers for cell- and tissue-based assays in microchannels. *Lab Chip.* 2009 Avr 7;9(7):1011-1013.
- 5-63. Treizebre A. BioMEMS Terahertz pour l'étude du trafic informationnel de cellules biologiques. 2007 Déc 6; Thèse soutenue à l'Université de Lille 1.
- 5-64. Skelley A, Voldman J. An active bubble trap and debubbler for microfluidic systems. *Lab on a Chip.* 2008 Oct;8(10):1733-1737.
- 5-65. Cheng D, Jiang H. A debubbler for microfluidics utilizing air-liquid interfaces. *Appl. Phys. Lett.* 2009 Nov 25;95(21):214103-214103-3.

Conclusion générale :
applications et perspectives

Dans le premier chapitre de cette thèse, l'état de l'art de l'impédancemétrie a été présenté. Différents avantages de l'application de ces techniques au domaine des bioMEMS ont été énumérés et différentes pistes d'amélioration ont été suggérées.

Nous avons ensuite exposé les critères qui ont guidé la conception des dispositifs. Leurs protocoles de fabrication ont été détaillés. Les méthodes et infrastructures de mesures ont été décrites. Différentes notions théoriques liées à l'impédancemétrie et à la microfluidique ont été présentées. Le calcul des constantes de cellules de réseaux circulaires d'électrodes interdigitées a été expliqué.

Dans le troisième chapitre, les caractérisations des microdispositifs ont été rapportées. Des modélisations effectuées avec des circuits équivalents électriques nous ont permis de comprendre les phénomènes électrochimiques mis en jeu. Les spectres de relaxation diélectrique de l'eau ont été déterminés et analysés.

Dans le cadre de la désinfection de l'eau, l'application de ces microdispositifs à l'analyse du parasite *C. parvum* a été ensuite présentée. Le protocole de préparation des suspensions de parasite permettant des analyses reproductibles a été détaillé. Une méthode permettant de déterminer la concentration en parasite d'échantillon purifiée a été expliquée à partir de leur mesure d'impédance. Le potentiel de l'impédancemétrie pour discriminer des parasites selon leur viabilité a été également démontré.

Nous avons enfin présenté l'application des bioMEMS impédimétriques à l'analyse des interactions cellule-protéine avec comme modèle d'étude les cellules CHO et la protéine Lactoferrine. La faisabilité de la culture cellulaire dans des bioMEMS a été démontrée. La caractérisation électrique de la densité cellulaire a été effectuée. Un circuit électrique équivalent dédié aux mesures d'impédance des cultures cellulaire a été exposé. Une méthode pour détecter électriquement de l'interaction spécifique de la Lf avec les CHO a été développée. L'utilisation de microdispositifs microfluidiques et impédimétriques pour la mesure quantitative de la culture cellulaire a été exposée. Le caractère invasif des mesures d'impédance sur cellule effectuées avec une résolution temporelle élevée dans des microcanaux a été démontré.

Les applications et les perspectives des résultats ici présentés sont nombreuses.

Concernant les résultats du troisième chapitre :

- La technique utilisée pour déterminer la conductivité et la permittivité diélectrique de suspensions de parasite peut être appliquée à d'autres types de suspensions biologiques (levures, bactéries par exemple).
- La méthode de calcul de la constante de cellule pour des réseaux circulaires d'électrodes interdigitées peut être exploitée pour d'autres applications biologiques. Ce format est en effet couramment exploité en biologie et est déjà utilisé pour des analyses multiplexée d'agents toxiques par impédancemétrie.
- L'effet de double couche (cf lexique) perturbant les mesures de relaxation diélectrique en basse fréquence pourrait être annulé en appliquant la méthode développée par Prodan et al. (6-1) (même surface mais constante de cellule différente) à des électrodes micrométriques.

A propos des résultats du quatrième chapitre :

- L'étude cinétique de l'augmentation de la conductivité provoquée par les suspensions de parasites pourrait être effectuée pour optimiser la méthode de détection et de comptage électrique des parasites
- L'application de tensions plus élevées pourrait être utilisé pour discriminer des gammes de viabilité
- Le développement d'un bioMEMS intégrant des étapes préalables de purification et de concentration des échantillons associées à un détecteur impédimétrique pourrait permettre d'effectuer des analyses parasitologiques de la potabilité de l'eau sur site.
- La technique d'impédancemétrie peut être appliqué à la quantification automatique de la concentration en parasite d'eau naturelle purifiée au préalable (comme c'est le cas dans le protocole actuellement utilisé.

Relativement au cinquième chapitre :

- L'interaction de la Lf avec les CHO pourrait être étudiée avec des lignées cellulaires de CHO présentant des proportions de récepteurs membranaires différentes (lignée CHO 677 et CHO 618, cf Chapitre 5, paragraphe I.2.2.).
- L'endocytose de la Lf ne pouvant se faire à 20°C, il serait intéressant d'étudier la mesure électrique de cette interaction à cette température tout en s'assurant qualitativement de l'état du tapis cellulaire (par une observation microscopique simultanée par exemple).
- Il serait intéressant d'étudier et de mesurer par impédancemétrie la culture de différentes lignées cellulaires dans des canaux microfluidiques.
- Le caractère invasif des mesures électrique lié à leur résolution temporelle devrait être étudié et analysé avec des simulations numériques.
- Les mesures de l'interaction Lf-CHO dans les microcanaux pourrait être étudiées avec des résolutions temporelles plus faibles pour limiter la dégradation des cellules.

Au cours de cette thèse, nous avons également étudié en parallèle la mesure des effets électrochimiques non-linéaires, i.e. les courants harmoniques. Des précédents travaux ont effet montré l'intérêt de ce type de mesure pour des applications biologiques (6-2,6-3,6-4). Ces mesures ont été réalisées avec les dispositifs à puits connectés à un détecteur synchrone à verrouillage de phase (Signal Recovey 7280).

Les caractérisations de ces dispositifs effectuées avec de l'eau déionisée et du milieu cellulaire ont montré que des tensions élevées permettent d'améliorer la reproductivité des mesures. Des analyses non-linéaires ont été effectuées sur des suspensions de parasites *C. parvum* pour mesurer leur concentration et distinguer leur viabilité. Ces mesures n'ont pas permis d'obtenir une meilleure sensibilité que les mesures linéaires. Dans un souci de synthèse, les résultats n'ont donc pas été présentés dans ce manuscrit.

Les travaux sur les mesures électrochimiques non-linéaires précédemment cités ont montré que les distorsions harmoniques étaient issues du changement de configurations des protéines membranaires sous l'effet d'un champ électrique important. Les analyses non-linéaires des cellules biologiques adhérentes sont plus compliquées à mettre en œuvre mais comme ces

protéines membranaires sont également impliquées dans l'adhésion protéique, l'infrastructure de mesure réalisée pour ces analyses harmoniques pourrait être appliquée à l'étude de l'interaction CHO-Lf.

Des mesures de bruit électronique ont également été effectuées sur de l'eau déionisée et du milieu cellulaire. Les mesures de bruit du milieu cellulaire avec l'application de courant continu ne sont pas possibles car en basse fréquence, la capacité de double couche empêche d'effectuer ces mesures (impédance d'entrée de l'échantillon élevée devant l'impédance de l'amplificateur faible bruit). Les premières mesures de bruit électronique effectuées avec de l'eau déionisée ont présenté des caractéristiques en $1/f$ évoluant linéairement avec le carré du courant en suivant l'équation de Hooge (6-5). Ces résultats n'ont pas pu être confirmés avec d'autres mesures, ils n'ont donc pas été présentés dans ce manuscrit.

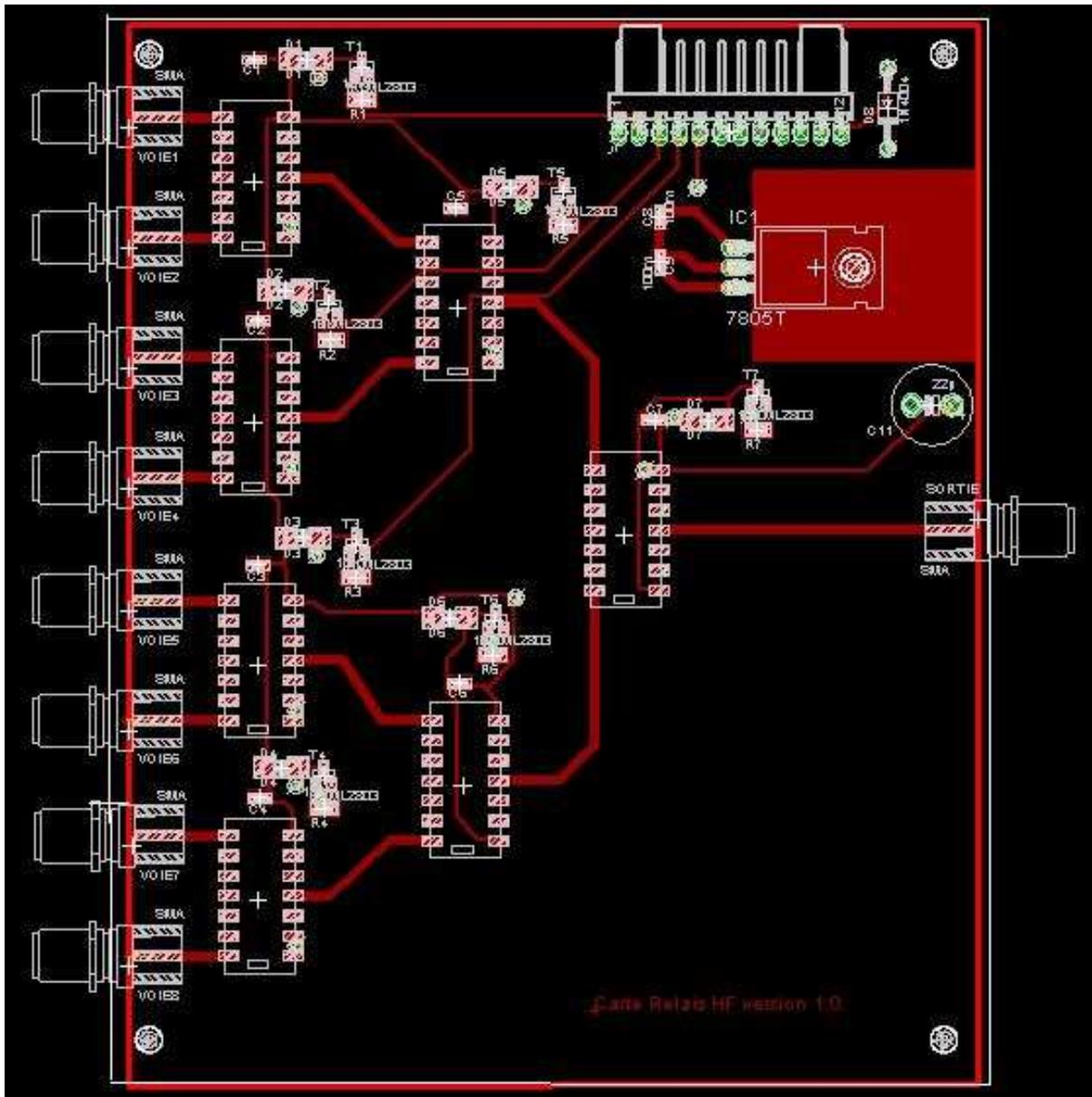
Références de la conclusion

- 6-1. Prodan C. Low-frequency, low-field dielectric spectroscopy of living cell suspensions. *J. Appl. Phys.* 2004;95(7):3754.
- 6-2. Kawanishi G, Fukuda N, Muraji M. Nonlinear dielectric properties of yeast cells cultured in different environment conditions. *Electron. Comm. Jpn.* 2009 9;92(9):17-23.
- 6-3. Woodward AM, Kell DB. On harmonic generation in nonlinear biological systems. *Biosens Bioelectron.* 1995;10(6-7):639-641.
- 6-4. Zhu JT, Tian WJ, Zheng S, Huang JP, Zhou LW. Nonlinear ac responses of erythrocyte suspensions: Experiment and theory. *Journal of Applied Physics.* 2007;
- 6-5. Kim Y, Yun S, Hyeong Park C, Min HS, June Park Y. Influence of magnetic field on 1/f noise and thermal noise in multi-terminal homogeneous semiconductor resistors and discrimination between the number fluctuation model and the mobility fluctuation model for 1/f noise in bulk semiconductors. *Solid-State Electronics.* 2004 Mai;48(5):641-654.

Annexes

Annexe 1

Typon du circuit relais



Annexe 2:

Tableau annexe : Comparaison des différents angles de contact (en degré) obtenus avec le PDMS oxydé ou non, par traitement ozone ou plasma O₂, avec du milieu de culture et de l'eau déionisée.

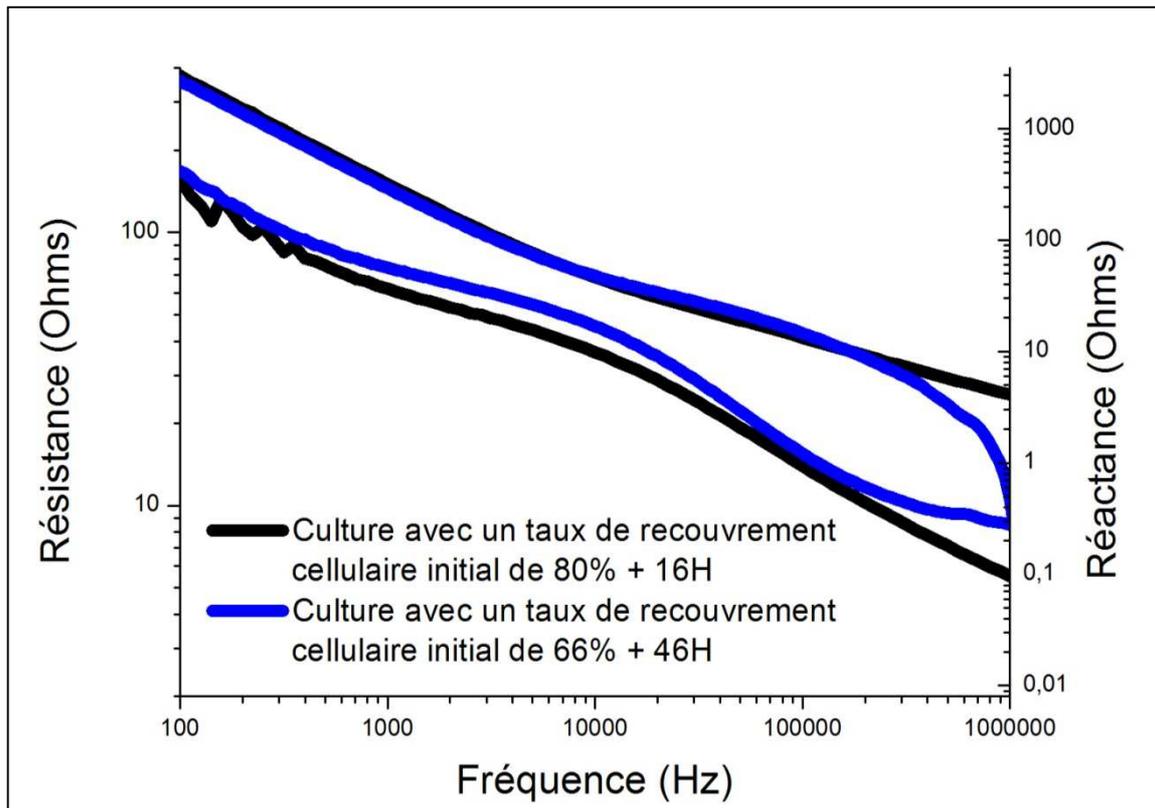
	H2O	Milieu de culture F12-K
PDMS	98,55625° ± 8,55507	73,9625° ± 4,85031
PDMS passé à l'ozone	86,18182° ± 5,88096	70° ± 6,63325
PDMS passé au plasma O ₂	37,25° ± 5,86899	7,3° ± 0,98995

Le PDMS étant hydrophile, la goutte de milieu se dépose de façon concave. Le volume de milieu est donc plus important aux bords des puits qu'au centre.

La concavité de la goutte réduit la profondeur de champ et limite les observations microscopiques d'une large surface de substrat.

Annexe 3:

Comparaison de l'impédance d'une culture cellulaire réalisée avec un taux de recouvrement cellulaire initial égal à 66% de la surface totale du fond des puits, 46H après l'injection des cellules et de l'impédance d'une culture cellulaire réalisée avec un taux de recouvrement cellulaire initial égal à 80% de la surface totale du fond des puits, 16H après l'injection des cellules.



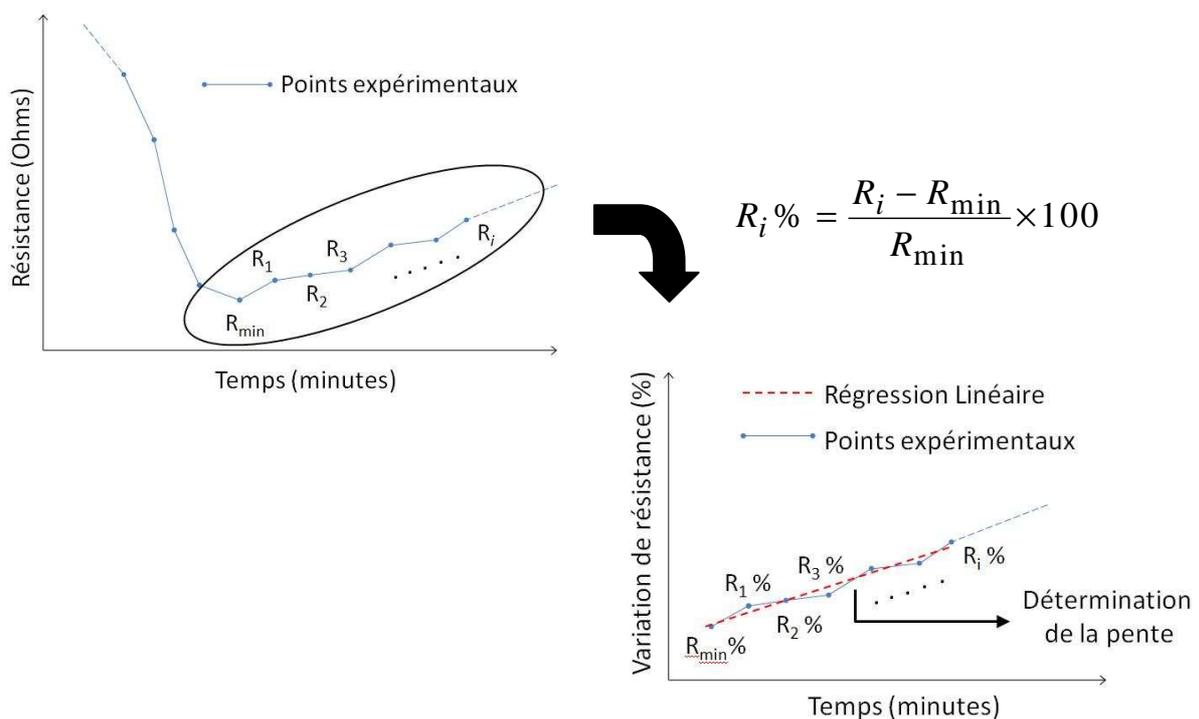
Nous constatons que les spectres d'impédance des deux cultures sont identiques. Les deux cultures cellulaires possèdent des propriétés électrochimiques identiques et sont donc comparables.

Annexe 4:**Méthode de calcul pour quantifier l'augmentation linéaire de la résistance causée par l'injection de Lf**

Pour quantifier l'augmentation linéaire de la résistance, nous avons calculé l'augmentation de la résistance en pourcentage par rapport à sa plus faible valeur, c'est-à-dire par rapport à sa valeur avant cette augmentation progressive et quasi-linéaire.

A partir des différentes valeurs $R_i\%$ correspondant à un pourcentage de variation, la régression linéaire de leur évolution par rapport au temps est déterminée. La pente de cette régression nous indique donc les variations de résistance en pourcentage par minutes.

Ce calcul est schématisé et formulé sur la figure suivante :



Nous avons préféré déterminer cette pente plutôt que le pourcentage de variation atteint au bout d'une certaine durée d'expérience car elle nous permet de comparer aisément des variations de résistance issues de différentes expériences sans que les différents phénomènes électrochimiques aient été mesurés sur une même durée.

Thèse de Timothée Houssin

BioMEMS pour l'analyse de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance

Résumé

Les travaux de thèse ici présentés portent sur l'analyse intégrée de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance en basse fréquence dans des systèmes microfluidiques. L'impédancemétrie représente une alternative intéressante aux marqueurs optiques car elle semble moins invasive. Le but de ces travaux est de développer des bioMEMS impédimétriques pour l'analyse du parasite aquatique *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) et la détection des interactions protéine-cellule. Pour cela, des réseaux de microélectrodes interdigitées ont été réalisés au sein de puits et de microcanaux. Différentes géométries d'électrodes sont caractérisées. Des circuits électrique de modélisation sont présentés. Les spectres de relaxation diélectrique de l'eau déionisée en basse fréquence (< 1 MHz) et les temps de relaxation mis en jeu ont été déterminés. Une méthode électrique permettant de quantifier automatiquement et sans marqueurs la concentration de parasites *C. parvum* suspendus dans de l'eau purifiée est présentée. La viabilité de ces parasites est discriminée par impédancemétrie. Pour étudier les interactions protéine-cellule, la lactoferrine (Lf) et des cellules d'ovaires d'hamster chinois (CHO) ont été choisies comme modèle d'étude. Différents paramètres biologiques de culture cellulaire sont analysés pour optimiser les mesures impédimétriques. L'interaction de la Lf avec les CHO est détectée spécifiquement. Afin d'injecter des réactifs aux cellules tout en minimisant les perturbations électrochimiques, l'analyse impédimétrique des interactions cellule-protéine est effectuée dans des canaux microfluidiques. Dans ces conditions, les mesures électriques ont des effets invasifs.

Mots clés : BioMEMS, Microélectrodes, Spectroscopie d'impédance, Microfluidique, Relaxation diélectrique, Purification de l'eau, *Cryptosporidium parvum*, Intéraction protéine-cellule, Lactoferrine,

Abstract

The thesis presented here deals with the integrated analysis of biological cells by low frequency impedance spectroscopy in microfluidic systems. Impedancemetry represents an interesting alternative to optical labels because they seem to be less invasive. The purpose of this work is to develop an impedimetric bioMEMS for the analysis of aquatic parasite *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) and the detection of cell-protein interactions. Arrays of interdigitated microelectrodes were realized in wells and microchannels. Different geometries of electrodes were characterized. Electrical circuit models are presented. Dielectric relaxation spectrums of deionized water in low frequencies (<1 MHz) and relaxation times were established. An electrical label free method to quantify automatically the concentration of *C. parvum* parasites suspended in purified water is presented. The viability of these parasites was discriminated by impedancemetry. To study protein-cell interactions, lactoferrin (Lf) and cells of chinese hamster ovary (CHO) were chosen as study model. Different biological parameters are analyzed to optimize impedimetric measurements. Lf-CHO interaction is detected specifically. To inject reagents to cells while minimizing electrochemical perturbations, impedimetric analysis of CHO-Lf interaction was also performed within microfluidic channels. In these conditions, electrical currents can have invasive effects.

Key words: BioMEMS, Microelectrodes, Impedance spectroscopy, Microfluidic, Dielectric relaxation, Water purification, *Cryptosporidium parvum*, Protein-cell interaction, Lactoferrin