

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
COURBEVOIE

①① N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

3 135 526

②① N° d'enregistrement national : **22 04472**

⑤① Int Cl⁸ : **G 01 N 27/403** (2022.01), G 01 N 33/483, C 12 Q 1/26

⑫

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

②② Date de dépôt : 11.05.22.

③③ Priorité :

④③ Date de mise à la disposition du public de la
demande : 17.11.23 Bulletin 23/46.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche préliminaire : *Se reporter à la fin du
présent fascicule*

⑥③ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

○ Demande(s) d'extension :

⑦① Demandeur(s) : *Institut National Polytechnique de Tou-
louse Etablissement public à caractère scientifique,
culturel et professionnel — FR, Centre national de la
recherche scientifique Etablissement public à caractère
scientifique et technique — FR et Université Toulouse III
- Paul Sabatier Etablissement public national scienti-
fique, culturel et professionnel — FR.*

⑦② Inventeur(s) : GUETTE-MARQUET Simon,
ROQUES Christine et BERGEL Alain.

⑦③ Titulaire(s) : Institut National Polytechnique de Toulouse
Etablissement public à caractère scientifique, culturel et profes-
sionnel, Centre national de la recherche scientifique Etablis-
sement public à caractère scientifique et technique, Université
Toulouse III - Paul Sabatier Etablissement public national
scientifique, culturel et professionnel.

⑦④ Mandataire(s) : Lavoix.

⑤④ PROCEDE D'ANALYSE DE LA VIABILITE DE CELLULES ANIMALES PAR MESURE ELECTROCHIMIQUE.

⑤⑦ PROCEDE D'ANALYSE DE LA VIABILITE DE CEL-
LULES ANIMALES PAR MESURE ELECTROCHIMIQUE

La présente invention concerne un procédé in vitro
d'analyse de la viabilité cellulaire par électrochimie, au
moyen de médiateurs d'oxydoréduction, par application
d'un potentiel constant, permettant une mesure stable en
continu.

Figure pour l'abrégé : Aucune

FR 3 135 526 - A1



Description

Titre de l'invention : PROCEDE D'ANALYSE DE LA VIABILITE DE CELLULES ANIMALES PAR MESURE ELECTRO- CHIMIQUE

- [0001] La présente invention concerne l'analyse de la viabilité cellulaire par électrochimie, notamment par analyse de l'activité du transfert d'électrons.
- [0002] Les cellules eucaryotes, notamment les cellules animales, notamment humaines, peuvent réaliser des transferts d'électrons vers le compartiment extracellulaire, c'est-à-dire transférer des électrons intracellulaires vers le milieu extracellulaire au travers de la membrane plasmique. Ce mécanisme de transfert d'électrons est couramment nommé tPMET pour « trans-Plasma Membrane Electron Transport ». Outre les cellules animales et humaines il est retrouvé chez de nombreux organismes tels que les levures et les plantes.
- [0003] Les tPMET ont été mis en évidence dans les années 60 en montrant que des cellules sont capables de réduire des colorants incapables de pénétrer à l'intérieur des cellules. Cependant, les effets de composés redox sur les cellules ont été observés bien avant la découverte des tPMET. Dès 1925, il a été démontré que des colorants peuvent être réduits par des explants de tissus, puis que les membranes plasmiques sont imperméables à ces colorants.
- [0004] Les tPMET sont impliqués dans une grande diversité de processus cellulaires physiologiques et pathologiques. En oxydant le NADH/NADPH intracellulaire, les tPMET permettent d'ajuster l'état redox au sein de la cellule et de contrôler les ratios $\text{NAD}^+ / \text{NADH}$ et $\text{NADP}^+ / \text{NADPH}$. Ces deux ratios sont des éléments majeurs du contrôle du métabolisme cellulaire. La simplicité des mécanismes tPMET permet de régénérer rapidement le NAD(P)^+ ; en quelques secondes l'ensemble du pool intracellulaire de NAD(P)H peut être ré-oxydé.
- [0005] Les tPMET semblent également être associés à la régulation de la prolifération cellulaire. Ils sont impliqués dans l'entrée d'éléments nutritifs dans les cellules et à la captation du fer. En conditions physiologiques, les tPMET sont impliqués dans la défense de l'organisme contre les attaques d'agents pathogènes par exemple. Les électrons captés du cytoplasme sont utilisés pour générer des composés oxydants toxiques comme du peroxyde d'hydrogène.
- [0006] Les tPMET sont en outre impliqués dans divers processus pathologiques. Dans les cellules cancéreuses, les tPMET semblent jouer un rôle majeur en termes d'activité métabolique modifiée/augmentée. En particulier, ils contribuent à la ré-oxydation rapide du NADH généré par la glycolyse et permettent aux cellules de se développer

en absence de dioxygène. L'expression d'oncogènes, comme N-myc, semble corrélée au niveau d'activité tPMET de lignées en culture. L'inhibition des tPMET chez les cellules cancéreuses pourrait constituer une nouvelle stratégie pour les thérapies anti-cancéreuses.

[0007] Le suivi des tPMET présente donc un grand intérêt dans de nombreux domaines de la biologie cellulaire visant des applications biomédicales très variées.

[0008] L'activité tPMET est couramment évaluée par spectrophotométrie en suivant l'apparition ou la disparition de couleur associée à la réduction de colorants. En raison du couplage entre les tPMET et l'activité mitochondriale, cette méthode est utilisée en routine pour évaluer la viabilité des cellules. Les principaux colorants utilisés sont le XTT et le MTT. Le kit de détection commercialisé par ATCC (XTT Cell proliferation Asasy Kit) repose sur ce principe. Les cellules réduisent le médiateur redox phénazine methosulfate (PMS) qui, à son tour, réduit le sel de tétrazolium XTT. La concentration de la forme réduite est mesurée par spectrophotométrie. Il s'agit donc d'une mesure finale qui se fait après que la forme réduite du médiateur redox se soit accumulée en solution.

[0009] Plus récemment, Sherman et al., Whole Eukaryotic Cells. Anal. Chem. 90, 2780–2786, 2018b ont également rapporté l'évaluation de l'activité tPMET par électrochimie : Dans ce cas, le médiateur redox est le ferricyanure de potassium et la concentration de sa forme réduite est mesurée par électrochimie. Toutefois, la mesure décrite dans cette étude est une mesure réalisée sur le milieu, après extraction des cellules de la suspension cellulaire. Cette méthode reste donc une mesure finale de la forme réduite du médiateur qui doit d'abord s'accumuler en solution. Elle ne permet pas le suivi en temps réel. Elle exige en outre une étape supplémentaire d'extraction des cellules du milieu de culture avant que la concentration du ferrocyanure ne soit mesurée par électrochimie

[0010] EP 1 199 560 décrit un procédé électrochimique pour la détermination du nombre de cellules et l'activité des systèmes biologiques. Cependant, le procédé implique l'application d'une substance gélifiante dans la contre-électrode employée comme récipient de réaction, et l'introduction du système biologique, préalablement mis en suspension dans une phase liquide, dans le récipient de réaction, de façon à ce que ledit système biologique soit immobilisé avec le médiateur d'oxydoréduction au sein de la substance gélifiante.

[0011] De plus, le procédé ne fait que mesurer l'intensité et il n'est fait aucune mention de l'application d'un potentiel contrôlé (fixe ou variable) à l'électrode de travail. Curieusement, le procédé selon EP 1 199 560 applique le système biologique à évaluer sur la contre-électrode sans imposer de potentiel à l'électrode de travail. Ceci semble donc indiquer un fonctionnement de type pile dans lequel l'intensité est régulée par la

différence de potentiel entre l'électrode de travail et la contre-électrode sur laquelle le système biologique est immobilisé. Ces systèmes électrochimiques de type pile sont connus pour leur manque de stabilité car l'intensité qui traverse le circuit électrique dépend des cinétiques électrochimiques de l'électrode de travail et de la contre-électrode ainsi que de la migration ionique au sein de la suspension, donc des caractéristiques de conduction ionique de la solution.

[0012] Ce procédé exige donc une préparation préalable du système biologique qui doit être fixé sur la contre-électrode et Il ne permet pas la mesure stable et fiable de la viabilité cellulaire.

[0013] Il reste donc désirable de mettre à disposition un procédé permettant une mesure en direct, en temps réel, fiable, rapide et stable du transfert d'électrons, corrélée à la quantité/activité des cellules et permettant une miniaturisation. Idéalement, ce procédé ne doit exiger qu'un minimum d'opérations de préparation du milieu afin de ne pas risquer d'altérer la viabilité cellulaire du fait de ces opérations ou risquer d'introduire un biais à la mesure du fait de l'impact de la phase de préparation de l'échantillon. Par exemple, des étapes d'immobilisation du système biologique, comme décrit dans EP 1 199 560, peuvent introduire une variabilité sur l'état ou sur la quantité des cellules impliquées dans la mesure.

[0014] Il reste en outre désirable d'obtenir une mesure d'intensité de courant qui soit le plus strictement corrélée à l'activité cellulaire, c'est-à-dire à la cinétique des transferts d'électrons qui ont lieu sur l'électrode de mesure, dite électrode de travail, en s'affranchissant de la cinétique des transferts à la seconde électrode, dite contre-électrode ou électrode auxiliaire, et des caractéristiques de conductivité ionique du milieu. Pour cela, l'électrochimie met en œuvre des montages expérimentaux dits à trois électrodes avec potentiel contrôlé, qui assurent que le courant traversant le circuit ne dépend que de la cinétique des transferts d'électrons à l'électrode. Les montages à trois électrodes avec potentiel contrôlé permettent de s'affranchir de la cinétique des transferts à la contre-électrode et, de l'impact de la conductivité ionique de la solution.

[0015] Selon un premier objet, l'invention concerne un procédé *in vitro* d'analyse de la viabilité de cellules animales, ledit procédé comprenant :

- L'obtention d'un échantillon contenant lesdites cellules animales ;
- la mise en contact dans une cellule électrochimique dudit échantillon avec un médiateur d'oxydoréduction ;
- l'application d'un potentiel constant à ladite cellule électrochimique ;
- la mesure de l'intensité ; et
- la détermination de la viabilité desdites cellules animales.

[0016] De façon classique, les cellules telles que présentes dans l'échantillon à un instant donné réduisent le médiateur redox ; la concentration de la forme réduite du médiateur,

qui dépend ainsi de l'état c'est-à-dire de la viabilité des cellules dans l'échantillon, est mesurée par électrochimie.

- [0017] Selon l'invention, la détection électrochimique est effectuée à potentiel imposé constant : Le dosage électrochimique selon l'invention a donc pour effet d'oxyder le médiateur redox réduit et donc de régénérer en continu sa forme oxydée (Figure 1B). Ceci assure une concentration de la forme oxydée du médiateur pratiquement constante. Ainsi, le procédé n'est pas limité par la concentration du médiateur redox. La mesure peut ainsi être réalisée en continu, sans que la forme oxydée du médiateur ne s'épuise et sans que la forme réduite du médiateur ne s'accumule.
- [0018] Le principe est représenté schématiquement à la Figure 1B.
- [0019] Le procédé selon l'invention se distingue ainsi des méthodes spectrophotométriques (Figure 1A), et de la méthode électrochimique après extraction décrite par Sherman et al, 2018 (Figure 1C) : selon ces méthodes, la concentration du médiateur redox réduit s'accumule au sein de la solution et tend à inhiber progressivement l'activité métabolique.
- [0020] Cet effet d'inhibition dû à l'accumulation de la forme réduite du médiateur est donc levé selon l'invention. Ainsi, le procédé selon l'invention permet un suivi de l'évolution de la viabilité cellulaire sur de longues périodes, jusqu'à plusieurs heures par exemple.
- [0021] On entend par mesure de viabilité la détermination en nombre ou en proportion de cellules vivantes et/ou mortes/endommagées.
- [0022] La mesure de la viabilité peut être corrélée à la mesure de l'activité cellulaire, c'est-à-dire l'activité de transfert d'électrons tPMET. Ce transfert illustre notamment l'activité enzymatique ou métabolique des cellules considérées.
- [0023] Ladite mesure peut comprendre la mesure d'une valeur à un moment donné, ou le suivi dynamique, en suivant ces paramètres dans le temps.
- [0024] Typiquement, le procédé selon l'invention est réalisé sur un échantillon des cellules à tester.
- [0025] L'échantillon des cellules à tester peut être obtenu par prélèvement d'un milieu cellulaire contenant les cellules animales, telles que des cellules humaines dont on cherche à mesurer la viabilité cellulaire. Selon ce mode de réalisation, l'échantillon ainsi prélevé peut être utilisé directement dans le procédé selon l'invention, en y ajoutant le médiateur d'oxydoréduction.
- [0026] Alternativement, l'échantillon peut être obtenu par modification du prélèvement, par exemple par toute méthode permettant sa mesure par électrochimie, telle que notamment par dilution, concentration, et/ou supplémentation. Ainsi, ledit prélèvement cellulaire peut ainsi être dilué dans un milieu de culture cellulaire, ou dans une solution de composition chimique simple, afin de constituer l'échantillon à tester. A titre

illustratif, ledit prélèvement peut être dilué dans un milieu de culture cellulaire ou une solution n'altérant pas la survie cellulaire tel que par exemple une solution à pH contrôlé, notamment à pH physiologique (7.20-7.5), présentant une osmolarité physiologique (270-320 milli osmol), et comprenant de préférence une source d'énergie (glucose 1-4 g/L), pour assurer la survie des cellules le temps de la mesure. Typiquement, on peut citer la solution saline équilibrée de Hank (HBSS).

- [0027] Ainsi, selon un mode de réalisation, l'obtention dudit échantillon comprend l'étape de prélèvement à partir d'un milieu cellulaire contenant les cellules et la dilution éventuelle dans un milieu qui assure la survie des cellules le temps de la mesure.
- [0028] Le milieu de mesure comprenant l'échantillon et le médiateur présente typiquement une concentration cellulaire permettant une mesure de l'intensité du courant proportionnelle au nombre de cellules. Ainsi selon un mode de réalisation, la concentration cellulaire dans le milieu de mesure est comprise entre 1 000 et 1 000 000 cellules.ml⁻¹ (cell.ml⁻¹).
- [0029] On entend par « médiateur d'oxydoréduction » un accepteur d'électrons qui est réduit par les cellules puis réoxydé par les électrodes. Ledit médiateur est typiquement non cytotoxique à la concentration considérée pour ne pas affecter la détection de la viabilité cellulaire.
- [0030] Selon le mode de réalisation, ledit médiateur est soluble dans le milieu cellulaire.
- [0031] Il existe une grande variété d'accepteurs d'électrons extracellulaires.
- [0032] *In vivo*, les électrons transférés permettent notamment la réduction du dioxygène ou d'ions métalliques (Fe³⁺, Cu²⁺). *In vitro*, en plus des substrats cités précédemment, les électrons peuvent réduire différents composés redox tels que Fe(CN)₆³⁻, DCIP, des quinones (hydroquinone, ménadione...) ou des colorants à base de tétrazolium (MTT, XTT, WST-1).
- [0033] Des médiateurs d'oxydoréduction sont utilisés pour les mesures de viabilité cellulaire avec détection spectrophotométrie, tels que le 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) (E° = 0,226 V/ESH); l'hexacyanoferrate III, également appelé ferricyanure (Fe(CN)₆³⁻) (E° = 0,37 V/ESH) ; les dérivés de naphthoquinones, tels que la ménadione (2-méthyl-1,4-naphthoquinone, également appelée vitamine K3) et ses dérivés (Elhabiri et al., Redox Behavior Predictions. Chem. Eur. J. 21 (2015) 3415 – 3424) tels que les hydroquinones (Martínez-Cifuentes et al., Molecules 22 (2017) 577) et les benzoquinones (M.T. Huynh et al., J. Am. Chem. Soc. 138 (2015) 15903-15910); les colorants à base de tétrazolium tels que le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT), le 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide (XTT), le disulfonate de 4-[3-(4-iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzène (WST-1).

- [0034] Des médiateurs redox sont également communément utilisés dans des procédés électrochimiques. Il s'agit par exemple de la phénazine méthosulfate (PMS) (O.S. Ksenzhek et al., *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 4 (1977) 346-357), du bleu de méthylène (O.S. Ksenzhek et al., *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 4 (1977) 346-357) et les médiateurs redox utilisés en bioélectrocatalyse (notamment décrits par D.P. Hickey et al., *Electrochemistry* 13 (2016) 97-132) tels que les composés dérivés de bipyridine (viologènes), d'osmium ou de ferrocène.
- [0035] Les références indiquent des travaux qui ont déterminé ou approché les valeurs des potentiels redox des médiateurs cités. Des valeurs différentes sont souvent trouvées dans la bibliographie du fait de la différence des dérivés, d'études divergentes ou de composés pouvant donner plusieurs réactions électrochimiques.
- [0036] Ces médiateurs peuvent être également mis en œuvre dans le procédé électrochimique selon l'invention.
- [0037] A titre de médiateur convenant à l'invention, on peut notamment citer des composés redox tels que le 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) ; l'hexacyanure de fer III ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) ; les dérivés de quinones tels que l'hydroquinone, ou la ménadione ; la phénazine méthosulfate (PMS) ; les colorants à base de tétrazolium tels que le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT), le 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide (XTT), le disulfonate de 4-[3-(4-iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzène (WST-1).
- [0038] La méthode pour réaliser la mise en contact du médiateur et de l'échantillon et ainsi constituer le milieu de mesure n'est pas limitée:
- [0039] Selon un mode de réalisation, ceci peut être fait par exemple par dissolution dudit médiateur dans ledit échantillon pour constituer le milieu de mesure.
- [0040] Selon un autre mode de réalisation, ceci peut être réalisé par mélange de l'échantillon avec une solution dudit médiateur préalablement préparée. Une telle solution peut être constituée notamment par le médiateur dilué dans l'eau ou dans un soluté tel que le milieu HBSS, PBS ou EBSS, plus particulièrement HBSS
- [0041] Le médiateur ainsi en solution est placé dans la cellule électrochimique, puis l'échantillon est injecté ensuite dans la cellule électrochimique.
- [0042] Selon un autre mode de réalisation, le médiateur peut être déposé sous forme d'une couche solide à la surface de l'électrode et le médiateur est dissous dans l'échantillon lorsque ce dernier est introduit dans la cellule. Ce mode de réalisation peut être particulièrement utile pour miniaturiser le système de mesure.
- [0043] Typiquement, le milieu de mesure comprenant l'échantillon et le médiateur présente une concentration en médiateur comprise entre 10 et 500 μM .
- [0044] On entend par « cellule électrochimique » un système capable d'oxyder le médiateur

d'oxydoréduction grâce à l'énergie électrique. Les cellules électrochimiques convenant à l'invention peuvent être choisies parmi les cellules classiquement utilisées, à 3 électrodes (électrode de référence, électrode de travail et contre-électrode, cette dernière étant également nommée électrode auxiliaire) ou à 2 électrodes comprenant une électrode de travail et une contre-électrode qui est alors utilisée comme électrode de référence, communément nommée « pseudo-référence »

- [0045] Selon un mode de réalisation, la cellule électrochimique comprend une électrode de travail, une électrode auxiliaire, et éventuellement une électrode de référence.
- [0046] Les cellules électrochimiques miniaturisées peuvent avantageusement être utilisées.
- [0047] L'application d'un potentiel désigne le potentiel appliqué à l'électrode de travail par rapport à l'électrode de référence. Typiquement, le potentiel constant peut être appliqué au moyen d'un potentiostat ou d'un générateur de tension. Le potentiostat peut être notamment un potentiostat portable.
- [0048] Selon un mode de réalisation, ledit potentiel constant est appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence ou l'électrode auxiliaire utilisée comme pseudo-référence.
- [0049] Le potentiel est constant en ce qu'il ne varie pas au cours du temps. Il peut être ajusté en fonction de la nature du médiateur utilisé.
- [0050] Selon un mode de réalisation, le potentiel est typiquement supérieur à ou égal au potentiel redox du médiateur utilisé. Ainsi, il est généralement supérieur d'au moins 50 mV au potentiel redox du médiateur d'oxydoréduction utilisé.
- [0051] Selon un mode de réalisation, le potentiel est généralement inférieur au potentiel d'oxydation de l'eau dans le milieu de la cellule électrochimique comprenant l'échantillon et le médiateur d'oxydoréduction en solution.
- [0052] Selon un mode de réalisation l'électricité mesurée est générée par le flux d'électrons générés par la réoxydation du médiateur par les électrodes :
- [0053] $M_{\text{Red}} \rightarrow M_{\text{ox}} + e^-$
- [0054] Où M_{Red} désigne le médiateur sous sa forme réduite et M_{ox} désigne le médiateur sous sa forme oxydée.
- [0055] Selon un mode de réalisation, la re-oxydation dudit médiateur préalablement réduit par les cellules a lieu à l'électrode de travail, en libérant des électrons générant le courant.
- [0056] L'intensité du courant mesurée est typiquement proportionnelle au flux d'électrons transférés lors de la réaction d'oxydation du médiateur, donc au flux de médiateur réduit par ledit échantillon et par conséquent au flux d'électrons issus du transfert par tPMET, et peut *in fine* être corrélée à la viabilité cellulaire (et éventuellement au nombre de cellules dans l'échantillon).
- [0057] Selon un mode de réalisation, la viabilité cellulaire peut être corrélée à l'intensité par

étalonnage préalable : typiquement, ces étalonnages comprennent le dosage avec des courbes de calibration pour des milieux cellulaires de référence, pour un type de cellules donné, selon le milieu cellulaire à tester.

- [0058] Selon un mode de réalisation, il est possible de s'affranchir de la quantification du nombre de cellules dans l'échantillon en préparant pour chaque essai un contrôle avec des cellules fixées juste avant la mesure (de viabilité à 0 %) et un témoin non exposé au produit à tester (viabilité 100 % par convention), le contrôle et le témoin étant préparés dans les mêmes conditions, de façon à rendre négligeable la différence du nombre de cellules entre les différentes conditions.
- [0059] Ainsi, toutes les mesures de viabilité peuvent être comprises entre la valeur pour le contrôle et le témoin.
- [0060] Typiquement, l'électrode de travail permet le suivi de l'évolution de l'intensité. Selon un mode de réalisation, l'intensité est mesurée entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire.
- [0061] L'intensité peut être mesurée au moyen d'un ampèremètre situé dans le circuit électrique de la cellule électrochimique, entre l'électrode de travail et la contre-électrode. Lorsqu'un potentiostat est utilisé pour fixer le potentiel de l'électrode de travail, l'ampèremètre est généralement inclus dans le potentiostat.
- [0062] A partir d'un milieu cellulaire, un ou plusieurs prélèvements peuvent être effectués à différents instants t , conduisant à un ou plusieurs échantillons, respectivement, sur lesquels conduire la mesure électrochimique du procédé selon l'invention.
- [0063] Il est ainsi possible d'analyser la variation de la viabilité du milieu cellulaire en comparant les mesures pour des échantillons prélevés à différents instants t .
- [0064] Pour un échantillon donné, il est également possible d'effectuer des mesures en continu sur une période de temps déterminée.
- [0065] L'intensité peut présenter en fonction du temps un plateau (système cellulaire stable) ou des variations de pente négative (décroissance cellulaire) ou positive (croissance cellulaire).
- [0066] Typiquement, l'intensité s'établit à une valeur plateau lorsque le régime de fonctionnement stable du milieu cellulaire est atteint, pour lequel la concentration de la forme réduite du médiateur est constante. Dans ce régime stationnaire, le médiateur est consommé à l'électrode à la même vitesse qu'il est généré par le milieu cellulaire.
- [0067] Une diminution d'intensité correspond à une baisse du flux de médiateur réduit par le milieu cellulaire testé, et de fait, à une perte de viabilité et/ou activité cellulaire.
- [0068] Une augmentation d'intensité détecte une hausse du flux de médiateur réduit par le milieu cellulaire testé, et de fait, une croissance cellulaire et/ou croissance de l'activité cellulaire.
- [0069] Le procédé selon l'invention permet notamment la miniaturisation des dispositifs

d'évaluation de la viabilité cellulaire et/ou dosages basés sur la détection de tPMET, tel qu'illustré selon les exemples. A l'heure actuelle, le dosage spectrophotométrique ne permet pas une miniaturisation aisée.

- [0070] Le procédé selon l'invention permet également une mesure en direct sans accumulation ou extraction du médiateur. Le procédé selon l'invention permet un rendu de résultats rapide.
- [0071] Le procédé permet également un suivi de l'intensité et ses variations en continu. Il permet également un suivi du milieu cellulaire en continu, par exemple pendant la phase de croissance de cellules jusqu'à l'obtention d'un régime stationnaire.
- [0072] En offrant la possibilité d'une mesure en fonction du temps, la détection électrochimique permet une caractérisation plus précise des tPMET par exemple par la détermination de vitesses initiales ou de variations de la vitesse en fonction du temps. Elle ouvre également la voie au suivi en continu de l'activité métabolique.
- [0073] Il permet par exemple d'identifier l'activité d'agents cytotoxiques ou activateurs de croissance sur les cellules.
- [0074] Ceci permet notamment la mise en œuvre du procédé dans le domaine de la thérapie cellulaire pour le contrôle de la viabilité des cellules en cours de préparation (du prélèvement à la production finale), avant utilisation/injection et au niveau des banques de tissus (greffes notamment) par exemple. Il permet des applications biomédicales très variées car les tPMET sont impliqués dans une grande diversité de processus cellulaires physiologiques et pathologiques : régulation de la prolifération cellulaire, activité métabolique modifiée/augmentée des cellules cancéreuses, etc.

Figures

- [0075] [Fig.1] La [Fig.1] illustre les principes de dosage des tPMET : A) Dosage conventionnel avec détection spectrophotométrique de la forme réduite du médiateur d'oxydoréduction ; B) Détection électrochimique suivant le principe de l'invention ; C) Dosage électrochimique de la forme réduite du médiateur suivant le protocole du groupe de Rawson (Sherman et al., Anal. Chem. 90 (2018), 2780-2786, 2018), après extraction des cellules de la solution (surnageant).
- [0076] [Fig.2] [Fig.2] représente un schéma illustratif d'une électrode et cellule de mesure pouvant convenir à l'invention.
- [0077] Plus précisément, la Figure 2A représente un système illustratif à trois électrodes comprenant :
 - [0078] une électrode de travail 1 de carbone ;
 - [0079] une électrode auxiliaire 2 en carbone ;
 - [0080] une électrode de pseudo-référence 3 en argent (PRA) ;
 - [0081] une connexion électrique 4 de l'électrode de travail 1;

- [0082] une connexion électrique 5 de l'électrode auxiliaire ; et
- [0083] une connexion électrique 6 de la PRA.
- [0084] Ce système est réalisé par sérigraphie sur une bandelette en céramique de 34 mm de long, 10 mm de large et 0.5 mm d'épaisseur (Metrohm Dropsens, figure A). Ainsi, une électrode de travail de 4 mm de diamètre est illustrée à la Figure 2A.
- [0085] La Figure 2B représente une cellule de mesure électrochimique dans laquelle la bandelette 7 de la Figure 2A est disposée à la base d'une cellule en téflon constituée de deux parties :
- [0086] la partie supérieure 8 de la cellule;
- [0087] la partie inférieure 9 de la cellule ;
- [0088] les parties 8 et 9 étant séparées par un joint torique 10;
- [0089] un film de parafilm 11 obturant la partie supérieure 8.
- [0090] Un tel système peut être miniaturisé en réduisant considérablement le volume de l'échantillon, par exemple en ménageant au-dessus de l'électrode un volume de seulement quelques microlitres dans lequel on introduit l'échantillon à doser par capillarité. De telles configurations sont notamment développées pour les bandelettes de mesure de la glycémie.
- [0091] [Fig.3] La [Fig.3] illustre les résultats obtenus lors d'un test de viabilité réalisé sur cellules Vero (1 million de cellules). DCIP 50 μ M dans du tampon HBSS, polarisation à 300 mV, électrodes DropSens en carbone. La flèche indique l'injection de la suspension de cellules (1,2 et 3) ou de la solution tamponnée (4,5 et 6) pour les contrôles.
- [0092] [Fig.4] La [Fig.4] illustre les résultats obtenus lors d'un test de viabilité réalisé sur cellules Hela (1 million de cellules). DCIP 50 μ M dans du tampon HBSS, polarisation à 300 mV, électrodes DropSens en carbone. La flèche indique l'injection de la suspension de cellules (1 et 2) ou de la solution tamponnée (4 et 5) pour les contrôles.
- [0093] [Fig.5] La [Fig.5] illustre les résultats obtenus lors d'un test de viabilité réalisé sur cellules Vero intactes, fixées ou lysées (1 million de cellules). DCIP 50 μ M dans du tampon HBSS, polarisation à 300 mV, électrodes DropSens en carbone. La flèche indique l'injection de la suspension de cellules (1 et 2) ou du lysat (3 et 4) ou de cellules fixées (5 et 6).

Exemples

Préparation des cellules

- [0094] Les essais ont été réalisés sur des lignées de cellules de mammifères, une lignée humaine Hela (ATCC CCL-2, carcinomateuses du col de l'utérus) et une lignée non humaine Vero (ATCC CCL-81, rein de singe vert *Cercopithecus aethiops*). Toutes les lignées proviennent de l'American Type Culture Collection (Manassas, Virginie, Etats-

Unis).

- [0095] Les stocks primaires de cellules ont été gracieusement fournis par la Fonderphar (Fondation pour le développement et la recherche pharmaceutique, Toulouse, France). Pour chaque lignée cellulaire des stocks secondaires ont été produits en amplifiant le stock primaire. Les banques de cellules ont été conservées en solution cryoconservatrice (sérum fœtal de veau additionné de 10% de DMSO [Corning, Corning, Etats-Unis]) à -80°C.
- [0096] Le milieu de culture est le RPMI 1640 (ref 31870-025, ThermoFisher scientific, Waltham, Etats-Unis). Ce milieu a été supplémenté avec 10% (en volume) de sérum de veau fœtal décomplémenté (ref 10270, ThermoFisher scientific), 2 mM de L-glutamine (ref 25030-54, ThermoFisher scientific) et un mélange de pénicilline/streptomycine (10 unités/mL et 10 µg/mL, ref 14140-122, ThermoFisher scientific). Par la suite, le milieu supplémenté avec tous les additifs est appelé « milieu complet ».
- [0097] Les cellules ont été cultivées en routine dans des flacons de 75 cm² (Corning) à 37°C dans une atmosphère humidifiée (80-95% d'humidité relative) et contenant 5% de CO₂ (incubateur à CO₂). Arrivé à 70-90% de confluence, après rinçage du tapis cellulaire avec du DPBS, les cellules ont été décrochées par trypsinisation à 37°C. L'action de la trypsine a été stoppée par ajout de milieu RPMI complet et la suspension obtenue a été centrifugée 5 min à 200 g. Le culot de cellules a été repris dans du RPMI complet. Après numération (cellule de Malassez en présence de bleu trypan), la suspension de cellules a été diluée dans du RPMI afin d'obtenir la densité cellulaire requise (en cellules viables).
- [0098] Les cellules lysées ont été obtenues en reprenant le culot de cellules obtenu après centrifugation dans de l'eau ultra pure (ref 340 952-8 Cooper). La suspension obtenue a été passée au bain à ultrasons pendant 5 min à pleine puissance (modèle USC3300D, VWR). Après préparation, le lysat a été conservé dans de la glace fondante et utilisé sans délai.
- [0099] Les cellules fixées ont été préparées en reprenant le culot de cellules dans un millilitre de formaldéhyde (ref FB002, ThermoFisher scientific) à 4% dans une solution de phosphates (PBS). Après une heure d'incubation à 37°C, les cellules ont été rincées trois fois avec du PBS afin d'éliminer le formaldéhyde en excès. Après le dernier rinçage, le culot de cellules a été repris dans une solution tamponnée (HBSS).
- [0100] Mesure électrochimique de la viabilité des cellules
- [0101] Les mesures électrochimiques sont réalisées avec des électrodes en carbone séri-graphiées sur des bandelettes en céramique (Metrohm Dropsens, DRP 110, Figure 2A). Ces électrodes comprennent une électrode de travail en carbone circulaire d'un diamètre de 4 mm, en partie entourée par l'électrode auxiliaire et l'électrode de pseudo-référence en argent (PRA), le tout déposé par jet d'encre (screen printed) sur

des bandelettes en céramique qui s'insèrent dans un connecteur électrique dédié. Les électrodes et la cellule électrochimique sont représentées dans la [Fig.2].

- [0102] Le potentiel de l'électrode de pseudo-référence en argent (PRA) donné par le fournisseur est de -131 mV par rapport à l'électrode de référence classique au chlorure d'argent, soit +66 mV par rapport à l'électrode standard à hydrogène (ESH).
- [0103] Les électrodes sont insérées à la base de réacteurs en téflon (Figure 2B). La partie inférieure du réacteur assure le maintien de l'électrode. La partie supérieure comporte une ouverture qui permet de remplir les réacteurs de milieu. Les deux parties sont maintenues entre elles par quatre vis en plastique. L'étanchéité est assurée par un joint torique situé entre l'électrode et la partie supérieure des réacteurs.
- [0104] Avant chaque utilisation, les réacteurs ont été nettoyés par immersion durant 2 h dans une solution de détergent (RBS35 2% v/v dans l'eau, Carl Roth, Karlsruhe, Allemagne) puis soigneusement rincés à l'eau courante puis à l'eau distillée. Les pièces des réacteurs (support, vis, joint) ainsi que les électrodes ont été stérilisées par immersion 30 min dans une solution d'éthanol à 70% (v/v dans l'eau, VWR, Radnor, Etats-Unis). Les électrodes ont été brièvement rincées par immersion dans l'eau ultra pure (eau pour préparation injectable, ref 340 952-8, Cooper, Melun, France) avant séchage complet sous poste de sécurité microbiologique (PSM). Le montage des réacteurs a été réalisé en conditions stériles, sous PSM, avec des outils stérilisés selon le même protocole.
- [0105] Les réacteurs équipés d'électrode en carbone (Metrohm Dropsens, DRP 110) sont remplis avec deux millilitres de tampon HBSS contenant du 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP, (ref D1878 Sigma Aldrich) à la concentration de 50 μ M, médiateur redox utilisé pour les mesures. Immédiatement après, les réacteurs sont transférés dans un incubateur à 37°C/5% CO₂, les électrodes de travail sont polarisées à +300 mV/PRA (soit 366 mV/ESH) à l'aide d'un potentiostat multicanaux (Biologics) et le courant est enregistré en continu. Après 20 à 50 minutes, 50 μ L de suspension cellulaire (un million de cellules), ou seulement de solution tamponnée pour les contrôles, sont injectés dans les réacteurs, sans interruption de la polarisation. Les mesures sont poursuivies pendant au moins une heure après l'injection des cellules.
- [0106] Un potentiel de 300 mV par rapport à la pseudo-référence DropSens est appliqué en continu. Ce potentiel assure l'oxydation rapide de la forme réduite du 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP), médiateur redox utilisé pour les mesures. Ce médiateur est également couramment utilisé pour le dosage spectrophotométrique.
- [0107] Les cellules Vero sont une lignée cellulaire issue de rein de singe vert communément utilisées en biotechnologie pour la culture de virus, la production de vaccins et des déterminations de cytotoxicité.

- [0108] Dès l'injection des cellules, le courant répond par un saut brusque qui atteint environ 800 nA après 2 à 3 minutes. Il croît ensuite lentement pendant environ 40 minutes et se stabilise les 30 minutes supplémentaires que dure l'essai aux environs de 1300 nA ([Fig.2]). Les contrôles sans cellules ne dépassent jamais 30 nA.
- [0109] Le même protocole repris avec des cellules Hela conduit à des résultats similaires, avec des courants plus faibles ([Fig.3]). La différence des courants entre cellules Vero et Hela est cohérente avec les mesures spectrophotométriques qui donnent également des réponses plus importantes avec les cellules Vero.
- [0110] Pour vérifier que le flux d'électrons enregistré est bien lié à la viabilité des cellules, le même type d'essai a été répété en injectant également des cellules préalablement fixées au formaldéhyde ou des cellules lysées par ultrasons dans de l'eau ultra-pure ([Fig.4]). Dans tous les cas, le nombre de cellules mises en œuvre est d'un million.
- [0111] L'injection de cellules viables conduit aux mêmes observations que précédemment : une augmentation très rapide de l'intensité du courant durant les quelques minutes qui suivent l'injection des cellules puis une évolution plus lente. Ici le temps de mesure a été prolongé au-delà des 120 minutes de l'essai précédent, faisant apparaître une décroissance linéaire de l'intensité du courant au-delà de deux heures de mesure. L'injection de cellules fixées ou lysées ne provoque pas de modification de l'intensité. Seules les cellules viables sont détectées.

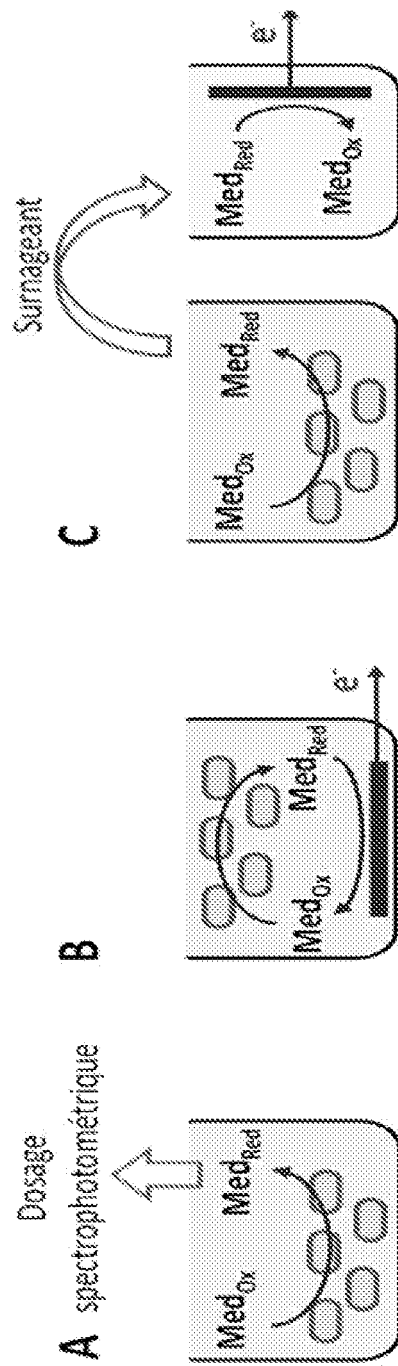
Revendications

- [Revendication 1] Procédé *in vitro* d'analyse de la viabilité de cellules animales, ledit procédé comprenant :
- L'obtention d'un échantillon contenant lesdites cellules animales ;
 - La mise en contact dans une cellule électrochimique dudit échantillon avec un médiateur d'oxydoréduction ;
 - l'application d'un potentiel constant à ladite cellule électrochimique ;
 - la mesure de l'intensité ; et
 - la détermination de la viabilité desdites cellules animales.
- [Revendication 2] Procédé selon la revendication 1 tel que le médiateur d'oxydoréduction est choisi parmi le 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP) ; hexacyanoferrate III ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) ; les dérivés de quinone tels que l'hydroquinone, ou la ménadione ; phénazine méthosulfate (PMS) ; les colorants à base de tétrazolium tels que le bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltétrazolium (MTT), le 2,3-bis-(2-méthoxy-4-nitro-5-sulfophényl)-2H-tétrazolium-5-carboxanilide (XTT), le disulfonate de 4-[3-(4-iodophényl)-2-(4-nitrophényl)-2H-5-tétrazolio]-1,3-benzène (WST-1).
- [Revendication 3] Procédé selon la revendication 1 ou 2 tel que la cellule électrochimique comprend une électrode de travail, une électrode auxiliaire, et éventuellement une électrode de référence.
- [Revendication 4] Procédé selon la revendication 3 tel que l'intensité est mesurée entre l'électrode de travail et l'électrode auxiliaire.
- [Revendication 5] Procédé selon la revendication 3 tel que ledit potentiel constant est appliqué entre l'électrode de travail et l'électrode de référence ou l'électrode auxiliaire utilisée comme pseudo-référence.
- [Revendication 6] Procédé selon la revendication 5 tel que ledit potentiel constant est appliqué au moyen d'un potentiostat ou d'un générateur de tension.
- [Revendication 7] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes tel que ledit potentiel constant appliqué est supérieur au potentiel redox dudit médiateur d'oxydoréduction et inférieur au potentiel d'oxydation de l'eau dans le milieu de mesure comprenant ledit échantillon et ledit

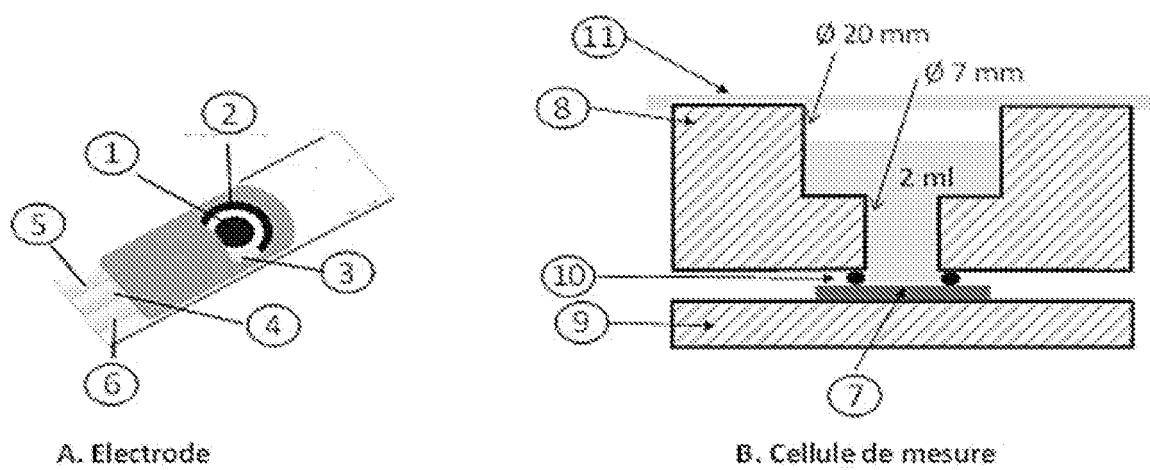
médiateur d'oxydoréduction.

- [Revendication 8] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes tel que la concentration cellulaire dans le milieu de mesure comprenant l'échantillon et le médiateur est comprise entre 1 000 et 1 000 000 cell.ml⁻¹.
- [Revendication 9] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes tel que la détermination de la viabilité cellulaire comprend la corrélation de l'intensité du courant à la viabilité cellulaire, pour un type de cellules donné, par étalonnage préalable.
- [Revendication 10] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes tel que l'obtention dudit échantillon comprend l'étape de prélèvement à partir d'un milieu cellulaire contenant les cellules et la dilution éventuelle dans un milieu qui assure la survie des cellules le temps de la mesure.
- [Revendication 11] Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes tel que l'intensité du courant est mesurée en continu sur une période de temps déterminée ou est mesurée à différents instants t, pour ledit échantillon.

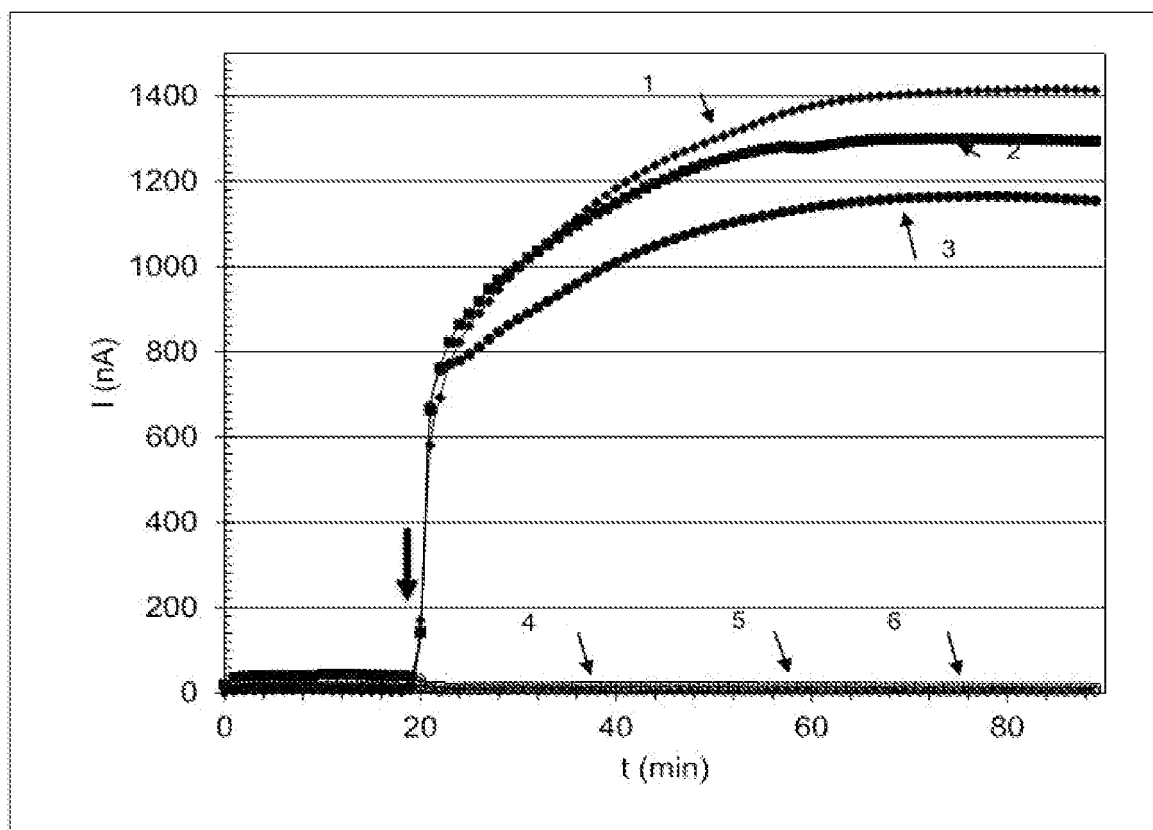
[Fig. 1]



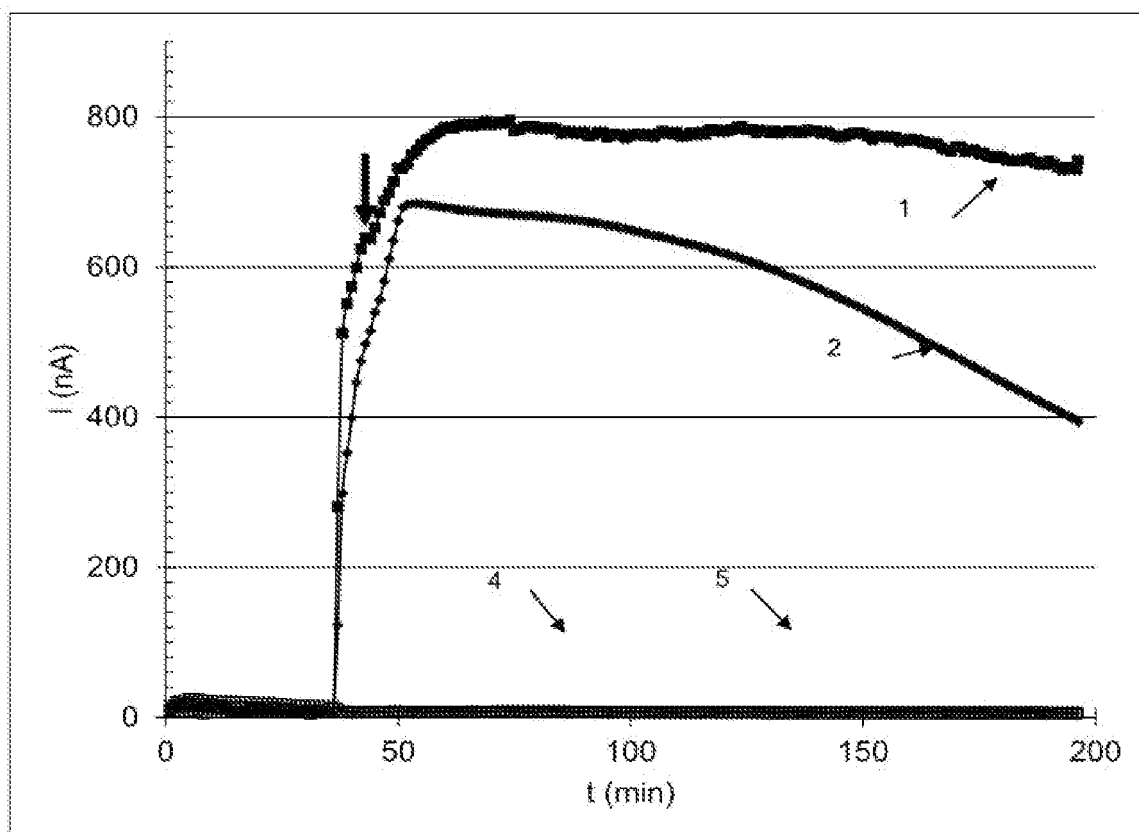
[Fig. 2]



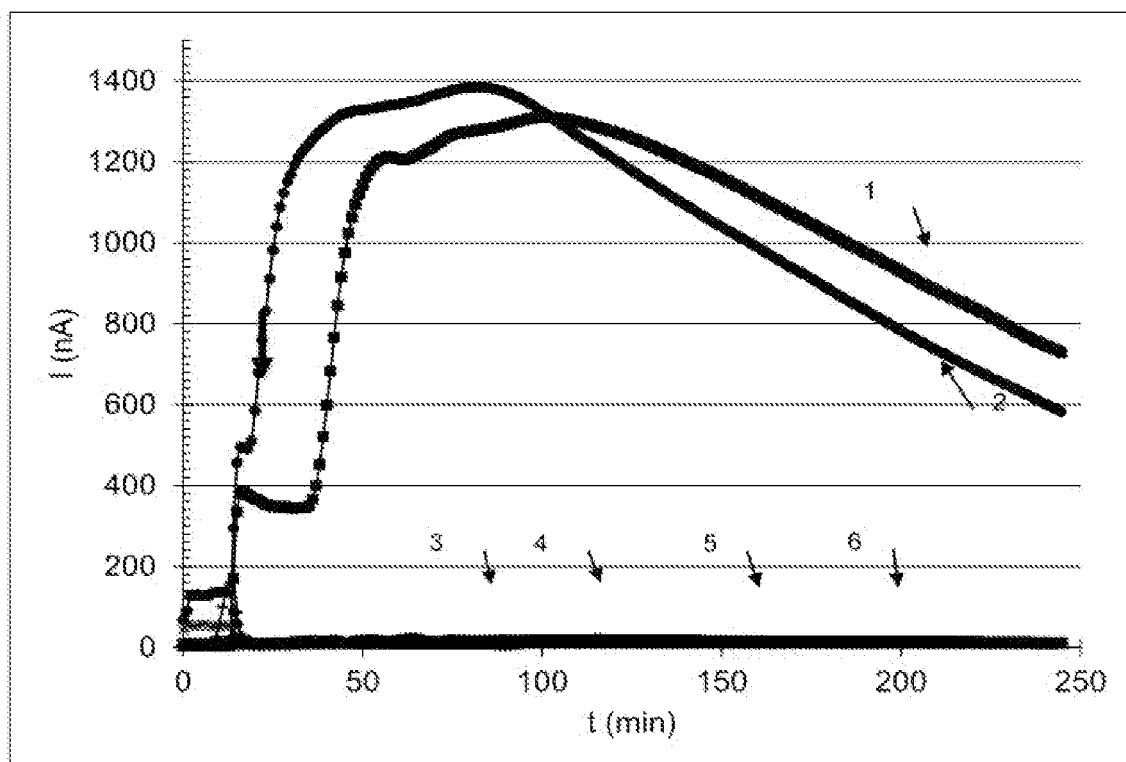
[Fig. 3]



[Fig. 4]



[Fig. 5]



RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE

établi sur la base des dernières revendications
déposées avant le commencement de la recherche

N° d'enregistrement
national

FA 908716
FR 2204472

DOCUMENTS CONSIDÉRÉS COMME PERTINENTS		Revendication(s) concernée(s)	Classement attribué à l'invention par l'INPI
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes		
X	WO 03/087293 A1 (LGC LTD [GB]; CASSELLS NICHOLAS PAUL [GB]) 23 octobre 2003 (2003-10-23) * le document en entier * -----	1-11	G01N27/403 G01N33/483 C12Q1/26
X	EP 0 221 663 A1 (PENA PAUL DE LA LTD [GB]) 13 mai 1987 (1987-05-13) * abrégé * * figures * * page 2, ligne 11 - page 3, ligne 44 * -----	1	
A	WO 2020/117650 A1 (AVAILS MED INC [US]) 11 juin 2020 (2020-06-11) * abrégé * * figures * * alinéas [0174] - [0227] * -----	1-11	
			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHÉS (IPC)
			C12M G01N
Date d'achèvement de la recherche		Examineur	
16 novembre 2022		Ruchaud, Nicolas	
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrière-plan technologique O : divulgation non-écrite P : document intercalaire T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet bénéficiant d'une date antérieure à la date de dépôt et qui n'a été publié qu'à cette date de dépôt ou qu'à une date postérieure. D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons & : membre de la même famille, document correspondant			

ANNEXE AU RAPPORT DE RECHERCHE PRÉLIMINAIRE **RELATIF A LA DEMANDE DE BREVET FRANÇAIS NO. FR 2204472 FA 908716**

La présente annexe indique les membres de la famille de brevets relatifs aux documents brevets cités dans le rapport de recherche préliminaire visé ci-dessus.
 Les dits membres sont contenus au fichier informatique de l'Office européen des brevets à la date du **16-11-2022**
 Les renseignements fournis sont donnés à titre indicatif et n'engagent pas la responsabilité de l'Office européen des brevets, ni de l'Administration française

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
WO 03087293 A1	23-10-2003	AU 2003222593 A1	27-10-2003
		WO 03087293 A1	23-10-2003
EP 0221663 A1	13-05-1987	AU 591177 B2	30-11-1989
		CA 1257649 A	18-07-1989
		EP 0221663 A1	13-05-1987
		GB 2181451 A	23-04-1987
		JP S62188957 A	18-08-1987
		ZA 867240 B	27-04-1988
WO 2020117650 A1	11-06-2020	US 2021325371 A1	21-10-2021
		WO 2020117650 A1	11-06-2020