

THESE DE DOCTORAT

INTITULEE

Elaboration d'un système *in vitro* de suivi en continu par spectroscopie d'impédance électrique de l'infection d'une lignée de cellules cancéreuses par un protozoaire parasite : *Cryptosporidium parvum*.

PRESENTEE ET SOUTENUE PUBLIQUEMENT LE

VENDREDI 16 JANVIER 2015 A

L'ECOLE DOCTORALE SCIENCES POUR L'INGENIEUR

SPECIALITE MICRO ET NANOTECHNOLOGIE, ACOUSTIQUE ET
TELECOMMUNICATION

PAR

Alfred DIBAO-DINA

DEVANT LE JURY D'EXAMEN :

Rapporteur :	Mme Karine Reybier	Maître de conférences, Université de Toulouse III
Rapporteur :	M. André Buret	Professeur, Université des Sciences de Calgary (Canada)
Président :	M. Philippe Pernod	Directeur de recherche CNRS, IEMN (Lille)
Membre :	M. Gilles Gargala	Maître de conférences, Université de Rouen
Membre invité :	M. Eric Viscogliosi	Directeur de recherche CNRS, Institut Pasteur de Lille
Co-encadrant :	M. Jérôme Follet	Enseignant-chercheur, ISA (Lille)
Directeur de thèse :	M. Vincent Senez	Directeur de recherche CNRS, IEMN (Lille)

Pour Mapuce, Papa, Maman et Clarisse

RESUME

Le *Cryptosporidium* est la principale cause d'épidémies d'origine hydrique provoquées par des protozoaires parasites dans le monde. Dans cette thèse, nous montrons qu'il est possible d'utiliser la spectroscopie d'impédance électrique pour obtenir *in vitro* des informations sur le cycle de vie du *Cryptosporidium* infectant des cultures cellulaires et pour quantifier l'infectivité d'un inoculum. Des cellules HCT-8 (issues d'un adénocarcinome iléocæcal humain) ont été cultivées dans des puits contenant un réseau d'électrodes interdigitées planaires jusqu'à confluence pendant 76 heures, puis infectées par le *Cryptosporidium parvum* pendant 60 heures. La réponse impédimétrique a été mesurée entre 100Hz et 1MHz avec une période d'échantillonnage de 7min. Au cours de l'infection, le signal d'impédance présente une série de pics distincts et reproductibles à 12, 23 et 31h post infection (PI) et de minima à 9, 19 et 28h PI. Une modélisation électrique par circuit équivalent révèle que ces variations peuvent être en partie expliquées par l'effet des interactions hôte-parasite sur les zones intercellulaires. En outre, nos données présentent pour la première fois un suivi en temps réel du développement précoce et homogène du parasite, où les phases de prédominance de formes invasives (i.e. zoïtes) et prolifératives (i.e. mérontes) s'alternent et sont respectivement observées aux pics et minima du signal impédimétrique. Finalement, en quantifiant l'amplitude de la réponse en impédance, nous montrons que ce dispositif peut également être utilisé comme un capteur d'infectivité, dont la réponse dès 12h PI s'avère au moins 4 fois plus rapide que d'autres techniques à l'état de l'art.

Mots-clefs : Impédance électrique ; électrodes interdigitées ; microélectronique ; culture cellulaire ; *Cryptosporidium* ; interaction hôte-parasite ; infectivité ; qualité de l'eau.

SUMMARY

Cryptosporidium is the main origin of worldwide waterborne epidemic outbreaks caused by protozoan parasites. In this thesis, we show that an *in vitro* electrical impedance-based device is able to get insights on *Cryptosporidium* life cycle on a cell culture and to quantify sample infectivity. HCT-8 cells (human adenocarcinoma) were grown to confluency on interdigitated microelectrode arrays during 76 hours and then infected by *Cryptosporidium parvum* during 60 hours. The impedimetric response was measured at frequencies ranging from 100Hz to 1MHz and a 7min sampling period. As the infection progresses, the impedance signal shows a reproducible distinct succession of peaks at 12, 23 and 31h post infection (PI), and minima at 9, 19 and 28h PI. An electrical equivalent circuit modeling-based approach indicates that these features can be partly explained by the effects of host-parasite interactions on intercellular areas. Furthermore, our data present for the first time a real-time monitoring of early homogeneous parasitic stage development with alternating invasive (i.e. zoites) and proliferative (i.e. meronts) form predominances, observed respectively at peaks and minima in the impedimetric signal. Finally, by quantifying the magnitude of the impedimetric response, we demonstrate this device can also be used as an infectivity sensor as early as 12h PI, thus being at least 4 times faster than other state of the art techniques.

REMERCIEMENTS

Ce travail de thèse a été rendu possible grâce à des financements provenant de la région Nord Pas de Calais, de la fondation Norbert Segard et de l'Institut Supérieur d'Electronique et du Numérique (ISEN).

J'ai depuis le début considéré cette thèse comme une formidable aventure humaine. La chance que j'ai eue de travailler sur un projet transdisciplinaire m'a permis de côtoyer plusieurs équipes de recherche, constituées de personnalités fortes et attachantes. J'espère que les quelques mots qui suivent parviendront à transmettre, du moins en partie, la reconnaissance que j'éprouve pour chacune d'elle.

En premier lieu, je tiens à adresser mon entière gratitude à mon directeur de thèse le Dr. Vincent Senez, qui m'a accordé sa confiance en me permettant d'effectuer une thèse au sein de son équipe. La rigueur scientifique dont il fait preuve a été pour moi une source d'enseignements, qui constitue à n'en pas douter la pierre angulaire de ma thèse. Il m'a permis de synthétiser tout ce que j'ai appris, révélé des compétences rédactionnelles que j'ignorais et j'ai pu ainsi gagner en confiance à son contact.

Je tiens également à remercier mon co-encadrant (co-directeur officieux) le Dr. Jérôme Follet. Sa disponibilité, sa pédagogie et son humour ont été essentiels, au sens propre du terme, pour moi au cours de cette thèse. Cela a nourri mon envie de continuer à apprendre, expérimenter, observer et rechercher. Je lui suis aussi profondément reconnaissant d'avoir toujours fait passer ma thèse en priorité. Je n'aurai pu espérer un meilleur encadrant pour me faire entrer dans le monde de la biologie, dans lequel je compte désormais rester.

Je tiens à remercier les membres de mon jury de thèse de l'intérêt qu'ils ont montré pour mon travail et du temps qu'ils ont passé à y apporter des corrections : le président Pr. Philippe Pernod, les rapporteurs Mc. Karine Reybier et Pr. André Buret ainsi que Dr. Eric Viscogliosi et Pr. Gilles Gargala (MCU-PH).

A présent, je souhaite adresser mes remerciements à l'ensemble du groupe BioMEMS de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN), en particulier le Dr. Alexis Vlandas, dont la vivacité intellectuelle a toujours été une source d'inspiration et qui est clairement une des raisons pour lesquelles j'ai voulu faire cette thèse. Je tiens également à remercier du fond du cœur Caroline D. et Catalin B., qui ont eu une immense influence sur moi, dont je ne prendrai certainement la pleine mesure que dans quelques années. J'ai également une pensée pour les membres actuels : Vincent T., Anthony T., Thomas D. Mouhamad I., Sébastien L., Florent F., Maud V. et anciens, pour leur aide et support précieux: Timothée H., Romuald L., Renaud D., Simon L. et Guillaume P.

Le deuxième groupe de recherche dont je faisais partie est le groupe BioGAP, de l'Institut Supérieur d'Agriculture (ISA). Je souhaite remercier l'ensemble de ce groupe, dirigé par le Dr. Patrice Halama, qui m'a accueilli, soutenu et encouragé tout au long de mon travail. J'ai une pensée particulière pour Jérôme M. et Caroline D., que je ne remercierai jamais assez pour leur gentillesse, leur honnêteté et leur bienveillance à mon égard. De même, je remercie Caroline C. et Ourida H., qui ont toujours été derrière moi pour me soutenir et m'aider sur mes manip. Je n'oublie pas Ali S., Bertrand V., Sitraka A. et l'ancienne-jeune Alice Y. que je remercie également pour leurs encouragements. Même s'ils ne font pas partie de l'ISA, j'intègre dans ces remerciements Fabrice C., Brigitte B. et Sophie C. de la Faculté Libre des Sciences et Technologie (FLST) pour leur accueil et leur gentillesse. J'intègre également les membres de l'Institut Pasteur de Lille, avec lesquelles le lien s'est fait grâce à l'ISA, et notamment Sadia B., Gabriela C. et Karine G. pour leur soutien sur notre étude de ce parasite complexe.

J'adresse aussi mes remerciements au troisième groupe dont je faisais partie, à savoir le groupe SAMBA de l'ISEN, dirigé par Dr. Anne-Christine Hladky. L'intérêt qu'ils me montraient, autant en rapport à mon

sujet qu'à ma personne, m'ont apporté un avis extérieur rafraîchissant qui a su nourrir ma confiance à des moments où j'en avais besoin.

Mais de cette thèse, je ne retiens pas que les groupes de travail. Je ne serai pas parvenu à un tel niveau, autant humain que scientifique, sans le support indispensable de nombreuses personnes travaillant dans les instituts dont font partie ces groupes. Je pense au personnel de la salle blanche de l'ITEMN, toujours prêt à rendre service : Alex, Malek, Pascal, Bertrand, André... Je pense au service informatique de l'ITEMN, qui a toujours été disponible pour m'aider et me fournir du matériel adéquat. Je pense au personnel administratif et de la D.A.O, toujours agréable, dont Farah, Sylvie, Alice, Hélène, Nathalie, Cécile (partie depuis)... Je pense à Olivier, Jean-François et Jean-Michel, souriants et avenants. Je pense à mes voisins du groupe OPTO, en particulier Matthieu, toujours désopilant. Je pense aux formidables personnes que j'ai eu la chance de rencontrer à l'ISA : Lucille, Damien, Sandra, Vincent, Véronique, Flore, Jana, Xavier, François... Je pense aux employés de l'ISEN avec qui j'étais régulièrement en contact et qui ont tout fait pour faciliter mes démarches administratives et surtout pour me sentir accueilli : Claire, Nathalie, Corinne, Josée, Roberte, Fabien, Christelle... Sincèrement, merci pour tout.

A présent, je voudrais mettre en avant mes amis. Merci Vince, Bobby, Nat, Mat, Cro, Lapin, Rob, Céline, Sam, Copine, Nico... Quelle que soit la distance ou la fréquence de nos contacts, surtout dans les périodes chargées, j'ai toujours senti votre soutien inconditionnel et votre confiance en mes capacités. J'ai hâte de célébrer la fin de cette aventure avec vous tous. J'ai également une pensée pour Jean-Christophe C., que je considère comme un ami et qui a toujours cru en moi, des bancs de Polytech' jusqu'à Frankfurt. Ta confiance est une des raisons qui m'a poussé à reprendre mes études.

Pour finir, je voudrais remercier ma famille. Je vais commencer par ma famille de cœur Frankfurtoise. Virginie et Harald, merci pour votre bienveillance et vos encouragements. Armin und Stini, herzlichen Dank für Ihre Liebe und Ihre Ermutigungen. Passons à présent à ma famille officielle. Clarisse, Tony, les mots ne suffisent pas pour décrire l'effet que vos paroles ont eu sur moi pendant les périodes difficiles. Merci. Maman, papa, vous avez été, êtes et serez toujours là pour moi et c'est ce qui m'a permis d'accomplir cette épreuve. Pour finir, Mapuce. Nous avons vécu intégralement cette aventure à deux et t'avoir comme compagnon de route est la plus belle chose qui me soit arrivée.

TABLE DES MATIERES

Résumé.....	iii
Summary	v
Remerciements	vii
Table des matières	ix
Liste des figures	xiii
Liste des tableaux	xvii
Liste des abréviations et symboles	xix
Liste des constantes et des variables	xxi
1 Introduction.....	1
1.1 Contexte.....	1
1.1.1 L'enjeu de la qualité de l'eau.....	1
1.1.2 Le <i>Cryptosporidium</i> : un agent pathogène de référence.....	1
1.1.3 Un besoin d'outils d'analyse du <i>Cryptosporidium</i>	2
1.2 Analyses du risque lié au <i>Cryptosporidium</i>	3
1.2.1 Détection et Comptage	3
1.2.1.1 Techniques et outils d'analyse.....	3
1.2.1.2 Limites de l'analyse	4
1.2.2 Viabilité.....	5
1.2.2.1 Définition	5
1.2.2.2 Techniques et outils d'analyse.....	5
1.2.2.3 Limites de l'analyse	6
1.2.3 Virulence.....	7
1.2.3.1 Définition	7
1.2.3.2 Techniques et outils d'analyse.....	7
1.2.3.3 Limites de l'analyse	7
1.2.4 Infectivité.....	8
1.2.4.1 Définition	8
1.2.4.2 Techniques et outils d'analyse.....	8
1.2.4.3 Limites de l'analyse	9
1.2.5 Conclusion.....	11
1.3 Techniques de mesures en continu et sans marquage des évolutions morphologiques de cultures cellulaires	11
1.3.1 Préambule.....	11
1.3.2 Présentation des techniques	12
1.3.2.1 Approche acoustique : Microbalance à Cristal de Quartz (QCM)	12

1.3.2.2	Approche optique : Résonance de Plasmons de Surface (SPR)	14
1.3.2.3	Approche électrique : Spectroscopie d'Impédance Electrique (EIS)	16
1.3.3	Récapitulatif	19
1.4	Stratégie de recherche	21
1.4.1	Définition de la problématique	21
1.4.2	Verrous technologiques et scientifiques	22
1.4.2.1	Verrous technologiques.....	22
1.4.2.2	Verrous scientifiques	22
1.4.3	Structure de la thèse.....	23
2	Modèles électrique et biologique	25
2.1	Description du système physique.....	25
2.2	La Spectroscopie d'Impédance Electrique (EIS).....	27
2.2.1	Définition	27
2.2.2	Phénomènes physiques	28
2.2.2.1	Conduction.....	29
2.2.2.2	Polarisation.....	29
2.2.3	Types de sollicitation électrique	30
2.2.3.1	Marche ou rampe de potentiel	30
2.2.3.2	Bruit blanc	30
2.2.3.3	Sinusoïde.....	31
2.2.4	Equipements de mesure d'impédance	31
2.2.4.1	Pont d'impédance.....	31
2.2.4.2	Impédancemètres (Frequency Resonance Analyzers).....	32
2.2.5	Représentations	33
2.2.5.1	Notations.....	34
2.2.5.2	Exemples de circuit.....	34
2.2.5.3	Diagramme de Nyquist	35
2.2.5.4	Diagramme de Bode.....	36
2.2.5.5	Analyse temporelle.....	37
2.2.6	Récapitulatif	37
2.3	Modèle biophysique du système physique.....	38
2.3.1	Cycle de vie du <i>C. parvum</i>	38
2.3.1.1	Ingestion	39
2.3.1.2	Désenkystement	39
2.3.1.3	Invasion	40
2.3.1.4	Formation de la vacuole parasitophore	40
2.3.1.5	Reproduction asexuée	40
2.3.1.6	Reproduction sexuée	41
2.3.2	Effets de l'infection par <i>C. parvum</i> sur les cellules.....	42
2.3.2.1	Effets locaux sur la cellule infectée	42

2.3.2.2	Effets globaux sur le tapis cellulaire.....	43
2.4	Modèle électrique du système physique.....	45
2.4.1	Description et limites du modèle électrique choisi : le circuit équivalent.....	45
2.4.2	Description des composants électriques du circuit équivalent.....	46
2.4.2.1	Résistance R et constante de cellule.....	46
2.4.2.2	Condensateur de capacité C.....	48
2.4.2.3	Inductance L.....	48
2.4.2.4	Elément à phase constante CPE.....	49
2.4.2.5	Tableau récapitulatif.....	51
2.4.3	Représentation par circuit équivalent.....	51
2.4.4	Justification du choix de notre circuit équivalent.....	52
2.4.4.1	Interface électrode-milieu (ou électrode-électrolyte).....	52
2.4.4.2	Milieu de culture.....	54
2.4.4.3	Eléments parasites.....	55
2.4.4.4	Les cellules.....	55
3	Elaboration et caractérisation électrique du dispositif de mesure	59
3.1	Vue d'ensemble du dispositif de mesure.....	60
3.2	Choix de la géométrie et des matériaux des éléments constituant le dispositif de mesure.....	61
3.2.1	Réseau d'Electrodes Interdigitées Planaires (REIP).....	61
3.2.2	Puits.....	63
3.2.3	Dispositif de mesure.....	63
3.3	Conception du dispositif.....	64
3.4	Protocole de caractérisation du dispositif.....	68
3.4.1	Banc de test expérimental.....	69
3.4.2	Choix et mesures d'impédance de milieux liquides.....	71
3.4.3	Analyses des mesures.....	72
3.4.4	Déduction des propriétés électriques des milieux.....	73
3.5	Caractérisation électrique.....	74
3.5.1	Air.....	74
3.5.2	Eau déionisée (EDI).....	76
3.5.3	Tampon phosphate salin (PBS) 1x.....	77
3.5.4	Milieu de culture.....	80
4	Suivi par spectroscopie d'impédance électrique d'une croissance cellulaire et influence du repiquage.....	83
4.1	Introduction.....	83
4.2	Matériels & Méthodes.....	84
4.2.1	Culture des cellules HCT-8.....	84
4.2.2	Culture des cellules HCT-8 dans notre dispositif de mesure.....	84
4.2.3	Analyse de la réponse en impédance.....	86
4.3	Résultats.....	88

4.3.1	Analyses temporelle et fréquentielle du tapis cellulaire.....	88
4.3.2	Analyse de la croissance cellulaire par circuit équivalent.....	91
4.3.3	Influence du repiquage sur nos croissances cellulaires.	95
4.4	Discussion.....	99
4.5	Conclusion.....	102
5	Suivi en continu par spectroscopie d'impédance de l'infection de cellules HCT-8 par le parasite <i>Cryptosporidium parvum</i>.....	105
5.1	Introduction.....	105
5.2	Matériels et méthodes.....	106
5.2.1	Préparation des oocystes.....	106
5.2.2	Protocole d'infection.....	108
5.2.3	Analyse de l'impédance électrique.....	108
5.2.4	Culture et infection dans des chambres de culture Lab-Tek™ en parallèle des mesures d'impédance électrique.....	109
5.2.5	Marquage par fluorescence.....	110
5.2.6	Observation par fluorescence.....	111
5.3	Résultats.....	113
5.3.1	Réponse impédimétrique spécifique des cellules hôtes à l'infection au <i>C. parvum</i>	113
5.3.2	Analyse du tapis cellulaire par circuit équivalent.....	115
5.3.3	Alternance des prédominances de zoïtes et mérontes.....	118
5.3.4	Réponses impédimétriques des cellules dépendantes de la dose infectieuse.....	121
5.4	Discussion.....	123
5.5	Conclusion.....	125
6	Conclusion.....	127
6.1	Réalisations.....	127
6.1.1	Avant l'introduction des parasites de <i>C. parvum</i>	127
6.1.2	Après l'introduction des parasites de <i>C. parvum</i>	128
6.2	Perspectives.....	129
6.2.1	Optimisation par miniaturisation.....	129
6.2.2	Spécificité de la réponse au couple espèce – cellule-hôte.....	131
6.2.3	L'EIS pour étudier le cancer induit par le <i>C. parvum</i>	131
A.	Suivi impédimétrique de croissance de cellules HCT-8 des expériences n°2 et 3.....	133
B.	Modélisation par circuit électrique équivalent de la croissance de cellules HCT-8 des expériences n°2 et 3.....	135
C.	Modélisation par circuit électrique équivalent de l'infection d'un tapis de cellules HCT-8 par le <i>C. parvum</i> des expériences n°2 et 3.....	139
	Bibliographie.....	143

LISTE DES FIGURES

Figure 1.1 : Niveaux d'analyses du <i>Cryptosporidium</i>	3
Figure 1.2 : Photo DIC d'un oocyste de l'espèce <i>Cryptosporidium parvum</i>	3
Figure 1.3 : Description de la méthode US/EPA 1623 et techniques utilisées par les dispositifs miniaturisés de détection du <i>Cryptosporidium</i>	4
Figure 1.4 : Photo DIC d'un oocyste de l'espèce <i>Cryptosporidium parvum</i> libérant ses sporozoïtes.....	5
Figure 1.5 : Photo DIC d'un oocyste de l'espèce <i>Cryptosporidium parvum</i> vide et plein.....	5
Figure 1.6 : Schéma représentant la mesure de la TEER.....	12
Figure 1.7 : Illustration d'une mesure par QCM sur des cellule.....	13
Figure 1.8 : Illustration d'un biocapteur SPR.....	15
Figure 1.9 : Schémas représentant des cellules dans un milieu de culture, dont les propriétés électriques sont mesurées par les systèmes développés par Giaever et Ehret.....	18
Figure 2.1 : Représentation du système physique complet.....	26
Figure 2.2 : Représentation de l'évolution temporelle d'une tension d'excitation alternative sinusoïdale et du courant alternatif résultant.....	28
Figure 2.3 : Représentation de la polarisation électrique.....	30
Figure 2.4 : Exemple de pont d'impédance.....	31
Figure 2.5 : Schéma de principe d'un impédancemètre.....	33
Figure 2.6 : Représentation schématique des circuits RC montés en série et en parallèle.....	35
Figure 2.7 : Diagramme de Nyquist d'un circuit RC monté en série et en parallèle.....	36
Figure 2.8 : Diagramme de Bode d'un circuit RC monté en série et en parallèle.....	37
Figure 2.9 : Représentation du cycle de vie du <i>C. parvum</i>	39
Figure 2.10 : Photo d'un sporozoïte et d'un merozoïte de type I.....	41
Figure 2.11 : Photos DIC et par fluorescence de macrogamonts et microgamonts.....	41
Figure 2.12 : Photo par microscopie électronique à balayage de cellules HCT-8 apoptotique et nécrosée suite à l'infection du tapis par le <i>C. parvum</i>	43
Figure 2.13 : Photo par microscopie électronique en transmission de cellules épithéliales <i>in vivo</i> infectée par le <i>Cryptosporidium</i>	43
Figure 2.14 : Photo par microscopie à fluorescence de cellules épithéliales entériques infectées ou non par le <i>Cryptosporidium</i>	44
Figure 2.15 : Exemples de circuits équivalents présentant la même impédance quelle que soit la fréquence de la tension alternative appliquée.....	46
Figure 2.16 : Comparaison des champs électriques induits par des électrodes interdigitées coplanaires avec deux doigts et par deux électrodes l'une en face de l'autre.....	47
Figure 2.17 : Illustration d'un diagramme de Nyquist d'un circuit RC parallèle et de la dépression du demi-cercle observée par Cole et Cole pour des mesures sur des électrolytes.....	49
Figure 2.18 : Circuit équivalent à l'équation (2.41) correspondant au modèle de Cole-Cole.....	50
Figure 2.19 : Modélisation par circuit équivalent du modèle physique.....	52
Figure 2.20 : Représentation de l'interface d'une électrode de métal plongée dans un électrolyte.....	54
Figure 2.21 : Représentation schématique d'une cellule unique et de sa modélisation électrique.....	56
Figure 2.22 : Illustration d'un tapis cellulaire dans son milieu de culture (électrodes, substrat et phénomènes d'interface non représentés) et de son circuit équivalent.....	57
Figure 2.23: Circuit équivalent final du système.....	58
Figure 3.1 : Photos du dispositif de mesure.....	60
Figure 3.2 : Représentation d'un tapis cellulaire et du volume de l'électrolyte au-dessus des électrodes.....	61
Figure 3.3 : Vue des dessus des lignes de champ induites par des électrodes interdigitées.....	62

Figure 3.4 : Etapes de fabrication du dispositif de mesure.....	64
Figure 3.5 : Création du profil casquette	65
Figure 3.6 : Photo d'un court-circuit fondu par effet Joule.....	67
Figure 3.7 : Vue de profil de la jonction entre le substrat, le milieu et le puits de PDMS.....	68
Figure 3.8 : Photo et schéma du banc de test expérimental.	69
Figure 3.9 : Photo du dispositif relié par pontages de fil d'aluminium au circuit imprimé.	70
Figure 3.10 : Photo et paramètres géométriques des électrodes interdigitées.	73
Figure 3.11 : Circuit équivalent utilisé pour modéliser le signal à l'air (i.e. sans milieu physiologique).....	75
Figure 3.12 : Diagramme de Bode du signal mesuré à vide et de sa modélisation par circuit équivalent.	75
Figure 3.13 : Diagramme de Bode du signal mesuré avec l'EDI et de sa modélisation par circuit équivalent.	76
Figure 3.14 : Circuit équivalent utilisé pour modéliser le signal avec l'EDI.	77
Figure 3.15 : Diagramme de Bode du signal mesuré avec le PBS et de sa modélisation par circuit équivalent	78
Figure 3.16 : Circuit équivalent utilisé pour modéliser le signal avec le PBS.....	78
Figure 3.17 : Amplitudes d'impédance du signal total et de chaque élément du circuit équivalent, constituant ses asymptotes en basses, moyennes et hautes fréquences	80
Figure 3.18 : Diagramme de Bode du signal mesuré avec le milieu de culture et de sa modélisation par circuit équivalent	81
Figure 4.1 : Illustration de fuites de milieu observées.	85
Figure 4.2 : Circuit équivalent final de notre système sans la contribution capacitive du substrat.	87
Figure 4.3: Représentations de la mesure de l'impédance du tapis cellulaire en fonction du temps et de la fréquence appliquée.....	89
Figure 4.4 : Spectre fréquentiel de $ Z(t,f) _{norm}$ aux temps t_{min} et t_{max} auxquels $ Z(t,f) _{norm}$ atteint ses valeurs minimale et maximale au cours des 76h de croissance du tapis cellulaire à la fréquence f_s	90
Figure 4.5 : Evolution temporelle de l'amplitude d'impédance normalisée du tapis cellulaire pendant 76h de croissance à la fréquence de sensibilité maximale de notre système $ Z(t,f_s) _{norm}$	91
Figure 4.6 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent comparées à l'amplitude d'impédance totale $ Z(t,\omega) $ à différentes fréquences.	93
Figure 4.7 : Effet du nombre de repiquages subis par les cellules sur leur réponse impédimétrique mesurée pendant 24h.	97
Figure 4.8 : Evolution de $R_{para}(t)$ à $t = 24h$ suivant le nombre de repiquage subis par les cellules.....	98
Figure 5.1 : Circuit équivalent de notre système utilisé pour modéliser des mesures sur des cultures de cellules HCT-8 confluentes infectées par le <i>C. parvum</i>	109
Figure 5.2 : Distribution des champs d'observation dans chaque puits.	111
Figure 5.3 : Trois exemples de formes parasitaires du <i>C. parvum</i> observées par fluorescence et par microscopie à Contraste Interférentiel Différentiel (DIC).....	112
Figure 5.4 : Suivi en continu de l'infection par <i>C. parvum</i> d'une culture de cellules HCT-8 confluite pendant 60h	114
Figure 5.5 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent. L'évolution de chaque amplitude d'impédance est comparée à $ Z(t,\omega) $ à différentes fréquences	117
Figure 5.6 : Evolution des formes parasitaires du <i>C. parvum</i> et du recouvrement du tapis des cellules hôtes au cours de l'infection pour un ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:1.....	120
Figure 5.7 : Réponse impédimétrique des cellules HCT-8 pendant l'infection au <i>C. parvum</i> en fonction de la dose infectieuse de l'inoculum.....	122
Figure A.1 : Représentations de la mesure de l'impédance du tapis cellulaire en fonction du temps et de la fréquence appliquée des deux autres expériences.	134

Figure B.1 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent comparées à l'amplitude d'impédance totale $ Z(t,\omega) $ à différentes fréquences pour l'expérience n°2.....	136
Figure B.2 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent comparées à l'amplitude d'impédance totale $ Z(t,\omega) $ à différentes fréquences pour l'expérience n°3.....	137
Figure C.1 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent. L'évolution de chaque amplitude d'impédance est comparée à $ Z(t,\omega) $ à différentes fréquences pour l'expérience n°2.....	141
Figure C.2 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent. L'évolution de chaque amplitude d'impédance est comparée à $ Z(t,\omega) $ à différentes fréquences pour l'expérience n°3.....	142

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1.1 : Récapitulatif des avantages et inconvénients des trois techniques majeurs pour suivre les évolutions morphologiques de cultures cellulaires en continu et sans marquage.....	20
Tableau 2.1 : Principales caractéristiques de quelques impédancemètres.....	33
Tableau 2.2 : Représentation et formules associées aux éléments électroniques standards.	51
Tableau 3.1 : Valeurs initiales des paramètres composant un circuit équivalent considérées par l'algorithme.....	73
Tableau 3.2 : Paramètres géométriques du réseau d'électrode total et de celui contenu dans un puits.....	73
Tableau 3.3 : Constante de cellule du réseau d'électrode total et de celui contenu dans un puits.....	74
Tableau 3.4 : Paramètres du circuit équivalent du signal mesuré à l'air.	75
Tableau 3.5 : Paramètres du circuit équivalent du signal mesuré avec de l'EDI.....	77
Tableau 3.6 : Paramètres du circuit équivalent du signal mesuré avec du PBS.	78
Tableau 3.7 : Paramètres du circuit équivalent du signal mesuré avec du milieu de culture.	81
Tableau 4.1: Valeurs des éléments du circuit équivalent déterminées avec notre protocole.....	94
Tableau 4.2 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent et coefficient de corrélation après 24h de croissance du tapis cellulaire ayant subis 7, 14, 24 et 33 repiquages	99
Tableau 5.1 : Valeurs du rapport $R_{x,y}$ entre les amplitudes d'impédance normalisée des ratios 1:1 et 0:1 aux différentes instants et fréquences	115
Tableau 5.2 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent post infection à un ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:1	118
Tableau 5.3 : Temps moyens de l'apparition des pics pour chaque ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée].....	123
Tableau B.1 : Valeurs des éléments du circuit équivalent déterminées avec notre protocole pour l'expérience n°2	135
Tableau B.2 : Valeurs des éléments du circuit équivalent déterminées avec notre protocole pour l'expérience n°3	135
Tableau C.1 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent post infection à un ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:1 pour l'expérience n°2.....	139
Tableau C.2 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent post infection à un ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:1 pour l'expérience n°3.....	140

LISTE DES ABREVIATIONS ET SYMBOLES

Abréviation / Symbole	Signification
ADN	Acide désoxyribonucléique
ARNm	Acide ribonucléique messenger
BALB/c, C57BL-6, CD-1	Types de souris néonatales
<i>C. hominis</i>	<i>Cryptosporidium hominis</i>
<i>C. parvum</i>	<i>Cryptosporidium parvum</i>
Caco-2	Cellules issues d'un adénocarcinome colorectal humain
CE / WE	Contre-électrode ("Counter Electrode") / Electrode de travail ("Working Electrode")
CO ₂	dioxyde de carbone
CPE	Élément à Phase Constante ("Constant Phase Element")
DAPI	4',6'-diamidino-2-phenylindole
DEP	Diélectrophorèse ("Dielectrophoresis")
DIC (microscopie)	(Microscopie à) Contraste Interférentiel Différentiel ("Differential Interferential Contrast")
EDI	Eau déionisée
EIS	Spectroscopie d'Impédance Electrique ("Electrical Impedance Spectroscopy")
FITC	Isothiocyanate de Fluorescéine ("Fluorescein Isothiocyanate")
FRA	Impédancemètre ("Frequency Resonance Analyzers")
GPIB	General Purpose Interface Bus
H ₂ O ₂	Eau oxygénée
H ₂ SO ₄	Acide sulfurique
HBSS	Solution saline équilibrée ("Hanks Balanced Salt Solution")
HCT-8	Cellules issues d'un adénocarcinome iléocœcal humain
HMDS	Hexaméthylidisilazane
HPIB	Hewlett-Packard Instrument Bus
IEMN	Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies
IL-8	Interleukine-8
IMS	Séparation Immuno-Magnétique ("Immune Magnetic Separation")
ISA	Institut Supérieur d'Agriculture
ISEN	Institut Supérieur d'Electronique et du Numérique
L2	Classe de confinement de laboratoire niveau 2
MDCK	Cellules non cancéreuses de rein de cocker ("Madin-Darby Canine Kidney")
NF-kB	Nuclear Factor-kappa B
O ₂	Dioxygène
OMS	Organisation Mondiale de la Santé ("World Health Organization")
P+x	Nombre de repiquages
PBS	Tampon phosphate salin ("Phosphate buffered saline")
PCA	Gélose pour dénombrement ("Plate Count Agar")
PCR	Réaction de Polymérisation en Chaîne ("Polymerase Chain Reaction")
PDMS	Polydiméthylsiloxane
pH	Potentiel hydrogène

PI	Iodure de propidium ("Propidium Iodide")
PI (h)	(Heures) Post Infection
QCM	Microbalance à Cristal de Quartz ("Quartz Crystal Microbalance")
REIP	Réseau d'Electrodes Interdigitées Planaires
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
RT-PCR	PCR avec une phase de Rétro-Transcription ("Reverse Transcription PCR")
sccm	centimètre cube par minute standard ("standard cubic centimeter per minute")
SCID	Souris sévèrement immunodéprimée ("Severe Combined Immunodeficiency")
SMA	SubMiniature version A
SPR	Résonance des Plasmons de Surface ("Surface Plasmon Resonance")
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TEER	Résistance Electrique TransEpithéliale ("TransEpithelial Electrical Resistance")
TEM	Microscopie Electronique en Transmission ("Transmission Electron Microscopy")
TGF- β	Facteur de croissance de transformation ("Transforming Growth Factor") β
US/EPA	Agence de Protection de l'Environnement des Etats-Unis ("United States Environment Protection Agency")
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
WGA	Wheat Germ Agglutinin
ZO	Jonctions serrées ("Zonula Occludens")
Ω	Ohm(s)

LISTE DES CONSTANTES ET DES VARIABLES

Constante	Définition	Valeur
ε_0	Permittivité du vide	$8,54187.10^{-12}$ F.m ⁻¹
j	Nombre imaginaire	$j^2 = -1$
π	Pi	3,14159...

Variabes	Définition	Unité
A	Accélération	m.s ⁻²
C	Capacité	F
C_{sub}	Capacité du substrat de Pyrex	F
D	Vecteur induction électrique	C.m ⁻²
D	Débit (attaque Plasma O ₂)	sccm
E	Vecteur champ électrique	V.m ⁻¹
E_{el}	Espace moyen entre chaque doigt de notre REIP	m
ε_r	Permittivité relative	-
f	Fréquence ($=\omega/2\pi$)	Hz ou .s ⁻¹
f_{milieu}	Fréquence de relaxation du milieu de culture	Hz ou .s ⁻¹
$f_{para/trans}$	Fréquence de relaxation entre les trajets trans- et paracellulaire	Hz ou .s ⁻¹
f_S	Fréquence à laquelle notre système est le plus sensible aux variations d'impédance du tapis cellulaire	Hz ou .s ⁻¹
i	Vecteur courant électrique	A.m ⁻²
I, i	Courant électrique	A
k	Module du REIP	-
$K(k)$	Intégrale elliptique complète du 1 ^{er} ordre	-
L	Inductance	H
$L_{câbles}, L_{câbles}(t), L_c(t)$	Inductance des câbles du banc de test expérimental	H
L_{el}	Largeur moyenne d'un doigt de notre REIP	m
n	Indice du CPE	-
$n_{dc}, n_{dc}(t)$	Indice du CPE modélisant la double couche	-
$n_{trans}, n_{trans}(t), n_t(t)$	Indice du CPE modélisant le trajet transcellulaire	-
$N_{oocystes,0:1}$	Nombre d'oocystes correspondant à l'inoculum du ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 0:1	-
$N_{oocystes,1:1}$	Nombre d'oocystes correspondant à l'inoculum du ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:1	-
$N_{oocystes,1:2}$	Nombre d'oocystes correspondant à l'inoculum du ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:2	-
$N_{oocystes,1:4}$	Nombre d'oocystes correspondant à l'inoculum du ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:4	-
P	Amplitude du CPE	S.s ⁿ
$P_{dc}, P_{dc}(t)$	Amplitude du CPE modélisant la double couche	S.s ^{ndc}
$P_{trans}, P_{trans}(t), P_t(t)$	Amplitude du CPE modélisant le trajet transcellulaire	S.s ^{ntrans}

\mathbf{P}	Vecteur polarisation du champ électrique	C.m ⁻²
$\mathbf{P}'(t)$	Polarisation dépendante du temps	C.m ⁻²
$\mathbf{P}_\infty, \mathbf{P}_s$	Polarisations indépendantes du temps (i.e. fréquence infinie et fréquence nulle)	C.m ⁻²
$Para\%, Para\%(\omega)$	Poids du trajet paracellulaire sur $ Z_{cell}(t,\omega) $ à la fréquence radiale ω	%
Pr	Pression (attaque Plasma O ₂)	mT
Pu	Puissance (attaque Plasma O ₂)	W
r^2	Coefficient de corrélation d'une modélisation par circuit équivalent	-
R	Résistance	Ω
$R_{hf}, R_{lf}(t)$	Résistance aux hautes fréquences	Ω
$R_{para}, R_{para}(t), R_p(t)$	Résistance modélisant le trajet paracellulaire	Ω
R_{tf}	Rapport entre les amplitudes d'impédance des ratios 1:1 et 0:1 au temps t et à la fréquence f	-
$S(f), S(x,f)$	Sensibilité de notre système de mesure à la fréquence f (et après x repiquages)	-
t	Temps	s
t_{max}	Temps où la valeur de l'amplitude d'impédance est respectivement à son maximum pour une fréquence donnée	s
t_{min}	Temps où la valeur de l'amplitude d'impédance est respectivement à son minimum pour une fréquence donnée	s
τ	Constante de temps	s
$Trans\%, Trans\%(\omega)$	Poids du trajet transcellulaire sur $ Z_{cell}(t,\omega) $ à la fréquence radiale ω	%
U, u	Tension (ou Potentiel) électrique	V
V	Vitesse	m.s ⁻¹
x	Nombre de repiquages	-
$Z(f), Z(\omega),$ $Z(t,f), Z(t,\omega)$	Impédance électrique totale	Ω
$Z'(f), Z'(\omega),$ $Z'(t,f), Z'(t,\omega)$	Partie réelle de l'impédance électrique totale	Ω
$Z''(f), Z''(\omega)$ $Z''(t,f), Z''(t,\omega)$	Partie imaginaire de l'impédance électrique totale	Ω
$\left \begin{array}{l} Z(f) \\ Z(t,f) \end{array} \right , \left \begin{array}{l} Z(\omega) \\ Z(t,\omega) \end{array} \right ,$	Amplitude de l'impédance électrique totale	Ω
$\left \begin{array}{l} Z_{norm}(t,f) \\ Z_{norm}(t,\omega) \end{array} \right ,$	Amplitude de l'impédance électrique totale normée par rapport à sa valeur à $t = 0h$	Ω
$Z_{câbles}(t,f), Z_{câbles}(t,\omega)$	Impédance électrique des câbles du banc de test expérimental	-
$\left \begin{array}{l} Z_{câbles}(t,f) \\ Z_{câbles}(t,\omega) \end{array} \right $	Amplitude de l'impédance électrique des câbles du banc de test expérimental	Ω
$Z_{cell}(t,f), Z_{cell}(t,\omega)$	Impédance électrique du tapis cellulaire	Ω
$Z_{cell}'(t,f), Z_{cell}'(t,\omega)$	Partie réelle de l'impédance électrique du tapis cellulaire	Ω
$Z_{cell}''(t,f), Z_{cell}''(t,\omega)$	Partie imaginaire de l'impédance électrique du tapis cellulaire	Ω
$\left \begin{array}{l} Z_{cell}(t,f) \\ Z_{cell}(t,\omega) \end{array} \right $	Amplitude de l'impédance électrique du tapis cellulaire	Ω
$Z_{dc}(t,f), Z_{dc}(t,\omega)$	Impédance électrique du CPE modélisant la double couche	-
$\left \begin{array}{l} Z_{dc}(t,f) \\ Z_{dc}(t,\omega) \end{array} \right $	Amplitude de l'impédance électrique du CPE modélisant la double couche	Ω
$Z_{trans}(t,f), Z_{trans}(t,\omega)$	Impédance électrique du CPE modélisant le trajet transcellulaire	Ω

$\left \begin{matrix} Z_{trans}(t,f) \\ Z_{trans}(t,\omega) \end{matrix} \right $	Amplitude de l'impédance électrique du CPE modélisant le trajet transcellulaire	Ω
Z_C	Impédance d'une capacité	Ω
Z_{CPE}	Impédance d'un CPE	Ω
Z_L	Impédance d'une inductance	Ω
Z_R	Impédance d'une résistance	Ω
ε_∞	Permittivité en hautes fréquences	F.m ⁻¹
ε_S	Permittivité statique (fréquence nulle)	F.m ⁻¹
ε_r	Permittivité relative	-
σ	Conductivité électrique	S.m ⁻¹
σ_{milieu}	Conductivité électrique du milieu de culture	S.m ⁻¹
σ_{max}	Conductivité électrique maximale détectable par notre système de mesure	S.m ⁻¹
$\sigma_{tapis,max}$	Conductivité électrique maximale du tapis cellulaire détectée par notre système de mesure	S.m ⁻¹
$\varphi(f), \varphi(\omega),$ $\varphi(t,f), \varphi(t,\omega)$	Phase de l'impédance électrique	radians (en degrés : *180/ π)
ω	Fréquence radiale (= $2\pi f$)	rad.s ⁻¹
K (κ)	Constante de cellule	m ⁻¹
K_{puits} (κ)	Constante de cellule de nos REIP dans le puits (diamètre = 6mm)	m ⁻¹
K_{total} (κ)	Constante de cellule de nos REIP totale (diamètre = 8mm)	m ⁻¹

1 INTRODUCTION

1.1 Contexte

1.1.1 L'enjeu de la qualité de l'eau

L'eau est essentielle à notre survie et l'accès à une source sûre et adéquate est vital pour nous tous. Bien que la majeure partie des sociétés occidentales puisse en jouir en abondance, une forte disparité demeure dans le monde et 1 milliard de personnes ne disposent pas d'une source d'eau améliorée à proximité de leur lieu de vie. Par définition, il s'agit d'une source d'eau dont les contrôles et infrastructures la protègent de toutes contaminations extérieures, en particulier par les matières fécales. Celles-ci induisent et propagent des maladies, faisant du contrôle de la qualité de l'eau un enjeu majeur à l'échelle mondiale.

La potabilité de l'eau en est le critère de référence majeur. Une eau est dite potable lorsque qu'elle est propre à la consommation humaine. Cela se détermine suite à l'évaluation de caractéristiques de diverses natures, parmi lesquelles une concentration maximale à respecter de produits chimiques pouvant être toxiques (par exemple les produits phytosanitaires) ou de micro-organismes pathogènes. Ces derniers se composent des virus, des bactéries et des protozoaires parasites (organisme unicellulaire). Leur surveillance est due au fait que leur ingestion conduit au développement de maladies infectieuses pouvant devenir chronique. Les données épidémiologiques mondiales montrent que les individus aux extrémités de la vie (les plus jeunes comme les plus âgés) ainsi que ceux présentant un système immunitaire déficient sont les plus sensibles aux contaminations par voie hydrique.

1.1.2 Le *Cryptosporidium* : un agent pathogène de référence

Parmi les agents pathogènes les plus communément retrouvés, les protozoaires parasites sont les plus difficiles à neutraliser par des méthodes chimiques comme la chloration ("WHO | Guidelines for drinking-water quality, fourth edition," n.d.). Etant donné l'impossibilité de définir des normes de sécurité pour tous les parasites, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS ou « WHO » pour « World Health Organization ») désigne des agents pathogènes comme référence à partir de critères comme leur persistance dans l'environnement, leur occurrence dans les sources d'eau ou encore leur capacité à induire une maladie infectieuse. Parmi ceux-ci, nous trouvons les parasites du genre *Cryptosporidium* ("WHO | Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking water," n.d.).

Le *Cryptosporidium* est un protozoaire parasite du phylum des apicomplexes infectant tous les groupes de vertébrés et notamment les humains (Fayer, 2010). Il s'agit de l'agent étiologique de la cryptosporidiose, une diarrhée sévère voire létale pour les organismes immunodéprimés ou dont le système immunitaire n'est pas entièrement formé, comme les enfants. Originellement découvert sur une souris en 1907 (Tyzzer, 1907), il n'a été reconnu qu'au début des années 1980 comme étant un agent étiologique d'importance de maladies humaines suite à plusieurs cas de décès de personnes porteuses du Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) et atteintes de cryptosporidiose. Une forte prévalence des cas de cryptosporidiose se situe dans les pays en développement en raison du manque d'hygiène, particulièrement pour les enfants, et du nombre plus important de personnes porteuses du VIH (Putignani et Menichella, 2010). Les épidémies liées à *Cryptosporidium* surviennent également dans les pays développés (Chalmers, 2012). La plus importante eut lieu en 1993, dans la ville de Milwaukee aux Etats-Unis, causant plus de 400 000 personnes malades et 69 décès (Mac Kenzie *et al.*, 1994). Les travaux de Baldursson et Karanis ont ainsi montré que

60% des maladies parasitaires d'origine hydrique en Europe et aux Etats-Unis entre 2004 et 2010 ont pour origine le *Cryptosporidium* (Baldursson et Karanis, 2011).

Du point de vue de ses spécificités, le *Cryptosporidium* présente une forte résilience aux traitements chimiques de l'eau tels que la chloration (Cacciò et Pozio, 2006) et est capable d'y persister sous sa forme infectieuse pendant plus de 13 mois (Chen *et al.*, 2007). Concernant l'inoculum requis pour induire la cryptosporidiose, des tests d'infection ont été menés en 1995 par DuPont *et al.* sur des individus volontaires et en bonne santé n'ayant pas été contaminés auparavant (DuPont *et al.*, 1995). Sur 29 volontaires entre 20 et 45 ans ayant été exposés à des doses variant de 30 à 1 million de parasites, 18 (62%) ont été infectés. La valeur médiane de dose infectieuse a été évaluée à 132 parasites mais certains ont été infectés avec seulement 30. Il a donc été conclu qu'une très faible dose de parasites était nécessaire pour causer l'infection. Ce résultat a été corroboré par l'équipe d'Okhuysen, qui a conclu que moins de 10 parasites étaient suffisants pour induire la maladie (Chappell *et al.*, 2006; Okhuysen *et al.*, 1999). Ces caractéristiques ont amené à considérer le *Cryptosporidium* comme un potentiel agent bioterroriste. Par conséquent, les mesures en terme de surveillance de cas d'infection se développent dans un nombre croissant de pays, notamment en Europe, augmentant ainsi le nombre de cas détectés (Fournet *et al.*, 2013).

1.1.3 Un besoin d'outils d'analyse du *Cryptosporidium*

En conséquence du danger représenté par le *Cryptosporidium*, de nombreuses recherches sont faites dans le but de créer de nouveaux outils de détection du parasite (Bridle *et al.*, 2012). Cependant, la détection seule est insuffisante, car tous les parasites n'engendrent pas la maladie. En 1998 à Sidney, une crise d'envergure eut lieu suite à la découverte de *Cryptosporidium* et de *Giardia*, un autre protozoaire parasite, dans les circuits de distribution d'eau, poussant les autorités à appeler la population à faire bouillir leur eau avant de la consommer. Il s'avéra néanmoins que les parasites étaient non viables (voir la définition de « viabilité » au paragraphe 1.2.2) et présentaient un danger largement moindre que celui estimé (Stein, 2000). Afin d'éviter des mesures drastiques inutiles, il est donc nécessaire de développer des outils capables d'évaluer correctement le risque d'une situation.

Par ailleurs, il n'existe à l'heure actuelle aucun traitement efficace contre l'infection au *Cryptosporidium*. Or, en plus des diarrhées mortelles qu'il peut engendrer, il a été montré que le *Cryptosporidium parvum* induit le cancer sur un modèle de souris immunodéprimé (Benamrouz *et al.*, 2014, 2012; Certad *et al.*, 2007), soulevant la question du risque potentiel chez l'Homme. En raison des dangers réels et potentiels, il devient impératif de développer des systèmes capables de vérifier l'efficacité d'un traitement thérapeutique et de passer en revue un large spectre de molécules par criblage haut-débit.

Enfin, de nombreux mécanismes concernant le cycle de vie du *Cryptosporidium* et sa relation avec les cellules-hôtes qu'il infecte demeure inconnus (Borowski *et al.*, 2010). Cette incompréhension rend notamment la culture en routine *in vitro* du parasite impossible pour l'instant (Arrowood, 2002), d'où une nécessité de développer des outils également dans cette optique.

1.2 Analyses du risque lié au *Cryptosporidium*

Au niveau des instances décisionnaires, il est essentiel de pouvoir déterminer si un agent pathogène représente un risque pour la santé humaine ou animale. L'évaluation du risque se doit d'être au plus proche du danger réel représenté par cet agent. Ceci est d'autant plus vrai pour des parasites du genre *Cryptosporidium* du fait de leur forte résistance aux traitements chimiques de l'eau et de leur résilience aux conditions environnementales. Les outils d'analyse liés à leur risque infectieux représentent donc un enjeu majeur quant à l'élaboration et la validation des procédures d'inactivation.

Selon les outils d'analyse du *Cryptosporidium*, le risque lié au parasite peut être classé en 5 niveaux. Ceux-ci sont donnés dans la figure 1.1 par ordre croissant du danger réel représenté pour l'Homme. Cette partie de l'introduction vise à décrire ces niveaux de risque, présenter les techniques utilisées actuellement pour les évaluer et à expliquer leurs limites par rapport au risque réel.

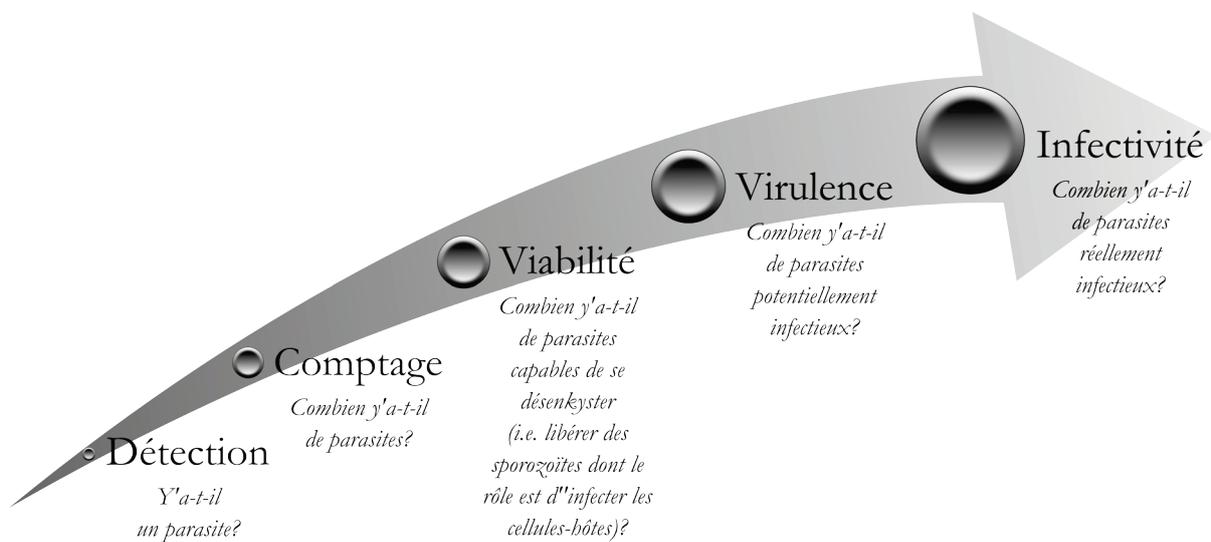


Figure 1.1 : Niveaux d'analyses du *Cryptosporidium* classés suivant la pertinence de leur résultat vis-à-vis de l'effet d'un échantillon sur l'Homme.

1.2.1 Détection et Comptage

1.2.1.1 Techniques et outils d'analyse

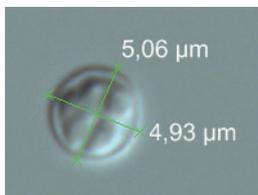


Figure 1.2: Photo DIC d'un oocyste de l'espèce *Cryptosporidium parvum*. (Photo de J. Follet)

Dans le cycle de vie de *Cryptosporidium*, le stade de dissémination se présente sous une forme d'oocyste, un micro-organisme d'une taille d'environ 5µm de diamètre pour l'espèce *Cryptosporidium parvum*. La figure 1.2 en présente une photo prise par microscopie à Contraste Interférentiel Différentiel (DIC). Sa concentration réelle étant évaluée à 10 oocystes / litre (DiGiorgio *et al.*, 2002), il est nécessaire de filtrer d'importants volumes d'eau pour non seulement les concentrer afin d'en obtenir un nombre significatif mais également pour retirer les autres particules microscopiques susceptibles de perturber les analyses.

Ainsi, la méthode standard de détection et de comptage développée par l'Agence américaine de Protection de l'Environnement (EPA) du nom d'US/EPA 1623 (Method 1623, 2005), consiste à filtrer d'importantes quantités d'eau et à les éluer pour réduire le volume contenant les oocystes. Puis, ceux-ci

sont concentrés, capturés par Séparation Immuno-Magnétique (IMS) et marqués avec un anticorps fluorescent (figure 1.3a). A cette étape, il est possible de les détecter et de les compter soit automatiquement par cytométrie par flux, soit manuellement à l'aide d'une cellule de Malassez.

Comme l'indique la figure 1.3a, 3 jours sont nécessaires pour appliquer cette méthode, pendant lesquels le *Cryptosporidium* peut poursuivre sa contamination des conduites d'eau environnantes. Elle mobilise également un nombre important de personnes qualifiées et représente un coût financier élevé.

Afin de pallier ces inconvénients, de nombreux projets de recherche ont été financés pour développer des systèmes de détection et comptage miniaturisés. Ceux-ci ont été pensés pour être utilisés à des étapes précises du protocole US/EPA 1623 (figure 1.3b) et se basent sur des techniques telles que l'analyse par Réaction de Polymérisation en Chaîne (PCR), la diélectrophorèse (DEP), la Résonance de Plasmons de Surface (SPR) ou encore la Spectroscopie d'Impédance Electrique (EIS). Plus de détails sur les techniques de détection et de comptage sont disponibles dans la revue de Quintero-Bétancourt *et al.* (Quintero-Betancourt *et al.*, 2002) et sur leur utilisation dans des systèmes miniaturisés dans la revue de Bridle *et al.* (Bridle *et al.*, 2012).

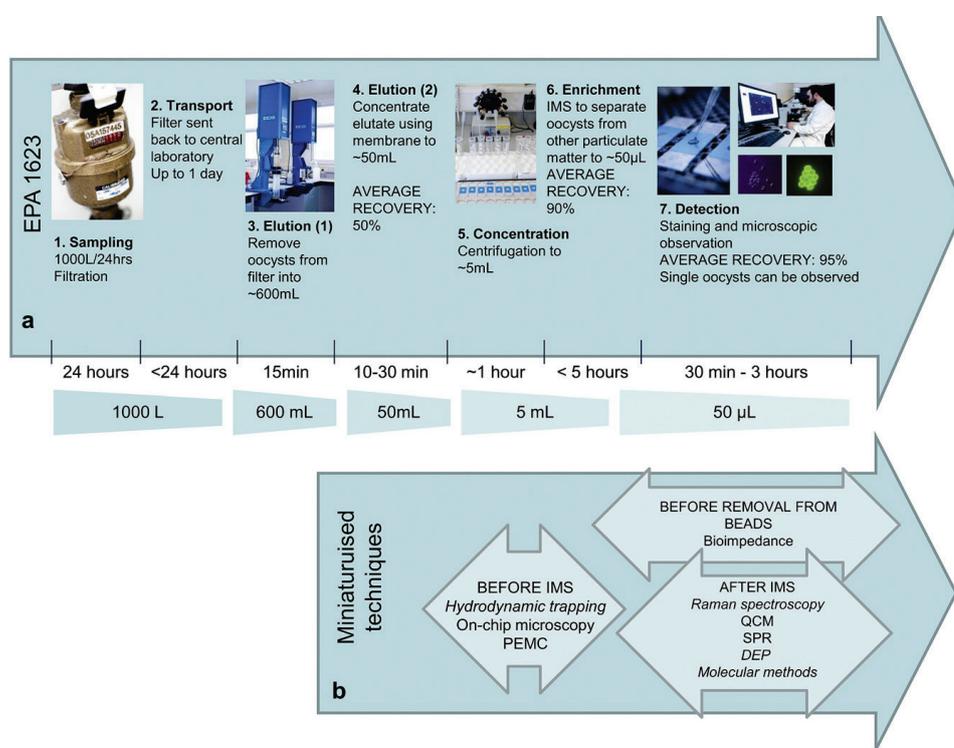


Figure 1.3: (a) Description de la méthode US/EPA 1623. (b) Techniques utilisées par les dispositifs miniaturisés de détection du *Cryptosporidium* et positionnement par rapport aux étapes de la méthode US/EPA 1623 (Bridle *et al.*, 2012).

1.2.1.2 Limites de l'analyse

La limite de ce niveau d'analyse réside dans le fait que tous les oocystes ne présentent pas le même risque pour l'Homme. En effet, il a été montré que les oocystes ayant subi un traitement particulier, par exemple d'ozonation, sont incapables de produire des formes infectieuses et ne présentent donc aucun danger (Morita *et al.*, 2002).

La détection ou le comptage d'oocystes seuls ne renseignent donc pas sur la dangerosité réelle d'un échantillon. Il est donc nécessaire d'étudier en plus les propriétés intrinsèques d'un oocyste.

1.2.2 Viabilité

1.2.2.1 Définition

Une fois ingérés, les oocystes de *Cryptosporidium* se désenkystent, c'est-à-dire libèrent leurs quatre sporozoïtes (figure 1.4), dans l'intestin de l'hôte afin d'infecter les cellules de la lumière intestinale et de s'y reproduire.



Figure 1.4 : Photo DIC d'un oocyste de l'espèce *Cryptosporidium parvum* libérant ses sporozoïtes. (Photo J. Follet)

La viabilité d'un oocyste se définissait initialement comme « la capacité d'un oocyste à se reproduire dans des conditions appropriées » mais il est aujourd'hui considéré que la viabilité désigne l'activité métabolique d'un oocyste ou son intégrité (Robertson et Gjerde, 2007).

1.2.2.2 Techniques et outils d'analyse

Originellement, la viabilité était évaluée selon la capacité d'un oocyste à se désenkyster, et donc à libérer ses sporozoïtes. Les parasites étaient alors désignés comme viables ou non viables suivant leur capacité à libérer ou non leurs sporozoïtes.

Le test consiste à mimer *in vitro* les environnements gastriques et intestinaux que l'oocyste traverse successivement suite à son ingestion. L'environnement gastrique se caractérise notamment par une forte acidité, qui stimule l'oocyste à se désenkyster une fois dans l'intestin. En pratique, le test consiste à introduire les oocystes dans un milieu mimant l'environnement gastrique, caractérisé par un pH acide et la présence de trypsine, puis de les laisser incuber dans celui mimant l'intestin, caractérisé par un pH neutre et l'ajout de bile. Puis, le ratio entre le nombre d'oocystes ayant désenkysté (vides) et le nombre total d'oocystes, ayant désenkysté ou non (pleins), est déterminé et comparé à celui avant le protocole de désenkystement (figure 1.5) (Robertson *et al.*, 1993)



Figure 1.5: Photo DIC d'un oocyste de l'espèce *Cryptosporidium parvum* vide avec son corps réfringent (gauche) et plein (droite).

Un autre test de viabilité, produisant des résultats très similaires au test précédent, consiste à évaluer les propriétés de perméabilité des membranes des oocystes à l'aide de deux marqueurs fluorescents : le 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI) et l'iodure de propidium (PI) (Campbell *et al.*, 1992). Ainsi, les oocystes étant perméables au DAPI et imperméables au PI sont considérés comme viables et ceux perméables aux deux comme non viables. Néanmoins, un troisième état a été mis en évidence : celui d'oocystes à priori non viables car imperméables au DAPI mais potentiellement capables de se désenkyster dans des

conditions environnementales plus favorables. Ceux-ci ont été désignés comme « quiescents » et sont imperméables aux deux marqueurs (Jenkins *et al.*, 1997; Robertson *et al.*, 1998).

D'autres approches ont été également étudiées afin d'estimer la viabilité :

- PCR sans (Wagner-Wiening et Kimmig, 1995) ou avec une phase de rétro-transcription (RT-PCR) (Jenkins *et al.*, 2000)
- Coloration d'acides nucléiques avec du SYTO®-9 et du SYTO®-59 (Belosevic *et al.*, 1997)
- Quantification de l'amylopectine, qui est un sucre employé par le parasite pour faire des réserves d'énergie (Fayer *et al.*, 1998),
- Hybridation *in situ* (Vesey *et al.*, 1998)
- Combinaison de marquages fluorescents au PI et au Isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et cytométrie en flux (Kato et Bowman, 2002).

1.2.2.3 Limites de l'analyse

Il a été montré que la viabilité ne reflète pas le risque d'infection réel d'un échantillon et ne peut donc pas être utilisée de manière fiable comme outil décisionnel.

Tout d'abord, Bukhari *et al.* ont montré que les tests de viabilité consistant à déterminer le désenkystement *in vitro* d'oocystes ou à les marquer avec des marqueurs fluorescents surestiment l'infectivité d'un échantillon (Bukhari *et al.*, 2000). Des sporozoïtes désenkystés ne sont donc pas forcément en mesure d'infecter un organisme-hôte.

D'autre part, Neuman *et al.* ont prouvé que des parasites estimés non viables par désenkystement *in vitro* étaient en revanche capables d'infecter des souris-nées (Neumann *et al.*, 2000), résultats confirmés par l'équipe de Hou *et al.* (Hou *et al.*, 2004).

En outre, les tests de coloration avec le SYTO®-9 et le SYTO®-59 n'ont pas pu être complètement corrélés avec le titre infectieux de l'échantillon (Belosevic *et al.*, 1997).

Enfin, Jenkins *et al.* ont montré qu'il existe des différences significatives entre des tests d'infection sur des souris et des tests de viabilité par hybridation *in situ*, par RT-PCR et par quantification d'amylopectine (Jenkins *et al.*, 1997). En l'occurrence, les tests par hybridation *in situ* tendent à surestimer les risques d'infection réels observés sur les souris. En revanche, la quantification d'amylopectine et le test de RT-PCR les sous-estiment. En effet, des oocystes considérés donc comme non viables car présentant de très faibles quantités d'amylopectine ou de l'acide ribonucléique messager (ARNm) ciblé par le test de RT-PCR sont capables d'induire l'infection chez la souris. Ces tests de viabilité ne sont pas non plus suffisants pour estimer la dangerosité réelle d'un échantillon.

En conclusion, la capacité d'un oocyste à se désenkyster ou la présence de sporozoïtes ne sont automatiquement pas synonymes de danger, car ceux-ci doivent encore être capables d'infecter la cellule-hôte. Des analyses plus poussées sur le *Cryptosporidium* sont donc nécessaires pour se rapprocher du risque réel.

1.2.3 Virulence

1.2.3.1 Définition

La virulence d'un pathogène se définit non seulement par rapport au pathogène en lui-même mais également par rapport à l'hôte qu'il infecte. Plus précisément, la virulence désigne la propriété d'un pathogène à endommager un hôte, mais cette propriété est modulée par la résistance et la susceptibilité de cet hôte (Bouزيد *et al.*, 2013; Casadevall et Pirofski, 1999). Les termes de pathogénicité et de virulence sont souvent utilisés de façon interchangeable. Leur différence réside dans le fait que la pathogénicité est uniquement employée pour désigner la capacité d'un pathogène à induire une maladie (et donc infliger des dégâts) à un hôte tandis que la virulence peut désigner le degré de pathogénicité. La pathogénicité est donc un critère qualitatif tandis que la virulence est un critère quantitatif.

La virulence se caractérise par un ensemble de facteurs génétiques du pathogène qui vont lui permettre de créer des atteintes sur l'hôte (Okhuysen et Chappell, 2002). Dans le cas du *Cryptosporidium*, 25 sont identifiés à l'heure actuelle et sont impliqués au niveau du désenkystement, de la mobilité des sporozoïtes sur les cellules hôtes, de leur attachement, de leur invasion, de la formation de la vacuole parasitophore (cf. 2.3.1.1), de la maintenance intracellulaire et des dommages causés à la cellule hôte (Bouزيد *et al.*, 2013).

Les facteurs de virulence permettent également de comprendre les degrés de sévérité entre différentes infections. Les symptômes observés cliniquement peuvent en effet être inexistantes ou inversement correspondre à une maladie sévère engageant le pronostic vital du (de la) patient(e) (Chalmers et Davies, 2010). De même, des essais d'infection au *Cryptosporidium parvum* menés sur des humains volontaires ont montré des différences de niveau de virulence selon la souche du parasite ingérée (Okhuysen *et al.*, 1999).

1.2.3.2 Techniques et outils d'analyse

La première technique employée pour déterminer les facteurs génétiques de virulence consistait à utiliser des anticorps adéquats et d'effectuer les analyses avec une approche immunohistologique (Perryman *et al.*, 1996).

Cette technique a aujourd'hui été remplacée par une autre plus simple, consistant à déterminer la présence ou l'expression de gènes codant les facteurs de virulence par une approche biomoléculaire (PCR ou RT-PCR), combinée ou non à une méthode quantitative. De nombreux exemples peuvent être trouvés dans la revue de Bouزيد *et al.* (Bouزيد *et al.*, 2013).

1.2.3.3 Limites de l'analyse

Tout d'abord, la plupart des facteurs de virulence identifiés pour le *Cryptosporidium* restent putatifs (Bouزيد *et al.*, 2013). En effet, la virulence étant dépendante de l'hôte et notamment de son système immunitaire, la caractérisation de ses facteurs demeure difficile.

Concernant la virulence, Edberg statuait que la présence de facteurs de virulence était une condition nécessaire mais pas suffisante pour induire une maladie, qui reste un phénomène phénotypique (Edberg, 2009). Autrement dit, connaître la virulence d'un parasite ne permet pas de conclure sur sa capacité effective à générer la maladie.

En conclusion, la virulence permet de connaître le risque potentiel vis-à-vis de la santé humaine représenté par un parasite mais pas le risque réel. Ainsi, même en utilisant des méthodes permettant

d'obtenir des informations à l'échelle du gène, il est aujourd'hui impossible d'analyser de façon précise l'effet du *Cryptosporidium* sur un organisme-hôte en considérant le parasite de manière isolée.

1.2.4 Infectivité

1.2.4.1 Définition

L'infectivité désigne la capacité d'un échantillon d'un organisme pathogène à produire une infection. *In vivo*, elle se détermine en quantifiant le nombre d'animaux développant une maladie pour une dose de pathogène donnée (Benamrouz *et al.*, 2012). *In vitro*, elle se définit à partir du nombre de formes infectieuses observés sur des cultures cellulaires par rapport à un témoin (King *et al.*, 2011).

Contrairement aux autres niveaux d'analyse, l'infectivité ne se définit donc pas par rapport au parasite uniquement mais à partir de l'infection de cellules-hôtes, par une approche *in vivo* ou *in vitro*.

1.2.4.2 Techniques et outils d'analyse

❖ *In vivo*

Encore aujourd'hui, l'approche *in vivo* est considérée comme un standard de référence de l'évaluation de l'infectivité du *Cryptosporidium*. Elle est par exemple employée pour mesurer la diminution du pouvoir infectieux voire l'inactivation d'un échantillon suite à un traitement désinfectant (Finch *et al.*, 1993; Korich *et al.*, 1990).

Bien que quelques expériences sur des êtres humains volontaires aient été menées (Chappell *et al.*, 2006; DuPont *et al.*, 1995; Okhuysen *et al.*, 1999), la plupart des tests d'infectivité s'effectuent sur un modèle animal. Parmi les mammifères employés, nous pouvons citer le macaque (Miller *et al.*, 1990), le hamster (Kim, 1987), le cobaye (Angus *et al.*, 1985), l'agneau (Tzipori *et al.*, 1982), les cochons (Tzipori *et al.*, 1981), l'opossum (Lindsay *et al.*, 1988) mais le plus usité reste la souris. Les modèles de référence de tests d'infectivité correspondent ainsi à des souris néonatales de type BALB/c (Jenkins *et al.*, 2002), C57BL-6 (Waters *et al.*, 1997) ou CD-1 (Finch *et al.*, 1993) et des souris adultes immunodéprimées génétiquement et/ou par voie chimique (Certad *et al.*, 2007; Rasmussen et Healey, 1992).

La mesure d'infectivité consiste alors à quantifier le nombre de formes infectieuses observées dans l'intestin (Finch *et al.*, 1993) ou dans les selles (Hikosaka *et al.*, 2005) par microscopie à contraste interférentiel (DIC) ou par microscopie à fluorescence suite à un marquage. Des approches histologiques sont également employées pour déterminer le nombre de cellules infectées ou les lésions induites par le parasite (Fayer et Ellis, 1993). En termes de sensibilité, il est possible d'évaluer l'infectivité d'un seul oocyste infectieux sur un modèle de souris adultes immunodéprimées (Yang *et al.*, 2000).

❖ *In vitro*

Sous certaines conditions, les cellules d'un organisme peuvent être isolées et continuer à pousser après avoir été déposées sur un substrat adéquat, tel une boîte de Petri ou un puits de culture, dans un environnement adapté. Cette pratique, la culture cellulaire *in vitro*, est vieille de plus d'un siècle (Harrison, 1906) et est utilisée pour étudier le comportement des cellules représentant une alternative, idéalement un remplacement, aux expérimentations animales.

C'est en 1984 que des formes infectieuses du *Cryptosporidium parvum* ont été observées pour la première fois *in vitro* sur des cultures cellulaires (Woodmansee et Pohlenz, 1984). Depuis, de nombreuses études ont été réalisées afin de trouver le protocole et les cellules-hôtes permettant au *Cryptosporidium parvum* de se

développer au mieux (Arrowood, 2002). Cette pratique présente par rapport à l'approche *in vivo* les avantages d'être moins coûteuse et de pouvoir délivrer des résultats sous 48-72 h. Une étude comparant plusieurs lignées cellulaires à montrer que les cellules HCT-8 (issues d'un adénocarcinome iléocœcal humain) sont celles supportant le plus d'étapes de développement du parasite (Upton *et al.*, 1994).

L'évaluation de l'infectivité la plus simple consiste à compter le nombre de foyers infectieux du *Cryptosporidium* sur une culture cellulaire suite à un marquage immunofluorescent (Schets *et al.*, 2005; Slifko *et al.*, 1997). Cette méthode permet, tout comme le modèle de souris, d'atteindre une sensibilité d'un unique oocyste infectieux et est également peu sujette au développement de faux positifs (Johnson *et al.*, 2012). En outre, il a été montré que les résultats obtenus par cette approche *in vitro* sont comparables avec ceux obtenus *in vivo* avec le modèle de souris néonatales de type BALB/c (Slifko *et al.*, 2002).

Au regard du potentiel de cette technique, de nombreuses études se sont penchées sur l'amélioration de son protocole à différents niveaux :

- Cellules-hôtes : développement de cultures primaires d'entérocytes humains (Castellanos-Gonzalez *et al.*, 2013) et de modèles organoïdes (i.e. tissu en trois dimensions) basés sur les cellules HCT-8 (Warren *et al.*, 2008).
- Stimulation des oocystes : mise en évidence des effets de sels biliaires et de taurocholate de sodium (King *et al.*, 2012).
- Dépôt des oocystes : ajout d'une étape de centrifugation pour accélérer le contact des oocystes avec les cellules-hôtes (King *et al.*, 2011).
- Incubation : amélioration du milieu de culture (Keegan *et al.*, 2003; Upton *et al.*, 1995).

D'autres tests d'infectivité couplant l'infection du *Cryptosporidium in vitro* sur des cultures cellulaires et des approches biomoléculaires par PCR (LeChevallier *et al.*, 2003) et RT-PCR (Rochelle *et al.*, 1997) ont également été développées. Tout comme le modèle animal, cette stratégie se révèle être sensible jusqu'à évaluer l'infectivité d'un unique oocyste (Johnson *et al.*, 2012; Rochelle *et al.*, 1997). Les résultats entre les deux méthodes sont par ailleurs similaires. Ainsi, des résultats équivalents ont été observés entre des cultures cellulaires HCT-8 infectées puis testées par RT-PCR et le modèle de souris néonatales CD-1 en termes de sensibilité, de relations dose-réponse et de variabilités entre les répliques (Rochelle *et al.*, 2002). Les mêmes résultats ont été obtenus avec des cellules HCT-8 infectées et testées par PCR quantitative (Garvey *et al.*, 2010; King *et al.*, 2005).

D'autres tests d'infectivité ont été réalisés sur des cultures cellulaires par hybridation *in situ*, qui permet de marquer l'ensemble des formes infectieuses du *Cryptosporidium* (Rochelle *et al.*, 2001) et de s'affranchir de l'utilisation d'un microscope à fluorescence en utilisant une réaction enzymatique à base de phosphatase alcaline. Plus de détails sur ces techniques d'analyses moléculaires peuvent être trouvés dans la revue de Kothavade (Kothavade, 2012).

1.2.4.3 Limites de l'analyse

❖ *In vivo*

Tout d'abord, les tests *in vivo* soulèvent la problématique de l'éthique quant à l'expérimentation animale. Celle-ci se doit dans la mesure du possible d'être remplacée par des alternatives *in vitro*.

En outre, l'expérimentation animale génère des coûts importants au niveau de la mise à disposition et de l'entretien d'une animalerie en niveau de confinement L2 en raison de la classification du *Cryptosporidium* en tant qu'agent pathogène pour l'homme. L'expérimentation en elle-même représente également un coût financier élevé, sans compter le délai de traitement des résultats (de l'ordre de la semaine), un coût en temps synonyme de frein à l'innovation.

Par ailleurs, en raison du faible nombre d'oocystes disponibles dans un échantillon, la dose infectieuse se révèle parfois insuffisante pour induire la maladie.

D'autre part, il existe un problème de reproductibilité important, les résultats d'infection pouvant être très variables d'une expérience à une autre, particulièrement dans celles impliquant des souris néonatales (Bukhari *et al.*, 2000).

Enfin, le problème de la spécificité peut également être évoqué, sachant que certaines espèces du *Cryptosporidium* infectieuses pour l'Homme ne peuvent être testées sur la souris car elle n'y est pas susceptible (Widmer *et al.*, 2000).

❖ *In vitro*

Les approches *in vitro* de l'évaluation de l'infectivité du *Cryptosporidium* ne sont pas non plus dénuées de défauts de reproductibilité. Intrinsèquement, il est souvent difficile voire impossible de standardiser un tapis cellulaire et d'importantes variabilités peuvent être observées suivant les expérimentations et les laboratoires dans lesquels elles sont menées.

De plus, un tapis cellulaire présente une forte hétérogénéité, certaines cellules étant plus âgées que d'autres et plus ou moins susceptibles à l'infection au *Cryptosporidium* (Fayer, 1997).

Concernant le protocole d'infection, il existe également une limitation liée au dépôt des oocystes sur le tapis cellulaire. En effet, ceux-ci possèdent une faible vitesse de sédimentation ($1\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Searcy *et al.*, 2005)) et sont susceptibles de désenkyster avant d'atteindre le tapis. Or le désenkystement est énergivore et sachant que les sporozoïtes ont besoin d'énergie pour se déplacer sur les cellules (vitesse de déplacement = 1 à $5\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Wetzel *et al.*, 2005), seuls ceux se trouvant à proximité d'une cellule cible auront une forte probabilité d'infection (King *et al.*, 2011).

En ce qui concerne les tests d'infectivité du *Cryptosporidium* combinant cultures cellulaires et analyses par PCR et RT-PCR, il a été montré que celles-ci produisent des faux positifs tandis que le marquage par immunofluorescence est certes robuste mais également chronophage (tout comme les analyses par PCR et RT-PCR) et mobilise un personnel expérimenté (Johnson *et al.*, 2012). Cet aspect chronophage vient du fait qu'il est nécessaire d'effectuer une étape de révélation (immunomarquage, hybridation de sondes, amplification de gènes cibles) comprenant de longues manipulations et périodes d'incubations. En outre, les observations, identifications et comptages au microscope se révèlent aussi coûteux en temps.

Par ailleurs, en raison de la nature même des techniques employées consistant à tuer et fixer les cellules, aucune de ces méthodes ne permet un suivi continu de l'infection sur une longue durée.

Enfin, et contrairement aux analyses liées à la détection, au comptage, à la viabilité ou à la virulence, ces tests d'infectivité ne peuvent pas être adaptés au criblage haut-débit. Depuis les années 2000 (Drews, 2000), ces techniques, qui consistent à automatiser des tests sur un grand nombre de zones de culture à l'aide d'un robot plutôt que manuellement avec une pipette, sont en plein essor, notamment dans l'industrie pharmaceutique. Or toutes les techniques *in vitro* comprennent une part importante de travail manuel ne permettant ni automatisation ni parallélisation du protocole, empêchant ainsi l'application au criblage haut-débit, pourtant nécessaire pour trouver des thérapies efficaces contre l'infection au *Cryptosporidium*.

1.2.5 Conclusion

En conclusion, contrairement aux autres analyses, qui restent des estimations de la dangerosité réelle d'un échantillon de *Cryptosporidium*, l'infectivité caractérise la capacité effective d'un parasite à induire une maladie. En effet, elle mobilise l'emploi de cellules-hôtes et l'observation directe de leur infection. Malgré les limites intrinsèques du modèle *in vivo* de la souris ou de cultures *in vitro* vis-à-vis du modèle humain, nous demeurons au plus proche de l'effet réel d'un parasite après son ingestion.

Les approches *in vivo* possèdent des coûts très importants en temps, argent et personnels, sans compter les problématiques liées à l'éthique qu'elles soulèvent. C'est pourquoi de nombreuses études *in vitro* ont été menées. Du fait que les techniques basées sur la PCR et RT-PCR produisent de faux positifs, les techniques basées sur le marquage immunofluorescent sont plus fiables et offrent des résultats similaires au standard de référence qu'est le modèle animal.

Néanmoins, cette technique comprend une part prédominante de travail manuel lié notamment au marquage des cellules, empêchant ainsi l'automatisation et la parallélisation des mesures, critères nécessaires à l'application d'analyses en criblage haut-débit. En outre, les étapes de fixation font qu'il est impossible de suivre en continu l'infection des cellules.

Ainsi, il existe un besoin réel d'outils permettant de mesurer *in vitro*, sur une longue durée, en continu et sans marquage l'infectivité du *Cryptosporidium* sur des cellules-hôtes.

1.3 Techniques de mesures en continu et sans marquage des évolutions morphologiques de cultures cellulaires

1.3.1 Préambule

L'expérimentation animale dans le domaine de la santé soulève des problématiques dans de nombreux domaines : éthique, coûts en argent (infrastructures, personnels qualifiés, expérimentation) et en temps (expérimentation, analyse des résultats), reproductibilité des résultats. Les expériences *in vitro* sur des cultures cellulaires proposent une alternative à ces expériences *in vivo* et visent à terme à les remplacer. Celles-ci ont déjà été comparées aux expérimentations *in vivo* avec une corrélation plus ou moins élevée dans le cadre de tests de cytotoxicité (Sayes *et al.*, 2007), de l'évaluation de l'efficacité d'une drogue (Wienkers et Heath, 2005), de l'infectivité d'un micro-organisme (Rochelle *et al.*, 2002) ou encore de l'effet d'une drogue sur l'infection d'un micro-organisme (Mele *et al.*, 2003). Elles représentent donc un moyen fiable pour les pouvoirs décisionnels dans le but de définir des protocoles de protection ou d'utilisation vis-à-vis de ces substances toxiques et de ces micro-organismes.

Aujourd'hui, les techniques d'analyse les plus utilisées en routine sont les observations au microscope à contraste interférentiel ou à fluorescence après une étape de marquage fluorescent, les analyses biomoléculaires (PCR, RT-PCR) et l'hybridation *in situ*. Or, ces techniques sont particulièrement chronophages, autant en ce qui concerne la préparation des cellules à analyser, par exemple l'étape de marquage, que l'analyse en elle-même. Elles requièrent également une part importante de travail manuel, empêchant toute automatisation d'analyse. En outre, elles ne permettent pas des analyses en continu car les cellules doivent être tuées et fixées. Enfin, les mesures ne peuvent être automatisées ou parallélisées donc ces techniques se révèlent inadaptées au criblage haut-débit.

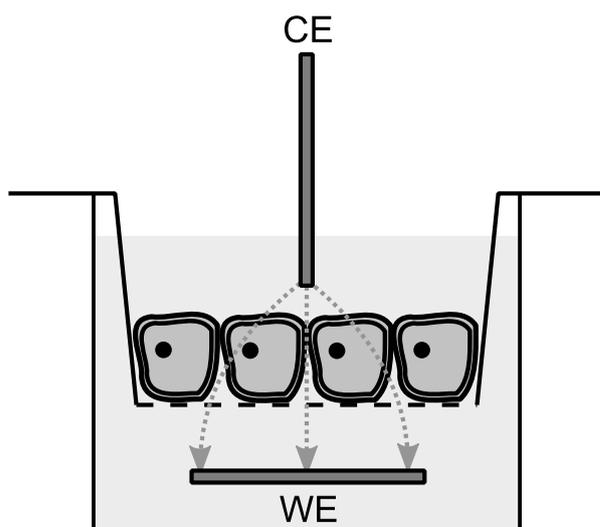


Figure 1.6 : Schéma représentant la mesure de la TEER. Les flèches en pointillés correspondent au trajet du champ électrique. WE et CE désignent respectivement l'électrode de travail et la contre-électrode.

Depuis de nombreuses années, une autre technique a trouvé sa place dans les laboratoires de biologie. Il s'agit de la mesure de la Résistance Electrique TransEpithéliale (TEER), introduite en 1951 par Ussing et Zerahn (Ussing et Zerahn, 1951). Le principe consiste à séparer verticalement un puits de culture en deux parties avec une membrane poreuse, sur laquelle les cellules sont cultivées (figure 1.6). Deux électrodes, placées de part et d'autre de cette membrane, génèrent un courant continu, dont le trajet sera perturbé par la résistance électrique du tapis cellulaire. Il est ainsi possible d'en mesurer la conductivité électrique, qui sera influencée par les changements morphologiques subis par le tapis, par exemple suite à l'ajout d'une substance chimique ou à l'infection par un micro-organisme. Plus de détails sur cette technique peuvent être trouvés dans la revue de Günzel *et al* (Günzel *et al*, 2012). En ce qui

concerne les micro-organismes, il est à noter que cette technique a déjà été utilisée pour étudier l'effet du *Cryptosporidium* (Roche *et al.*, 2000) et de *Giardia* (Maia-Brigagão *et al.*, 2012) sur des cellules en culture. Cette méthode présente l'avantage d'être sans marquage et non-destructive dans le cas de mesures effectuées ponctuellement. En revanche, pour des mesures en continu, les électrodes de métal présentent un risque d'électrolyse, i.e. de se décomposer chimiquement sous l'effet du courant continu qui les traversent. Les substances chimiques résultantes peuvent être cytotoxiques et donc contaminer les cellules. En outre, les systèmes de mesure de la TEER, dont le Millicell® ERS-2 commercialisés par Millipore qui fait aujourd'hui figure de référence, nécessitent de plonger manuellement une électrode dans le puits de culture, empêchant là aussi une automatisation des mesures.

Afin de pallier ces inconvénients, le développement de techniques sans marquage permettant des mesures continues (donc non destructives) sur une longue durée a été étudié. Le but de cette partie est de présenter les principales techniques utilisées et d'expliquer pourquoi notre choix dans cette thèse s'est porté sur la bioimpédance. Elle comprendra également un tableau récapitulatif des avantages et inconvénients de ces techniques quant à l'analyse continue et sans marquage des évolutions morphologiques de cultures cellulaires et leur adaptabilité pour des criblages haut-débit.

1.3.2 Présentation des techniques

1.3.2.1 Approche acoustique : Microbalance à Cristal de Quartz (QCM)

❖ Description et application aux cultures cellulaires

L'approche acoustique la plus développée est la Microbalance à Cristal de Quartz (QCM). Cette technique consiste à étudier la monocouche d'un matériau, par exemple un tapis cellulaire, recouvrant une fine lame de quartz en forme de disque, dont les faces supérieures et inférieures sont recouvertes d'un film d'or jouant le rôle d'électrodes. Cette méthode permet d'obtenir des informations telles que la masse et la viscoélasticité (liée à la dissipation d'énergie) du matériau déposé.

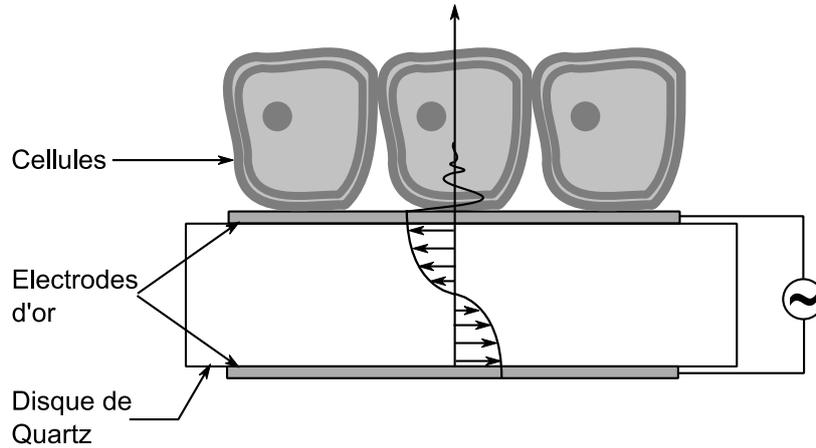


Figure 1.7 : Illustration d'une mesure par QCM sur des cellules. Les électrodes générant un champ électrique alternatif induisent la propagation d'une onde acoustique dans le quartz (flèches) qui se prolonge dans la cellule sur une hauteur donnée.

Le principe physique sous-jacent exploite les propriétés piézoélectriques du quartz. En appliquant un potentiel alternatif aux électrodes, une onde acoustique se propage dans le disque de quartz et induit une déformation mécanique sous forme de cisaillement dans une direction parallèle aux électrodes, telle que l'illustre la figure 1.7. Cette déformation s'effectue à la fréquence de résonance du quartz. Or cette dernière se révèle très sensible aux changements de masse, de sorte que les évolutions morphologiques du matériau déposé peuvent être observées à travers les variations de la fréquence de résonance. De manière plus précise, une légère augmentation de la masse induit une diminution de cette fréquence, avec une sensibilité de l'ordre du nanogramme pour une monocouche de matériau homogène. Cet effet a été modélisé par Sauerbrey (Sauerbrey, 1959), qui a élaboré l'équation du même nom :

$$\Delta f = \frac{-2f^2}{A\rho c} \Delta m \quad (1.1)$$

- Avec :
- Δf : variations de la fréquence de résonance (Hz).
 - Δm : variations de la masse du matériau déposé (kg).
 - f : fréquence de résonance du quartz (dépendante de sa coupe) (Hz)
 - ρ : masse volumique du quartz (kg.m^{-3})
 - A : aire de recouvrement des électrodes (m^2)
 - c : célérité d'une onde acoustique dans cette coupe du quartz (m.s^{-1})

Cette approche par QCM peut être employée pour suivre en continu des phénomènes cellulaires *in vitro* car elle est non-invasive, possède une résolution temporelle élevée et peut être utilisée en phase liquide. Ainsi, l'attachement et la prolifération de cellules adhérentes ont pu être mesurés par cette technique (Redepenning *et al.*, 1993; Wegener *et al.*, 1998). Ces études ont montré que la fréquence de résonance du système diminue à mesure que les cellules recouvrent la surface de l'électrode, permettant ainsi de caractériser le tapis cellulaire.

❖ Avantages

Concernant le suivi non-invasif continu de la morphologie d'une culture cellulaire, cette technique offre plusieurs avantages. Outre la sensibilité précédemment évoquée, l'approche par QCM offre une grande flexibilité, dans la mesure où l'électrode peut être recouverte par n'importe quel type de cellules. Ainsi, Wegener *et al.* ont réalisé des suivis de croissance de différents types de cellules et ont pu mettre en plus en évidence le caractère spécifique du système (Wegener *et al.*, 1998). En effet, le décalage de

fréquence observé entre le moment où l'inoculum est introduit et celui où les cellules ont recouvert toute la surface est dépendant du type de cellules testées.

Enfin, cette technique peut être combinée à une approche électrique afin de mesurer l'impédance du résonateur et d'obtenir une analyse plus détaillée du matériau considéré (Yang et Thompson, 1993).

❖ Inconvénients

Le principal défaut de cette technique réside dans la faible profondeur de pénétration de l'onde acoustique dans le tapis cellulaire. En effet, Wegener *et al.* ont mesuré les variations de la fréquence de résonance lors d'une croissance cellulaire suivant la taille de l'inoculum de départ (Wegener *et al.*, 1998). Or la variation diminuait à mesure que la taille de l'inoculum augmentait et ce jusqu'à un certain seuil. Ce résultat met en évidence que seules les cellules en contact direct avec le résonateur contribuent aux variations de la fréquence de résonance. Le système est donc aveugle aux phénomènes se déroulant au niveau de la zone apicale du tapis cellulaire, c'est-à-dire la partie supérieure de la membrane des cellules (Wegener *et al.*, 2000b). Il est donc impossible d'obtenir des informations sur la morphologie du tapis à ce niveau.

En outre, cette technique ne peut à l'heure actuelle être adaptée à un criblage haut-débit car elle offre des possibilités de parallélisation limitées. Il n'existe d'ailleurs à notre connaissance pas de systèmes commerciaux offrant des possibilités d'analyses multiplexées de culture cellulaires par QCM.

Enfin, la relation linéaire de Sauerbrey liant les variations de fréquence de résonance et celles de masse du matériau adsorbé n'est pas valable pour les cellules car il s'agit de corps viscoélastiques. Ainsi, les variations de masse peuvent être imputées à des variations viscoélastiques, provenant par exemple des micromécaniques cellulaires. Or, la fréquence de résonance est un paramètre intégral ne faisant pas de distinction entre les contributions de la masse et celles des variations viscoélastiques (Kanazawa et Gordon, 1985). Des extensions de l'approche par QCM ont été élaborées afin de fournir un meilleur niveau d'informations (Rodahl *et al.*, 1997) en introduisant un paramètre correspondant au ratio entre l'énergie dissipée et celle stockée élastiquement pendant une période d'oscillation du résonateur. Ceci permet de mieux distinguer ces deux contributions. L'analyse des résultats reste néanmoins difficile avec cette approche.

1.3.2.2 Approche optique : Résonance de Plasmons de Surface (SPR)

❖ Description et application aux cultures cellulaires

L'approche optique la plus utilisée pour suivre en continu et de manière non-invasive l'évolution morphologique d'un tapis cellulaire est basée sur la Résonance de Plasmons de Surface (SPR). L'objectif de cette technique consiste à étudier l'interface entre une surface solide conductrice (ex : électrode d'or) et un matériau déposé à sa surface (ex : tapis cellulaire) ou un milieu liquide (ex : milieu de culture) à l'aide de plasmons de surface.

Les plasmons sont des ondes électriques évanescentes produites par l'interaction de photons émis par une source lumineuse avec des électrons libres d'une surface conductrice. Cet effet peut être comparé aux ondes créées dans l'eau après avoir déposé une bouée à sa surface, ondes qui s'atténuent avec la distance. La configuration des capteurs SPR la plus utilisée est la configuration Kretschmann (figure 1.8), du scientifique du même nom (Kretschmann, 1971). Celle-ci consiste à monter un prisme sous une surface conductrice et de l'éclairer avec une source lumineuse à un angle incident θ_i . Cet angle doit être égal ou plus grand que l'angle de réflexion interne totale du prisme afin que toute la lumière soit réfléchiée et qu'aucune portion ne soit transmise à travers la surface d'or. Cette réflexion induit la création de plasmons, i.e. un champ électrique évanescent le long de la surface d'or, qui provoque en conséquence la

diminution de l'intensité du rayon réfléchi à un angle appelé « angle de résonance plasmonique ». Lorsqu'une fine couche d'un matériau est adsorbée sur la surface, l'angle de résonance plasmonique et donc la réflectivité s'en trouveront modifiés, permettant ainsi de la caractériser.

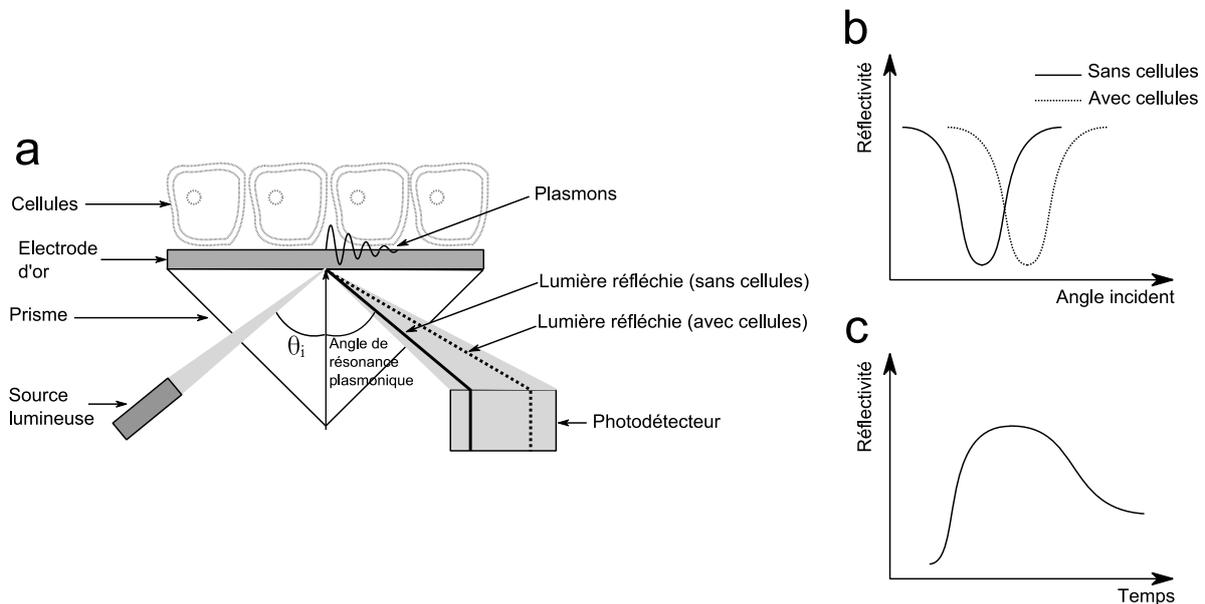


Figure 1.8 : Illustration d'un biocapteur SPR. a) Configuration de Kretschmann d'un capteur SPR appliqué à l'analyse d'un tapis cellulaire. Les plasmons sont créés suite à l'excitation d'électrons de la surface d'or par les photons de la source lumineuse et la lumière réfléchi est captée par un photodétecteur. Une partie de la lumière incidente est donc absorbée à un certain angle appelé « angle de résonance plasmonique », qui varie avec la présence (pointillés) ou non (traits pleins) de cellules. b) Evolution de la réflectivité captée par le photodétecteur en fonction de l'angle d'incidence de la source lumineuse. Le minimum observé correspond à l'angle de résonance plasmonique, qui varie suivant la présence (pointillés) ou non (traits pleins) des cellules. c) Evolution temporelle de la réflectivité à angle incident fixe.

Cette technique a depuis longtemps été utilisée pour étudier des interactions biomoléculaires, à propos desquelles plus d'informations peuvent être obtenues dans la revue de Homola *et al.* (Homola *et al.*, 1999). Son application à l'analyse de cultures cellulaires reste cependant récente (Robelek, 2009). Cette technique est particulièrement adaptée à leur étude car elle est non-invasive et ne nécessitent pas de marquage. De plus, il est possible de suivre en continu avec une haute résolution temporelle l'évolution de l'angle de résonance plasmonique (Yanase *et al.*, 2007b) et donc des phénomènes relatifs aux cellules. Elle est donc adaptée pour suivre l'évolution de tapis cellulaires sur une longue durée.

❖ Avantages

L'avantage principal de cette technique quant au suivi continu et non-invasif de la morphologie d'un tapis cellulaire est qu'elle peut apporter deux types d'information : temporelle et angulaire. Il est en effet possible d'étudier la réflectivité soit à une longueur d'onde constante et un angle d'incidence variable, soit à un angle d'incidence constant avec une source polychromatique sur une longue durée (Knoll, 1998). Cette réflectivité recouvre tous les phénomènes influençant le champ électrique évanescent induit par la réflexion de la lumière incidente. Ainsi, Yanase *et al.* ont montré une corrélation entre la force du signal SPR et la surface couverte par les cellules (Yanase *et al.*, 2007b) et ont étudié les différents phénomènes pouvant les lier (Yanase *et al.*, 2007a).

D'un point de vue spatial, il est possible d'étudier latéralement les différences de réflectivité et de convertir les images au microscope. Giebel *et al.* ont ainsi pu déduire la distance moyenne entre les différentes parties de cellules gliales de poisson et la surface de l'électrode (Giebel *et al.*, 1999). Le suivi temporel peut ainsi être combiné avec un suivi optique.

Enfin, il existe des systèmes commerciaux, comme le Biacore T200 commercialisé par la société du même nom, compatibles avec des systèmes comprenant 96 ou 384 puits de culture. Ceci montre que les possibilités de parallélisation existent et seront vraisemblablement amenées à se développer en vue d'applications au criblage haut-débit.

❖ Inconvénients

Néanmoins, tout comme l'approche par QCM, le principal défaut des analyses SPR réside dans la faible hauteur de pénétration du champ évanescent lorsque la longueur d'onde de la source lumineuse utilisée est dans la lumière visible, ce qui est le cas de la plupart des systèmes. La profondeur de champ est en effet dans ces conditions d'environ 200nm (Steyer et Almers, 2001). Or, à cette distance, seulement la lame basale inférieure de la cellule est sondée. Certes, des informations relatives par exemple à l'interaction entre la surface et la cellule, aux changements au niveau de la surface d'adhésion voire sur le cytosquelette peuvent en être extraites (Fang, 2006; Robelek et Wegener, 2010). Cependant, aucune information ne peut être obtenue sur la morphologie du tapis au niveau de la zone apicale.

Golosovsky *et al.* ont proposé de pallier cet inconvénient en remplaçant la source lumineuse dans le domaine du visible par des rayonnements infra-rouges (Golosovsky *et al.*, 2009). La profondeur de pénétration du champ évanescent étant proportionnelle à la longueur d'onde du rayonnement incident, utiliser un rayonnement infrarouge permet de la faire augmenter jusqu'à 2,5 μ m. Ils ont ainsi accédé à des informations invisibles avec la méthode précédente, par exemple des différences de réponse indiquant plusieurs phases dans l'adhésion cellulaire (contact initial entre les cellules et le substrat, étalement des cellules, formation de contacts intercellulaires et génération d'amas de cellules). Malgré tout, les cellules épithéliales étant d'une hauteur comprise entre 5 et 10 μ m environ (Van Driessche *et al.*, 1993; Xiaoqi Huang *et al.*, 2004), certains phénomènes apparaissant au niveau de la zone apicale demeurent transparents.

Enfin, la réflectivité est un paramètre intégral, reflétant la contribution de nombreux phénomènes. Ceux-ci sont, par cette approche, difficiles à différencier, compliquant ainsi l'interprétation des résultats.

1.3.2.3 Approche électrique : Spectroscopie d'Impédance Electrique (EIS)

❖ Description et application aux cultures cellulaires

La Spectroscopie d'Impédance Electrique (EIS) ou impédancemétrie est une technique sans marqueur permettant de sonder les propriétés diélectriques d'un matériau en le soumettant à un champ électrique. Il s'agit également d'une technique non-invasive car le champ est créé en appliquant une tension alternative de faible amplitude, autorisant ainsi les suivis sur une longue durée.

Le terme « impédance » a pour origine le verbe anglais « to impede » qui signifie « gêner » ou « ralentir », verbe qui dérive lui-même du latin « *impedire* » qui a pour sens « entraver ». Ainsi, l'impédance d'un matériau se définit par sa capacité à perturber voire bloquer un champ électrique. Un matériau est constitué d'atomes, eux-mêmes constitués d'un noyau de neutrons (charges neutres) et de protons (charges positives) autour duquel gravitent des électrons (charges négatives). Le champ électrique étant un déplacement de charges, un matériau est désigné comme « conducteur » électrique s'ils possèdent des charges suffisamment libres pour se déplacer dans celui-ci. A l'inverse, il est qualifié d'« isolant » électrique ou de « diélectrique » si ses charges ne peuvent pas se déplacer, le rendant incapable de laisser passer un

courant électrique. Par application d'une tension continue, seuls les matériaux conducteurs peuvent être sondés par le champ unidirectionnel induit car celui-ci ne peut se propager dans les matériaux isolants. La valeur mesurée se nomme alors « résistance ». En revanche, utiliser une tension alternative, induisant un champ bidirectionnel, permet de sonder les matériaux isolants en plus des conducteurs du fait d'une propriété appelée « relaxation diélectrique ». Nous mesurons dans ce cas « l'impédance » du matériau. Plus d'explications sur ce principe peuvent être trouvées dans le chapitre 2 (cf. 2.2).

Une attention particulière s'est portée depuis quelques dizaines d'années sur l'application de cette technique aux analyses de cultures cellulaires *in vitro*. En effet, les membranes des cellules influencent un champ électrique de la même manière que le fait un matériau diélectrique tandis que d'autres éléments comme le cytoplasme et les jonctions intercellulaires s'apparentent à un matériau conducteur doté d'une certaine résistance (voir chapitre 2 à la partie 2.4.4.4 pour plus de détails). Ivar Giaever et son collègue Charles R. Keese ont été les pionniers de ces mesures en cultivant des cellules sur des microélectrodes planaires au fond de boîte de Pétri et en les mesurant par l'application d'une tension alternative de faible amplitude mais à plusieurs fréquences (Giaever et Keese, 1984). Les microélectrodes planaires sont des électrodes (généralement d'or) dont les dimensions d'intérêt sont de taille micrométrique, donc du même ordre de grandeur que les cellules, généralement fabriquées sur un substrat de verre. Le système de Giaever et Keese consiste à cultiver des cellules dans une boîte de Pétri, dont la surface comprend une électrode de travail couvrant $0,0005\text{cm}^2$ entourée d'une contre-électrode de $0,15\text{cm}^2$. La surface de l'électrode de travail étant 300 fois inférieure à celle de la contre-électrode, l'impédance totale du système sera déterminée par celle de l'électrode de travail (figure 1.9a). Ainsi, il fut montré que l'impédance augmente au fur et à mesure que la surface couverte par les cellules sur cette électrode augmente, ceci pouvant être prédit par un modèle mathématique développé par la suite (Giaever et Keese, 1991). Des fluctuations du signal furent également observées et corrélées à des mouvements au niveau d'une cellule unique (De Blasio *et al.*, 2004). Ce système fut par la suite nommé Electrical Cell-Substrate Impedance (ECIS) et commercialisée par la société Applied Biophysics Inc.

De nombreux systèmes s'inspirant de cette innovation furent par la suite élaborés (Spegel *et al.*, 2008). Parmi ceux-ci, Ehret fut le premier à développer en 1997 un système basé sur un Réseau d'Electrodes Interdigitées Planaires (REIP), couvrant toute la surface de culture (figure 1.9b) (Ehret *et al.*, 1997). Par rapport à des électrodes classiques, celles-ci présentent l'avantage d'augmenter la surface de contact entre la couche sensible, ici les cellules, et le signal électrique mesuré. Il est ainsi possible de suivre de manière homogène l'évolution d'une culture cellulaire, contrairement au système initial de Giaever qui ne mesurait qu'une partie de cette surface. Ces systèmes, et d'autres similaires, ont prouvé leur robustesse dans le suivi de nombreux phénomènes cellulaires : comme l'adhésion et la prolifération (Atienza *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2008; Wegener *et al.*, 2000a), la confluence (De Blasio *et al.*, 2004), l'apoptose suite à des traitements chimiques (Arndt *et al.*, 2004; Meissner *et al.*, 2011; Solly *et al.*, 2004), l'infection par un virus (Cho *et al.*, 2007; Kiilerich-Pedersen *et al.*, 2011; McCoy et Wang, 2005) ou la différenciation de cellules souches (Bagnaninchi et Drummond, 2011).

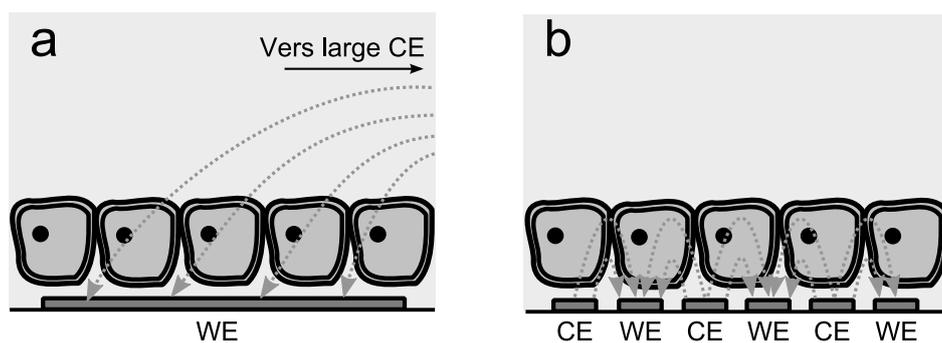


Figure 1.9 : Schémas représentant des cellules dans un milieu de culture, dont les propriétés électriques sont mesurées par les systèmes développés par Giaever (a) et Ehret (b). Les flèches en pointillé correspondent au trajet du champ électrique. WE et CE désignent respectivement les électrodes de travail et les contre-électrodes.

❖ Avantages

Contrairement à la mesure de la TEER, que nous avons décrit dans le préambule de cette partie (voir 1.3.1) et qui n'offre que des informations sur la résistance (les propriétés conductrices) du tapis cellulaire, l'impédancemétrie permet de sonder l'ensemble de ses propriétés diélectriques en faisant varier la fréquence de la tension alternative. En outre, cette tension alternative permet de contourner le problème d'électrolyse des électrodes lié à l'utilisation prolongée d'un courant continu, que nous avons également évoqué, et de suivre en temps réel l'évolution des cellules. L'EIS peut ainsi fournir des informations sur le tapis cellulaire suivant deux dimensions : fréquentielle et temporelle.

Les avantages de cette technique pour suivre en continu et sans marquage les évolutions morphologiques de cultures cellulaires sont nombreux. Tout d'abord, l'EIS possède les avantages des fabrications de la microélectronique : intégration et parallélisation aisée, automatisation des mesures et faibles coûts dans le cas de production en série. Ceux-ci se constatent par le nombre important de systèmes commerciaux offrant des possibilités d'analyse en parallèle sur 96 puits et plus. Ainsi, Solly proposait en 2004 le premier système d'analyse par impédancemétrie avec un format adapté au criblage haut-débit, dans des appareils comprenant 96 puits de culture, chacun tapissé de microélectrodes, avec le potentiel d'être miniaturisées en 384 et 1536 zones (Solly *et al.*, 2004). Ce système fut commercialisé sous le nom de RT-CES™ par la société ACEA Biosciences avant d'être renommé xCelligence et d'être également proposé par la société Roche Applied Sciences suite à un partenariat entre les deux entreprises. Les autres systèmes se sont depuis adaptés à ce standard, comme le système CellKey® commercialisé par la société MDS Sciex (Ciambrone *et al.*, 2004). De même, les systèmes développés par Giaever et Ehret sont maintenant proposés sous la forme de plaques de 96 puits, celui d'Ehret étant commercialisé par la société Bionas GmbH qu'il a lui-même fondée sous la marque Bionas Discovery™ adcon reader (Ceriotti *et al.*, 2007).

Un autre avantage réside dans la versatilité des mesures suivant la forme des électrodes. Par exemple, appliqué à la mesure d'objets biologiques, les REIP offrent de multiples avantages par rapport aux classiques électrodes de Giaever: augmenter le rapport signal/bruit (Varshney et Li, 2009) ; diminuer la contribution résistive du milieu de culture en diminuant la distance entre les électrodes par rapport à leur surface ; diminuer la taille de la contre-électrode et donc du système ce qui permet une intégration plus aisée dans un système de criblage haut-débit (Spegel *et al.*, 2008) ; augmentation de la reproductibilité des mesures en assurant un suivi spatial homogène. De même, Solly *et al.* proposent un autre motif d'électrodes interdigitées utilisant des doigts d'électrodes non plus rectangulaires mais composés de disques disposés les uns à côté des autres (Solly *et al.*, 2004). D'après leur étude, cette modification dans la

géométrie des électrodes leur permet d'augmenter la surface d'analyse et de couvrir jusqu'à 75% du tapis cellulaire. La forme des REIP influencent également la profondeur de pénétration du champ électrique, Gerwen *et al.* ayant montré qu'elle était directement dépendante du dimensionnement des doigts et de leur espacement (Van Gerwen *et al.*, 1998).

Pour finir, la modélisation par circuit électrique équivalent offre la possibilité d'isoler la contribution de chaque élément mesuré, facilitant ainsi l'interprétation des résultats (plus de détails peuvent être trouvés dans le chapitre 2 dans la partie 2.4).

❖ Inconvénients

Concernant les inconvénients de l'EIS par rapport au suivi continu de la morphologie de cultures cellulaires, le principal concerne l'interprétation physique des résultats, qui peut s'avérer problématique. Par exemple un tapis cellulaire étant fortement hétérogène, il ne correspond pas à un élément électrique idéal. Sa modélisation nécessite l'emploi d'un élément imaginaire appelé Élément à Phase Constante (CPE) dont l'interprétation est source de confusion et d'erreurs. Un autre exemple de cette difficulté d'interprétation réside dans le fait que différentes modélisations peuvent fournir un résultat similaire. Plus d'informations sur ces difficultés peuvent être trouvées dans le chapitre 2 (cf. 2.4.1).

En outre, si la forme des REIP est complexe, il est difficile d'estimer exactement ce qui est sondé et la profondeur de pénétration. Gerwen a en effet élaboré un modèle basé sur une forme relativement simple de REIP, avec un réseau carré et des électrodes droites (Van Gerwen *et al.*, 1998). En dehors de ce modèle, le champ électrique peut devenir hétérogène et les effets de bord non négligeables. Ces difficultés relatives à l'interprétation des résultats révèlent la nécessité de confirmer les résultats obtenus avec l'EIS avec d'autres mesures.

Pour finir, un autre inconvénient de l'EIS est relatif à la contribution d'éléments indésirables au signal qui viennent s'ajouter à celle des cellules que nous cherchons à analyser. Ainsi, leur impédance peut être trop faible par rapport à celles que représentent des éléments du montage comme les câbles, le circuit imprimé et les électrodes ou des phénomènes électrochimiques comme celui de la double couche électrique. Le système de mesure serait donc aveugle à l'évolution de la contribution des cellules.

1.3.3 Récapitulatif

En résumé, des efforts ont été effectués ces dernières années pour développer des techniques permettant un suivi en continu et sans marquage de la morphologie de cultures cellulaires. Parmi celles-ci, la QCM, la SPR et l'EIS sont celles montrant le plus de potentiel. Des analyses d'une plus large gamme de techniques peuvent être trouvées dans les revues de Michaelis *et al.* et de Ona et Shibata (Michaelis *et al.*, 2012; Ona et Shibata, 2010)

Les analyses par QCM peuvent être aisément combinées avec une approche électrique et apportent des réponses spécifiques aux cellules étudiés. Néanmoins, la faible profondeur de pénétration qu'elle offre tout comme les possibilités limitées de parallélisation représentent des limites importantes. L'interprétation des résultats peut certes se faire selon deux paramètres mais reste limitée.

La SPR quant à elle offre de meilleures possibilités de parallélisation, tout en permettant un suivi selon deux dimensions. Par ailleurs, de récents développements ont montré qu'elle peut être combinée à une observation microscopique. Tout comme la QCM cependant, la profondeur de pénétration est faible et les différentes contributions à la réponse sont regroupées dans un seul paramètre, limitant l'interprétation des résultats.

Enfin, l'EIS présente les avantages des fabrications microélectroniques : faibles coûts, simplicité de parallélisation et d'automatisation. Elle permet également, tout comme la SPR, un suivi des mesures suivant deux dimensions. Par ailleurs, contrairement aux deux autres techniques, la profondeur de pénétration ou la répartition du champ peuvent être modulées par la forme des électrodes, offrant alors une large gamme d'analyse. La difficulté par rapport à l'EIS est surtout liée à l'interprétation des résultats, que ce soit par rapport à l'identification physique des contributions ou de ce qui est réellement sondé. De même, l'évolution des cellules sondées peut être transparente par rapport aux contributions des éléments indésirables liés au montage ou à des phénomènes physico-chimiques.

En conclusion, afin de suivre les évolutions morphologiques de cultures cellulaires, l'EIS semble la technique la plus adaptée car elle n'est pas limitée dans sa profondeur de pénétration. Elle permet ainsi d'acquérir des informations sur les zones basales et sur les zones apicales d'un tapis cellulaire. Enfin, ses avantages de fabrication liés à la microélectronique sont multiples et avantageux à long terme dans une optique de criblage haut-débit.

Le tableau 1.1 résume les avantages et les inconvénients évoqués pour chaque technique.

	Avantages	Inconvénients
QCM	Non-invasive Sans marqueur Spécificité des réponses Combinaison avec suivi électrique aisée	Parallélisation très limitée Faible profondeur de pénétration Interprétation des résultats problématique
SPR	Non invasive Sans marqueur Suivi angulaire et temporel Combinaison avec suivi microscopique possible Parallélisation, automatisation	Faible profondeur de pénétration Interprétation des résultats très limitée (un seul paramètre)
EIS	Non invasive Sans marqueur Suivi fréquentiel et temporel Parallélisation, automatisation Versatilité des mesures suivant la forme des électrodes Faible coût	Interprétation des résultats problématique (utilisation d'élément électrique non standard, plusieurs modèles amènent à un même résultat) Contribution des autres éléments du montage

Tableau 1.1 : Récapitulatif des avantages et inconvénients des trois techniques majeurs pour suivre les évolutions morphologiques de cultures cellulaires en continu et sans marquage.

1.4 Stratégie de recherche

1.4.1 Définition de la problématique

Au cours de cette introduction, nous avons tout d'abord montré le danger que représente le protozoaire parasite *Cryptosporidium* pour l'Homme. Puis, nous avons justifié la nécessité de créer des outils afin d'évaluer le risque représenté par un échantillon, d'obtenir des informations intrinsèques sur son cycle de vie complexe et de tester l'efficacité de traitements thérapeutiques contre son infection. Puis, nous avons montré que l'infektivité est le niveau d'analyse de risque relatif au *Cryptosporidium* le plus proche de la réalité car elle quantifie directement l'effet réel du parasite sur les cellules-hôtes. Nous avons alors soulevé le besoin d'outils pour suivre *in vitro*, en continu et sans recourir à des étapes de fixation et/ou de marquage les procédés d'infection du parasite sur les cellules-hôtes afin d'accéder notamment en temps réel à l'infektivité. Enfin nous avons comparé les principales techniques d'analyse non-invasive et sans marquage de cultures cellulaires et en avons conclu que l'EIS est celle présentant le plus de potentiel pour suivre dynamiquement les évolutions morphologiques de ces cultures. Elle permet en effet d'obtenir des hauteurs d'analyse suffisantes pour sonder l'ensemble du tapis cellulaire ainsi que des possibilités d'intégration aisées en vue d'analyse par criblage haut-débit de molécules à visée thérapeutique contre l'infection par *Cryptosporidium*.

Notre problématique consiste alors à élaborer un système *in vitro* pour suivre en continu par une approche électrique, i.e. l'EIS, l'infection de cultures cellulaires par le *Cryptosporidium*. Celles-ci serviront donc d'intermédiaires pour obtenir des informations sur le cycle de vie du parasite et sur son infektivité. Il s'agit du premier travail utilisant la spectroscopie d'impédance électrique appliquée à des cellules, ou bioimpédance, pour étudier leur infection par un protozoaire parasite, par définition un organisme eucaryote dont la préparation requiert des soins particuliers (stimulation du désenkystement, dépôt rapide des parasites sur le tapis cellulaire...).

Au sein du genre *Cryptosporidium*, quinze espèces ont été reportées dans des cas d'infection pour l'Homme. Parmi celles-ci, les espèces *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) et *Cryptosporidium hominis* (*C. hominis*) ont été les plus communément citées dans les cas de cryptosporidiose à travers le monde (Chalmers, 2012). Le *C. parvum* est disponible commercialement car il est prélevé sur du bétail dont il est également un agent infectieux, contrairement au *C. hominis* qui n'infecte que l'Homme. C'est pourquoi nous l'avons choisi comme modèle pour étudier ce parasite.

D'autre part, une étude comparant plusieurs lignées cellulaires a montré que les cellules HCT-8 sont celles supportant le plus d'étapes de développement du parasite (Upton *et al.*, 1994). Notre choix de cellules-hôtes s'est donc porté sur les cellules HCT-8.

Enfin, le choix de la forme d'électrode a été fait au regard du manque d'informations dont nous disposons quant au suivi des effets du *C. parvum* sur l'impédance électrique de cultures de cellules HCT-8. Nous avons en effet choisi un REIP circulaire couvrant toute la surface de culture afin de suivre l'effet du *C. parvum* sur l'ensemble du tapis cellulaire et pas seulement sur une portion. En outre, un REIP nous permet d'obtenir une profondeur de pénétration suffisante pour sonder également la zone apicale du tapis cellulaire.

1.4.2 Verrous technologiques et scientifiques

1.4.2.1 Verrous technologiques

Les premières questions que nous nous sommes posé concernent notre capacité à cultiver des cellules dans des puits de culture millimétriques que nous avons-nous-même créés. En effet, afin de s'assurer que tous les oocystes de *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) introduits dans le puits se déposent sur des cellules, il est nécessaire que le tapis soit au préalable à confluence, c'est-à-dire que les cellules aient recouvert entièrement le fond du puits.

- Le volume du milieu de culture introduit dans ces puits étant inférieur à 100 µl, diminuer son volume de seulement quelques µl peut avoir un effet létal sur les cellules. Comment pouvons-nous éviter les fuites et évaporations de celui-ci?
- Quelles mesures devons-nous prendre pour s'assurer l'absence de contaminations extérieures ?
- La pousse des cellules peut-elle être suivie par EIS de manière reproductible suivant le nombre de repiquages subis par les cellules et le dispositif utilisé?
- A quel point les éléments du montage et les phénomènes physico-chimiques indésirables perturbent-ils les mesures ?
- Le risque d'évaporation et la nécessité d'échanges gazeux entre l'incubateur à 5% de CO₂ et le milieu de culture afin de maintenir un pH d'environ 7 semblent deux problèmes incompatibles. Comment faire pour permettre aux cellules de pousser tout en tenant compte de ces problèmes ?

Puis, les interrogations concernant l'infection des cellules HCT-8 par le *C. parvum* ont émergé.

- Quel protocole d'infection par le *C. parvum* sera compatible avec notre expérience, notamment en ce qui concerne la stimulation du désenkystement ?
- Après cette stimulation, pouvons-nous déposer les oocystes de manière suffisamment rapide sur les cellules afin de s'assurer que les sporozoïtes aient assez d'énergie pour les infecter ?
- Notre dispositif est-il assez sensible pour observer une réponse de l'infection au *C. parvum* et celle-ci est-elle reproductible ?
- Le milieu de culture utilisé pour l'infection par le *C. parvum* est différent de celui dans lequel les cellules baignent lors de leur croissance avant l'introduction des parasites. En effet, il contient moins de sérum de veau fœtal (SVF) afin que le *C. parvum* puisse se développer. Dans ces conditions, pendant combien de temps l'infection peut-elle être suivie ?
- Enfin, comment tester simplement différents niveaux d'infectivité de l'inoculum de départ sans avoir recours aux tests d'infectivité *in vitro* et *in vivo* classiques?

1.4.2.2 Verrous scientifiques

D'un point de vue scientifique, nous nous sommes d'abord demandé si le vieillissement des cellules HCT-8 lié au nombre de leur repiquage a un effet sur la réponse en impédance de notre système.

Concernant l'infectivité de l'échantillon, pouvons-nous voir si elle influence le signal ? Si c'est le cas, de quelle manière le modifie-t-elle ? Comment pouvons-nous la quantifier ?

En outre, un parasite a une relation de dépendance avec les cellules qu'il infecte car il se développe en utilisant leurs ressources. Sera-t-il possible de relier la réponse de notre système à des phénomènes biologiques résultant de l'interaction hôte-parasite, voire au cycle de vie du parasite ?

Enfin, notre système présente-t-il une réponse spécifique au *C. parvum* ?

1.4.3 Structure de la thèse

La problématique de cette thèse sera traitée de la façon suivante :

Le chapitre 1, l'introduction, visait tout d'abord à contextualiser le choix du parasite d'étude, le *Cryptosporidium*. Puis, nous avons détaillé les différents niveaux d'analyse de celui-ci et justifié le fait que l'infectivité est celui le plus proche de la réalité car le parasite est en contact direct avec des cellules. Ensuite, nous avons présenté les techniques de suivi continu et sans marquage de cultures cellulaires présentant le plus de potentiel et conclu que l'EIS était la mieux adaptée pour suivre l'évolution de leur morphologie. Enfin, nous avons détaillé notre stratégie de recherche, en définissant précisément la problématique ainsi que les verrous technologiques et scientifiques initiaux.

Le chapitre 2 détaille les modèles électrique et biologique utilisés au cours de cette thèse. Après une description du système physique dans son ensemble, nous présentons la technique de spectroscopie d'impédance électrique (EIS), qui nous permet de le mesurer. Puis nous détaillons le modèle biophysique utilisé pour comprendre ce système physique, à savoir un ensemble des connaissances relatives au cycle de vie du parasite de l'espèce *Cryptosporidium parvum* et à son effet sur les cellules-hôtes. Pour finir, nous décrivons le modèle électrique, i.e. un circuit équivalent, avec lequel le système physique a été analysé et justifions sa composition.

Le chapitre 3 concerne l'élaboration et la caractérisation électrique du dispositif de mesure avec lequel les expériences ont été effectuées. Après une présentation d'une vue d'ensemble de ce dispositif, nous justifions les choix relatifs à la géométrie et aux matériaux des éléments le composant, notamment les électrodes. Puis, nous décrivons les différentes étapes de conception basées sur des procédés de fabrication en microélectronique. Ensuite, nous détaillons le protocole de caractérisation électrique du dispositif, dont le but est d'évaluer dans quelle mesure la géométrie des électrodes choisie nous permet d'effectuer des mesures d'impédance sur des cellules HCT-8. Pour finir, nous présentons les mesures de caractérisation effectuées sur différents milieux physiologiques et concluons quant à l'adaptation de la géométrie des électrodes.

Le chapitre 4 couvre le suivi par EIS d'une croissance cellulaire jusqu'à confluence et l'influence du repiquage. L'introduction contextualise cette expérience. Puis nous décrivons les matériels et méthodes relatifs aux cultures de cellules en amont des mesures et dans nos puces ainsi qu'à l'analyse de la réponse en impédance obtenue. Ensuite, nous présentons nos résultats, à savoir les mesures d'impédance de la croissance cellulaire suivant la fréquence et le temps, les analyses par circuit équivalent et les mesures relatives à l'influence du repiquage. La discussion qui suit a pour but d'expliquer les valeurs obtenues et d'évaluer l'impact du nombre de repiquages subis par des cellules HCT-8 par rapport aux effets attendus de l'infection par le *C. parvum* sur les mesures impédimétriques.

Le chapitre 5 présente le suivi impédimétrique du tapis de cellules HCT-8 confluent pendant l'infection par le *C. parvum*. L'introduction fait le point sur les enjeux de ces mesures. Les matériels et méthodes détaillent la préparation des oocystes, le protocole d'infection, l'analyse de la réponse impédimétrique et enfin les cultures et infections en parallèle des mesures impédimétriques dans des chambres de culture Lab-Tek™, qui ont été marquées pour des observations par microscopie à fluorescence. Dans les résultats, nous présentons tout d'abord la réponse impédimétrique des cellules HCT-8 à l'infection par le *C. parvum*, puis l'analyse des mesures par circuit équivalent. Ensuite, nous mettons en avant l'alternance des prédominances de formes parasitaires et la dépendance de la réponse impédimétrique des cellules par rapport à la viabilité de l'inoculum introduit. Dans la discussion qui suit, notre objectif est d'appliquer des hypothèses biologiques quant aux phénomènes physiologiques sous-jacents, liés notamment à la relation hôte-parasite, qui peuvent expliquer les résultats obtenus. Enfin, nous évaluons l'efficacité de notre système comme capteur d'infectivité.

En conclusion, nous résumons d'abord ce qui a été réalisé au cours de cette thèse, notamment en ce qui concerne le suivi en continu par une approche électrique de l'infection de cellules cancéreuses par un protozoaire parasite, un résultat jamais obtenu auparavant. Dans les perspectives, nous discutons de l'optimisation de notre système par voies de miniaturisation et notamment des verrous technologiques que cela soulève. Puis nous parlons de la spécificité de la réponse impédimétrique et de l'adaptation de notre système à d'autres couples parasite – cellule-hôte. Pour finir, nous présentons les opportunités que cette technique permet d'ouvrir dans la recherche sur le cancer induit par le *Cryptosporidium*.

Les annexes présentent les analyses, qui n'ont pas fait l'objet d'un calcul de moyennes et d'écart-type dans le corps de la thèse, de deux autres expériences de suivi impédimétrique d'un tapis cellulaire, d'abord pendant sa croissance (cf. chapitre 4) et puis pendant son infection par le *C. parvum* (cf. chapitre 5). Elles nous permettent donc de justifier la reproductibilité de ces analyses. L'annexe A présente l'évolution de l'impédance mesurée (amplitude normalisée et phase) pendant la croissance cellulaire suivant la fréquence et le temps dans un repère en trois dimensions. Les annexes B et C illustrent l'évolution des paramètres du circuit équivalent respectivement pendant la croissance du tapis cellulaire et pendant l'infection de ce tapis par le *C. parvum*.

2 MODELES ELECTRIQUE ET BIOLOGIQUE

Le but de ce chapitre consiste à décrire les modèles électrique et biologique nous permettant d'analyser le système physique comprenant une culture de cellules HCT-8 (issues d'un adénocarcinome iléocœcal humain) infectée par le protozoaire parasite *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*).

Dans une première partie, nous décrivons ce système physique et justifierons la nécessité de combiner un modèle électrique et un modèle biologique pour l'analyser.

Dans une deuxième partie, nous expliquerons en quoi consiste la Spectroscopie d'Impédance Electrique (EIS) et définirons les phénomènes physiques que cette technique nous permet d'analyser. Nous présenterons également différents types de sollicitations électriques et choisirons la mieux adaptée à notre étude ainsi que l'équipement pour la créer et analyser la réponse du système. Nous montrerons enfin les différentes représentations de cette réponse qui seront utilisées au cours de cette thèse.

Dans une troisième partie, le modèle biophysique du système sera présenté. Tout d'abord, nous décrivons le cycle de vie du parasite et les différentes formes de développement qu'il adopte. Puis, nous présenterons les effets qu'il induit à un niveau local sur la cellule infectée et à un niveau global sur le tapis cellulaire.

Dans une quatrième et dernière partie, nous décrivons le modèle électrique de notre système. Nous justifierons d'abord notre choix d'une modélisation par circuit équivalent. Puis nous présenterons le circuit équivalent choisi. Enfin, nous justifierons le choix de chacun des éléments le constituant ainsi que leurs modifications prévisibles au cours de l'expérience à partir du modèle biophysique.

2.1 Description du système physique

Notre problématique consiste à quantifier en continu par EIS les procédés d'infection du *Cryptosporidium* sur des cultures cellulaires. Nous allons à présent décrire le système qui sera analysé par EIS.

Celui-ci comprend tout d'abord les cellules-hôtes et le parasite. Dans l'introduction, nous avons justifié le choix de la lignée HCT-8 comme cellules-hôtes et de l'espèce *C. parvum* comme modèle de parasite.

Le système comprend également les électrodes sur lesquelles les cellules sont cultivées et le substrat sur lequel ces électrodes sont fabriquées. Nous avons justifié dans l'introduction que les électrodes sont sous la forme d'un Réseau d'Electrodes Interdigitées Planaires (REIP) circulaire. Elles sont fabriquées sur un substrat de Pyrex, matériau déjà utilisé pour des études similaires (Böhm *et al.*, 2000), attestant son caractère biocompatible pour notre expérience de croissance cellulaire.

Dans les laboratoires de biologie cellulaire, les cultures de cellules s'effectuent classiquement dans des flasques comprenant une surface de culture de plusieurs dizaines de cm². Dans une optique de miniaturisation pour permettre par exemple des analyses par criblage haut-débit, des systèmes de culture dans des puits (Yarmush et King, 2009), dans des gouttes sur une surface plane (Fernandes *et al.*, 2009) ou encore dans des chambres de culture microfluidiques (Velve-Casquillas *et al.*, 2010) se sont développés. Nous avons choisi d'effectuer nos cultures de cellules dans des puits afin de simplifier le dépôt des cellules et des parasites.

Enfin, l'EIS consistant à mesurer la réponse en impédance d'un système suite à une sollicitation électrique, il faut également prendre en compte dans cette réponse les contributions des éléments de montage reliant le système décrit ci-dessus et l'impédancemètre.

Le système complet est représenté sur la figure 2.1.

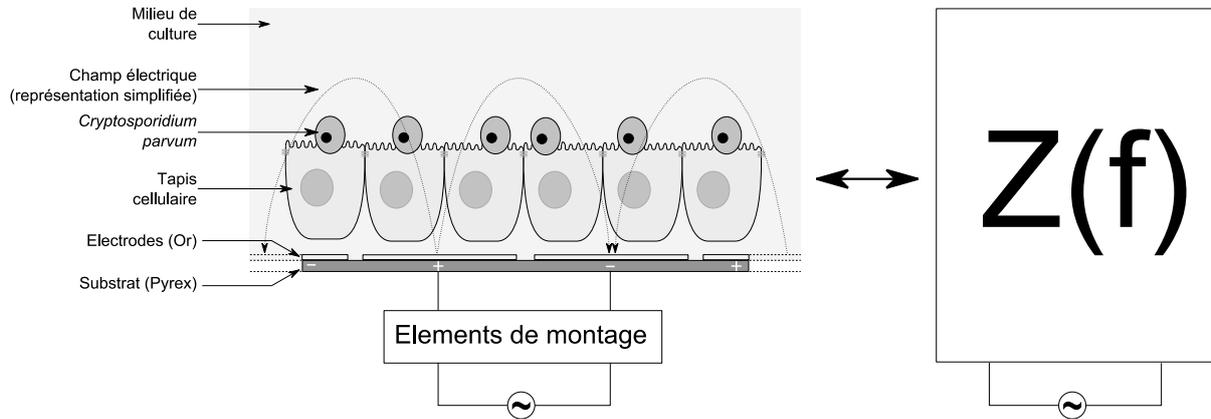


Figure 2.1 : Représentation du système physique complet. Afin de simplifier le schéma, seules quelques électrodes et quelques cellules contenues dans le puits de culture ont été représentées, tandis que le champ électrique n'est symbolisé que par une seule ligne de champ. De même, les tailles des cellules, du parasite *C. parvum* et du subépithélium ne sont ici pas à l'échelle. Les éléments de montage correspondent aux éléments permettant de lier la tension alternative (ou le courant alternatif) délivrée par la source aux électrodes. Le système, éléments de montage compris, est équivalent à une seule impédance $Z(f)$ dépendante de la fréquence à laquelle la tension (ou le courant) est appliquée.

Chaque élément du système influence d'une manière caractéristique le champ électrique induit par la sollicitation électrique. La réponse électrique obtenue est ainsi une combinaison de toutes ces contributions. Son analyse requiert donc l'application d'un modèle électrique permettant de distinguer chacun des éléments.

Par ailleurs, nous avons montré que les cellules et les parasites apportent également leur contribution au système. Cependant, à mesure que l'infection progresse, les cellules et les parasites évoluent d'un point de vue physico-chimique. La réponse sera donc influencée par la complexe relation hôte-parasite existant entre le *C. parvum* et les cellules HCT-8. Afin d'évaluer les effets de l'infection des cellules sur la réponse, il est également nécessaire de développer un modèle biologique.

2.2 La Spectroscopie d'Impédance Electrique (EIS)

2.2.1 Définition

Afin de définir la notion d'impédance, il est nécessaire de rappeler en premier lieu ce qu'est une résistance électrique. Il s'agit de l'aptitude d'un élément de circuit électrique à résister au flux du courant. La loi d'Ohms définit la résistance R comme étant le ratio entre la tension U à ses bornes et le courant I la traversant :

$$R = \frac{U}{I} \quad (2.1)$$

L'utilisation de la loi d'Ohms est cependant limitée à un conducteur parfait. Celui-ci se définit par le fait que si on lui impose une tension U ou un courant I , alors la réponse, respectivement le courant I ou la tension U , s'établit instantanément.

La notion d'impédance est une généralisation de la résistance pour des matériaux qui ne sont pas des conducteurs parfaits. Pour rappel, le terme « impédance » a pour origine le verbe anglais « to impede » qui signifie « gêner » ou « ralentir » et dérive lui-même du latin « impedire » qui a pour sens « entraver ». Si le matériau considéré est un objet biologique, par exemple une cellule biologique, nous parlons de bioimpédance.

La Spectroscopie d'Impédance Electrique (EIS) désigne une méthode de caractérisation de propriétés électriques d'un matériau et de son interface avec des électrodes électriquement conductrices. Ce terme regroupe les techniques de mesure de la réponse électrique linéaire du système étudié (composé des électrodes et du matériau) et d'analyse de cette réponse pour obtenir des informations sur les propriétés physico-chimiques du système à l'étude et leurs interrelations.

D'un point de vue général, ces méthodes consistent à appliquer un stimulus électrique (une tension ou un courant) à des électrodes et à observer la réponse (respectivement le courant ou la tension résultante). L'impédance électrique de la cellule expérimentale se définit alors par le rapport entre la tension et le courant.

Il est à noter que le caractère linéaire de cette réponse est dépendant du stimulus électrique appliqué, qui doit être suffisamment faible. Les études des propriétés non-linéaires de ces systèmes étant en dehors du champ de cette thèse, ils ne seront pas abordés.

Considérons le cas d'un stimulus électrique à une fréquence fixe sous forme de tension alternative sinusoïdale de la forme :

$$U(t) = U_0 \sin(\omega t) \quad (2.2)$$

Et le courant alternatif résultant de la forme :

$$I(t) = I_0(\omega) \sin(\omega t - \varphi(\omega)) \quad (2.3)$$

La grandeur ω désigne la fréquence radiale de la tension alternative appliquée (en rad.s^{-1}) et est égale à $2\pi f$, où f désigne la fréquence (en Hz ou s^{-1}), et la grandeur t le temps (en s). $\varphi(\omega)$ désigne le décalage en phase du courant résultant (en radians) et représente le fait que le courant n'apparaît pas instantanément suite à l'application de la tension d'excitation. Les grandeurs U_0 et $I_0(\omega)$ désignent respectivement l'amplitude de la tension d'excitation et du courant résultant, cette dernière dépendant de la fréquence appliquée.

La figure 2.2 illustre le décalage en phase et la différence en amplitude du courant résultant par rapport à la tension d'excitation.

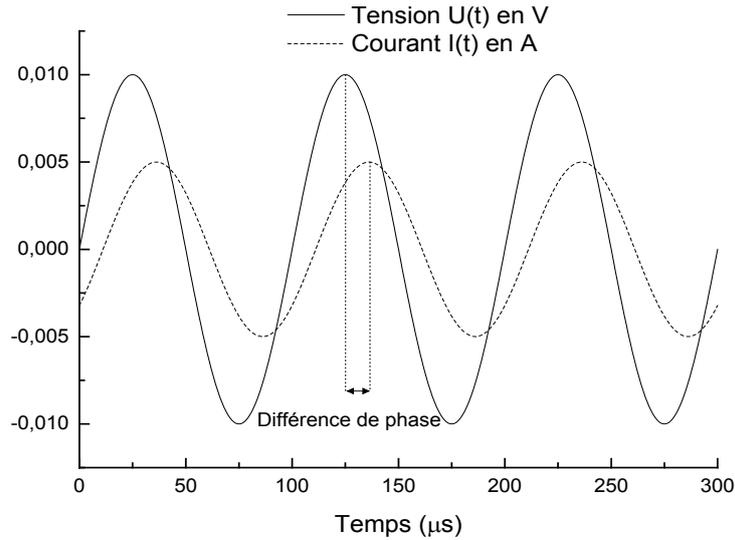


Figure 2.2 : Représentation de l'évolution temporelle d'une tension d'excitation alternative sinusoïdale et du courant alternatif résultant.

Afin d'étudier le rapport entre la tension d'excitation périodique et le courant résultant, il est plus aisé de leur associer les nombres complexes suivants :

$$U(t) = U_0 e^{j\omega t} \quad (2.4)$$

$$I(t) = I_0(\omega) e^{j(\omega t - \varphi(\omega))} \quad (2.5)$$

La grandeur j désigne le nombre imaginaire ($j^2 = -1$). Le nombre complexe $Z(\omega)$ se définit alors de la façon suivante :

$$Z(\omega) = \frac{U(t)}{I(t)} = \frac{U_0}{I_0(\omega)} e^{j\varphi(\omega)} = |Z(\omega)| e^{j\varphi(\omega)} \quad (2.6)$$

$Z(\omega)$ désigne la « fonction d'impédance » tandis que sa valeur à une fréquence particulière correspond à « l'impédance » du circuit électrique. Celle-ci contient deux informations :

- $|Z(\omega)|$ (en Ω), qui désigne l'amplitude de l'impédance et correspond au rapport entre la tension maximale et l'intensité maximale
- $\varphi(\omega)$ (en radians), qui désigne la phase mais peut également être nommée « argument ». $\varphi(\omega)$ peut également être exprimée en degrés ($^\circ$) à partir de la relation : $\varphi[^\circ] = \varphi[\text{radians}] * (180/\pi)$

2.2.2 Phénomènes physiques

Pour rappel, un matériau est constitué d'atomes, eux-mêmes constitués d'un noyau de neutrons (charges neutres) et de protons (charges positives) autour duquel gravitent des électrons (charges négatives). Dans le cas d'un électrolyte, les porteurs de charges sont des ions. Un champ électrique \mathbf{E} peut induire deux types principaux de phénomènes physiques relatifs aux charges d'un matériau ou d'un électrolyte : la conduction et la polarisation. Le but de cette partie est de présenter brièvement ces phénomènes. Des études plus exhaustives peuvent être trouvées dans la littérature (Barsoukov et Macdonald, 2005).

2.2.2.1 Conduction

Un corps est dit « conducteur » s'il contient des porteurs de charge peu liés au noyau et donc mobiles. Un électrolyte est une substance, liquide ou solide, qui contient des ions mobiles : elle est donc conductrice.

La conduction désigne alors l'interaction avec le champ électrique induisant le déplacement de ces porteurs de charge. Cette interaction a pour résultat un courant de conduction dépendant d'une conductivité purement réelle tel que :

$$\mathbf{i} = \sigma \mathbf{E} \quad (2.7)$$

Où \mathbf{i} désigne le vecteur courant de conduction (A.m⁻²), σ la conductivité (S.m⁻¹) et \mathbf{E} le vecteur champ électrique (V.m⁻¹).

2.2.2.2 Polarisation

Un corps est dit « diélectrique » (ou isolant) s'il ne contient pas de porteurs de charges mobiles. Malgré l'impossibilité des milieux diélectriques à conduire le courant, ils peuvent présenter des dipôles électrostatiques qui sont susceptibles d'interagir avec un champ électrique. Cette interaction se traduit par la réorientation de ces dipôles, autrement désignée par la polarisation.

Cette polarisation induit la création d'un courant de déplacement :

$$\mathbf{i} = \frac{d\mathbf{D}}{dt} \quad (2.8)$$

où \mathbf{D} désigne le vecteur induction électrique (C.m⁻²), qui dépend de la polarisation à partir de la formule suivante :

$$\mathbf{D} = \varepsilon_0 \mathbf{E} + \mathbf{P} \quad (2.9)$$

Où \mathbf{E} désigne le champ électrique (V.m⁻¹), ε_0 la permittivité du vide (8,54187.10⁻¹² F.m⁻¹) et \mathbf{P} la polarisation du matériau diélectrique (C.m⁻²).

Cette polarisation ne s'effectue pas instantanément. Il existe un temps caractéristique, appelé temps de relaxation (ou constante de temps), au bout duquel la polarisation se stabilise et les charges atteignent un état d'équilibre. On parle alors de relaxation diélectrique. Par conséquent, la polarisation peut être divisée en deux catégories :

- \mathbf{P}_∞ : Polarisation quasi-instantanée, due au déplacement des porteurs de charge. Celle-ci définit la permittivité à hautes fréquences ε_∞ telle que :

$$\varepsilon_\infty - 1 = \frac{\mathbf{P}_\infty}{\mathbf{E}\varepsilon_0} \quad (2.10)$$

- $\mathbf{P}^s(t)$: Polarisation dépendante du temps, due à l'orientation des dipôles du circuit électrique. Si le champ reste stable pendant un temps infiniment long, la polarisation résultante \mathbf{P}_s définit la permittivité à statique ε_s telle que :

$$\varepsilon_s - 1 = \frac{\mathbf{P}_s}{\mathbf{E}\varepsilon_0} \quad (2.11)$$

Ce phénomène de polarisation est résumé figure 2.3.

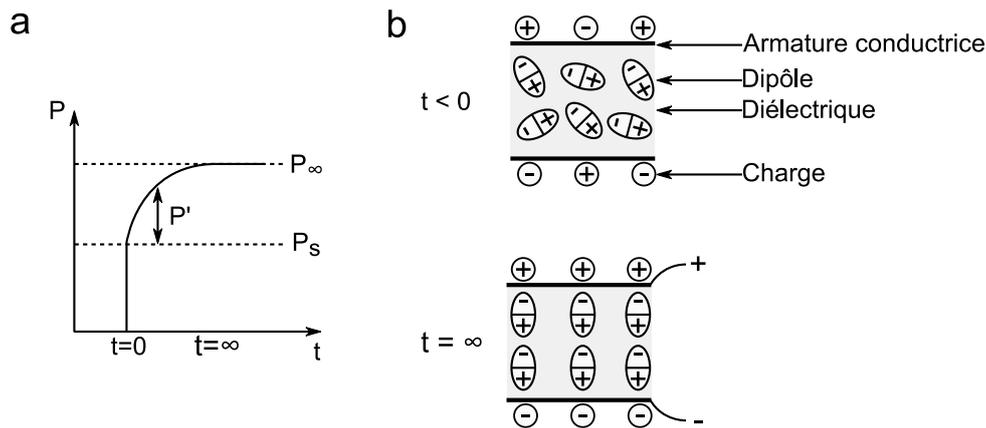


Figure 2.3 : Représentation de la polarisation électrique. a) Dépendance temporelle de la polarisation P après application d'un champ électrique à un isolant à $t=0$ (Barsoukov et Macdonald, 2005). b) Représentation schématique de la polarisation électrique dans un isolant entre deux armatures conductrices à $t < 0$ (sans champ électrique : dipôles non orientés) et à $t = \infty$ (avec champ électrique et après un temps suffisamment long : dipôles orientés).

2.2.3 Types de sollicitation électrique

Il existe trois types de stimuli électriques en spectroscopie d'impédance électrique. Cette partie a pour objectif de les décrire et de justifier notre choix de sollicitation sinusoïdale.

2.2.3.1 Marche ou rampe de potentiel

Ce type de sollicitation consiste à appliquer une rampe de potentiel $U(t)$ telle $U(t) = U_0$ pour $t > 0$ et $U(t) = 0$ pour $t < 0$ et de mesurer le courant $I(t)$ résultant. Le ratio $U_0/I(t)$, dépendant du temps, est généralement étudié dans le domaine fréquentiel suite à une transformée de Fourier ou de Laplace.

Cette approche présente les avantages d'être simple à mettre en place. De plus, faire varier la grandeur U_0 permet d'influencer les réactions électrochimiques se produisant à l'interface électrode-matériau.

Les inconvénients de cette méthode, en plus de la nécessité d'appliquer une transformée de Fourier ou de Laplace, réside dans le fait que le rapport signal sur bruit diffère selon les fréquences. La fonction d'impédance ne sera pas donc correctement déterminée sur la gamme fréquentielle étudiée.

2.2.3.2 Bruit blanc

Cette technique consiste à appliquer un signal $U(t)$ composé d'un bruit blanc (signal aléatoire contenant toutes les fréquences de la gamme considérée) à l'électrode et de mesurer le courant résultant.

Cette sollicitation offre l'avantage de collecter rapidement des données car un seul signal est appliqué pendant un temps relativement court.

Les désavantages de cette méthode résident dans le fait qu'elle nécessite la génération d'un vrai bruit blanc, i.e. contenant toutes les fréquences d'étude, et également de traiter le signal avec une transformée de Fourier.

2.2.3.3 Sinusoïde

La sollicitation la plus communément utilisée consiste à appliquer une tension ou un courant sinusoïdal aux électrodes et de mesurer soit l'amplitude et le décalage de phase soit la partie réelle et la partie imaginaire du courant ou de la tension résultante à la fréquence étudiée. Des systèmes commerciaux sont disponibles et permettent d'effectuer des mesures jusqu'à environ 1MHz. Celles-ci peuvent être effectuées automatiquement sur un spectre fréquentiel soit directement par l'appareil, soit en mettant en place un interfaçage avec un ordinateur disposant d'un programme informatique adéquat.

Par rapport aux autres méthodes, celle-ci présente l'avantage d'obtenir un meilleur rapport signal sur bruit tandis que les appareils commerciaux se révèlent généralement simples d'utilisation.

Pour ces raisons, notre choix s'est porté sur une sollicitation de type sinusoïdale. Plus précisément, nous avons eu recours à l'application d'une tension sinusoïdale.

2.2.4 Equipements de mesure d'impédance

Le but de cette partie est de présenter les équipements utilisés pour effectuer des mesures d'impédance électriques.

2.2.4.1 Pont d'impédance

La manière la plus simple d'effectuer des mesures d'impédance se basait auparavant sur l'utilisation de ponts d'impédance inspirés du pont de Wheatstone (Ekelof, 2001). Il s'agit d'une méthode analogique pour mesurer l'impédance d'un système de manière indirecte.

Le principe d'un pont d'impédance repose sur l'association de quatre impédances de la manière représentée sur la figure 2.4. R_1 et R_2 sont deux résistances de valeurs connues, Z_X est l'impédance inconnue à déterminer et Z_S un circuit RLC dont les composants sont ajustables.

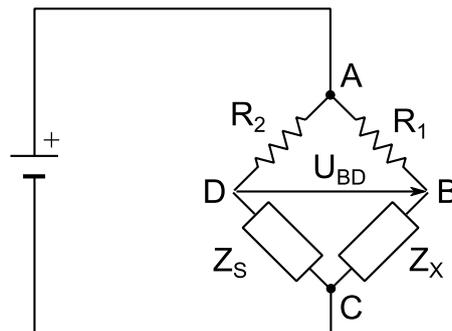


Figure 2.4 : Exemple de pont d'impédance.

Considérons les nœuds A , B , C et D . La tension alternative d'excitation est appliquée entre A et C . Le pont est dit équilibré quand la différence de potentiel entre B et D , notée U_{BD} , est nulle. La condition de cet équilibre se traduit avec l'équation suivante :

$$Z_X = \left(\frac{R_1}{R_2}\right) Z_S \quad (2.12)$$

Notons Z_X' et Z_X'' les parties réelle et imaginaire de Z_X et prenons le cas du pont de Wien où Z_S est composée d'une résistance R_S et d'une capacité C_S ajustables et montés en série. La condition d'équilibre s'obtient en ajustant alternativement R_S et C_S jusqu'à ce que les parties réelle et imaginaire de la tension entre B et D soient nulles. Ainsi, Z_X' et Z_X'' seront égales à :

$$Z_X' = \left(\frac{R_1}{R_2}\right) R_S \quad (2.13)$$

$$Z_X'' = \left(\frac{R_1}{R_2}\right) \omega C_S \quad (2.14)$$

Avec $\omega = 2\pi f$ la fréquence radiale appliquée (rad.s^{-1}) et f la fréquence (s^{-1} ou Hz).

Cette méthode connaît des limitations dans les mesures à hautes fréquences (capacité de fuite, effets inductifs) et à basses fréquences (bruits de différentes origines dont le courant industriel à 50 ou 60Hz). De multiples développements ont été effectués pour dépasser ces limitations (Barsoukov et Macdonald, 2005).

Une autre limitation vient du fait que l'impédance ne se détermine pas directement sur le système mais par l'intermédiaire de composants ajustables. Par conséquent, il n'est pas possible de connaître le potentiel réellement appliqué à l'électrode de travail du système sans avoir recours à un contrôle par un potentiostat, qui génère d'autres perturbations dans le signal mesuré.

2.2.4.2 Impédancemètres (Frequency Resonance Analyzers)

Ces deux dernières décennies, de plus en plus de mesures d'impédance ont été effectuées avec des impédancemètres (« Frequency Resonance Analyzers » ou FRA), des appareils délivrant un signal numérique permettant une collection plus rapide des données.

Ces appareils permettent de déterminer l'impédance d'un système à un stimulus sinusoïdal en corrélant la réponse $I(t)$ avec deux signaux de référence synchrones, l'un étant en phase avec la sollicitation sinusoïdale et l'autre déphasé de 90° . Ce principe est illustré sur la figure 2.5. Sur celle-ci, la sollicitation sinusoïdale $U(t)$ est de la forme :

$$U(t) = U_0 \sin(\omega t) \quad (2.15)$$

Avec U_0 son amplitude (en V) et ω sa fréquence radiale (rad.s^{-1}).

Désignons par $H(\omega)$ la fonction de transfert du système et par $H'(\omega)$ et $H''(\omega)$ ses parties réelles et imaginaires, comme sur la figure 2.5. Celles-ci sont liées à l'impédance $Z(\omega)$ du système mesuré, selon les formules :

$$H'(\omega) = U_0 |Z(\omega)| \cos(\varphi(\omega)) \quad (2.16)$$

$$H''(\omega) = U_0 |Z(\omega)| \sin(\varphi(\omega)) \quad (2.17)$$

Avec $|Z(\omega)|$ désignant l'amplitude (en Ω) de l'impédance et $\varphi(\omega)$ sa phase (en radians).

Les impédancemètres proposent de nombreux avantages, dont une précision de mesure jusqu'à quatre chiffres significatifs et des gammes de fréquences pouvant aller de 10^{-4} à 10^8 Hz. En outre, les mesures sont effectuées directement sur le système contrairement aux ponts d'impédance. Par conséquent, celles-ci ne sont pas sujettes aux limitations induites par un contrôle du potentiel de l'électrode de travail avec un potentiostat.

Le tableau 2.1 récapitule les caractéristiques principales de quelques impédancemètres. Dans le cadre de cette thèse, l'impédancemètre HP 4192A sera utilisé. Il possède une limitation en fréquence à 13MHz et

en impédance à $1\text{M}\Omega$. Dans cette thèse, les phénomènes biologiques que nous cherchons à observer apparaissent à des fréquences inférieures à 1MHz (Martinsen *et al.*, 2002). Nous avons donc choisi d'effectuer nos mesures à des fréquences comprises entre 100Hz et 1MHz . D'un point de vue fréquentiel, l'impédancemètre HP 4192A est par conséquent adapté à nos mesures. En revanche, la valeur limite de l'impédance qu'il est capable de mesurer, i.e. $1\text{M}\Omega$, doit être prise en compte lors de l'analyse des réponses obtenues.

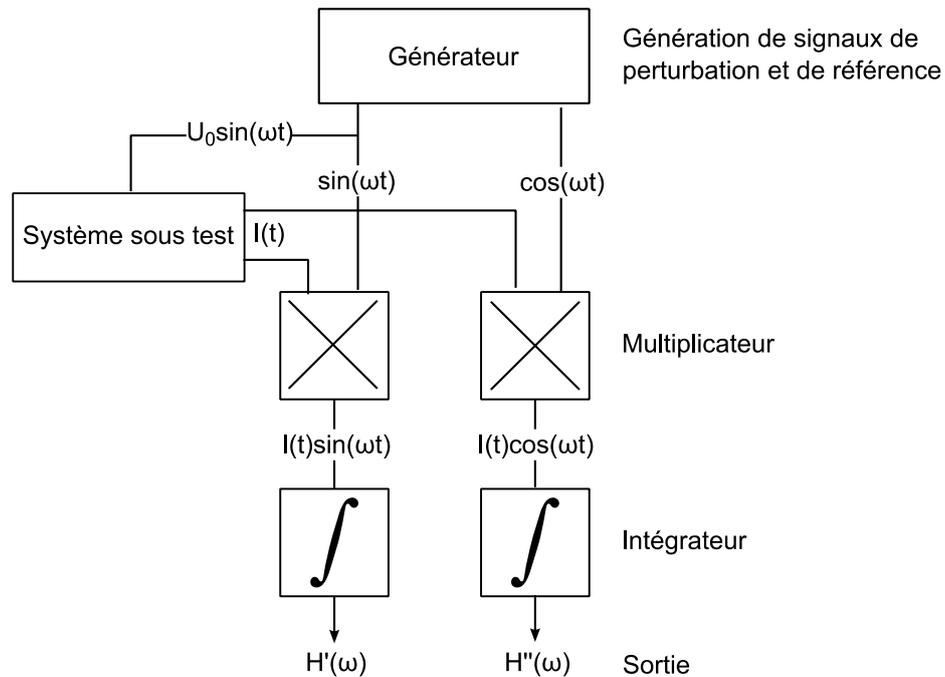


Figure 2.5 : Schéma de principe d'un impédancemètre (Barsoukov et Macdonald, 2005).

Modèle	Gamme fréquentielle	Limite d'impédance mesurée	Tension d'excitation (alternative)	Polarisation (continue)
Solartron 1260	$10\mu\text{Hz} - 32\text{MHz}$	$1\text{M}\Omega$	$5\text{mV} - 3\text{V}$ (rms*)	Jusqu'à 41V
Novocontrol Alpha-A	$30\mu\text{Hz} - 20\text{MHz}$	$1\text{T}\Omega$	$0,1\text{V} - 3\text{V}$ (rms*)	Jusqu'à 40V
HP 4192A	$5\text{Hz} - 13\text{MHz}$	$1\text{M}\Omega$	$5\text{mV} - 1,1\text{V}$ (rms*)	Jusqu'à 40V
HP 4294A	$10\text{Hz} - 110\text{MHz}$	$500\text{M}\Omega$	$5\text{mV} - 1\text{V}$ (rms*)	Jusqu'à 40V

Tableau 2.1 : Principales caractéristiques de quelques impédancemètres (*rms = « root mean square » pour « moyenne quadratique »).

2.2.5 Représentations

Dans cette partie, les différentes représentations de l'impédance dont il est question dans cette thèse sont décrites.

Dans un premier temps, nous expliquons les notations utilisées pour écrire les impédances sous leurs coordonnées cartésiennes et polaires, qui sont à la base des représentations. Nous décrivons également les circuits qui nous ont servi d'exemple.

Puis nous définissons les diagrammes de Nyquist et de Bode, qui permettent des représentations de l'impédance dans le domaine fréquentiel. Enfin, nous présentons l'intérêt et la méthodologie des analyses temporelles.

2.2.5.1 Notations

Notons $Z(\omega)$ l'impédance d'un système électrode-matériau. Il s'agit d'un nombre complexe, nous pouvons donc l'écrire sous sa forme cartésienne de la manière suivante :

$$Z(\omega) = Z'(\omega) + jZ''(\omega) \quad (2.18)$$

Où $Z'(\omega)$ et $Z''(\omega)$ représentent respectivement ses parties réelle (en Ω) et imaginaire (en Ω), j le nombre imaginaire ($j^2 = -1$) et ω la fréquence radiale (en rad.s^{-1}), égale à $2\pi f$ avec f désignant la fréquence (s^{-1} ou Hz).

De même, nous pouvons écrire $Z(\omega)$ sous sa forme polaire :

$$Z(\omega) = |Z(\omega)|e^{j\varphi(\omega)} \quad (2.19)$$

Où $|Z(\omega)|$ et la phase $\varphi(\omega)$ représentent respectivement son amplitude (en Ω) et son décalage en phase (en radians).

Il est à noter que les relations entre les coordonnées polaires et cartésiennes sont déterminées à partir des équations suivantes :

$$\begin{cases} Z'(\omega) = |Z(\omega)| * \cos(\varphi(\omega)) \\ Z''(\omega) = |Z(\omega)| * \sin(\varphi(\omega)) \end{cases} \quad (2.20)$$

$$\begin{cases} |Z(\omega)| = \sqrt{Z'(\omega)^2 + Z''(\omega)^2} \\ \varphi(\omega) = \text{atan}\left(\frac{Z''(\omega)}{Z'(\omega)}\right) \end{cases} \quad (2.21)$$

2.2.5.2 Exemples de circuit

Considérons deux composants électroniques standards :

- R : une résistance (en Ω), correspondant à un conducteur parfait (voir 2.2.1 et 2.2.2.1). Son impédance $Z_R(\omega)$ est un nombre réel pur et est indépendante de la fréquence. Elle s'écrit :

$$Z_R(\omega) = R \quad (2.22)$$

- C : une capacité d'un condensateur (en F), correspondant à deux armatures conductrices séparées par un diélectrique (voir 2.2.2.2). Son impédance $Z_C(\omega)$ est dépendante de la fréquence et est un nombre imaginaire pur. Elle s'écrit :

$$Z_C(\omega) = \frac{1}{jC\omega} = -j \frac{1}{C\omega} \quad (2.23)$$

Les circuits que nous prendrons comme exemple sont deux circuits RC, le premier correspondant à une association des composants R et C en série (figure 2.6a) et le second à une association en parallèle (figure 2.6b).

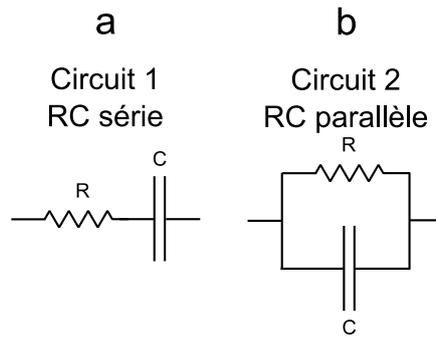


Figure 2.6 : Représentation schématique des circuits 1 et 2, respectivement des circuits RC montés en série (a) et en parallèle (b).

L'impédance de chacun de ces circuits, respectivement $Z_1(\omega)$ et $Z_2(\omega)$, se détermine à partir des équations suivantes.

$$Z_1(\omega) = Z_R(\omega) + Z_C(\omega) \Leftrightarrow Z_1(\omega) = R - j \frac{1}{C\omega} \quad (2.24)$$

$$\frac{1}{Z_2(\omega)} = \frac{1}{Z_R(\omega)} + \frac{1}{Z_C(\omega)} \Leftrightarrow Z_2(\omega) = \frac{R}{1 + jRC\omega} \quad (2.25)$$

Afin de représenter les impédances $Z_1(\omega)$ et $Z_2(\omega)$ de ces circuits, nous avons besoin d'assigner des valeurs aux composants R et C. Nous souhaitons les représenter aux fréquences utilisées au cours de cette thèse, i.e. entre 100Hz et 1MHz. Nous donc choisi les valeurs de R et C de telle sorte que la fréquence de relaxation f_{RC} du circuit, i.e. la fréquence où le circuit bascule d'un type de comportement (résistif ou capacitif par exemple) à un autre, soit comprise dans ce spectre. Dans les circuits que nous étudions, elle est unique et se définit de la manière suivante :

$$f_{RC} = \frac{1}{\tau} = \frac{1}{2\pi * RC} \quad (2.26)$$

Où τ désigne le temps de relaxation du système (en s), dont la définition a été donnée en 2.2.2.2.

Nous avons choisi $R = 100\Omega$ et $C = 1\mu\text{F}$. Ces valeurs nous permettent d'obtenir une fréquence de relaxation f_{RC} égale à environ 1,6kHz, qui est donc comprise entre 100Hz et 1MHz.

2.2.5.3 Diagramme de Nyquist

Le diagramme de Nyquist consiste à représenter les coordonnées cartésiennes de $Z(\omega)$, en traçant la partie imaginaire $Z''(\omega)$ en fonction de la partie réelle $Z'(\omega)$ dans un repère orthogonal. Par souci de visibilité, les valeurs $Z''(\omega)$ étant ici négatives, la figure 2.7 représente $-Z''(\omega)$ en fonction de $Z'(\omega)$.

Lorsque les composants R et C sont placés en série, le courant circule à travers les deux. La droite verticale présentée par le diagramme de Nyquist de ce circuit (figure 2.7a) montre que la partie réelle est constante car le courant passe par la résistance quelle que soit la fréquence. D'autre part, la décroissance de l'impédance globale à mesure que ω augmente provient du fait que la partie imaginaire de $Z_1(\omega)$ évolue en $\sim 1/\omega$.

Lorsque les composants R et C sont montés en parallèle, le flux de courant est plus important dans la branche présentant la plus faible impédance. Il s'agit d'un pont diviseur de courant. Ainsi, l'expression de

$Z_2(\omega)$ nous montre que lorsque ω est faible (100 Hz), l'impédance globale est dominée par R , soit 100Ω . À l'inverse, en hautes fréquences (1 MHz), $Z_2(\omega)$ peut s'approcher en $-j/C\omega$ qui sera alors proche de 0Ω .

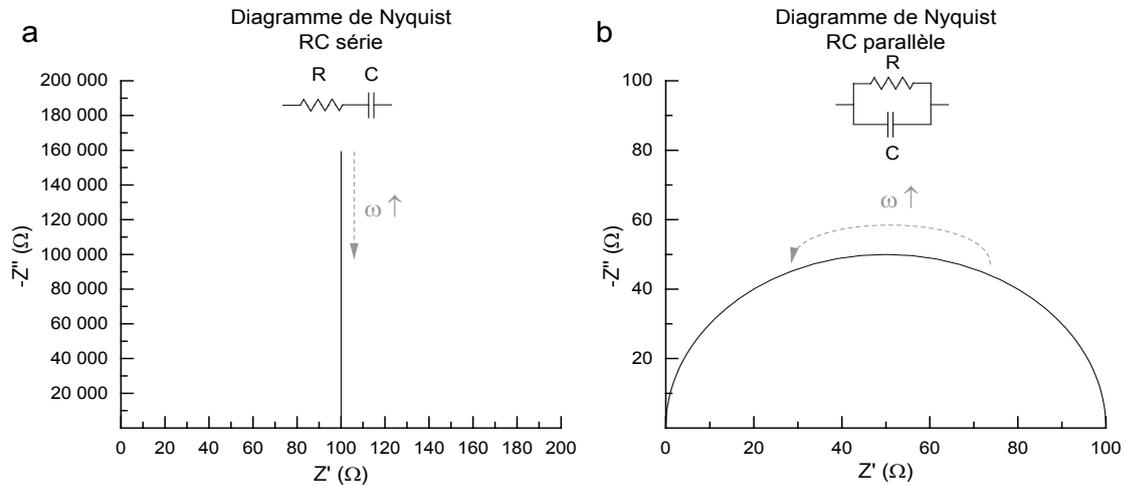


Figure 2.7 : Diagramme de Nyquist d'un circuit RC monté en série (a) et en parallèle (b).
 $R = 100\Omega$, $C = 1\mu\text{F}$.

L'intérêt du diagramme de Nyquist repose sur la représentation en deux dimensions de l'impédance, chaque point de la courbe correspondant à l'impédance à une fréquence. Il s'agit également de son principal défaut car la fréquence pour chaque point de données n'est pas représentée.

2.2.5.4 Diagramme de Bode

Le diagramme de Bode consiste à tracer à l'aide de deux courbes l'amplitude $|Z(\omega)|$ et la phase $\varphi(\omega)$ de l'impédance en fonction de la fréquence f (figure 2.8). Il pallie ainsi au désavantage du diagramme de Nyquist, où la fréquence n'apparaît pas explicitement. Nous pouvons alors déterminer graphiquement les différentes fréquences de relaxation du système. En outre, il permet de quantifier l'amplitude de l'impédance, exprimée en Ohms, et de la comparer avec la phase, qui nous renseigne sur le comportement du système, par exemple résistif (0°) ou capacitif (-90°).

Pour tous ces avantages, nous avons préféré représenter nos mesures à l'aide de diagrammes de Bode plutôt que Nyquist.

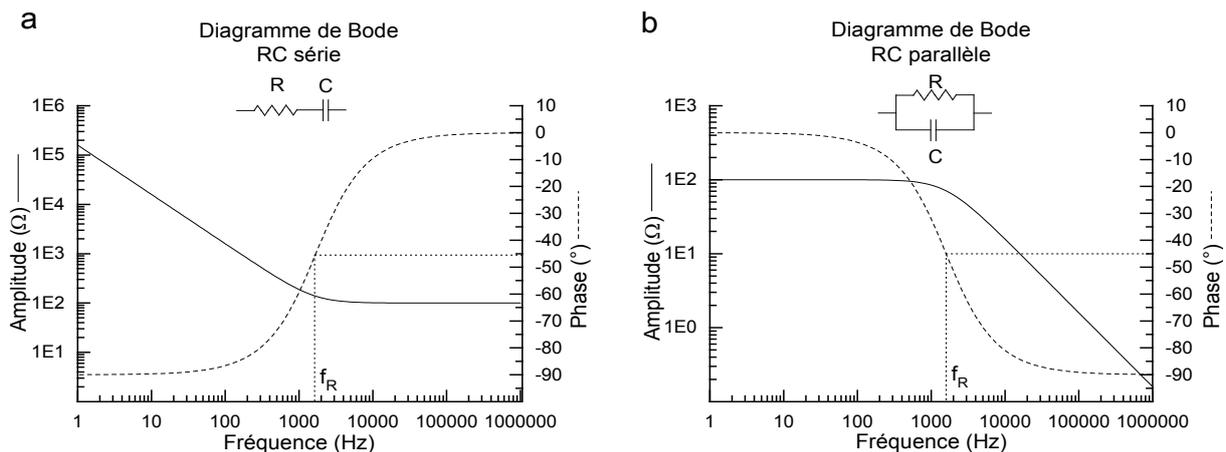


Figure 2.8 : Diagramme de Bode d'un circuit RC monté en série (a) et en parallèle (b).
 $R = 100\Omega$, $C = 1\mu\text{F}$.

2.2.5.5 Analyse temporelle

Les diagrammes de Nyquist et de Bode permettent d'effectuer des analyses fréquentielles de la fréquence. Afin d'observer les variations dans le temps de l'impédance d'un système, il est indispensable de disposer d'un moyen d'effectuer une analyse continue sur une période donnée soit à une fréquence fixe soit sur une gamme de fréquence. A moins de posséder d'un impédancemètre ayant une telle fonctionnalité, il est nécessaire de passer par un interfaçage sur ordinateur permettant d'instaurer un contrôle automatique sur celui-ci.

Le système d'interfaçage que nous avons utilisé répond à une norme appelée GPIB (« General Purpose Interface Bus »), également connue sous le nom d'IEEE-488 ou HPIB (« Hewlett-Packard Instrument Bus »). Il s'agit d'une norme qui définit le fonctionnement d'un bus, i.e. l'ensemble des communications numériques entre l'ordinateur et le périphérique (ici l'impédancemètre). Un programme, qui a été élaboré sur le logiciel LabVIEW, permet finalement de contrôler l'impédancemètre à partir de l'ordinateur.

Ainsi, il est possible de suivre l'évolution à une fréquence donnée des parties réelle ($Z'(t)$) ou imaginaire ($Z''(t)$), de l'amplitude ($|Z(t)|$) ou de la phase ($\varphi(t)$) à une fréquence donnée en fonction du temps dans un repère orthogonal classique.

2.2.6 Récapitulatif

En résumé, l'EIS, appliquée à des fréquences inférieures à 1MHz, nous permet de mesurer les propriétés électriques et diélectriques d'un matériau ou d'un électrolyte soumis à un champ électrique. Celles-ci se définissent à partir de deux phénomènes physiques principaux : la conduction et la polarisation.

Dans cette thèse, nous avons choisi comme type de sollicitation électrique une tension sinusoïdale, dans un spectre fréquentiel compris entre 100Hz et 1MHz. Un impédancemètre HP 4192A applique cette tension sinusoïdale et enregistre la valeur de l'impédance correspondant à la fréquence. Enfin, ces impédances ont été représentées, soit fréquemment à un instant donné à l'aide d'un diagramme de Bode, soit temporellement à une fréquence définie.

2.3 Modèle biophysique du système physique

Afin de comprendre l'évolution temporelle d'un signal de bioimpédance, il est essentiel de relier les mesures électriques avec des phénomènes biologiques. Dans le cadre de ce travail, il est ainsi nécessaire de décrire des éléments relatifs à la biologie de l'agent pathogène étudié : le parasite de l'espèce *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*).

Les parasites du genre *Cryptosporidium* sont des organismes eucaryotes unicellulaires (protozoaires). Ils possèdent un cycle de développement au sein d'un seul hôte (ils sont donc dits monoxènes). Ce cycle se caractérise par deux phases de reproduction : asexuée et sexuée. Les interactions du parasite sur son hôte sont donc plus complexes qu'une simple induction de mort cellulaire telle que pourrait être la conséquence de l'introduction d'une substance cytotoxique par exemple.

Les cryptosporidies appartiennent au groupe (ou phylum) des Apicomplexa. Ce dernier se distingue des autres groupes de parasites par un rassemblement d'organites (formant le complexe apical) situés dans la zone supérieure (apicale) de la forme infectante du parasite (le sporozoïte). La fonction de cette structure est *in fine* de pénétrer la cellule hôte. Le mot Apicomplexa est ainsi issu de la contraction du terme « apical complex ».

Suite à la pénétration du sporozoïte dans la cellule hôte, le développement du parasite présente une particularité puisqu'il est intracellulaire mais extra-cytoplasmique. Une fois la cellule hôte infectée, le parasite va y puiser les éléments nécessaires à son développement et perturber le fonctionnement de la cellule hôte. La cartographie du génome de *C. parvum* (Abrahamsen *et al.*, 2004) et de *Cryptosporidium hominis* (*C. hominis*) (Xu *et al.*, 2004) a par exemple mis en évidence l'absence critique d'enzymes présentes normalement dans le cycle de Krebs (suggérant des manques dans la biosynthèse des réserves de molécules impliquées dans les transports énergétiques) et l'absence de voies de synthèse *de novo* de certains acides aminés, d'acides gras et de nucléosides. De ce fait, il ressort que les cryptosporidies se reposent entièrement sur leur hôte pour leur permettre d'acquérir ces nutriments et en ce sens fabriquent de nombreux transporteurs moléculaires.

Dans un premier temps, nous étudierons les différentes phases du cycle de vie des parasites du genre *Cryptosporidium* en s'appuyant sur le modèle décrit pour l'espèce *C. parvum*. Les étapes de transmission, de désenkystement, d'invasion, de formation de vacuole parasitophore, de reproduction asexuée et de reproduction sexuée y seront décrites. Puis les multiples effets induits par le développement du *C. parvum* sur les cellules hôtes et sur le tapis cellulaire dans son ensemble seront présentés.

2.3.1 Cycle de vie du *C. parvum*

Le cycle de vie du *C. parvum* est défini par une succession de formes de développement parasitaires caractéristiques (en fonction de leur taille, de leur structure et du nombre de cellules les constituant). Ces formes parasitaires seront décrites dans le sens chronologique du cycle de vie du *C. parvum* illustré sur la figure 2.9.

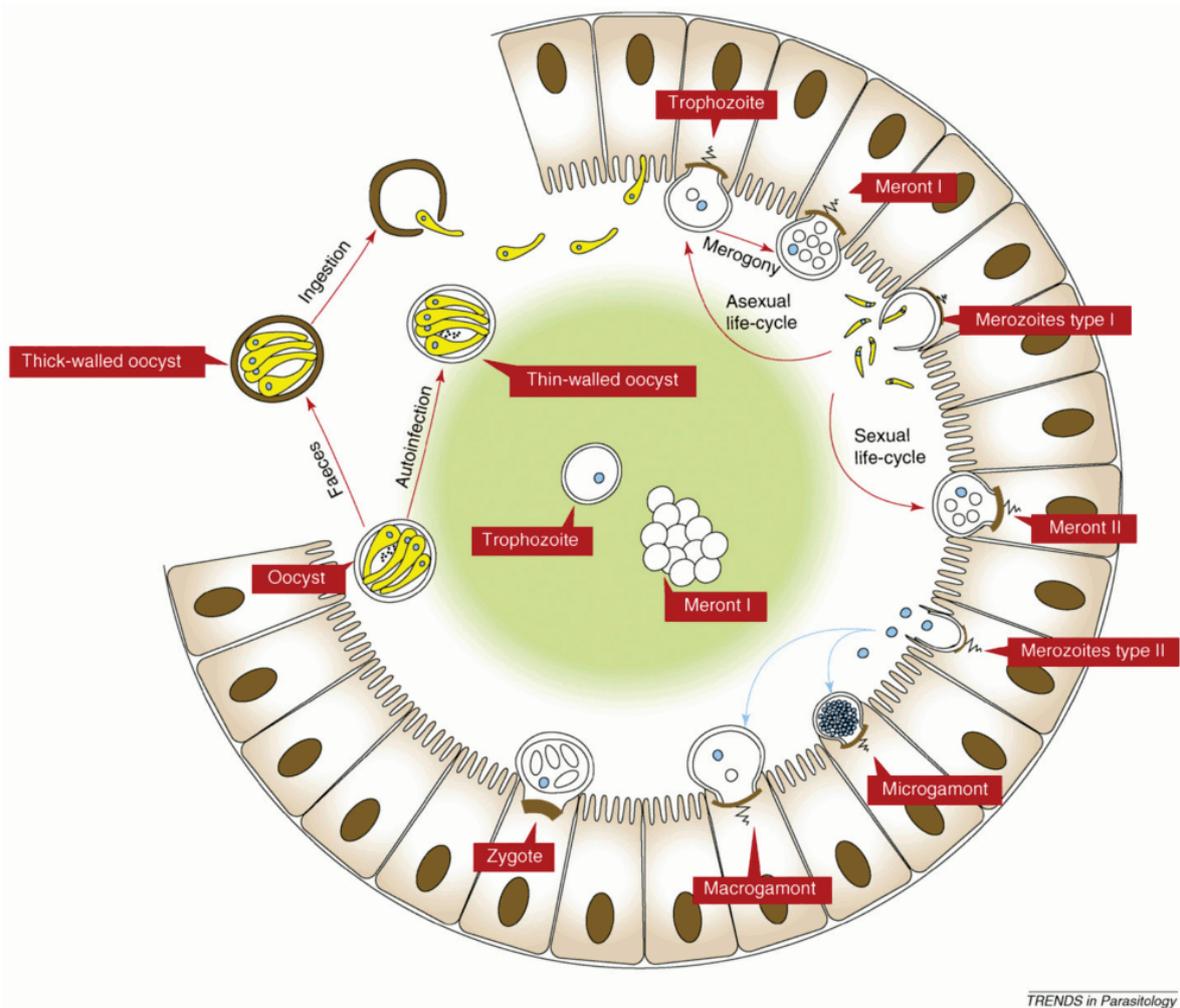


Figure 2.9 : Représentation du cycle de vie du *C. parvum*. L'ordre chronologique de son évolution se suit dans le sens des aiguilles d'une montre à partir du « Thick-walled oocyst » (Borowski *et al.*, 2010).

2.3.1.1 Ingestion

Le *C. parvum* se transmet soit par ingestion d'eau contaminée par des matières fécales d'organismes humains ou animaux atteints de cryptosporidiose soit directement par voie oro-fécale (Morgan et Thompson, 1998).

A cette étape, le parasite se trouve sous la forme d'un oocyste, dont le diamètre est d'environ 5 µm pour le *C. parvum* mais qui diffère suivant les espèces (Smith *et al.*, 2005; Upton et Current, 1985).

2.3.1.2 Désenkystement

Le désenkystement correspond par définition à la libération par l'oocyste de sporozoïtes, des cellules oblongues de 1 x 2-3µm (Slifko *et al.*, 1997) dont la zone apicale contient des organites qui ont pour rôle *in fine* de pénétrer les cellules de la lumière intestinale ou gastrique (Borowski *et al.*, 2008) (figure 2.10).

Bien que les mécanismes induisant le désenkystement ne soient pas encore entièrement compris, il a été montré qu'il est possible de le stimuler *in vitro* en reproduisant le transit des oocystes *in vivo* dans l'estomac (environnement acide) puis dans l'intestin grêle. Ainsi, cette stimulation de désenkystement s'effectue en exposant d'abord les oocystes à un milieu acide (pH = 2) puis en les incubant avec des sels

biliaires, des agents réducteurs et des protéases à une température de 37°C (Arrowood, 2002; Smith *et al.*, 2005).

Environ 30 à 90min après cette stimulation, les oocystes se désenkystent et libèrent leurs quatre sporozoïtes (Smith *et al.*, 2005).

2.3.1.3 Invasion

L'invasion des sporozoïtes dans la lumière intestinale ou gastrique résulte d'un enchaînement successif de plusieurs actions : mobilité par glissement sur les cellules, orientation, attachement et pour finir invasion. Ces processus sont médiés par des interactions ligand-récepteurs entre les sporozoïtes et la lumière intestinale ou gastrique. La description de ces interactions à l'échelle moléculaire est en dehors du champ de cette thèse mais peut être trouvée dans la revue de Smith *et al.* (Smith *et al.*, 2005).

Concernant la mobilité des sporozoïtes sur les cellules, celle-ci peut être améliorée en utilisant de la trypsine lors de l'étape de stimulation du désenkystement, qui déclencherait les mécanismes de glissement et/ou d'invasion des sporozoïtes (Smith *et al.*, 2005).

Puis, les sporozoïtes orientent leur complexe apical vers la lumière intestinale, ce qui permet leur attachement. Les organites contenus dans celui-ci permettent de dissoudre le mucus intestinal, permettant alors l'attachement et la pénétration des sporozoïtes. L'instant d'attachement des sporozoïtes diffère selon les études, se déroulant soit pendant la première heure d'incubation (Huang *et al.*, 2004), soit entre 2 et 6h (Mele *et al.*, 2004).

Il est à noter que les sporozoïtes disposent de peu d'énergie pour se déplacer et s'orienter, ce qui réduit leur possibilité d'invasion si le désenkystement se produit trop loin des cellules cibles (King *et al.*, 2011).

2.3.1.4 Formation de la vacuole parasitophore

Au cours de l'invasion du sporozoïte dans la cellule-hôte, leur membrane fusionne, délimitant une niche appelée vacuole parasitophore. En raison de cette vacuole, le parasite peut être décrit une fois internalisé comme étant intracellulaire mais extracytoplasmique (Huang *et al.*, 2004).

A cette étape, la forme infectieuse mononucléée est appelée trophozoïte, de taille 2-4 x 2-4µm et dont l'apparition des premières formes immatures a été observée dès 5h post infection (PI) (Slifko *et al.*, 1997).

2.3.1.5 Reproduction asexuée

Suite à l'invasion de la cellule-hôte, le noyau du trophozoïte se divise plusieurs fois (par mérogonie : réplication de l'ADN) pour donner 6 à 8 noyaux, chacun étant ensuite entouré par une membrane cellulaire. La forme globale obtenue est alors appelée méront de type I, d'une taille 4-4.8 x 4-4.8µm et a été observée dès 12h PI (figure 2.10) (Slifko *et al.*, 1997).

Le méront de type I libère ensuite 6 à 8 formes mononucléées oblongues similaires aux sporozoïtes appelées mérozoïtes de type I, d'une taille de 1 x 2-3µm (Slifko *et al.*, 1997). Ceux-ci vont, de la même manière que les sporozoïtes, infecter les cellules voisines, pour reformer des trophozoïtes puis des méronts de type I et ainsi de suite.

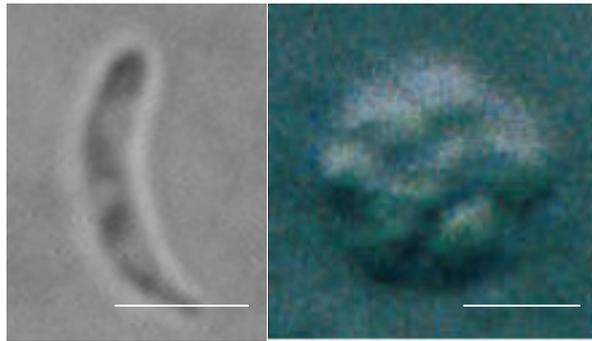


Figure 2.10 : Photo d'un sporozoïte (gauche) et d'un méront de type I (droite). Barre = 2 μ m.
(Hijjawi *et al.*, 2001; Slifko *et al.*, 1997)

2.3.1.6 Reproduction sexuée

Un cycle de reproduction asexuée, sous une influence encore inconnue aujourd'hui, évolue en reproduction sexuée lorsqu'un mérozoïte induit le développement d'un méront de type II en lieu et place d'un méront de type I. Les premières forme de ce type ont été observées à 48h PI et sont caractérisées par une taille de 4-4,8 x 4-4,8 μ m et un nombre quatre mérozoïtes de type II (Slifko *et al.*, 1997).

Une fois libérés, ces mérozoïtes vont réinfecter le tapis pour créer deux formes de reproduction sexuée (O'Hara et Chen, 2011). Le microgamont (ou microgamétocyte), est d'une taille de 5,6 x 3,4 μ m et contient de 14 à 16 microgamètes de 1,5 x 0,5 μ m chacune. Le macrogamont (ou macrogamétocyte) est d'une taille de 3-3,5 x 3-3,5 μ m et contient un large noyau excentré. Ces formes ont été observées à 48h PI (figure 2.11) (Hijjawi *et al.*, 2001; Slifko *et al.*, 1997).

Les microgamètes relâchés par le microgamont fusionnent avec les macrogamonts pour donner des zygotes. Ces derniers vont finalement se développer soit en oocyste à paroi fine (« thin-walled »), afin de réinfecter l'hôte (nous parlons d'autoinfection), soit en oocyste à paroi épaisse (« thick-walled »), qui va être éjecté de l'organisme avec la matière fécale, en attendant d'être ingéré par un autre organisme.

Il est important de noter que cette dernière étape de production de nouveaux oocystes infectieux n'a pas encore été atteinte en infectant des cultures cellulaires avec du *C. parvum* et que cela demeure un objectif important dans l'étude du parasite (Arrowood, 2002).

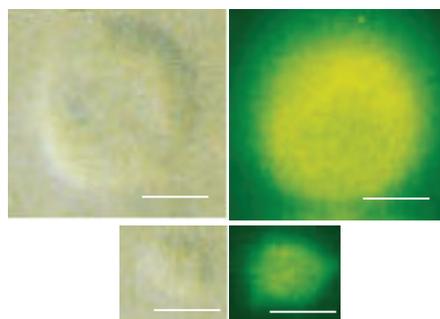


Figure 2.11 : Photos DIC (gauche) et par fluorescence (droite) de macrogamonts (ligne du haut) et microgamonts (ligne du bas). Barre = 2 μ m. (Slifko *et al.*, 1997)

2.3.2 Effets de l'infection par *C. parvum* sur les cellules

Pendant leur développement, les *Cryptosporidies* affectent leur hôte tant au niveau local d'une cellule infectée qu'à un niveau plus global du tapis cellulaire. Les parties qui suivent ont pour but de présenter ces effets. L'étude exhaustive de ces interactions à l'échelle moléculaire n'entrant pas dans le cadre de cette thèse, le lecteur est invité à consulter la revue de O'hara et Chen sur le sujet (O'Hara et Chen, 2011).

2.3.2.1 Effets locaux sur la cellule infectée

Dans les phases précoces de son développement, il a été prouvé que le *C. parvum* peut détourner la voie de signalisation de l'apoptose (ou suicide cellulaire) de la cellule-hôte par l'activation de la protéine anti-apoptotique NF- κ B (Chen *et al.*, 2001; McCole *et al.*, 2000). Bien que cela ne concerne pas toutes les cellules infectées, cette étude suggère que le parasite empêche la cellule-hôte de se suicider afin de faciliter sa croissance et sa maturation.

En revanche, plus tard dans le processus de développement, le parasite induit l'apoptose des cellules infectées. Les premières apoptoses ont ainsi été observées à 12h Post Infection (PI) (Chen *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2008) tandis que leur apogée semblent être atteintes à 24h PI (McCole *et al.*, 2000). Cette induction d'apoptose n'est pas non plus systématique. En effet, Mele *et al.* ont montré qu'environ 15% des cellules infectées étaient apoptotiques à 6h PI (Mele *et al.*, 2004) tandis que pour Liu *et al.*, ce chiffre s'élève à 20% à 24h PI et 48h PI (Liu *et al.*, 2009). Le parasite utilise les cellules-hôtes pour se développer, par exemple en altérant leur métabolisme pour détourner à son profit certains nutriments et modifier l'expression de certains de ses gènes (Deng *et al.*, 2004). L'induction de l'apoptose semble donc être un mécanisme de protection de l'hôte visant à limiter le nombre de parasites et/ou à se débarrasser de l'infection (Widmer *et al.*, 2000).

Afin de constater l'effet du *C. parvum* sur les cellules après plusieurs jours d'infection, une étude menée par Edwards a consisté à suivre une infection de cellules HCT-8 (issues d'un adénocarcinome iléocœcal humain) par le parasite pendant 5 jours (Edwards, 2012). Ses observations recourent les résultats obtenus par Mac Cole décrits précédemment quant à l'observation de cellules apoptotiques à 24h PI (McCole *et al.*, 2000). Son étude fait en revanche apparaître des lyses de cellules, synonymes de nécrose, à 48h PI (figure 2.12). A 96h PI, celles-ci sont essentiellement observées dans les zones infectées, menant à l'hypothèse qu'elles sont induites par le développement avancé du parasite.

Le *C. parvum* a également un effet sur le cytosquelette de la cellule infectée. Dès le processus d'internalisation, le parasite détourne en effet la membrane des cellules pour former la vacuole parasitophore. Il y a ainsi un remodelage de la membrane de la cellule hôte associée à une réorganisation du cytosquelette, marquée notamment par des modifications de l'actine à l'interface entre cette vacuole parasitophore et la membrane cytoplasmique, telle que le présente la figure 2.13 (Elliott et Clark, 2000). Cette polymérisation de l'actine constitue par ailleurs une étape essentielle du processus d'infection du *Cryptosporidium* (Elliott *et al.*, 2001). Un autre changement morphologique induit par l'infection par le *C. parvum* réside dans la perte d'adhérence des cellules-hôtes sur le substrat de culture dès 6h PI et ce jusqu'à 24h PI (Widmer *et al.*, 2000).

Les modifications des cellules induites par le parasite peuvent induire dans certains cas des développements cancéreux. De récentes études ont ainsi montré que des infections par le *C. parvum* sur des modèles murins immunodéprimés entraînent le développement de tumeurs invasives au niveau du tube digestif. (Benamrouz *et al.*, 2014; Certad *et al.*, 2007)

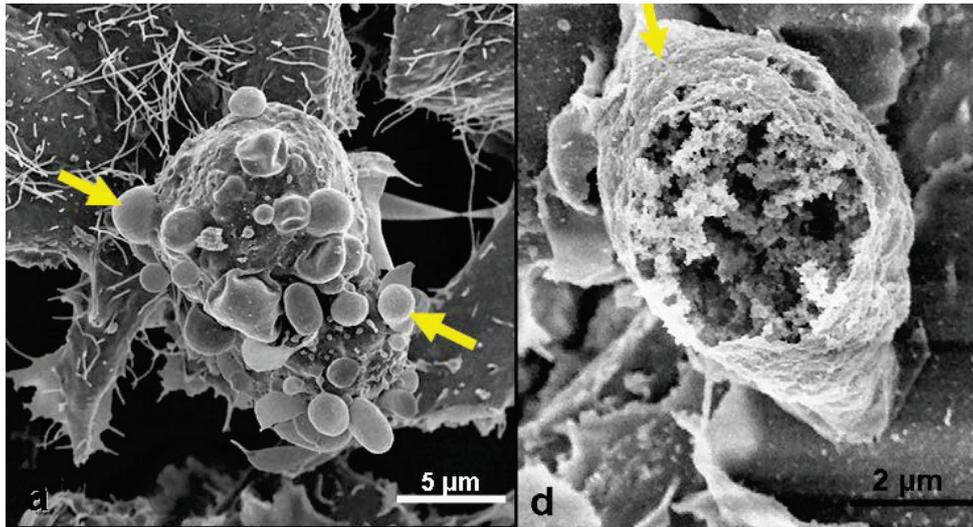


Figure 2.12 : Photo par microscopie électronique à balayage de cellules HCT-8 apoptotique (gauche) et nécrosée (droite) suite à l'infection du tapis par le *C. parvum* (Edwards, 2012).

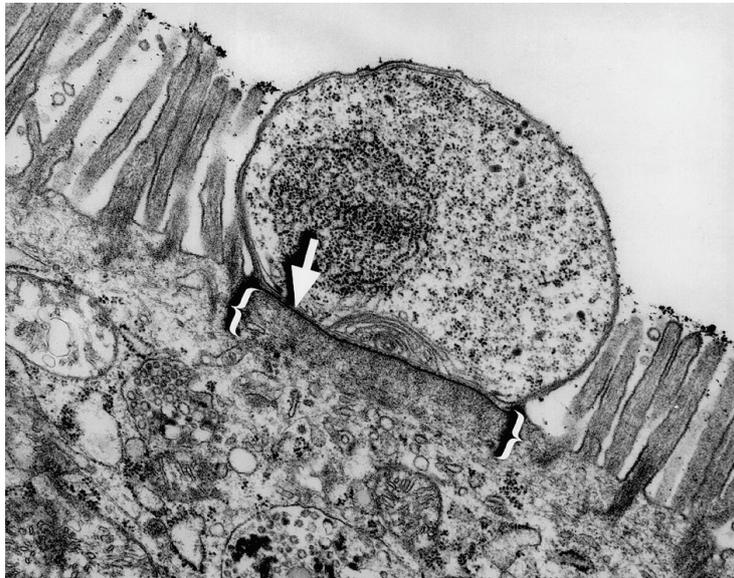


Figure 2.13 : Photo par microscopie électronique en transmission (TEM) de cellules épithéliales *in vivo* infectée par le *Cryptosporidium*. Les accolades et la flèche indiquent l'accumulation de l'actine entre la vacuole parasitophore et la membrane cytoplasmique constituant l'organe nutritionnel (« feeder organelle ») (Elliott et Clark, 2000).

2.3.2.2 Effets globaux sur le tapis cellulaire

Les travaux de Chen (Chen *et al.*, 2001) montrent que l'induction de NF- κ B, et donc l'inhibition de l'apoptose que nous avons évoquée dans la partie précédente, n'est observée que dans les cellules infectées et pas dans les cellules voisines. A l'inverse, l'inhibition de la voie NF- κ B induit l'apoptose non seulement dans les cellules infectées mais aussi dans les cellules voisines. Cette observation quant à l'apoptose de cellules non infectées rejoint l'étude d'Edwards, qui avait observé à 96h PI des cellules apoptotiques principalement dans les régions non infectées (Edwards, 2012). A ce sujet, Deng *et al.* soulèvent dans leur discussion que les variations d'expression des gènes impliqués dans les mécanismes d'apoptose seraient

liées non seulement aux cellules infectées mais également aux cellules voisines qui ne sont pas infectées mais qui réagissent tout de même en modulant leurs voies apoptotiques (Deng *et al.*, 2004).

Par ailleurs, une infection par le *Cryptosporidium andersoni* de cultures de Caco-2 (issues d'un adénocarcinome colorectal humain) a montré une rupture des ZO-1, qui est une protéine directement liée aux jonctions serrées (« Zonula Occludens » ou ZO, un type de jonction intercellulaire), et leur délocalisation dans le cytoplasme, comme l'illustre la figure 2.14 (Buret *et al.*, 2003). Cette observation peut être associée avec l'altération du cytosquelette abordée dans la partie précédente par Elliott *et al.* (Elliott et Clark, 2000). De même, l'évolution de la perméabilité d'un tapis cellulaire de Caco-2 infecté par le *C. parvum* a été étudiée. Une altération se produit au niveau apical et la perméabilité du tapis, évaluée à partir de la mesure de la Résistance Electric TransEpithéliale (TEER, cf. 1.3.1), diminue à mesure que le nombre de parasites de l'espèce *C. parvum* inoculés augmente (Griffiths *et al.*, 1994).

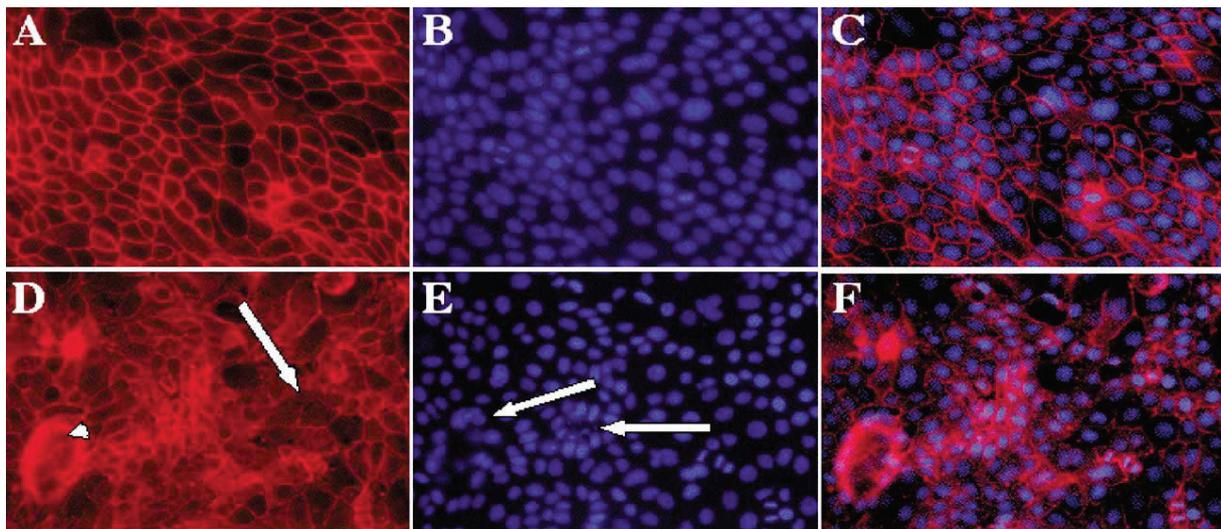


Figure 2.14 : Photo par microscopie à fluorescence de cellules épithéliales entériques infectées (D, E, F) ou non (A, B, C) par le *Cryptosporidium*. Les protéines ZO-1 reliées aux jonctions serrées sont marquées en rouge et les noyaux des cellules en bleu. Les flèches sur la photo D montrent les ruptures des jonctions serrées consécutives à l'infection et celles de la photo E des exemples de cellules apoptotiques caractérisées par une condensation de la chromatine, une réduction de la taille des noyaux et leur fragmentation (Buret *et al.*, 2003).

Il est également à noter qu'une réponse de type immunitaire a également été observée *in vitro*. En effet, Laurent *et al.* ont montré que des cellules HCT-8 et Caco-2 infectées par des oocystes de *C. parvum* libèrent des cytokines pro-inflammatoires notamment de l'interleukine-8 (IL-8) (Laurent *et al.*, 1999). Cette cytokine est généralement impliquée dans la réponse immunitaire de cellules épithéliales en contact avec des micro-organismes. Une autre cytokine pro-inflammatoire libérée est l'interféron IFN- γ , qui induirait une résistance directe des entérocytes contre l'infection à *C. parvum* (Pollok *et al.*, 2001). Ces données ont été observées aussi bien *in vivo* qu'*in vitro*.

Puis, l'équipe de Maillot a montré que des cellules Caco-2 infectées par le *C. parvum* émettent non seulement de l'IL-8 mais également du facteur de croissance de transformation β (TGF- β). Cette observation est concomitante avec d'autres résultats sur l'infection de cellules entériques par la bactérie entéropathogène *Escherichia coli* (Choi *et al.*, 2013). Le TGF- β est une cytokine anti-inflammatoire qui régule la réparation de l'épithélium muqueux. Le TGF- β limite la nécrose cellulaire et l'augmentation de la perméabilité paracellulaire induite par le parasite. Ce résultat est à mettre en relation avec une régulation de l'expression des protéines ZO-1 et Claudine-1, toutes deux associées aux jonctions serrées et donc au trajet paracellulaire (Howe *et al.*, 2005).

2.4 Modèle électrique du système physique

2.4.1 Description et limites du modèle électrique choisi : le circuit équivalent

Nous avons vu que la réponse en impédance de notre système est une combinaison de la contribution de plusieurs éléments influençant le champ électrique d'une manière caractéristique. Le but de notre modèle électrique est de les distinguer afin d'extraire la contribution des cellules HCT-8 infectées par le *Cryptosporidium parvum* et de quantifier électriquement ces processus d'infection au cours du temps.

La sollicitation électrique que nous avons appliquée à notre système consiste à polariser nos électrodes en leur appliquant une tension alternative à des fréquences comprises entre 100Hz et 1MHz. Suivant la fréquence utilisée, les contributions en impédance des éléments peuvent évoluer selon leurs propriétés physico-chimiques. En conséquence, leur influence sur la réponse électrique totale évolue également. Afin d'identifier et quantifier ces contributions, nous avons choisi de procéder à une modélisation de notre système par circuit équivalent.

Une modélisation par circuit équivalent est une méthode analytique consistant à déterminer un circuit électrique théorique ayant toutes les caractéristiques électriques d'un système donné. Ainsi, son impédance sera comparable à celle du système mesuré quelle que soit la fréquence d'étude. Ce circuit théorique consiste en une association de composants électriques en série et/ou en parallèle. Leur identification et leur quantification permet ainsi d'analyser la contribution de chaque élément constitutif du système. Cette méthode a été maintes fois utilisée pour des analyses d'impédance sur des cultures cellulaires (Abdur Rahman *et al.*, 2007; Mamouni et Yang, 2011; Meissner *et al.*, 2011; Wegener *et al.*, 1996)

En pratique, une réponse en impédance pour un système électrode-matériau donné peut être analysée par un circuit électrique équivalent déterminé d'une manière relativement empirique. Puis, les paramètres de ce circuit peuvent être estimés et son impédance comparée aux données expérimentales. Cette estimation des paramètres peut s'effectuer en utilisant une méthode des moindres carrés non-linéaire, dont un exemple est décrit dans le chapitre 3 (cf. 3.4.3).

Ce modèle possède des limites. D'une part, il n'existe pas un unique circuit équivalent permettant la modélisation d'un système. En effet, un circuit équivalent avec au moins trois paramètres peut être réarrangé de différentes manières tout en fournissant la même impédance. Or, si deux circuits équivalents différents apportent deux impédances égales, leurs composants seront nécessairement différents, qualitativement ou quantitativement (Barsoukov et Macdonald, 2005; McAdams et Jossinet, 1996). Un exemple est donné dans la figure 2.15. Ainsi se pose la question : quel circuit choisir ? Des éléments de réponse peuvent être apportés en comparant cette mesure en impédance à d'autres effectuées dans des conditions différentes et également à partir de l'intuition du chercheur concernant les propriétés et phénomènes physico-chimiques du système (Barsoukov et Macdonald, 2005; McAdams et Jossinet, 1996).

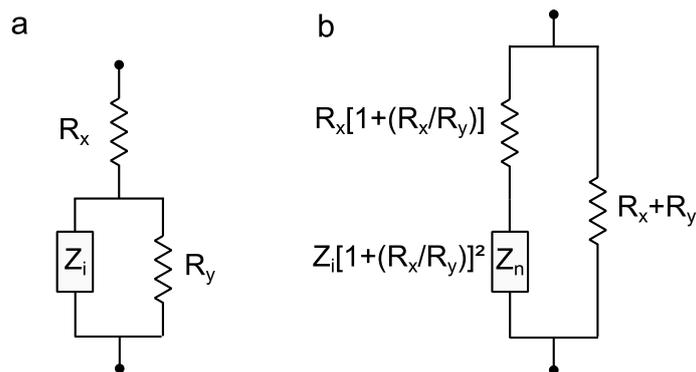


Figure 2.15 : Exemples de circuits équivalents présentant la même impédance quelle que soit la fréquence de la tension alternative appliquée.

Une autre limite de ce système réside dans le fait que les résultats obtenus présentent de possibles ambiguïtés d'interprétation. En effet, un circuit équivalent incluant seulement les composants électriques standard que sont la résistance, la capacité et l'inductance (cf. définitions dans la partie 2.4.2) aura des comportements fréquentiels idéaux. Or, les matériaux réels, comme un tapis cellulaire ou une surface d'électrode, présentent des propriétés à l'échelle microscopique distribuées dans l'espace, dont la modélisation par ces composants électriques standards se révèle inadéquate (Barsoukov et Macdonald, 2005; McAdams et Jossinet, 1996). Il a ainsi été montré que l'utilisation d'éléments plus complexes comme l'élément à phase constante (CPE voir 2.4.2.4) dans le circuit équivalent facilite le processus de modélisation mais complexifie l'interprétation des résultats (Barsoukov et Macdonald, 2005; McAdams *et al.*, 1995; McAdams et Jossinet, 1996).

Pour conclure, Mac Donald disait que « un modèle physico-chimique détaillé est toujours préférable à un circuit équivalent pour des fins de modélisation, puisque de tels modèles ne peuvent souvent correspondre à des circuit équivalents impliquant des composants électriques standards. Néanmoins, la plupart des mesures par EIS impliquent des problèmes [au niveau] quantique qui ne peuvent être résolus actuellement à l'échelle microscopique. Ainsi, on doit généralement se satisfaire de modèles continus plus simples comme la modélisation par circuit équivalent ». (Macdonald, 1992)

2.4.2 Description des composants électriques du circuit équivalent

L'objectif de cette partie est de définir les composants électriques qui seront utilisés dans la modélisation par circuit équivalent.

2.4.2.1 Résistance R et constante de cellule

Nous avons vu qu'une résistance R modélise un conducteur parfait (2.2.1). Considérons donc un conducteur parfait, de conductivité σ ($S.m^{-1}$), de longueur l (m) et de section surfacique S (m^2). Sa résistance R se détermine suivant la formule :

$$R = \frac{1}{\sigma} \frac{l}{S} \quad (2.27)$$

Expérimentalement, cette formule dépend cependant des électrodes avec lesquelles cette mesure est faite. Si celles-ci présentent par exemple une large section surfacique S par rapport à leur longueur l , cette

formule peut être utilisée. Plus généralement, celle-ci n'est valable que dans le cas idéal où la forme géométrique du système électrode-matériau (ou électrode-électrolyte) vérifie les hypothèses suivantes :

- Le champ électrique est uniforme sur la longueur du matériau (ou électrolyte)
- Les effets de bord aux électrodes peuvent être négligés.

Or, les électrodes interdigitées coplanaires avec lesquelles nous effectuons nos mesures d'impédance ne vérifient ni l'hypothèse d'uniformité du champ, tel que l'illustre la figure 2.16, ni l'hypothèse de l'absence d'effets de bord (Olthuis *et al.*, 1995).

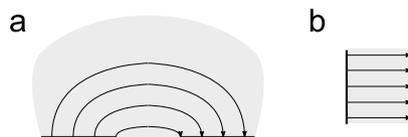


Figure 2.16 : Comparaison des champs électriques induits par des électrodes interdigitées coplanaires avec deux doigts, qui est fortement hétérogène (a), et par deux électrodes l'une en face de l'autre, uniforme (b).

En conséquence, afin de pouvoir calculer la résistance du matériau/de électrolyte en utilisant des électrodes aux géométries complexes, il est nécessaire d'introduire un facteur géométrique dépendant des dimensions du capteur appelé constante de cellule et noté K (m^{-1}). R peut alors se déterminer suivant la formule :

$$R = \frac{\kappa}{\sigma} \quad (2.28)$$

La valeur de K peut être déterminée de 2 façons :

- Expérimentalement : la valeur de la résistance mesurée est multipliée par la valeur de conductivité du matériau/de électrolyte mesuré avec un conductimètre, suivant ainsi l'équation (2.28).
- Théoriquement : Van Gerwen *et al.* ont établi une formule basée sur une transformée conforme dite de Schwarz-Christoffel (Olthuis *et al.*, 1995). Une transformée conforme consiste à modifier la forme d'un plan pour simplifier certains calculs en utilisant des rotations, des redimensionnements, des étirements ou des courbures. En l'occurrence, la transformée de Schwarz-Christoffel permet de changer le demi-plan au-dessus des électrodes présenté dans la figure 2.16a en un rectangle tel que présenté dans la figure 2.16b dans lequel les calculs de résistance et de capacité sont simplifiés. Cette formule a été développée pour être appliquée à un réseau circulaire d'électrodes interdigitées par Houssin *et al.* (Houssin *et al.*, 2010) :

$$\kappa = \frac{1}{2 \sum_{i=1}^{N-1} R \sqrt{1 - \left(\frac{i(L_{el} + E_{el})}{R}\right)^2}} \frac{K(k)}{K(\sqrt{1 - k^2})} \quad (2.29)$$

Avec K la constante de cellule (en m^{-1}), N le nombre de doigt, R le rayon du réseau circulaire (en m), L_{el} la largeur de chaque doigt (en m) et E_{el} l'espacement entre eux (en m). $K(k)$ et k désignent respectivement l'intégrale elliptique complète du 1^{er} ordre et le module et ne doivent pas être confondus avec la constante de cellule K (kappa). Le module k a pour expression :

$$k = \cos\left(\frac{\pi}{2} \frac{L_{el}}{L_{el} + E_{el}}\right) \quad (2.30)$$

$K(k)$ n'a pas de solution analytique mais il peut être utile d'en avoir des approximations numériques afin d'obtenir une valeur de constante de cellule. Hilberg en décrivait plusieurs méthodes, dépendante de la valeur de k^2 (Hilberg, 1969). Introduisons la variable k' telle que :

$$k' = \sin\left(\frac{\pi}{2} \frac{L_{el}}{L_{el} + E_{el}}\right) \quad (2.31)$$

Ainsi, pour $0 < k^2 < 0,5$, nous obtenons l'approximation suivante :

$$\frac{K(k)}{K(k')} = \frac{\pi}{\ln\left(2 \frac{1 + \sqrt{k'}}{1 - \sqrt{k'}}\right)} \quad (2.32)$$

Et pour $0,5 < k^2 < 1$:

$$\frac{K(k)}{K(k')} = \frac{1}{\pi} \ln\left(2 \frac{1 + \sqrt{k}}{1 - \sqrt{k}}\right) \quad (2.33)$$

2.4.2.2 Condensateur de capacité C

D'un point de vue fondamental, un condensateur d'une capacité C est un élément capable de stocker des charges. Un condensateur est créé dès que deux conducteurs sont séparés par un diélectrique. L'unité de C est le Farad (F).

Considérons deux armatures conductrices, de surface S (m²) et séparées d'une distance d (m) par un diélectrique parfait, de permittivité relative ϵ_r . La valeur de C se détermine à partir de la formule suivante :

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{S}{d} \quad (2.34)$$

Où ϵ_0 correspond à la permittivité du vide ($8,54187.10^{-12}$ F.m⁻¹). Similairement au calcul d'une résistance, cette formule n'est valable que dans le cas où les armatures présentent une géométrie permettant de considérer un champ électrique uniforme et de négliger les effets de bord. Pour les géométries plus complexes auxquelles ces hypothèses ne s'appliquent pas, la formule (2.34) peut être adaptée pour inclure la constante de cellule K (m⁻¹) définie au 2.4.2.1 :

$$C = \epsilon_0 \epsilon_r \frac{1}{K} \quad (2.35)$$

2.4.2.3 Inductance L

D'un point de vue général, l'inductance d'un circuit électrique traduit le fait qu'un courant le traversant crée un champ magnétique à travers la section entourée par ce circuit. L'inductance est ainsi égale au quotient de ce flux magnétique par l'intensité du courant le traversant. L'unité de l'inductance est le Henry (H).

Par extension, une inductance désigne tout composant électrique qui par sa construction à une valeur d'inductance. Ces composants peuvent être des bobines (ou selfs) mais également des câbles.

L'impédance d'une inductance Z_L se détermine à partir de la formule suivante :

$$Z_L = jL\omega \quad (2.36)$$

2.4.2.4 Élément à phase constante CPE

Comme nous l'avons vu, les composants électriques standards que sont la résistance, le condensateur et l'inductance modélisent des comportements électriques idéaux. Ils sont ainsi souvent inadaptés pour reproduire la réponse en impédance de matériaux réels ou d'objets biologiques à toutes les fréquences. Une meilleure corrélation peut souvent être obtenue en utilisant des composants empiriques non-idéaux, i.e. dont le comportement dépend de la fréquence. Plus particulièrement, cette dépendance fréquentielle peut être modélisée de sorte que la phase de la fonction d'impédance soit indépendante de la fréquence. Un tel élément est appelé Élément à Phase Constante (CPE).

Son origine remonte aux travaux qui ont été faits pour développer le modèle dit de Debye concernant les phénomènes de relaxation se produisant dans un matériau diélectrique. Celui-ci se base sur l'hypothèse que les phénomènes de polarisation (voir 2.2.2.2) ne sont gouvernés que par des cinétiques de premier ordre, sans prendre en compte les forces de rappel visqueuses, et présentent donc un unique temps de relaxation. Ceci se traduit par la formule de Debye :

$$\varepsilon(\omega) - \varepsilon_\infty = \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} \quad (2.37)$$

Où ε_s est la permittivité statique du matériau (en F.m⁻¹), ε_∞ sa permittivité en hautes fréquences (en F.m⁻¹) et τ son temps de relaxation (en s) (voir définitions dans le paragraphe 2.2.2.2).

En pratique, peu de systèmes vérifient cette équation avec exactitude. Des efforts ont ainsi été effectués pour étendre le modèle de Debye à des matériaux présentant plusieurs temps de relaxation. Ainsi, en utilisant une distribution de temps de relaxation appropriée, il est possible de modéliser la réponse plus complexe de la plupart des matériaux diélectriques réels.

Soit $G(\tau)$ une fonction de distribution de temps de relaxation. La formule générale adaptant le modèle de Debye pour inclure une distribution de temps de relaxation s'écrit :

$$\varepsilon(\omega) - \varepsilon_\infty = \int_0^\infty \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + j\omega\tau} G(\tau) d\tau \quad (2.38)$$

Parmi les fonctions de distribution existantes, une des plus utilisées est celle proposée par Cole et Cole (Cole et Cole, 1941) pour décrire la dépression du demi-cercle du diagramme de Nyquist observée lors de mesures effectuées sur une grande variété d'électrolytes en comparaison au diagramme de Nyquist d'un circuit RC parallèle (voir 2.2.5.3), telle que l'illustre la figure 2.17.

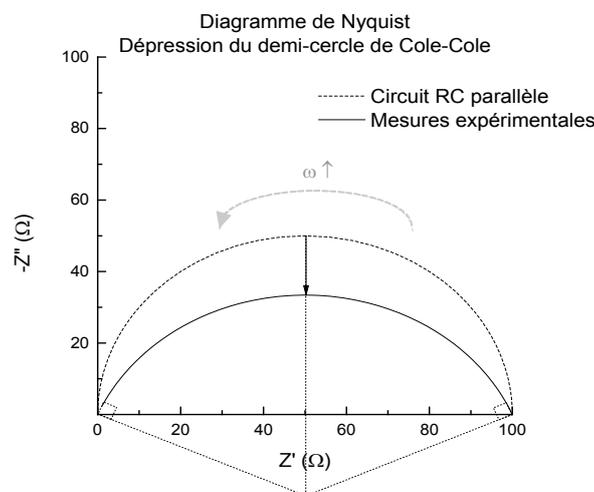


Figure 2.17 : Illustration d'un diagramme de Nyquist d'un circuit RC parallèle et de la dépression du demi-cercle observée par Cole et Cole pour des mesures sur des électrolytes.

La formule de Cole-Cole décrit une distribution de type gaussienne de temps de relaxation, centrée sur un temps de relaxation τ , qui s'écrit :

$$\varepsilon(\omega) - \varepsilon_\infty = \frac{\varepsilon_s - \varepsilon_\infty}{1 + (j\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad (2.39)$$

Où le paramètre α définit la largeur de cette fonction gaussienne. Cole et Cole signalèrent alors que la réponse diélectrique décrit par cette équation peut être décomposée en un circuit équivalent. En effet, en multipliant chaque membre par la constante de cellule K , nous obtenons :

$$C(\omega) = C_1 + \frac{C_2}{1 + (j\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad (2.40)$$

Avec $C(\omega) = K\varepsilon(\omega)$, $C_1 = K\varepsilon_\infty$ et $C_2 = K(\varepsilon_s - \varepsilon_\infty)$. Si nous définissons $\tau = (PC_2)^{1/(1-\alpha)}$, où R désigne une constante, et que nous multiplions les deux membres par $j\omega$, alors nous obtenons :

$$Y(\omega) = j\omega C_1 + \frac{j\omega C_2}{1 + PC_2(j\omega)^{1-\alpha}} \quad (2.41)$$

Avec $Y(\omega)$ correspondant à l'admittance du circuit équivalent (égale à $1/Z(\omega)$) représenté figure 2.18, contenant un CPE, celui-ci ayant pour impédance :

$$Z_{CPE} = \frac{1}{P(j\omega)^n} \quad (2.42)$$

Où n (égal à α) correspond à l'indice du CPE (sans unité) et P son amplitude (en S.sⁿ). Cet élément comprend une partie réelle Z'_{CPE} et une partie imaginaire Z''_{CPE} qui ont pour forme :

$$Z'_{CPE} = \frac{1}{P\omega^n} \cos\left(n\frac{\pi}{2}\right) \quad (2.43)$$

$$Z''_{CPE} = \frac{1}{P\omega^n} \sin\left(n\frac{\pi}{2}\right) \quad (2.44)$$

L'indice n est compris entre -1 et 1 et nous pouvons remarquer que :

- Si $n = 1$: le CPE devient une capacité
- Si $n = 0$: le CPE devient une résistance
- Si $n = -1$: le CPE devient une inductance

Enfin, nous pouvons ajouter que la loi de Fricke (Grimnes et Martinsen, 2000) permet de relier la phase φ du CPE et son indice n avec la formule :

$$\varphi = n\frac{\pi}{2} \quad (2.45)$$

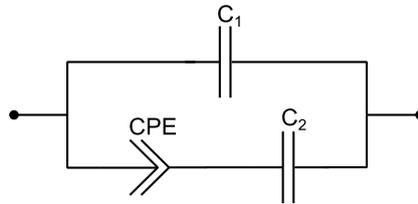


Figure 2.18 : Circuit équivalent à l'équation (2.41) correspondant au modèle de Cole-Cole.

2.4.2.5 Tableau récapitulatif

Le tableau 2.2 présente pour chaque élément de circuit équivalent le symbole associé et rappelle les formules permettant le calcul de leur valeur et de leur impédance.

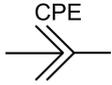
Élément	Symbole	Valeur	Impédance
Résistance		$R = \frac{\kappa}{\sigma}$	$Z_R(\omega) = R$
Capacité ou condensateur		$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{\kappa}$	$Z_C(\omega) = \frac{1}{jC\omega} = -j \frac{1}{C\omega}$
Inductance		Dépendante du composant considéré (Grover, 2004)	$Z_L(\omega) = jL\omega$
Élément à phase constante CPE		-	$Z_{CPE} = \frac{1}{P(j\omega)^n}$

Tableau 2.2 : Représentation et formules associées aux éléments électroniques standards.

Avec : K : constante de cellule (m^{-1}), facteur géométrique dépendant des dimensions du capteur (voir 2.4.2.1).

σ : conductivité du système étudié (en $S.m^{-1}$)

ϵ_r et ϵ_0 : respectivement la permittivité relative du système et la permittivité du vide ($8,54187.10^{-12}F.m^{-1}$).

2.4.3 Représentation par circuit équivalent

Précédemment, nous avons présenté notre modèle physique (voir 2.1). Ce modèle physique correspond à un ensemble d'éléments qui influent la réponse en impédance électrique du système. Ces éléments peuvent être associés à un composant électrique tandis que leurs interrelations peuvent être interprétées comme un montage en série ou en parallèle. La figure 2.19 présente ainsi le circuit équivalent avec lequel nous avons associé notre modèle physique.

Dans la partie suivante, nous justifierons le choix de chacun de ces composants. Nous mettrons une emphase particulière sur les éléments qui peuvent potentiellement être modifiés lors de l'infection des cellules HCT-8 au *C. parvum* au regard du modèle biologique.

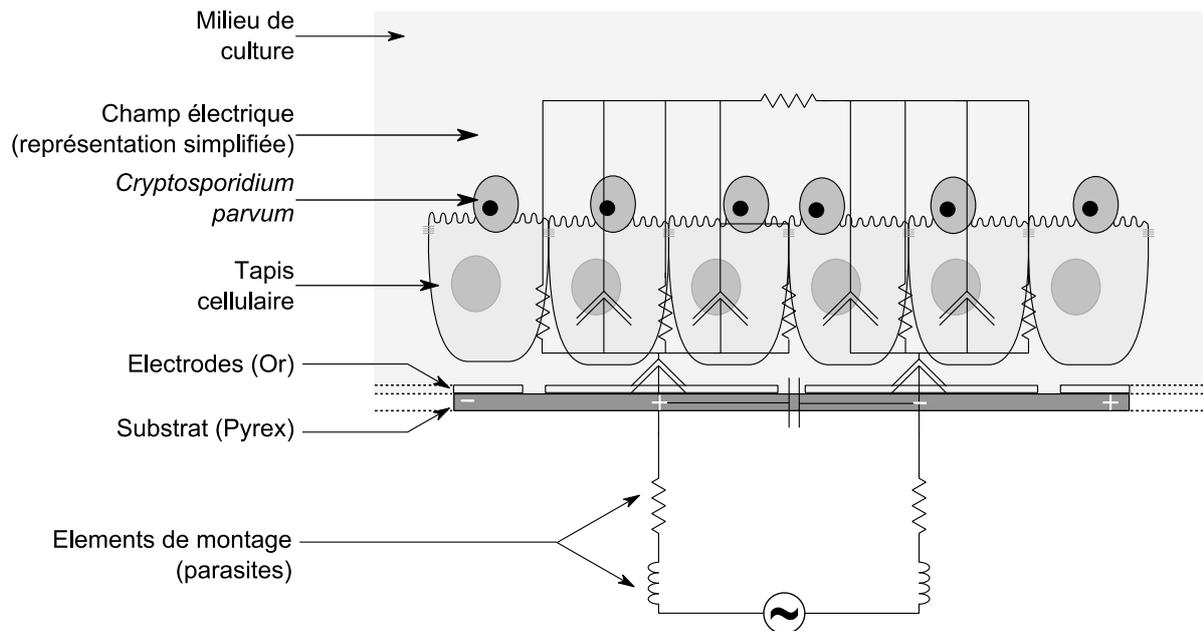


Figure 2.19 : Modélisation par circuit équivalent du modèle physique

2.4.4 Justification du choix de notre circuit équivalent

2.4.4.1 Interface électrode-milieu (ou électrode-électrolyte)

Considérons d'abord les phénomènes se déroulant à l'interface électrode-milieu (un électrolyte, voir plus de détails au 2.4.4.2). La nature de ces phénomènes dépend de la tension appliquée aux électrodes. Dans le cadre de cette thèse, la tension que nous appliquerons est de 10mV. Nos électrodes étant en or, cette tension est suffisamment faible pour les considérer comme polarisables, i.e. il n'existe pas d'interaction de nature chimique entre le métal et l'électrolyte. Par conséquent, nous pouvons négliger les phénomènes d'échanges (ou transferts) de charges entre l'électrode et l'électrolyte, créant un courant appelé faradique, ainsi que l'impédance lié à la diffusion de ces charges appelée impédance de Warburg. De même, nous pouvons négliger les phénomènes d'adsorption chimiquement spécifique d'ions directement à la surface de l'électrode. Plus de détails sur les phénomènes chimiques au niveau de l'interface électrode-électrolyte peuvent être trouvés dans la littérature (Barsoukov et Macdonald, 2005; Grimnes et Martinsen, 2000).

Lorsqu'une électrode de métal polarisée est immergée dans une solution ionique, les charges de celle-ci se déplacent en raison des interactions électrostatiques avec les charges du métal, créant un champ électrique. Les charges mobiles de l'électrolyte se distribuent ainsi sur ce champ tandis que les charges du métal restent confinées à la surface de l'électrode.

Les molécules du solvant de l'électrolyte, dans notre cas l'eau, sont également influencées par ce champ. La molécule H₂O est un dipôle, qui est libre de s'orienter et de se déplacer sous l'influence de ce champ électrique. Ainsi, une couche de molécules d'eau, appelée couche d'hydratation, se crée à la surface de l'électrode par attraction électrostatique avec les charges du métal. Cette couche est également appelée couche de Helmholtz interne. Les molécules d'eau vont également être attirées par les charges présentes dans l'électrolyte pour former une couche d'hydratation autour d'elle. Parmi ces charges hydratées, les plus proches de l'électrode polarisée (de charge opposée à la leur) vont former une couche à son voisinage, appelée couche de Helmholtz externe. Ainsi, les charges de l'électrode se retrouvent à une certaine

distance, déterminée par l'épaisseur des couches d'hydratation, d'une couche de charges de l'électrolyte de signe opposée : ces charges se répartissent donc d'une manière comparable à celle d'un condensateur et forme la capacité dite de Helmholtz. Puis, à une distance plus éloignée de l'interface, une couche diffuse d'ions hydratés se crée également dans l'électrolyte. Cette couche porte le nom de Gouy-Chapman et cette répartition des charges crée la capacité du même nom.

Ainsi, la répartition des charges à l'interface électrode-électrolyte créent deux couches de charges, l'une compacte et l'autre diffuse, dont l'ensemble se nomme double couche électrique. Celle-ci peut être modélisée théoriquement par deux capacités en série (de Helmholtz et de Gouy-Chapman), qui peuvent être regroupées en une seule appelée capacité de Stern. Ce phénomène de double couche électrique est illustré sur la figure 2.20a.

Expérimentalement, la réponse en impédance de la double couche ne peut cependant pas être toujours modélisée par une capacité car elle présente généralement une phase légèrement inférieure à 90° . Ce phénomène a été expliqué par la nature fractale, i.e. non parfaitement lisse, de la surface de l'électrode, autant au niveau micrométrique que nanométrique (Jorcin *et al.*, 2006), induisant une distribution de propriétés résistives et capacitives. Ce caractère fractal peut être issu d'une déposition de protéines (McAdams *et al.*, 1995) ou d'une rugosité/porosité de surface (De Levie, 1965). Afin de décrire simplement la porosité de l'électrode, De Levie fut le premier à proposer un modèle d'impédance d'un creux d'électrode en forme de V, composé d'un montage de capacité et de résistance comparable à celui d'une ligne de transmission (voir figure 2.20b). Ce modèle fut maintes fois amélioré, notamment par Scheider *et al.* (Scheider, 1975), qui aboutit à la conclusion qu'un CPE modélise de la manière la plus fidèle l'interface électrode-électrolyte. Ivorra *et al.* (Ivorra *et al.*, 2005) ont ajouté que si ces irrégularités sont vues comme des trous, alors l'utilisation d'un CPE, dont les paramètres sont dépendants de la fréquence, peut s'expliquer intuitivement (voir figure 2.20c): à mesure que la fréquence augmente, la surface de l'électrode « vue » par le courant est réduite induisant une diminution de la capacité, proportionnelle à la surface ; par ailleurs, le courant réduit sa profondeur de pénétration à l'intérieur du trou impliquant une diminution de sa composante résistive.

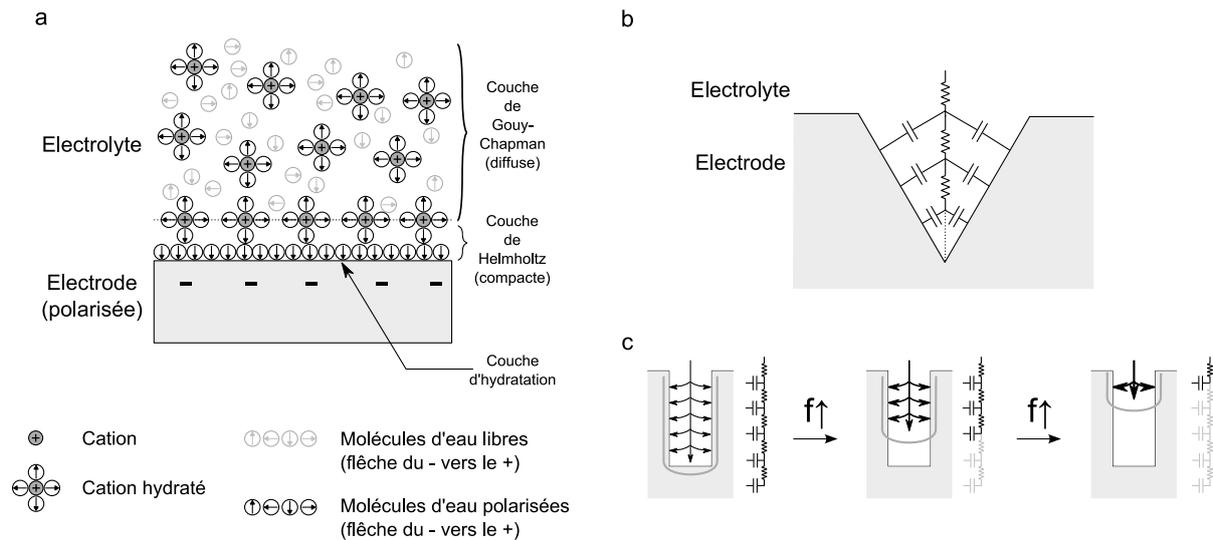


Figure 2.20 : Représentation schématique de l'interface d'une électrode de métal plongée dans un électrolyte. (a) Lorsque l'électrode est polarisée négativement, les cations s'organisent à l'interface électrode-électrolyte en deux couches : la couche de Helmholtz (compacte) et la couche de Gouy-Chapman (diffuse), toutes deux pouvant être modélisées comme des capacités. La combinaison des deux capacités, montées en série, en une seule s'appelle la capacité de Stern. (b) Modèle de De Levie d'un trou en forme de V à la surface de l'électrode induisant une distribution de résistance et de capacité sous forme de ligne de transmission (De Levie, 1965) (c) Représentation de la dépendance fréquentielle de l'impédance du trou : lorsque la fréquence augmente, le courant tend à circuler sur les zones les plus externes du trou, réduisant la capacité effective et la résistance (Ivorra *et al.*, 2005).

2.4.4.2 Milieu de culture

En augmentant la fréquence, la double-couche est court-circuitée et le volume du milieu de culture alors sondé. Dans notre système, les dimensions des doigts des REIP sont suffisamment faibles par rapport à la hauteur du puits de culture pour que nous puissions considérer ce volume comme semi-infini.

Par définition, le milieu de culture est un support de culture de cellules, dont la composition doit reproduire aussi fidèlement que possible les conditions de l'environnement que les cellules trouvaient *in vivo*. Le milieu de culture est composé d'ions libres et est donc un électrolyte. La présence de porteurs de charges ioniques permettant la conduction du courant, le milieu agit comme une résistance électrique.

Bien qu'une solution ionique agisse comme une résistance sur une large gamme de fréquences, elle se comporte comme une capacité à des fréquences plus élevées, auxquelles les charges ioniques n'ont pas le temps de suivre les changements de direction du champ électrique. Il s'agit donc d'un phénomène de relaxation. L'électrolyte devrait donc être modélisé comme un circuit RC en parallèle. Nous allons néanmoins montrer que ce n'est pas le cas à nos fréquences d'étude, inférieures au 1MHz

Déterminons la fréquence de relaxation f_{milieu} de ce phénomène. A partir de l'équation de la fréquence de relaxation d'un circuit RC en parallèle (équation (2.26) voir (2.2.5.3)) et de celles donnant l'expression de R (2.28) et de C (2.35), nous pouvons en déduire l'expression de f_{milieu} suivante :

$$f_{milieu} = \frac{\sigma_{milieu}}{\epsilon_0 \epsilon_r} \quad (2.46)$$

Avec σ_{milieu} la conductivité du milieu (en S.m⁻¹), ϵ_r sa permittivité diélectrique relative et ϵ_0 la permittivité du vide (8,54187.10⁻¹² F.m⁻¹). Considérons des valeurs standards de conductivité et de permittivité de

milieu de culture, respectivement $1,5\text{S.m}^{-1}$ et 80 (Huang *et al.*, 1997). f_{milieu} est égale 2.2GHz et donc de plusieurs ordres de grandeur supérieures à nos fréquences d'étude.

En conclusion, ce phénomène de relaxation n'apparaît pas à nos fréquences et nous pouvons modéliser le milieu de culture par une résistance seule.

2.4.4.3 Eléments parasites

Nous désignons par éléments parasites les éléments du signal qui sont liés à l'instrumentation et non pas au système électrode-électrolyte. Nous pouvons ainsi en distinguer de plusieurs sortes :

- Les câbles : comme nous l'avons vu au 2.4.2.3, les câbles ont un comportement inductif et peuvent donc être modélisés comme une inductance. Leur valeur peut être calculée par la formule suivante (Grover, 2004):

$$L = 2 * 2l \left(\ln \left(\frac{2l}{d(1+x)} \right) - x + \frac{\mu}{4} + \frac{d}{2l} \right) \quad (2.47)$$

où l désigne la longueur des câbles (m), d leur diamètre (m), μ la perméabilité magnétique relative du matériau (sans unité). x est défini tel que :

$$x = \sqrt{1 + \left(\frac{d}{2l} \right)^2} \quad (2.48)$$

- Le substrat des électrodes : le substrat que nous avons utilisé est du Pyrex. Sa résistivité électrique étant très élevée ($4.10^8\Omega.m$ (Elert, 2004)), comparée à l'or par exemple ($2,44.10^{-8}\Omega.m$ (Matula, 1979)), celui-ci se comporte comme un diélectrique. Il peut donc être modélisé comme une capacité (Borkholder, 1998).
- Le circuit imprimé : le circuit imprimé et les soudures, composés de matériaux conducteurs, auront également un comportement résistif. Or, d'après la figure 2.19, ceux-ci se retrouvent en série avec la résistance modélisant le milieu de culture. Elles peuvent donc être combinées en une seule et même résistance afin de simplifier notre circuit équivalent.

2.4.4.4 Les cellules

❖ Modèle de la cellule unique

Une cellule eucaryote est composée d'une membrane et d'un cytoplasme qui comprend le cytosol, des organites avec leur propre membrane et le noyau avec son enveloppe.

D'un point de vue électrique, la conductivité du cytoplasme est dominée par le cytosol, qui est fortement conducteur, avec une conductivité pouvant aller jusqu'à 1S.m^{-1} (Pethig et Markx, 1997). Il peut être modélisé au premier ordre par une résistance.

La membrane des cellules est composée d'une double couche lipidique. Les lipides sont des molécules amphiphiles car elles comprennent une tête hydrophile et une queue hydrophobe. La tête est orientée vers l'extérieur de la membrane, en contact soit avec le cytoplasme soit avec l'extérieur de la cellule, et la queue vers l'intérieur. D'une épaisseur comprise entre 5 et 10nm, l'intérieur de celle-ci est très faiblement conducteur, avec une conductivité de 10^{-7}S.m^{-1} (Pethig et Markx, 1997). Plongée dans un milieu de culture, la membrane sépare donc deux milieux conducteurs, à savoir le milieu de culture et le cytoplasme, par un milieu diélectrique. Elle peut donc être modélisée par une capacité, dont la valeur est approximativement

$1\mu\text{F}\cdot\text{cm}^{-2}$ (Pethig et Markx, 1997). Au premier ordre, les membranes des organites et du noyau de la cellule peuvent être négligées.

Enfin, la membrane des cellules ayant le comportement d'une capacité, le champ électrique aux fréquences les plus basses contournera la cellule. Ce trajet paracellulaire étant exclusivement dans le milieu de culture, il peut être modélisé comme une résistance.

En conclusion, une cellule unique peut être modélisée par une capacité, représentant la membrane, en série avec une résistance, le cytoplasme, le tout en parallèle avec une résistance modélisant le trajet paracellulaire (voir figure 2.21).

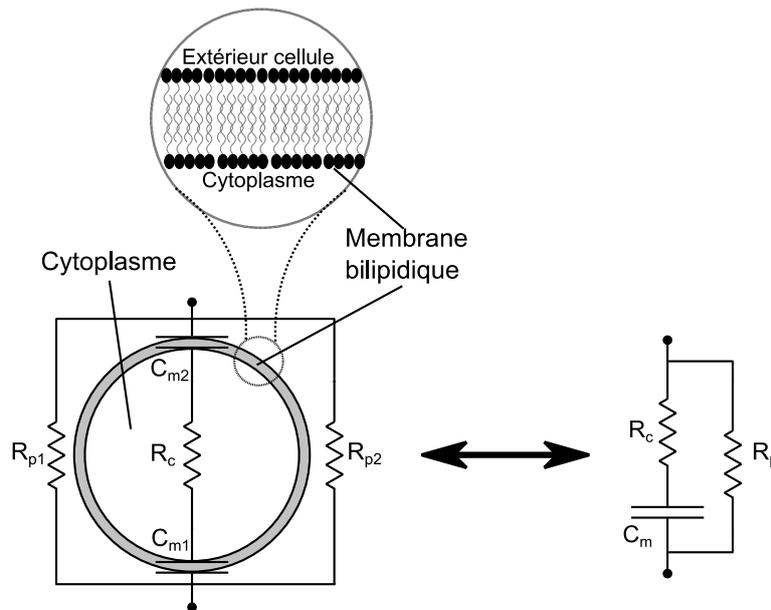


Figure 2.21: Représentation schématique d'une cellule unique et de sa modélisation électrique.

❖ Modèle du tapis cellulaire

Contrairement à la cellule unique, dont le spectre d'impédance électrique sur une certaine gamme de fréquences présente une phase de 90° correspondant à sa capacité membranaire, la réponse en impédance d'un tapis cellulaire présente une phase inférieure à 90° (McAdams et Jossinet, 1996). Ceci est dû au fait que chaque cellule possède une taille et une forme spécifiques, se traduisant à l'échelle du tapis par une forte hétérogénéité. L'anisotropie des tapis cellulaires doit par ailleurs être considérée comme une règle plutôt qu'une exception (Grimnes et Martinsen, 2000). Cette anisotropie induit une distribution des propriétés résistives et capacitives des cellules, d'une manière similaire à ce qui peut être observé à l'interface électrode-électrolyte (Schwan, 1985). En conséquence, l'utilisation d'un CPE permet une meilleure modélisation des phénomènes d'interface d'origine biophysique d'un tapis cellulaire.

Concernant la modélisation du tapis cellulaire dans sa globalité, les deux circuits équivalents présentés figure 2.22 ont la particularité d'avoir des valeurs d'impédance identiques (McAdams et Jossinet, 1996). Notre choix s'est porté sur le Circuit A car la résistance R_∞ se trouve être en série avec la résistance modélisant le milieu de culture et également avec la résistance parasite du circuit imprimé et des soudures (voir figure 2.19 et 2.4.4.3). Cela nous permet ainsi de les combiner en une seule résistance, réduisant le nombre d'éléments que contient notre circuit équivalent.

Notre modélisation du tapis cellulaire comprend donc deux éléments principaux. Le premier, une résistance, correspond au trajet paracellulaire. Celui-ci inclut les composants de nature résistive que sont le subépithélium et les jonctions intercellulaires. Le deuxième, un CPE, modélise le trajet transcellulaire, i.e. à travers les cellules. Ce composant est lié à la distribution des temps de relaxation des cellules du tapis.

Cependant aucun consensus n'a été pour l'instant fait quant à son interprétation physique et seules quelques études s'y sont intéressées. Ivorra a par exemple relié l'indice du CPE n à l'hétérogénéité des espaces extracellulaires (Ivorra *et al.*, 2005).

Nous avons vu dans le modèle biologique que le *C. parvum* induit pendant son infection de multiples effets sur les cellules-hôtes. Dans notre circuit équivalent, les deux éléments modélisant le tapis cellulaire sont donc potentiellement les plus susceptibles d'être significativement modifiés par les processus d'infection du parasite. Par ailleurs, nous avons montré qu'il existe deux types d'effet : locaux, i.e. uniquement sur la cellule infectée, et globaux, i.e. sur le tapis cellulaire. Par conséquent, nous pouvons également émettre l'hypothèse que l'importance de ces effets peut différer en fonction du nombre de cellules infectées. Par exemple, plus il y aura de cellules infectées, plus les effets locaux auront d'impact sur l'impédance.

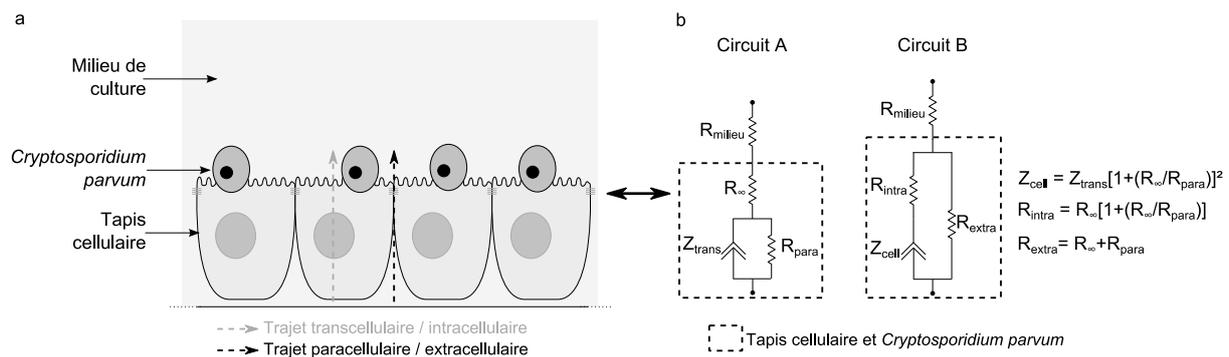


Figure 2.22 : Illustration d'un tapis cellulaire dans son milieu de culture (électrodes, substrat et phénomènes d'interface non représentés) et de son circuit équivalent. (a) Le trajet paracellulaire/extracellulaire contourne les cellules et est principalement influencé par les jonctions intercellulaires et le subépithélium tandis que le trajet transcellulaire/intracellulaire traverse les membranes des cellules. (b) Les cellules peuvent être modélisées par deux circuits équivalents donnant la même impédance quelle que soit la fréquence (McAdams et Jossinet, 1996). Le circuit A modélise le trajet transcellulaire par un CPE, le trajet paracellulaire par une résistance et le comportement à hautes fréquences également par une résistance. Le circuit B représente le trajet intracellulaire par un CPE (membrane) et une résistance (cytoplasme) et le trajet extracellulaire par une résistance. Notre choix s'est porté sur le Circuit A car la résistance des cellules à hautes fréquences R_{∞} et la résistance du milieu R_{milieu} se trouvant en série, il est possible de les combiner en une seule et de simplifier le circuit.

❖ Modèle électrique final

Nous avons présenté la modélisation de notre système global par circuit équivalent figure 2.19. Nous avons également justifié le choix de nos éléments tout en apportant la simplification de combiner les résistances du milieu de culture, du circuit imprimé et du tapis cellulaire aux hautes fréquences en une seule, que nous nommerons R_{hf} (hf = hautes fréquences). La forme finale du circuit équivalent est présentée figure 2.23.

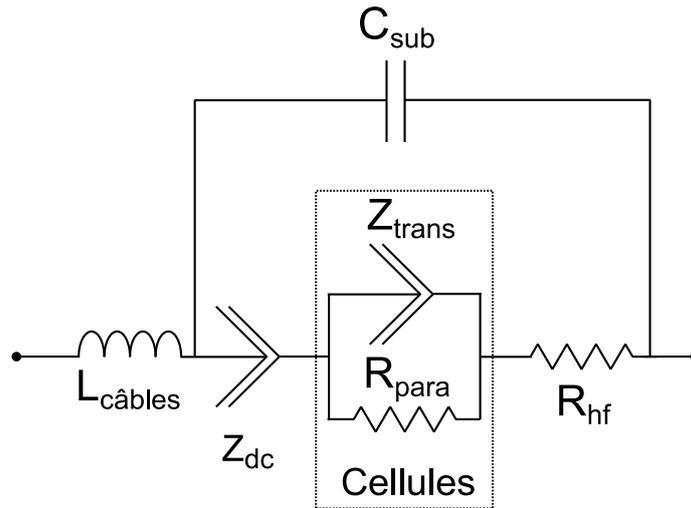


Figure 2.23: Circuit équivalent final du système

En conclusion, nous pouvons dire que la compréhension d'une réponse impédimétrique nécessite une connaissance précise du système physique étudié. D'un côté, il est important de connaître les phénomènes biologiques apparaissant lors de l'infection d'un tapis cellulaire par le *C. parvum* pour émettre des hypothèses sur les origines des modifications au niveau de l'impédance mesurée. Nous avons en effet montré qu'au cours de son développement, le *C. parvum* induit des effets sur les cellules-hôtes au niveau local, qui peuvent s'avérer prédominants si le nombre de cellules infectées est élevé, et au niveau global, qui sont susceptibles d'être significatifs même si peu de sites d'infection sont présents. D'un autre côté, la technique de l'EIS étant sensible, le signal est influencé par de nombreux éléments autres que celui qui nous intéresse, à savoir les cellules (cf. 1.3.2.3). Ainsi, une modélisation par circuit équivalent permet de distinguer leurs différentes contributions et d'isoler celle du tapis cellulaire. Néanmoins, il est nécessaire de confirmer si ce modèle est applicable pour le système que nous avons utilisé pendant cette thèse à l'aide de mesures de caractérisation.

3 ELABORATION ET CARACTERISATION ELECTRIQUE DU DISPOSITIF DE MESURE

Afin d'effectuer des mesures d'impédance électrique sur un tapis cellulaire, nous avons conçu un dispositif de mesure contenant quatre puits de culture distincts au fond desquels se trouvent un Réseau d'Electrodes Interdigitées Planaires (REIP). Le principe d'utilisation de ce dispositif consiste d'abord à introduire un certain volume de milieu de culture dans ces puits et d'y ajouter ensuite des cellules HCT-8 (issues d'un adénocarcinome iléocœcal humain). Les cellules pousseront donc sur les REIP. Comme nous l'avons vu dans le chapitre 2 (cf. 2.4.4.1), polariser les électrodes induit la création d'un champ électrique dans le milieu de culture. Notre objectif est de sonder grâce à ce champ électrique le tapis cellulaire, qui forme une couche de quelques micromètres d'épaisseur sur les électrodes. Or, la répartition des lignes de champ est influencée par la géométrie des électrodes (Van Gerwen *et al.*, 1998), qui détermine la valeur de la constante de cellule (cf. 2.4.2.1). Dans ce chapitre, nous chercherons à caractériser dans quelle mesure la géométrie choisie pour nos REIP, et donc leur constante de cellule, est adaptée pour les mesures d'impédance électrique d'un tapis cellulaire.

Dans une première partie, nous commencerons par présenter une vue d'ensemble du dispositif.

Puis, dans une seconde partie, nous discuterons des choix effectués quant à la géométrie et aux matériaux de notre dispositif de mesure. Nous étudierons d'abord la géométrie et les matériaux utilisés pour les REIP, puis pour les puits et enfin pour le dispositif de mesure dans son ensemble.

Dans une troisième partie, nous détaillerons les différentes étapes de fabrication du dispositif de mesure effectuées dans la salle blanche de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies (IEMN). Nous commencerons par présenter la conception des REIP, faites en or, sur un substrat de Pyrex, puis celle des puits de culture, réalisés dans du polydiméthylsiloxane (PDMS), ainsi que la procédure de leur collage sur le substrat et les REIP.

Dans une quatrième partie, nous présenterons le protocole utilisé pour caractériser électriquement notre dispositif de mesure. Nous montrerons d'abord une vue d'ensemble de celui-ci et aborderons ensuite chaque partie en détail :

- le banc expérimental
- les différents milieux liquides testés et la raison de ces choix
- l'analyse des mesures par un diagramme de Bode et par circuit équivalent
- l'extraction à partir des paramètres du circuit de la conductivité et de la permittivité électriques de chacun des milieux liquides. Ce dernier point nous permettra de déterminer dans quelle mesure notre dispositif nous permet de retrouver les valeurs exactes de ces propriétés, disponibles dans la littérature.

Enfin, nous analyserons dans une cinquième partie les mesures d'impédance électrique effectuées afin de caractériser notre dispositif ainsi que leur modélisation par circuit équivalent. Nous étudierons les mesures effectuées à l'air libre (sans introduire de milieux liquides), avec de l'eau déionisée (EDI), avec du tampon phosphate salin (PBS) et le milieu utilisé pour la culture de cellules HCT-8. Nous conclurons en indiquant quelle conductivité maximale du tapis cellulaire notre dispositif de mesure permet de sonder.

3.1 Vue d'ensemble du dispositif de mesure

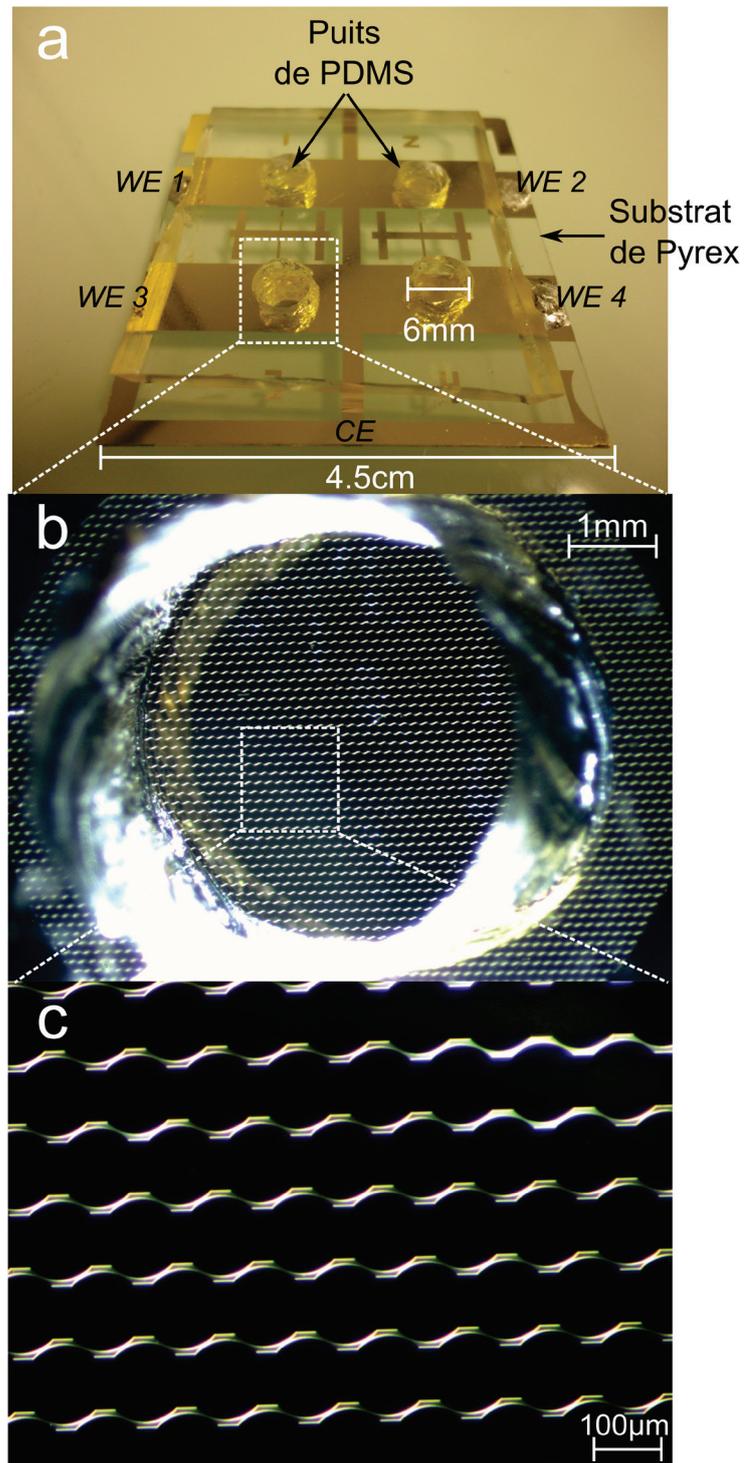


Figure 3.1 : Photos du dispositif de mesure. a) Vue complète du dispositif, contenant 4 puits de culture de polydiméthylsiloxane (PDMS) posé sur un substrat de Pyrex sur lequel sont fabriquées les électrodes d'or. WE 1, 2, 3 et 4 désignent les quatre électrodes de travail, chacune reliée à un Réseau d'Electrodes Interdigitées Planaires (REIP) différent, et CE leur contre-électrode commune. b) Vue d'un REIP au fond d'un puits de PDMS. Nous pouvons noter que son diamètre est plus grand que celui des puits. c) Agrandissement sur les électrodes interdigitées dont chaque doigt est composé de disques disposés les uns à côté des autres. En noir apparaissent les électrodes, d'une largeur moyenne L_{ei} de $100\mu\text{m}$, et en blanc l'espace entre elles E_{ei} de $7\mu\text{m}$ en moyenne.

3.2 Choix de la géométrie et des matériaux des éléments constituant le dispositif de mesure

3.2.1 Réseau d'Electrodes Interdigitées Planaires (REIP)

Un Réseau d'Electrodes Interdigitées Planaires (REIP) est une structure composée d'un nombre N d'électrodes en forme de bande (ou doigt) de taille micrométrique disposées parallèlement les unes par rapport aux autres (cf figure 3.2 et figure 3.3a). Ehret fut le premier à utiliser cette géométrie d'électrode pour mesurer l'impédance électrique de cultures cellulaires (Ehret *et al.*, 1997). Leur intérêt réside dans le fait que leur géométrie détermine la hauteur et la répartition du champ électrique induit, permettant d'ajuster la surface et l'épaisseur sondées dans le matériau sous test (ici le tapis cellulaire). Il faut noter que cette assertion est vraie si la hauteur de l'électrolyte est considérée comme infinie. Dans notre cas, nous souhaitons effectuer des mesures sur un tapis de cellules épithéliales de type HCT-8. Ce tapis s'apparente à une couche anisotrope (Grimnes et Martinsen, 2000) d'une hauteur de quelques micromètres (entre 5 et 10 μm environ pour les cellules épithéliales (Van Driessche *et al.*, 1993; Xiaoqiu Huang *et al.*, 2004)) située sur les électrodes (voir figure 3.2). Par conséquent, la géométrie de nos électrodes a été choisie en fonction de ces critères.

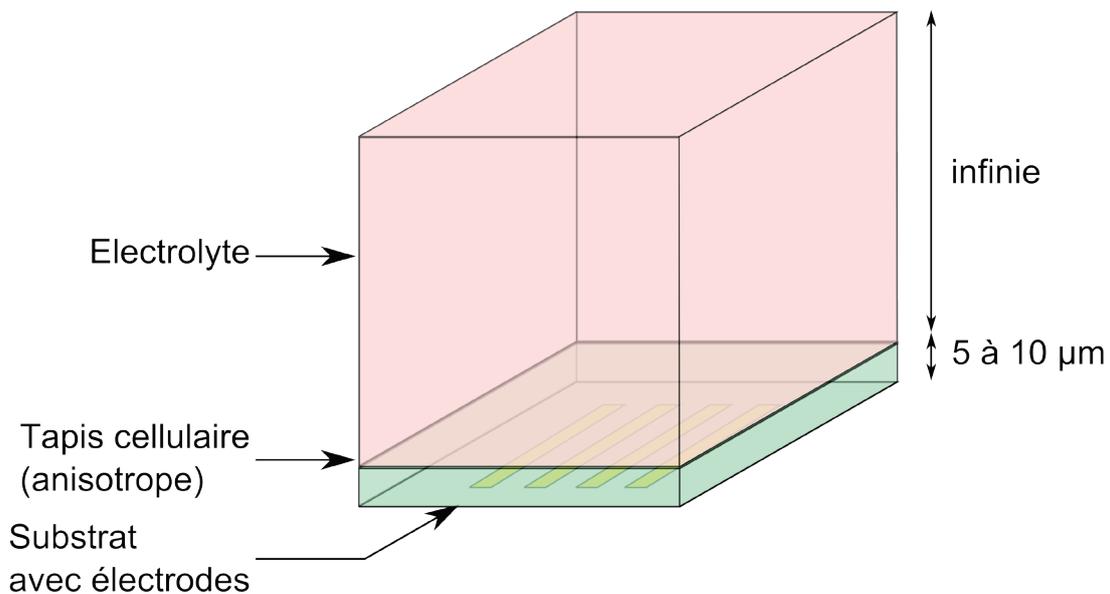


Figure 3.2 : Représentation d'un tapis cellulaire et du volume de l'électrolyte au-dessus des électrodes. Les cellules représentent une couche anisotrope de 5 à 10 μm de hauteur et la hauteur de l'électrolyte peut être considérée comme infinie par rapport à elle. Les dimensions ne sont pas à l'échelle.

Tout d'abord, afin de pouvoir sonder un tapis cellulaire de 5 à 10 μm de hauteur, nous souhaitons que nos REIP induisent un champ dont la majorité de l'énergie électrique est comprise dans cette couche. Linderholm définit la profondeur de champ P_C comme étant la hauteur à laquelle l'intensité du champ électrique est divisée par deux (Linderholm, 2006). En considérant comme infinies la longueur des doigts d'électrode et la hauteur de l'électrolyte, la profondeur de champ dépend de deux paramètres : la largeur des électrodes (L_{el}) et l'espacement entre les doigts (E_{el}). Pour notre géométrie d'électrodes, L_{el} et E_{el} sont en moyenne de 100 μm et de 7 μm respectivement. La profondeur de champ P_C peut être calculée à partir de la formule (Linderholm, 2006) :

$$P_C = \frac{L_{el} + E_{el}}{2} \sqrt{-1 - \left(\frac{L_{el}}{L_{el} + E_{el}}\right)^2} + 2 \sqrt{1 - \left(\frac{L_{el}}{L_{el} + E_{el}}\right)^2 + \left(\frac{L_{el}}{L_{el} + E_{el}}\right)^4} \quad (3.1)$$

Ce modèle nous donne une profondeur de champ de 6,04841 μm . Nous pouvons donc supposer qu'une majorité du champ sera comprise dans le tapis cellulaire.

Par ailleurs, nous souhaitons prendre en compte le caractère anisotrope du tapis grâce à deux critères. Le premier concerne la forme des doigts de nos électrodes, qui ne sont pas rectilignes mais composés de disques disposés les uns à côté des autres. Comme le montre la figure 3.3b, le champ électrique induit par de tels doigts d'électrodes possède des lignes de champ également anisotropes, permettant de sonder le tapis dans de multiples directions, contrairement au cas d'électrodes rectilignes, dont les lignes de champ induites ne permettent de sonder qu'une seule direction dans le tapis (figure 3.3a). Nous avons aussi pris en compte le fait que ce caractère anisotrope doit être considéré sur l'ensemble du tapis. Nous avons donc augmenté le nombre de doigts que notre réseau comprend afin de sonder la totalité des cellules.

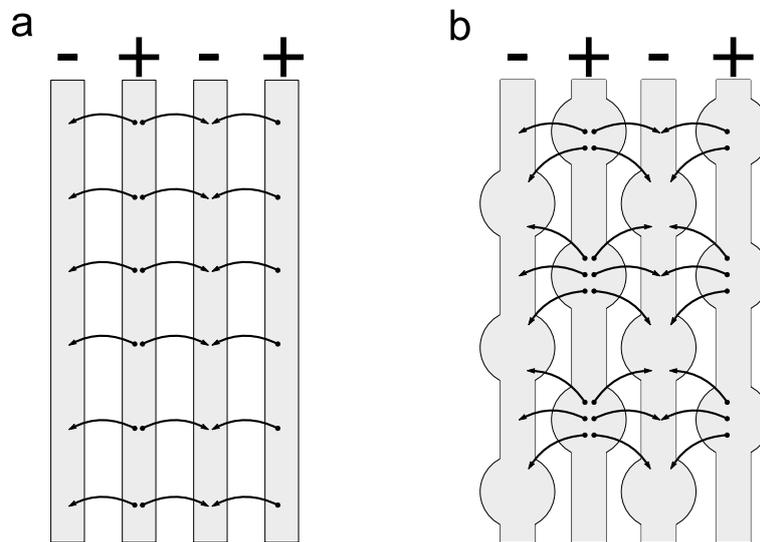


Figure 3.3 : Vue des dessus des lignes de champ induites par des électrodes interdigitées. a) Lorsque les formes des doigts sont rectilignes, les lignes de champ sont parallèles les unes par rapport aux autres. b) Lorsque les doigts sont composés de disques disposés les uns à côté des autres, les lignes de champ ne sont plus parallèles, induisant une distribution anisotrope du champ électrique.

Nous avons considéré le fait que ces électrodes constituent une surface sur laquelle des cellules seront cultivées au fond d'un puits. Les matériaux choisis pour les électrodes et le substrat sont donc déterminants quant au succès de la croissance de ces cellules. Nous avons ainsi choisi de fabriquer nos électrodes en or car nous souhaitons les considérer comme idéalement polarisables. Comme nous l'avons vu précédemment (cf. 2.4.4.1), cela nous permettra de négliger les échanges chimiques entre l'électrode et l'électrolyte, tels que des réactions d'oxydo-réduction, et donc de possibles courant faradiques. Nos mesures s'effectuent à 10mV tandis que le potentiel redox de l'or est d'environ 1,5V, ce qui nous permet de valider le fait qu'elles peuvent être considérées comme idéalement polarisables. Quant au substrat, nous avons choisi le Pyrex car des mesures d'impédance électriques sur des cellules ont déjà été réalisées avec succès dessus, confirmant son caractère biocompatible dans notre cas de figure (Böhm *et al.*, 2000). Enfin, le puits de culture étant de forme cylindrique, nous avons décidé de créer un REIP circulaire.

3.2.2 Puits

Le calcul de la constante de cellule (cf. 2.4.2.1) est basé sur l'hypothèse que la hauteur du milieu de culture est infinie par rapport aux dimensions des électrodes et à la profondeur de champ (Linderholm, 2006). Afin de satisfaire cette hypothèse, nous avons choisi de créer des puits de culture de 5mm de hauteur. Par ailleurs, nous souhaitons que toutes les cellules soient comprises dans le champ électrique induit par les électrodes. C'est pourquoi le diamètre du puits (6mm) est inférieur au diamètre du réseau circulaire d'électrodes (8mm). Le volume du puits, de forme cylindrique, est donc de 141mm^3 (ou μl) environ.

En ce qui concerne le matériau constituant les puits, nous avons choisi le polydiméthylsiloxane (PDMS) car il s'agit d'un polymère aisément structurable. Néanmoins, le PDMS possède des limitations dans le cadre de cultures cellulaires. Parmi celles-ci, nous pouvons noter qu'il est perméable à l'eau, ce qui induit des problèmes d'évaporation du milieu de culture, et relativement toxique pour les cellules (Berthier *et al.*, 2012). Il est donc nécessaire de vérifier si la structure de PDMS a un impact significatif sur la croissance cellulaire.

3.2.3 Dispositif de mesure

Afin de confirmer la reproductibilité de nos mesures d'impédance électrique sur des cultures cellulaires, nous avons choisi de répéter chaque expérience trois fois. Il est donc dans notre intérêt que le dispositif de mesure possède plusieurs puits de culture au fond desquels se trouvent des REIP distincts les uns des autres, permettant des mesures indépendantes. Cependant, si ces puits se trouvent trop proches les uns des autres, les risques de fuite de milieu de culture sous le PDMS d'un puits à un autre augmentent. Afin de conserver une distance suffisante entre les puits, nous avons décidé de concevoir quatre puits et donc quatre REIP. Nous sommes néanmoins conscients qu'une optimisation de l'espace permettant d'ajouter plus de zones de culture est possible.

Au final, le dispositif de mesure possède quatre électrodes de travail, chacune d'elle partageant une contre-électrode commune (figure 3.1a). Chaque REIP contient donc une électrode de travail et une contre-électrode, chacune d'elle possédant 37 doigts si nous considérons le réseau dans son ensemble ou 27 si nous considérons les doigts à l'intérieur du puits

3.3 Conception du dispositif

Cette partie décrit les différentes étapes de fabrication, résumées dans la figure 3.4.

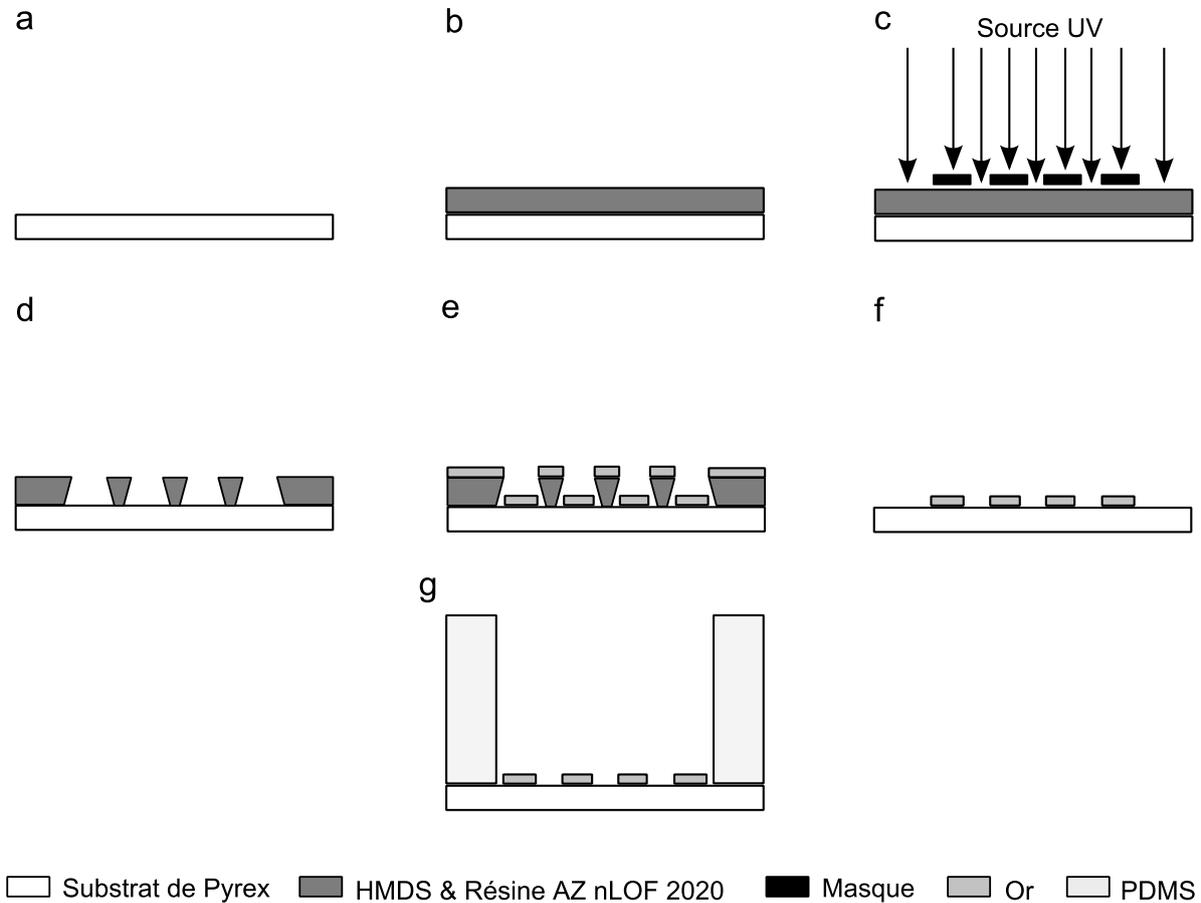


Figure 3.4 : Etapes de fabrication du dispositif de mesure. a) Nettoyage ; b) Dépôt d'HMDS et de résine AZ nLOF 2020 ; c) Insolation UV ; d) Développement formant les profils « casquette » ; e) Métallisation ; f) Lift-Off ; g) Fixation des puits de PDMS.

❖ Nettoyage

Un soin particulier a été apporté dans le nettoyage des substrats de Pyrex afin de s'assurer un dépôt uniforme de résine et donc d'or, limitant les défauts de fabrication comme des courts-circuits ou des épaisseurs d'électrodes différentes.

Les substrats ont d'abord été plongés pendant 5min dans un Piranha. Il s'agit d'un bain comprenant 1/3 d'eau oxygénée (H_2O_2) auquel sont ajoutés 2/3 d'acide sulfurique (H_2SO_4), permettant de supprimer toute matière organique présente sur le substrat. Ce nettoyage a été complété par un rinçage à l'acétone et à l'isopropanol.

❖ Dépôt d'HMDS

L'hexaméthylsilazane (HMDS) est un composé organique qui, en interagissant avec le substrat de Pyrex, permet de promouvoir l'adhésion de la résine sur celui-ci.

Afin de le déposer, une attaque du substrat au Plasma dioxygène (O_2) (Puissance (P_H) = 100W, Débit (D) = 30sccm (centimètre cube par minute standard), Pression (P_r) = 100mT, Temps (t) = 10s) a été

réalisée afin d'activer la surface. Elle a été suivie d'une étape de déshydratation en laissant le substrat sur une plaque chauffante à 110°C pendant 10min.

Une fine monocouche d'HMDS (Dow ST) a immédiatement après été déposée sous forme liquide par enduction centrifuge (« spin coating ») avec les paramètres suivants : Capot Fermé, Vitesse (V) = 2000rpm, Accélération (A) = 1000rpm.s⁻¹, Temps (t) = 20s).

❖ Dépôt de Résine

La résine choisie est la AZ nLOF 2020 d'AZ Electronic Materials, une résine négative communément utilisée pour créer des profils dits « casquette » dont nous nous sommes servis pour fabriquer les électrodes, comme l'illustre la figure 3.4d. Ce profil nous permet de déposer l'or de manière discontinue sur le Pyrex et la résine, comme le montre la figure 3.4e, et de retirer l'or déposé sur la résine grâce à un solvant. Sans ce profil, l'or serait déposé de façon continue et le solvant ne pourrait pas atteindre la résine, qui se trouverait donc sous l'or.

Cette résine a été déposée par enduction centrifuge. Une épaisseur de 2µm est obtenue avec ces paramètres: Capot Ouvert, $V = 3000\text{rpm}$, $A = 1000\text{rpm.s}^{-1}$, $t = 20\text{s}$. Afin de retirer le solvant de la résine et améliorer son adhésion sur le substrat, celui-ci est posé sur une plaque chauffante pour 1min à 110°C.

❖ Insolation UV

Le substrat a ensuite subi une insolation par rayon UV afin de polymériser les parties exposées par le masque négatif, conçu par Timothée Houssin (Houssin *et al.*, 2010). Les paramètres de l'insolation sont : UV 365nm, Intensité = 11mW.cm⁻², $t = 4,9\text{s}$. Le substrat est une nouvelle fois déposé sur une plaque chauffante pendant 1min à 110°C pour amplifier la polymérisation induite par l'insolation UV.

❖ Développement

Le développement permet de retirer les parties de résine non polymérisées par l'insolation. Des profils « casquette » sont créés car le faible temps d'insolation a permis de polymériser de manière plus importante la résine en surface par rapport sa partie inférieure. Si le temps d'insolation était plus long, la résine serait entièrement polymérisée et les profils « casquette » ne pourraient pas être créés (cf. figure 3.5).

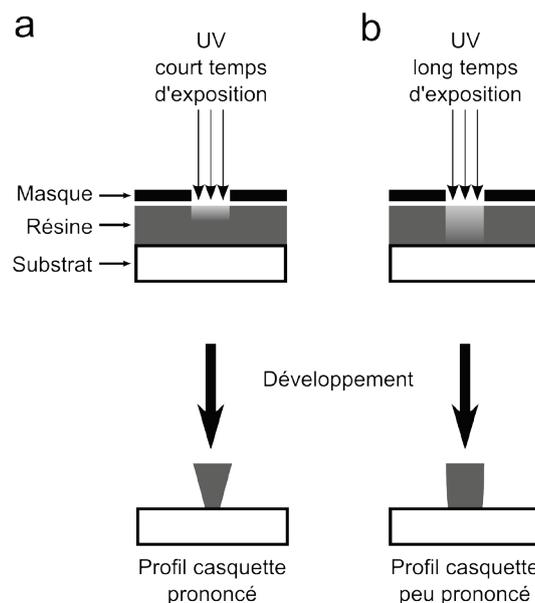


Figure 3.5 : Création du profil casquette. a) A faible temps d'exposition, la partie supérieure de la résine est plus polymérisée que sa partie inférieure, induisant une différence dans la vitesse de développement et un profil casquette prononcé. b) Pour un temps d'exposition plus long, la polymérisation de la résine est plus homogène et le profil casquette peu prononcé.

Le substrat a d'abord été plongé dans le solvant organique complexe (appelé développeur) AZ MIF 326 de AZ Electronic Materials sans agitation pendant 55s avant d'être immédiatement plongé dans un bain d'eau déionisée (EDI) pendant 15s, également sans agitation. Puis, le substrat a été rincé en douceur à l'EDI et séché sous un flux d'azote.

L'épaisseur de la résine a ensuite été mesurée à l'aide d'un profilomètre afin de confirmer l'obtention d'une épaisseur de 2 μm avec les paramètres d'enduction centrifuge utilisés.

❖ **Métallisation**

L'étape de métallisation qui suit consiste d'abord à décaper le substrat de Pyrex avec un canon à ion Argon (200eV pendant 2min) pour promouvoir l'adhésion de l'or. Puis, une couche d'accroche de titane de 10nm a été déposée afin d'améliorer la fixation de la couche d'or de 100nm, les deux dépôts se faisant par évaporation.

❖ **Lift-off**

Le lift-off est une étape qui consiste à retirer la résine restante (qui se retrouve donc couverte d'or suite à la métallisation) afin qu'il ne reste que les électrodes directement fixées au substrat. Le protocole standard est constitué de deux étapes.

La première consiste à plonger le substrat dans un solvant organique (appelé révélateur) qui va dissoudre la résine, celle-ci étant accessible grâce au profil casquette. Le révélateur choisi est le SVC-14 de Dow ST et cette étape a été réalisée pendant 40min à 70°C.

Généralement, la totalité de la résine ne peut pas être retirée avec ce seul bain. La deuxième étape consiste alors à placer le substrat, toujours dans le révélateur, dans un sonicateur générant des ondes sonores à une fréquence de 35kHz (ultrason). Celles-ci déclenchent des phases de compression et décompression complexes dans le révélateur qui vont créer des bulles microscopiques au niveau du substrat. En phase de décompression, celles-ci explosent et les turbulences créées facilitent la dissolution du reste de la résine. Cette opération est faite à température ambiante pendant 3min. Enfin, pour parfaire la suppression de la résine, il est possible de créer manuellement des bulles d'air à l'aide d'une pipette qui appliqueront une pression dessus et la retireront mécaniquement.

❖ **Courts-circuits**

Malgré le lift-off, il se peut qu'une partie des zones d'or censées avoir été retirées subsiste. Les raisons peuvent être multiples : dépôt non uniforme de la résine dû à certaines impuretés initiales, durée du développement ou du lift-off non optimale. Si ces zones se trouvent entre deux doigts d'électrodes, elles peuvent créer un contact entre ceux-ci occasionnant un court-circuit. En pratique, une fois le lift-off effectué, la résistance de chacun des quatre réseaux d'électrode d'un dispositif de mesure est mesurée à l'aide d'un ohmmètre. Si celle-ci est infinie (i.e. supérieure au seuil de détection de l'ohmmètre), alors il n'existe pas de court-circuit. Si en revanche celle-ci à une valeur comprise entre quelques Ohms (court-circuit important) et quelques Mégaohms (court-circuit peu important), il est nécessaire de chercher au microscope l'origine du court-circuit sur le REIP.

Une fois repéré, le substrat est placé dans une station sous pointe avec le court-circuit au centre de la lunette binoculaire. Après avoir positionné les pointes de part et d'autre de celui-ci, une tension V la plus faible possible est appliquée à l'aide de l'analyseur de réseau Tektronix 370A afin de générer un courant I dans le REIP. Le but de cette opération est de faire fondre par effet Joule la partie de l'or provoquant le court-circuit (voir figure 3.6). La tension appliquée V est ainsi augmentée progressivement jusqu'à ce que visuellement le court-circuit disparaisse, que la courbe $I(V)$ donnée par l'analyseur de réseau soit égale à 0 et finalement qu'un ohmmètre témoigne de la résistance infinie du REIP.

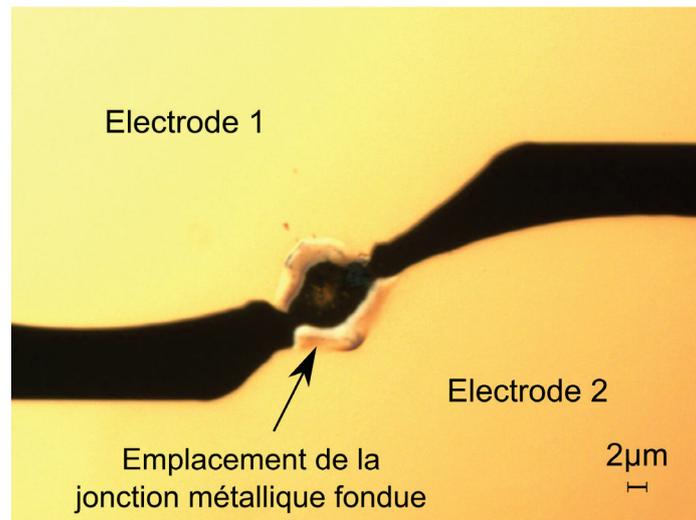


Figure 3.6 : Photo d'un court-circuit fondu par effet Joule

❖ Puits

Les puits de culture consistent en une structure de PDMS collées sur le substrat.

Le PDMS a été conçu à partir d'un mélange de 60g de PDMS en phase liquide et de 6g d'agent de durcissement (« curing agent » en anglais) qui permettra sa polymérisation, soit un ratio de 1/10 par rapport au mélange total. Ce mélange s'effectue manuellement pendant une dizaine de minutes et engendre la création de bulles d'air. Celles-ci sont retirées en plaçant le mélange dans un bâti où la pression peut être diminuée. La diminution de la pression permet d'augmenter le volume des bulles jusqu'à leur éclatement mais pour éviter tout débordement du mélange hors du bécher, il est nécessaire à un certain moment d'augmenter la pression pour la ramener à sa valeur initiale. La suppression des bulles s'effectuent donc en alternant plusieurs fois ces phases de diminution et d'augmentation de la pression. Le mélange est ensuite moulé dans deux boîtes de Pétri différentes (permettant d'obtenir dans chacune une hauteur de PDMS d'environ 5mm) qui sont placées dans un four pour un recuit de 3h 30min à 60°C. Le PDMS désormais à l'état solide, nous pouvons y percer des trous de 6mm à l'aide de poinçons afin de créer les puits de culture. Puis, le PDMS est découpé à l'aide d'un scalpel en une structure en forme de parallélépipède de dimension 3cm x 3cm x 5mm. La structure de PDMS est ensuite nettoyée à l'isopropanol.

Avant le collage du PDMS, le substrat subit une nouvelle étape de nettoyage, comprenant un bain d'acétone et un bain d'isopropanol. Puis, une attaque au Plasma O_2 du substrat ($P_H = 150W$, $D = 30sccm$, $P_r = 100mT$, $t = 30s$) permet d'en activer la surface de Pyrex. L'objectif est alors de coller la structure de PDMS sur les parties du substrat avec le Pyrex, le PDMS n'adhérant pas sur l'or directement. Il faut noter qu'à cette étape le PDMS ne subit pas de traitement au Plasma O_2 . En effet, des tests que nous avons effectués ont montré qu'activer aussi le PDMS augmente certes la force de son adhésion sur la surface de Pyrex, mais augmente aussi la fuite de liquide introduit dans le puits entre le substrat et le PDMS. L'origine de ce problème vient du fait que l'attaque au Plasma O_2 , bien qu'elle soit de faible puissance et de courte durée ($P_H = 50W$, $D = 50sccm$, $P_r = 650mT$, $t = 10s$), rend la surface du PDMS hétérogène, ce qui favorise la fuite de liquide (cf. figure 3.7). En conséquence, le PDMS est simplement déposé sur le substrat, en faisant attention à ce que le fond des puits soit entièrement couvert par des électrodes. Appliquer une pression avec un objet lourd pendant 30s augmente la solidité du collage du PDMS. Ainsi, les forces électrodynamiques s'exerçant entre le PDMS et le Pyrex suffisent pour ne pas occasionner de fuite.

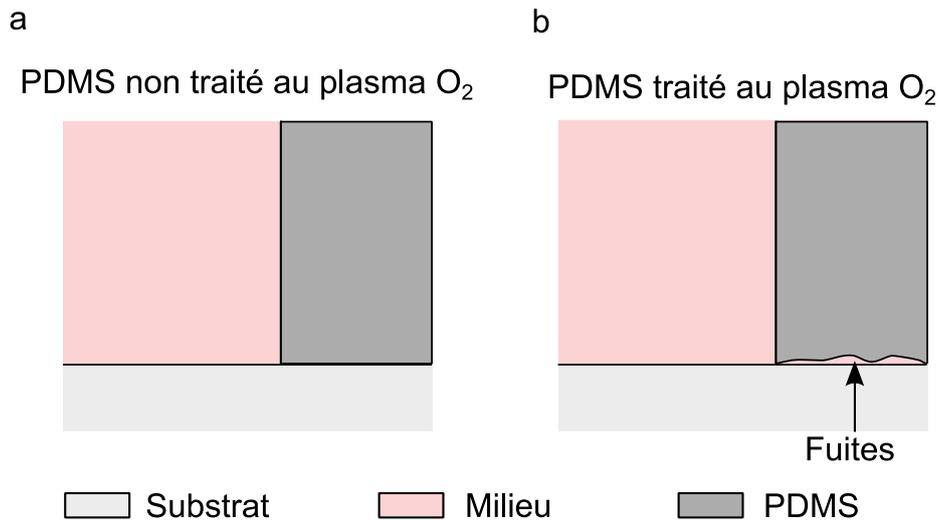


Figure 3.7 : Vue de profil de la jonction entre le substrat, le milieu et le puits de PDMS. Dans le cas où le PDMS n'est pas activé par une attaque au plasma O_2 , le milieu ne fuit pas. S'il est attaqué au plasma O_2 , les hétérogénéités de surface résultantes entraînent des fuites du milieu entre le PDMS et le substrat.

3.4 Protocole de caractérisation du dispositif

L'objectif de cette thèse est d'effectuer des mesures d'impédance électrique sur des cultures cellulaires. Nous avons présenté dans la partie précédente le dispositif de mesure de cette impédance et la manière dont il a été créé. Nous allons à présent le caractériser électriquement pour déterminer dans quelle mesure il est adapté aux mesures que nous souhaitons effectuer. En effet, nous avons vu que le champ électrique est fortement influencé par la géométrie du réseau d'électrodes interdigitées, qui détermine sa constante de cellule. Or, nous avons vu dans le chapitre 2 (cf. 2.4.4.3) que le dispositif doit être intégré à un banc de test expérimental et qu'en conséquence le signal électrique est également influencé par des éléments de ce montage, notamment les câbles. Leur contribution étant de nature inductive, leur impédance à hautes fréquences peut s'avérer prédominante par rapport aux contributions qui nous intéressent. Ainsi, l'objectif précis de la caractérisation est de déterminer dans quelle mesure la géométrie de notre dispositif est adaptée à des mesures sur des cultures cellulaires en prenant en compte les contributions des autres éléments du montage.

Dans cette partie, nous détaillerons le protocole de caractérisation qui a été mis en place. Dans un premier temps, nous présenterons les éléments constituant le banc de test expérimental. Puis nous justifierons le choix des milieux liquides utilisés et décrirons comment la mesure de leur impédance a été effectuée. Ensuite, nous présenterons le protocole d'analyse des mesures. Celui-ci consiste d'abord à décrire le diagramme de Bode du signal puis à le modéliser avec un circuit équivalent adapté, dont la valeur des paramètres sera en adéquation avec nos mesures. Enfin, à partir des valeurs de constante de cellule de notre dispositif et de celle des paramètres du circuit équivalent, nous déterminerons les paramètres électriques que sont la conductivité et la permittivité de chacun des milieux. Nous comparerons ces valeurs à d'autres obtenues avec des méthodes alternatives (mesures avec un conductimètre, littérature) et discuterons de la capacité de notre dispositif à effectuer des mesures précises sur ces milieux.

3.4.1 Banc de test expérimental

La figure 3.8 présente les différents éléments du banc de test expérimental.

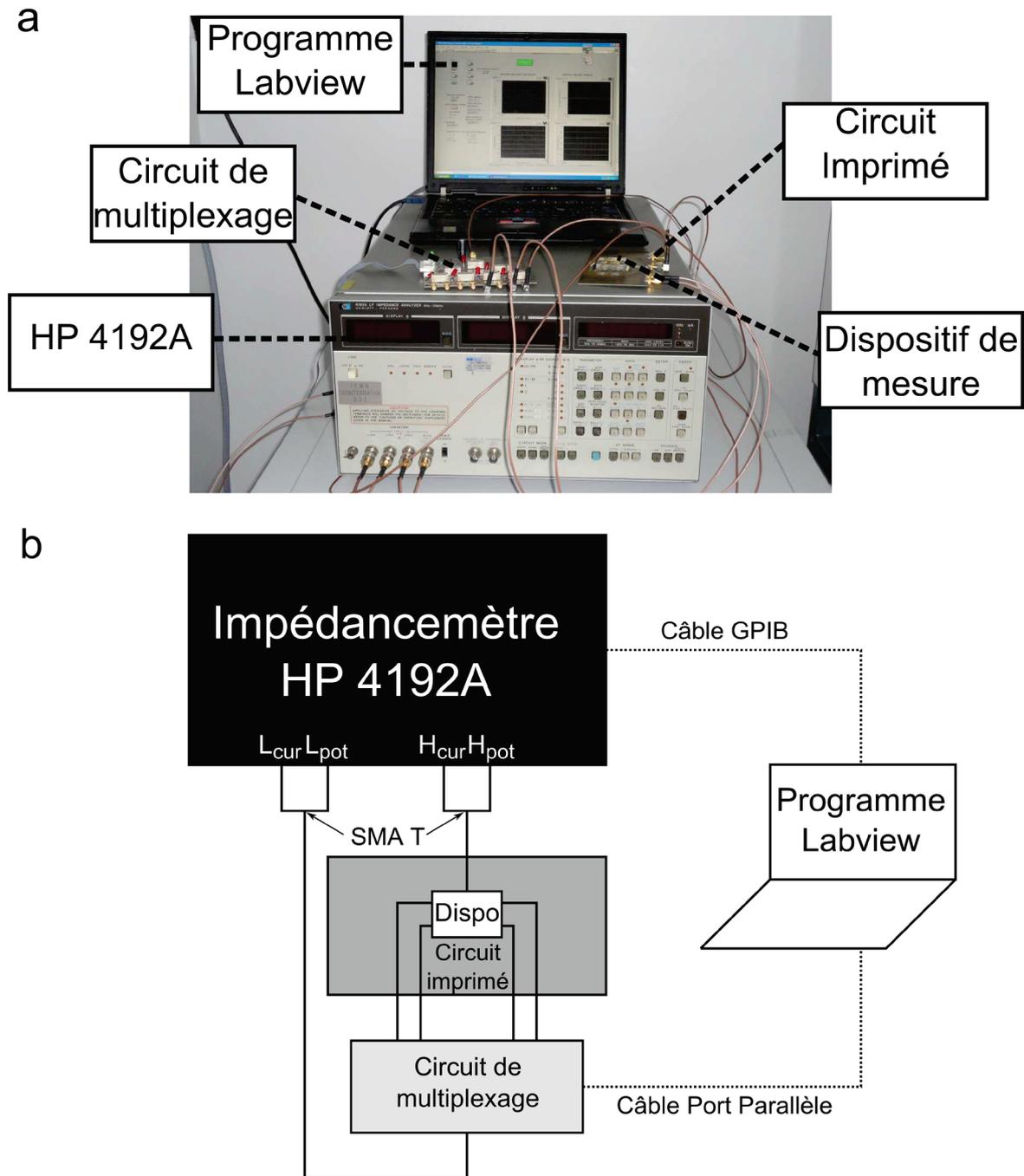


Figure 3.8 : Photo et schéma du banc de test expérimental. a) Le banc de test est composé du dispositif de mesure dont les électrodes de travail et la contre-électrode commune sont câblés par des fils d'aluminium à un circuit imprimé. Celui-ci est branché avec des câbles SMA à un circuit de multiplexage et à un impédancemètre HP 4192A. Un programme LabVIEW contrôle le multiplexeur (pour changer le canal analysé sur le circuit imprimé) et l'impédancemètre (pour effectuer des mesures d'impédance pour une gamme de fréquence et une tension d'excitation définie par l'utilisateur. b) Sur le schéma, nous pouvons voir que les quatre ports de l'impédancemètre sont branchés deux par deux afin de permettre des mesures à deux points. L'impédancemètre est relié à l'ordinateur à l'aide d'un câble GPIB branché sur un port USB tandis que le multiplexeur est branché à son port parallèle.

L'objectif de ce banc de test est de pouvoir effectuer des mesures d'impédance avec le dispositif de mesure. Celui-ci doit donc être relié à un impédancemètre. La connexion entre les deux est rendu possible par l'utilisation d'un circuit imprimé élaboré au cours de la thèse de Timothée Houssin (Houssin, 2011). Celui-ci permet de relier chaque électrode de travail et la contre-électrode commune du dispositif de mesure avec des voies dédiées à un port SubMiniature version A (SMA). Des câbles coaxiaux de type SMA ont été choisis en raison de leur ergonomie et de leur disponibilité, leur utilisation étant commune pour des mesures dans le domaine des radio-fréquences. Le câblage, ou pontage, entre le dispositif de mesure et le circuit imprimé a été réalisé à l'aide de fils d'aluminium, comme le montre la figure 3.9.

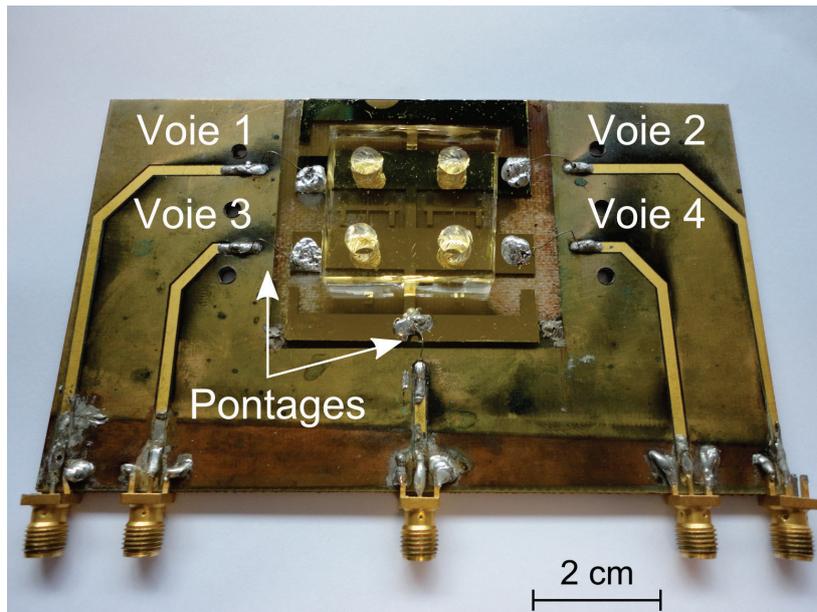


Figure 3.9 : Photo du dispositif relié par pontages de fil d'aluminium au circuit imprimé. Ce dernier possède quatre voies, qui permettent de lier les électrodes du dispositif aux ports SMA.

Comme nous l'avons évoqué dans la partie (cf. 2.2.4.2), notre impédancemètre est le HP 4192A qui permet d'effectuer comme nous le souhaitons des mesures d'impédance inférieures à $1\text{M}\Omega$ pour des fréquences inférieures à 13MHz. Il dispose de quatre ports pour connecter le dispositif sous test: deux pour délivrer et mesurer le courant, respectivement I_{cur} et H_{cur} , deux pour délivrer et mesurer la tension, L_{pot} et H_{pot} . Dans notre cas, les ports L_{cur} et L_{pot} ont été connectés ensemble à l'aide de connecteurs SMA en forme de T, tout comme les ports H_{cur} et H_{pot} , tel que représenté sur la figure 3.8b afin d'effectuer une mesure à deux points qui correspondent à une électrode de travail et à la contre-électrode commune.

L'impédancemètre possède donc deux ports tandis que le circuit imprimé, auquel le dispositif est relié, en possède cinq. L'un des ports correspond à la contre-électrode et est directement relié à l'impédancemètre. Afin de pouvoir relier les quatre autres ports du circuit imprimé à l'unique port restant de l'impédancemètre, nous avons utilisé un circuit de multiplexage, également élaboré lors de la thèse de Timothée Houssin (Houssin, 2011). Celui-ci possède des relais électrostatiques permettant de commuter le port analysé sur le circuit imprimé.

La commutation du circuit de multiplexage s'effectue à l'aide d'un programme externe. De même, l'impédancemètre ne permet pas d'effectuer des mesures sur un spectre fréquentiel de manière automatique. Nous avons donc eu recours à un interfaçage avec un ordinateur contenant un programme LabVIEW, réalisé par Timothée Houssin (Houssin, 2011). Ce programme permet notamment de commuter le canal analysé sur le circuit de multiplexage et de réaliser des mesures d'impédance pour une

gamme de fréquence et une tension d'excitation définies par l'utilisateur. Les fichiers obtenus comprennent pour chaque fréquence l'amplitude de l'impédance, sa phase, sa partie réelle et sa partie imaginaire. Le circuit de multiplexage est relié au port parallèle de l'ordinateur et l'impédancemètre à un port USB via un câble GPIB (voir définition dans la partie 2.2.5.1).

3.4.2 Choix et mesures d'impédance de milieux liquides

Notre objectif est d'estimer si la constante de cellule de notre réseau d'électrodes est adaptée aux mesures que nous souhaitons effectuer. Par exemple, si nous prenons le cas où l'électrolyte est modélisée par une résistance (cf. 2.4.4.2), nous souhaitons vérifier si la valeur de la conductivité obtenue suite à la modélisation par circuit équivalent est la même que celle mesurée avec un conductimètre. Avant tout chose, nous avons effectué des mesures d'impédance sans introduire de milieux liquides, i.e. à l'air. Puis nous avons choisi des milieux liquides possédant une conductivité significativement différente : l'eau déionisée (EDI), dont la conductivité mesurée au conductimètre est égale à $1,3 \cdot 10^{-4} \text{S.m}^{-1}$, et le tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 1x, dont la conductivité vaut $1,3 \text{S.m}^{-1}$. Le PBS est une solution physiologique communément utilisée en culture cellulaire, notamment pour rincer des cellules avant de les fixer. Enfin, nous avons effectué des mesures d'impédance sur le milieu de culture utilisé pour faire croître des cellules HCT-8, d'une conductivité de $1,5 \text{S.m}^{-1}$ et dont la composition est décrite dans la partie 4.2.1.

Les fréquences d'étude sont au nombre de 81, comprises sur une échelle logarithmique entre 100Hz et 1Mhz, et la tension d'excitation est de 10mV. Le choix des fréquences a déjà été justifié par rapport au fait que nous souhaitons observer des phénomènes de relaxation sur des objets biologiques qui apparaissent à des fréquences inférieures à 1MHz (cf. 2.2.4.2). Concernant la tension d'excitation, nous avons déjà évoqué le fait qu'à faible tension les phénomènes restent linéaires (cf. 2.2.1) tandis que les électrodes peuvent être considérées comme idéalement polarisable (cf. 2.4.4.1). En outre, appliquer une faible tension nous permettra, lors des mesures sur un tapis cellulaire, d'éviter les risques d'altération membranaire pouvant conduire à des phénomènes d'électroporation. En effet, lorsque la différence de potentiel appliquée à la membrane de la cellule est trop élevée, celle-ci se déstabilise de manière réversible dans un premier temps puis irréversiblement à mesure que cette tension augmente. La tension transmembranaire d'électroporation est d'environ 1V, soit un champ électrique de 100MV.m^{-1} , et peut varier d'un type de cellules à un autre (Tsong, 1991). En général, il convient d'utiliser un champ électrique inférieur à 10kV.m^{-1} pour effectuer des mesures sur des objets biologiques sans les perturber. Afin de calculer quel serait la valeur maximale du champ électrique pour notre géométrie d'électrode, considérons la formule reliant le champ électrique E (en V.m^{-1}) à une différence de potentiel U (en V) entre deux armatures conductrices parallèles séparées par une distance d (en m) :

$$E = \frac{U}{d} \quad (3.2)$$

La valeur de E augmente donc si d diminue. Dans notre cas, bien que nos doigts d'électrodes ne correspondent pas au modèle de deux armatures parallèles, nous pouvons néanmoins estimer la valeur du champ E pour une tension de 10mV et une distance de $3 \mu\text{m}$, où les doigts sont les plus proches (cf. figure 3.10). Nous obtenons un champ électrique maximal d'une valeur de $3,3 \text{kV.m}^{-1}$, ce qui nous permet de supposer que le champ ne perturbera pas la croissance des cellules. Ceci devra néanmoins être vérifié expérimentalement.

Pour chaque mesure d'impédance, un volume de $90 \mu\text{l}$ du milieu concerné a été introduit dans le puits d'un dispositif non encore utilisé à l'aide d'une pipette. L'impédance de chaque fréquence est alors mesurée de manière successive directement après l'introduction. Relever l'impédance pour le spectre

fréquentiel composé de 81 fréquences dure 1min 45s. La stabilité de la réponse a été contrôlée en effectuant la mesure cinq fois de suite, i.e. pendant un peu moins de 10min. Enfin, l'impédance de chaque milieu a été mesurée à température ambiante sauf celle du milieu de culture, dont la température a été élevée à 37°C afin de se rapprocher des conditions d'une culture cellulaire.

3.4.3 Analyses des mesures

Tout d'abord, une analyse fréquentielle du signal est réalisée à l'aide d'un diagramme de Bode (cf. 2.2.5.4). L'objectif de celle-ci est de déterminer les comportements fréquentiels de la réponse impédimétrique et de les associer à ceux de composants électriques (présentés Tableau 2.2) :

- Si $|Z|$ est constant et φ proche de 0, le comportement est de type résistif.
- Si $|Z|$ est proportionnel à $1/f$ et φ converge vers -90° , le comportement est de type capacitif.
- Si $|Z|$ est proportionnel à f et φ converge vers 90° , le comportement est de type inductif.
- Dans d'autres cas, l'utilisation d'un élément à phase constante (CPE) peut être envisagée.

A partir de cette analyse, un circuit équivalent (cf. 2.4.1) est élaboré, l'utilisation de chaque élément devant trouver une justification physique. L'objectif est de quantifier les contributions des différents éléments identifiés dans le signal. Le logiciel utilisé pour la modélisation est le logiciel libre EIS Spectrum Analyzer (Pomerantsev, 2005). Celui-ci nous permet de déterminer par un algorithme basé sur la méthode des moindres carrés la valeur et l'erreur relative estimée de chaque paramètre du circuit équivalent. Nous avons obtenu les résultats de modélisation les plus satisfaisants avec l'algorithme de Powell (Powell, 1964). Nous avons également choisi que cet algorithme minimise la fonction suivante :

$$f(\omega, p_1, p_2, \dots, p_M) = \frac{1}{M_1 - M_2} \sum_{i=1}^N \frac{(Z'_{exp} - Z'_{fit})^2 + (Z''_{exp} - Z''_{fit})^2}{(Z''_{exp} - Z''_{exp})^2} \quad (3.3)$$

où: Z'_{exp} , Z''_{exp} , Z'_{fit} et Z''_{fit} correspondent respectivement aux parties réelles et imaginaires de l'impédance mesurée expérimentalement et déduite par le fit.

M_1 désigne le nombre de points, à savoir 81 (nombre de fréquences entre 100Hz et 1Mhz).

M_2 est le nombre de paramètres dans le circuit équivalent. Par exemple, une résistance ou une capacité équivalent à 1 paramètre (R ou C) tandis qu'un CPE vaut pour 2 (amplitude P et indice n).

p_1, p_2, \dots, p_M désignent les paramètres du circuit équivalent

ω représente la fréquence radiale (rad.s^{-1})

Nous définissons alors le coefficient de corrélation r^2 de la manière suivante :

$$r^2 = f(\omega, p_1, p_2, \dots, p_M)_{min} \quad (3.4)$$

L'algorithme requiert la définition de valeurs initiales pour chacun des éléments du circuit. Plus celles-ci sont proches des valeurs expérimentales, plus l'algorithme a de chances de converger rapidement vers un minimum global, condition nécessaire pour valider la modélisation. Les valeurs initiales pour chaque type de paramètres ont été regroupées dans le tableau 3.1:

Paramètres	Valeurs initiales
Résistance R	1000 Ω
Capacité C	2.10 ⁻⁵ F
Inductance L	1.10 ⁻⁵ H
CPE – Amplitude P	2.10 ⁻⁵ S.s ⁿ
CPE – Indice n	1

Tableau 3.1 : Valeurs initiales des paramètres composant un circuit équivalent considérées par l'algorithme.

3.4.4 Dédution des propriétés électriques des milieux

Suivant le choix des paramètres modélisant le milieu physiologique, nous pouvons déduire sa conductivité électrique (s'il s'agit d'une résistance) et/ou sa permittivité diélectrique (s'il s'agit d'une capacité). Celles-ci se calculent à partir des formules (2.28) et (2.35). Comme nous l'avons montré, la constante de cellule du réseau d'électrodes permet de lier la résistance à la conductivité et la capacité à la permittivité (voir définition au 2.4.2.1). Déterminons à présent la valeur de cette constante de cellule pour notre réseau d'électrodes.

En reprenant la formule (2.29), il est possible de calculer une constante de cellule théorique pour nos électrodes interdigitées. Déterminons d'abord la valeur du module k (formule (2.30)) afin de vérifier quelle approximation d'Hilberg nous pouvons appliquer (formules (2.32) et (2.33)). Cette valeur dépend des paramètres géométriques des électrodes, représentés figure 3.10.

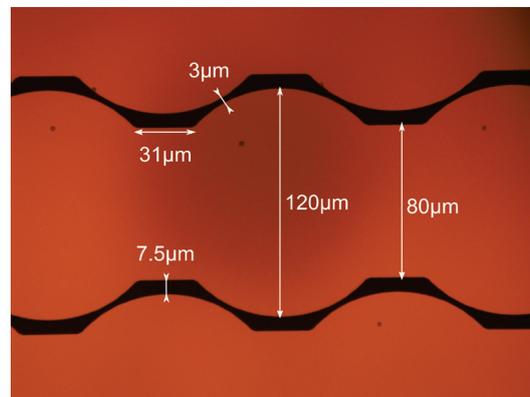


Figure 3.10 : Photo et paramètres géométriques des électrodes interdigitées.

En raison de la forme des doigts d'électrodes, constitués de disques positionnés les uns à côté des autres, la largeur des doigts et l'espace inter-doigts n'ont pas de valeur constante sur l'ensemble du réseau. Nous pouvons néanmoins calculer des valeurs moyennes de ces grandeurs. En ce qui concerne le nombre de doigts à considérer, nous avons vu précédemment (cf. 3.2.3) que nous pouvons distinguer deux réseaux : le réseau total et celui compris dans un puits de culture. Le tableau 3.2 présente les paramètres géométriques suivant ces deux cas :

Réseaux	Rayon R (μm)	Largeur doigt moyenne L_{el} (μm)	Espace inter doigts moyen E_{el} (μm)	Nombre de doigts N
Réseau total	8 000	100	7	74
Réseau puits	6 000	100	7	54

Tableau 3.2 : Paramètres géométriques du réseau d'électrode total et de celui contenu dans un puits.

Dans les deux cas, κ^2 a pour valeur 0,10258. Nous pouvons donc appliquer l'approximation d'Hilberg de la formule (2.32). Nous obtenons ainsi les valeurs de constante de cellule regroupées dans le tableau 3.3:

Réseaux	Constante de cellule
Réseau total	$K_{total} = 1,87379 \text{ m}^{-1}$
Réseau puits	$K_{puits} = 3,36602 \text{ m}^{-1}$

Tableau 3.3 : Constante de cellule du réseau d'électrode total et de celui contenu dans un puits.

Nous pouvons ainsi à partir de ces constantes de cellule et des paramètres modélisant le milieu déduire les valeurs de conductivité électrique et de permittivité diélectrique. Puis, ces valeurs sont comparées à d'autres obtenues soit avec un conductimètre (pour la conductivité) soit par la littérature (pour la permittivité). Si nous obtenons des valeurs proches, alors nous pouvons déduire que notre système, et donc la constante de cellule, est adapté pour ce milieu. Si en revanche les valeurs sont significativement différentes, alors nous devons analyser l'origine de cette divergence, en évaluant notamment l'impact des éléments parasites sur l'impédance, et conclure quant aux limites de notre géométrie d'électrodes.

3.5 Caractérisation électrique

3.5.1 Air

La première étape de la caractérisation consiste à étudier l'impédance électrique de notre dispositif en l'absence de milieux liquides, i.e. à l'air. La figure 3.12 en présente le diagramme de Bode.

Le diagramme de Bode présente un profil où le logarithme de l'amplitude de l'impédance diminue linéairement en fonction du logarithme de la fréquence tandis que la phase est constante à 90° . Or d'après les équations (2.21) et (2.23), l'amplitude de l'impédance d'une capacité a pour expression :

$$|Z_C(\omega)| = \frac{1}{C\omega} = \frac{1}{C * 2\pi f} \quad (3.5)$$

D'où :

$$\log(|Z_C(\omega)|) = -\log(2\pi C) - \log(f) \quad (3.6)$$

Les mêmes équations nous permettent de déduire la valeur de la phase de l'impédance :

$$\varphi_C(\omega) = \text{atan}\left(\frac{1/C\omega}{0}\right) = \lim_{x \rightarrow \infty} (\text{atan}(x)) = \frac{\pi}{2} = 90^\circ \times \left(\frac{\pi}{180}\right) \quad (3.7)$$

Nous sommes donc en présence d'un comportement purement capacitif. Le circuit équivalent est donc simplement composé d'une capacité (voir figure 3.11), que notre protocole de modélisation nous permet de la quantifier (voir tableau 3.4). La réponse impédimétrique de ce circuit équivalent est également représenté figure 3.12.



Figure 3.11 : Circuit équivalent utilisé pour modéliser le signal à l'air (i.e. sans milieu physiologique).

	Valeur	Erreur relative (%)
C (F)	$3,41520 \cdot 10^{-11}$	0,21492
r^2	0,99988723	-

Tableau 3.4 : Paramètres du circuit équivalent du signal mesuré à l'air.

L'objectif est à présent de déterminer ce qui est effectivement mesuré. Calculons la valeur de la permittivité diélectrique en considérant la formule (2.35) et la constante de cellule du réseau total d'électrode (cf. tableau 3.3) :

$$\epsilon_r = \frac{C * \kappa_{total}}{\epsilon_0} = 7,22750 \quad (3.8)$$

où ϵ_0 correspond à la permittivité du vide et est égale à $8,85419 \cdot 10^{-12} \text{F.m}^{-1}$.

La permittivité du verre est comprise entre 3,7 et 10 (Clipper Controls, 2014). Or, la valeur obtenue est comprise dans cet intervalle. Nous pouvons donc en conclure que nous mesurons l'impédance du substrat de Pyrex. En conclusion, en l'absence de milieux physiologique, le courant induit par l'excitation des électrodes circule dans le substrat.

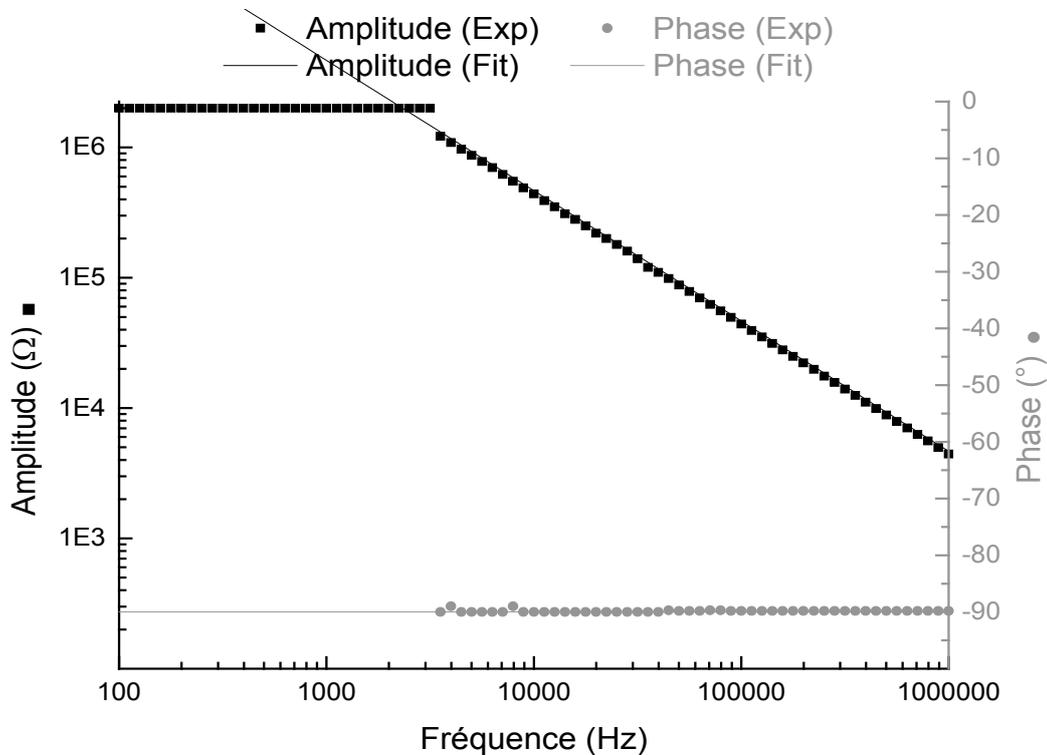


Figure 3.12 : Diagramme de Bode du signal mesuré à vide (Exp) et de sa modélisation par circuit équivalent (Fit, cf. figure 3.11). A noter que l'amplitude maximale pouvant être mesurée avec l'impédancemètre HP 4192A est $1.10^6 \Omega$, d'où la saturation pour $f < 3000 \text{Hz}$.

3.5.2 Eau déionisée (EDI)

Nous avons ensuite caractérisé notre dispositif avec de l'eau déionisée (EDI). Le diagramme de Bode est présenté figure 3.13.

Le diagramme de Bode comprend cette fois trois domaines distincts. Dans le premier, de 100 à 3000Hz, l'amplitude de l'impédance diminue avec une faible pente et la phase augmente d'une valeur de -50° jusqu'à -20° . Il s'agit d'un comportement complexe à basses fréquences, qui correspond à l'impédance de double couche à l'interface entre l'électrode et l'EDI (cf. 2.4.4.1). Comme nous l'avons montré, un CPE permet de modéliser fidèlement ce type de phénomène. Puis, dans le deuxième domaine, de 3kHz à 20kHz, la pente de l'amplitude diminue et est presque nulle, tandis que la phase se stabilise. Nous nous approchons plus d'un comportement résistif. Enfin, au-delà de 20kHz, l'amplitude et la phase diminuent fortement, cette dernière atteignant une valeur à 1MHz proche de -90° , synonyme de comportement capacitif.

Le circuit équivalent utilisé est inspiré de la littérature (Laureyn *et al.*, 2000) et comprend un CPE en série avec une résistance, le tout en parallèle avec une capacité, tel que le représente la figure 3.14. La résistance et la capacité modélise les comportements diélectriques et conducteurs de l'EDI et le CPE l'interface électrode-électrolyte. Notre protocole de modélisation nous permet d'en déterminer les valeurs (voir tableau 3.5). Le diagramme de Bode de sa réponse impédimétrique est également représenté figure 3.13.

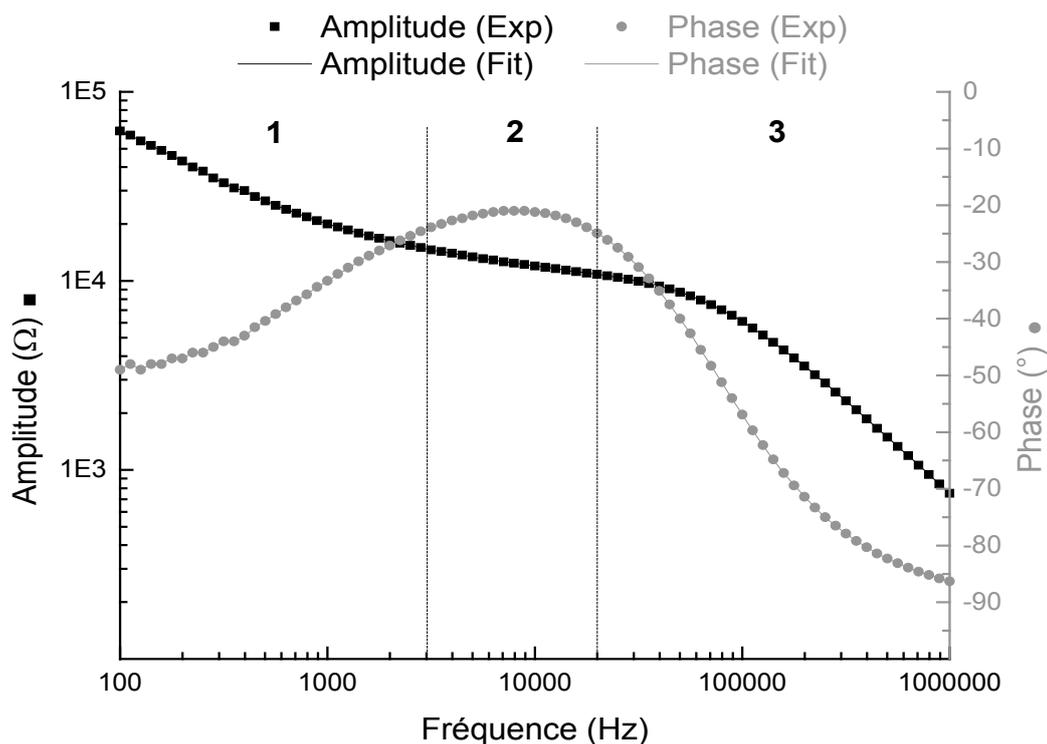


Figure 3.13 : Diagramme de Bode du signal mesuré avec l'EDI (Exp) et de sa modélisation par circuit équivalent (Fit, cf. figure 3.14), ainsi que les trois domaines fréquentiels observables.

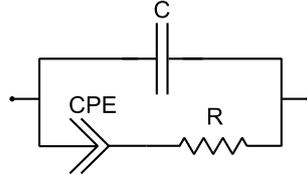


Figure 3.14 : Circuit équivalent utilisé pour modéliser le signal avec l'EDI.

	Valeur	Erreur (%)
$P_{CPE} (S.s^{ncpe})$	$2,6787.10^{-7}$	0,66124
n_{CPE}	0,64923	0,12383
$R (\Omega)$	10747	0,53139
$C (F)$	$2,1183.10^{-10}$	0,55626
r^2	0,99982102	-

Tableau 3.5 : Paramètres du circuit équivalent du signal mesuré avec de l'EDI.

La capacité modélise correctement le comportement capacitif de l'EDI. En effet, à partir de la formule (2.35) et de la valeur de la constante de cellule des électrodes comprises dans un puits, il est possible de retrouver une valeur de permittivité électrique proche de celle de l'eau, qui est égale aux fréquences appliquées à 80 :

$$\epsilon_r = \frac{C * \kappa_{puits}}{\epsilon_0} = 80,52956 \quad (3.9)$$

Ce résultat nous confirme la précision de la constante de cellule théoriquement calculée. Procéder de la même manière pour la résistance à partir de la formule (2.28) ne permet en revanche pas de retrouver la valeur de conductivité de l'EDI mesurée au conductimètre, qui est de $1,3.10^{-4}S.m^{-1}$.

$$\sigma = \frac{\kappa_{puits}}{R} = 3,13206. 10^{-4}S. m^{-1} \quad (3.10)$$

Cette différence peut être due à une pollution de l'EDI par l'air, étant donné que celle-ci y est exposée pendant les mesures. Une autre source potentielle de pollution est la désorption du PDMS formant les puits dans l'EDI. L'ajout d'ions résultant de cette pollution expliquerait l'augmentation de conductivité de l'EDI déterminée avec notre dispositif. En conclusion, notre dispositif permet de retrouver dans une certaine mesure les propriétés électriques de l'EDI, une solution à faible conductivité, mais notre protocole nécessite certaines améliorations, notamment en fermant le puits à l'aide d'un capot pendant la mesure pour limiter le risque de pollution.

3.5.3 Tampon phosphate salin (PBS) 1x

Nous avons également caractérisé notre dispositif avec du tampon phosphate salin (PBS) à une concentration de 1x. Le diagramme de Bode de cette mesure est présenté figure 3.15.

Ce diagramme comprend aussi trois domaines fréquentiels. Dans le premier, de 100 à 1000Hz, l'amplitude de l'impédance décroît linéairement et la phase est environ égale à 81°. Il s'agit là encore de l'impédance de double couche à l'interface électrode-électrolyte, dont une modélisation fidèle est obtenue avec un CPE. Dans le deuxième domaine fréquentiel, de 1 à 300kHz, nous constatons une diminution puis une stabilisation de l'amplitude de l'impédance, tandis que la phase augmente vers une valeur de 0°.

Ceci suggère l'apparition d'un comportement résistif. Enfin, le troisième domaine fréquentiel, au-dessus de 300kHz, est caractérisé par des valeurs de phase positives et une légère augmentation de l'amplitude de l'impédance. Cela correspond à un comportement inductif en hautes fréquences.

Le circuit équivalent choisi pour modéliser ce spectre est donc un CPE placé en série avec une résistance et une inductance, comme présenté sur la figure 3.16. Le CPE symbolise la double couche à l'interface électrode-électrolyte, la résistance la partie résistive du PBS et l'inductance les effets parasites des câbles, visibles en hautes fréquences. En appliquant notre protocole de modélisation, nous obtenons les valeurs des paramètres figurant dans le tableau 3.6.

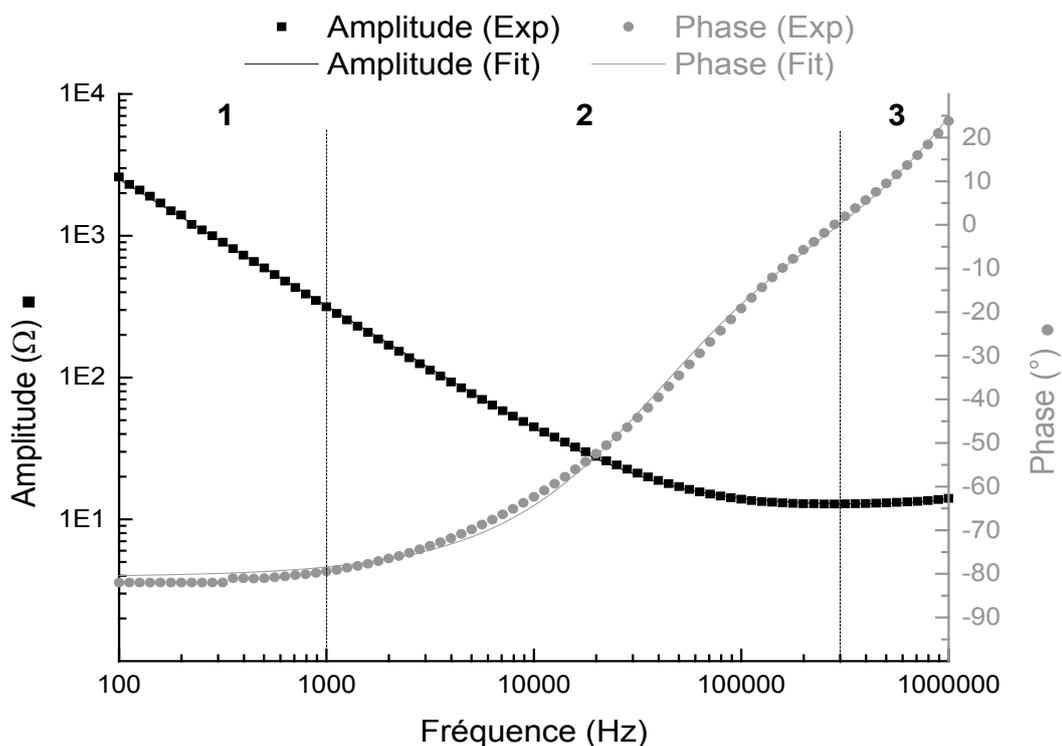


Figure 3.15 : Diagramme de Bode du signal mesuré avec le PBS (Exp) et de sa modélisation par circuit équivalent (Fit, cf. figure 3.16), ainsi que les trois domaines fréquents observables.

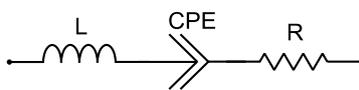


Figure 3.16 : Circuit équivalent utilisé pour modéliser le signal avec le PBS.

	Valeur	Erreur (%)
$P_{CPE} (S.s^{ncpe})$	$1,2381 \cdot 10^{-6}$	0,88417
n_{CPE}	0,89634	0,10155
$R (\Omega)$	12,576	1,19
$L (H)$	$1,0324 \cdot 10^{-6}$	5,823
r^2	0,99904441	-

Tableau 3.6 : Paramètres du circuit équivalent du signal mesuré avec du PBS.

Analysons à présent les valeurs de ces paramètres. Concernant l'inductance, en reprenant la formule (2.47) modélisant l'inductance de câbles selon leur géométrie et leurs propriétés intrinsèques, nous pouvons estimer celle de nos câbles de mesure :

$$L = 2 * 2l \left(\ln \left(\frac{2l}{d(1+x)} \right) - x + \frac{\mu}{4} + \frac{d}{2l} \right) = 4,35\mu H \quad (3.11)$$

Avec : l = longueur du câble (1,5m en moyenne)

d = diamètre du câble (1mm)

μ = perméabilité magnétique relative du matériau (1)

$$x = \sqrt{1 + \left(\frac{d}{2l} \right)^2}$$

Cette valeur est du même ordre de grandeur que celle obtenue dans notre modélisation, à savoir 1,0324μH. Notre calibrage qui consiste à considérer les phénomènes inductifs à hautes fréquences comme étant originaires des câbles est donc juste.

Intéressons-nous à présent à la valeur de R dans notre modélisation. Si nous calculons la valeur de la résistance obtenue avec la constante de cellule du réseau d'électrode contenu dans le puits K_{puits} et la conductivité du PBS mesurée au conductimètre, nous obtenons :

$$R = \frac{\kappa_{puits}}{\sigma} = \frac{3.36602}{1.3} = 2.58925\Omega$$

Cette valeur est significativement différente de celle déduite par la modélisation, qui est de 12,576Ω. La valeur théorique de K_{puits} nous a été confirmée lors de la déduction de la permittivité de l'EDI en hautes fréquences (voir 3.5.2). Il n'y a donc pas d'erreur concernant sa valeur. Cette différence a deux origines. Tout d'abord, comme nous l'avions montré dans le chapitre 2 (cf. 2.4.4.3), cette résistance à hautes fréquences comprend, en plus de celle de la solution, celle du circuit imprimé et des soudures des câblages par fil d'aluminium. Celle-ci oscille entre 0,7 et 2Ω suivant le canal considéré. Cette résistance seule ne suffit cependant pas à expliquer entièrement la différence entre les valeurs de R déduites à l'aide du conductimètre et celle issue de notre modélisation. Pour illustrer la raison de cette différence, considérons l'amplitude de l'impédance du PBS et traçons les asymptotes correspondant à chaque élément du circuit équivalent considéré dans un domaine fréquentiel allant jusqu'à 10MHz (figure 3.17).

Nous constatons qu'il existe un phénomène transitoire entre le domaine fréquentiel où la double couche prédomine, à des fréquences inférieures à 300kHz, et celui où l'inductance prédomine. Ce phénomène transitoire est interprété dans notre modélisation comme un plateau résistif à une valeur de 12,576Ω. Or le diagramme de Bode de la figure 3.15 nous montre que la phase à cette fréquence ne se stabilise pas à une valeur de 0° mais tend vers des valeurs positives. Cela signifie que nous n'atteignons pas de plateau résistif et que nous ne pouvons pas déduire de notre calibrage la valeur exacte de la résistance du milieu mais une valeur surestimée.

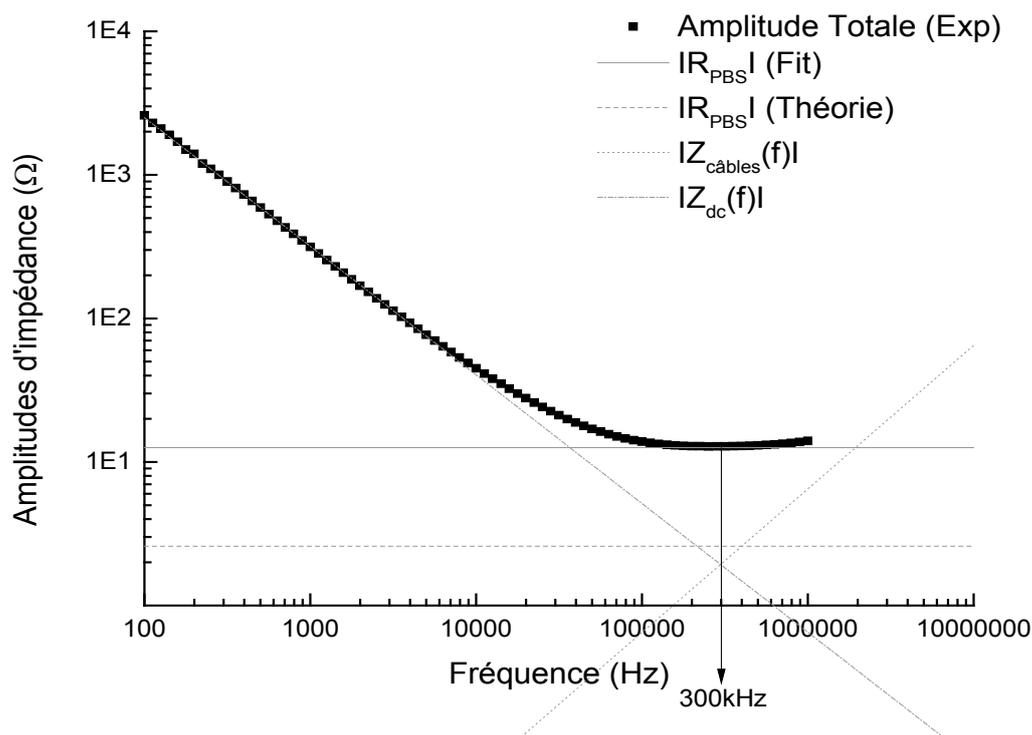


Figure 3.17 : Amplitudes d'impédance du signal total et de chaque élément du circuit équivalent, constituant ses asymptotes en basses, moyennes et hautes fréquences (voir tableau 3.6). La résistance du PBS dont la conductivité a été mesurée au conductimètre est également représentée. L'abréviation « dc » désigne la double couche à l'interface électrode-électrolyte.

En conclusion, la constante de cellule de notre dispositif n'est pas adaptée pour des solutions possédant une conductivité élevée. Sa faible valeur induit une faible résistance à hautes fréquences de la solution, qui se trouve dominée par l'impédance des câbles. Nous pouvons ajouter que ces effets sont toujours présents quel que soit le milieu mesuré. Effectuer des mesures d'impédance sur des milieux à forte conductivité nous permet alors de calibrer la contribution impédimétrique des câbles.

3.5.4 Milieu de culture

Enfin, nous avons testé notre dispositif avec le milieu de culture utilisé dans nos expériences, dont la composition est détaillée dans le chapitre 4 (cf. 4.2.1).

La conductivité du milieu de culture, mesurée au conductimètre, est de $1,5\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$. Nous nous retrouvons dans un cas de solution fortement conductrice comme le PBS et d'un point de vue qualitatif, les diagrammes de Bode sont semblables. D'un point de vue quantitatif, nous avons utilisé le même circuit équivalent que pour le PBS (figure 3.16) pour modéliser ce signal et les valeurs obtenues sont similaires, comme le montre le tableau 3.7.

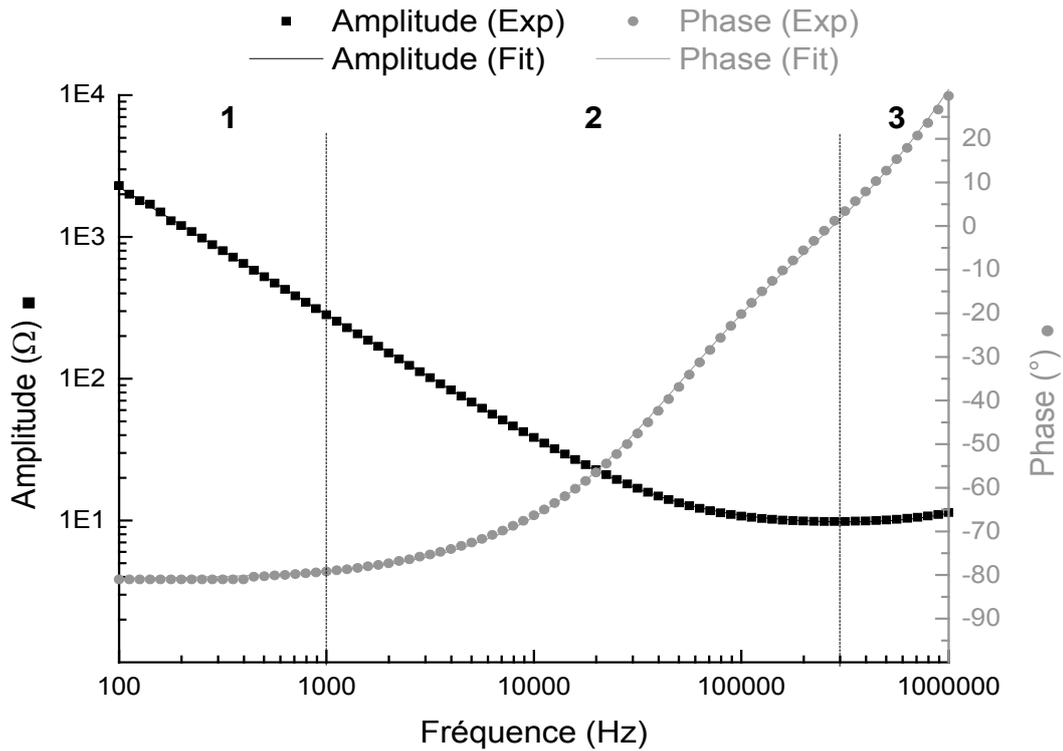


Figure 3.18 : Diagramme de Bode du signal mesuré avec le milieu de culture (Exp) et de sa modélisation par circuit équivalent (Fit, cf. figure 3.16), ainsi que les trois domaines fréquentiels observables.

	Valeur	Erreur (%)
$P_{CPE} (S.s^{ncpe})$	$1,3517 \cdot 10^{-6}$	0,40215
n_{CPE}	0,90008	0,0457
$R (\Omega)$	9,53660	0,56862
$L (H)$	$1,0197 \cdot 10^{-6}$	2,1551
\hat{r}^2	0,99979422	-

Tableau 3.7 : Paramètres du circuit équivalent du signal mesuré avec du milieu de culture.

Les remarques émises concernant la caractérisation avec le PBS sont également valables pour le milieu de culture.

En conclusion, cette mesure confirme que la constante de cellule de notre dispositif n'est pas adaptée pour des solutions possédant une conductivité élevée car les effets inductifs des câbles deviennent prédominants en hautes fréquences. Afin de déterminer dans quelle mesure notre dispositif est adapté pour effectuer des mesures d'impédance sur un tapis cellulaire, nous pouvons déduire la conductivité maximale σ_{max} qu'il permet de mesurer. Le seuil minimum mesurable de la résistance de la solution R_{min} se calcule en soustrayant la résistance obtenue par modélisation ($9,5366\Omega$) avec la résistance maximale de notre circuit imprimé (2Ω , cf. 3.5.3). Nous pouvons en déduire la conductivité σ_{max} associée :

$$\sigma_{max} = \frac{\kappa_{puits}}{R_{min}} = \frac{3.36602}{7.53660} = 0,44662 S.m^{-1} \quad (3.12)$$

Comme nous l'avons montré dans le chapitre 2 (cf. 2.4.4.4), le trajet paracellulaire du tapis a un comportement résistif et possède donc une certaine conductivité effective. L'effet des cellules sur l'impédance pourra donc être mesuré avec notre dispositif si celle-ci est inférieure à $0,44662\text{S.m}^{-1}$.

En perspective, nous pouvons ajouter qu'il existe deux solutions pour résoudre ce problème. D'une part, réduire le nombre de doigts des électrodes permet d'augmenter la constante de cellule et donc le seuil minimum mesurable de la résistance de la solution (voir formule (2.29)). Il serait donc envisageable de réduire le diamètre des puits de culture et donc le nombre de doigts qu'ils contiennent. D'autre part, si nous considérons la formule (2.47) déterminant l'inductance de câbles, nous pouvons constater qu'elle est proportionnelle à leur longueur. Or, l'impédance (voir formule (2.36)) est directement proportionnelle à l'inductance. Ainsi, diminuer la longueur des câbles permet de réduire leur contribution sur le signal d'impédance.

4 SUIVI PAR SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE ELECTRIQUE D'UNE CROISSANCE CELLULAIRE ET INFLUENCE DU REPIQUAGE

4.1 Introduction

La culture de cellules pour faire de l'expérimentation *in vitro* requiert toujours une étape préliminaire visant à isoler des cellules de tissus normaux ou tumoraux. La deuxième phase consiste à les maintenir en vie dans un milieu de culture le plus stable possible. Ces cultures se font traditionnellement dans des flacons de culture de taille macrométrique. Les cultures plus récentes dans des zones de petite taille, comme des puits milli- voire micrométriques, des chambres microfluidiques ou encore dans des gouttes (Meyvantsson et Beebe, 2008) permettent de nouvelles techniques d'analyses, notamment le criblage haut-débit et les laboratoires sur puce.

Il existe deux types de cellules : les cellules en suspension (ex : érythrocytes) et les cellules adhérentes (ex : épithéliales). Dans le cas de culture de cellules adhérentes, comme les HCT-8, nous désignons par confluence le moment où les cellules ont, suite à plusieurs divisions et formations de jonctions entre elles, formé un tapis recouvrant la totalité de la surface de culture. Il est alors nécessaire de procéder à un repiquage. Cette opération consiste à détacher les cellules pour les remettre en culture, après dilution, dans un nouveau dispositif contenant du milieu de culture frais.

Dans cette thèse, nous cherchons à étudier par impédancemétrie l'effet sur des cultures de cellules HCT-8 (issues d'un adénocarcinome iléocœcal humain) de l'infection par le parasite *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*). Nous avons conçu un dispositif comprenant des puits de culture au fond desquels se trouvent des Réseaux d'Electrodes Interdigitées Planaires (REIP, cf. 3.2.1). Le champ électrique induit par ces électrodes lorsqu'elles sont soumises à une tension doit nous permettre de sonder les cellules infectées par le parasite. Comme nous l'avons montré (cf. 1.2.1), le parasite sous sa forme infectieuse se présente sous la forme d'un oocyste de quelques micromètres de diamètre. Ceux-ci seront introduits dans le puits de culture après les cellules. Or, si les cellules ne forment pas un tapis confluent et ne recouvrent pas l'ensemble des électrodes, il existe un risque que des parasites introduits dans le puits de culture atterrissent sur des électrodes et n'infectent donc pas les cellules. En outre, nous souhaitons standardiser le moment où les parasites sont introduits afin d'augmenter la reproductibilité de nos expériences. Pour toutes ces raisons, l'obtention d'un tapis cellulaire à confluence au fond des puits de notre dispositif est une condition nécessaire avant l'introduction des parasites de *C. parvum*.

Dans un premier temps, nous vérifierons si notre dispositif, caractérisé par la constante de cellule des REIP, est adapté au suivi par impédancemétrie d'une croissance cellulaire jusqu'à sa confluence. Dans cette optique, nous analyserons le signal d'impédance total entre les fréquences 100Hz et 1MHz pendant 76 heures. Puis, nous effectuerons une modélisation du signal d'impédance par circuit équivalent (cf. 2.4) afin d'isoler la contribution de chacun des éléments influençant le signal, de déterminer le domaine fréquentiel de leur influence et d'étudier leur évolution temporelle. Nous pourrions ainsi évaluer quel paramètre est le plus représentatif de la croissance cellulaire. Enfin, nous étudierons l'effet du nombre de repiquages sur le signal d'impédance car il influence les cultures *in vitro* dans leur développement (Hughes *et al.*, 2007).

4.2 Matériels & Méthodes

4.2.1 Culture des cellules HCT-8

Les cellules choisies sont des cellules HCT-8 (issues d'un adénocarcinome iléocæcal humain, ECACC No 90032006) car elles s'avèrent très sensibles au développement du parasite de l'espèce *C. parvum* (Upton *et al.*, 1994). Elles sont conservées dans une solution contenant 90% de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, additionné de 10% de diméthylsulfoxyde (DMSO) dans de l'azote liquide.

Leur culture s'effectue dans un milieu Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, Invitrogen Corporation, France) supplémenté avec 1mM de Pyruvate de Sodium, 2mM de L-glutamine, 10% (vol/vol) de SVF décomplémenté, 170 μ M de Streptomycine, 210 μ M de Gentamycine et de Pénicilline (100U/L). Les supports de culture sont des flacons de 75cm² contenant 20ml de milieu, placés dans un incubateur à 37°C avec 5% (vol/vol) de dioxyde de carbone (CO₂) dont l'atmosphère est à saturation d'eau.

Les cellules sont repiquées tous les 3-4 jours lorsqu'elles atteignent 80% de confluence au 1/5, 1/10 ou 1/20. Toutes les manipulations de cellules sont effectuées sous une hotte à flux laminaire et après stérilisation du matériel et des gants de travail. Dans un premier temps, le repiquage consiste à retirer le surnageant et à rincer les cellules d'abord avec du milieu de culture puis avec 2ml d'acutase (Autogen Bioclear, Royaume-Uni) pendant 30 secondes pour éliminer les cellules mortes. L'acutase est un mélange d'enzymes protéolytiques et collagénolytiques qui mime simultanément l'action de la trypsine et de la collagénase. Cette double action permet de dégrader le système protéique de fixation des cellules aboutissant à leur détachement du support de culture et à leur séparation entre elles. Ensuite, les cellules sont incubées pendant 10min à 37°C avec 3ml d'acutase afin de détacher complètement le tapis. Sept millilitres de milieu sont ensuite ajoutés et un soin particulier est accordé pour dissocier les cellules les unes des autres et les mettre en suspension. Après une étape de centrifugation, le surnageant, contenant de l'acutase, est retiré et est remplacé par du milieu frais préalablement chauffé à 37°C. Enfin le volume de cellules nécessaire pour un repiquage au 1/5, 1/10 ou 1/20 est prélevé et ajouté à du milieu de culture frais dans un flacon de culture.

4.2.2 Culture des cellules HCT-8 dans notre dispositif de mesure

Nous avons repris le banc de mesure expérimental présenté figure 3.9. Afin d'inoculer un nombre désiré de cellules HCT-8 dans les puits de polydiméthylsiloxane (PDMS) de notre dispositif (cf. 3.2.2), celles-ci sont comptées après l'étape de centrifugation et le remplacement du surnageant par du milieu de culture frais. Le comptage s'effectue à l'aide d'une cellule de Malassez afin que 50000 cellules soient introduites dans chaque puits. Il est à noter qu'avant d'inoculer les cellules dans les puits, ceux-ci ainsi que le dispositif entier et le circuit imprimé sont nettoyés avec de l'alcool à 70% (vol/vol) pendant 15min à température ambiante avant d'être rincés trois fois avec le milieu de culture. Après inoculation sous une hotte à flux laminaire, le dispositif et le circuit imprimé sont introduits dans l'incubateur. L'impédance électrique des quatre puits est suivie successivement pendant 24 ou 76h (suivant les expériences) grâce à l'impédancemètre HP 4192A, au circuit de multiplexage et au programme LabVIEW. La tension d'excitation appliquée est de 10mV. D'un point de vue fréquentiel, l'impédance électrique est mesurée pour 81 fréquences entre 100Hz et 1MHz appliquées successivement sur un puits. La génération d'un tel fichier de données dure approximativement 1min 45s. D'un point de vue temporel, l'intervalle de temps entre la génération de deux fichiers de données pour un même puits est d'environ 7min (4 puits

successivement pendant 1min 45s chacun : $4 \times 1\text{min } 45\text{s} = 7\text{min}$). Chaque mesure a été réalisée en triplicate.

Concernant la tension d'excitation, il convient de rappeler une notion abordée dans le chapitre 3 (cf. 3.4.2), à savoir la tension transmembranaire d'électroporation. Nous avons montré qu'appliquer un champ électrique inférieur à 10kV.m^{-1} assurait de ne pas perturber les cellules et que dans notre cas, le champ électrique est au maximum de $3,33\text{kV.m}^{-1}$ (cf. formule (3.1)). Nous avons conclu que théoriquement, le champ émis ne perturbe pas la croissance des cellules. En pratique, après 24h de suivi par impédancemétrie d'une croissance cellulaire dans notre dispositif en reprenant le protocole décrit précédemment, nous avons pu observer un tapis confluent. Nous pouvons donc conclure que le champ électrique ne perturbe pas de manière significative la croissance des cellules.

De nombreux problèmes ont été rencontrés au cours des cultures et des solutions ont été au fur et à mesure élaborées :

❖ Evaporation

Description : Le volume du milieu diminue jusqu'à sa disparition totale.

Solution : Les puits ont été fermés avec un couvercle renversé de boîte de Pétri stérilisé.

❖ Fuite

Description : Le volume du milieu diminue et est ensuite retrouvé soit entre les puits de PDMS et le substrat (cf. figure 4.1a) soit entre les puits de PDMS et le couvercle de la boîte de Pétri (cf. figure 4.1b).

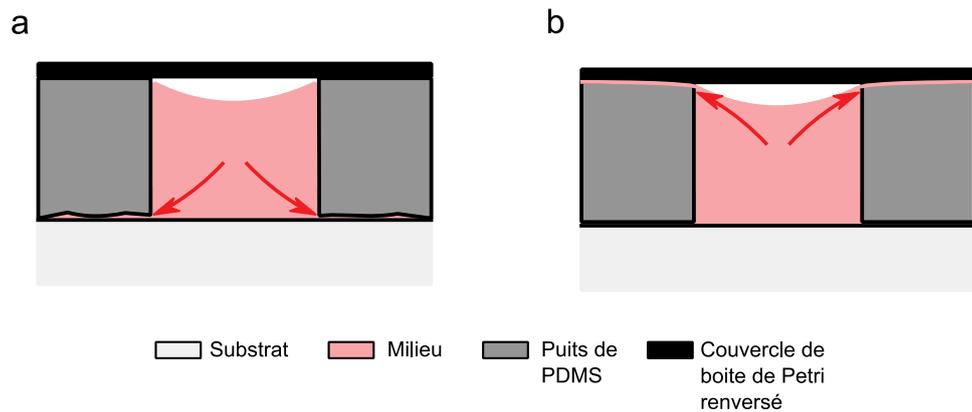


Figure 4.1 : Illustration de fuites de milieu observées, soit entre les puits de PDMS et le substrat (a), soit entre les puits de PDMS et le couvercle de la boîte de Pétri empêchant le milieu de s'évaporer (b). Les flèches indiquent pour chacune des figures le sens des fuites.

Solution : La fuite sous le PDMS était due au traitement par plasma O_2 du PDMS pour améliorer son collage sur le substrat (cf. 3.3). Nous avons montré que ne pas le traiter et le fixer en utilisant des forces électrodynamiques suffit à ne pas provoquer de fuites. La fuite sous le couvercle de la boîte de Pétri était due au volume de milieu de culture initialement trop élevé qui touchait le couvercle et s'écoulait par capillarité. La solution a été d'introduire un volume de $90\mu\text{l}$ de milieu, qui est suffisamment élevé pour maintenir la culture des cellules pendant la durée de l'expérience tout en ne touchant pas le couvercle.

❖ Contamination bactérienne

Description : Des bactéries ont été retrouvées avec les cellules lors d'observations au microscope. Le problème réside dans le fait qu'elles utilisent les ressources du milieu et empêchent en conséquence les cellules de se développer.

Solution : Pendant la totalité du protocole, tous les milieux ont été filtrés avant utilisation avec une membrane dont les pores font $0,22\mu\text{m}$ de diamètre. Afin de s'assurer de l'absence de bactéries et de valider nos résultats, les solutions et les surnageants de culture ont été testés après chaque manipulation et à la fin de l'expérience avec de la gélose pour dénombrement (PCA) dans une boîte de Pétri. Il s'agit d'un milieu favorisant notamment la croissance de bactéries. La boîte de Pétri a été placée pendant une nuit dans l'incubateur à 37°C .

4.2.3 Analyse de la réponse en impédance

❖ Analyses fréquentielle et temporelle

Dans nos expériences, l'impédance est mesurée suivant la fréquence et le temps. Elle dépend donc de ces deux variables et nous pouvons écrire $Z(t,f)$ ou $Z(t,\omega)$ où t désigne le temps (en s), f la fréquence (en Hz) et ω la fréquence radiale (en $\text{rad}\cdot\text{s}^{-1}$) telle que $\omega = 2\pi f$.

Nous effectuerons les analyses fréquentielle et temporelle en trois étapes :

- Dans un premier temps, nous combinerons les deux analyses pour tracer l'évolution de l'amplitude de l'impédance $|Z(t,f)|$ et de la phase $\varphi(t,f)$ en fonction du temps et de la fréquence dans un repère en trois dimensions. Nous justifierons notre choix d'étudier l'amplitude de l'impédance plutôt que sa phase. Cette analyse nous permettra de distinguer des temps et des gammes de fréquences caractéristiques dans l'évolution de $|Z(t,f)|$.
- Dans un deuxième temps, nous étudierons fréquemment l'amplitude de l'impédance $|Z(t,f)|$ pour quelques temps caractéristiques que nous aurons définis grâce à la première analyse. Nous définirons, grâce à cette étude fréquentielle, la fréquence f_s à laquelle notre système est le plus sensible aux évolutions de $|Z(t,f)|$.
- Pour finir, nous étudierons l'évolution temporelle de $|Z(t,f)|$ à la fréquence f_s . Ceci est réalisable grâce à un programme Matlab que nous avons créé, permettant l'extraction de $|Z(t,f)|$ pour chaque fréquence avec un intervalle d'environ 7min entre chaque points de données.

❖ Analyse par circuit équivalent

Un circuit équivalent adapté à l'analyse de l'impédance électrique d'un tapis cellulaire dans les conditions de notre banc de mesure expérimentale a déjà été présenté et justifié (cf. figure 2.23).

Ce circuit comprend une capacité modélisant le comportement diélectrique du substrat. Celui-ci a été modélisé en effectuant des mesures avec notre dispositif sans y ajouter de milieux physiologiques (cf. 3.5.1). Cependant, en modélisant l'impédance électrique d'une mesure effectuée avec le milieu utilisé pour la culture des cellules HCT-8 (cf. 3.5.4), nous pouvons constater que le circuit équivalent ne comprend pas de capacité modélisant le comportement diélectrique du substrat (cf. figure 3.16). Ceci s'explique par le fait que la capacité du substrat est placée en parallèle de la combinaison en série de la double couche de l'interface électrode-électrolyte et de la résistance du milieu. Dans un montage en parallèle, le courant circule majoritairement dans la branche de circuit présentant l'amplitude d'impédance la plus faible. Or, en comparant les diagrammes de Bode des mesures du substrat (cf. figure 3.12) et du milieu de culture (cf. figure 3.18), nous pouvons constater qu'à chaque fréquence, l'amplitude d'impédance du substrat est 2 à 4 ordres de grandeurs supérieure à celle de la mesure sur du milieu de culture. En présence de ce dernier, la

contribution de l'impédance du substrat est donc négligeable sur le signal d'impédance total. Cela nous permet de simplifier le circuit équivalent initialement présenté figure 2.23 en celui présenté figure 4.2 :

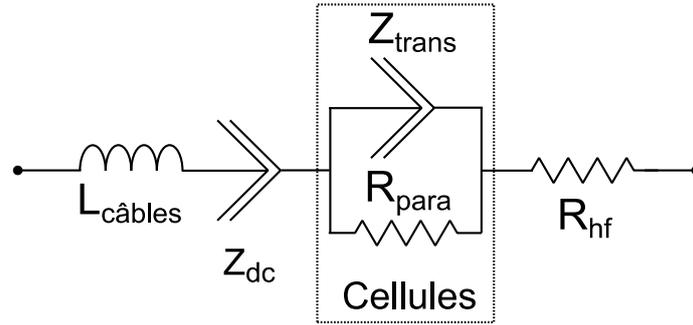


Figure 4.2 : Circuit équivalent final de notre système sans la contribution capacitive du substrat, négligeable pour des mesures avec le milieu utilisé pour nos cultures de cellules HCT-8.

Le tapis cellulaire est représenté par une résistance $R_{para}(t)$ et un CPE $Z_{trans}(t, \omega)$, d'amplitude $P_{trans}(t)$ et d'indice $n_{trans}(t)$, montés en parallèle, modélisant respectivement les trajets paracellulaire et transcellulaire. Le tapis cellulaire peut donc être représenté dans son ensemble par un élément que nous nommerons $Z_{cell}(t, \omega)$, placés en série avec les autres éléments du circuit équivalent. L'impédance de $Z_{cell}(t, \omega)$ se définit par la formule suivante:

$$Z_{cell}(t, \omega) = \frac{R_p(t)}{1 + R_p(t)P_t(t) * (j\omega)^{n_t(t)}} \quad (4.1)$$

Où j désigne le nombre imaginaire ($j^2 = -1$), ω la fréquence radiale égale à $2\pi f$ (en rad.s^{-1}) et t le temps (en s). $R_p(t)$, $P_t(t)$ et $n_t(t)$ correspondent respectivement à $R_{para}(t)$, $P_{trans}(t)$ et $n_{trans}(t)$.

Les éléments $R_{para}(t)$ et $Z_{trans}(t, \omega)$ étant montés en parallèle, l'impédance $Z_{cell}(t, \omega)$ sera dominée par l'élément ayant l'impédance la plus faible à une fréquence donnée. D'après la formule (4.2), quand ω tend vers 0, $Z_{cell}(t, \omega) \sim R_{para}(t)$ et quand ω tend vers l'infini, $Z_{cell}(t, \omega) \sim Z_{trans}(t, \omega)$.

Nous pouvons développer la formule (4.1) afin de distinguer les parties réelle et imaginaire de $Z_{cell}(t, \omega)$:

$$Z_{cell}(t, \omega) = \frac{R_p(t) \left(1 + R_p(t)P_t(t)\omega^{n_t(t)} \cos\left(n_t(t)\frac{\pi}{2}\right) \right) - jR_p(t)^2P_t(t)\omega^{n_t(t)} \sin\left(n_t(t)\frac{\pi}{2}\right)}{\left(1 + R_p(t)P_t(t)\omega^{n_t(t)} \cos\left(n_t(t)\frac{\pi}{2}\right) \right)^2 + \left(R_p(t)P_t(t)\omega^{n_t(t)} \sin\left(n_t(t)\frac{\pi}{2}\right) \right)^2} \quad (4.2)$$

La modélisation par circuit équivalent a été réalisée à 13 instants temporels en suivant le protocole détaillé dans la partie 3.4.3 avec le logiciel EIS Spectrum Analyzer. Ces instants ont été choisis après 3h car les valeurs des éléments modélisant le tapis cellulaire divergent avant cette heure. Enfin, leur répartition sur l'axe temporel a été faite afin de représenter au mieux les moments caractéristiques de la croissance du tapis cellulaire.

4.3 Résultats

4.3.1 Analyses temporelle et fréquentielle du tapis cellulaire

L'impédance électrique du tapis cellulaire a été analysée sur 76 heures à des fréquences comprises entre 100Hz et 1MHz. Concernant la représentation de $|Z(t,f)|$, nous avons pu constater lors des mesures de caractérisation sur le milieu de culture (cf. 3.5.4) que les valeurs de $|Z(t,f)|$ varient de plusieurs ordres de grandeur sur ce spectre fréquentiel, égale à plus de 1000Ω à 100Hz et à environ 10Ω à 1MHz. Afin d'en représenter les changements relatifs au cours du temps, nous avons choisi de tracer l'évolution de sa valeur normalisée par rapport $t = 0h$, notée $|Z(t,f)|_{norm}$. Celle-ci se calcule à partir de la formule (4.3):

$$|Z(t,f)|_{norm} = \frac{|Z(t,f)|}{|Z(t=0h,f)|} \quad (4.3)$$

La figure 4.3 présente l'amplitude de l'impédance normalisée $|Z(t,f)|_{norm}$ et de la phase $\varphi(t,f)$ de l'impédance en fonction du temps et de la fréquence dans un repère en trois dimensions. Comme nous pouvons le constater à la vue de ces graphiques, l'analyse de ces deux dimensions simultanément est complexe. C'est pourquoi nous avons décidé dans un premier temps de suivre la croissance du tapis cellulaire en n'en choisissant qu'une seule. L'intérêt de porter notre choix sur l'amplitude de l'impédance $|Z(t,f)|_{norm}$ réside dans le fait que son analyse est plus aisée du fait que les changements relatifs au cours de la croissance du tapis diffèrent de manière claire suivant la fréquence appliquée.

A des fréquences peu élevées (inférieures à 1kHz environ), $|Z(t,f)|_{norm}$ décroît continuellement pendant les 76 heures de culture, jusqu'à des valeurs 40% inférieures aux valeurs initiales. A des fréquences plus élevées (entre 1 et 100kHz), $|Z(t,f)|_{norm}$ diminue pendant les premières heures de la croissance (12 heures pour des fréquences proches de 1kHz, moins de 3 heures pour des fréquences proches de 100kHz) puis augmente jusqu'à environ 26h avant de décroître jusqu'à la fin de l'expérience. A 26h, nous pouvons constater que le maximum d'amplitude relative atteint dépend de la fréquence.

La sensibilité de notre système peut être définie par rapport à cette augmentation d'amplitude relative. Nous avons constaté que pour des fréquences comprises entre 1kHz et 100kHz environ, $|Z(t,f)|_{norm}$ diminue pendant les premières heures de la croissance jusqu'à un minimum. Afin de prendre en compte cette diminution de l'impédance initiale dans la sensibilité de notre système, commençons par définir le paramètre $S(f)$ tel que :

$$S(f) = \frac{|Z(t_{max},f)|_{norm}}{|Z(t_{min},f)|_{norm}} = \frac{|Z(t_{max},f)|}{|Z(t_{min},f)|} \quad (4.4)$$

où t_{max} et t_{min} désignent les temps où la valeur de l'amplitude d'impédance est respectivement à son maximum et son minimum pour une fréquence donnée. Comme nous l'avons évoqué, il existe une fréquence f_s pour laquelle la sensibilité de notre système $S(f)$ atteint une valeur maximale. f_s se définit donc avec la formule suivante :

$$S(f_s) = \text{Max}_{i=1\dots N}(S(f_i)) = \text{Max}_{i=1\dots N} \left(\frac{|Z(t_{max},f_i)|}{|Z(t_{min},f_i)|} \right) \quad (4.5)$$

où N correspond au nombre de fréquences étudiées, ici 81. La figure 4.4 représente le spectre fréquentiel de $|Z(t,f)|_{norm}$ moyenné sur 3 expériences indépendantes aux temps t_{min} et t_{max} relatifs à la fréquence f_s (respectivement égaux à 26h et 1h30). Dans notre système, f_s est approximativement égale à 30kHz. Quant à la valeur de $S(f_s)$ pour ces suivis impédimétriques de croissance d'un tapis cellulaire, elle est en moyenne de $2,59294 \pm 0,05814$.

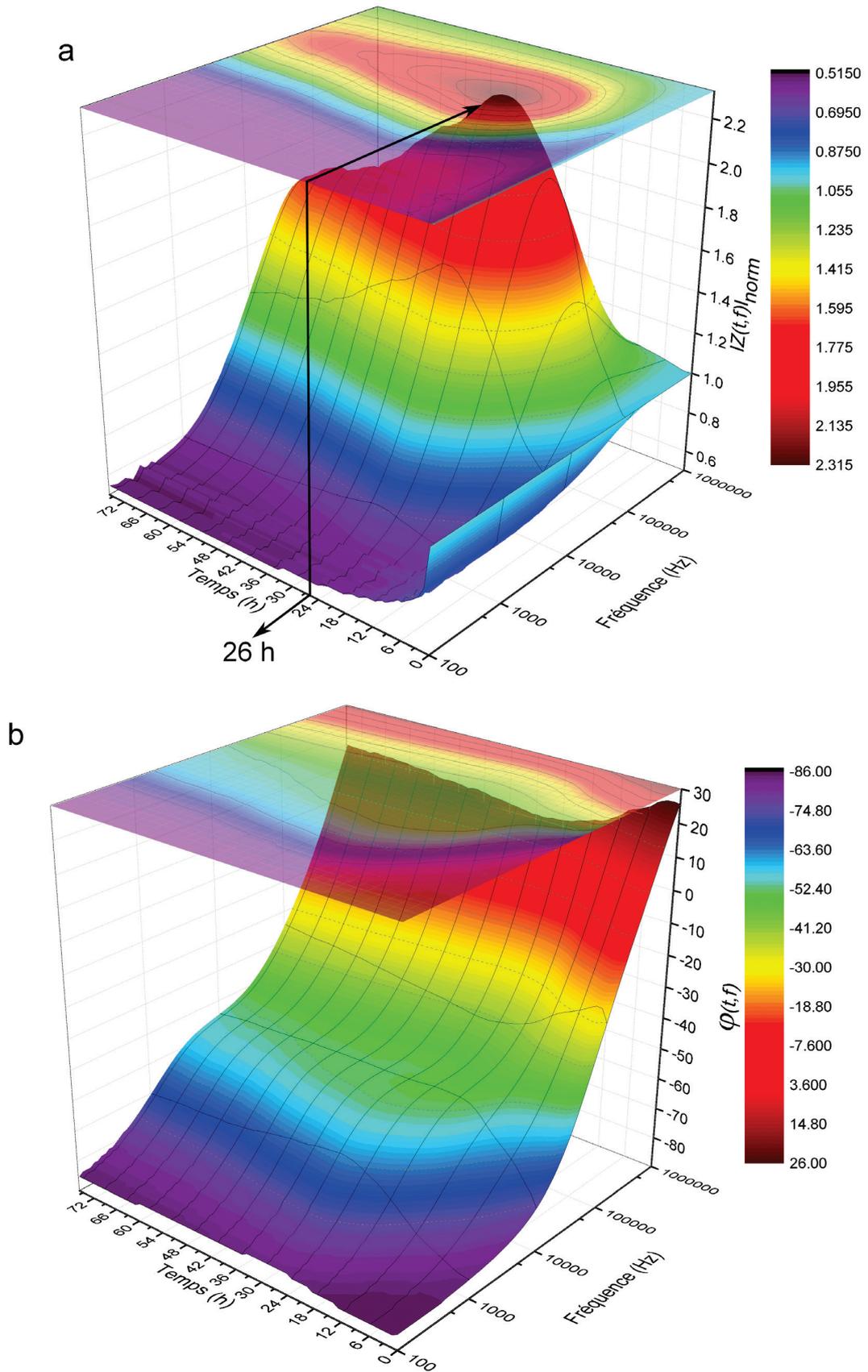


Figure 4.3: Représentations de la mesure de l'impédance du tapis cellulaire en fonction du temps et de la fréquence appliquée. Les graphiques correspondent à l'amplitude de l'impédance normalisée par rapport à sa valeur à $t = 0h$ (cf. équation (4.3)) (a) et à la phase (b). Cette mesure a été effectuée en triplicate. La représentation des deux autres résultats peut être trouvée en Annexe A.

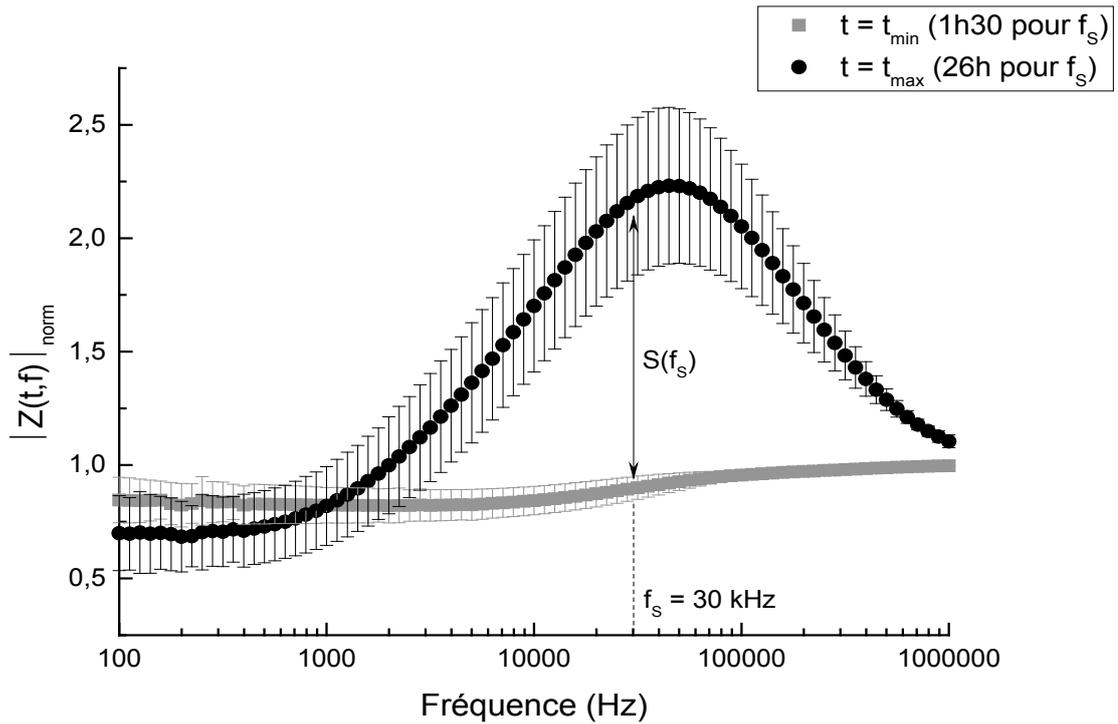


Figure 4.4 : Spectre fréquentiel de $|Z(t,f)|_{norm}$ aux temps t_{min} et t_{max} auxquels $|Z(t,f)|_{norm}$ atteint ses valeurs minimale et maximale au cours des 76h de croissance du tapis cellulaire à la fréquence f_s . $S(f_s)$ correspond au rapport entre ses 2 valeurs et définit la sensibilité de notre système. Les moyennes et écart-types ont été calculés sur 3 expériences indépendantes ($n = 3$).

Nous pouvons à présent considérer comme référence de suivi impédimétrique d'un tapis cellulaire pendant 76h de croissance l'évolution temporelle de $|Z(t,f_s)|_{norm}$ (cf. Figure 4.5). La différence entre la largeur des écart-types provient de difficultés à reproduire exactement les caractéristiques d'une culture cellulaire entre différentes expériences (vitesse de croissance, composition du tapis et donc amplitude d'impédance électrique) intrinsèques à des systèmes vivants. L'évolution temporelle de $|Z(t,f_s)|_{norm}$ est caractérisée par trois phases :

- De 0 à 1h30 : Diminution de 10% environ.
- De 1h30 à 26h : Augmentation de 140% environ.
- De 26 à 76h : Diminution de 20% environ.

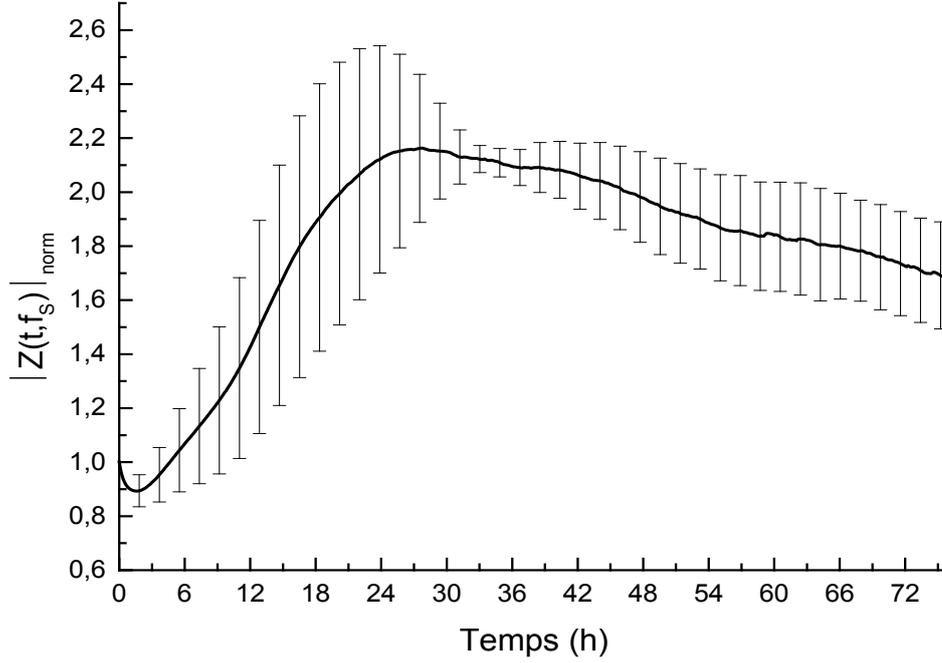


Figure 4.5 : Evolution temporelle de l'amplitude d'impédance normalisée du tapis cellulaire pendant 76h de croissance à la fréquence de sensibilité maximale de notre système $|Z(t, f_s)|_{norm}$ ($f_s = 30\text{kHz}$). Les moyennes et écart-types ont été calculés sur 3 expériences indépendantes ($n = 3$). Par souci de lisibilité, les barres d'erreur ont été représentées tous les 15 points.

4.3.2 Analyse de la croissance cellulaire par circuit équivalent

Comme nous avons pu le constater, le tapis cellulaire influence l'impédance mesurée totale au fur et à mesure de sa formation. Celle-ci est composée de la contribution de plusieurs paramètres, qui peuvent être distingués en procédant à une modélisation par circuit équivalent. Le but de celle-ci est d'étudier d'une part la gamme fréquentielle dans laquelle chaque paramètre influence l'impédance totale et d'autre part l'influence de la formation du tapis cellulaire sur leur évolution au cours du temps. Nous pourrions ainsi déterminer quel paramètre est le plus adapté pour illustrer l'évolution de l'impédance totale.

Dans cette optique, nous allons comparer l'évolution temporelle de l'amplitude de l'impédance totale avec celle de chacun des paramètres du circuit équivalent à différentes fréquences comprises entre 100Hz et 1MHz. D'après le circuit équivalent présenté figure 4.2 et la formule des impédances de chacun des éléments (cf. tableau 2.2), nous pouvons déterminer l'impédance totale :

$$Z(t, \omega) = \left(R_{hf}(t) + \frac{\cos\left(n_{dc}(t)\frac{\pi}{2}\right)}{P_{dc}(t)\omega^{n_{dc}(t)}} + Z_{cell}'(t, \omega) \right) + j \left(L_c(t)\omega - \frac{\sin\left(n_{dc}(t)\frac{\pi}{2}\right)}{P_{dc}(t)\omega^{n_{dc}(t)}} + Z_{cell}''(t, \omega) \right) \quad (4.6)$$

Où $L_c(t)$ désigne $L_{câbles}(t)$, $Z_{cell}'(t, \omega)$ et $Z_{cell}''(t, \omega)$ respectivement les parties réelles et imaginaires de $Z_{cell}(t, \omega)$ (voir équation (4.2)). Pour rappel, ω correspond à la fréquence radiale (en rad.s^{-1}) et est égale à $2\pi f$. La formule (4.6) est complexe et déterminer l'influence de chacun des paramètres sur l'amplitude d'impédance $|Z(t, \omega)|$ (non normée) à une fréquence donnée n'est pas trivial. C'est pourquoi nous avons choisi d'étudier une approximation de $|Z(t, \omega)|$. Celle-ci se base sur le fait que, comme nous le montre le circuit équivalent (cf. figure 4.2), les éléments $L_{câbles}(t)$, $Z_{dc}(t, \omega)$, $Z_{cell}(t, \omega)$ et $R_{hf}(t)$ sont montés en série car le

courant circule à travers chacun d'eux. Leurs impédances s'ajoutent donc, ce qui nous a d'ailleurs permis de déterminer l'équation (4.6). Ces impédances étant complexes, il n'est pas rigoureusement exact de dire que l'amplitude de l'impédance totale $|Z(t, \omega)|$ est la somme des amplitudes d'impédance de chacun des éléments du circuit équivalent. Cela nous permet néanmoins de quantifier approximativement la contribution d'un élément sur $|Z(t, \omega)|$. Nous pouvons donc écrire :

$$|Z(t, \omega)| \cong |Z_{câbles}(t, \omega)| + |Z_{dc}(t, \omega)| + |Z_{cell}(t, \omega)| + R_{hf}(t) \quad (4.7)$$

Où $|Z_{câbles}(t, \omega)|$, $|Z_{dc}(t, \omega)|$ et $|Z_{cell}(t, \omega)|$ désignent respectivement l'amplitude des impédances de $L_{câbles}(t)$, $Z_{dc}(t, \omega)$ et $Z_{cell}(t, \omega)$. Ainsi, nous pourrions calculer le ratio entre l'amplitude d'impédance de chaque élément et l'amplitude d'impédance totale et conclure quant à leur influence à une fréquence et un temps donnés.

Chacune de ces amplitudes d'impédance a été déterminée à 13 instants temporels. La figure 4.6 les représentent, ainsi que l'amplitude de l'impédance totale $|Z(t, \omega)|$, en fonction du temps pour les fréquences 100Hz, 500Hz, 1kHz, 3kHz, 5kHz, 10kHz, 30kHz, 50kHz, 100kHz, 300kHz, 500kHz et 1MHz. Par souci de clarté, nous avons choisi de ne représenter que les amplitudes d'impédance dont la valeur à une fréquence est égale à au moins 10% de $|Z(t, \omega)|$ ou de n'en représenter qu'une seule si celle-ci est égale à 90% de $|Z(t, \omega)|$.

Concernant $|Z_{cell}(t, \omega)|$, nous avons souhaité rendre compte de l'influence (ou poids) des deux paramètres le constituant, i.e. $R_{para}(t)$ et $|Z_{trans}(t, \omega)|$ (cf. 4.2.3). Ceux-ci étant montés en parallèle, l'amplitude d'impédance la plus faible dominera $|Z_{cell}(t, \omega)|$. En adaptant la formule permettant le calcul d'impédance pour un pont diviseur de courant, nous pouvons déterminer leur poids respectif à une fréquence radiale ω_0 , i.e. $Para\%(\omega_0)$ et $Trans\%(\omega_0)$ (en %), grâce aux formules :

$$Para\%(\omega_0) = \sum_{i=0}^M \left(\frac{|Z_t(t_i, \omega_0)|}{R_p(t_i) + |Z_t(t_i, \omega_0)|} \times 100 \right) / M \quad (4.8)$$

$$Trans\%(\omega_0) = \sum_{i=0}^M \left(\frac{R_p(t_i)}{R_p(t_i) + |Z_t(t_i, \omega_0)|} \times 100 \right) / M \quad (4.9)$$

Où t_i désigne un instant temporel auquel la modélisation a été effectuée et M correspond au nombre de ces instants, égal à 13. Les amplitudes d'impédance $R_{para}(t)$, $|Z_{trans}(t, \omega)|$ et $|Z_{cell}(t, \omega)|$ ont été représentées selon la règle suivante :

- Si $Para\%(\omega_0) > 75\%$, alors seul $R_{para}(t)$ est représenté.
- Si $Trans\%(\omega_0) > 75\%$, alors seul $|Z_{trans}(t, \omega)|$ est représenté.
- Sinon, $R_{para}(t)$, $|Z_{trans}(t, \omega)|$ et $|Z_{cell}(t, \omega)|$ sont tous les trois représentés.

Pour finir, il existe une fréquence de relaxation (cf. 2.2.2.2 et 2.2.5.2), à laquelle les poids des trajets paracellulaire et transcellulaire sur l'impédance du tapis cellulaire sont égaux. Cette fréquence, que nous noterons $f_{para/trans}(t)$, se calcule à partir de la formule suivante :

$$f_{para/trans}(t) = \frac{1}{2\pi \left(R_p(t) P_t(t) \right)^{1/n_t(t)}} \quad (4.10)$$

Les amplitudes d'impédance ont été calculées à partir de valeurs issues de notre protocole de calibrage du circuit équivalent. Celles-ci, ainsi que les valeurs $f_{para/trans}(t)$ sont répertoriées dans le tableau 4.1.

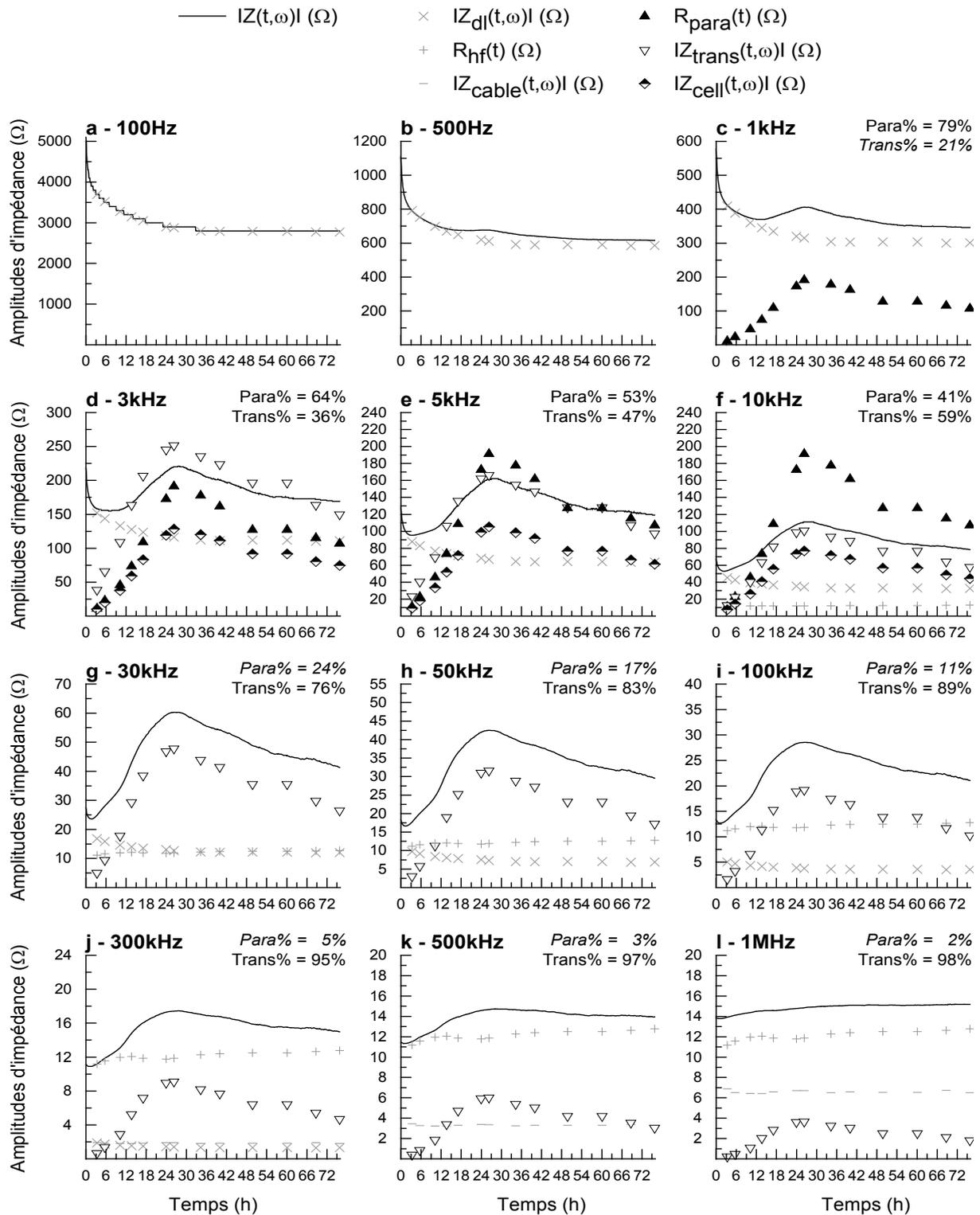


Figure 4.6: Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent comparées à l'amplitude d'impédance totale $|Z(t,\omega)|$ aux fréquences 100Hz (a), 500Hz (b), 1kHz (c), 3kHz (d), 5kHz (e), 10kHz (f), 30kHz (g), 50kHz (h), 100kHz (i), 300kHz (j), 500kHz (k) et 1MHz (l). A chaque fréquence, seules les amplitudes d'impédance des éléments dont la valeur est égale à au moins 10% de $|Z(t,\omega)|$ sont représentées. La contribution des trajets para- et transcellulaire sur $|Z_{cell}(t,\omega)|$ ont également été tracées selon la règle suivante : si leur poids, respectivement $Para\%$ et $Trans\%$, est supérieur à 75% (cf. équations (4.8) et (4.9)), alors seule la contribution prédominante est représentée. Sinon, les trois amplitudes d'impédance, i.e. $R_{para}(t)$, $|Z_{trans}(t,\omega)|$ et $|Z_{cell}(t,\omega)|$, sont tracées. Cette mesure a été effectuée en triplicata. Les deux autres résultats peuvent être trouvés en Annexe B.

Temps (h,min)	R_{para} (Ω)	P_{trans} (S.S ^{nttrans})	n_{trans}	R_{hf} (Ω)	P_{dc} (S.S ^{ndll})	n_{dc}	$L_{câbles}$ (H)	r^2	$f_{para/trans}$ (Hz)
3h 19min	10,98	4,43E-06	0,88638	11,17	5,74E-07	0,95551	1,09E-06	0,99955	1,2E+04
5h 37min	22,62	4,01E-06	0,84274	11,57	5,94E-07	0,95756	1,04E-06	0,99957	1,0E+04
10h 12min	45,46	4,18E-06	0,78661	11,96	6,30E-07	0,95963	1,02E-06	0,99968	8,6E+03
13h 38min	73,33	4,07E-06	0,74780	12,06	6,55E-07	0,95991	1,02E-06	0,99974	8,2E+03
17h 05min	108,61	3,85E-06	0,72971	11,86	6,75E-07	0,96000	1,05E-06	0,99973	6,8E+03
23h 58min	172,60	3,61E-06	0,71874	11,77	7,24E-07	0,95711	1,07E-06	0,99968	4,6E+03
26h 15min	191,11	3,44E-06	0,72105	11,86	7,11E-07	0,96107	1,07E-06	0,99971	4,1E+03
34h 17min	177,59	3,37E-06	0,72961	12,26	7,22E-07	0,96312	1,03E-06	0,99976	4,2E+03
40h 01min	161,55	3,47E-06	0,73215	12,40	7,19E-07	0,96426	1,05E-06	0,99979	4,4E+03
49h 46min	127,20	3,54E-06	0,74310	12,50	7,26E-07	0,96289	1,04E-06	0,99975	5,1E+03
60h 06min	116,77	4,09E-06	0,74310	12,59	7,34E-07	0,96231	1,05E-06	0,99975	4,7E+03
68h 42min	115,10	4,37E-06	0,74033	12,63	7,15E-07	0,96584	1,07E-06	0,99980	4,5E+03
75h 49min	106,86	4,24E-06	0,75256	12,78	7,24E-07	0,96405	1,03E-06	0,99980	4,4E+03

Tableau 4.1: Valeurs des éléments du circuit équivalent déterminées avec notre protocole de calibration. Le coefficient de corrélation r^2 et la fréquence $f_{para/trans}$ ont été déterminés à partir des formules (3.3) et (4.10). Cette mesure a été effectuée en triplicate. Les deux autres résultats peuvent être trouvés en Annexe B.

Analysons à présent l'évolution de chacun des éléments et leur influence sur $|Z(t,\omega)|$:

❖ Double couche (Z_{dc})

Aux fréquences inférieures ou égales à 500Hz, le ratio entre $|Z_{dc}(t,\omega)|$ et $|Z(t,\omega)|$ est égal à une valeur comprise entre 90 et 100%. $|Z(t,\omega)|$ est donc entièrement dominée par $|Z_{dc}(t,\omega)|$. Puis, à 1kHz, nous pouvons constater que ce ratio diminue jusqu'à une valeur minimale d'environ 75% à 26 h. La double couche n'explique donc plus entièrement les variations observées dans $|Z(t,\omega)|$ au cours du temps. Le ratio entre les deux amplitudes d'impédance diminue à mesure que la fréquence augmente, jusqu'à ce que la contribution de la double couche devienne négligeable à partir d'une fréquence comprise entre 300 et 500kHz.

D'un point de vue temporel, $|Z_{dc}(t,\omega)|$ commence par diminuer jusqu'à 40 h, perdant environ 40% de sa valeur initiale. Puis elle se stabilise à cette valeur jusqu'à la fin de l'expérience.

❖ Résistance à hautes fréquences (R_{hf})

Pour des fréquences inférieures à 10kHz, $R_{hf}(t)$ est négligeable par rapport à $|Z(t,\omega)|$. Puis, à 10kHz, le ratio entre les deux est compris entre 10 et 20% environ. A partir d'une fréquence entre 100 et 300kHz, $R_{hf}(t)$ devient prédominant sur $|Z(t,\omega)|$ car à 300kHz, sa valeur correspond au minimum à environ 70% de $|Z(t,\omega)|$.

L'évolution temporelle de $R_{hf}(t)$ est relativement stable, oscillant à des valeurs comprises entre 11 et 12 Ω environ, ce qui correspond à des variations inférieures à 10%.

❖ Inductance ($L_{câbles}$)

Les effets inductifs $|Z_{câbles}(t,\omega)|$ sont négligeables pour des fréquences inférieures à 300kHz. Le ratio entre sa valeur et $|Z(t,\omega)|$ augmente ensuite à mesure que la fréquence augmente, passant de valeurs comprises entre 10 et 20% environ à 300kHz et entre 40 et 50% à 1MHz.

Tout comme $R_{hf}(t)$, $|Z_{câbles}(t,\omega)|$ est stable dans le temps, oscillant entre 6.2 et 7 Ω environ, soit des variations d'environ 10%.

❖ Tapis cellulaire (Z_{cell})

Les effets du tapis cellulaire sont considérés comme négligeables à des fréquences inférieures ou égales à 500Hz. A 1kHz, le ratio entre $|Z_{cell}(t,\omega)|$ (égal ici à $R_{para}(t)$) et $|Z(t,\omega)|$ atteint une valeur maximale de 50% à 26 h. A partir de cette fréquence, cet élément n'est donc plus négligeable sur l'amplitude de l'impédance totale. Dès 3kHz, le ratio maximal à 26h entre $|Z_{cell}(t,\omega)|$ et $|Z(t,\omega)|$ est de 55% environ et supérieur à celui entre $|Z_{dc}(t,\omega)|$ et $|Z(t,\omega)|$, qui est de 50% environ. Nous pouvons donc considérer que l'effet du tapis cellulaire sur l'amplitude de l'impédance totale est prédominant à cette fréquence. Puis, à partir d'une fréquence comprise entre 100 et 300kHz, $|Z_{cell}(t,\omega)|$ (ici égal à $|Z_{trans}(t,\omega)|$) n'est plus prédominant car à 300kHz, son ratio avec $|Z(t,\omega)|$ est inférieur à 50%. En raison de la valeur du ratio maximal entre $|Z_{cell}(t,\omega)|$ et $|Z(t,\omega)|$ de 50% à 1kHz, nous pouvons conclure que les effets du tapis cellulaire sont principalement visibles entre 1kHz et 100kHz. En outre à 5kHz, nous pouvons observer que les poids des trajets para- et transcellulaires sur $|Z_{cell}(t,\omega)|$ sont quasiment égaux à 50%, 5kHz étant une fréquence proche de $f_{para/trans}(t)$ (cf. tableau 4.1).

D'un point de vue temporel, $|Z_{cell}(t,\omega)|$ est nul à 0 h, puis augmente jusqu'à un maximum à 26h avant de diminuer jusqu'à une valeur égale à environ 50% de celle du maximum. Il existe en outre une fréquence, 30kHz, pour laquelle le ratio entre $|Z_{cell}(t,\omega)|$ et $|Z(t,\omega)|$ à 26h atteint une valeur maximum, soit 80%.

4.3.3 Influence du repiquage sur nos croissances cellulaires.

Cette partie évalue l'influence du nombre de repiquages sur l'amplitude de l'impédance électrique totale $|Z(t,\omega)|$. Cette dernière a été mesurée pendant 24h sur une même culture cellulaire ayant subi au préalable 7, 14, 24 et 33 repiquages (respectivement P+7, P+14, P+24 et P+33). Afin d'observer les changements relatifs de $|Z(t,\omega)|$ avec un maximum de sensibilité, nous avons représenté, tout comme dans la partie 4.3.1, l'amplitude d'impédance électrique normalisée par rapport à $t = 0h$ $|Z(t,\omega)|_{norm}$ à la fréquence f_s , soit 30kHz (cf. figure 4.7a). Pour chaque repiquage, la moyenne et l'écart-type ont été calculés à partir de mesures effectuées sur trois puits différents.

Nous pouvons constater que suivant le nombre de repiquages subis par les cellules, l'amplitude de l'impédance normalisée totale évolue différemment. Après 7 repiquages, $|Z(t,\omega)|_{norm}$ commence par diminuer légèrement pendant environ 4h et une valeur moyenne de 0,85 puis augmente jusqu'à atteindre une valeur moyenne de 2.10 à 24h. Nous pouvons noter que la pente diminue légèrement après 18h. Après 14 repiquages, l'évolution est similaire car nous pouvons également y observer la diminution initiale, jusqu'à 4h et une valeur moyenne de 0,85, suivie d'une augmentation jusqu'à une valeur de 1,80 environ à 24h. La pente diminue ici aussi légèrement après 18h. Après 24 repiquages, la diminution initiale est plus marquée car elle dure jusqu'à 12h et atteint une valeur de 0,6. Elle est suivie par une augmentation jusqu'à une valeur moyenne de 1 à la fin de l'expérience. Enfin, après 33 repiquages, nous ne constatons pas de diminution initiale mais une augmentation tout au long des 24h, pour atteindre une valeur finale de 1,45. Afin d'évaluer la sensibilité maximale de notre système en fonction du nombre de repiquages subis par les cellules, nous pouvons adapter la formule (4.5) de la façon suivante :

$$S(x, f_s) = \frac{|Z(x, t_{max}, f_s)|}{|Z(x, t_{min}, f_s)|} \quad (4.11)$$

où x désigne le nombre de repiquages des cellules et t_{max} et t_{min} correspondent aux instants où la valeur de l'amplitude d'impédance est respectivement à son maximum et son minimum à une fréquence donnée, ici f_s (30kHz). La fonction $S(x;f_s)$ en fonction du nombre de repiquages x a été tracée sur la figure 4.7b.

Les moyennes et écart-types ont été déterminés sur les trois expériences indépendantes. Ces valeurs peuvent être modélisées avec la fonction suivante :

$$f(x) = a \times x + b \quad (4.12)$$

avec $a = -0,03989 \pm 0,00434$, $b = 2,70553 \pm 0,00783$ et un coefficient de corrélation de 0,96535 (max = 1). Ce modèle montre que $S(x, f_S)$ diminue linéairement à mesure que le nombre de repiquages x subis au préalable par les cellules augmente. Or, nous souhaitons obtenir une sensibilité suffisamment élevée afin que les effets de l'infection soient visibles sur la réponse impédimétrique. Ces effets étant inconnus, nous avons arbitrairement choisi d'effectuer nos expériences d'infection sur des cultures cellulaires dont la sensibilité $S(x, f_S)$ est, après 24h de croissance du tapis cellulaire, au minimum de 2. La figure 4.7b montre que pour obtenir cette valeur, le nombre maximal de repiquages que les cellules peuvent subir est de 17.5, soit 18 environ.

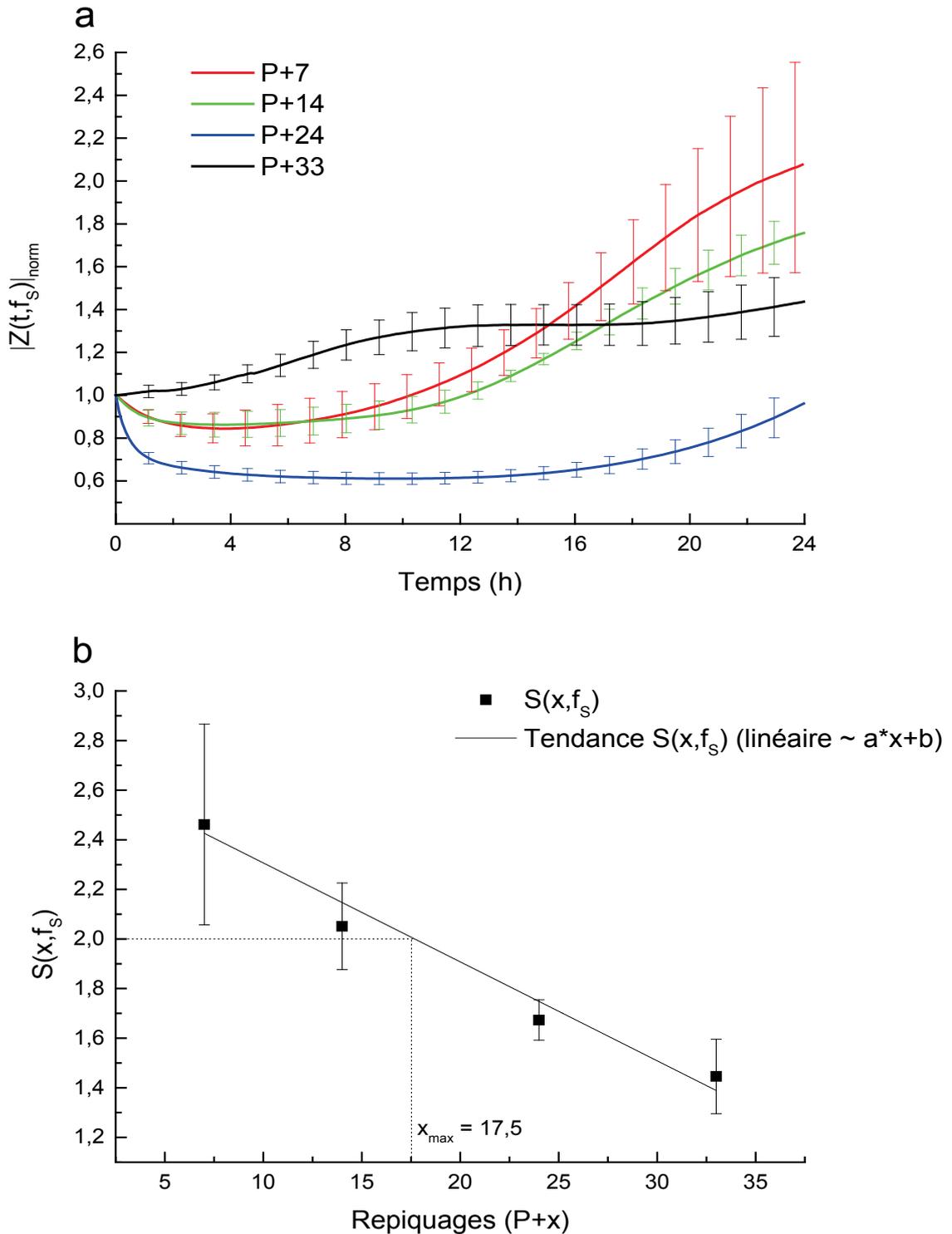


Figure 4.7: Effet du nombre de repiquages subis par les cellules sur leur réponse impédimétrique mesurée pendant 24h. a) Evolution sur 24h de l'amplitude de l'impédance normalisée totale $|Z(t, f_s)|_{\text{norm}}$ au cours de la croissance d'un tapis cellulaire ayant subi au préalable 7, 14, 24 et 33 repiquages (P+7, P+14, P+24 et P+33). Par souci de lisibilité, les barres d'erreur ont été représentées tous les 10 points. b) Sensibilité maximale de notre système $S(x, f_s)$ en fonction du nombre de repiquages x . La courbe de tendance est de la forme $y = a \cdot x + b$ avec $a = -0,03989 \pm 0,00434$ et $b = 2,70553 \pm 0,00783$ et un coefficient de corrélation de 0,96535 ($\text{max} = 1$). Pour obtenir une valeur minimale de $S(x, f_s)$ égale à 2, le nombre de repiquages maximal x_{max} doit être de 17,5, soit 18 environ. Les moyennes et écart-types de chaque courbe ont été calculés à partir de trois mesures effectuées sur trois puits différents ($n = 3$).

Comparons à présent les valeurs de l'élément $R_{para}(t)$ du circuit équivalent (cf. circuit équivalent figure 4.2) après 24h de croissance du tapis cellulaire pour chaque nombre de repiquages. La modélisation a été effectuée en suivant protocole décrit dans la partie 4.2.3. La figure 4.8 présente la valeur moyenne et les écart-types de $R_{para}(t = 24h)$, calculés à partir de mesures effectuées sur trois puits différents, en fonction du nombre de repiquages subis par les cellules avant l'expérience. Les valeurs des autres éléments du circuit équivalent sont répertoriées dans le tableau 4.2. Nous pouvons constater que $R_{para}(t = 24h)$ diminue à mesure que le nombre de repiquage augmente. Sa valeur moyenne après 7 repiquages est d'environ 200Ω et diminue jusqu'à environ 30Ω après 33 repiquages. Ces valeurs peuvent se modéliser avec la fonction suivante :

$$f(x) = c \times x^d \quad (4.13)$$

avec $c = 1536,31668 \pm 366,31949$, $d = -1,0475 \pm 0,07979$ et un coefficient de corrélation de $0,96155$ ($\max = 1$). d est proche de -1 , donc $f(x) \sim c/x$, traduisant la relation inversement proportionnelle entre la valeur $R_{para}(t = 24h)$ et le nombre de repiquages subis par les cellules.

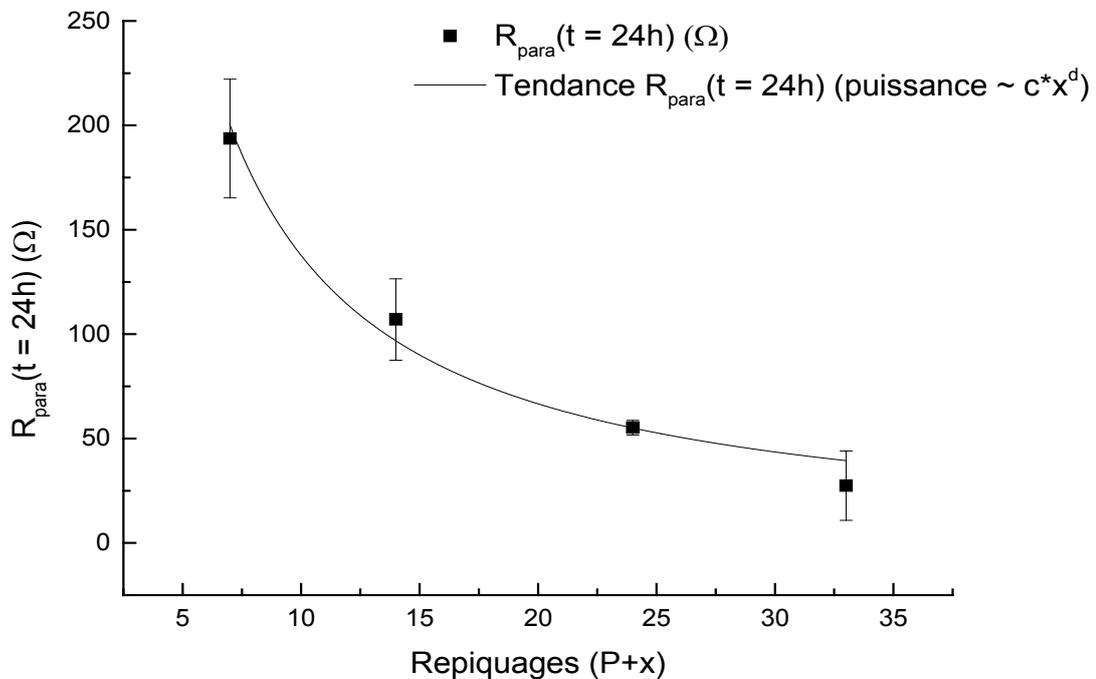


Figure 4.8: Evolution de $R_{para}(t)$ à $t = 24h$ suivant le nombre de repiquage subis par les cellules. Elle peut être modélisée par une courbe de tendance de la forme $y = c \cdot x^d$ avec $c = 1536,31668 \pm 366,31949$, $d = -1,0475 \pm 0,07979$ et un coefficient de corrélation de $0,96155$ ($\max = 1$). d est proche de -1 donc la courbe de tendance peut s'approximer en $\sim c/x$. Les moyennes et écart-types de chaque courbe ont été calculés à partir de trois mesures effectuées sur trois puits différents ($n = 3$).

		R_{para} (Ω)	P_{trans} (S.S ^{ntrans})	n_{trans}	R_{bf} (Ω)	P_{dc} (S.S ^{ndc})	n_{dc}	r^2
P+7	Donnée 1	222,23	4,25E-06	0,69805	12,60	4,45E-07	0,97349	0,99993
	Donnée 2	193,53	5,25E-06	0,69045	13,01	6,49E-07	0,98172	0,99993
	Donnée 3	165,36	4,06E-06	0,72857	11,63	5,82E-07	0,96942	0,99992
P+14	Donnée 1	119,49	3,37E-06	0,78297	14,45	7,05E-07	0,98715	0,99986
	Donnée 2	84,55	6,25E-06	0,77081	12,66	8,39E-07	0,98319	0,99994
	Donnée 3	117,04	4,41E-06	0,74514	16,73	8,46E-07	0,96793	0,99989
P+24	Donnée 1	56,13	3,98E-06	0,81602	10,86	7,49E-07	0,97390	0,99969
	Donnée 2	51,30	6,40E-06	0,80610	12,01	7,34E-07	0,97862	0,99992
	Donnée 3	58,18	7,38E-06	0,78028	11,55	7,64E-07	0,97988	0,99991
P+33	Donnée 1	13,16	1,30E-06	0,97503	8,72	9,23E-07	0,96302	0,99916
	Donnée 2	45,65	1,72E-05	0,71362	8,72	9,23E-07	0,96302	0,99991
	Donnée 3	23,55	2,78E-06	0,87080	10,00	1,11E-06	0,94731	0,99945

Tableau 4.2 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent et coefficient de corrélation après 24h de croissance du tapis cellulaire ayant subi 7, 14, 24 et 33 repiquages (respectivement P+7, P+14, P+24 et P+33). Les données 1, 2 et 3 désignent trois mesures effectuées sur trois puits différents.

4.4 Discussion

L'objectif de cette thèse est de suivre les procédés d'infection du protozoaire parasite *C. parvum* sur des cultures de cellules HCT-8 en mesurant en continu l'impédance électrique de ces dernières. Dans le chapitre 3, nous avons présenté et caractérisé électriquement notre dispositif de mesure d'impédance électrique ainsi que le banc de test expérimental. Notre conclusion était que ce système possède des limites dans l'analyse de milieux à conductivité élevée. En particulier, lors de mesures effectuées sur le milieu de culture utilisé pour les cellules HCT-8, nous avons montré que les effets parasites provenant des câbles du banc de test deviennent non négligeables sur la mesure d'impédance en hautes fréquences. Il est donc nécessaire de vérifier si, malgré ces limites, notre dispositif, caractérisé par la constante de cellule du REIP (cf. définition dans la partie 2.4.2.1 et le calcul dans le tableau 3.3), est adapté à la mesure d'impédance électrique des cellules HCT-8. Dans un premier temps, nous pouvons considérer la valeur de R_{para} déterminée après 3h de croissance ($10,98\Omega$ cf. tableau 4.1) comme étant proche de la résistance paracellulaire minimale que notre système peut mesurer. A partir de la valeur de notre constante de cellule ($K_{puits} = 3,36602m^{-1}$ cf. tableau 3.3), nous pouvons calculer la conductivité maximale du tapis $\sigma_{tapis,max}$, qui est donc proche de la conductivité maximale que notre système peut détecter, en utilisant la formule (2.28). Nous obtenons $\sigma_{tapis,max} = 0,30656S.m^{-1}$. Cette valeur est inférieure à celle de σ_{max} ($0,44662 S.m^{-1}$) que nous avons déterminée dans le chapitre 3 (cf. 3.5.4). Ceci confirme notre prédiction quant à la conductivité maximale du tapis cellulaire que notre système peut détecter. Dans un deuxième temps, nous avons justifié la nécessité de l'état de confluence du tapis cellulaire avant l'infection par le *C. parvum* (cf. 4.1). Suivre en continu la croissance du tapis cellulaire jusqu'à sa confluence constitue une autre méthode pour vérifier si notre dispositif est adapté à la mesure d'impédance électrique des cellules HCT-8. L'impédance contient deux informations : l'amplitude et la phase. En choisissant de suivre l'amplitude, nous avons montré qu'il existe une fréquence f_s à laquelle ses variations au cours de la croissance du tapis cellulaire sont les plus importantes. Nous pouvons donc conclure que notre dispositif de mesure est adapté pour mesurer l'impédance électrique d'un tapis de cellules HCT-8.

Standardiser le suivi de la croissance du tapis cellulaire sur 76h nous a permis de constater que l'évolution de l'amplitude de cette impédance possède à la fréquence f_s une forme caractéristique : une

légère diminution de 0 à 3h, suivie d'une augmentation importante de 3 à 26h et enfin une dégression de 26 à 76h. Cette forme est similaire à celle des courbes de croissance de cellules humaines observées classiquement en biologie. Dans celles-ci, la concentration des cellules est mesurée en fonction du temps de culture. Trois phases peuvent être distinguées, qui correspondent aux trois phases que nous avons observées :

- Phase de stabilisation : la première phase correspond au moment où les cellules s'adaptent au milieu de culture. Elles reconstituent leur squelette, s'attachent et s'étalent sur le substrat. Elles ne forment donc pas encore un tapis. Le champ électrique est par conséquent peu perturbé ce qui explique le peu de changements observés sur l'amplitude d'impédance électrique.
- Phase de croissance exponentielle : dans la deuxième phase, les cellules commencent leur division (ou mitose). Celle-ci est exponentielle car une cellule se divise en deux cellules-filles qui elles-mêmes se divisent en deux cellules-filles chacune etc... A mesure que les divisions progressent, les cellules recouvrent de plus en plus d'espace et forment des jonctions intercellulaires entre elles. La surface occupée par le tapis cellulaire augmente, perturbant ainsi de plus en plus le champ électrique induit par le REIP sur lequel elles poussent. En conséquence, l'amplitude de l'impédance électrique mesurée augmente.
- Phase de confluence : la dernière phase correspond au moment où les cellules ont formé un tapis confluent, i.e. le tapis cellulaire recouvre l'ensemble du REIP. L'amplitude d'impédance électrique atteint donc un maximum à cet instant. A confluence, les cellules épithéliales non transformées cessent de croître par inhibition de contact et nous pourrions donc nous attendre à ce que l'amplitude d'impédance électrique reste constante au cours du temps. Or, les cellules HCT-8 sont des cellules épithéliales cancéreuses, donc ayant subi une transformation. Elles ont donc perdu leur inhibition de contact et continuent de se diviser une fois à confluence. Cette phase de confluence n'est donc pas stable, ce qui expliquerait pourquoi l'amplitude d'impédance électrique n'est pas constante. Afin de comprendre pourquoi elle diminue, il est nécessaire d'analyser la contribution de chacun des éléments sur l'impédance électrique totale. Nous pourrions ainsi distinguer celui qui illustre au mieux l'évolution de l'amplitude d'impédance électrique au cours de la croissance du tapis cellulaire.

La modélisation par circuit équivalent nous permet de distinguer trois types d'éléments : ceux dont l'influence la plus importante sur l'amplitude d'impédance électrique totale se situe aux fréquences élevées (R_{hf} , $Z_{câbles}$), aux fréquences faibles (Z_{dc}) et enfin à des fréquences intermédiaires (Z_{cell}). Au cours de la croissance cellulaire, l'amplitude de leur impédance évolue différemment. Nous allons à présent les analyser et trouver des hypothèses biochimiques justifiant leurs évolutions :

- Tout d'abord, les variations des amplitudes d'impédance de R_{hf} (milieu de culture et effets résistifs du montage parasite) et $Z_{câbles}$ (effets inductifs des câbles parasites) sont faibles. Elles peuvent être majoritairement imputées à une baisse de précision de notre algorithme de modélisation en hautes fréquences.
- Concernant la diminution de l'amplitude d'impédance de Z_{dc} , elle peut s'expliquer par une réorganisation de charges au niveau du subépithélium (l'espace entre les électrodes et les cellules) pendant la croissance du tapis (Giaever et Keese, 1991). En effet, nous avons montré dans le chapitre 2 (cf. 2.4.4.1) que la double couche dans le cadre de notre expérience possède un comportement capacitif. Ceci se confirme par la valeur de l'indice du CPE la modélisant, de 0,96 en moyenne sur l'ensemble de notre expérience donc très proche de 1. La valeur d'une capacité augmente si le nombre de charges qu'elle contient s'accroît. Par analogie, si le nombre de charges augmente au niveau de l'interface électrode-électrolyte, alors la valeur de l'amplitude de la CPE P_{dc} s'élève, comme nous pouvons l'observer dans notre expérience. Par conséquent, l'amplitude de l'impédance électrique Z_{dc} diminue.

- En ce qui concerne Z_{cell} , nous avons montré que son influence sur l'amplitude d'impédance électrique totale peut être observée principalement entre 1kHz et 100kHz, ce qui explique notamment le pic observé à 26h. En outre, nous avons confirmé que cette influence est la plus importante à la fréquence f_s . Z_{cell} est composé de deux éléments, dont l'évolution des amplitudes d'impédance électriques au cours du temps possèdent une forme similaire : R_{para} et Z_{trans} , modélisant respectivement les trajets para- et transcellulaire. Nous n'avons à l'heure actuelle pas d'explication sur la raison de la similarité de leur évolution. Néanmoins, ce point commun nous permet de choisir quel élément analyser pour illustrer au mieux la croissance cellulaire. Nous avons choisi le trajet paracellulaire car il n'est composé que d'un seul paramètre (R_{para}) et son analyse est donc plus aisée que Z_{trans} , un CPE comprenant deux paramètres (P_{trans} et n_{trans}). Le trajet paracellulaire est composé de deux zones, qui ne peuvent être distinguées dans le terme R_{para} : les jonctions intercellulaires et le subépithélium. Les phases d'augmentation et de diminution de R_{para} peuvent donc être expliquées par des changements au niveau de ces zones. Nos hypothèses portent sur des modifications au niveau des jonctions intercellulaires car nous n'avons que peu d'informations biologiques permettant de relier le subépithélium pendant la croissance avec des variations de résistance électrique. D'une part, l'augmentation de R_{para} peut s'expliquer par la formation de jonctions entre les cellules qui se multiplient par mitose (Wegener *et al.*, 1996). La littérature nous précise que parmi ces jonctions, ce sont les jonctions serrées qui influent le plus sur cette résistance électrique. Celles-ci sont spécifiques des tissus épithéliaux et leur rôle est de bloquer la circulation de fluides entre la zone apicale (i.e. au-dessus) et la zone basale (i.e. en dessous) du tapis cellulaire. D'autre part, la diminution de R_{para} peut s'expliquer de deux façons : soit par la dégradation de ces jonctions serrées au cours du temps, soit par leur multiplication après que le tapis ait atteint la confluence. En effet, les cellules HCT-8 sont des cellules cancéreuses donc leurs divisions ne s'arrêtent pas une fois la confluence du tapis atteinte. L'augmentation de la densité des cellules sur une surface de dimension fixe induit une augmentation du périmètre des jonctions intercellulaires, et surtout des jonctions serrées. De nouvelles résistances viennent alors s'ajouter en parallèle de $R_{para}(t = 26h)$, ce qui a pour conséquence de diminuer la valeur de la résistance totale. L'évolution de l'élément R_{para} pendant la croissance cellulaire peut donc être expliquée. Comme pour l'amplitude d'impédance électrique totale, son évolution comprend également une phase d'augmentation jusqu'à 26h suivie d'une phase de diminution jusqu'à la fin de l'expérience. Seule la phase de stabilisation observée sur l'amplitude d'impédance électrique totale de 0 à 3h ne peut être observée sur R_{para} . En conclusion, l'élément R_{para} est celui qui permet d'illustrer au mieux la croissance du tapis cellulaire dans notre expérience.

Nous nous sommes également intéressés à l'effet du nombre de repiquages subis au préalable par les cellules sur l'évolution de l'impédance électrique du tapis qu'elle forme. En effet, notre but est d'obtenir un tapis cellulaire confluent et d'observer ensuite l'effet de l'infection par le *C. parvum* sur son impédance. Or, les repiquages subis par les cellules les affectent au niveau de leur morphologie, de leur développement et de l'expression de leur gène (Hughes *et al.*, 2007). D'un point de vue électrique, il a été montré que ces changements ont notamment une influence sur la mesure de la TEER (cf. définition dans la partie 1.3.1) du tapis cellulaire. Néanmoins, les cellules réagissent différemment à l'augmentation du nombre de repiquages subis, même au sein d'une même lignée. Tandis que Yu *et al.* ont montré que l'augmentation du nombre de repiquages sur des cellules Caco-2 (issues d'un adénocarcinome colorectal humain) induit une augmentation de la TEER (Yu *et al.*, 1997), Walter *et al.* en ont mesuré à l'inverse une diminution sur la même lignée cellulaire (Walter et Kissel, 1995). De même, Arthur *et al.* ont mesuré la TEER de six types de cellules MDCK (cellules non cancéreuses de rein de coquer) d'origine différente après 65 à 70 repiquages puis après 125 à 130 : la TEER augmente pour cinq types de cellules mais diminue pour un.

Concernant les cellules HCT-8, il n'existe pas d'études permettant de conclure sur l'effet du nombre de repiquages sur le développement du tapis cellulaire. Notre expérience permet d'isoler la résistance électrique du trajet paracellulaire R_{para} par rapport aux autres contributions du tapis. Elle montre que celle-ci évolue de manière inversement proportionnelle au nombre de repiquages : lorsque ceux-ci augmentent, R_{para} diminue. Cette diminution peut être expliquée par des différences dans la structure et le développement des jonctions serrées, dont la détermination de l'origine nécessite des études complémentaires.

Il convient à présent d'estimer le nombre de repiquages maximum que nos cellules HCT-8 peuvent subir pour augmenter nos chances que l'effet de l'infection par le *C. parvum* sur l'amplitude d'impédance soit reproductible et visible. Concernant la reproductibilité, elle peut être évaluée en comparant l'évolution temporelle de l'amplitude d'impédance avec la forme de courbe caractéristique de la croissance d'un tapis cellulaire, comprenant une phase de stabilisation, de croissance exponentielle jusqu'à 26h et de confluence. Au regard des pentes des courbes entre 18 et 24h, celles correspondant à 7 et 14 repiquages approchent de la phase de confluence à 24h, ce qui n'est pas le cas des courbes à 24 et 33 repiquages. Le nombre maximal de repiquages pour assurer la reproductibilité de la courbe caractéristique de croissance d'un tapis cellulaires est donc compris entre 14 et 24. Quant à la visibilité, nous pouvons nous référer à la sensibilité de notre système, évaluant l'écart entre les valeurs minimale et maximale de l'amplitude d'impédance que notre système mesure pendant la croissance du tapis cellulaire. Les effets du *C. parvum* sur l'impédance électrique d'un tapis de cellules HCT-8 étant pour l'instant inconnus, nous avons estimé que notre système doit présenter une valeur de sensibilité minimale afin de s'assurer que ces effets soient visibles. Ainsi, nous avons arbitrairement choisi une valeur minimale de 2, qui d'après notre modèle est atteinte pour un nombre de repiquages inférieur à 18. Des expériences complémentaires sont néanmoins nécessaires afin de déterminer cette valeur précisément. Celles-ci nécessitent par exemple d'infecter avec le même nombre de parasites de *C. parvum* des cellules d'une même lignée mais ayant subi un nombre de repiquages différent. Puis en comparant les variations dans la réponse impédimétrique par rapport à celles des cellules ayant subi le moins de repiquages (définies comme référence), nous pouvons alors déterminer une différence de réponse maximale, qui correspond à un nombre de repiquages à ne pas dépasser. En conclusion, afin d'augmenter la visibilité et la reproductibilité des effets d'infection du *C. parvum* sur un tapis de cellules HCT-8, nous avons décidé de ne pas effectuer d'expériences d'infection sur des cellules ayant subi plus de 18 repiquages.

4.5 Conclusion

En conclusion, notre dispositif de mesure et notre banc de test sont adaptés à la mesure d'impédance électrique de culture de cellules HCT-8. A la fréquence où la sensibilité est maximale, l'évolution temporelle de l'amplitude d'impédance a un profil proche des courbes de croissance de cellules animales observées classiquement en biologie. Nous avons standardisé la durée de la croissance du tapis cellulaire à 76h afin de nous assurer de retrouver ce profil de courbe caractéristique. Nous avons également montré que la résistance du trajet paracellulaire permettait d'illustrer l'évolution de l'amplitude d'impédance totale. Pour finir, il convient de considérer le nombre de repiquages que les cellules ont subi avant les mesures. En effet, celui-ci a un impact sur l'amplitude d'impédance du tapis et potentiellement sur la sensibilité et la reproductibilité de notre système au suivi des procédés d'infection du *C. parvum* sur les cellules. Nous avons fait le choix de ne pas faire d'expériences d'infection sur des cellules ayant subi un nombre de repiquages supérieur à 18.

Ces expériences nous ont montré que la spectroscopie d'impédance électrique est une technique efficace pour suivre la croissance d'un tapis cellulaire. Néanmoins, elle est très sensible et influencée par un grand nombre de paramètres, qui complexifient d'une part son analyse (phénomène de double couche, milieu de culture, effets parasites du montage) et d'autre part sa reproductibilité (nombre de repiquages). Valider des mesures d'impédance électrique requiert donc la maîtrise de tous ces paramètres.

5 SUIVI EN CONTINU PAR SPECTROSCOPIE D'IMPEDANCE DE L'INFECTION DE CELLULES HCT-8 PAR LE PARASITE *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM*

5.1 Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que notre dispositif de mesure est capable de mesurer l'impédance électrique de culture de cellules HCT-8. Nous avons choisi de standardiser la durée de leur croissance pendant 76h pour s'assurer de la reproductibilité du profil de croissance et également de l'état de confluence du tapis, une condition nécessaire avant d'introduire les parasites de *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*) (cf. 4.1). Dans ce chapitre, notre objectif est de mesurer en continu l'impédance électrique de ces cultures à confluence pendant leur infection par le parasite.

Tout d'abord, il est nécessaire de nous assurer que les parasites introduits dans le puits de culture infectent les cellules cultivées. Dans le chapitre 1, nous avons vu que la forme infectieuse du *C. parvum* est un oocyste (cf. 1.2.1.1). Afin d'infecter les cellules, celui-ci doit d'abord se désenkyster, i.e. libérer quatre sporozoïtes, des formes oblongues qui doivent pénétrer la membrane des cellules cibles (cf. 1.2.2.1). Ce désenkystement peut être stimulé *in vitro* (cf. 1.2.2.2). Cependant, ce processus est énergivore (cf. 1.2.4.3). Les sporozoïtes ayant besoin d'énergie pour se déplacer et pénétrer la cellule, seuls ceux se trouvant à proximité des cellules cibles lors du désenkystement parviendront à les infecter. S'assurer que les parasites pénètrent les cellules requiert donc deux contrôles : le premier pour nous assurer que le désenkystement des oocystes est optimal et le deuxième pour vérifier si les oocystes ont effectivement pénétré et donc infecté les cellules.

Nous avons également vu que le parasite possède un cycle de reproduction spécifique, caractérisé par des formes développement asexué et sexué (cf. 2.3.1). Ces formes se distinguent par leur taille, le nombre de noyaux qu'elles contiennent, la forme de leurs structures internes (chacune contenant un noyau) et le moment où elles apparaissent par rapport au début de l'infection. Classiquement, elles sont identifiées par microscopie à fluorescence, qui nécessite d'abord de tuer les cellules puis de les marquer. Ce protocole est incompatible avec nos mesures d'impédance électrique en continu, dans lequel les cellules ne sont pas endommagées et ne subissent pas de marquage. Afin d'observer les formes de développement du parasite au cours de l'infection, il nous sera nécessaire de développer un protocole permettant l'identification et la quantification de ces formes à des instants voulus en parallèle de notre mesure d'impédance. Ce protocole doit également inclure un contrôle de l'état du tapis car le parasite provoque la mort de cellules soit par apoptose, soit par nécrose (cf. 2.3.2). Ceci va avoir un impact sur l'occupation (ou couverture) du tapis cellulaire par rapport à la surface du Réseau d'Electrodes Interdigitées Planaires (REIP). Ces observations nous aideront à faire un lien entre la réponse en impédance et les phénomènes biologiques se déroulant au cours de l'infection.

Pour finir, nous avons montré que l'infectivité est le niveau d'analyse de risque relatif au *Cryptosporidium* le plus proche de la réalité car elle quantifie directement l'effet réel du parasite sur les cellules-hôtes (cf. 1.2.5). Suivre en continu l'infection du *C. parvum* sur des cultures de cellules *in vitro* devrait donc nous permettre d'obtenir des informations sur l'infectivité de l'échantillon introduit. Nous tenterons donc de répondre aux questions suivantes : Comment faire varier l'infectivité d'un échantillon ? Comment

l'infectivité influence-t-elle la mesure d'impédance électrique des cellules ? Comment peut-elle être quantifiée ?

Dans ce chapitre, nous verrons tout d'abord que la spectroscopie d'impédance électrique (EIS) utilisée avec un REIP peut être utilisée pour suivre en temps réel la réponse de cultures cellulaires infectées par le *C. parvum*. Par ailleurs, nous montrerons que la technique d'EIS peut fournir des informations sur le développement du parasite à travers son action sur les cellules, ce qui ouvre de nouvelles opportunités d'analyses biologiques. Finalement, pour la première fois, nous démontrons que l'infectivité d'un échantillon de parasite peut être mesurée et représentée sous la forme d'une courbe dépendante de la dose introduite.

5.2 Matériels et méthodes

Dans les expériences qui seront présentées ici, nous manipulerons pour la première fois les parasites de l'espèce *C. parvum*. Avant toutes choses, les parties 4.2.1 et 4.2.2 décrivent le protocole suivi pour mesurer l'impédance électrique d'un tapis de cellules HCT-8 pendant sa croissance dans notre dispositif de mesure pendant 76h à 81 fréquences comprises entre 100Hz et 1MHz. Nous obtenons ainsi un tapis cellulaire confluent, une étape nécessaire avant l'ajout des parasites.

Dans cette partie, nous détaillerons tout d'abord la manière dont les oocystes de *C. parvum* sont préparés avant leur introduction dans les puits de culture sur les cellules. Cette préparation inclut notamment la stimulation de leur désenkystement, l'élaboration du témoin négatif de l'infection sur les cellules et la variation de viabilité d'un échantillon. Puis nous présenterons le protocole d'infection et la manière dont nous nous assurons de l'absence de contamination bactérienne afin de valider nos résultats.

Puis, nous aborderons succinctement le protocole utilisé pour mesurer et analyser l'impédance électrique des cellules par circuit équivalent, celui-ci ayant été présenté en détails dans les chapitres 3 et 4 (cf. 3.4.3 et 4.2.3).

Enfin, nous présenterons le protocole utilisé pour infecter des cellules cultivées dans des chambres de culture Nunc™ Lab-Tek™ en parallèle de nos mesures d'impédance électrique. Ceci nous permettra de marquer les cellules et les parasites à des instants spécifiques afin de quantifier par microscopie à fluorescence les formes de développement du parasite et la couverture du tapis cellulaire par rapport au REIP. Ces instants spécifiques seront choisis à des moments où la courbe d'amplitude d'impédance des cellules présente une forme particulière. Ces observations nous aideront à formuler des hypothèses biologiques expliquant l'évolution temporelle de l'amplitude d'impédance électrique et donc l'effet de l'infection du *C. parvum* sur les cellules.

5.2.1 Préparation des oocystes

Les oocystes de *C. parvum* de la souche "Iowa" ont été achetés chez Waterborne Inc. et stockés dans du tampon phosphate salin (PBS) à 4°C. Avant chaque expérimentation, les taux de désenkystement ont été déterminés en utilisant une procédure standard. Celle-ci consiste à incuber les oocystes pendant 20min à 37°C dans de l'eau acidifiée (pH = 2,4) complétée avec de la trypsine à 0,025% (masse/vol), puis dans un milieu de maintenance (cf. préparation dans la partie 5.2.2) pendant 30min. Ensuite, quelques microlitres de la suspension d'oocystes sont déposés sur une lame en verre, recouverts avec une lame

couvre-objet et observés par Contraste Interférentiel Différentiel (DIC) Nomarski avec un microscope Nikon 80i à un agrandissement de x630. Le pourcentage de désenkystement a été déterminé en comptant 500 occurrences correspondant à des oocystes intacts ou vides (fantômes). Le taux de désenkystement a été calculé à partir de l'équation :

$$\text{Taux de désenkystement} = \frac{\text{Nombre d'oocystes vides}}{\text{Nombre d'oocystes intacts et vides}} \times 100 \quad (5.1)$$

Afin de standardiser la procédure d'infection, tous les inocula ont été effectués de sorte que le ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] 1:1 corresponde en théorie à la présence d'un sporozoïte relâché par cellule HCT-8 déposée sur un REIP dans un puits. Pour rappel, un oocyste contient quatre sporozoïtes. Le nombre d'oocystes dans un inoculum de ratio 1:1, noté $N_{oocystes,1:1}$, a donc été déterminé de la façon suivante :

$$N_{oocystes,1:1} = \frac{\text{Nombre de cellules cultivées} / 4}{\text{Taux de désenkystement}} \quad (5.2)$$

Le nombre de cellules HCT-8 cultivées sur un REIP, d'une surface de 28mm² environ, a été calculé à partir de la surface occupée par une cellule dans un tapis à confluence. Celle-ci a été estimée à 180µm² grâce à des observations sur des expériences de calibration non présentées dans cette thèse. Certes, comme nous l'avons vu dans le chapitre 4 (cf. 4.4), les cellules HCT-8 poursuivent leur division à confluence et leur nombre varie donc. Une surface de cellule moyenne de 180µm² nous permet néanmoins de standardiser notre protocole, en considérant environ 160 000 cellules HCT-8 dans un tapis à confluence. En outre, nous voyons d'après la formule (5.2) que le nombre d'oocystes dans un inoculum de ratio 1:1 diminue si le taux de désenkystement augmente. Enfin de maximiser nos chances d'infection par oocyste introduit, seuls les échantillons dont les taux de désenkystement sont supérieurs à 70% ont été utilisés pour nos expériences.

Notre témoin négatif correspond à l'introduction de 0 sporozoïte viable par cellule cultivée, soit un ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 0:1. Son élaboration consiste à inactiver un échantillon contenant le même nombre d'oocystes que le ratio 1:1 ($N_{oocystes,0:1} = N_{oocystes,1:1}$) en répétant deux fois de suite le protocole suivant : 1min de congélation dans de l'azote liquide et 1min de décongélation à 37°C. L'inactivation par chauffage à des températures supérieures à 100°C est également possible mais elle inactiverait potentiellement des bactéries, qui seraient présentes dans l'inoculum non traité de ratio 1:1, ajoutant un biais de mesure. Nous avons également testé notre système avec des inocula présentant une gamme de parasites viables afin d'estimer la limite de détection de notre système. Les ratios [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:2 et 1:4 ont été obtenus en mélangeant des inocula d'oocystes non traités (ratio 1:1) et d'oocystes inactivés (ratio 0:1) tout en maintenant le nombre total d'oocystes. Les nombres d'oocystes $N_{oocystes,1:2}$ et $N_{oocystes,1:4}$ ont été calculés à partir des formules suivantes :

$$N_{oocystes,1:2} = 0.50 * N_{oocystes,1:1} + 0.50 * N_{oocystes,0:1} \quad (5.3)$$

$$N_{oocystes,1:4} = 0.25 * N_{oocystes,1:1} + 0.75 * N_{oocystes,0:1} \quad (5.4)$$

5.2.2 Protocole d'infection.

Selon le test d'infectivité développé par Keegan *et al.* (Keegan *et al.*, 2003), après une étape de lavage par centrifugation à 1800g pendant 20min à température ambiante, les oocystes ont été incubés dans de l'eau acidifiée (pH 2,4) contenant de la Trypsine à 0,025% (masse/volume) à 37°C pendant 20min pour stimuler le désenkystement. Cette étape mime l'environnement gastrique préalable à l'infection dans l'intestin.

Après une seconde étape de centrifugation à 1800g pour 10min, les oocystes ont été suspendus dans un milieu de maintenance. Ce milieu de maintenance est composé de RPMI 1640 avec 2mM de L-Glutamine, 15mM de tampon HEPES (ou acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique), 23mM de bicarbonate de sodium, 5mM de glucose, 0,5µM d'acide folique, 7µM d'acide 4-amino-benzoïque, 0,1µM de pantothénate de calcium, 50nM d'acide ascorbique, 1% (vol/vol) de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, 210µM de Gentamycine, 170µM de Streptomycine et de la Pénicilline (105U/L).

Avant l'inoculation des oocystes, le surnageant des cultures cellulaires a été remplacé par ce milieu de maintenance. Puis, les oocystes dont le désenkystement a été stimulé ont été ajoutés aux monocouches de cellules. Au total, un puits contient 90µl de milieu de maintenance. Afin d'éviter l'évaporation du milieu, les puits ont été couverts avec une boîte de Pétri renversée, stérilisée au préalable (cf. 4.2.2). Le dispositif de mesure a ensuite été incubé dans une atmosphère saturée en eau à 37°C et 5% (vol/vol) de CO₂. Les mesures d'impédance électrique ont été effectuées pendant 60h, une durée au bout de laquelle le signal ne connaît plus de variations significatives. La tension est de 10mV et a été appliquée à 81 fréquences comprises entre 100Hz et 1MHz comme pendant la phase de croissance du tapis cellulaire. Sept minutes séparent chaque point de données pris à une fréquence. Pour chaque ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée], trois expériences indépendantes ont été réalisées.

Tout comme dans le chapitre 4 (cf. 4.2.2), valider nos résultats implique de nous assurer que les mesures n'ont pas été perturbées par de possibles contaminations bactériennes. Dans un premier temps, toutes les solutions ont été filtrées à 0,22µm avant leur utilisation pour retirer physiquement les bactéries potentiellement présentes. Dans un deuxième temps, ces solutions et les surnageants de culture ont été testés avec de la gélose pour dénombrement (PCA), un milieu favorisant entre autres la croissance de bactéries, après chaque étape du protocole et à la fin de l'expérience. Ce milieu a été conçu dans une boîte de Pétri, qui a été placée, après dépôt d'une goutte de la solution ou du surnageant à tester, à 37°C pendant une nuit.

5.2.3 Analyse de l'impédance électrique

Comme dans le chapitre 4 (cf. 4.2.3), l'analyse de l'impédance électrique s'est effectuée en deux étapes : d'abord selon les axes fréquentiel et temporel, puis par circuit équivalent.

Les analyses temporelle et fréquentielle consistent d'abord à suivre l'évolution de l'impédance électrique correspondant à des ratios [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] 1:1 et 0:1 (témoin négatif) en fonction du temps à un nombre fini de fréquences. Nous analyserons également à une fréquence fixe les différences entre les ratios 1:1, 1:2, 1:4 et 0:1 dans le temps afin de tester notre système dans une application de capteur d'infectivité.

Les analyses par circuit équivalent suivent le protocole défini dans les chapitres 3 et 4 (cf. 3.4.3 et 4.2.3) et le circuit utilisé est représenté figure 5.1.

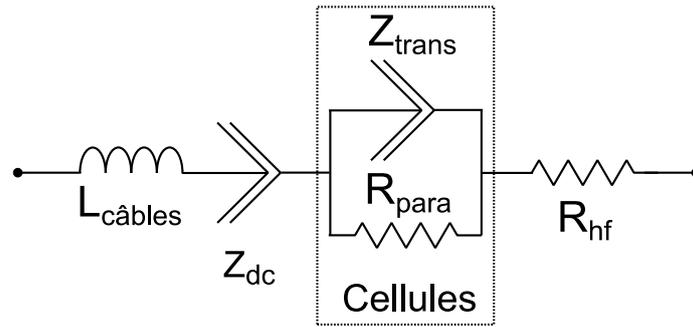


Figure 5.1 : Circuit équivalent de notre système utilisé pour modéliser des mesures sur des cultures de cellules HCT-8 confluentes infectées par le *C. parvum*.

Pour rappel :

- $L_{câbles}$: inductance parasite des câbles de mesure (exprimée en H).
- Z_{dc} : CPE représentant la double couche à l'interface électrode-milieu, composé de son amplitude P_{dc} (en $S.s^{ndc}$) et de son indice n_{dc} .
- R_{para} : résistance du trajet paracellulaire (en Ω).
- Z_{trans} : CPE modélisant le trajet transcellulaire composé de son amplitude P_{trans} (en $S.s^{ntrans}$) et de son indice n_{trans} .
- Z_{cell} : combinaison parallèle de R_{para} et Z_{trans} qui correspond au tapis cellulaire dans son ensemble.
- R_{hf} : effets résistifs visibles en hautes fréquences provenant du milieu de culture et du circuit imprimé (en Ω).

5.2.4 Culture et infection dans des chambres de culture Lab-Tek™ en parallèle des mesures d'impédance électrique

Nous avons souhaité obtenir des informations relatives au cycle de vie du *C. parvum* ainsi qu'à son effet sur la couverture du tapis cellulaire par rapport au REIP au cours des 60h de mesures d'impédance électrique. Notre objectif est de fournir des hypothèses biologiques liant l'évolution temporelle de l'impédance du tapis cellulaire avec le développement du *C. parvum* et le recouvrement du tapis cellulaire par rapport à un état de confluence. Le cycle de vie du *C. parvum* est caractérisé par différentes formes de développement associées à des phases de reproduction asexuée et sexuée (cf. 2.3.1). Ces formes se distinguent par leur taille, le nombre de noyaux qu'elles contiennent et le moment où elles apparaissent par rapport au début de l'infection. Elles peuvent être identifiées par microscopie à fluorescence après avoir fixé puis marqué les formes parasitaires. Quant au tapis cellulaire, l'estimation de sa couverture nécessite également un suivi microscopique. Les protocoles de ces deux observations sont incompatibles avec celui de notre suivi d'impédance électrique, pendant lequel les cellules ne peuvent pas être fixées. De même, notre banc de test expérimental ne permet pas en l'état de suivre par microscopie l'évolution du tapis cellulaire.

La solution que nous avons trouvée a été de cultiver des cellules HCT-8 également dans des chambres de culture Lab-Tek™ (Nunc™ International, Roskilde, Danemark) et de les infecter avec le *C. parvum* au même moment que celles de notre dispositif de mesure. Les protocoles utilisés pour cultiver des cellules HCT-8 pendant 76h puis pour les infecter pendant 60h sont les mêmes que dans le cas de suivi d'impédance avec notre dispositif de mesure. De même, pour chaque chambre Lab-Tek™, les cellules ont

été cultivées dans 3 puits différents. La différence dans les protocoles est une conséquence de la différence de taille entre les surfaces de culture d'un puits de notre dispositif, 28mm², et d'un puits d'une chambre Lab-Tek™, 40mm². Le tapis cellulaire y est donc environ 40% plus large. Pour compenser la consommation du milieu de culture par les cellules logiquement plus importante dans un puits Lab-Tek™, le volume de milieu introduit dans ces puits est de 200µl au lieu de 90µl.

5.2.5 Marquage par fluorescence.

Au total, les cellules ont été cultivées dans 9 chambres de culture Lab-Tek™ différentes. Après 76h de culture et l'introduction des oocystes de *C. parvum*, les cellules et les formes parasitaires ont donc pu être fixées dans leur état physiologique à 9 instants différents. Avant l'étape de fixation, le surnageant est d'abord retiré puis les cellules sont rincées avec une solution saline équilibrée (HBSS, Gibco®, life technologies, UK). Ce rinçage permet de retirer des éléments susceptibles de conduire à une erreur d'interprétation de l'infection observée par immunomarquage. Par exemple, les débris cellulaires et les traces de milieu de culture peuvent induire des marquages aspécifiques et/ou de l'autofluorescence tandis que les parasites n'ayant pas infecté de cellules peuvent conduire à une surestimation de l'infection étudiée. La fixation a ensuite été réalisée en utilisant du Formaldéhyde à 4% (vol/vol) pendant 15min dans une atmosphère humide à 37°C. Puis, chaque chambre de culture Lab-Tek™ a été stockée à -20°C pour que les cellules soit marquées ultérieurement.

Les cellules ont été rincées avec de l'HBSS 3 fois avant chaque marquage et 1 fois en fin de marquage. Plusieurs marquages ont en effet été nécessaires pour nos observations :

- Formes de développement du *C. parvum* : elles ont été marquées avec des anticorps IgG polyclonaux reconnaissant plusieurs épitopes (partie d'un antigène fixée par un anticorps) et capables de tracer les différentes formes intracellulaires du parasite. Afin de pouvoir les observer par fluorescence, ces anticorps sont eux-mêmes marqués avec de la fluorescéine (FL-Sporo-Glo™ Kit, Waterborne Inc., New Orleans, LA, USA). Dans notre cas, ils apparaissent ainsi en vert. Les anticorps ont été dilués à 1/20 et incubés sur les cellules pendant 1 heure à 37°C.
- Membranes des cellules : elles ont été marquées avec la protéine Wheat Germ Agglutinin (WGA) conjuguée avec un marqueur fluorescent rouge l'Alexa Fluor® 488 (Invitrogen, UK). Ce marquage, réalisé pendant 20min à température ambiante, nous permet d'évaluer la couverture du tapis cellulaire par rapport à un état de confluence, i.e. les membranes recouvrent toute la surface de culture.
- Acide désoxyribonucléique (ADN) des cellules : il a été marqué avec du 4',6'-diamidino-2-phenylindol (DAPI) pendant 2min à température ambiante. Ce marquage, en bleu, nous permet de quantifier le nombre de cellules sur une zone d'observation donnée et donc d'estimer la surface moyenne qu'elles occupent.

Un défaut de ce type de marquage réside dans le fait que la fluorescence s'atténue avec le temps et l'exposition à la lumière, incluant celle du microscope avec lequel les observations sont effectuées. Afin de limiter ce phénomène et d'augmenter la durée de vie du marquage, du milieu de montage (« No-Fade™ Mounting Medium », Waterborne Inc. New Orleans, LA, USA) a été déposé sur les lames d'observation. Pour finir, les lames ont été recouvertes par des lamelles couvre-objet et observées à l'aide d'un microscope Nikon 80i. Les photos ont été capturées avec une caméra digitale Nikon DXM 1200C et traitées avec le logiciel NIS-Elements Microscope (Nikon, Tokyo, Japan).

5.2.6 Observation par fluorescence.

Nous avons introduit dans les puits de culture un nombre de parasites du même ordre de grandeur que celui des cellules, soit plusieurs dizaines de milliers (cf. 5.2.1). Leur identification et leur quantification sur l'ensemble de la surface est donc impossible. C'est pourquoi nous avons limité nos observations à neuf champs, comme le montre la figure 5.2a. Leur disposition régulière augmente la reproductibilité de leur positionnement entre chaque puits et améliore donc la fiabilité des comptages. La couverture du tapis cellulaire par rapport à la surface de culture totale est en comparaison plus aisée à déterminer. Elle a donc été estimée sur plus de champs (treize) dont la répartition est présentée figure 5.2b. Les observations des formes parasitaires et de la couverture du tapis ont été respectivement effectuées à un agrandissement de x630 et de x200.

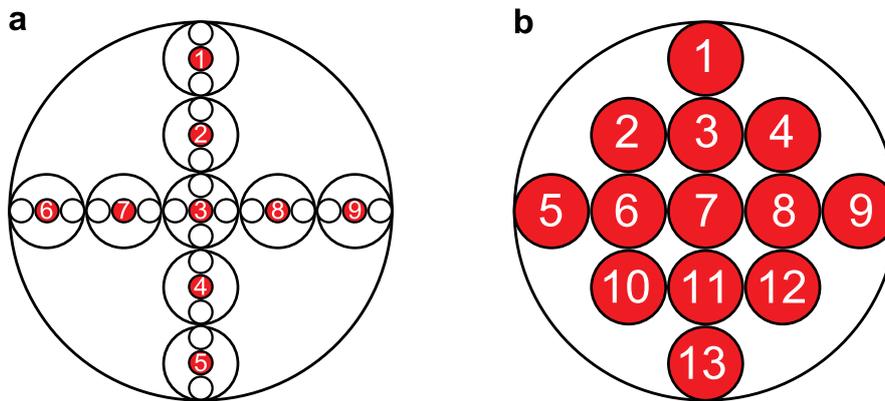


Figure 5.2 : Distribution des champs d'observation dans chaque puits. a) Les parasites ont été comptés au centre de 9 champs (disques rouges) à un grossissement de x630. b) La couverture des tapis a été observée au centre de 13 champs (disques rouges) à un agrandissement de x200.

Comme nous l'avons décrit dans le chapitre 2 (cf. 2.3.1), les formes de développement du *C. parvum* sont nombreuses. Certaines, comme les mérozoïtes de type I et II, peuvent s'avérer difficilement distinguables entre elles, en raison de leur taille similaire et de la difficulté à compter exactement le nombre de noyaux qu'elles contiennent. Nous avons donc effectué certains choix pour faciliter leur identification. Tout d'abord, les champs observés par fluorescence l'ont également été par Contraste Interférentiel Différentiel (DIC), dont le relief aide au comptage des noyaux et à la délimitation de la forme. Puis, nous avons regroupé les formes parasitaires observées en 3 catégories, selon leur taille, leur nombre de noyaux (identifiés par le marquage au DAPI) et la forme de leurs structures internes (Borowski *et al.*, 2010; Hijjawi *et al.*, 2001; Slifko *et al.*, 1997):

- Zoïtes : Ce groupe comprend les sporozoïtes, les trophozoïtes et les merozoïtes. Il s'agit de structures mononucléées d'un diamètre compris entre 1 et 4 μ m correspondant aux formes invasives.
- Mérozoïtes : Ce groupe comprend les mérozoïtes de type I et II. Il s'agit de structures multinucléées (4 à 8 noyaux), d'un diamètre compris entre 3 et 5 μ m, dont les structures internes sont de formes oblongues (type « bananes »). Ce groupe correspond aux formes prolifératives.
- Gamontes: Ce groupe comprend les micro- et macrogamontes. Ces formes, d'un diamètre compris entre 3 et 6 μ m, sont caractérisées par des structures internes rondes. Certaines sont multinucléées (les microgamontes possèdent plus de 16 noyaux) et les autres, mononucléées, se distinguent par leur grande taille (supérieure à 5 μ m).

La figure 5.3 présente des exemples de ces groupes sur des photos prises par fluorescence et par DIC. En partant de la gauche, la première colonne correspond aux zoïtes, la deuxième aux mérontes et la troisième aux gamontes. Enfin, la quantification des formes parasitaires et la couverture du tapis cellulaire ont été déterminées sur trois puits différents.

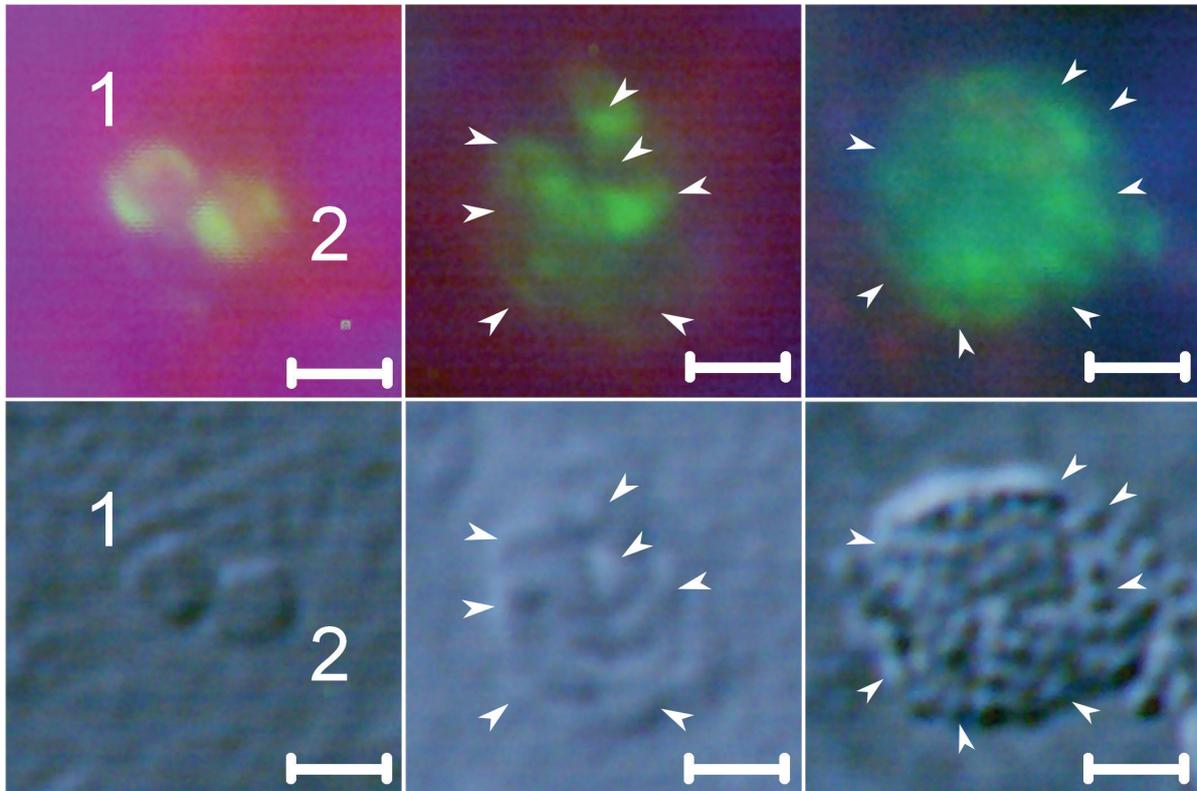


Figure 5.3 : Trois exemples de formes parasitaires du *C. parvum* observées par fluorescence (première ligne) et par microscopie à Contraste Interférentiel Différentiel (DIC) (barre d'échelle = $2\mu\text{m}$). En partant de la gauche, la première colonne correspond à deux formes de type zoïtes (sporozoïtes, mérozoïtes et trophozoïtes), la deuxième aux mérontes (mérontes de type I et II) et la troisième aux gamontes (micro- et macrogamontes). Les flèches indiquent pour ces deux dernières formes des exemples de structures internes, oblongues pour les mérontes et rondes pour les gamontes. Elles contiennent chacune un noyau, qui a été mis en évidence par le marquage au DAPI.

5.3 Résultats

5.3.1 Réponse impédimétrique spécifique des cellules hôtes à l'infection au *C. parvum*

Les cellules HCT-8 ont d'abord été cultivées sur les REIP au fond des puits de notre dispositif et leur impédance a été enregistrée en continu pendant 76 heures à des fréquences comprises entre 100Hz et 1MHz avec une période d'échantillonnage de 7 minutes (cf. figure 4.3 et figure 4.5). Après ces 76 heures de culture, les inocula de *C. parvum* contenant un ratio de 1 sporozoïte viable par cellule (1:1) et 1 sporozoïte inactivé thermiquement par cellule (0:1, témoin négatif = échantillon entièrement inactivé thermiquement) ont été ajoutés dans les puits de culture. Cette étape établit le temps de référence noté 0 heure post infection (0h PI) à partir duquel l'impédance électrique du tapis cellulaire a été de nouveau suivie pendant 60 heures. Comme dans le chapitre 4 (cf. 4.3.1), nous avons choisi de suivre l'amplitude de l'impédance $|Z(t,f)|$ au lieu de sa phase $\varphi(t,f)$. En effet, il est plus aisé de représenter les changements relatifs de l'impédance pendant l'infection des cellules en analysant une valeur normalisée de $|Z(t,f)|$. Celle-ci, que nous noterons $|Z(t,f)|_{norm}$, est différente de celle que nous avons utilisée dans le chapitre 4 (cf. formule (4.3)) car elle a été définie à partir d'un nouveau temps de référence correspondant au moment de l'inoculation, à savoir 0h PI (égale à $t = 76h$). Dans ce chapitre, $|Z(t,f)|_{norm}$ sera donc calculée selon la formule suivante :

$$|Z(t,f)|_{norm} = \frac{|Z(t,f)|}{|Z(t = 76h, f)|} \quad (5.5)$$

Nous avons montré précédemment que les changements en impédance se déroulant au niveau du tapis cellulaire sont les plus visibles sur l'amplitude d'impédance totale à des fréquences comprises entre 1kHz et 100kHz (cf. 4.3.2). Par conséquent, nous avons choisi ces deux fréquences pour analyser l'évolution temporelle de $|Z(t,f)|_{norm}$ pour les ratios 1:1 et 0:1. Deux autres fréquences caractéristiques ont également été étudiées : 5kHz, une fréquence proche de $f_{para/trans}$ à laquelle les poids des trajets paracellulaire et transcellulaire sur l'impédance du tapis cellulaire sont égaux (cf. formule (4.10)) et 30kHz, qui correspond à la fréquence f_s à laquelle notre système est le plus sensible aux variations de l'amplitude d'impédance totale induites par le tapis cellulaire (cf. formule (4.5)).

La figure 5.4 représente l'évolution temporelle de $|Z(t,f)|_{norm}$ pour les ratios 1:1 et 0:1 à chacune de ces fréquences. Concernant le témoin, correspondant au ratio 0:1, $|Z(t,f)|_{norm}$ diminue et ne présente pas de formes spécifiques. Pour le ratio 1:1, trois domaines peuvent être distingués au cours du temps. Dans le premier, du moment de l'inoculation jusqu'à 9h PI, aucune différence significative n'a été observée entre l'amplitude d'impédance du témoin et celle du ratio 1:1. Puis, dans le deuxième domaine, de 9h PI à 40h PI, l'amplitude d'impédance du ratio 1:1 devient plus élevée que celle du témoin et présente trois pics à 12h PI, 23h PI et 31h PI et trois minima, respectivement à 9h PI, 19h PI et 28h PI. Enfin, dans le troisième domaine, qui débute au moment où la courbe de $|Z(t,f)|_{norm}$ du ratio 1:1 devient inférieure à celle du témoin jusqu'à la fin de l'expérience, l'amplitude d'impédance diminue d'abord fortement puis avec une pente plus faible à partir de 42h PI environ.

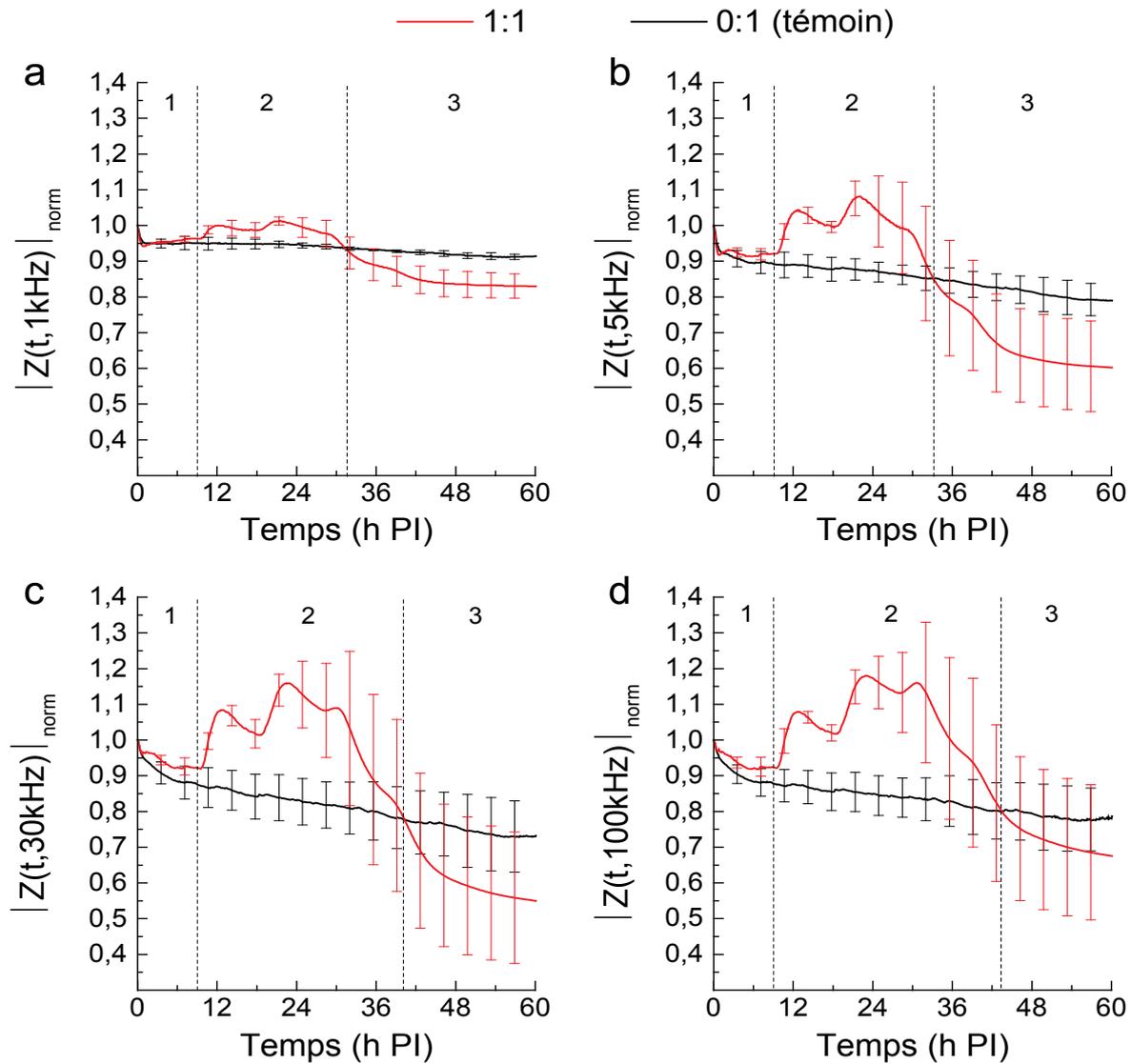


Figure 5.4 : Suivi en continu (un point toutes les 7 minutes) de l'infection au *C. parvum* d'une culture de cellules HCT-8 confluente pendant 60h (PI = post infection). Les cellules ont été infectées avec un ratio de 1 sporozoïte viable par cellule cultivée (ratio 1:1) et avec des sporozoïtes inactivés par choc thermique (ratio 0:1, témoin négatif). L'évolution temporelle de l'amplitude normalisée de l'impédance $|Z(t, f)|_{norm}$ est représentée aux fréquences 1kHz (a), 5kHz (b), 30kHz (c) et 100kHz (d). Pour chaque fréquence, 3 domaines peuvent être distingués au cours du temps : le 1^{er} où les courbes des ratios 1:1 et 0:1 ne peuvent être distingués ; le 2^e où la courbe du ratio 1:1 présente une succession de pics et de minima ; le 3^e où la courbe du ratio 1:1 chute et devient inférieure à celle du ratio 0:1. Les moyennes et écart-types sont calculés à partir de 3 expériences indépendantes ($n = 3$). Par souci de lisibilité, les barres d'erreur ont été représentées tous les 25 points.

Nous avons également souhaité connaître la sensibilité de notre système pendant les premières 24h pour distinguer un inoculum viable (1:1) d'un inoculum non viable (0:1). La méthode que nous avons choisie consiste à déterminer le rapport entre les amplitudes d'impédance normalisée des ratios 1:1 et 0:1 aux moments où les pics sont observés, i.e 12h PI (t_1) et 23h PI (t_2), pour chaque fréquence étudiée. Ce rapport, que nous noterons $R_{tx, fy}$, a été calculé selon la formule suivante :

$$R_{tx, fy} = \frac{(|Z(t_x, f_y)|_{norm})_{1:1}}{(|Z(t_x, f_y)|_{norm})_{0:1}} \quad (5.6)$$

Où t_x ($x = 1$ ou 2) correspond aux instants d'observations des pics et f_y ($y = 1, 2, 3$ ou 4) aux fréquences étudiées (1, 5, 30 et 100kHz respectivement). Les valeurs de R_{t_x, f_y} sont répertoriées dans le tableau 5.1. Nous pouvons constater que parmi les fréquences choisies, la valeur de R_{t_x, f_y} est la plus élevée à 30kHz, correspondant à la fréquence f_3 . Cette fréquence est donc la plus sensible pour détecter la différence entre nos ratios 1:1 et 0:1.

R_{t_x, f_y}	$f_1 = 1\text{kHz}$	$f_2 = 5\text{kHz}$	$f_3 = 30\text{kHz}$	$f_4 = 100\text{kHz}$
$t_1 = 12\text{h PI}$	1,05110	1,16275	1,23856	1,22464
$t_2 = 23\text{h PI}$	1,06230	1,22010	1,38784	1,38671

Tableau 5.1 : Valeurs du rapport R_{t_x, f_y} entre les amplitudes d'impédance normalisée des ratios 1:1 et 0:1 aux instants t_x ($x = 1$ et 2) correspondant aux pics observés pendant les premières 24 heures d'infection et aux fréquences f_y ($y = 1$ à 4) correspondant aux fréquences caractéristiques analysées après l'infection.

5.3.2 Analyse du tapis cellulaire par circuit équivalent.

Afin d'émettre des hypothèses sur les procédés biologiques expliquant l'évolution de l'amplitude totale de la réponse impédimétrique des cellules pendant l'infection, nous avons isolé ses différentes contributions avec une modélisation par circuit équivalent. Le circuit équivalent utilisé est illustré figure 5.1. Les valeurs déterminées pour chaque élément en fonction du temps ainsi que celles de $f_{para/trans}(t)$ sont répertoriées dans le tableau 5.2.

Tout d'abord, nous avons analysé l'influence de l'amplitude d'impédance de chaque contribution, i.e. $|Z_{cables}(t, \omega)|$, $|Z_{dc}(t, \omega)|$, $|Z_{cell}(t, \omega)|$ et $R_{bf}(t)$, par rapport à l'amplitude d'impédance totale $|Z(t, \omega)|$. La méthodologie utilisée est la même que celle du chapitre précédent (cf. 4.3.2). Pour rappel, $|Z(t, \omega)|$ peut être approximée par la somme des amplitudes d'impédance de chaque contribution (cf. formule (4.7)). Nous pouvons donc estimer leur influence respective en calculant le rapport entre leur amplitude d'impédance et l'amplitude d'impédance totale. Nous avons tracé figure 5.5a-d chacune de ces amplitudes d'impédance en fonction du temps aux fréquences caractéristiques déjà utilisées dans la partie 5.3.1: 1, 5, 30 et 100kHz. Par souci de clarté, nous avons choisi de ne représenter que les amplitudes d'impédance dont le rapport avec $|Z(t, \omega)|$ à une fréquence est égale à au moins 10%. Ceci explique l'absence de $|Z_{cables}(t, \omega)|$, négligeable à ces fréquences. En ce qui concerne $|Z_{cell}(t, \omega)|$, sa représentation est dépendante du poids respectif de $R_{para}(t)$ et $|Z_{trans}(t, \omega)|$ sur le tapis cellulaire suivant la règle établie dans la partie 4.3.2.

Commençons par décrire les éléments autres que le tapis cellulaire. D'un point de vue fréquentiel, $|Z_{dc}(t, \omega)|$ prédomine sur $|Z(t, \omega)|$ à 1kHz, le rapport entre les deux étant compris à des valeurs entre 80 et 95%. Son influence diminue à mesure que la fréquence augmente, jusqu'à des valeurs comprises entre 15 et 25% à 100kHz. A cette fréquence, il s'agit de l'élément $R_{bf}(t)$ qui prédomine sur $|Z(t, \omega)|$, le rapport entre les deux ayant des valeurs comprises entre 50 et 85% environ. Son influence est plus faible à 30kHz, le rapport entre $R_{bf}(t)$ et $|Z(t, \omega)|$ étant entre 25 et 50%, et est négligeable à 1 et 5kHz. D'un point de vue temporel, tous les paramètres ont une valeur quasiment constante pendant les 60 heures de l'expérience.

Décrivons à présent l'évolution temporelle de $|Z_{cell}(t, \omega)|$. Nous pouvons constater qu'elle est similaire à celle de $|Z(t, \omega)|$ car elle comprend également les trois domaines temporels précédemment décrits : un domaine où $|Z_{cell}(t, \omega)|$ est stable de 0 à 9h PI, puis un domaine où plusieurs phases d'augmentation peuvent être distinguées de 9 à 40h PI et enfin le dernier où $|Z_{cell}(t, \omega)|$ diminue jusqu'à la fin de l'expérience.

La figure 5.5a-d nous permet également de constater que les évolutions temporelles de $R_{para}(t)$ et $|Z_{trans}(t, \omega)|$ possèdent une forme similaire, tout comme dans le chapitre 4 (cf. figure 4.6). Afin d'émettre des hypothèses biologiques plus précises concernant l'effet de l'infection au *C. parvum* sur les trajets para- et transcellulaire du tapis de cellules, nous avons représenté figure 5.5e-g les évolutions de $R_{para}(t)$ et des deux éléments composant le CPE d'amplitude $|Z_{trans}(t, \omega)|$, i.e. $P_{trans}(t)$ et $n_{trans}(t)$. Tandis que l'évolution du paramètre $R_{para}(t)$ est très proche de celle de l'impédance totale, dans le sens où les trois domaines décrits précédemment peuvent de nouveau être observées, celles de $P_{trans}(t)$ et $n_{trans}(t)$ s'en éloignent. Entre 0 et 19h PI, $P_{trans}(t)$ reste stable tandis que les pentes de $n_{trans}(t)$ et de l'impédance totale sont opposées. Ensuite, $P_{trans}(t)$ commence à croître vers des valeurs 5 fois supérieures à ses valeurs initiales jusqu'à 45h PI avant de lentement décroître jusqu'à la fin de l'expérience. Concernant l'évolution de $n_{trans}(t)$, il commence par décroître de 19h PI jusqu'à 32h PI, puis augmente graduellement jusqu'à la fin de l'expérience.

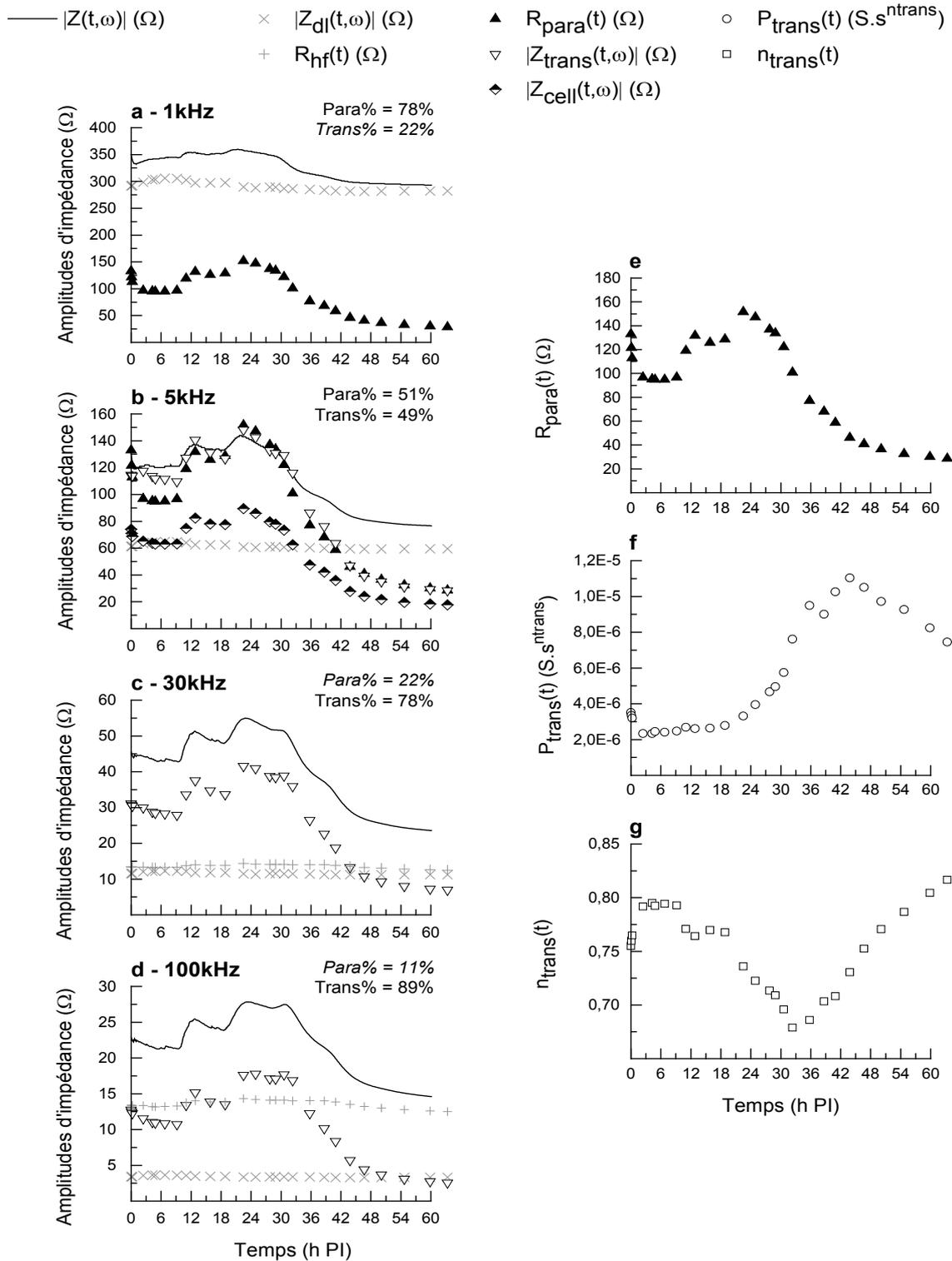


Figure 5.5 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent. L'évolution de chaque amplitude d'impédance est comparée à $|Z(t,\omega)|$ aux fréquences 1kHz (a), 5kHz (b), 30kHz (c) et 100kHz (d). Seules les amplitudes d'impédance des éléments dont la valeur est égale à au moins 10% de $|Z(t,\omega)|$ sont représentées. La contribution des trajets para- et transcellulaire sur $|Z_{cell}(t,\omega)|$ ont également été tracées selon la règle suivante : si leur poids, respectivement $Para\%$ et $Trans\%$, est supérieur à 75% (cf. équations (4.8) et (4.9)), alors seule la contribution prédominante est représentée. Sinon, les trois amplitudes d'impédance, i.e. $R_{para}(t)$, $|Z_{trans}(t,\omega)|$ et $|Z_{cell}(t,\omega)|$, sont tracées. A droite, l'évolution des paramètres constituant les éléments du tapis cellulaire, i.e. $R_{para}(t)$ (e) pour le trajet paracellulaire, $P_{trans}(t)$ (f) et $n_{trans}(t)$ (g) pour le CPE du trajet transcellulaire ont été représentées. Cette analyse a été effectuée en triplicate. Les deux autres résultats peuvent être trouvés en Annexe C.

Temps pi (h,min)	R_{para} (Ω)	P_{trans} (S.S ^{ntrans})	n_{trans}	R_{hf} (Ω)	P_{dl} (S.S ^{ndl})	n_{dl}	$L_{câbles}$ (H)	r^2	$f_{para/trans}$ (Hz)
0h 00min	132,92	3,51E-06	0,75499	13,43	7,24E-07	0,96777	1,02E-06	0,99978	4,1E+03
0h 07min	121,58	3,35E-06	0,75980	13,37	7,27E-07	0,96689	1,03E-06	0,99978	4,6E+03
0h 14min	112,90	3,19E-06	0,76465	13,34	7,18E-07	0,96830	1,05E-06	0,99976	5,1E+03
2h 25min	96,74	2,34E-06	0,79171	13,36	7,47E-07	0,96147	8,97E-07	0,99963	6,4E+03
4h 15min	95,17	2,33E-06	0,79506	13,21	7,38E-07	0,96108	9,04E-07	0,99962	6,3E+03
4h 49min	94,75	2,44E-06	0,79227	13,16	7,34E-07	0,96162	9,10E-07	0,99962	6,2E+03
6h 46min	94,88	2,40E-06	0,79415	13,24	7,22E-07	0,96250	9,04E-07	0,99963	6,1E+03
9h 11min	96,61	2,48E-06	0,79284	13,30	7,18E-07	0,96331	9,06E-07	0,99964	5,9E+03
11h 01min	118,97	2,68E-06	0,77080	13,76	7,26E-07	0,96321	8,78E-07	0,99972	5,5E+03
12h 51min	131,73	2,60E-06	0,76402	14,00	7,18E-07	0,96646	8,63E-07	0,99975	5,5E+03
15h 50min	125,89	2,63E-06	0,76977	13,85	7,15E-07	0,96705	8,75E-07	0,99973	5,3E+03
18h 49min	128,74	2,78E-06	0,76771	13,87	7,11E-07	0,96744	8,82E-07	0,99975	4,9E+03
22h 29min	151,57	3,31E-06	0,73582	14,33	7,30E-07	0,96747	8,52E-07	0,99979	4,9E+03
24h 53min	147,17	3,95E-06	0,72248	14,19	7,31E-07	0,96793	8,60E-07	0,99977	4,8E+03
27h 45min	136,93	4,66E-06	0,71324	14,10	7,45E-07	0,96535	8,69E-07	0,99977	4,8E+03
28h 54min	133,78	4,95E-06	0,70888	14,11	7,46E-07	0,96516	8,70E-07	0,99976	4,9E+03
30h 37min	122,13	5,75E-06	0,69572	14,09	7,60E-07	0,96406	8,66E-07	0,99978	5,4E+03
32h 21min	100,87	7,62E-06	0,67893	14,00	7,69E-07	0,96304	8,60E-07	0,99980	6,1E+03
35h 47min	77,03	9,50E-06	0,68601	14,04	7,69E-07	0,96337	8,49E-07	0,99982	5,9E+03
38h 39min	68,04	9,00E-06	0,70331	14,02	7,61E-07	0,96513	8,54E-07	0,99980	5,9E+03
40h 57min	58,68	1,03E-05	0,70801	13,85	7,58E-07	0,96613	8,60E-07	0,99979	5,6E+03
43h 49min	46,10	1,10E-05	0,73041	13,52	7,64E-07	0,96546	8,78E-07	0,99977	5,2E+03
46h 41min	40,73	1,05E-05	0,75234	13,23	7,61E-07	0,96615	9,04E-07	0,99973	4,8E+03
50h 07min	36,44	9,72E-06	0,77058	13,02	7,62E-07	0,96578	9,23E-07	0,99967	4,8E+03
54h 43min	32,45	9,27E-06	0,78659	12,79	7,67E-07	0,96485	9,45E-07	0,99963	4,8E+03
59h 52min	30,13	8,24E-06	0,80442	12,60	7,67E-07	0,96486	9,60E-07	0,99959	4,8E+03

Tableau 5.2 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent post infection à un ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:1 dont la représentation graphique des évolutions se trouvent figure 5.5. Chaque paramètre a été défini précèmmment (cf. 5.2.3). Les calculs de r^2 et de $f_{para/trans}$ sont respectivement basés sur les formules (3.3) et (4.10). Cette analyse a été effectuée en triplicate. Les deux autres tableaux peuvent être trouvés en Annexe C.

5.3.3 Alternance des prédominances de zoïtes et mérontes.

Nous avons souhaité obtenir des informations sur l'origine de la forme spécifique de la courbe de l'amplitude d'impédance électrique normalisée $|Z(t,f)|_{norm}$ pendant l'infection des cellules par le *C. parvum*. Comme fréquence de référence, nous avons choisi 30kHz (f_s) que nous avons définie dans la partie 5.3.1 comme étant la plus sensible de notre système pour différencier un inoculum de *C. parvum* inactivé par choc thermique (ratio 0:1) et un non traité (ratio 1:1). Les informations que nous cherchons sont d'une part sur le parasite et d'autre part sur les cellules hôtes. Concernant le parasite, nous cherchons à identifier

ses formes de développement, qui sont caractéristiques de son cycle de vie, composé notamment d'une phase de reproduction asexuée et sexuée. Par rapport aux cellules, nous cherchons à savoir si une des conséquences de l'infection est une dégradation du tapis cellulaire entraînant une diminution de son recouvrement sur la surface de culture. Ces observations s'effectuent par microscopie à fluorescence et nécessitent de fixer les cellules dans leur état physiologique. Chacune de nos 9 chambres de culture Lab-Tek™ a été fixée à un instant correspondant à une forme spécifique de la réponse impédimétrique des cellules à l'infection :

- 1 chambre au début de l'expérience à 5h PI : $|Z(t,fs)|_{norm}$ est stable (1^{er} domaine temporel)
- 3 chambres à 9, 19 et 28h PI : $|Z(t,fs)|_{norm}$ présente 3 minima
- 3 chambres à 12, 23 et 31h PI : $|Z(t,fs)|_{norm}$ présente 3 pics
- 1 chambre à 39h PI : $|Z(t,fs)|_{norm}$ présente un point d'inflexion (fin du 2^e domaine temporel)
- 1 lame à la fin de l'expérience à 59h PI : $|Z(t,fs)|_{norm}$ chute (3^e domaine temporel)

Le moment de fixation de chaque chambre de culture Lab-Tek™ a été déterminé de deux manières. En amont de l'expérience, les formes spécifiques de $|Z(t,fs)|$ ont été identifiées pour trois expériences indépendantes. L'instant auquel elles apparaissent a ensuite été moyenné, fournissant une première estimation. Puis, pendant l'expérience, un suivi impédimétrique de l'infection a été effectué en parallèle de celles effectuées dans les chambres Lab-Tek™. Avant de fixer les cellules et les parasites d'une chambre, un contrôle des formes de la réponse impédimétrique a été effectué grâce à un traitement des données par un programme Matlab pour confirmer le démarrage du protocole de fixation. Par la suite, les formes parasitaires et les cellules ont été marquées et observées par microscopie à fluorescence et par microscopie DIC. Ces observations nous ont permis d'identifier et de quantifier à 9 instants spécifiques de la réponse impédimétrique le total des formes parasitaires présentes (figure 5.6a) et la proportion des formes parasitaires appartenant aux groupes des zoïtes, des mérontes et des gamontes (figure 5.6b). Les comptages ont été moyennés sur trois puits d'une même chambre de culture Lab-Tek™. Sur la figure 5.6a, la courbe $|Z(t,fs)|_{norm}$ a un rôle de guide pour les yeux seulement car les observations n'ont pas été effectuées directement dans les puits où l'impédance électrique a été mesurée.

La figure 5.6a nous permet de constater que les formes parasitaires comptées sur nos champs d'observation sont à 5h PI en faible quantité. Puis leur nombre augmente pour devenir dix fois plus élevé à 23h PI. L'augmentation est ensuite plus marquée car ce nombre est de nouveau multiplié par dix en l'espace de 16 heures, i.e. à 39h PI. Enfin, le nombre de parasites diminue entre 39 et 59h PI de 20% environ. En ce qui concerne, la proportion des formes parasitaires, nous pouvons observer sur la figure 5.6b que celle-ci varie au cours de l'infection. A 5, 12, 23 et 31h PI, les formes de type zoïtes sont prédominantes. A l'inverse, à 9, 19, 28 et 39h PI, les formes de type mérontes sont majoritaires. Dans nos relevés, les prédominances de zoïtes et mérontes alternent donc successivement de 5 jusqu'à 31h PI. En outre, ces prédominances de zoïtes et de mérontes sont respectivement corrélées avec les pics et les minima observés sur l'évolution temporelle de $|Z(t,fs)|_{norm}$. Par ailleurs, les formes de type gamontes, caractéristiques de la reproduction sexuée, commencent à apparaître à 39h PI mais représentent seulement une minorité du total des formes (1%). A l'inverse, à la fin de l'expérience, elles sont largement prédominantes car elles correspondent à près de 70% de la totalité des formes.

Aux mêmes instants que les identifications et quantifications des formes parasitaires, nous avons déterminé le recouvrement du tapis cellulaire. Celui-ci se calcule en faisant le rapport entre les zones occupées par les membranes de cellules et la totalité de la zone de culture observée. Le recouvrement du tapis cellulaire est présenté pour chacun des 9 instants d'observation sur la figure 5.6c et est exprimé en %. Dans nos relevés, nous pouvons observer que le recouvrement est supérieur à 99% de 5h PI (et supposément de 0h PI) jusqu'à 39h PI. En revanche, à la fin de l'expérience, ce chiffre chute en dessous de 92%. Cette dégression significative semble donc être temporellement corrélée avec la chute de $|Z(t,fs)|_{norm}$ et la prédominance de formes de type gamontes.

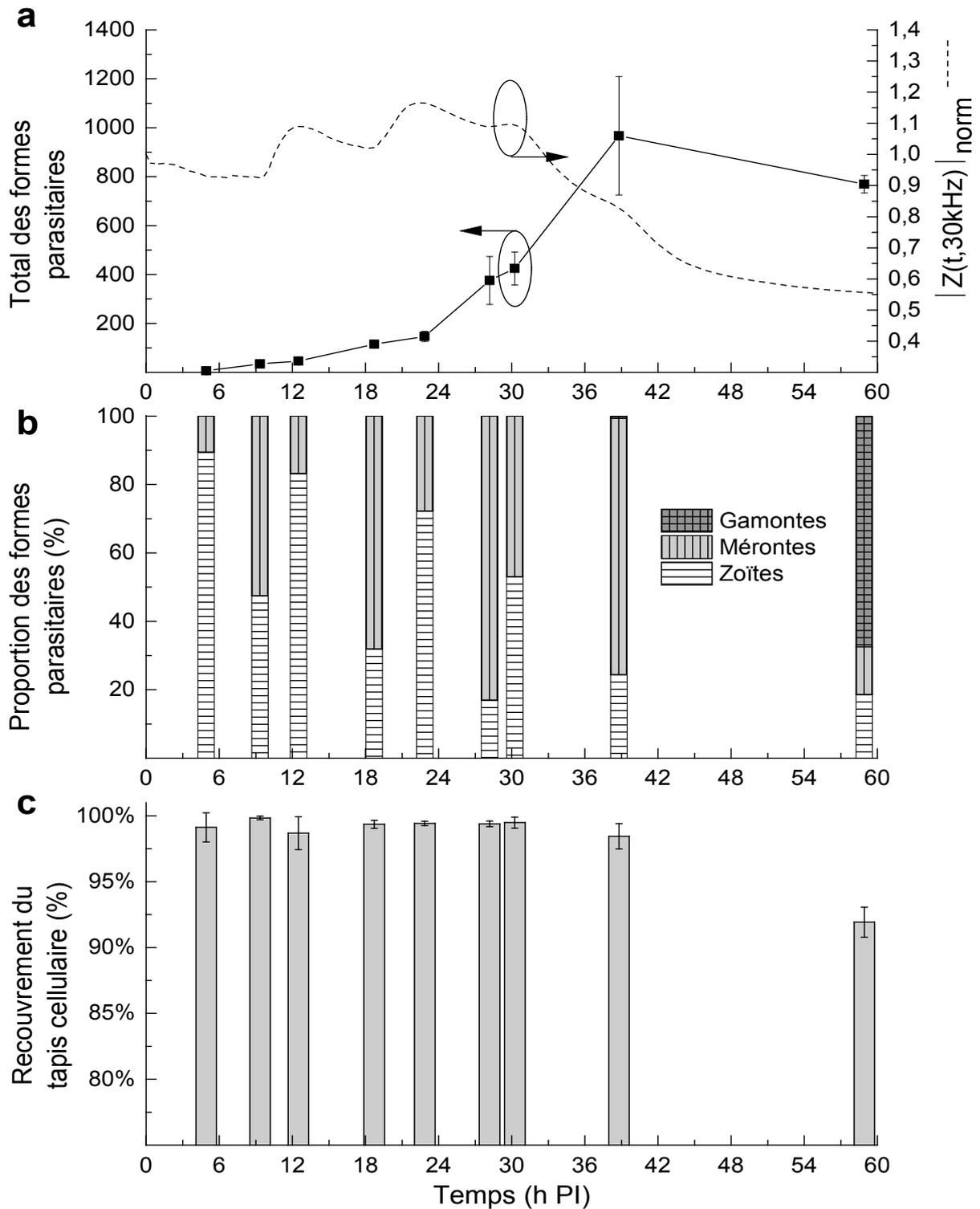


Figure 5.6 : Evolution des formes parasitaires du *C. parvum* et du recouvrement du tapis des cellules hôtes au cours de l'infection (PI = post infection) pour un ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:1. a) Total des formes parasitaires comptées sur 9 champs par puits. La courbe de $|Z(t, f_s)|_{norm}$ correspondant au ratio de 1:1 a été ajoutée comme guide car il s'agit de la fréquence où notre système est le plus sensible à l'infection. b) Proportion des 3 groupes de formes parasitaires (zoïtes, mérontes et gamontes) par rapport au total des formes parasitaires exprimée en %. c) Evolution du recouvrement du tapis cellulaire par rapport à la surface de culture totale, exprimée en %. Les moyennes et écart-types ont été calculés à partir de données relevées provenant de 3 puits par chambre de culture Lab-Tek™ différents (n = 3).

5.3.4 Réponses impédimétriques des cellules dépendantes de la dose infectieuse.

Nous avons testé le potentiel de notre système en tant que capteur d'infectivité d'un échantillon contenant des oocystes de *C. parvum*. Les oocystes inactivés thermiquement tel que le décrit notre protocole ne produisent aucune forme infectieuse tandis que les oocystes non traités en produisent, tel que le confirme la figure 5.6a. Nous postulons par conséquent qu'il est possible de modifier l'infectivité des échantillons en mélangeant les parasites non traités et les parasites inactivés. Dans cette optique, nous avons choisi de comparer les réponses impédimétriques des cellules pour 4 ratios [sporozoïte viable]:[cellule cultivée], qui peuvent être considérés équivalents *in fine* à des variations de la dose infectieuse introduite. Ces ratios correspondent à 1 sporozoïte viable pour 1, 2 et 4 cellules (respectivement 1:1, 1:2 et 1:4) et 1 sporozoïte inactivé par cellule (0:1, témoin négatif). La figure 5.7a présente pour chacun de ces ratios la moyenne sur 3 mesures indépendantes de l'évolution temporelle de l'amplitude d'impédance normalisée à la fréquence f_s , soit 30kHz ($|Z(t, f_s)|_{norm}$). Nous avons choisi cette fréquence car elle a été définie dans la partie 5.3.1 comme étant la plus sensible de notre système pour différencier un inoculum de *C. parvum* inactivé par choc thermique (ratio 0:1) et un non traité (ratio 1:1).

Les 3 domaines temporels précédemment décrits (cf. 5.3.1) peuvent être observés pour chaque ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée]:

- Dans le premier, de 0 à 9h PI, on ne constate pas de différences avec le témoin négatif.
- Dans le deuxième, à partir de 9h PI, les courbes présentent une succession de 3 pics.
- A partir de 40, 44 et 55h PI respectivement pour les ratios 1:1, 1:2 et 1:4, nous pouvons observer une chute de $|Z(t, f_s)|_{norm}$, qui devient inférieur à la courbe témoin.

En ce qui concerne le deuxième domaine temporel, nous avons analysé les 3 pics sous deux aspects. Tout d'abord, nous avons souhaité vérifier si leur apparition à chaque expérience s'effectue de manière synchrone. Le tableau 5.3 présente les moyennes et écart-types de l'instant de leur apparition à chaque expérience d'un ratio donné (ligne) et pour chacun des 3 ratios (colonne). Pour chaque ratio, $\Delta t1$ désigne l'instant où le premier pic apparaît en moyenne par rapport au début de l'expérience, $\Delta t2$ l'écart temporel moyen entre le premier et le deuxième pic et $\Delta t3$ l'écart temporel moyen entre le deuxième et le troisième. Ce tableau nous montre qu'il existe peu de différences entre les valeurs de $\Delta t1$ de chaque ratio, de même que pour les valeurs de $\Delta t2$ et $\Delta t3$. En considérant le fait que les valeurs de $\Delta t1$, $\Delta t2$ et $\Delta t3$ sont significativement supérieures à leurs écart-types respectifs, nous pouvons conclure que chaque pic observé apparaît de manière relativement synchrone pour chaque expérience d'un ratio donné et entre chacun des 3 ratios.

Considérons à présent la valeur de $|Z(t, f_s)|_{norm}$ de ces pics pour chaque expérience de chaque ratio. Nous ne considérerons que les deux premiers pics car la valeur de $|Z(t, f_s)|_{norm}$ du troisième pic du ratio 1:1 est inférieure à celle du deuxième pic, ce qui n'est pas le cas des autres ratios (figure 5.7a). Pour chaque ratio, nous avons normalisé la valeur moyenne de $|Z(t, f_s)|_{norm}$ au niveau du 1^{er} et du 2^e pic avec la valeur du témoin ($|Z(t, f_s)|_{norm}^{0:1}$) à 12h PI pour le 1^{er} pic et à 23h PI pour le 2^e pic. La figure 5.7b présente cette amplitude moyenne, normalisée par rapport au témoin, pour le 1^{er} (à 12h PI en moyenne) et le 2^e pic (à 23h PI en moyenne) par rapport au ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée]. Pour chacun des pics, il existe une relation linéaire entre les amplitudes d'impédance et le ratio, ce dernier correspondant à une dose infectieuse. Nous pouvons définir la limite de détection de notre système comme étant le ratio auquel la droite modélisant la relation entre l'amplitude de chaque pic et le ratio est égal à 1 (qui correspond au témoin négatif non infectieux). Elle est égale pour le pic à 12h PI à un ratio de 1:11, soit un sporozoïte viable pour 11 cellules cultivées, et pour le pic à 23h PI à un ratio de 1:16.

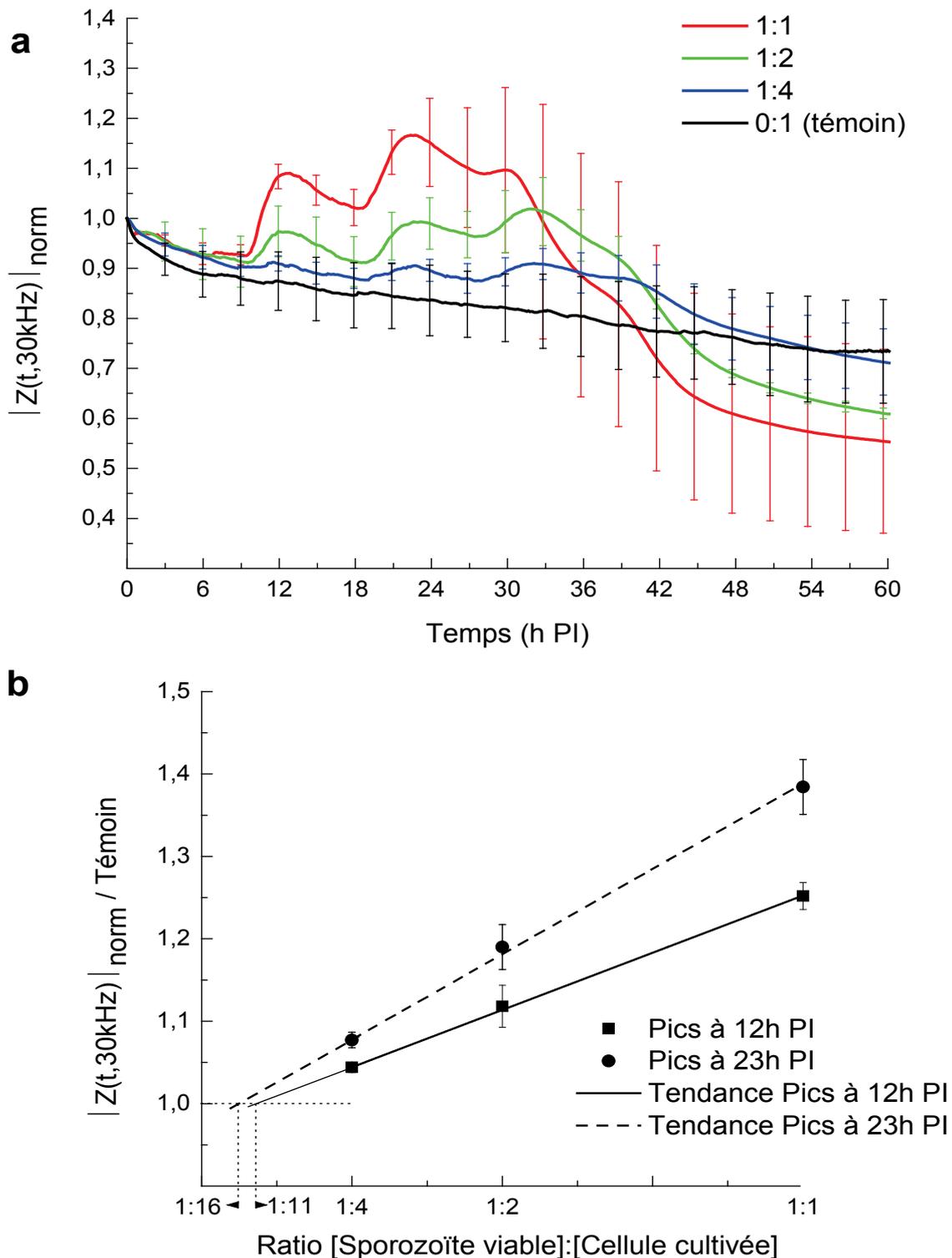


Figure 5.7 : Réponse impédimétrique des cellules HCT-8 pendant l'infection au *C. parvum* (PI = post infection) en fonction de la dose infectieuse de l'inoculum. a) Evolution temporelle de l'impédance normalisée à 30kHz $|Z(t, 30\text{kHz})|_{\text{norm}}$ à différents ratios [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] (0:1 = parasites inactivés thermiquement). Moyennes et écart-types sont calculés à partir de 3 répétitions (n = 3). b) Relation entre les pics de l'amplitude de l'impédance normalisée (divisée par le témoin = 1) à 12 et 23h PI et le ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée]. Les équations des courbes de tendance sont: $y = a \cdot x + b$ avec, pour les pics à 12h PI: $a = 0,27777 \pm 0,00410$ et $b = 0,97478 \pm 0,00175$ (coefficient de corrélation: 0,99956) et à 23h PI: $a = 0,41419 \pm 0,01536$ et $b = 0,97433 \pm 0,0058$ (coefficient de corrélation: 0,99725). La limite de détection de notre système correspond au ratio auquel ces courbes sont égales à 1 et est de 1:11 pour le pic à 12h PI et 1:16 à 23h PI. Les barres d'erreur ont été représentées tous les 25 points.

Ratios	$\Delta t1$ (h,min)	$\Delta t2$ (h,min)	$\Delta t3$ (h,min)
1:1	12h 48min \pm 0h 31min	9h 47min \pm 1h 4min	7h 39min \pm 0h 29min
1:2	12h 19min \pm 0h 22min	10h 49min \pm 0h 16min	8h 52min \pm 0h 8min
1:4	11h 28min \pm 0h 12min	11h 28min \pm 1h 9min	9h 27min \pm 0h 14min

Tableau 5.3 : Temps moyens de l'apparition des pics pour chaque ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée]. $\Delta t1$ correspond à l'intervalle de temps entre l'introduction des oocystes et le 1^{er} pic d'impédance observé, $\Delta t2$ celui entre le 1^{er} et le 2^e pic observé et $\Delta t3$ entre le 2^e et le 3^e. Les moyennes et écart-types sont calculés à partir de 3 expériences indépendantes (n = 3).

5.4 Discussion

Nous avons tout d'abord montré qu'un tapis de cellules HCT-8 à confluence délivre une réponse impédimétrique spécifique au cours de l'infection par le protozoaire parasite *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*). En analysant l'amplitude de cette impédance électrique pendant 60 heures, nous pouvons en effet observer à des fréquences comprises entre 1 et 100kHz, i.e. celles où les variations au niveau du tapis cellulaire sont les plus visibles dans notre système, 3 domaines temporels distincts. Ceux-ci se caractérisent par une forme de courbe particulière. Dans le deuxième domaine, nous pouvons par exemple observer une succession de pics et de minima. Afin d'émettre des hypothèses pour expliquer cette réponse spécifique, nous avons d'abord eu recours à une modélisation par circuit équivalent. Celle-ci nous permet d'étudier la contribution de chaque élément influençant l'impédance électrique et donc de postuler sur de possibles mécanismes biologiques sous-jacents. Cette modélisation nous a notamment permis de voir qu'entre 1 et 100kHz, l'infection du *C. parvum* sur les cellules n'a pas d'effet sur les éléments autres que le tapis cellulaire. Ainsi, seule l'évolution de l'amplitude d'impédance électrique du tapis explique la réponse globale spécifique observée.

Dans le chapitre 2, nous avons vu que le *C. parvum* fusionne sous la membrane des cellules afin d'effectuer ses cycles de reproduction (cf. 2.3.1). Il est donc possible que ce changement de forme des cellules influence la réponse en impédance. Par ailleurs, le parasite affecte le tapis cellulaire d'un point de vue local, i.e. au niveau des foyers infectieux, et d'un point de vue global, i.e. sur l'ensemble du tapis cellulaire (cf. 2.3.2). Ces effets peuvent également peser sur l'impédance électrique du tapis. Nous avons donc analysé le tapis cellulaire plus finement pour savoir quel composant produit les changements observés dans les domaines temporels évoqués. Ces composants sont d'un côté le trajet transcellulaire, i.e. à travers les cellules, représenté par les paramètres du CPE $P_{trans}(t)$ et $n_{trans}(t)$, et le trajet paracellulaire, i.e. autour des cellules, modélisé avec la résistance $R_{para}(t)$. Dans un CPE, l'indice n peut être associé au caractère « non-idéal » de cet élément en comparaison d'une capacité (Cole et Cole, 1941). L'indice n peut également être vu comme un paramètre de distribution de constantes de temps : plus n augmente, plus cette distribution est large (Grimnes et Martinsen, 2000) (cf. 2.4.2.4). Sa décroissance dans le 2^e domaine temporel peut être associée à une augmentation de l'hétérogénéité d'une part des cellules en termes de taille et de forme (Foster et Schwan, 1989) et d'autre part des espaces intercellulaires (Ivorra *et al.*, 2005) (cf. 2.4.4). En effet, lors de l'infection, certaines cellules sont touchées et qui plus est à des degrés différents. Ceci concourt à augmenter l'hétérogénéité du tapis cellulaire et donc la largeur de la distribution de constante de temps. La décroissance de $P_{trans}(t)$ dans le 3^e domaine temporel peut être mise en relation avec l'augmentation de $n_{trans}(t)$, qui se rapproche de 1. Cela signifie que le comportement du CPE devient plus capacitif. Or nous avons également observé que la couverture du tapis cellulaire tend à diminuer à la fin de l'expérience, ce qui réduit la surface effective de l'électrode en contact avec les cellules (McAdams *et*

al., 1996). Une capacité diminue lorsque la surface associée diminue, ce qui expliquerait la diminution constatée sur $P_{trans}(t)$. Concernant $R_{para}(t)$, nous avons montré que son évolution au cours de l'infection est similaire à celle de l'amplitude d'impédance électrique totale entre 1kHz et 100kHz. Cet élément permet donc d'illustrer au mieux l'évolution de l'impédance. Afin d'expliquer les autres formes spécifiques de la réponse des cellules, en particulier les pics et minima observés dans le 2^e domaine temporel, nous émettrons dans la suite de notre discussion nos hypothèses à partir de l'évolution de $R_{para}(t)$.

Pour mieux comprendre les mécanismes biologiques sous-jacents gouvernant cette réponse, nous avons procédé à un comptage et une classification des formes parasitaires à des moments clés de l'infection tels que déterminés par la réponse impédimétrique. Les résultats obtenus sont en accord avec les précédentes études concernant le cycle de vie du *Cryptosporidium*, dans lesquelles la majorité des zoïtes ont été observés à 6h PI (Borowski *et al.*, 2010; Mauzy *et al.*, 2012) et les premières formes multinucléées décrites après 12h PI (Mauzy *et al.*, 2012; Slifko *et al.*, 1997). Nos observations confirment que le développement parasitaire initial est supporté par de la reproduction asexuée avec une prédominance de zoïtes et de mérontes et ce jusqu'à 30h PI. Tandis que Mauzy révélait une transition unique entre une prédominance de zoïte et une prédominance de mérontes dans le développement précoce du *C. parvum*, en sélectionnant arbitrairement ses temps d'échantillonnage (Mauzy *et al.*, 2012), nous avons montré pour la première fois de multiples alternances de prédominances de formes. En effet, pendant les 30 premières heures de l'infection, les mérontes (formes prolifératives) libèrent des zoïtes (formes infectieuses) entre les minima locaux et les pics d'impédance tandis que les zoïtes se développent en mérontes entre les pics et les minima locaux. Le suivi de l'impédance en continu nous donne des cinétiques de transition entre les prédominances de zoïtes comprises entre 7 et 13h, une information jamais obtenue auparavant.

En nous basant sur ces informations et les connaissances de ces systèmes biologiques, intéressons-nous à présent à relier la réponse impédimétrique avec les phénomènes biologiques au niveau du tapis cellulaire lors de l'infection. Les décroissances de $R_{para}(t)$ au début de l'infection peuvent être expliquées soit par une destruction des cellules soit par une augmentation de la perméabilité des jonctions intercellulaires. La figure 5.6c montre que la couverture du tapis est constante et supérieure à 99% pendant la période de 0 à 24h PI, contredisant ainsi la première hypothèse. Par contraste, lorsque la charge parasitaire augmente plus tardivement et de manière concomitante avec l'apparition des premières formes de reproduction sexuée observée dans nos cultures, nous mesurons une décroissance significative de la couverture du tapis cellulaire, ce qui induit une décroissance de $R_{para}(t)$ dans nos données modélisées. Au cours de sa thèse, Edwards a montré que l'apparition de formes de développement plus avancé du *C. parvum* provoque des nécroses des cellules-hôtes ainsi que la dégradation du tapis cellulaire (Edwards, 2012), ce qui peut expliquer nos résultats.

Puisque la dégradation du tapis cellulaire n'est pas la cause principale des variations de $R_{para}(t)$ pendant les premières 24h, les phénomènes liés aux jonctions intercellulaires doivent être examinés. Selon de précédentes études, l'EIS appliqué sur des cellules permet notamment d'obtenir des informations sur les voies paracellulaires (Giaever et Keese, 1991). Or, il a été déterminé que durant leur phase d'invasion, de nombreux agents infectieux (virus, bactéries, protozoaires) dégradent la perméabilité paracellulaire pour promouvoir leur pénétration dans la couche de cellules (Bonazzi et Cossart, 2011). De récentes données sur un autre protozoaire parasite entérique (*Giardia duodenalis*) ont montré que cet agent pathogène perturbe les jonctions intercellulaires, induisant une réduction de la Résistance Electrique TransEpithéliale (TEER) (Maia-Brigagão *et al.*, 2012). Les auteurs ont montré que ces altérations de perméabilité sont associées à l'attachement des trophozoïtes, et plus particulièrement au processus d'invasion du parasite. De telles observations suggèrent que les décroissances d'impédance de nos expériences peuvent être associées au processus d'invasion du *Cryptosporidium*. De précédentes études ont montré que les perturbations des jonctions intercellulaires, qui sont liées aux augmentations de perméabilité, sont un facteur de l'invasion des zoïtes et de la formation de trophozoïtes (Buret *et al.*, 2003), renforçant ainsi notre hypothèse.

Les augmentations d'impédance semblent être associées à la réponse des cellules-hôtes au développement du *Cryptosporidium* passant de structures de type mérontes à des structures de type zoïtes. Il a été montré que les entérocytes relâchent des cytokines telles que le TGF- β dans le milieu en réponse à l'infection au parasite de l'espèce *C. parvum* (Maillot *et al.*, 2000). Cette molécule présente un effet protecteur de la barrière intestinale en réduisant la perméabilité paracellulaire à partir de la régulation de protéines associées aux jonctions serrées (Howe *et al.*, 2005). La production de TGF- β expliquerait par conséquent les augmentations d'impédance observées dans nos expériences, consécutives à une réponse des cellules à l'infection, tel que cela a été montré dans les travaux de Roche *et al.* (Roche *et al.*, 2000) et la revue de Suzuki (Suzuki, 2013). Nous pensons donc que les variations d'impédance pendant les infections au *Cryptosporidium* sont une conséquence de l'invasion du parasite et de la réponse des cellules hôtes, qui induisent respectivement une perturbation et un renforcement des jonctions serrées.

Par ailleurs, nous avons cherché à évaluer et quantifier le potentiel de notre système en tant que capteur d'infectivité d'échantillons comprenant des doses variables de parasites infectieux de l'espèce *C. parvum*. La figure 5.7a montre des pics visibles à 12h PI et 23h PI, qui s'avèrent être corrélés à la dose de parasites viables introduite (figure 5.7b). Ainsi, en traçant l'amplitude des pics, normée par rapport au témoin négatif, en fonction du ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée], la courbe de tendance résultante présente une évidente croissance monotone. Une interprétation au premier ordre montre que le second pic offre une meilleure sensibilité (pente à 0,41 Ω /ratio) et une meilleure limite de détection que le premier pic (un ratio de [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:16). Nous pouvons néanmoins noter que l'écart entre les limites de détection du premier et du second pic est faible. De plus, le premier pic présente l'avantage d'apparaître au bout de seulement 12h PI, contre 23h PI pour le second. L'infectivité peut donc être évaluée dès 12h PI. Ce temps de détection montre que notre capteur d'infectivité est au moins 4 fois plus rapide que les techniques actuelles (souris néonatales: 6 jours ; cultures de cellules observées par fluorescence: de 48 à 72h (Johnson *et al.*, 2012)).

5.5 Conclusion

En conclusion, nous avons créé un capteur d'infectivité utilisant l'EIS pour suivre pour la première fois en continu la réponse de cellules à une infection d'un protozoaire parasite. Comparée aux techniques actuelles de quantification des procédés infectieux de parasite, qui nécessitent de fixer et marquer les cellules infectées, notre suivi continu et non-invasif permet de définir des temps d'échantillonnage pertinents pour d'autres analyses. Dans notre cas, cela nous a aidés à suivre et confirmer le développement homogène du parasite pendant les 30 premières heures d'infection. En outre, nous avons démontré que cet outil peut être utilisé en tant que capteur d'infectivité de protozoaires parasites, délivrant plus rapidement une réponse que les techniques actuelles disponibles.

Concernant les perspectives de ce travail, notre modélisation suggère que la limite de détection de notre capteur correspond à un ratio minimum [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:16. Aujourd'hui, les techniques pour évaluer l'infectivité d'un échantillon de *C. parvum* parviennent à détecter un oocyste unique (cf. 1.2.4.2). Un oocyste libérant 4 sporozoïtes, cela signifierait en théorie que notre capteur pourrait le détecter si le tapis cellulaire comprenait 64 cellules. Bien que cette assertion soit purement théorique, elle nous indique qu'améliorer la limite de détection, et donc la sensibilité, de notre capteur implique une miniaturisation de celui-ci. Cette miniaturisation implique d'autres verrous technologiques, comme par exemple le dépôt des parasites sur la couche de cellules. En effet, dans nos expériences, nous n'avons pu observer qu'un faible nombre de formes parasitaires au début de l'infection, ce qui laisse

supposer que peu d'oocystes ont atteint le tapis cellulaire lors de l'inoculation. Si la taille de ce tapis, et donc la taille de notre réseau d'électrodes, est réduite, nous pouvons améliorer le transport des parasites vers les cellules par des techniques de microfluidique. Enfin, les instants d'apparition de ces formes sont reproductibles entre les expériences et la dose infectieuse de *C. parvum* introduite malgré certains phénomènes biologiques qui peuvent varier d'une expérience à une autre, comme le nombre de d'oocystes désenkystés, l'état du tapis, le nombre de sporozoïtes parvenant à pénétrer une cellule... Cette reproductibilité laisse supposer que la réponse impédimétrique est spécifique à l'espèce du *C. parvum*. Une autre perspective consiste donc à tester notre capteur avec d'autres espèces de parasites pour confirmer la spécificité de la réponse impédimétrique.

6 CONCLUSION

6.1 Réalisations

La problématique de cette thèse était d'élaborer un système *in vitro* pour suivre en continu par spectroscopie d'impédance électrique (EIS) l'infection de cultures cellulaires par le protozoaire parasite de genre *Cryptosporidium*. Ces dernières servent donc d'intermédiaires pour obtenir des informations comme l'infectivité du parasite et potentiellement sur son cycle de vie.

Nous avons choisi comme modèle de cellules-hôte la lignée HCT-8 (issues d'un adénocarcinome iléocœcal humain) et comme modèle de parasite l'espèce *Cryptosporidium parvum* (*C. parvum*).

6.1.1 Avant l'introduction des parasites de *C. parvum*

La première étape consistait à concevoir un dispositif de mesure d'impédance électrique, composé de quatre puits de culture indépendants en polydiméthylsiloxane (PDMS) au fond desquels se trouve un Réseau d'Electrodes Interdigitées Planaires (REIP). Ce dispositif a été intégré à un banc de test expérimental, qui nous a permis de contrôler les paramètres suivants : tension d'excitation de 10mV, fréquences entre 100Hz et 1MHz, mesures sur cette gamme de fréquence sur 4 puits successivement, 7min d'écart entre deux mesures sur un même puits. Nous avons caractérisé notre dispositif de mesure et le banc de test avec différents liquides. Ceux-ci sont adaptés à la mesure de liquides dont la conductivité n'excède pas une certaine valeur. Dans le cas de liquides de conductivité élevée, comme le milieu de culture utilisé pour les cellules HCT-8, il s'avère que des effets parasites provenant des câbles du banc de test deviennent non négligeables à partir de 300kHz. Ceci est dû à la géométrie du REIP du dispositif de mesure, qui induit une valeur de constante de cellule faible.

En revanche, nous avons montré que notre dispositif est adapté pour mesurer pendant 76h l'impédance d'un tapis de cellules HCT-8 durant sa croissance jusqu'à confluence. En effet, la conductivité équivalente du tapis cellulaire est à partir de 3h inférieure à la conductivité maximale que notre système peut mesurer. Les expériences sur les cellules ont nécessité la mise en place d'un protocole qui nous a permis de supprimer les problèmes liés à la culture de cellule dans un faible volume de liquides (90 μ l) et de valider chaque mesure effectuée :

- La fuite du milieu a pu être évitée en collant les puits de PDMS sur le substrat avec des forces électrodynamiques.
- L'évaporation du milieu a été empêchée en recouvrant les puits d'un capot.
- Les contaminations bactériennes ont été évitées en filtrant chaque solution avant utilisation. Puis leur élimination a été confirmée par un contrôle systématique des surnageants sur de la gélose pour dénombrement (PCA).

D'un point de vue fréquentiel, les variations de la réponse induites par la croissance du tapis cellulaire sont visibles à des fréquences comprises entre 1kHz et 100kHz, donc inférieures à la fréquence où l'effet parasite des câbles est non négligeable (i.e. 300kHz). Plus précisément, nous avons défini une fréquence f_s à laquelle notre système est le plus sensible à ces variations. A cette fréquence, l'évolution temporelle de la réponse impédimétrique comprend les 3 mêmes étapes qu'une courbe de comptage de cellules réalisée classiquement en biologie pendant une croissance cellulaire : une phase de stabilisation ; une phase de croissance exponentielle, pendant laquelle les jonctions intercellulaires (en particulier les jonctions serrées)

se forment ; une phase de confluence, où les cellules recouvrent la totalité des REIP. Une modélisation de notre signal par circuit équivalent nous a montré que les deux dernières étapes sont également visibles dans l'évolution de l'élément correspondant au trajet paracellulaire du tapis de cellules, i.e. une résistance électrique. Ce paramètre est donc le plus adapté pour illustrer l'évolution temporelle de la réponse impédimétrique.

Cependant, nous avons vu que ces étapes dans l'évolution temporelle de la réponse impédimétrique dépendent du nombre de repiquage que les cellules HCT-8 ont subi au préalable. Celui-ci va notamment influencer la structure et le développement des jonctions intercellulaires. En conséquence, nous n'avons pas pu constater aux mêmes instants la phase de croissance exponentielle précédemment décrites. La reproductibilité de l'aspect de la réponse impédimétrique dépend donc du nombre de repiquages subis par les cellules. En outre, augmenter le nombre de repiquages a pour effet de diminuer l'amplitude de la réponse impédimétrique après 24h de croissance. Nous avons défini la sensibilité maximale de notre système comme étant le rapport entre le maximum et le minimum de l'amplitude de la réponse impédimétrique à la fréquence f_s . Les effets de l'infection par le *C. parvum* sur l'impédance de cultures HCT-8 étant inconnus, nous avons choisi arbitrairement une limite basse de cette sensibilité, à savoir 2. Les expériences d'infection par le *C. parvum* ne sont pas effectuées sur les cultures présentant une sensibilité inférieure à cette valeur. Notre modèle nous a montré que cette sensibilité était atteinte pour un nombre maximum de 18 repiquages sur une même culture de cellules.

6.1.2 Après l'introduction des parasites de *C. parvum*

Cette sensibilité minimale nous semblait nécessaire pour observer pendant 60h l'effet de l'infection par le parasite *C. parvum* sur la réponse impédimétrique de ces cultures HCT-8 à confluence. Un soin particulier a été accordé au protocole de désenkystement et à la préparation du témoin :

- D'un côté, avoir un protocole de désenkystement efficace permet d'augmenter nos chances d'infection par oocyste de *C. parvum* introduit. Notre protocole a été validé par des tests de désenkystement, qui nous ont permis de n'introduire que des inocula dont le taux de désenkystement est supérieur à 70%.
- D'un autre côté, le témoin négatif nous permet de nous assurer que la réponse observée lors de l'introduction d'un inoculum avec des parasites viables (et potentiellement infectieux) est bien due à cette infection. Geler les oocystes à l'azote liquide puis les ramener à 37°C permet de s'assurer d'une part que les oocystes sont morts et d'autre part que la réponse du témoin négatif n'est pas due à une température de l'inoculum inférieure à 37°C.

Nous avons observé pendant ces 60h une nette différence entre l'inoculum supposé infectieux et le témoin. L'infection a donc bien eu lieu. Ceci valide le fait qu'en suivant notre protocole, des oocystes atteignent le tapis cellulaire et ont encore suffisamment d'énergie pour infecter les cellules.

La réponse impédimétrique des cellules exposées à l'inoculum supposée infectieux est composée de 3 domaines temporels reproductibles à chaque expérience, pour des fréquences entre 1 et 100kHz (où les changements de la réponse impédimétrique induits par le tapis cellulaire sont visibles) :

- Le 1^{er} : jusqu'à 9h PI (PI = post infection), pas de différence significative avec le témoin.
- Le 2^e : alternance entre 3 pics et 3 minima.
- Le 3^e : chute de la réponse, le début étant dépendant de la fréquence appliquée.

Afin d'apporter des explications biologiques à cette réponse spécifique, nous avons observé en parallèle et à des moments spécifiques de ces domaines temporels le cycle de vie du parasite *C. parvum*. Celui-ci est

notamment caractérisé par des formes de reproduction asexuée et sexuée. Le recouvrement du tapis cellulaire par rapport à la surface de culture totale a également été déterminé:

- Les pics et minima observés dans le 2^e domaine correspondent respectivement à une prédominance dans le total des formes de développement observées de zoïtes (i.e. formes invasives) et mérontes (i.e. formes prolifératives). Toutes deux correspondent à des formes de reproduction asexuée. Pendant le 2^e domaine temporel, le recouvrement du tapis cellulaire est maximal, i.e. à confluence. Dans le même temps, les pics et minima observés dans la réponse impédimétrique sont également présents dans l'évolution des valeurs de la résistance modélisant le trajet paracellulaire. En nous basant sur des études récentes, nous avons émis l'hypothèse que ces variations sont une conséquence de l'invasion du parasite et de la réponse des cellules hôtes, qui induisent respectivement une perturbation et un renforcement des jonctions serrées.
- Dans le 3^e domaine temporel, le nombre de parasites atteint un maximum. Nous pouvons également y observer l'apparition puis la prédominance de formes de type gamontes à la fin de l'expérience. Dans le même temps, nous avons pu observer une diminution du recouvrement du tapis cellulaire, impliquant une dégradation des cellules-hôtes. Nous avons ainsi pu fournir l'hypothèse que la dégradation des cellules-hôtes induite par l'apparition de formes de développement avancées du *C. parvum* implique une diminution de la réponse impédimétrique du tapis cellulaire.

Pour finir, notre système a été testé comme capteur d'infectivité. Nous avons introduit sur des cultures HCT-8 confluentes des inocula de différents ratios de viabilité, que nous avons postulés d'infectivité différente. En nous plaçant à la fréquence f_s de sensibilité maximale, notre système permet de les différencier. D'un côté, nous avons montré qu'il existe une relation linéaire liant l'amplitude des deux premiers pics du 2^e domaine temporel et la dose infectieuse de l'inoculum introduit. D'un autre côté, le début du 3^e domaine temporel dépend également de la dose infectieuse : plus celle-ci est élevée, plus le 3^e domaine temporel début tôt.

En conclusion, il s'agit du premier travail permettant de mesurer en continu par spectroscopie d'impédance électrique l'infection de cultures de cellules par un protozoaire parasite. Ceci nous permet de définir des temps d'échantillonnage pertinents pour effectuer des analyses biologiques complémentaires et obtenir des informations sur le cycle de vie du parasite ainsi que sur la relation hôte-parasite. En outre, ce système peut être utilisé comme capteur d'infectivité, délivrant une réponse au moins 4 fois plus rapide que les techniques actuelles.

6.2 Perspectives

6.2.1 Optimisation par miniaturisation

Aujourd'hui, les techniques de mesure d'infectivité *in vitro* et *in vivo* parviennent à détecter jusqu'à un oocyste de *C. parvum* infectieux. Si nous souhaitons apporter une solution alternative basée sur l'EIS, celle-ci doit donc permettre d'atteindre cette limite de détection. Notre modélisation de la relation liant l'amplitude de la réponse impédimétrique et l'inoculum montre que notre système possède une limite de détection à 12h PI de 1 oocyste viable pour 44 cellules cultivées et à 23h PI de 1 oocyste viable pour 64 cellules. Considérons la meilleure limite de détection, i.e. celle à 23h PI, et la surface d'une cellule, que nous

avons estimée à $180\mu\text{m}^2$. Cela reviendrait à mesurer l'impédance d'un tapis de 64 cellules sur une surface de REIP de $120\mu\text{m}$ de diamètre. L'optimisation de la limite de détection implique donc une miniaturisation du réseau d'électrodes interdigitées, voire de la surface de culture en elle-même. Cette miniaturisation soulève plusieurs verrous technologiques :

❖ **Transport des oocystes sur la zone sensible**

Au cours de cette thèse, nous avons évoqué l'importance que tous les oocystes introduits soient déposés sur les cellules dont l'impédance électrique est mesurée. Déposer précisément, et sans abimer les cellules, une goutte contenant les oocystes sur une surface de $120\mu\text{m}$ de diamètre est impossible avec une pipette classiquement utilisée en laboratoire de biologie. Comme solution, nous pouvons envisager un circuit microfluidique composé de chambres, où les cellules sont cultivées, et de canaux, dont le rôle est de transporter les cellules et les oocystes jusqu'au RIE. Cette solution améliorerait également la vitesse de dépôt des oocystes sur le tapis cellulaire. Ceux-ci possèdent en effet une faible vitesse de sédimentation ($1\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Searcy *et al.*, 2005)) qui augmente le temps avant lequel les sporozoïtes atteignent et infectent les cellules dans le cas de cultures dans un puits. En conséquence, transporter les oocystes avec des canaux microfluidiques permettra également d'avoir un effet sur la rapidité de détection et la distinction entre les doses infectieuses introduites.

❖ **Adaptation de la constante de cellule du REIP**

Réduire la surface des électrodes a une incidence sur la géométrie du REIP et donc sur sa constante de cellule. Nous avons vu que celle-ci augmente lorsque le nombre de doigts constituant le réseau diminue (cf. formule (2.29)). Or, nous avons montré que la faible constante de cellule du REIP de notre dispositif était à l'origine de la prédominance des effets inductifs des câbles du banc expérimental dans les mesures d'impédance électrique à hautes fréquences sur du milieu de culture (cf. 3.5.4). Miniaturiser la surface des électrodes est donc un moyen pour augmenter la constante de cellule de notre REIP. Cependant, si celle-ci est trop élevée, la valeur de l'amplitude d'impédance mesurée peut être supérieure à la valeur limite détectable par l'impédancemètre. Des études sont donc nécessaires pour optimiser la constante de cellule du réseau par rapport aux limites de l'impédancemètre et pour réduire les effets parasites du montage.

❖ **Mesures d'impédance électrique sur un groupe de cellules**

L'EIS est une technique sensible. Par exemple, De Blasio *et al.* ont mesuré grâce à cette technique des micromouvements d'une cellule unique sur une surface d'électrode de $250\mu\text{m}$ de diamètre (De Blasio *et al.*, 2004). Dans nos expériences, nous avons effectué des mesures d'impédance électrique sur un tapis cellulaire composé d'approximativement 160 000 cellules. Nous avons donc mesuré un phénomène à l'échelle d'une population. Pour un groupe de 64 cellules, nous pouvons nous attendre à ce que les mesures soient plus sensibles à des modifications au niveau de quelques cellules. En outre, diminuer le nombre de cellules analysées revient à diminuer le rapport entre le périmètre et la surface de culture. Les effets de bord, autant biologiques (ex : formes des cellules) qu'électriques (ex : forme des lignes de champ) peuvent alors devenir significatifs sur la réponse impédimétrique. Pour ces raisons, effectuer des expériences en triplicate peut s'avérer insuffisant pour moyenniser nos mesures. Il sera donc nécessaire d'augmenter le nombre de surfaces d'analyses sur notre dispositif de mesure. Ceci est facilité par la miniaturisation des REIP, qui nous permet d'augmenter leur nombre sur un même dispositif de mesure. Effectuer des expériences sur un grand nombre de zones d'analyses différents présente aussi l'avantage de mesurer l'impédance électrique de cellules ayant subi le même nombre de repiquages. Comme nous l'avons montré, celui-ci influe en effet sur les structures et le développement des jonctions intercellulaires et donc sur la reproductibilité des mesures.

6.2.2 Spécificité de la réponse au couple espèce – cellule-hôte

Nos expériences ont montré que l'évolution temporelle de la réponse impédimétrique des cellules pendant l'infection par le *C. parvum* est reproductible. Par exemple, chaque pic du 2^e domaine temporel apparaît à des instants similaires par rapport au moment de l'introduction de l'inoculum. Nous nous posons donc la question suivante : cette réponse est-elle spécifique au couple *C. parvum* – cellule HCT-8 ?

Notre système peut potentiellement être testé avec d'autres espèces de *Cryptosporidium*, dont l'infection *in vitro* s'effectue également sur des cellules HCT-8. Parmi celles-ci, nous pouvons par exemple citer le *C. hominis*, qui est avec le *C. parvum* l'espèce la plus communément identifiée dans les cas de cryptosporidiose chez l'Homme (Chalmers, 2012). Comparer les réponses impédimétriques des cellules pendant l'infection permettrait de constater si celle-ci est spécifique à l'espèce. Cette spécificité pourrait s'exprimer de plusieurs façons : nombre et amplitude des pics, instants de leur apparition, début du 3^e domaine temporel où la réponse chute et devient inférieure au témoin...

En outre, nous pourrions également tester notre système avec le *C. parvum* mais en utilisant d'autres types de cellules-hôtes. Des infections au *C. parvum* ont notamment déjà été réalisées sur des cellules de type MDCK (cellules non cancéreuses de rein de coquer) et Caco-2 (issues d'un adénocarcinome colorectal humain) (Arrowood, 2002). Utiliser d'autres cellules peut également avoir un effet sur la spécificité de la réponse, voire sur la rapidité et la sensibilité de détection.

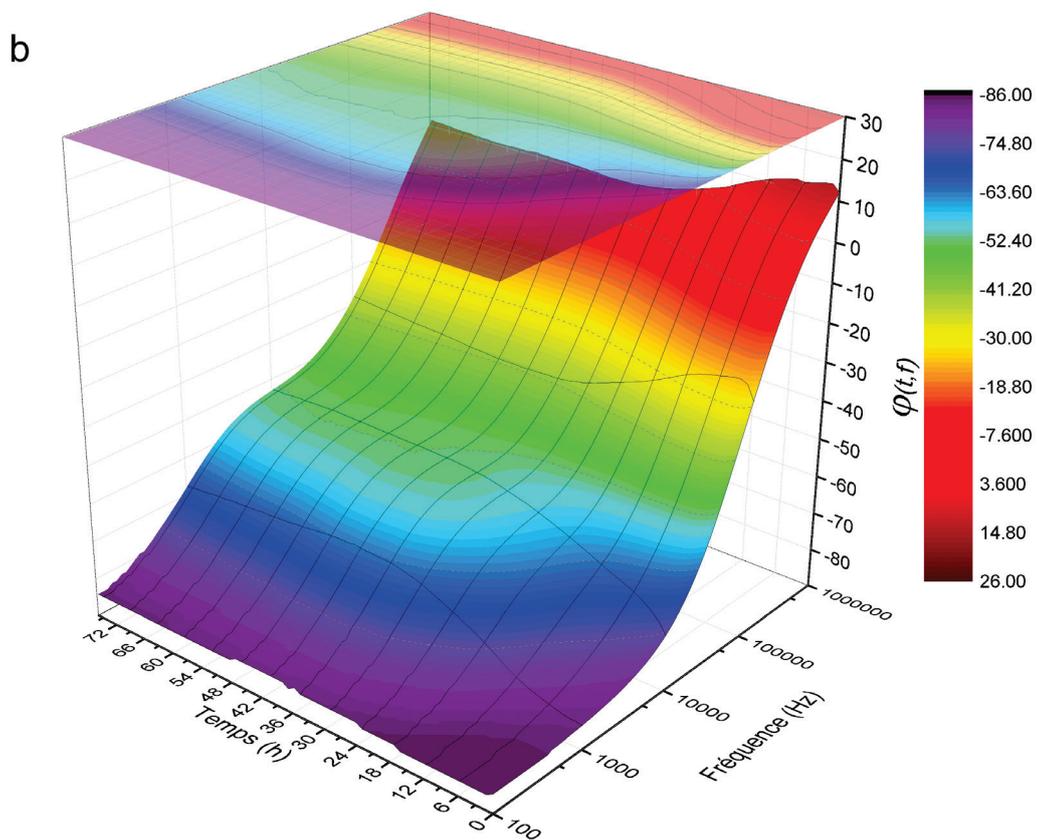
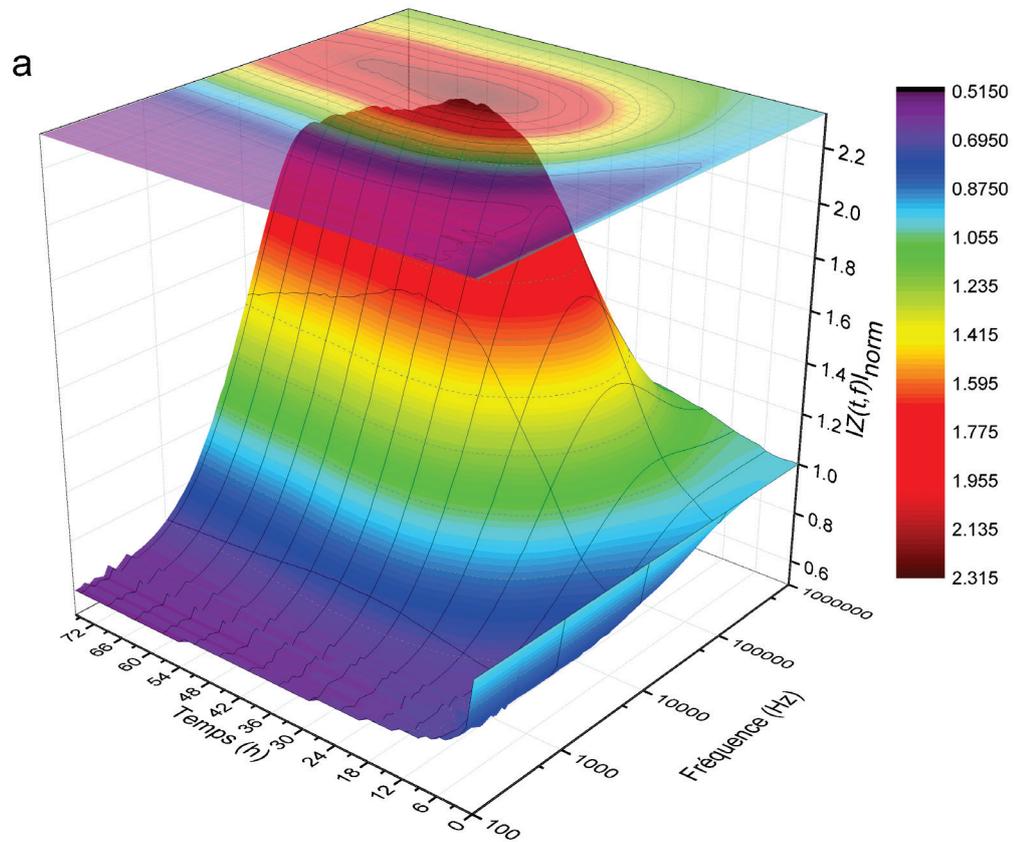
6.2.3 L'EIS pour étudier le cancer induit par le *C. parvum*

Depuis quelques années, il a été montré que l'infection au *C. parvum* sur un modèle de souris sévèrement immunodéprimée (SCID) induit le développement de tumeurs gastro-intestinales (Benamrouz *et al.*, 2014, 2012; Certad *et al.*, 2007). Ces études montrent que la cryptosporidiose n'est pas le seul risque encouru par un individu infecté par le *C. parvum*, particulièrement s'il possède un système immunitaire déficient.

L'induction de ces tumeurs par l'infection au *C. parvum* n'est pas encore entièrement élucidée. Comme nous l'avons montré sur des cultures cellulaires, une mesure en continu par EIS permettrait d'obtenir plus d'informations sur les mécanismes sous-jacents.

Plusieurs verrous technologiques sont à régler au préalable. Par exemple, le modèle de cellule doit être remplacé par un modèle d'explant, dont le maintien en culture pendant 45 jours est nécessaire pour observer le développement d'un adénocarcinome (Benamrouz *et al.*, 2012). Néanmoins cette étude ouvre d'importantes opportunités dans la recherche sur le cancer en utilisant des approches électriques.

A. SUIVI IMPEDIMETRIQUE DE CROISSANCE DE CELLULES HCT-8 DES EXPERIENCES N°2 ET 3



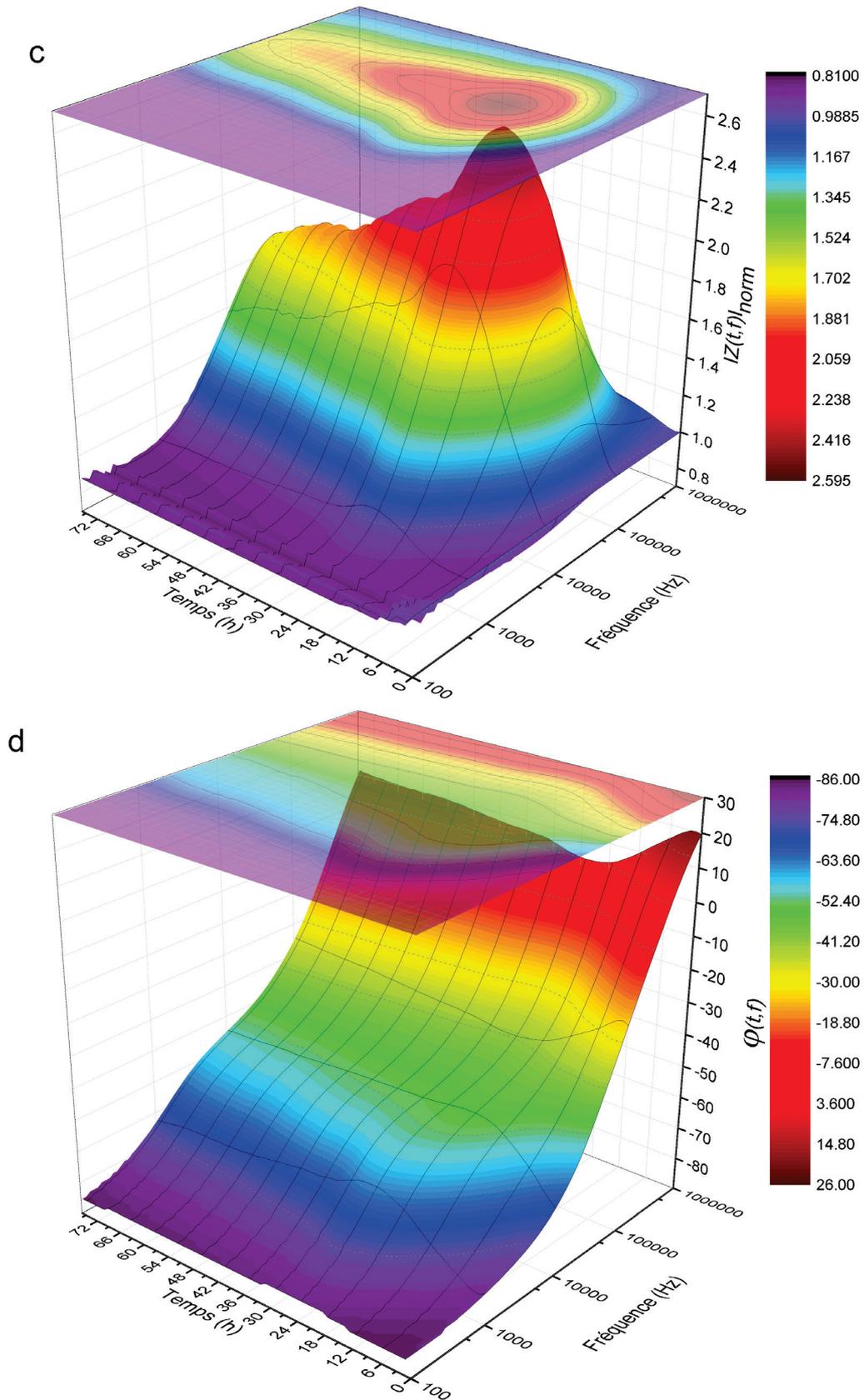


Figure A.1 : Représentations de la mesure de l'impédance du tapis cellulaire en fonction du temps et de la fréquence appliquée des deux autres expériences (cf. figure 4.3 pour l'expérience n°1). Les graphiques (a) et (b) correspondent à l'amplitude de l'impédance normalisée par rapport à sa valeur à $t = 0$ h (cf. équation (4.3)) et à la phase de l'expérience n°2 et les graphiques (c) et (d) de l'expérience n°3.

B. MODELISATION PAR CIRCUIT ELECTRIQUE EQUIVALENT DE LA CROISSANCE DE CELLULES HCT-8 DES EXPERIENCES N°2 ET 3

Temps (h,min)	R_{para} (Ω)	P_{trans} (S.S ^{ntrans})	n_{trans}	R_{hf} (Ω)	P_{dc} (S.S ^{ndf})	n_{dc}	L_{cables} (H)	r^2	$f_{para/trans}$ (Hz)
3h 19min	0,01	4,99E-04	0,06331	12,116	6,32E-07	0,95777	6,16E-7	0,99852	-
5h 37min	0,00	4,87E-04	0,01005	12,587	6,42E-07	0,95913	5,79E-7	0,99757	-
10h 12min	27,33	1,98E-06	0,92356	13,072	6,66E-07	0,95686	5,33E-7	0,99945	6,6E+03
13h 38min	48,97	2,30E-06	0,87343	13,458	6,77E-07	0,95851	4,77E-7	0,99959	5,3E+03
17h 05min	76,27	2,56E-06	0,83541	13,469	6,81E-07	0,95862	4,76E-7	0,99974	4,5E+03
23h 58min	126,43	3,00E-06	0,78063	13,235	6,92E-07	0,96052	5,19E-7	0,99988	3,9E+03
26h 15min	139,94	2,98E-06	0,77109	13,272	7,07E-07	0,95826	5,36E-7	0,99988	3,9E+03
34h 17min	181,90	3,08E-06	0,74421	13,295	7,15E-07	0,95703	5,64E-7	0,99982	3,7E+03
40h 01min	181,77	3,19E-06	0,73854	13,464	7,32E-7	0,95494	5,34E-7	0,99978	3,8E+03
49h 46min	167,37	3,19E-06	0,74047	13,587	7,21E-7	0,95720	5,24E-7	0,99974	4,2E+03
60h 06min	148,47	3,37E-06	0,74053	13,652	7,09E-7	0,95926	5,18E-7	0,99975	4,6E+03
68h 42min	139,08	3,39E-06	0,74499	12,116	6,32E-7	0,95777	6,16E-7	0,99978	4,7E+03
75h 49min	130,29	3,41E-06	0,75015	12,587	6,42E-7	0,95913	5,79E-7	0,99979	4,7E+03

Tableau B.1 : Valeurs des éléments du circuit équivalent déterminées avec notre protocole de calibrage pour l'expérience n°2 (cf. tableau 4.1 pour l'expérience n°1). Leurs évolutions temporelles sont représentées figure b.1. Le coefficient de corrélation r^2 et la fréquence $f_{para/trans}$ ont été déterminés à partir des formules (3.3) et (4.10). Les données à 3h 19min et 5h 37min n'ont pas été prises en compte les valeurs des éléments modélisant le tapis cellulaire divergent.

Temps (h,min)	R_{para} (Ω)	P_{trans} (S.S ^{ntrans})	n_{trans}	R_{hf} (Ω)	P_{dc} (S.S ^{ndf})	n_{dc}	L_{cables} (H)	r^2	$f_{para/trans}$ (Hz)
3h 19min	11,40	3,21E-06	0,90747	9,22	9,17E-07	0,94520	7,25E-07	0,99929	1,2E+04
5h 37min	23,98	4,63E-06	0,83000	9,61	9,17E-07	0,94848	6,98E-07	0,99938	9,2E+03
10h 12min	53,05	6,44E-06	0,74502	10,03	9,07E-07	0,95406	6,56E-07	0,99965	7,2E+03
13h 38min	83,21	7,61E-06	0,69936	9,85	8,90E-07	0,95825	6,58E-07	0,99968	6,0E+03
17h 05min	125,32	8,93E-06	0,66711	9,48	8,90E-07	0,95989	6,84E-07	0,99968	4,2E+03
23h 58min	172,08	7,94E-06	0,66857	9,49	8,73E-07	0,96446	6,91E-07	0,99964	3,1E+03
26h 15min	168,12	7,41E-06	0,67680	9,61	8,62E-07	0,96617	6,86E-07	0,99964	3,1E+03
34h 17min	114,95	6,24E-06	0,70750	9,92	9,08E-07	0,95846	6,66E-07	0,99963	4,4E+03
40h 01min	107,80	5,97E-06	0,71540	10,05	9,11E-07	0,95838	6,60E-07	0,99964	4,6E+03
49h 46min	86,68	5,73E-06	0,73104	10,09	9,11E-07	0,95734	6,64E-07	0,99958	5,3E+03
60h 06min	82,26	6,53E-06	0,72791	10,14	9,18E-07	0,95699	6,63E-07	0,99956	4,9E+03
68h 42min	77,72	6,43E-06	0,73544	10,19	9,18E-07	0,95694	6,60E-07	0,99958	4,9E+03
75h 49min	66,84	6,24E-06	0,74612	10,10	9,05E-07	0,95881	6,61E-07	0,99956	5,4E+03

Tableau B.2 : Valeurs des éléments du circuit équivalent déterminées avec notre protocole de calibrage pour l'expérience n°3 (cf. tableau 4.1 pour l'expérience n°1). Leurs évolutions temporelles sont représentées figure b.2. Le coefficient de corrélation r^2 et la fréquence $f_{para/trans}$ ont été déterminés à partir des formules (3.3) et (4.10).

Expérience n°2

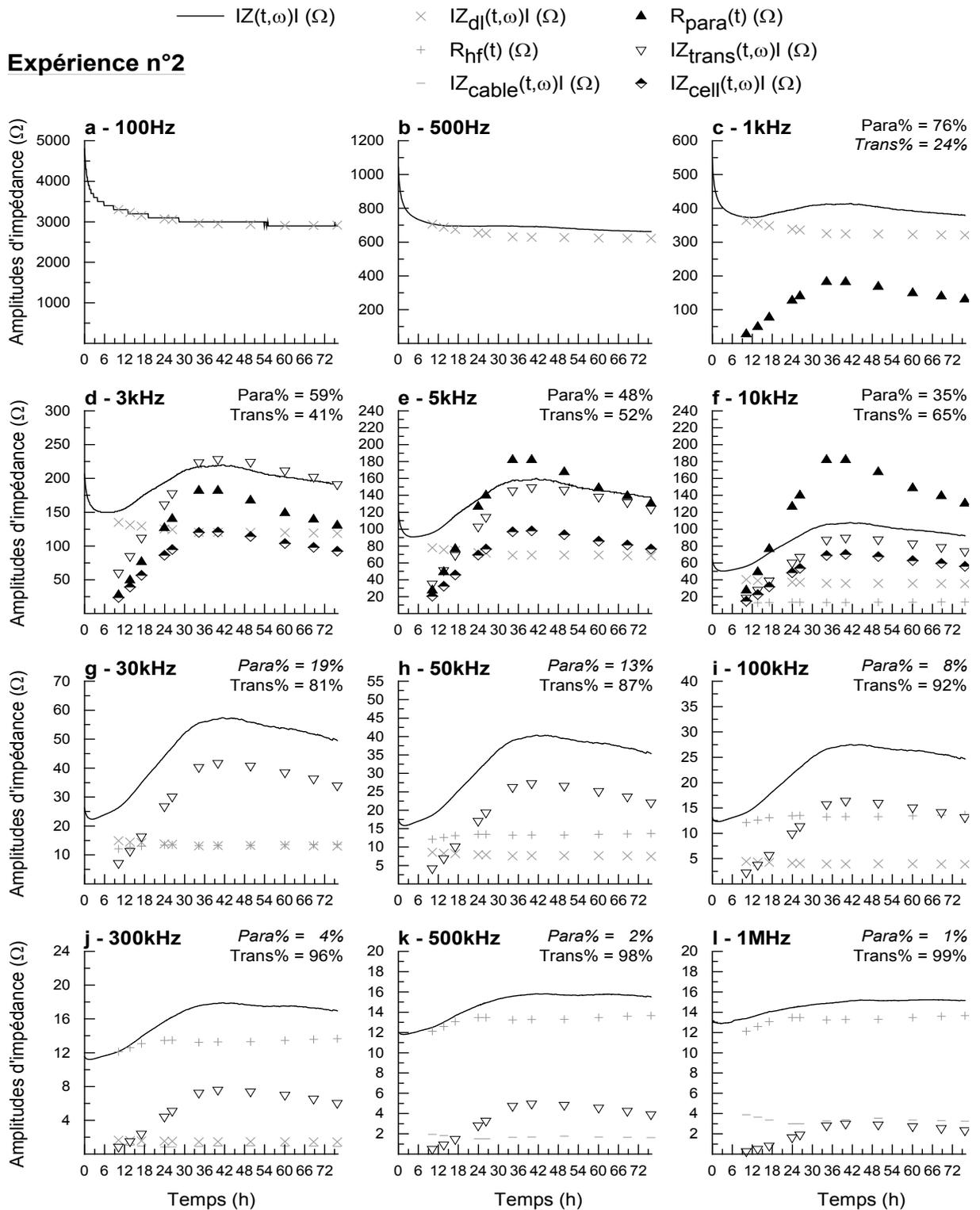


Figure B.1 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent comparées à l'amplitude d'impédance totale $|Z(t,\omega)|$ aux fréquences 100Hz (a), 500Hz (b), 1kHz (c), 3kHz (d), 5kHz (e), 10kHz (f), 30kHz (g), 50kHz (h), 100kHz (i), 300kHz (j), 500kHz (k) et 1MHz (l) pour l'expérience n°2 (cf. figure 4.6 pour voir l'expérience n°1 et une description exhaustive du protocole de création des graphiques).

Expérience n°3

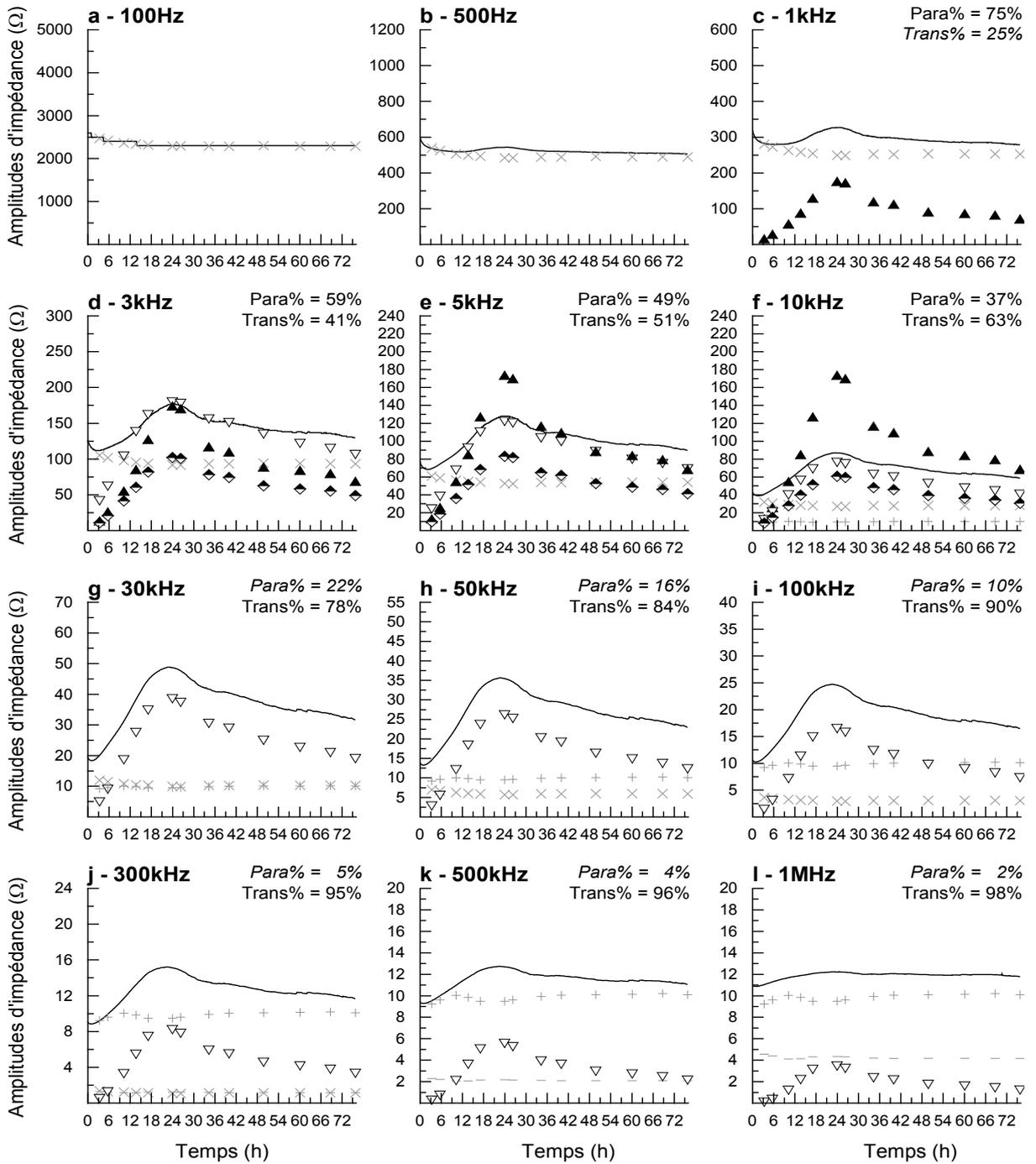
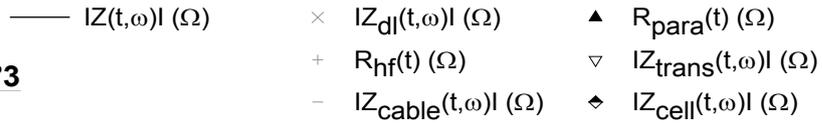


Figure B.2 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent comparées à l'amplitude d'impédance totale $|Z(t,\omega)|$ aux fréquences 100Hz (a), 500Hz (b), 1kHz (c), 3kHz (d), 5kHz (e), 10kHz (f), 30kHz (g), 50kHz (h), 100kHz (i), 300kHz (j), 500kHz (k) et 1MHz (l) pour l'expérience n°3 (cf. figure 4.6 pour voir l'expérience n°1 et une description exhaustive du protocole de création des graphiques).

C. MODELISATION PAR CIRCUIT ELECTRIQUE EQUIVALENT DE L'INFECTION D'UN TAPIS DE CELLULES HCT-8 PAR LE *C. PARVUM* DES EXPERIENCES N°2 ET 3

Temps PI (h,min)	R_{para} (Ω)	P_{trans} (S.S ^{ntrans})	n_{trans}	R_{hf} (Ω)	P_{dl} (S.S ^{ndl})	n_{dl}	$L_{câbles}$ (H)	r^2	$f_{para/trans}$ (Hz)
0h 00min	161,32	2,89E-06	0,74938	14,01	7,30E-07	0,96106	5,48E-07	0,99978	4,4E+03
0h 07min	143,74	2,70E-06	0,75934	13,93	7,24E-07	0,96218	5,52E-07	0,99978	4,9E+03
0h 14min	148,34	2,60E-06	0,75634	14,18	7,47E-07	0,95780	5,41E-07	0,99974	5,2E+03
2h 25min	138,97	2,36E-06	0,76947	13,56	7,35E-07	0,95987	4,42E-07	0,99983	5,4E+03
4h 15min	132,54	2,39E-06	0,77584	13,56	7,20E-07	0,96008	4,48E-07	0,99983	5,2E+03
4h 49min	130,11	2,38E-06	0,77760	13,56	7,16E-07	0,96021	4,52E-07	0,99982	5,2E+03
6h 46min	132,80	2,42E-06	0,77768	13,68	7,00E-07	0,96198	4,55E-07	0,99984	4,9E+03
9h 11min	134,47	2,46E-06	0,77626	13,81	6,92E-07	0,96319	4,70E-07	0,99983	4,8E+03
11h 01min	168,89	2,56E-06	0,75837	14,21	6,83E-07	0,96589	4,46E-07	0,99987	4,4E+03
12h 51min	178,58	2,47E-06	0,75465	14,41	6,95E-07	0,96474	4,30E-07	0,99988	4,4E+03
15h 50min	175,34	2,49E-06	0,75755	14,42	6,88E-07	0,96614	4,44E-07	0,99987	4,3E+03
18h 49min	171,71	2,65E-06	0,75597	14,45	6,87E-07	0,96595	4,55E-07	0,99988	4,2E+03
22h 29min	171,67	3,65E-06	0,71889	14,60	6,87E-07	0,96735	4,35E-07	0,99989	4,5E+03
24h 53min	156,82	4,86E-06	0,70294	14,52	6,93E-07	0,96652	4,42E-07	0,99987	4,3E+03
27h 45min	136,73	5,55E-06	0,70152	14,54	6,98E-07	0,96525	4,50E-07	0,99986	4,5E+03
28h 54min	131,75	5,66E-06	0,70199	14,58	6,98E-07	0,96535	4,47E-07	0,99985	4,5E+03
30h 37min	115,46	6,85E-06	0,69078	14,61	6,91E-07	0,96722	4,36E-07	0,99989	4,9E+03
32h 21min	92,78	8,98E-06	0,68736	14,70	7,04E-07	0,96569	4,16E-07	0,99992	4,8E+03
35h 47min	67,52	8,17E-06	0,72691	14,66	7,01E-07	0,96635	4,26E-07	0,99990	4,8E+03
38h 39min	55,96	7,27E-06	0,75176	14,53	7,04E-07	0,96559	4,45E-07	0,99990	5,2E+03
40h 57min	43,37	8,07E-06	0,76736	14,23	6,97E-07	0,96708	4,64E-07	0,99988	5,1E+03
43h 49min	31,30	8,30E-06	0,79788	13,73	6,95E-07	0,96736	5,01E-07	0,99981	5,0E+03
46h 41min	24,62	7,04E-06	0,83133	13,46	7,01E-07	0,96598	5,21E-07	0,99975	5,3E+03
50h 07min	20,23	6,21E-06	0,85707	13,23	7,04E-07	0,96524	5,42E-07	0,99969	5,7E+03
54h 43min	17,64	5,68E-06	0,87908	13,01	7,00E-07	0,96575	5,65E-07	0,99963	5,6E+03
59h 52min	15,74	5,02E-06	0,90094	12,88	7,04E-07	0,96488	5,81E-07	0,99957	5,7E+03

Tableau C.1 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent post infection à un ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:1 pour l'expérience n°2 (cf. tableau 5.2 pour l'expérience n°1). Leurs évolutions temporelles sont représentées figure c.1. Chaque paramètre a été défini précédemment (cf. 5.2.3). Les calculs de r^2 et de $f_{para/trans}$ sont respectivement basés sur les formules (3.3) et (4.10).

Temps PI (h,min)	R_{para} (Ω)	P_{trans} (S.S ^{ntrans})	n_{trans}	R_{hf} (Ω)	P_{dl} (S.S ^{ndl})	n_{dl}	$L_{câbles}$ (H)	r^2	$f_{para/trans}$ (Hz)
0h 00min	87,32	8,23E-06	0,71522	14,64	9,24E-07	0,96125	6,60E-07	0,99974	4,0E+03
0h 07min	91,02	8,38E-06	0,71279	14,69	9,23E-07	0,96139	6,56E-07	0,99974	3,8E+03
0h 14min	81,22	7,89E-06	0,72069	14,60	9,25E-07	0,96127	6,62E-07	0,99973	4,3E+03
2h 25min	77,21	7,44E-06	0,72910	14,62	9,58E-07	0,95933	6,66E-07	0,99971	4,4E+03
4h 15min	73,83	7,31E-06	0,73497	14,66	9,62E-07	0,95915	6,67E-07	0,99970	4,4E+03
4h 49min	73,99	7,33E-06	0,73528	14,68	9,61E-07	0,95928	6,68E-07	0,99971	4,4E+03
6h 46min	76,85	7,58E-06	0,73455	14,78	9,55E-07	0,96030	6,67E-07	0,99972	4,0E+03
9h 11min	81,06	8,02E-06	0,72957	14,87	9,47E-07	0,96176	6,66E-07	0,99972	3,7E+03
11h 01min	106,17	9,09E-06	0,70213	15,36	9,12E-07	0,96777	6,36E-07	0,99977	3,1E+03
12h 51min	111,57	8,99E-06	0,69823	15,51	9,13E-07	0,96809	6,29E-07	0,99978	3,1E+03
15h 50min	97,14	8,62E-06	0,71172	15,39	9,56E-07	0,96273	6,44E-07	0,99980	3,4E+03
18h 49min	102,30	8,99E-06	0,70972	15,49	9,46E-07	0,96460	6,42E-07	0,99980	3,0E+03
22h 29min	158,35	1,06E-05	0,66791	16,21	8,61E-07	0,98012	5,91E-07	0,99987	2,3E+03
24h 53min	152,91	1,08E-05	0,66784	16,20	8,66E-07	0,97903	5,93E-07	0,99987	2,3E+03
27h 45min	151,23	1,14E-05	0,66416	16,25	8,65E-07	0,97937	5,93E-07	0,99988	2,3E+03
28h 54min	150,89	1,20E-05	0,65721	16,38	8,66E-07	0,97935	5,82E-07	0,99989	2,4E+03
30h 37min	144,14	1,49E-05	0,63324	16,40	8,54E-07	0,98149	5,75E-07	0,99990	2,6E+03
32h 21min	123,47	1,94E-05	0,61270	16,20	8,76E-07	0,97713	5,83E-07	0,99990	3,0E+03
35h 47min	102,65	2,25E-05	0,61151	15,95	8,92E-07	0,97445	5,88E-07	0,99990	3,3E+03
38h 39min	92,47	2,39E-05	0,61287	16,03	8,90E-07	0,97458	5,85E-07	0,99990	3,4E+03
40h 57min	74,47	2,68E-05	0,61735	16,07	9,06E-07	0,97177	5,74E-07	0,99991	3,8E+03
43h 49min	61,09	2,47E-05	0,64481	15,88	9,07E-07	0,97145	5,77E-07	0,99990	3,8E+03
46h 41min	56,07	2,23E-05	0,66476	15,82	9,01E-07	0,97230	5,88E-07	0,99990	3,7E+03
50h 07min	52,27	2,07E-05	0,67970	15,77	9,07E-07	0,97134	5,97E-07	0,99988	3,7E+03
54h 43min	49,68	1,88E-05	0,69534	15,70	9,02E-07	0,97193	6,08E-07	0,99988	3,6E+03
59h 52min	47,46	1,66E-05	0,71172	15,62	9,02E-07	0,97202	6,19E-07	0,99986	3,7E+03

Tableau C.2 : Valeurs des paramètres du circuit équivalent post infection à un ratio [sporozoïte viable]:[cellule cultivée] de 1:1 pour l'expérience n°3 (cf. tableau 5.2 pour l'expérience n°1). Leurs évolutions temporelles sont représentées figure c.2. Chaque paramètre a été défini précédemment (cf. 5.2.3). Les calculs de r^2 et de $f_{para/trans}$ sont respectivement basés sur les formules (3.3) et (4.10).

— $|Z(t,\omega)|$ (Ω) \times $|Z_d(t,\omega)|$ (Ω) \blacktriangle $R_{para}(t)$ (Ω) \circ $P_{trans}(t)$ ($S.s^{n_{trans}}$)
Expérience n°2 $+$ $R_{hf}(t)$ (Ω) ∇ $|Z_{trans}(t,\omega)|$ (Ω) \square $\eta_{trans}(t)$
 \blacklozenge $|Z_{cell}(t,\omega)|$ (Ω)

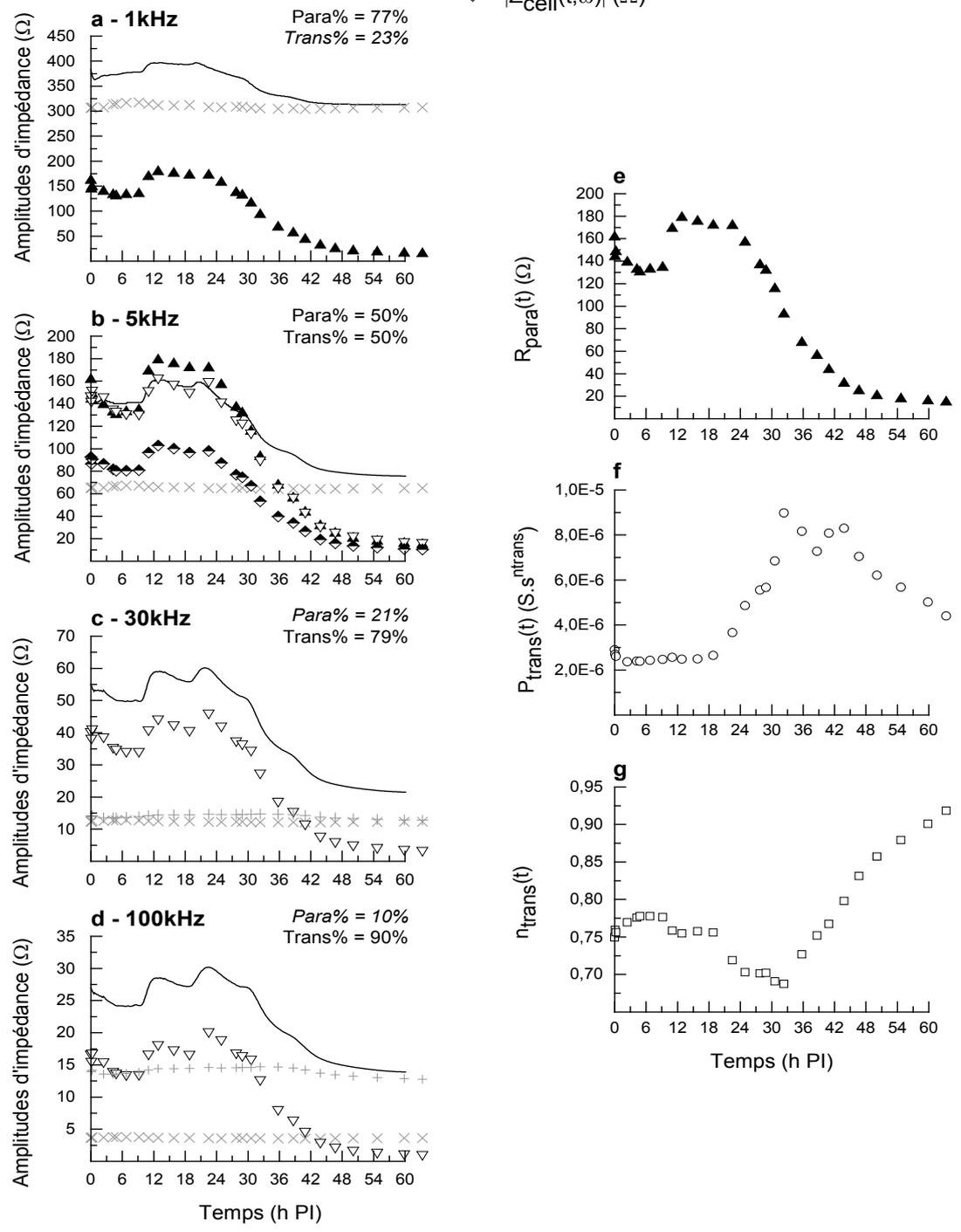


Figure C.1 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent. L'évolution de chaque amplitude d'impédance est comparée à $|Z(t,\omega)|$ aux fréquences 1kHz (a), 5kHz (b), 30kHz (c) et 100kHz (d) pour l'expérience n°2 (cf. figure 5.5 pour voir l'expérience n°1 et une description exhaustive du protocole de création des graphiques).

— $|Z(t,\omega)|$ (Ω) \times $|Z_d(t,\omega)|$ (Ω) \blacktriangle $R_{para}(t)$ (Ω) \circ $P_{trans}(t)$ ($S \cdot s^{n_{trans}}$)
Expérience n°3 $+$ $R_{hf}(t)$ (Ω) ∇ $|Z_{trans}(t,\omega)|$ (Ω) \square $\eta_{trans}(t)$
 \diamond $|Z_{cell}(t,\omega)|$ (Ω)

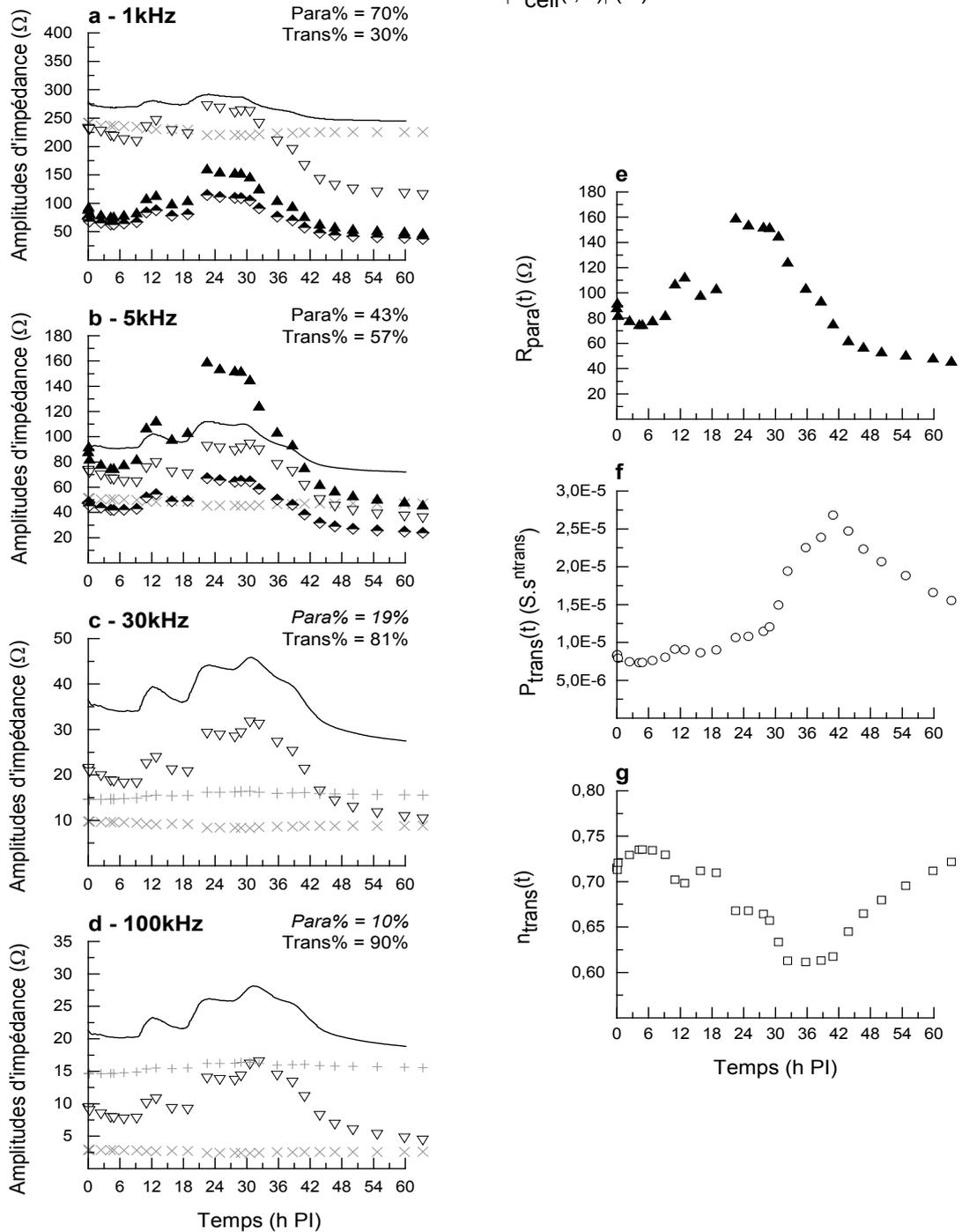


Figure C.2 : Evolutions temporelles des amplitudes d'impédance des éléments du circuit équivalent. L'évolution de chaque amplitude d'impédance est comparée à $|Z(t,\omega)|$ aux fréquences 1kHz (a), 5kHz (b), 30kHz (c) et 100kHz (d) pour l'expérience n°3 (cf. figure 5.5 pour voir l'expérience n°1 et une description exhaustive du protocole de création des graphiques).

BIBLIOGRAPHIE

A

- Abdur Rahman, A.R., Price, D.T., Bhansali, S., 2007. Effect of electrode geometry on the impedance evaluation of tissue and cell culture. *Sens. Actuators B Chem.* 127, 89–96. doi:10.1016/j.snb.2007.07.038
- Abrahamsen, M.S., Templeton, T.J., Enomoto, S., Abrahante, J.E., Zhu, G., Lancto, C.A., Deng, M., Liu, C., Widmer, G., Tzipori, S., Buck, G.A., Xu, P., Bankier, A.T., Dear, P.H., Konfortov, B.A., Spriggs, H.F., Iyer, L., Anantharaman, V., Aravind, L., Kapur, V., 2004. Complete Genome Sequence of the Apicomplexan, *Cryptosporidium parvum*. *Science* 304, 441–445. doi:10.1126/science.1094786
- Angus, K.W., Hutchison, G., Munro, H.M.C., 1985. Infectivity of a strain of *Cryptosporidium* found in the guinea-pig (*Cavia porcellus*) for guinea-pigs, mice and lambs. *J. Comp. Pathol.* 95, 151–165. doi:10.1016/0021-9975(85)90002-7
- Arndt, S., Seebach, J., Psathaki, K., Galla, H.-J., Wegener, J., 2004. Bioelectrical impedance assay to monitor changes in cell shape during apoptosis. *Biosens. Bioelectron.* 19, 583–594. doi:10.1016/S0956-5663(03)00269-0
- Arwood, M.J., 2002. *In vitro* Cultivation of *Cryptosporidium* Species. *Clin. Microbiol. Rev.* 15, 390–400. doi:10.1128/CMR.15.3.390-400.2002
- Atienza, J.M., Zhu, J., Wang, X., Xu, X., Abassi, Y., 2005. Dynamic Monitoring of Cell Adhesion and Spreading on Microelectronic Sensor Arrays. *J. Biomol. Screen.* 10, 795–805. doi:10.1177/1087057105279635

B

- Bagnaninchi, P.O., Drummond, N., 2011. Real-time label-free monitoring of adipose-derived stem cell differentiation with electric cell-substrate impedance sensing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 6462–6467. doi:10.1073/pnas.1018260108
- Baldursson, S., Karanis, P., 2011. Waterborne transmission of protozoan parasites: Review of worldwide outbreaks – An update 2004–2010. *Water Res.* 45, 6603–6614. doi:10.1016/j.watres.2011.10.013
- Barsoukov, E., Macdonald, J.R., 2005. *Impedance Spectroscopy: Theory, Experiment, and Applications*. John Wiley & Sons.
- Belosevic, M., Guy, R.A., Taghi-Kilani, R., Neumann, N.F., Gyürék, L.L., Liyanage, L.R.J., Millard, P.J., Finch, G.R., 1997. Nucleic acid stains as indicators of *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Int. J. Parasitol.* 27, 787–798. doi:10.1016/S0020-7519(97)00033-7
- Benamrouz, S., Conseil, V., Chabe, M., Praet, M., Audebert, C., Blervaque, R., Guyot, K., Gazzola, S., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Goetinck, N., Gantois, N., Osman, M., Slomianny, C., Dehennaut, V., Lefebvre, T., Viscogliosi, E., Cuvelier, C., Dei-Cas, E., Creusy, C., Certad, G., 2014. *Cryptosporidium parvum*-induced ileo-caecal adenocarcinoma and WNT signaling in a rodent model. *Dis. Model. Mech.* dmm.013292. doi:10.1242/dmm.013292
- Benamrouz, S., Guyot, K., Gazzola, S., Mouray, A., Chassat, T., Delaire, B., Chabé, M., Gosset, P., Viscogliosi, E., Dei-Cas, E., Creusy, C., Conseil, V., Certad, G., 2012. *Cryptosporidium parvum* Infection in SCID Mice Infected with Only One Oocyst: qPCR Assessment of Parasite Replication in Tissues and Development of Digestive Cancer. *PLoS ONE* 7, e51232. doi:10.1371/journal.pone.0051232
- Berthier, E., Young, E.W.K., Beebe, D., 2012. Engineers are from PDMS-land, Biologists are from Polystyrenia. *Lab. Chip* 12, 1224–1237. doi:10.1039/C2LC20982A
- Böhm, S., Timmer, B., Olthuis, W., Bergveld, P., 2000. A closed-loop controlled electrochemically actuated micro-dosing system. *J. Micromechanics Microengineering* 10, 498. doi:10.1088/0960-1317/10/4/303
- Bonazzi, M., Cossart, P., 2011. Impenetrable barriers or entry portals? The role of cell–cell adhesion during infection. *J. Cell Biol.* 195, 349–358. doi:10.1083/jcb.201106011
- Borkholder, D.A., 1998. *Cell Based Biosensors Using Microelectrodes*. Thèse de l'Université de

Stanford. Directeur : Gregory Kovacs.

Borowski, H., Clode, P.L., Thompson, R.C.A., 2008. Active invasion and/or encapsulation? A reappraisal of host-cell parasitism by *Cryptosporidium*. *Trends Parasitol.* 24, 509–516. doi:10.1016/j.pt.2008.08.002

Borowski, H., Thompson, R.C.A., Armstrong, T., Clode, P.L., 2010. Morphological characterization of *Cryptosporidium parvum* life-cycle stages in an *in vitro* model system. *Parasitology* 137, 13–26. doi:10.1017/S0031182009990837

Bouzi, M., Hunter, P.R., Chalmers, R.M., Tyler, K.M., 2013. *Cryptosporidium* Pathogenicity and Virulence. *Clin. Microbiol. Rev.* 26, 115–134. doi:10.1128/CMR.00076-12

Bridle, H., Kersaudy-Kerhoas, M., Miller, B., Gavrilidou, D., Katzer, F., Innes, E.A., Desmulliez, M.P.Y., 2012. Detection of *Cryptosporidium* in miniaturised fluidic devices. *Water Res.* 46, 1641–1661. doi:10.1016/j.watres.2012.01.010

Bukhari, Z., Marshall, M.M., Korich, D.G., Fricker, C.R., Smith, H.V., Rosen, J., Clancy, J.L., 2000. Comparison of *Cryptosporidium parvum* Viability and Infectivity Assays following Ozone Treatment of Oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 2972–2980. doi:10.1128/AEM.66.7.2972-2980.2000

Buret, A.G., Chin, A.C., Scott, K.G., 2003. Infection of human and bovine epithelial cells with *Cryptosporidium andersoni* induces apoptosis and disrupts tight junctional ZO-1: effects of epidermal growth factor. *Int. J. Parasitol.* 33, 1363–1371. doi:10.1016/S0020-7519(03)00138-3

C

Cacciò, S.M., Pozio, E., 2006. Advances in the epidemiology, diagnosis and treatment of cryptosporidiosis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 4, 429–443. doi:10.1586/14787210.4.3.429

Campbell, A.T., Robertson, L.J., Smith, H.V., 1992. Viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts: correlation of *in vitro* excystation with inclusion or exclusion of fluorogenic vital dyes. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 3488–3493.

Casadevall, A., Pirofski, L., 1999. Host-Pathogen Interactions: Redefining the Basic Concepts of Virulence and Pathogenicity. *Infect. Immun.* 67, 3703–3713.

Castellanos-Gonzalez, A., Cabada, M.M., Nichols, J., Gomez, G., White, A.C., 2013. Human Primary Intestinal Epithelial Cells as an Improved *In vitro* Model for *Cryptosporidium parvum* Infection. *Infect. Immun.* 81, 1996–2001. doi:10.1128/IAI.01131-12

Cerioti, L., Ponti, J., Broggi, F., Kob, A., Drechsler, S., Thedinga, E., Colpo, P., Sabbioni, E., Ehret, R., Rossi, F., 2007. Real-time assessment of cytotoxicity by impedance measurement on a 96-well plate. *Sens. Actuators B Chem.* 123, 769–778. doi:10.1016/j.snb.2006.10.024

Certad, G., Ngouanesavanh, T., Guyot, K., Gantois, N., Chassat, T., Mouray, A., Fleurisse, L., Pinon, A., Cailliez, J.-C., Dei-Cas, E., Creusy, C., 2007. *Cryptosporidium parvum*, a potential cause of colic adenocarcinoma. *Infect. Agent. Cancer* 2, 22. doi:10.1186/1750-9378-2-22

Chalmers, R.M., 2012. Waterborne outbreaks of cryptosporidiosis. *Ann. Dell Istituto Super. Sanità* 48, 429–446. doi:10.4415/ANN_12_04_10

Chalmers, R.M., Davies, A.P., 2010. Minireview: Clinical cryptosporidiosis. *Exp. Parasitol., Cryptosporidium and other waterborne protozoa* 124, 138–146. doi:10.1016/j.exppara.2009.02.003

Chappell, C.L., Okhuysen, P.C., Langer-Curry, R., Widmer, G., Akiyoshi, D.E., Tanriverdi, S., Tzipori, S., 2006. *Cryptosporidium hominis*: Experimental Challenge of Healthy Adults. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 75, 851–857.

Chen, F., Huang, K., Qin, S., Zhao, Y., Pan, C., 2007. Comparison of viability and infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in potassium dichromate solution and chlorinated tap water. *Vet. Parasitol.* 150, 13–17. doi:10.1016/j.vetpar.2007.09.001

Chen, X., Levine, S.A., Splinter, P.L., Tietz, P.S., Ganong, A.L., Jobin, C., Gores, G.J., Paya, C.V., LaRusso, N.F., 2001. *Cryptosporidium parvum* activates nuclear factor κ B in biliary epithelia preventing epithelial cell apoptosis. *Gastroenterology* 120, 1774–1783. doi:10.1053/gast.2001.24850

Chen, X.-M., Gores, G.J., Paya, C.V., LaRusso, N.F., 1999. *Cryptosporidium parvum* induces apoptosis in biliary epithelia by a Fas/Fas ligand-dependent mechanism. *Am. J. Physiol. - Gastrointest. Liver Physiol.* 277, G599–G608.

Choi, H.J., Kim, J., Do, K.H., Park, S.-H., Moon, Y., 2013. Prolonged NF- κ B Activation by a Macrophage Inhibitory Cytokine 1-Linked Signal in Enteropathogenic Escherichia coli-Infected Epithelial

Cells. Infect. Immun. 81, 1860–1869. doi:10.1128/IAI.00162-13

Cho, S., Becker, S., von Briesen, H., Thielecke, H., 2007. Impedance monitoring of herpes simplex virus-induced cytopathic effect in Vero cells. *Sens. Actuators B Chem.* 123, 978–982. doi:10.1016/j.snb.2006.10.061

Ciambrone, G.J., Liu, V.F., Lin, D.C., McGuinness, R.P., Leung, G.K., Pitchford, S., 2004. Cellular Dielectric Spectroscopy: A Powerful New Approach to Label-Free Cellular Analysis. *J. Biomol. Screen.* 9, 467–480. doi:10.1177/1087057104267788

Clipper Controls, 2014. Dielectric Constant Values [WWW Document]. URL <http://www.clippercontrols.com/pages/Dielectric-Constant-Values.html>

Cole, K.S., Cole, R.H., 1941. Dispersion and Absorption in Dielectrics I. Alternating Current Characteristics. *J. Chem. Phys.* 9, 341–351. doi:10.1063/1.1750906

D

De Blasio, B.F., Laane, M., Walmann, T., Giaever, I., 2004. Combining optical and electrical impedance techniques for quantitative measurement of confluence in MDCK-I cell cultures. *BioTechniques* 36, 650–654, 656, 658 passim.

De Levie, R., 1965. The influence of surface roughness of solid electrodes on electrochemical measurements. *Electrochimica Acta* 10, 113–130. doi:10.1016/0013-4686(65)87012-8

Deng, M., Rutherford, M.S., Abrahamsen, M.S., 2004. Host intestinal epithelial response to *Cryptosporidium parvum*. *Adv. Drug Deliv. Rev., Pathogen Invasion Across Intestine: Mechanisms and Potential Exploitation* 56, 869–884. doi:10.1016/j.addr.2003.10.034

DiGiorgio, C.L., Gonzalez, D.A., Huitt, C.C., 2002. *Cryptosporidium* and *Giardia* Recoveries in Natural Waters by Using Environmental Protection Agency Method 1623. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5952–5955. doi:10.1128/AEM.68.12.5952-5955.2002

Draws, J., 2000. Drug Discovery: A Historical Perspective. *Science* 287, 1960–1964. doi:10.1126/science.287.5460.1960

DuPont, H.L., Chappell, C.L., Sterling, C.R., Okhuysen, P.C., Rose, J.B., Jakubowski, W., 1995. The Infectivity of *Cryptosporidium parvum* in Healthy Volunteers. *N. Engl. J. Med.* 332, 855–859. doi:10.1056/NEJM199503303321304

E

Edberg, S.C., 2009. Does the possession of virulence factor genes mean that those genes will be active? *J. Water Health* 07, S19. doi:10.2166/wh.2009.066

Edwards, H., 2012. *The 100 Faces of Cryptosporidium Parvum*. Murdoch University.

Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, M., Schwinde, A., Stegbauer, K., Wolf, B., 1997. Monitoring of cellular behaviour by impedance measurements on interdigitated electrode structures. *Biosens. Bioelectron.* 12, 29–41. doi:10.1016/0956-5663(96)89087-7

Ekelof, S., 2001. The genesis of the Wheatstone bridge. *Eng. Sci. Educ. J.* 10, 37–40. doi:10.1049/esej:20010106

Elert, G., 2004. The Physics Hypertextbook [WWW Document]. URL <http://physics.info/electric-resistance/>

Elliott, D.A., Clark, D.P., 2000. *Cryptosporidium parvum* Induces Host Cell Actin Accumulation at the Host-Parasite Interface. *Infect. Immun.* 68, 2315–2322. doi:10.1128/IAI.68.4.2315-2322.2000

Elliott, D.A., Coleman, D.J., Lane, M.A., May, R.C., Machesky, L.M., Clark, D.P., 2001. *Cryptosporidium parvum* Infection Requires Host Cell Actin Polymerization. *Infect. Immun.* 69, 5940–5942. doi:10.1128/IAI.69.9.5940-5942.2001

F

- Fang, Y., 2006. Label-free cell-based assays with optical biosensors in drug discovery. *Assay Drug Dev. Technol.* 4, 583–595. doi:10.1089/adt.2006.4.583
- Fayer, R., 1997. *Cryptosporidium* and Cryptosporidiosis. CRC Press.
- Fayer, R., 2010. Taxonomy and species delimitation in *Cryptosporidium*. *Exp. Parasitol.* 124, 90–97. doi:10.1016/j.exppara.2009.03.005
- Fayer, R., Ellis, W., 1993. Glycoside antibiotics alone and combined with tetracyclines for prophylaxis of experimental cryptosporidiosis in neonatal BALB/c mice. *J. Parasitol.* 79, 553–558.
- Fayer, R., Trout, J.M., Jenkins, M.C., 1998. Infectivity of *Cryptosporidium parvum* oocysts stored in water at environmental temperatures. *J. Parasitol.* 84, 1165–1169.
- Fernandes, T.G., Diogo, M.M., Clark, D.S., Dordick, J.S., Cabral, J.M.S., 2009. High-throughput cellular microarray platforms: applications in drug discovery, toxicology and stem cell research. *Trends Biotechnol.* 27, 342–349. doi:10.1016/j.tibtech.2009.02.009
- Finch, G.R., Black, E.K., Gyurek, L., Belosevic, M., 1993. Ozone inactivation of *Cryptosporidium parvum* in demand-free phosphate buffer determined by *in vitro* excystation and animal infectivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4203–4210.
- Foster, K.R., Schwan, H.P., 1989. Dielectric properties of tissues and biological materials: a critical review. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* 17, 25–104.
- Fournet, N., Deege, M.P., Urbanus, A.T., Nichols, G., Rosner, B.M., Chalmers, R.M., Gorton, R., Pollock, K.G., van der Giessen, J.W., Wever, P.C., Dorigo-Zetsma, J.W., Mulder, B., Mank, T.G., Overdeest, I., Kusters, J.G., van Pelt, W., Kortbeek, L.M., 2013. Simultaneous increase of *Cryptosporidium* infections in the Netherlands, the United Kingdom and Germany in late summer season, 2012. *Euro Surveill. Bull. Eur. Sur Mal. Transm. Eur. Commun. Dis. Bull.* 18.

G

- Garvey, M., Farrell, H., Cormican, M., Rowan, N., 2010. Investigations of the relationship between use of *in vitro* cell culture-quantitative PCR and a mouse-based bioassay for evaluating critical factors affecting the disinfection performance of pulsed UV light for treating *Cryptosporidium parvum* oocysts in saline. *J. Microbiol. Methods* 80, 267–273. doi:10.1016/j.mimet.2010.01.017
- Giaever, I., Keese, C.R., 1984. Monitoring fibroblast behavior in tissue culture with an applied electric field. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 81, 3761–3764.
- Giaever, I., Keese, C.R., 1991. Micromotion of mammalian cells measured electrically. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 7896–7900.
- Giebel, K.-F., Bechinger, C., Herminghaus, S., Riedel, M., Leiderer, P., Weiland, U., Bastmeyer, M., 1999. Imaging of Cell/Substrate Contacts of Living Cells with Surface Plasmon Resonance Microscopy. *Biophys. J.* 76, 509–516. doi:10.1016/S0006-3495(99)77219-X
- Golosovsky, M., Lirtsman, V., Yashunsky, V., Davidov, D., Aroeti, B., 2009. Midinfrared surface-plasmon resonance: A novel biophysical tool for studying living cells. *J. Appl. Phys.* 105, 102036. doi:10.1063/1.3116143
- Griffiths, J.K., Moore, R., Dooley, S., Keusch, G.T., Tzipori, S., 1994. *Cryptosporidium parvum* infection of Caco-2 cell monolayers induces an apical monolayer defect, selectively increases transmonolayer permeability, and causes epithelial cell death. *Infect. Immun.* 62, 4506–4514.
- Grimnes, S., Martinsen, Ø.G., 2000. *Bioimpedance and Bioelectricity Basics*. Academic Press.
- Grover, F.W., 2004. *Inductance Calculations: Working Formulas and Tables*. Courier Dover Publications.
- Günzel, D., Zakrzewski, S.S., Schmid, T., Pangalos, M., Wiedenhoeft, J., Blasse, C., Ozboda, C., Krug, S.M., 2012. From TER to trans- and paracellular resistance: lessons from impedance spectroscopy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257, 142–151. doi:10.1111/j.1749-6632.2012.06540.x

H

Harrison, R.G., 1906. Observations on the living developing nerve fiber. *Exp. Biol. Med.* 4, 140–143. doi:10.3181/00379727-4-98

Hijjawi, N.S., Meloni, B.P., Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., 2001. Complete development and long-term maintenance of *Cryptosporidium parvum* human and cattle genotypes in cell culture. *Int. J. Parasitol.* 31, 1048–1055. doi:10.1016/S0020-7519(01)00212-0

Hikosaka, K., Satoh, M., Koyama, Y., Nakai, Y., 2005. Quantification of the infectivity of *Cryptosporidium parvum* by monitoring the oocyst discharge from SCID mice. *Vet. Parasitol.* 134, 173–176. doi:10.1016/j.vetpar.2005.06.017

Hilberg, W., 1969. From Approximations to Exact Relations for Characteristic Impedances. *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.* 17, 259–265. doi:10.1109/TMTT.1969.1126946

Homola, J., Yee, S.S., Gauglitz, G., 1999. Surface plasmon resonance sensors: review. *Sens. Actuators B Chem.* 54, 3–15. doi:10.1016/S0925-4005(98)00321-9

Hou, L., Li, X., Dunbar, L., Moeller, R., Palermo, B., Atwill, E.R., 2004. Neonatal-Mouse Infectivity of Intact *Cryptosporidium parvum* Oocysts Isolated after Optimized *In vitro* Excystation. *Appl. Environ. Microbiol.* 70, 642–646. doi:10.1128/AEM.70.1.642-646.2004

Houssin, T., 2011. BioMEMS pour l'analyse de cellules biologiques par spectroscopie d'impédance. Thèse de l'Université de Lille 1. Directeurs : Vincent Senez, Dimitri Pavlidis.

Houssin, T., Follet, J., Follet, A., Dei-Cas, E., Senez, V., 2010. Label-free analysis of water-polluting parasite by electrochemical impedance spectroscopy. *Biosens. Bioelectron.* 25, 1122–1129. doi:10.1016/j.bios.2009.09.039

Howe, K.L., Reardon, C., Wang, A., Nazli, A., McKay, D.M., 2005. Transforming Growth Factor- β Regulation of Epithelial Tight Junction Proteins Enhances Barrier Function and Blocks Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7-Induced Increased Permeability. *Am. J. Pathol.* 167, 1587–1597.

Huang, B.Q., Chen, X.-M., LaRusso, N.F., 2004. *CRYPTOSPORIDIUM PARVUM* ATTACHMENT TO AND INTERNALIZATION BY HUMAN BILIARY EPITHELIA *IN VITRO*: A MORPHOLOGIC STUDY. *J. Parasitol.* 90, 212–221. doi:10.1645/GE-3204

Huang, Y., Wang, X.B., Becker, F.F., Gascoyne, P.R., 1997. Introducing dielectrophoresis as a new force field for field-flow fractionation. *Biophys. J.* 73, 1118–1129. doi:10.1016/S0006-3495(97)78144-X

Hughes, P., Marshall, D., Reid, Y., Parkes, H., Gelber, C., 2007. The costs of using unauthenticated, over-passaged cell lines: how much more data do we need? *BioTechniques* 43, 575, 577–578, 581–582 passim.

I

Ivorra, A., Genescà, M., Sola, A., Palacios, L., Villa, R., Hotter, G., Aguiló, J., 2005. Bioimpedance dispersion width as a parameter to monitor living tissues. *Physiol. Meas.* 26, S165. doi:10.1088/0967-3334/26/2/016

J

Jenkins, M.B., Anguish, L.J., Bowman, D.D., Walker, M.J., Ghiorse, W.C., 1997. Assessment of a dye permeability assay for determination of inactivation rates of *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 3844–3850.

Jenkins, M.C., Trout, J., Abrahamsen, M.S., Lancto, C.A., Higgins, J., Fayer, R., 2000. Estimating viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts using reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) directed at mRNA encoding amyloglucosidase. *J. Microbiol. Methods* 43, 97–106. doi:10.1016/S0167-7012(00)00198-6

Jenkins, M., Trout, J., Higgins, J., Dorsch, M., Veal, D., Fayer, R., 2002. Comparison of tests for viable and infectious *Cryptosporidium parvum* oocysts. *Parasitol. Res.* 89, 1–5. doi:10.1007/s00436-002-0720-6

Johnson, A.M., Giovanni, G.D.D., Rochelle, P.A., 2012. Comparison of Assays for Sensitive and Reproducible Detection of Cell Culture-Infectious *Cryptosporidium parvum* and *Cryptosporidium hominis* in Drinking Water. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 156–162. doi:10.1128/AEM.06444-11

Jorcin, J.-B., Orazem, M.E., Pébère, N., Tribollet, B., 2006. CPE analysis by local electrochemical impedance spectroscopy. *Electrochimica Acta* 51, 1473–1479. doi:10.1016/j.electacta.2005.02.128

K

Kanazawa, K.K., Gordon, J.G., 1985. Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Anal. Chem.* 57, 1770–1771. doi:10.1021/ac00285a062

Kato, S., Bowman, D.D., 2002. Using flow cytometry to determine the viability of *Cryptosporidium parvum* oocysts extracted from spiked environmental samples in chambers. *Parasitol. Res.* 88, 326–331. doi:10.1007/s004360100504

Keegan, A.R., Fanok, S., Monis, P.T., Saint, C.P., 2003. Cell Culture-Taqman PCR Assay for Evaluation of *Cryptosporidium parvum* Disinfection. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 2505–2511. doi:10.1128/AEM.69.5.2505-2511.2003

Külerich-Pedersen, K., Poulsen, C.R., Jain, T., Rozlosnik, N., 2011. Polymer based biosensor for rapid electrochemical detection of virus infection of human cells. *Biosens. Bioelectron.* 28, 386–392. doi:10.1016/j.bios.2011.07.053

Kim, C.W., 1987. *Cryptosporidium* sp.: Experimental infection in Syrian golden hamsters. *Exp. Parasitol.* 63, 243–246. doi:10.1016/0014-4894(87)90169-X

King, B.J., Keegan, A.R., Monis, P.T., Saint, C.P., 2005. Environmental Temperature Controls *Cryptosporidium* Oocyst Metabolic Rate and Associated Retention of Infectivity. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 3848–3857. doi:10.1128/AEM.71.7.3848-3857.2005

King, B.J., Keegan, A.R., Phillips, R., Fanok, S., Monis, P.T., 2012. Dissection of the hierarchy and synergism of the bile derived signal on *Cryptosporidium parvum* excystation and infectivity. *Parasitology* 139, 1533–1546. doi:10.1017/S0031182012000984

King, B.J., Keegan, A.R., Robinson, B.S., Monis, P.T., 2011. *Cryptosporidium* cell culture infectivity assay design. *Parasitology* 138, 671–681. doi:10.1017/S0031182011000217

Knoll, W., 1998. Interfaces and Thin Films as Seen by Bound Electromagnetic Waves. *Annu. Rev. Phys. Chem.* 49, 569–638. doi:10.1146/annurev.physchem.49.1.569

Korich, D.G., Mead, J.R., Madore, M.S., Sinclair, N.A., Sterling, C.R., 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1423–1428.

Kothavade, R.J., 2012. Potential molecular tools for assessing the public health risk associated with waterborne *Cryptosporidium* oocysts. *J. Med. Microbiol.* 61, 1039–1051. doi:10.1099/jmm.0.043158-0

Kretschmann, E., 1971. Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen. *Z. Für Phys.* 241, 313–324. doi:10.1007/BF01395428

L

Laurent, F., McCole, D., Eckmann, L., Kagnoff, M.F., 1999. Pathogenesis of *Cryptosporidium parvum* infection. *Microbes Infect.* 1, 141–148. doi:10.1016/S1286-4579(99)80005-7

Laureyn, W., Nelis, D., Van Gerwen, P., Baert, K., Hermans, L., Magnée, R., Pireaux, J.-J., Maes, G., 2000. Nanoscaled interdigitated titanium electrodes for impedimetric biosensing. *Sens. Actuators B Chem.* 68, 360–370. doi:10.1016/S0925-4005(00)00489-5

LeChevallier, M.W., Giovanni, G.D.D., Clancy, J.L., Bukhari, Z., Bukhari, S., Rosen, J.S., Sobrinho, J., Frey, M.M., 2003. Comparison of Method 1623 and Cell Culture-PCR for Detection of *Cryptosporidium* spp. in Source Waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 69, 971–979. doi:10.1128/AEM.69.2.971-979.2003

Linderholm, O.P., 2006. Two-dimensional Microimpedance Imaging for Cell Culture Monitoring. Thèse de l'École Polytechnique Fédérale de Lausanne. Directeur : Philippe Renaud.

Lindsay, D.S., Hendrix, C.M., Blagburn, B.L., 1988. Experimental *Cryptosporidium parvum* Infections in Opossums (*Didelphis virginiana*). *J. Wildl. Dis.* 24, 157–159. doi:10.7589/0090-3558-24.1.157

Liu, J., Deng, M., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Rutherford, M.S., Enomoto, S., 2009. Biphasic Modulation of Apoptotic Pathways in *Cryptosporidium parvum*-Infected Human Intestinal Epithelial Cells. *Infect. Immun.* 77, 837–849. doi:10.1128/IAI.00955-08

Liu, J., Enomoto, S., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Rutherford, M.S., 2008. Inhibition of Apoptosis in *Cryptosporidium parvum*-Infected Intestinal Epithelial Cells Is Dependent on Survivin. *Infect. Immun.* 76, 3784–3792. doi:10.1128/IAI.00308-08

M

Macdonald, J.R., 1992. Impedance spectroscopy. *Ann. Biomed. Eng.* 20, 289–305. doi:10.1007/BF02368532

Mac Kenzie, W.R., Hoxie, N.J., Proctor, M.E., Gradus, M.S., Blair, K.A., Peterson, D.E., Kazmierczak, J.J., Addiss, D.G., Fox, K.R., Rose, J.B., Davis, J.P., 1994. A Massive Outbreak in Milwaukee of *Cryptosporidium* Infection Transmitted through the Public Water Supply. *N. Engl. J. Med.* 331, 161–167. doi:10.1056/NEJM199407213310304

Maia-Brigagão, C., Morgado-Díaz, J.A., De Souza, W., 2012. *Giardia* disrupts the arrangement of tight, adherens and desmosomal junction proteins of intestinal cells. *Parasitol. Int.* 61, 280–287. doi:10.1016/j.parint.2011.11.002

Maillot, C., Gargala, G., Delaunay, A., Ducrotte, P., Brasseur, P., Ballet, J.J., Favennec, L., 2000. *Cryptosporidium parvum* infection stimulates the secretion of TGF- β , IL-8 and RANTES by Caco-2 cell line. *Parasitol. Res.* 86, 947–949. doi:10.1007/PL00008524

Mamouni, J., Yang, L., 2011. Interdigitated microelectrode-based microchip for electrical impedance spectroscopic study of oral cancer cells. *Biomed. Microdevices* 13, 1075–1088. doi:10.1007/s10544-011-9577-8

Martinsen, Ø.G., Grimnes, S., Schwan, H.P., 2002. INTERFACE PHENOMENA AND DIELECTRIC PROPERTIES OF BIOLOGICAL TISSUE. *Encycl. Surf. Colloid Sci.* 20, 2643–2652.

Matula, R.A., 1979. Electrical resistivity of copper, gold, palladium, and silver. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 8, 1147–1298. doi:10.1063/1.555614

Mauzy, M.J., Enomoto, S., Lancto, C.A., Abrahamsen, M.S., Rutherford, M.S., 2012. The *Cryptosporidium Parvum* Transcriptome during *In vitro* Development. *PLoS ONE* 7, e31715. doi:10.1371/journal.pone.0031715

McAdams, E.T., Jossinet, J., 1996. Problems in equivalent circuit modelling of the electrical properties of biological tissues. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 40, 147–152. doi:10.1016/0302-4598(96)05069-6

McAdams, E.T., Jossinet, J., Lacknermeier, A., Risacher, F., 1996. Factors affecting electrode-gel-skin interface impedance in electrical impedance tomography. *Med. Biol. Eng. Comput.* 34, 397–408. doi:10.1007/BF02523842

McAdams, E.T., Lacknermeier, A., McLaughlin, J.A., Macken, D., Jossinet, J., 1995. The linear and non-linear electrical properties of the electrode-electrolyte interface. *Biosens. Bioelectron.* 10, 67–74. doi:10.1016/0956-5663(95)96795-Z

McCole, D.F., Eckmann, L., Laurent, F., Kagnoff, M.F., 2000. Intestinal Epithelial Cell Apoptosis following *Cryptosporidium parvum* Infection. *Infect. Immun.* 68, 1710–1713. doi:10.1128/IAI.68.3.1710-1713.2000

McCoy, M.H., Wang, E., 2005. 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* 130, 157–161. doi:10.1016/j.jviromet.2005.06.023

Meissner, R., Eker, B., Kasi, H., Bertsch, A., Renaud, P., 2011. Distinguishing drug-induced minor morphological changes from major cellular damage via label-free impedimetric toxicity screening. *Lab. Chip* 11, 2352–2361. doi:10.1039/C1LC20212J

Mele, R., Morales, M.A.G., Tosini, F., Pozio, E., 2003. Indinavir reduces *Cryptosporidium parvum* infection in both *in vitro* and *in vivo* models. *Int. J. Parasitol.* 33, 757–764. doi:10.1016/S0020-7519(03)00093-6

Mele, R., Morales, M.A.G., Tosini, F., Pozio, E., 2004. *Cryptosporidium parvum* at Different Developmental Stages Modulates Host Cell Apoptosis *In vitro*. *Infect. Immun.* 72, 6061–6067. doi:10.1128/IAI.72.10.6061-6067.2004

Method 1623, 2005. Method 1623: *Cryptosporidium* and *Giardia* in Water by Filtration/IMS/FA.

Environmental Protection Agency, United States.

Meyvantsson, I., Beebe, D.J., 2008. Cell Culture Models in Microfluidic Systems. *Annu. Rev. Anal. Chem.* 1, 423–449. doi:10.1146/annurev.anchem.1.031207.113042

Michaelis, S., Robelek, R., Wegener, J., 2012. Studying cell-surface interactions *in vitro*: a survey of experimental approaches and techniques. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 126, 33–66. doi:10.1007/10_2011_112

Miller, R.A., Bronsdon, M.A., Morton, W.R., 1990. Experimental Cryptosporidiosis in a Primate Model. *J. Infect. Dis.* 161, 312–315. doi:10.1093/infdis/161.2.312

Morgan, U.M., Thompson, R.C.A., 1998. PCR Detection of *Cryptosporidium*: The Way Forward? *Parasitol. Today* 14, 241–245. doi:10.1016/S0169-4758(98)01247-2

Morita, S., Namikoshi, A., Hirata, T., Oguma, K., Katayama, H., Ohgaki, S., Motoyama, N., Fujiwara, M., 2002. Efficacy of UV Irradiation in Inactivating *Cryptosporidium parvum* Oocysts. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 5387–5393. doi:10.1128/AEM.68.11.5387-5393.2002

N

Neumann, N.F., Gyürék, L.L., Finch, G.R., Belosevic, M., 2000. Intact *Cryptosporidium parvum* oocysts isolated after *in vitro* excystation are infectious to neonatal mice. *FEMS Microbiol. Lett.* 183, 331–336. doi:10.1111/j.1574-6968.2000.tb08980.x

O

O'Hara, S.P., Chen, X.-M., 2011. The cell biology of *Cryptosporidium* infection. *Microbes Infect.* 13, 721–730. doi:10.1016/j.micinf.2011.03.008

Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., 2002. *Cryptosporidium* virulence determinants – are we there yet? *Int. J. Parasitol., ASP Special* 32, 517–525. doi:10.1016/S0020-7519(01)00356-3

Okhuysen, P.C., Chappell, C.L., Crabb, J.H., Sterling, C.R., DuPont, H.L., 1999. Virulence of Three Distinct *Cryptosporidium parvum* Isolates for Healthy Adults. *J. Infect. Dis.* 180, 1275–1281. doi:10.1086/315033

Olthuis, W., Streekstra, W., Bergveld, P., 1995. Theoretical and experimental determination of cell constants of planar-interdigitated electrolyte conductivity sensors. *Sens. Actuators B Chem.* 24, 252–256.

Ona, T., Shibata, J., 2010. Advanced dynamic monitoring of cellular status using label-free and non-invasive cell-based sensing technology for the prediction of anticancer drug efficacy. *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 2505–2533. doi:10.1007/s00216-010-4223-5

P

Perryman, L.E., Jasmer, D.P., Riggs, M.W., Bohnet, S.G., McGuire, T.C., Arrowood, M.J., 1996. A cloned gene of *Cryptosporidium parvum* encodes neutralization-sensitive epitopes. *Mol. Biochem. Parasitol.* 80, 137–147. doi:10.1016/0166-6851(96)02681-3

Pethig, R., Markx, G.H., 1997. Applications of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 15, 426–432. doi:10.1016/S0167-7799(97)01096-2

Pollok, R.C.G., Farthing, M.J.G., Bajaj-Elliott, M., Sanderson, I.R., McDonald, V., 2001. Interferon gamma induces enterocyte resistance against infection by the intracellular pathogen *Cryptosporidium parvum*. *Gastroenterology* 120, 99–107. doi:10.1053/gast.2001.20907

Pomerantsev, A.L., 2005. *Progress in Chemometrics Research*. Nova Publishers.

Powell, M.J.D., 1964. An efficient method for finding the minimum of a function of several variables without calculating derivatives. *Comput. J.* 7, 155–162. doi:10.1093/comjnl/7.2.155

Putignani, L., Menichella, D., 2010. Global Distribution, Public Health and Clinical Impact of the Protozoan Pathogen *Cryptosporidium*. *Interdiscip. Perspect. Infect. Dis.* 2010, e753512. doi:10.1155/2010/753512

Q

Quintero-Betancourt, W., Peele, E.R., Rose, J.B., 2002. *Cryptosporidium parvum* and *Cyclospora cayetanensis*: a review of laboratory methods for detection of these waterborne parasites. J. Microbiol. Methods 49, 209–224. doi:10.1016/S0167-7012(02)00007-6

R

Rasmussen, K.R., Healey, M.C., 1992. Experimental *Cryptosporidium parvum* infections in immunosuppressed adult mice. Infect. Immun. 60, 1648–1652.

Redepenning, J., Schlesinger, T.K., Mechalke, E.J., Puleo, D.A., Bizios, R., 1993. Osteoblast attachment monitored with a quartz crystal microbalance. Anal. Chem. 65, 3378–3381. doi:10.1021/ac00071a008

Robelek, R., 2009. Surface plasmon resonance sensors in cell biology: basics and application. Bioanal. Rev. 1, 57–72. doi:10.1007/s12566-009-0005-y

Robelek, R., Wegener, J., 2010. Label-free and time-resolved measurements of cell volume changes by surface plasmon resonance (SPR) spectroscopy. Biosens. Bioelectron. 25, 1221–1224. doi:10.1016/j.bios.2009.09.016

Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V., 1993. *In vitro* excystation of *Cryptosporidium parvum*. Parasitology 106 (Pt 1), 13–19.

Robertson, L.J., Campbell, A.T., Smith, H.V., 1998. Viability of *Cryptosporidium parvum* Oocysts: Assessment by the Dye Permeability Assay. Appl. Environ. Microbiol. 64, 3544–3545.

Robertson, L.J., Gjerde, B.K., 2007. *Cryptosporidium* oocysts: challenging adversaries? Trends Parasitol. 23, 344–347. doi:10.1016/j.pt.2007.06.002

Roche, J.K., Martins, C.A.P., Cosme, R., Fayer, R., Guerrant, R.L., 2000. Transforming Growth Factor β 1 Ameliorates Intestinal Epithelial Barrier Disruption by *Cryptosporidium parvum* *In vitro* in the Absence of Mucosal T Lymphocytes. Infect. Immun. 68, 5635–5644. doi:10.1128/IAI.68.10.5635-5644.2000

Rochelle, P.A., Ferguson, D.M., Handojo, T.J., Leon, R.D., Stewart, M.H., Wolfe, R.L., 1997. An assay combining cell culture with reverse transcriptase PCR to detect and determine the infectivity of waterborne *Cryptosporidium parvum*. Appl. Environ. Microbiol. 63, 2029–2037.

Rochelle, P.A., Ferguson, D.M., Johnson, A.M., De Leon, R., 2001. Quantitation of *Cryptosporidium parvum* infection in cell culture using a colorimetric *in situ* hybridization assay. J. Eukaryot. Microbiol. 48, 565–574.

Rochelle, P.A., Marshall, M.M., Mead, J.R., Johnson, A.M., Korich, D.G., Rosen, J.S., Leon, R.D., 2002. Comparison of *In vitro* Cell Culture and a Mouse Assay for Measuring Infectivity of *Cryptosporidium parvum*. Appl. Environ. Microbiol. 68, 3809–3817. doi:10.1128/AEM.68.8.3809-3817.2002

Rodahl, M., Höök, F., Fredriksson, C., Keller, C.A., Krozer, A., Brzezinski, P., Voinova, M., Kasemo, B., 1997. Simultaneous frequency and dissipation factor QCM measurements of biomolecular adsorption and cell adhesion. Faraday Discuss. 107, 229–246. doi:10.1039/A703137H

S

Sauerbrey, G., 1959. Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. Z. Für Phys. 155, 206–222. doi:10.1007/BF01337937

Sayes, C.M., Reed, K.L., Warheit, D.B., 2007. Assessing Toxicity of Fine and Nanoparticles: Comparing *In vitro* Measurements to In Vivo Pulmonary Toxicity Profiles. Toxicol. Sci. 97, 163–180. doi:10.1093/toxsci/kfm018

Scheider, W., 1975. Theory of the frequency dispersion of electrode polarization. Topology of networks with fractional power frequency dependence. J. Phys. Chem. 79, 127–136. doi:10.1021/j100569a008

Schets, F.M., Engels, G.B., During, M., Husman, A.M. de R., 2005. Detection of Infectious *Cryptosporidium* Oocysts by Cell Culture Immunofluorescence Assay: Applicability to Environmental Samples. Appl. Environ. Microbiol. 71, 6793–6798. doi:10.1128/AEM.71.11.6793-6798.2005

Schwan, H.P., 1985. Analysis of Dielectric Data: Experience Gained with Biological Materials. IEEE Trans. Electr. Insul. EI-20, 913–922. doi:10.1109/TEI.1985.348727

Searcy, K.E., Packman, A.I., Atwill, E.R., Harter, T., 2005. Association of *Cryptosporidium parvum* with Suspended Particles: Impact on Oocyst Sedimentation. Appl. Environ. Microbiol. 71, 1072–1078. doi:10.1128/AEM.71.2.1072-1078.2005

Slifko, T.R., Friedman, D., Rose, J.B., Jakubowski, W., 1997. An *in vitro* method for detecting infectious *Cryptosporidium* oocysts with cell culture. Appl. Environ. Microbiol. 63, 3669–3675.

Slifko, T.R., Huffman, D.E., Dussert, B., Owens, J.H., Jakubowski, W., Haas, C.N., Rose, J.B., 2002. Comparison of tissue culture and animal models for assessment of *Cryptosporidium parvum* infection. Exp. Parasitol. 101, 97–106. doi:10.1016/S0014-4894(02)00100-5

Smith, H.V., Nichols, R.A.B., Grimason, A.M., 2005. *Cryptosporidium* excystation and invasion: getting to the guts of the matter. Trends Parasitol. 21, 133–142. doi:10.1016/j.pt.2005.01.007

Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B., Zheng, W., 2004. Application of Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) Technology to Cell-Based Assays. ASSAY Drug Dev. Technol. 2, 363–372. doi:10.1089/adt.2004.2.363

Spegel, C., Heiskanen, A., Skjolding, L.H.D., Emnéus, J., 2008. Chip Based Electroanalytical Systems for Cell Analysis. Electroanalysis 20, 680–702. doi:10.1002/elan.200704130

Stein, P.L., 2000. The Great Sydney Water Crisis of 1998. Water. Air. Soil Pollut. 123, 419–436. doi:10.1023/A:1005255202854

Steyer, J.A., Almers, W., 2001. A real-time view of life within 100 nm of the plasma membrane. Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 268–275. doi:10.1038/35067069

Suzuki, T., 2013. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions. Cell. Mol. Life Sci. 70, 631–659. doi:10.1007/s00018-012-1070-x

T

Tsong, T.Y., 1991. Electroporation of cell membranes. Biophys. J. 60, 297–306. doi:10.1016/S0006-3495(91)82054-9

Tyzzer, E.E., 1907. A sporozoan found in the peptic glands of the common mouse. Exp. Biol. Med. 5, 12–13. doi:10.3181/00379727-5-5

Tzipori, S., Angus, K.W., Campbell, I., Gray, E.W., 1982. Experimental infection of lambs with *Cryptosporidium* isolated from a human patient with diarrhoea. Gut 23, 71–74.

Tzipori, S., McCartney, E., Lawson, G.H., Rowland, A.C., Campbell, I., 1981. Experimental infection of piglets with *Cryptosporidium*. Res. Vet. Sci. 31, 358–368.

U

Upton, S.J., Current, W.L., 1985. The Species of *Cryptosporidium* (Apicomplexa: Cryptosporidiidae) Infecting Mammals. J. Parasitol. 71, 625. doi:10.2307/3281435

Upton, S.J., Tilley, M., Brillhart, D.B., 1994. Comparative development of *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa) in 11 continuous host cell lines. FEMS Microbiol. Lett. 118, 233–236. doi:10.1111/j.1574-6968.1994.tb06833.x

Upton, S.J., Tilley, M., Brillhart, D.B., 1995. Effects of select medium supplements on *in vitro* development of *Cryptosporidium parvum* in HCT-8 cells. J. Clin. Microbiol. 33, 371–375.

Ussing, H.H., Zerahn, K., 1951. Active Transport of Sodium as the Source of Electric Current in the Short-circuited Isolated Frog Skin. Acta Physiol. Scand. 23, 110–127. doi:10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x

V

Van Driessche, W., De Smet, P., Raskin, G., 1993. An automatic monitoring system for epithelial cell height. Pflüg. Arch. Eur. J. Physiol. 425, 164–171.

- Van Gerwen, P., Laureyn, W., Laureys, W., Huyberegts, G., Op De Beeck, M., Baert, K., Suls, J., Sansen, W., Jacobs, P., Hermans, L., Mertens, R., 1998. Nanoscaled interdigitated electrode arrays for biochemical sensors. *Sens. Actuators B Chem.* 49, 73–80. doi:10.1016/S0925-4005(98)00128-2
- Varshney, M., Li, Y., 2009. Interdigitated array microelectrodes based impedance biosensors for detection of bacterial cells. *Biosens. Bioelectron.* 24, 2951–2960. doi:10.1016/j.bios.2008.10.001
- Velve-Casquillas, G., Le Berre, M., Piel, M., Tran, P.T., 2010. Microfluidic tools for cell biological research. *Nano Today* 5, 28–47. doi:10.1016/j.nantod.2009.12.001
- Vesey, G., Ashbolt, N., Fricker, E. j., Deere, D., Williams, K. l., Veal, D. a., Dorsch, M., 1998. The use of a ribosomal RNA targeted oligonucleotide probe for fluorescent labelling of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts. *J. Appl. Microbiol.* 85, 429–440. doi:10.1046/j.1365-2672.1998.853496.x

W

- Wagner-Wiening, C., Kimmig, P., 1995. Detection of viable *Cryptosporidium parvum* oocysts by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61, 4514–4516.
- Walter, E., Kissel, T., 1995. Heterogeneity in the human intestinal cell line Caco-2 leads to differences in transepithelial transport. *Eur. J. Pharm. Sci.* 3, 215–230. doi:10.1016/0928-0987(95)00010-B
- Wang, L., Zhu, J., Deng, C., Xing, W., Cheng, J., 2008. An automatic and quantitative on-chip cell migration assay using self-assembled monolayers combined with real-time cellular impedance sensing. *Lab Chip* 8, 872–878. doi:10.1039/B804130J
- Warren, C.A., Destura, R.V., Sevilleja, J.E.A.D., Barroso, L.F., Carvalho, H., Barrett, L.J., O'Brien, A.D., Guerrant, R.L., 2008. Detection of Epithelial-Cell Injury, and Quantification of Infection, in the HCT-8 Organoid Model of Cryptosporidiosis. *J. Infect. Dis.* 198, 143–149. doi:10.1086/588819
- Waters, W.R., Reinhardt, T.A., Harp, J.A., 1997. Oral administration of putrescine inhibits *Cryptosporidium parvum* infection of neonatal C57BL-6 mice and is independent of nitric oxide synthesis. *J. Parasitol.* 83, 746–750.
- Wegener, J., Janshoff, A., Galla, H.-J., 1998. Cell adhesion monitoring using a quartz crystal microbalance: comparative analysis of different mammalian cell lines. *Eur. Biophys. J.* 28, 26–37. doi:10.1007/s002490050180
- Wegener, J., Keese, C.R., Giaever, I., 2000a. Electric Cell–Substrate Impedance Sensing (ECIS) as a Noninvasive Means to Monitor the Kinetics of Cell Spreading to Artificial Surfaces. *Exp. Cell Res.* 259, 158–166. doi:10.1006/excr.2000.4919
- Wegener, J., Seebach, J., Janshoff, A., Galla, H.-J., 2000b. Analysis of the Composite Response of Shear Wave Resonators to the Attachment of Mammalian Cells. *Biophys. J.* 78, 2821–2833. doi:10.1016/S0006-3495(00)76825-1
- Wegener, J., Sieber, M., Galla, H.-J., 1996. Impedance analysis of epithelial and endothelial cell monolayers cultured on gold surfaces. *J. Biochem. Biophys. Methods* 32, 151–170. doi:10.1016/0165-022X(96)00005-X
- Wetzel, D.M., Schmidt, J., Kuhlenschmidt, M.S., Dubey, J.P., Sibley, L.D., 2005. Gliding Motility Leads to Active Cellular Invasion by *Cryptosporidium parvum* Sporozoites. *Infect. Immun.* 73, 5379–5387. doi:10.1128/IAI.73.9.5379-5387.2005
- WHO | Guidelines for drinking-water quality, fourth edition [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/2011/dwq_guidelines/en/ (accessed 5.28.14).
- WHO | Risk assessment of *Cryptosporidium* in drinking water [WWW Document], n.d. . WHO. URL http://www.who.int/water_sanitation_health/publications/cryptoRA/en/ (accessed 5.28.14).
- Widmer, G., Corey, E.A., Stein, B., Griffiths, J.K., Tzipori, S., 2000. Host cell apoptosis impairs *Cryptosporidium parvum* development *in vitro*. *J. Parasitol.* 86, 922–928. doi:10.1645/0022-3395(2000)086[0922:HCAICP]2.0.CO;2
- Wienkers, L.C., Heath, T.G., 2005. Predicting *in vivo* drug interactions from *in vitro* drug discovery data. *Nat. Rev. Drug Discov.* 4, 825–833. doi:10.1038/nrd1851
- Woodmansee, D.B., Pohlenz, J.F.L., 1984. Development of *Cryptosporidium* sp. in a human rectal tumor cell line. *Proc. Fourth Int. Symp. Neonatal Diarrhea* 306–317.

X

Xiaoqiu Huang, Duc Nguyen, Greve, D.W., Domach, M.M., 2004. Simulation of microelectrode impedance changes due to cell growth. *IEEE Sens. J.* 4, 576–583. doi:10.1109/JSEN.2004.831302

Xu, P., Widmer, G., Wang, Y., Ozaki, L.S., Alves, J.M., Serrano, M.G., Puiu, D., Manque, P., Akiyoshi, D., Mackey, A.J., Pearson, W.R., Dear, P.H., Bankier, A.T., Peterson, D.L., Abrahamsen, M.S., Kapur, V., Tzipori, S., Buck, G.A., 2004. The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 431, 1107–1112. doi:10.1038/nature02977

Y

Yanase, Y., Suzuki, H., Tsutsui, T., Hiragun, T., Kameyoshi, Y., Hide, M., 2007a. The SPR signal in living cells reflects changes other than the area of adhesion and the formation of cell constructions. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1081–1086. doi:10.1016/j.bios.2006.03.011

Yanase, Y., Suzuki, H., Tsutsui, T., Uechi, I., Hiragun, T., Mihara, S., Hide, M., 2007b. Living cell positioning on the surface of gold film for SPR analysis. *Biosens. Bioelectron.* 23, 562–567. doi:10.1016/j.bios.2007.07.005

Yang, M., Thompson, M., 1993. Multiple chemical information from the thickness shear mode acoustic wave sensor in the liquid phase. *Anal. Chem.* 65, 1158–1168. doi:10.1021/ac00057a010

Yang, S., Benson, S.K., Du, C., Healey, M.C., 2000. Infection of Immunosuppressed C57BL/6N Adult Mice with a Single Oocyst of *Cryptosporidium parvum*. *J. Parasitol.* 86, 884–887. doi:10.1645/0022-3395(2000)086[0884:IOICAM]2.0.CO;2

Yarmush, M.L., King, K.R., 2009. Living-Cell Microarrays. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 11, 235–257. doi:10.1146/annurev.bioeng.10.061807.160502

Yu, H., Cook, T.J., Sinko, P.J., 1997. Evidence for diminished functional expression of intestinal transporters in Caco-2 cell monolayers at high passages. *Pharm. Res.* 14, 757–762.