

Ultramicroélectrodes : leurs propriétés fondamentales et leur utilisation comme synapses semi-artificielles

Christian Amatore

Les ultramicroélectrodes font l'objet de nombreuses applications depuis leur invention voici une quinzaine d'années. Il existe dans la bibliographie un certain nombre d'excellentes revues et un ouvrage entier [1-3] sur le sujet. Dans le cadre de cette revue, l'accent est mis sur certaines applications biologiques des ultramicroélectrodes qui impliquent leur emploi dans des montages que nous avons baptisé « synapses semi-artificielles » du fait de leur identité très marquée, tant du point de vue conceptuel que fonctionnel, avec les synapses neurales. Néanmoins, la présentation de ces aspects nécessite d'exposer au préalable les grandes propriétés des ultramicroélectrodes.

1. Les ultramicroélectrodes ? Ce qu'elles sont et ce à quoi elles servent

Dans le cadre de cet article, le vocable ultramicroélectrode recouvre l'ensemble des électrodes dont une dimension au moins est micrométrique ou inférieure. Néanmoins, et bien qu'il s'agisse d'une définition commode, ce n'est pas là une bonne définition. Leurs formes les plus usitées sont représentées sur la *Figure 1*. Elles sont choisies dans la mesure où elles permettent une construction manuelle relativement aisée. Des formes plus complexes, où plusieurs ultramicroélectrodes interagissent en réseau, peuvent être réalisées par des techniques de lithographie [4] ou de peinture employant des encres conductrices [5].

Les ultramicroélectrodes possèdent un certain nombre de caractéristiques importantes qui découlent toutes de leur petite taille. Cependant, de notre point de vue, il en est certaines qui correspondent réellement à leur faible taille géométrique, et d'autres qui correspondent à des propriétés électrochimiques spécifiques qui ne découlent qu'indirectement de ces petites tailles. Le premier point semble assez évident, puisqu'il s'agit d'un problème de résolution spatiale: une taille donnée permet d'espérer explorer des domaines de taille comparables. Le deuxième point nécessite pour être compris de faire un rapide exposé préalable des difficultés intrinsèques de l'électrochimie.

Toute technique électrochimique requiert un contrôle précis du potentiel de l'électrode par rapport à la solution étudiée, soit au niveau de son application soit à celui de sa mesure. Cependant, dans les techniques faradiques, un courant passe nécessairement à travers la solution ce qui

Les figures sont publiées avec l'autorisation de l'Académie des Sciences (C.R. Acad. Sci. Paris, t. 323, série II b, p. 757-771, 1996. Electrochimie et photochimie).

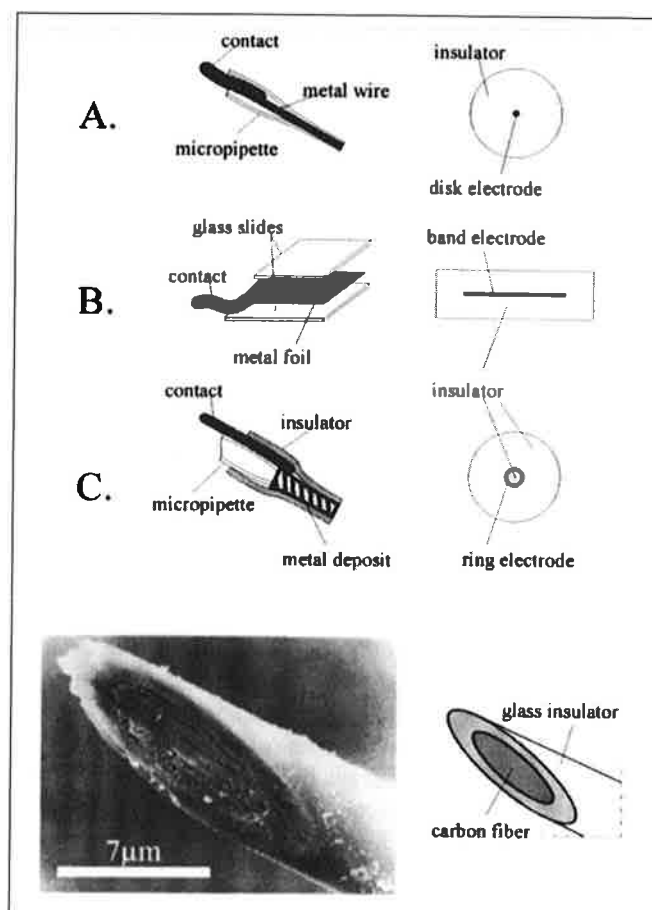


Figure 1 - Représentation schématique des différentes formes d'ultramicroélectrodes et de leur technique de fabrication (haut). Photographie de la pointe d'une électrode disque biseautée utilisée pour des expériences sur cellule unique (bas).

implique une perte par chute ohmique du fait de la résistance R_{soln} de la solution [6]. De même l'interface électrode / solution présente une capacité, C_{el} [6], qui a deux conséquences. D'une part, c'est par le biais de cette capacité que s'introduit le bruit ($N \propto C_{\text{el}}$) des mesures électrochimiques. D'autre part, jointe à la résistance de la solution, cette capacité constitue un filtre série dont la constante de temps $t = R_{\text{soln}} C_{\text{el}}$, limite la vitesse de variation du potentiel de l'électrode. La capacité d'une électrode constituée par un petit disque de rayon r° , vaut $C_{\text{el}} \approx 2p \pi^{\circ 2} C_d$, où C_d dépend de la solution et du matériau d'électrode mais pas de sa taille [6]. La résistance de la solution vaut $R_{\text{soln}} \approx r/(4\pi r^\circ)$ où r est la résistivité de la solution. Il en résulte que $t \propto r^\circ$; cela montre que plus l'électrode est petite plus des signaux rapides pourront lui être appliqués [2,7]. En régime transitoire, le courant i est proportionnel à la surface de l'inter-

face, c'est-à-dire à $r^{0.2}$ [6]. La chute ohmique, iR_{soln} , est alors aussi proportionnelle à r^0 , ce qui montre qu'une fraction plus importante du potentiel global est effectivement utilisable électrochimiquement, lorsque la taille de l'électrode est plus petite. En régime stationnaire le courant devient proportionnel au périmètre de l'électrode, de sorte que la chute ohmique devient indépendante de la taille de l'électrode. Enfin, le rapport signal faradique sur bruit, S/N , est proportionnel au rapport courant sur capacité de l'interface. En régime transitoire le rapport signal / bruit est donc indépendant de la taille de l'électrode, tandis qu'il varie inversement avec celle-ci ($S/N \propto 1/r^0$) en régime stationnaire. Il en découle que trois grandes classes d'électrodes peuvent être définies sur ces bases.

Compte tenu de ce qui précède, et pour des conditions électrochimiques usuelles, la classe des ultramicroélectrodes semble devoir correspondre à des dimensions de l'ordre du micromètre ou inférieures. Cependant il faut souligner que les raisonnements précédents ne sont valides que pour des électrodes dont la taille reste très grande par rapport aux tailles moléculaires. En effet, lorsque l'électrode approche les tailles angströmiques (pointe d'un STM par exemple) d'autres phénomènes sont à considérer. Par exemple sa capacité devient proportionnelle à son rayon et non plus à sa surface. De même la taille de l'électrode devient comparable aux distances sur lesquelles les électrons peuvent être transférés par effet tunnel, ce qui rend caduque toute notion de couche de diffusion. Les propriétés de ces objets électrochimiques qui font le pont entre l'électrochimie classique et la microscopie par effet tunnel restent encore à explorer et à comprendre [8]. Néanmoins, leur existence limite donc la notion d'ultramicroélectrodes à la gamme des nanomètres.

L'ensemble des propriétés précédentes a ouvert des champs d'applications entièrement nouvelles aux techniques électrochimiques en brisant ses limites technologiques traditionnelles. On peut par exemple citer l'extension des études cinétiques jusque dans la gamme des nanosecondes [7], l'étude de solutions très concentrées [9], voire non diluées, ou de milieux hautement résistifs (alcanes, gels, polymères, etc.) [10,11]. Cependant, aussi extraordinaires qu'elles puissent être, de notre point de vue, ces applications ne recouvrent qu'une extension du domaine « classique » de l'électrochimie [8]. Dans la suite sont montrées des applications entièrement nouvelles.

2. Synapses semi-artificielles

D'un point de vue physico-chimique, une synapse permet de résoudre un certain nombre de difficultés liées à la transmission d'une information moléculaire entre deux cellules, et en particulier celui du rapport signal / bruit. En effet, la spécificité et la fiabilité d'une communication intercellulaire demande une reconnaissance de l'information cellulaire avec un grand rapport signal / bruit. Ceci semble a priori contradictoire avec le nombre extrêmement faible de molécules émises (quelques femto- voire attomoles généralement). Cependant si ces quantités sont émises dans un volume très restreint, elles correspondent à des concentrations

suffisamment importantes pour permettre une détection précise du message cellulaire. C'est ce principe que nous avons adapté pour la détection de signaux chimiques émis par une cellule vivante. En effet en remplaçant la cellule réceptrice par une ultramicroélectrode de taille comparable séparée de la cellule émettrice par un film de solution de quelques femtolitres (Fig. 2), on reconstitue une synapse semi-artificielle capable de détecter sélectivement toute molécule électroactive émise par la cellule étudiée, et ce même pour des quantités émises trop réduites pour être détectables par des techniques physico-chimiques classiques. Deux exemples sont présentés ici afin de démontrer l'intérêt de tels dispositifs.

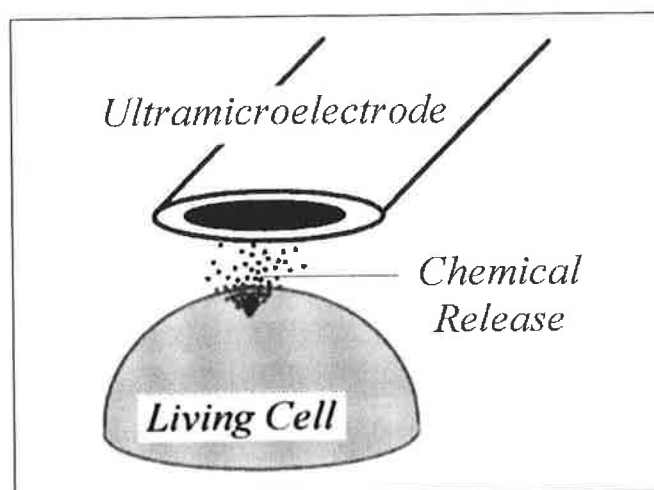


Figure 2 - Principe d'une synapse semi-artificielle. La cellule vivante adhère au fond d'une boîte de Pétri tandis que l'ultramicroélectrode est disposée au-dessus de la cellule grâce à un micromanipulateur.

Le premier concerne l'étude d'un phénomène de stress oxydatif, un mécanisme par lequel les cellules sont supposées pouvoir se défendre contre une agression commise par d'autres cellules, bactéries ou virus ou éventuellement attaquer d'autres cellules (macrophages par exemple). Ce mécanisme était connu par ses conséquences métaboliques, entre autres la peroxydation des bilipides membranaires, mais son origine et sa cinétique restaient inconnues [12-14,15,16]. L'utilisation d'une microélectrode placée dans la configuration de la Figure 2 a permis de mesurer pour la première fois en temps réel une réponse de stress oxydatif (Fig. 3, haut) et de montrer qu'elle correspondait à l'émission de quantités importantes (quelques dizaines de femtomoles) de peroxyde d'hydrogène [17]. L'extraordinaire rapidité de cette réponse (moins de 100 ms), le fait qu'elle soit couplée à une augmentation concomitante de la respiration cellulaire (Fig. 3, bas) [17] suggèrent que ce phénomène a pour origine une enzyme membranaire du type NADPH-oxydase.

Le deuxième exemple est relatif à l'exocytose de neurotransmetteurs. Les études biologiques antérieures ont montré que les neurotransmetteurs sont contenus à l'intérieur de la cellule émettrice dans des petites vésicules qui vont fusionner avec la paroi cellulaire pour délivrer leur contenu dans l'espace extracellulaire (exocytose) dès l'arrivée de l'influx nerveux propagé le long de la membrane de l'axone depuis le corps cellulaire. Cela est schématisé pour une synapse neurale sur la Figure 4. Des études réalisées par Neher à partir

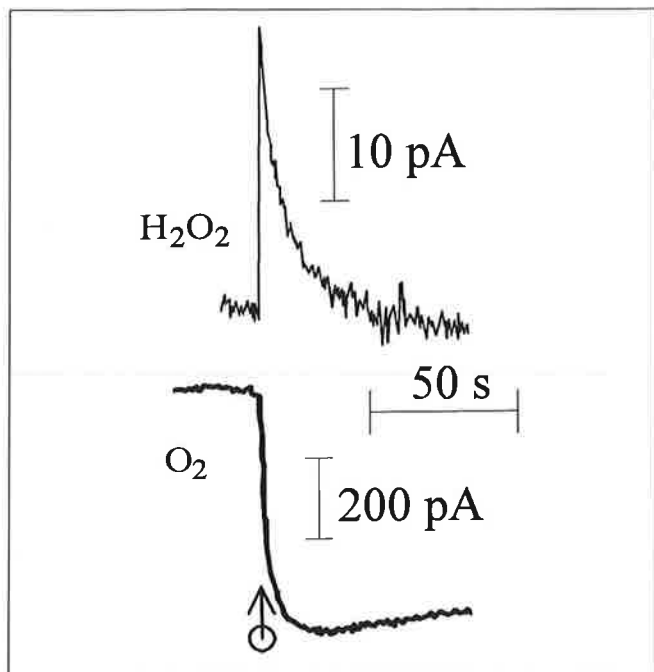


Figure 3 - Observation de la réponse de stress oxydatif émise par un fibroblaste humain. La réponse cellulaire est stimulée en perçant la membrane avec la pointe d'un micropipette. Variation du flux de peroxyde d'hydrogène (haut), variation de la concentration du dioxygène au-dessus de la cellule (bas).

d'expériences dites de « patch-clamp » sur des cellules chromaffines des capsules surrénales et des mastocytes ont permis de préciser la mécanique membranaire de l'exocytose d'adrénaline par ces cellules [19, 20]. Grâce à ces travaux, on pouvait décomposer le processus en deux étapes distinctes: création initiale d'un pore transmembranaire d'une dizaine d'angströms de diamètre à travers les deux membranes (cellulaire et vésiculaire) [19, 20d,e], généralement suivie d'une

phase rapide impliquant la fusion complète des deux membranes par intégration de la membrane vésiculaire dans la membrane cellulaire [19, 20d,e]. L'utilisation d'une ultramicroélectrode placée dans la configuration de la Figure 2, mais quasiment au contact de la paroi de la cellule chromaffine, permet de préciser ce modèle dans la mesure où une électrode faradique peut détecter en temps réel l'émission d'adrénaline [19d,e, 21-23] et ne se limite pas à observer les variations de surface membranaire comme le fait la technique du « patch-clamp ». La Figure 4 résume les résultats obtenus [23]. Lorsque la cellule est stimulée elle produit une série stochastique de « bouffées » d'adrénaline se traduisant par l'observation d'une série de pics de courant liés à l'oxydation de l'adrénaline à la surface de l'électrode (Fig. 4a). Chacun de ces pics est constitué par une montée rapide du signal suivie par une décroissance lente (Fig. 4b). Bien que la taille (intensité et durée) des pics soit variable, leur intégrale (c'est-à-dire le nombre de molécules détectées) est relativement constante et correspond à deux à trois millions de molécules d'adrénaline, c'est-à-dire précisément au contenu estimé d'une seule vésicule. En outre, 20 à 30% des pics sont précédés par un plateau constant de faible intensité (Fig. 4b) attribué à une émission à flux constant par le pore trans-membranaire dont l'existence avait été démontrée par Neher et son école. L'analyse des paramètres physico-chimiques décrivant la forme des pics permet de proposer le mécanisme représenté sur les Figures 4c et 4d [23].

Conclusion

Dans le cadre de cet article synthétique, nous avons tenté d'expliquer en quoi les ultramicroélectrodes ont permis de briser la plupart des contraintes technologiques dans les-

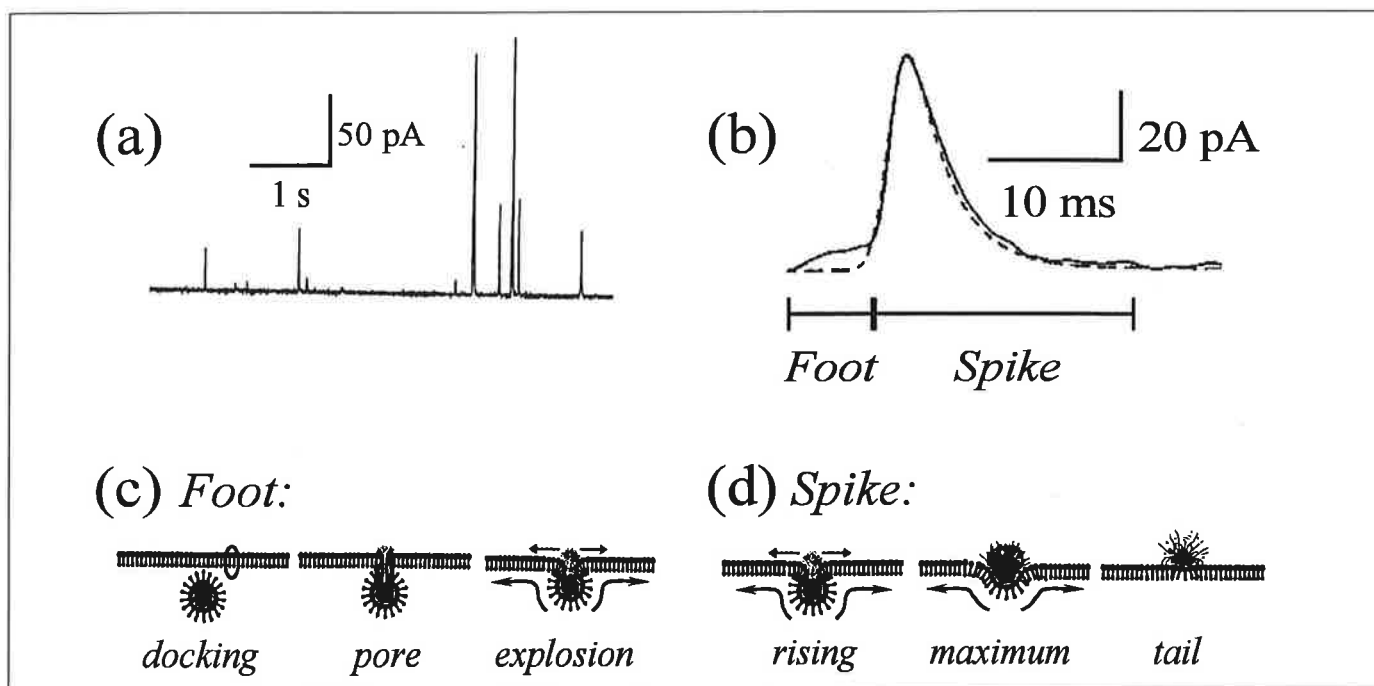


Figure 4 - Détection de l'émission vésiculaire d'adrénaline par des cellules chromaffines de capsules surrénales stimulées par des ions Ba^{2+} . L'électrode est au contact immédiat de la membrane cellulaire ; a : série de pics de courant, b : agrandissement de l'un des pics de courant (trait plein) superposé aux variations prédites (trait tireté) par le modèle décrit dans le texte et schématisé en c et d.

quelles était enfermée l'électrochimie. Nous avons aussi tenté de démontrer que ces objets constituaient réellement une classe d'électrodes à part et n'étaient pas seulement des électrodes encore plus petites que les autres comme leur étymologie (ulter-micron-electron-hodos, soit des passages à électrons encore plus petits que les autres) peut le laisser penser. Nous avons aussi voulu montrer que leurs petites tailles en faisaient des capteurs de variations localisées de concentration, permettant de détecter des quantités infinitésimales de molécules électroactives, et partant d'observer des processus fondamentaux de la biologie cellulaire. Nous croyons qu'il s'agit là de l'une des caractéristiques essentielles de ces nouveaux objets.

Références

- [1] Wightman R. M. and Wipf D. O., **1989**, Vol. 15, Chap. 3, pp. 267-353 in *Electroanalytical Chemistry*, Bard A. J. Ed., Marcel Dekker, New York.
- [2] Montenegro M. I., Queiros M.A. and Daschbach J. L. Eds., **1991**, *Microelectrodes: Theory and Applications*, NATO ASI Series, Kluwer Academic Publisher, Dordrecht.
- [3] Amatore C., **1995**, Electrochemistry at Ultramicroelectrodes, pp. 131-208 in *Physical Electrochemistry*, Rubinstein I. Ed., Marcel Dekker, New York.
- [4] Bard A. J., Crayston J. A., Kittlesen G. P., Varco Shea T. and Wrighton M. S., *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 2321.
- [5] (a) Shanks I. A., Smith A. M. and Nylander C. I., **1986**, European Patent EP0170375A2 (Unilever); (b) Sheddon, B. J., Girault H. H. and Eddowes M. J., *J. Electroanal. Chem.*, **1989**, *266*, 227.
- [6] Bard A. J. and Faulkner L. R., **1980**, *Electrochemical Methods*, Wiley, New York.
- [7] (a) Howell J. O. and Wightman R. M., *Anal. Chem.*, **1984**, *56*, 524. (b) Amatore C., Jutand A. and Pflüger F., *J. Electroanal. Chem.*, **1987**, *218*, 361. (c) Andrieux C. P., Hapiot P. and Savéant J. M., *J. Phys. Chem.*, **1988**, *92*, 5987, p. 5992. (d) Bowyer W. J., Engelman E. E. and Evans D. H., *J. Electroanal. Chem.*, **1989**, *262*, 67. (e) Amatore C. and Lefrou C., *J. Electroanal. Chem.*, **1992**, *324*, 33.
- [8] Norton J. D., White H. S. and Feldberg S. W., *J. Phys. Chem.*, **1990**, *94*, 6772.
- [9] (a) Malmstan R. A., Smith C. P. and White H. S., *J. Electroanal. Chem.*, **1986**, *215*, 223; (b) Montenegro M. I. and Pletcher D., *J. Electroanal. Chem.*, **1988**, *248*, 229.
- [10] (a) Deakin M. R., Wightman R. M. and Amatore C. A., *J. Electroanal. Chem.*, **1987**, *225*, 49; (b) Amatore C., Fosset B., Bartelt J., Deakin M. R. and Wightman R. M., *J. Electroanal. Chem.*, **1988**, *256*, 255; (c) Oldham K. B., *J. Electroanal. Chem.*, **1988**, *250*, 1; (d) Cooper J. B. and Bond A. M., *J. Electroanal. Chem.*, **1991**, *315*, 143; (e) Norton J. D., Benson W. E., White H. S., Pendley B. D. and Abruna H. D., *Anal. Chem.*, **1991**, *63*, 1909; (f) Norton J. D. and White H. S., *J. Electroanal. Chem.*, **1992**, *325*, 341; (g) Myland J. C. and Oldham K. B., *J. Electroanal. Chem.*, **1993**, *347*, 49; (h) Amatore C., Bento M. F. and Montenegro M. I., *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 2800.
- [11] (a) Bond A. M., Fleischmann M. and Robinson J., *J. Electroanal. Chem.*, **1984**, *180*, 257; (b) Howell J. O. and Wightman R. M., *J. Phys. Chem.*, **1984**, *88*, 3915; (c) Geng L., Ewing A.G., Jernigan J. C. and Murray R. W., *Anal. Chem.*, **1986**, *58*, 852; (d) Geng L. and Murray R. W., *Inorg. Chem.*, **1986**, *25*, 3115; (e) Parcher J. F., Barbour C.J. and Murray R. W., *Anal. Chem.*, **1989**, *61*, 584; (f) Amatore C. and Pflüger F., *Organometallics*, **1990**, *9*, 2276.
- [12] Halliwell B., Gutteridge J. M. C., **1989**, *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford.
- [13] (a) Chance B., **1991**, Vol. 15, Chap. 3, pp. 267-353 in *Annual Review of Biophysics and Biophysical Chemistry*, Engleman D. Ed., Annual Reviews, Palo Alto; (b) Sies H., **1982**, *Metabolic Compartmentation*, Academic Press, New York; (c) Denk W., Strickler J. H. and Webb W. W., *Science*, **1990**, *248*, 73; (d) Cerutti P. A., *Science*, **1985**, *227*, 375; (e) Vuillaume M., *Mutat. Res.*, **1987**, *189*, 43; (f) Scandalios J. S., Ed., **1992**, *Molecular Biology of Free Radical Scavenging Systems*, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor.
- [14] (a) Christman M.F., Morgan R.W., Jacobson, F.S. and Ames B.N., *Cell*, **1985**, *41*, 735; (b) Darr, D. and Fridovich I., *Free Radicals Med.*, **1995**, *18*, 195; (c) Löntz W., Sirsjö A; Liu W., Lindberg M., Rollman O. and Törmä H., *Free Radicals Biol. Med.*, **1995**, *18*, 349.
- [15] Torres-Rocca J. F., Lecoœur H., Amatore C. and Gougeon M.-L., *Cell Death and Differ.*, **1995**, *2*, 309.
- [16] (a) Gougeon M.-L., Olivier R., Garcia S., Guetard D., Dragic T., Dauguet C. and Montagnier L., *C.R. Acad. Sci. Paris*, **1991**, *312*, 529; (b) Meyaard L., Otto S. A., Jonker R. R., Mijster M. J., Keet R. and Miedema F., *Science*, **1992**, *257*, 217; (c) Gougeon M.L., *Cell Death and Differ.*, **1995**, *2*, 1.
- [17] Arbault S., Pantano P., Jankowski J. A., Vuillaume M. and Amatore C., *Anal. Chem.*, **1995**, *67*, 3382.
- [18] (a) Segal A. W. and Jones O. T. G., *Nature*, **1978**, *276*, 515; (b) Meier B., Cross A. R., Hancock J. T., Kaup F. J. and Jones O. T., *Biochem. J.*, **1991**, *275*, 245; (c) Meier B., Jesaitis A., Emmendorffer A., Roesler J. and Quinn M. T., *Biochem. J.*, **1993**, *289*, 481.
- [19] Monck J. R. and Fernández J. M., *J. Cell Biol.*, **1992**, *119*, 1395.
- [20] (a) Fernández J. M., Neher E. and Gomperts B. D., *Nature*, **1984**, *312*, 453; (b) Breckenridge L. and Almers W., *Nature*, **1987**, *312*, 814; (c) Zimmerberg J., Curran M., Cohen F. S. and Brodwick M., *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.*, **1987**, *84*, 1585; (d) Neher E., *Nature*, **1993**, *363*, 498; (e) Alvarez de Toledo G., Fernández-Chacón R. and Fernández J. M., *Nature*, **1993**, *363*, 554.
- [21] (a) Wightman R.M., Jankowski J. A., Kennedy R.T., Kawagoe K. T., Schroeder T. J., Leszczyszyn D.J., Near J. A., Diliberto Jr. E.J. and Viveros O. J., *Proc. natn. Acad. Sci. U. S. A.*, **1991**, *88*, 10754; (b) Schroeder T. J., Jankowski J. A., Kawagoe K. T., Wightman R. M., Lefrou C. and Amatore C., *Anal. Chem.*, **1992**, *65*, 2711; (c) Wightman R. M., Schroeder T. J., Finnegan J. M., Ciolkowski E. L. and Pihel K., *Biophys. J.*, **1995**, *68*, 383.
- [22] Ciolkowski E. L., Maness K. M., Cahill P. S., Wightman R. M., Evans D. H., Fosset B. and Amatore C., *Anal. Chem.*, **1994**, *66*, 3611.
- [23] Schroeder T. J., Borges R., Finnegan J. M., Pihel K., Amatore C. and Wightman R. M., *Biophys. J.*, **1996**, *70*, 1061.