

Université  
de Toulouse

# THÈSE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par *l'Université Toulouse III - Paul Sabatier*  
Discipline ou spécialité : *Micro et nano systèmes*

---

Présentée et soutenue par *Tong CHEN*  
Le 18 Décembre 2012

**Titre :** *Développement de biocapteurs hyperfréquences microfluidiques pour la spectroscopie diélectrique non-invasive de la cellule unique. Applications en cancérologie*

---

### JURY

*Pr. Jean-Baptiste Béguéret*  
*Dr. Dominique Fourmy*  
*Pr. Alain Cazarré*  
*Pr. Alain Thiéry*

---

**Ecole doctorale :** *GEET*  
**Unité de recherche :** *LAAS-CNRS*  
**Directeur(s) de Thèse :** *Dr. David DUBUC, Dr. Katia GRENIER*  
**Rapporteurs :** *Pr. Jean-Baptiste Béguéret, Dr. Dominique Fourmy*

# Remerciements

Trois ans et trois mois sont passés pour réaliser ces travaux de thèse, répartis au sein du Laboratoire d'Analyses et d'Architecture des Systèmes (LAAS) du Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) de Toulouse et Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM) de Toulouse.

Je voudrais en premier lieu remercier chaleureusement David DUBUC et Katia GRENIER de m'avoir accueilli au sein de l'équipe Micro et nanosystèmes Hyper Fréquences Fluidiques et m'ont encadré mes travaux de recherche avec leur rigueur et leur expertise scientifique. Un grand merci à eux, toujours disponible malgré leurs multiples responsabilités, et qui voit toujours clair dans les explications parfois tortueuses du étudiant étranger. Remercie pour leurs conseils, leurs aides, leurs patiences, leurs soutiens et leurs confiances.

Je voudrais aussi remercier tous Maire POUPOT et Jean Jaque FOURNIE qui sont membres d'INSERM pour leurs gentillesse, leurs aides et leurs conseils précieux.

Je souhaite remercier monsieur Jaque GRAFFEUIL et Alain CAZARRE qui m'a accueilli au l'école doctorat et de tous leurs aides gentils et conseils précieuse.

Je remercie également Jean-Baptiste BEGUERET et Dominique FOURMY d'avoir accepté la tâche de rapporteur, ainsi que Alain THIERY pour son présence dans le jury.

Je souhaite remercier François ATRIS, Thomas CHRETIENNOT, et Pierre qui sont camarades dans notre groupe pour leur aide.

Je tiens à remercier au groupe TEAM, en particulier à Laurent MAZENQ, Frank CARCENAC, Emmanuel DARAN, Djaffar BELAHRET, Pascal DUBREUIL, Adrien DESMOULIN pour m'avoir aidé sur la technologie en salle blanche. Et je remercier Marie-Charline BLATCHE pour m'aider les techniques biologiques.

Merci à ma chère femme Junlin CHEN, qui m'avait beaucoup aidé dans la vie et son soutien et amour. Et merci à papa et maman, pour tous leurs soutient et l'amour qui me donne.

# TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>1</b>
<b>CHAPITRE I .....</b>	<b>5</b>
<b>METHODES D'ANALYSE CELLULAIRES EN BIOLOGIE .....</b>	<b>5</b>
1. INTRODUCTION .....	7
2. LES METHODES OPTIQUES USUELLES D'ANALYSE CELLULAIRE : «METHODES SUR TABLE ».....	9
2.1 <i>La microscopie</i> .....	10
2.2 <i>La cytométrie en flux</i> .....	17
2.3 <i>Conclusions</i> .....	21
3. METHODES D'ANALYSE SUR PUCE .....	22
3.1 <i>Biocapteurs</i> .....	23
3.2 <i>Détection mécanique</i> .....	24
3.3 <i>Détection optique</i> .....	25
3.4 <i>Détection électronique</i> .....	26
3.5 <i>Micro-cytométrie et détection électrique</i> .....	28
3.6 <i>Discussions</i> .....	30
4. LES POTENTIALITES DE LA DETECTION ELECTRIQUE HAUTE FREQUENCE POUR LA BIOLOGIE (CELLULAIRE) ..	31
5. BUT DE NOTRE TRAVAIL ET CONCLUSIONS.....	35
<b>CHAPITRE II .....</b>	<b>43</b>
<b>SPECTROSCOPIE DIELECTRIQUE HF : LIQUIDES BIOLOGIQUES ET SUSPENSIONS DE CELLULES.....</b>	<b>43</b>
1. INTRODUCTION .....	45
2. INTERACTION ONDES HF ET MATIERES BIOLOGIQUES/LIQUIDES .....	46
2.1 <i>Propriétés diélectriques de matériaux</i> .....	47
2.2 <i>Permittivité complexe et comportement fréquentiel</i> .....	49
2.3 <i>La relaxation diélectrique</i> .....	51
3. CONCEPTION D'UN MICROSYSTEME DE SPECTROSCOPIE HF DE MATERIAUX BIOLOGIQUES .....	53
3.1 <i>Principe de mesure des propriétés HF d'un matériau</i> .....	54
3.2 <i>Méthodes de mesures des propriétés HF d'un matériau</i> .....	55
3.3 <i>Choix de l'architecture du biocapteur</i> .....	56
3.4 <i>Conception du biocapteur</i> .....	56
4. FABRICATION DU BIOCAPTEUR .....	61
4.1 <i>Elaboration du circuit HF</i> .....	61

4.2	<i>Elaboration des micro-canaux en PDMS</i> .....	63
4.3	<i>L'assemblage de circuit HF et des micro-canaux</i> .....	67
5.	EXPERIMENTATIONS .....	71
5.1	<i>Matériels et méthodes</i> .....	71
5.2	<i>Procédure d'extraction de paramètres du liquide et validation</i> .....	72
5.2	<i>Mélange binaire éthanol/eau</i> .....	77
5.3	<i>Milieu biologique : sérum de veau fœtal en milieu aqueux</i> .....	81
5.4	<i>Cellules en suspension dans leur milieu de culture</i> .....	82
5.5	<i>Différentiation de cellules vivantes/mortes en suspension dans leur milieu de culture</i> .....	86
6.	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES.....	87
 <b>CHAPITRE III</b> .....		<b>91</b>
<b>SPECTROSCOPIE DIELECTRIQUE HF : JUSQU'A LA CELLULE UNIQUE</b> .....		<b>91</b>
1.	INTRODUCTION .....	93
2.	DISPOSITIF DE PIEGEAGE DE CELLULE UNIQUE.....	94
2.1	<i>Manipulation des cellules</i> .....	94
2.2	<i>Piégeage hydrodynamique d'une cellule unique</i> .....	98
2.3	<i>La fabrication des composants</i> .....	104
3.	CONCEPTION DE CIRCUITS HF COMPATIBLE L'ANALYSE D'UNE CELLULE UNIQUE .....	106
3.1	<i>Simulations électromagnétiques</i> .....	107
3.2	<i>Fabrication finale des dispositifs</i> . .....	111
4.	EXPERIMENTATIONS .....	112
4.1	<i>Validation avec des microbilles polystyrènes</i> .....	112
4.2	<i>Lien contrastes capacitif/conductif et contraste diélectrique</i> .....	118
4.3	<i>Spectroscopie hyperfréquence d'une cellule de type Lymphome B</i> .....	121
5.	CONCLUSIONS .....	127
 <b>CHAPITRE IV:</b> .....		<b>131</b>
<b>OPTIMISATION ET AMELIORATION DU SYSTEME DE SPECTROSCOPIE DIELECTRIQUE HF DE CELLULE UNIQUE</b> .....		<b>131</b>
1.	INTRODUCTION .....	132
2.	OPTIMISATION DU BIOCAPTEUR DE CELLULE UNIQUE .....	133
3.	OPTIMISATION DU PIEGEAGE (BLOQUEUR) DE CELLULE UNIQUE.....	138
4.	OPTIMISATION DE LA TECHNOLOGIE BIOCAPTEUR HF DE CELLULE UNIQUE .....	141
4.1	<i>Améliorations de la technologie d'intégration « circuit HF » / « circuit microfluidique »</i> .....	141
4.2	<i>Technologie d'élaboration des bloqueurs optimisées pour la capture efficace de cellule unique</i> .....	143
4.3	<i>Optimisation des volumes de liquide consommé</i> .....	144
4.4.	<i>Développement de la filière de fabrication collective de micro-canaux à base de SU-8</i> .....	145

5. CARACTERISATION AVEC DES CELLULES .....	157
5.1 Comparaison avec la technologie du chapitre III.....	157
5.2 Impact de la diminution du gap de capacité de détection .....	158
5.3 Mesures de cellules vivante et morte .....	159
6. CONCLUSIONS .....	163
<b>CONCLUSION GENERALE.....</b>	<b>167</b>

# Introduction générale

Les sciences évoluent exponentiellement. Plus les connaissances augmentent sur un thème et plus les découvertes qui s'en suivent sont nombreuses et riches.

Nous assistons notamment à l'explosion des applications de l'électronique portable, nos téléphones portables n'ont jamais autant évolués : autonomie, ergonomie, fonctionnalités sont sans cesse repoussées. Les technologies et l'ingénierie œuvrent de concert pour suivre ce que l'on nomme le *more-moore*<sup>1</sup> : c'est à dire la miniaturisation des circuits intégrés électroniques mais aussi, de façon complémentaire (perpendiculaire) le *more-than-moore* qui consiste en la co-intégration des fonctionnalités côte à côte : les circuits radiofréquences, analogiques et numériques, les composants actifs et passifs, les fonctions basses-consommations et hautes-tensions, les capteurs et actionneurs.

Plus récemment, l'International Technology Roadmap for Semiconductor (ITRS) a projeté dans sa «roadmap» l'intégration de fonctionnalités microfluidiques sur les circuits électroniques pour des applications biomédicales.

Les domaines de la biologie et de la médecine aspirent en effet à disposer de nouveaux outils d'analyse et de diagnostic du vivant et les domaines qui se font les plus pressants sont ceux des biologies cellulaire et moléculaire. Ces domaines requièrent en effet des résolutions nanométrique à micrométrique, ce qui n'est pas sans poser des problèmes de sensibilité. Il est de plus nécessaire que les études faites sur des objets uniques soient menées en batterie et l'on pressent ainsi tout ce que peut apporter la microélectronique.

Ainsi les micro et nanotechnologies permettent de miniaturiser les systèmes d'analyse tout en assurant des analyses jusqu'ici non accessibles par des techniques traditionnelles. Notre premier chapitre illustre cette tendance de passer de *systèmes d'analyse sur table* aux *systèmes sur puce*. Nous présentons de plus, au-delà de l'aspect miniaturisation, les avantages apportés par certaines techniques telles que celle que nous proposons : l'analyse par ondes hyperfréquences. Outre leurs avantages, et sans masquer leurs inconvénients, ces nouvelles

---

<sup>1</sup> Gordon Moore a prôné en 1965 que la densité des circuits intégrés doublerait tous les 18 mois, loi encore vérifiée aujourd'hui

techniques permettent, en complémentarité avec les autres techniques existantes ou en développement, d'apporter une nouvelle vision du vivant.

L'exploitation des ondes hyperfréquences est en effet judicieuse à bien des égards pour l'analyse de milieux biologiques. Utiliser depuis longtemps pour chauffer des milieux aqueux (chauffage micro-ondes et hyperthermie) ou mesurer le taux d'humidité de produits alimentaire ou de sols, les ondes électromagnétiques ont une interaction particulière et forte avec les molécules dans la gamme des hyperfréquences. Ainsi nous dérivons au chapitre 2 nos développements sur l'analyse par ondes hyperfréquences de milieux aqueux intégrés grâce aux microtechnologies. Les réponses en fréquence obtenues, qui sont significativement différentes pour des suspensions de cellules vivantes et mortes, pointent les potentialités des techniques hyperfréquences pour la biologie.

Ce résultat est une réelle preuve de concept du bien-fondé de l'emploi conjugué des hyperfréquences et des microtechnologies pour de l'analyse biologique. Toujours dans un souci d'apporter de nouveaux moyens aux biologistes, nous avons ambitionné de prouver que notre technique pouvait analyser une cellule unique. Analyser les mécanismes biologiques à l'échelle de la cellule est en effet devenu une part importante de la cancérologie. Les chapitres 3 et 4 résument nos travaux qui aboutissent, pour la première fois à notre connaissance, à la spectroscopie hyperfréquence d'une cellule unique ; montrant de plus des contrastes significatifs entre cellules vivante et morte.

Nous avons, pour toutes nos études impliquant des milieux biologiques, collaboré avec Mary Poupot et Jean-Jacques Fournié du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse. Ces biologistes consacrent leurs travaux de recherche à l'identification des mécanismes immunologiques responsables de la destruction thérapeutique de lymphomes (cellules cancéreuses) et des modes précis d'action d'anticorps thérapeutiques. Ils étudient de plus comment le microenvironnement de lymphomes promeut des échecs thérapeutiques et des rechutes.

Nous espérons que dans un futur proche, nos travaux sur la spectroscopie non-invasive de cellule unique dans son microenvironnement, leur fourniront une technique complémentaire aux techniques traditionnelles (ou même en rupture) d'investiguer les cellules et leurs mécanismes [1].

Ces développements devront de plus rapidement s'opérer en co-intégration avec des circuits intégrés de traitement des signaux hyperfréquences (sur technologie CMOS ou BiCMOS et avec lesquelles de nombreuses fonctions HF ont d'ores et déjà été développées et continuent de l'être pour des applications télécom [2]) pour aboutir à des systèmes sur puce miniatures, portables, autonomes, ... et pouvant analyser de façon parallélisée un grand nombre de cellule individuelle pour du screening de médicament par exemple [3].

### **Bibliographie**

[1] L. Martinet, R. Poupot, P. Mirshahi, A. Rafii, J. J. Fournié M. Mirshahi and M. Poupot; Hospicells derived from ovarian cancer stroma inhibit T-cell immune responses; *Int J Cancer* ; 126 : 2143-2152; 2010.

[2] T. Taris, R. Severino, Y. Deval, J.B. Begueret ; mm-Waves design trends in BiCMOS technology; Circuits and Systems and TAISA Conference; 2008.

[3] S. H. Kim, T. Yamamoto, D. Fourmy, and T. Fujii; An electroactive microwell array for trapping and lysing single-bacterial cells ; *Biomicrofluidics*; 5(2): 024114; 2011.



# Chapitre I

Méthodes d'analyse  
cellulaires en biologie



# 1. Introduction

La discipline d'étude des cellules : 'la biologie cellulaire' est née après l'observation et la description des microorganismes par Antoni van Leeuwenhoek en 1677, qui réussit à en obtenir de forts grossissements (300 ×) grâce à un microscope simple composé d'une seule petite lentille quasi sphérique [1]. Une photographie du microscope utilisé par Antoni van Leeuwenhoek pour observer les bactéries et microorganismes est présentée à la figure I.1.

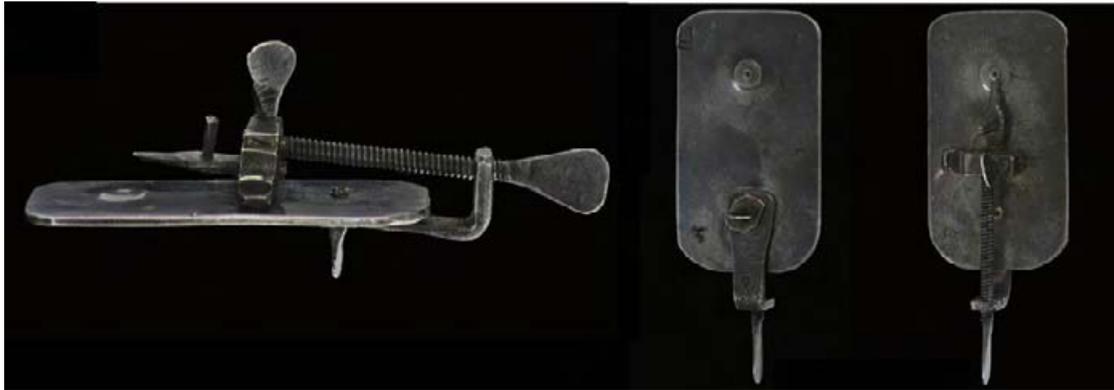


Figure I.1. Le microscope utilisé par Antoni van Leeuwenhoek permettant la première observation de bactéries et microorganismes [1].

Il a fallu attendre les années 1830 pour que l'importance de l'analyse des cellules s'établisse. En 1838, Matthias Schleiden, un Allemand avocat, devenu botaniste, a conclu que, malgré les différences de structure des tissus, les plantes sont constituées de cellules et l'embryon végétal est issu d'une seule cellule. En 1839, Theodor Schwann, un zoologiste allemand et collègue de Schleiden, a publié un rapport détaillé sur la base cellulaire de la vie animale [2].

Aujourd'hui, la biologie cellulaire (anciennement cytologie) est devenue une discipline à l'état de l'art : elle présente une des plus fortes croissances dans les sciences biologiques contemporaines. Cette discipline étudie les cellules, leurs propriétés physiologiques, leur structure, les organites qu'elles contiennent, les interactions avec leur environnement, leur cycle de vie, la division et la mort, qui s'établissent à la fois à un niveau microscopique et moléculaire. Des recherches en biologie cellulaire englobent à la fois la grande diversité des organismes unicellulaires, comme les bactéries et les protozoaires, ainsi que les nombreuses

cellules spécialisées dans les organismes pluricellulaires comme les humains [3]. Connaître les constituants des cellules et le fonctionnement des cellules est fondamental pour toutes les sciences biologiques. Apprécier les similitudes et les différences entre les types de cellules est particulièrement important dans les domaines de la biologie cellulaire et moléculaire, et des domaines biomédicaux tels que les recherches sur la cancérologie.

En raison de la très petite taille des objets biologiques cellulaires et moléculaires, la biologie cellulaire est de plus en plus dépendante des développements de nouveaux instruments ainsi que des technologies associées. En conséquence, il est impératif pour tout biologiste cellulaire et moléculaire de connaître et maîtriser les technologies nécessaires à la collecte de données biologiques [4]. Après plus de 150 ans de développements, les techniques (traditionnelles) et l'instrumentation associée (et commercialisée) pour l'étude des cellules sont matures et très bien établies dans les laboratoires de biologie.

Mais les derniers développements de la biologie cellulaire, notamment dans le contexte de la compréhension des mécanismes du cancer, ont amené depuis les dix dernières années, le développement de nouvelles technologies pour étudier finement et extensivement les cellules : via une approche nommée 'lab-on-a-chip'. Les méthodes à l'échelle « micrométrique » sont des technologies nouvellement développées qui tirent profit des micro (et nano) technologies (souvent nommées MEMS pour Micro Electro Mechanical System) servant à miniaturiser des instruments traditionnels ou à développer de nouvelles méthodes d'analyse. Ces nouvelles techniques, connues sous le nom de 'bio-MEMS', deviennent une tendance importante dans le domaine de recherche cellulaire ; et l'exemple le plus frappant consiste à établir la carte génétique de cellules à l'aide d'un réseau de milliers de chambres élémentaires de réaction intégré sur une puce (d'où la notion de lab-on-a-chip), comme illustré à la figure I.2.



Figure I.2: Puce à identification de gènes (Affymetrix)

Dans ce chapitre, nous allons introduire et discuter les méthodes et les instruments les plus couramment utilisés dans le domaine de la biologie cellulaire ; puis nous présenterons de nouvelles technologies d'analyse cellulaire miniaturisées.

## 2. Les méthodes optiques usuelles d'analyse cellulaire : « méthodes sur table »

Les méthodes d'analyse cellulaire usuelles utilisant des instrumentations commercialisées peuvent être divisées en deux catégories principales: (1) l'analyse de cellules fixées et (2) les techniques de cytométrie en flux.

Pour l'analyse de cellules fixées, la technique reine reste la microscopie avec toutes ses variantes. Les échantillons de cellules sont fixés sur une lame ou boîte de Pétri et observés par un microscope en acquérant des images ou en analysant quantitativement des paramètres morphologiques de la cellule ou encore en étudiant leur contenu intracellulaire par marquage via des composants biochimiques. Cela comprend le microscope optique, la microscopie par fluorescence, la microscopie à contraste de phase, le microscope électronique à transmission, le microscope électronique à balayage, etc.

La cytométrie en flux (CMF) est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, en les comptant et en les caractérisant [5]. C'est la lumière réémise (par diffusion ou par fluorescence) qui permet de classer la population suivant plusieurs critères et de les trier. La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de particules isolées ou de cellules, bactéries, etc. (vivantes ou mortes) entraînées par un flux liquide ou gazeux. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un liquide [6-8].

## 2.1 La microscopie

Il y a trois branches connues de la microscopie : optique; électronique et la microscopie à sonde de balayage. [9]. La microscopie optique et électronique implique la diffraction, la réflexion, la réfraction des rayonnements électromagnétiques ou de faisceaux d'électrons en interaction avec l'échantillon, et collecte ces rayonnements afin de créer une image. La microscopie à sonde locale forme des images de surface à l'aide d'une sonde physique qui balaye l'échantillon [10], un type connu est le microscope à force atomique (AFM).

### 2.1.1 Microscopie optique

Le microscope optique est muni d'un objectif et d'un oculaire qui permet de grossir l'image d'un objet de petites dimensions et de séparer les détails de cette image (et son pouvoir de résolution) afin qu'il soit observable par l'œil humain [11]. Les microscopes optiques peuvent être très simples. La figure I.3 montre l'image et le schéma constitutif d'un microscope optique simple, mais il existe beaucoup de conceptions complexes qui visent à améliorer la résolution et le contraste de l'échantillon. De plus, l'image d'un microscope optique peut être capturée par les caméras qui sont sensibles à la lumière pour produire une micrographie. Initialement les images ont été capturées par film photographique, mais les développements modernes dans le CMOS et Charge-Coupled Device (CCD) ont grandement amélioré la qualité des appareils photo numériques permettant la capture d'images numériques avec une résolution suffisante [12]. Des microscopes purement numériques sont maintenant disponibles et utilisent une caméra CCD qui permet d'examiner un échantillon, montrant l'image obtenue directement sur un écran d'ordinateur sans avoir besoin d'oculaires.

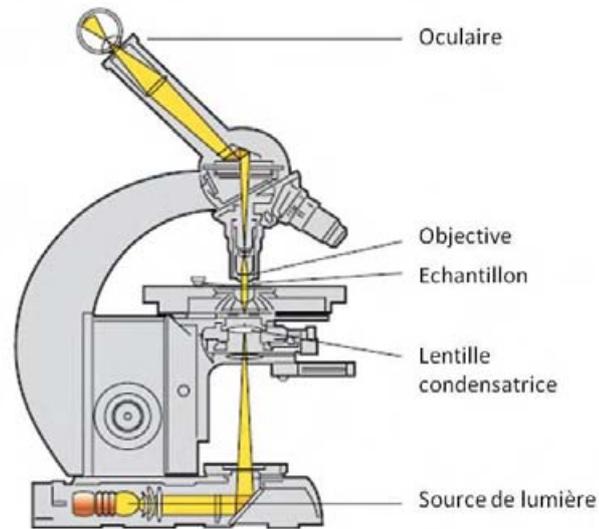


Figure I.3. Le microscope optique et son schéma constitutif.

Parfois, les petits objets translucides, comme une cellule vivante, sont très difficile à observer avec un microscope optique normal (Figure I.4 (A)). Le microscope à contraste de phase permet de rendre les objets très transparents visibles. Le principe de ce microscope est d'exploiter les changements de phase d'une onde lumineuse traversant un échantillon [13-14]. On peut distinguer les différentes parties d'un objet parce qu'elles affectent (réfractent) la lumière différemment les unes des autres (Figure I.4 (B)). Le contraste ainsi obtenu relate des différences d'indice de réfraction. Les organites cellulaires sont en effet constitués de différentes proportions de molécules: ADN, ARN, protéines, lipides, glucides, des sels et de l'eau qui sont susceptibles d'avoir des indices de réfraction différents. Normalement, ces différences ne peuvent pas être détectées par nos yeux. Toutefois, le microscope à contraste de phase convertit ces différences d'indice de réfraction en intensité (luminosité relative à l'obscurité) visible à l'œil [15].

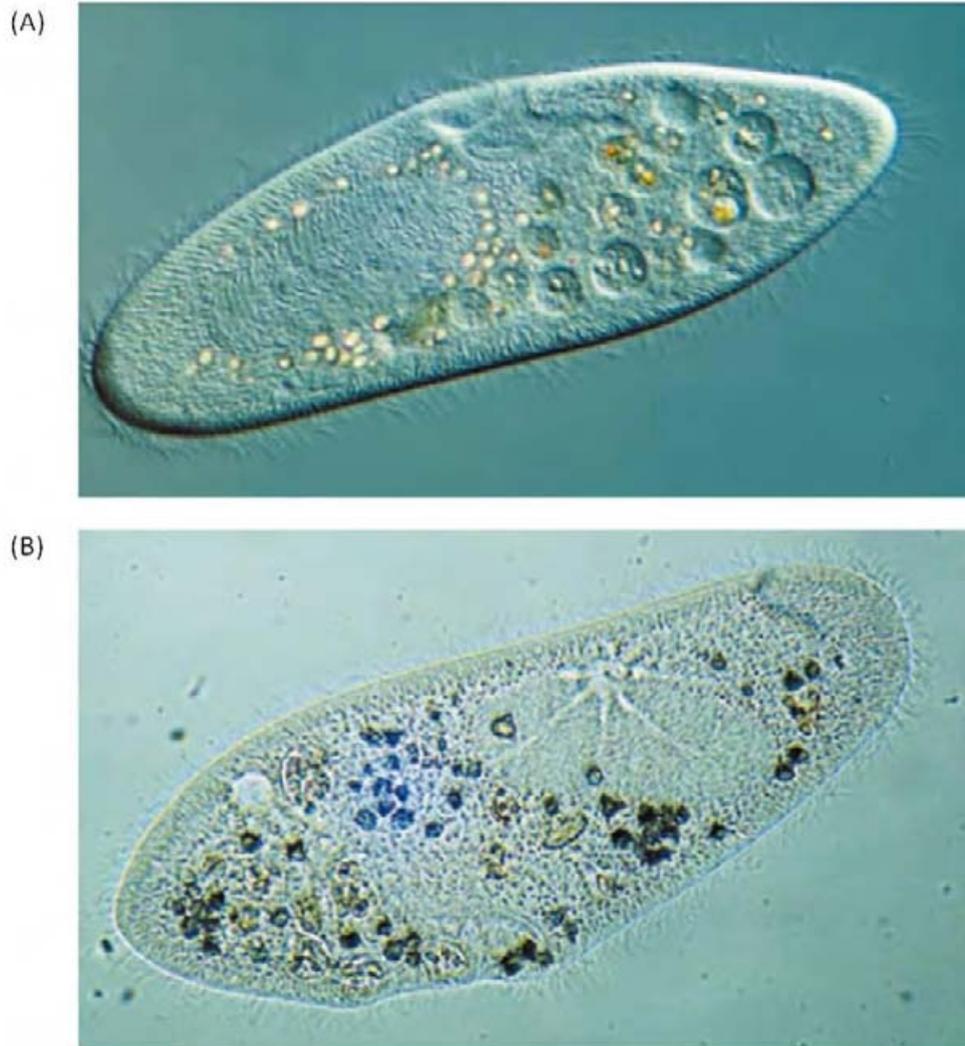


Figure I.4. Une comparaison des cellules observées avec différents types de microscopes optiques. (A) Microscope optique normal (champ clair). (B) Le microscope à contraste de phase. (Micrographes par M. I. Walker/Photo Researchers, INC)

Une autre variation de la microscopie optique est la microscopie en fluorescence, tirant profit du phénomène de fluorescence et de phosphorescence, au lieu de, ou en plus de l'observation classique par réflexion (physique) ou absorption de la lumière visible naturelle ou artificielle [16-17]. La microscopie en fluorescence est un excellent outil pour l'étude des matériaux qui peuvent être amenés à fluorescer, soit sous sa forme naturelle ou lorsqu'ils sont traités avec des produits chimiques susceptibles d'entrer en fluorescence [18], soit par des techniques d'étiquetage par des tags fluorescents [16]. Dans l'une de ses applications les plus courantes, un fluorochrome est lié de manière covalente (conjugué) à un anticorps pour produire un anticorps fluorescent qui peut être utilisé pour déterminer l'emplacement d'une protéine spécifique à l'intérieur de la cellule. Les protéines ainsi marquées par fluorescence

peuvent ainsi être utilisés pour étudier un processus dynamique comme il peut se produire dans une cellule vivante. Par exemple, un fluorochrome spécifique peut être lié à une protéine cellulaire, telle que l'actine ou la tubuline, et la protéine marquée par fluorescence est injectée dans une cellule vivante : on peut ainsi observer et suivre leurs emplacements par microscopie, révélant les activités dynamiques dans lesquelles la protéine participe [19]. Deux images de cellules sous microscope à fluorescence sont illustrées à la figure I.5. La microscopie en fluorescence est un des plus importants moyens d'analyse utilisé dans le domaine de biologie cellulaire, souvent employé par des instruments sur table mais aussi utilisé dans les systèmes miniaturisés.

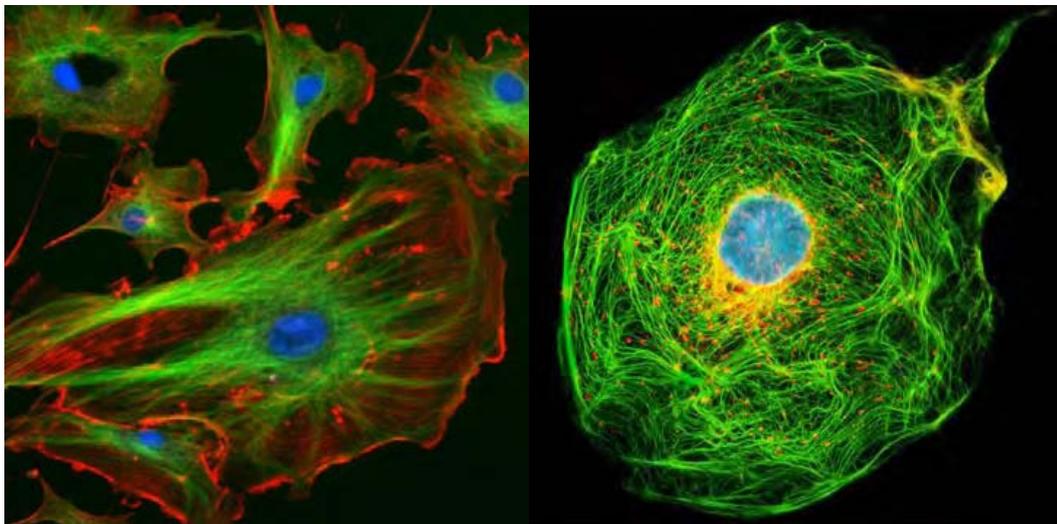


Figure I.5. Image des cellules sous microscope à fluorescence, à gauche : les cellules endothéliales ; à droite : une cellule épithéliale de rein de rat kangourou masculin (Photo par Nikon.Inc). Les différentes parties des cellules sont marquées par différentes couleurs de fluorochrome.

Un des gros avantages des microscopes optiques est la possibilité d'observer les cellules vivantes. Il est possible d'observer un large éventail de l'activité biologique. De plus, le faible coût des microscopes optiques les rend utiles dans une large gamme de domaines différents. Cependant, leurs résolutions sont réduites par une limite physique imposée par la longueur d'onde de la lumière. Et en biologie, il est nécessaire, au préalable, de pré-conditionner l'échantillon : soit il faut placer la coupe de tissu (ou le liquide contenant des organismes vivants) entre deux lames par exemple, soit il faut au préalable marquer par un ou plusieurs fluorochromes les objets que l'on souhaite observer, soit les deux à la fois. Du fait de la

préparation, la microscopie optique nécessite une importante quantité d'appareils complémentaires pour la seule destination de l'observation microscopique [20].

### 2.1.2 Microscope électronique

Un microscope électronique est un type de microscope qui utilise un faisceau de particules d'électrons pour illuminer un échantillon et en créer une image très agrandie. Les microscopes électroniques ont un plus grand pouvoir de résolution que les microscopes optiques qui utilisent des rayonnements électromagnétiques et peuvent obtenir des grossissements beaucoup plus élevés allant jusqu'à 2 millions de fois, alors que les meilleurs microscopes optiques sont limités à un grossissement de 2000 fois [21]. On trouve deux types principaux de microscope électronique : microscope électronique en transmission (MET) utilisant des électrons qui sont transmis à travers un échantillon, tandis que les microscopes électroniques à balayage (MEB) utilisent des électrons qui rebondissent sur la surface de l'échantillon [22-23]. Le MET a été exploité plus largement à l'examen de la structure interne des cellules. En revanche, le MEB est utilisé principalement pour examiner les surfaces d'objets. Notons que les échantillons biologiques observés dans les deux types de microscope électronique nécessitent un traitement préalable afin d'aboutir à un échantillon approprié [20]. La figure I.6(A) (B) présente quelques images de cellules prises avec un MET et (C) (D) les images des cellules humaines avec un MEB.

Malheureusement, les microscopes électroniques présentent une série de désavantages : ils sont extrêmement coûteux et les échantillons doivent être complètement secs, il est donc impossible d'observer des spécimens vivants ; la préparation des échantillons est souvent complexe, etc...

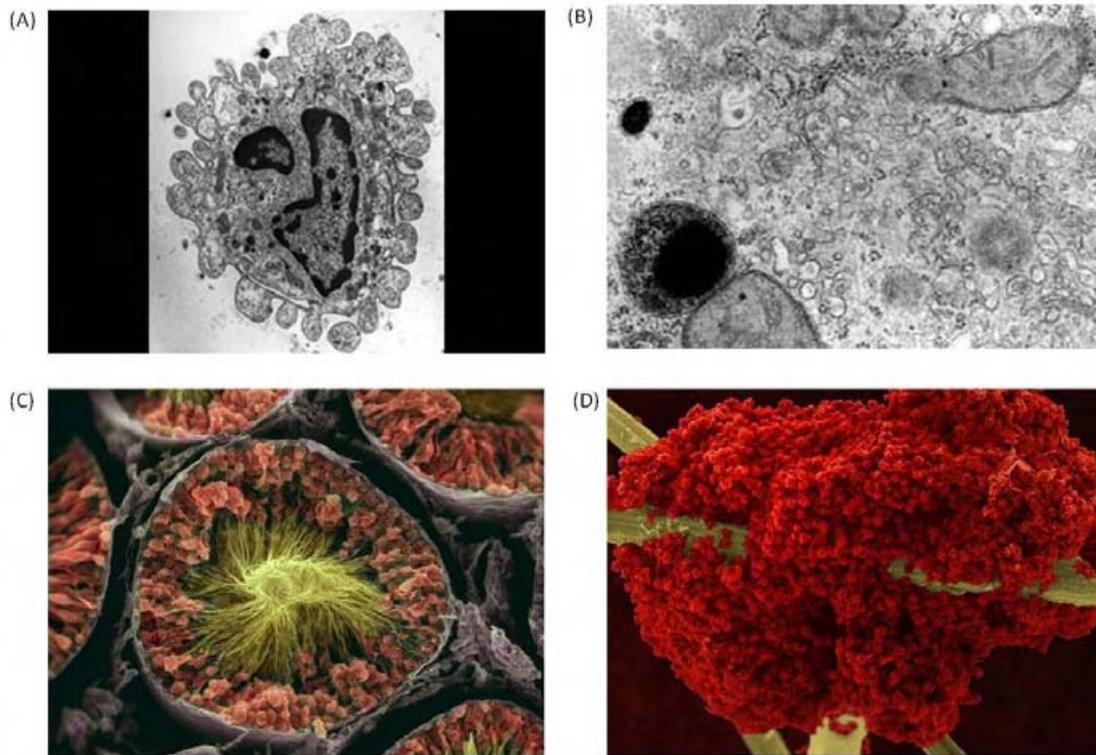


Figure I.6. Images prises par des microscopes électroniques (A) Cette image montre une cellule morte par MET. (B) du cytoplasme de cellules hépatiques par MET (Photos par Björn Afzelius). (C) La queue d'un spermatozoïde par MEB (D) Un caillot de sang sur les fibres d'un pansement de gaze par MEB. (Photos par FEI.Inc)

### 2.1.3 Microscope à force atomique

Le microscope à force atomique (AFM pour Atomic Force Microscope) est un type de microscope à sonde locale permettant de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. Inventé en 1985, par G.Binnig, F.Quate et C. Gerber, ce type de microscope est essentiellement basé sur l'analyse d'un objet point par point au moyen d'un balayage via une sonde locale, assimilable à une pointe effilée. Ce mode d'observation permet alors, de réaliser la cartographie locale de grandeurs physiques caractéristiques de l'objet sondé (rigidité, capacité, résistivité, ...) mais également de travailler dans des environnements particuliers tels que des milieux sous vide, liquides ou ambiants [24]. La microscopie à force atomique (AFM) est donc une technique qui constitue une plate-forme polyvalente pour l'imagerie (et même la manipulation) de cellules vivantes jusqu'à la molécule unique, ce qui permet de répondre à des questions pertinentes dans les domaines clés de la biologie cellulaire, y compris l'adhésion

cellulaire et la signalisation, la division cellulaire, la pathogenèse microbienne ... [25]. La figure I.7 présente la photographie d'une poutre AFM à gauche, et à droite 4 images de l'organisation nanométrique de peptidoglycane dans des cellules vivantes de lactis (travail effectué par Guillaume Andre et al [26]).

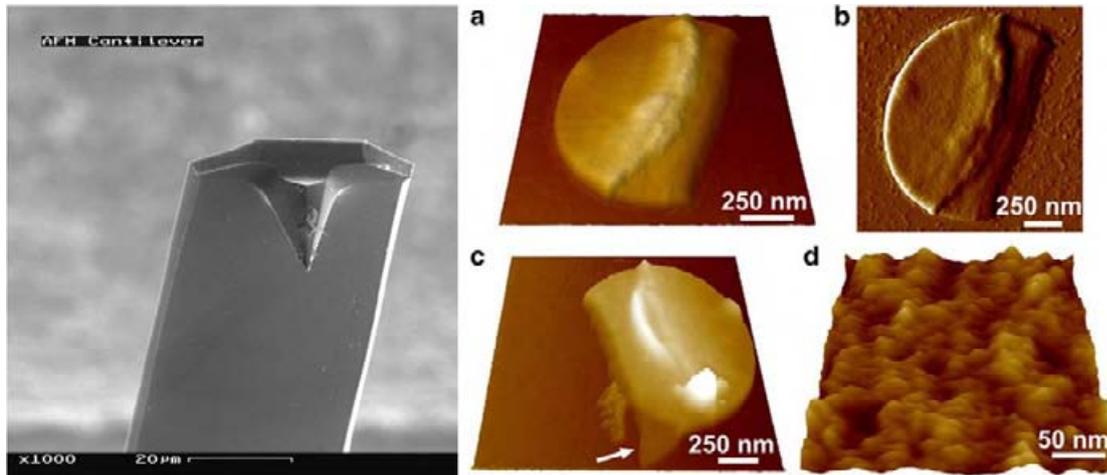


Figure I.7. A gauche : photographie d'une poutre AFM. A droite : Image AFM de l'organisation nanométrique de peptidoglycane dans des cellules vivantes de lactis [26].

Par rapport au microscope électronique à balayage, la microscopie à force atomique présente de nombreux avantages. Elle offre une véritable vision de surface en trois dimensions. En même temps, l'AFM ne nécessite aucun traitement particulier des échantillons (certaines techniques MEB utilisent des traitements à base de cuivre ou de carbone, qui provoquent des dommages irréversibles). De plus, alors que les analyses MEB doivent être exécutées dans des conditions de vide poussé, le microscope à force atomique peut opérer sous pression atmosphérique et même en environnement liquide, et ce sans compromis sur les résultats. L'AFM peut de plus être utilisé pour étudier des cellules, des bactéries ou molécules biologiques, ou même de tissus biologiques. La figure I.8 présente une image optique (A) et de la rigidité (module d'Young) (B) d'une bactérie vivante [27]. Une telle analyse permet de suivre l'état de rigidité d'objets biologiques au cours de processus et de les relier avec des états biologiques. Dans [27], par exemple, il est démontré que des bactéries vivantes et mortes ne présentent pas le même état de rigidité, ce qui permet d'envisager l'utilisation de cet outil pour la détection ou le criblage de la viabilité cellulaire.

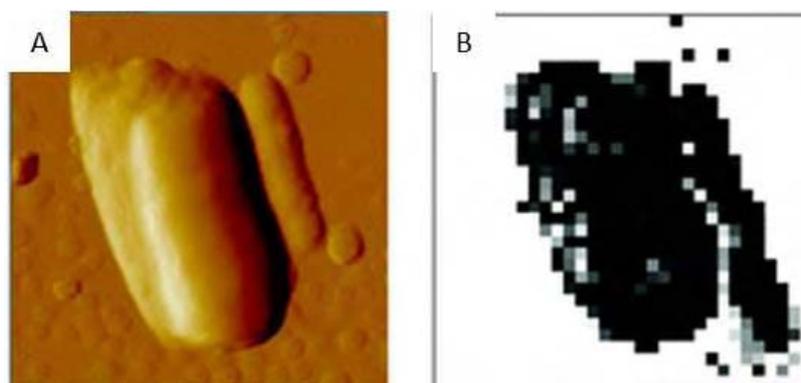


Figure I.8 : Image optique (A) et de la rigidité (B) d'une bactérie vivante [27].

Les inconvénients de l'AFM (conséquence de la forte résolution de cette technique) sont qu'il fournit une image de faible dimension (quelques centaines de  $\mu\text{m}^2$  typiquement), qu'il est assez lent pour effectuer cette acquisition et que beaucoup de phénomènes influencent la réponse de la sonde (cela nécessite une maîtrise parfaite de la technique).

#### 2.1.4 Discussions

Les développements des microscopes sont incessants afin d'améliorer leurs performances, leur résolution, et d'ajouter de nouvelles fonctionnalités. Ils ont toujours un rôle très important en biologie pour l'étude de cellules, éventuellement de la cellule unique, en particulier pour l'étude des cellules cancéreuses.

## 2.2 La cytométrie en flux

La cytométrie en flux (en abrégé FCM) est une technique de comptage et d'étude de particules microscopiques, telles que les cellules et les chromosomes. Ces derniers sont suspendus dans un flux de liquide et passés devant un appareil de détection optique ou électronique. Il permet simultanément une analyse multiparamétrique des caractéristiques physiques ou chimiques de quelques milliers de particules par seconde. La technologie a des applications dans un certain nombre de domaines, y compris la biologie moléculaire, la pathologie, l'immunologie, la biologie végétale et biologie marine. Elle est un outil particulièrement puissant pour la biologie cellulaire. En effet, cette technique permet de déterminer énormément de caractéristiques d'une suspension de cellules : son état d'activation,

de maturation, de prolifération, ou de mort. Elle permet également de séparer des informations concernant des cellules différentes, présentes dans la même suspension ; elle permet même de trier ces cellules, de les séparer physiquement, pour pouvoir obtenir des populations pures à partir d'un mélange [28].

### 2.2.1 Principes

Il s'agit d'analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc. Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs aux propriétés optiques intrinsèques des particules qui correspondent aux phénomènes de diffusion lumineuse liés aux dimensions de la particule, à leur structure interne ou à l'auto-fluorescence de certaines cellules comme les végétaux, le phytoplancton, etc. Ils sont relatifs aussi aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenues par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires [29]. Le procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'événements par seconde.

Le cytomètre en flux comprend trois parties :

- un réseau fluidique constitué d'une veine liquide s'écoulant à vitesse constante qui entraîne et focalise un deuxième flux liquide contenant l'échantillon,
- un banc optique avec une ou plusieurs sources lumineuses et ses détecteurs de type photodiode (pour la diffusion de la lumière) et des photomultiplicateurs et filtres optiques qui permettent de quantifier les diverses fluorescences émises par chaque objet,
- un microprocesseur qui convertit les signaux électriques en signaux numériques, coordonne les données, prépare les représentations graphiques et les analyses statistiques.

Le schéma du principe de FCM est illustré à la figure I.9.

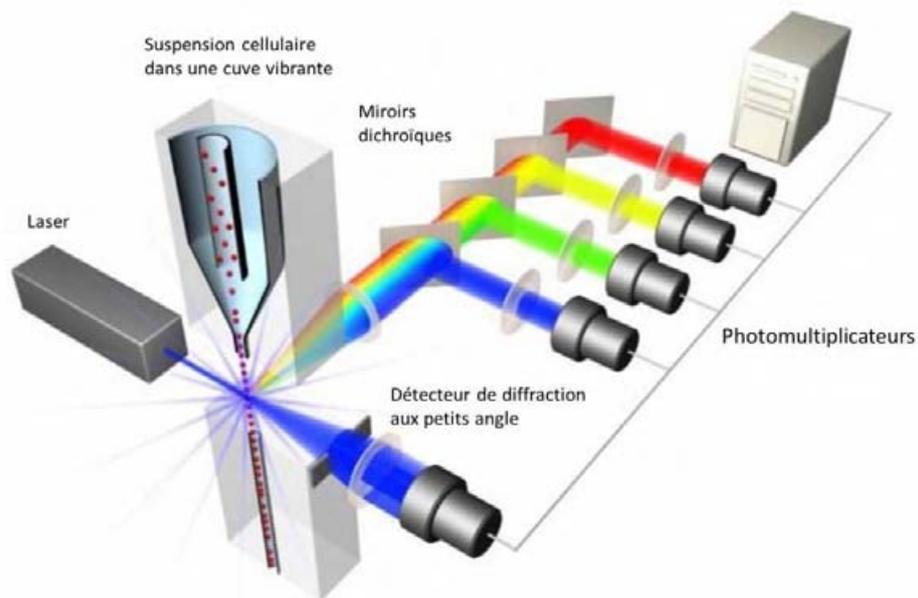


Figure I.9. Schéma du principe d'un FCM.

### 2.2.2 Une fonctionnalité importante : tri de cellule activé par fluorescence

Le tri de cellules activé par fluorescence est une option de la cytométrie en flux. Il fournit une méthode pour un mélange hétérogène de cellules biologiques de trier les particules dans des (2 ou plus) contenants, cellule par cellule, et basé sur les réponses (signaux fluorescents) de chaque élément [30].

Par rapport au FCM, on trouve un mécanisme de vibration qui provoque des ruptures en gouttelettes individuelles du flux de cellules. Le système est réglé de sorte que la probabilité soit faible d'avoir plus d'une cellule par gouttelette. Juste avant que le flux ne se brise en gouttelettes, il traverse la partie optique/électronique mesurant la fluorescence de chaque cellule. En fonction des réponses, une charge électrique est induite dans chaque gouttelette. Les gouttelettes chargées passent ensuite par un système de déflexion électrostatique qui détourne les gouttelettes dans des conteneurs en fonction de leur charge. [30-31]. La figure I.10 démontre le schéma de tri cellulaire activé par fluorescence [32].

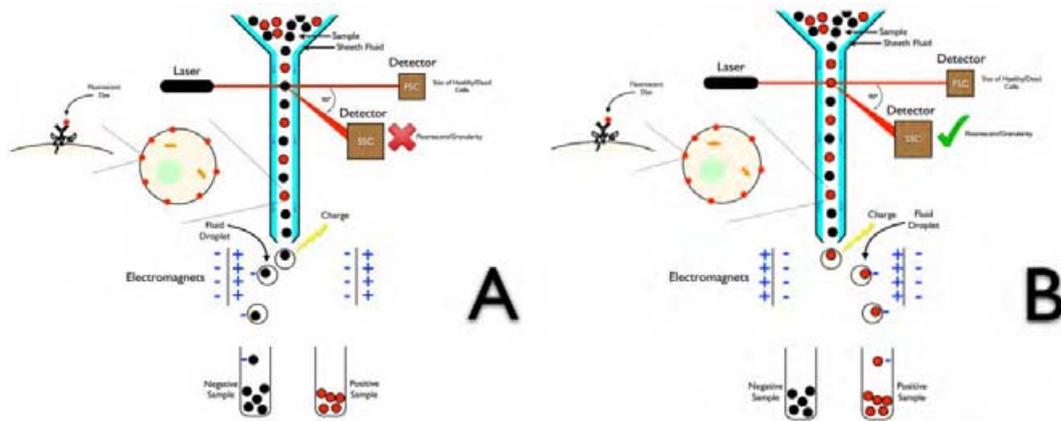


Figure I.10 Schéma expliquant le tri cellulaire activé par fluorescence [32].

### 2.2.3 Discussions

En 1973, BD corporation, en coopération avec l'Université de Stanford, a développé et produit le premier cytomètre de flux commercial : FACS I. Depuis les équipements de cytométrie en flux sont entrés dans une ère de rapide développement. Le succès du CMF est basé sur la disponibilité de l'équipement commercial qui est à la fois robuste et polyvalent. Il permet de plus l'acquisition de données biologiques « modernes » et le logiciel d'interprétation est très puissant. Le CMF doit aussi son succès au développement des méthodes de marquage qui offrent à l'heure actuelle une panoplie gigantesque de possibilités [33]. La figure I.11 présente le nouveau produit de BD Corporation- 'Influx™ cell sorter', qui dispose d'une architecture modulaire et d'une puissante combinaison de capacités de détection et des performances élevées pour permettre aux chercheurs de répondre aux exigences essentielles d'efficacité et de précision d'analyse.

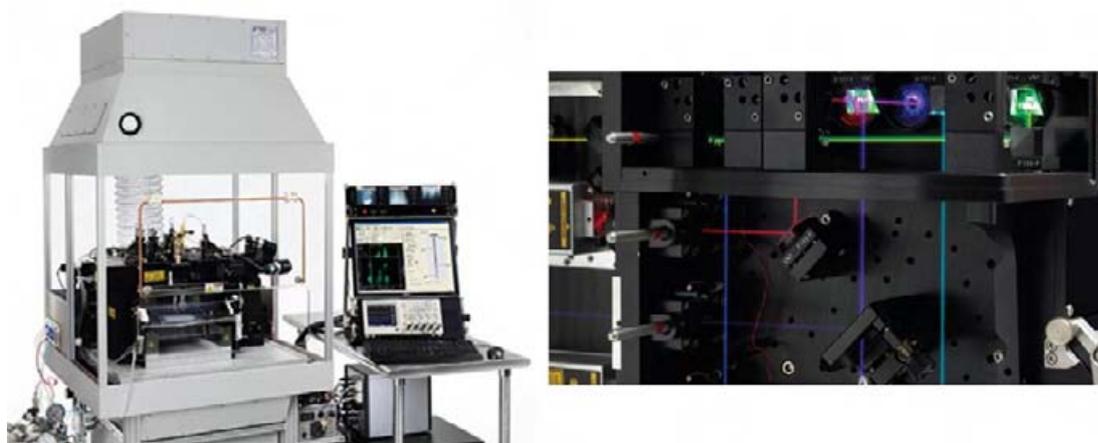


Figure I.11 A gauche, vue d'ensemble de l'instrument BD influx, à droite, le système de miroir dichroïque et photomultiplicateur. (Photos par BD.INC).

Les cytomètres sont largement utilisés dans les laboratoires et cliniques pour les analyses et diagnostics cellulaires. Plusieurs applications de la cytométrie en flux peuvent actuellement être appliquées à l'étude du cancer : la détection de l'ADN des cellules tumorales aneuploïdie, l'analyse de la prolifération des cellules tumorales et l'immunophénotypage des leucémies [34]. Cependant, leur encombrement et leur prix ainsi que le coût des consommables pour le marquage sont parmi les points faibles de cette technique, ce qui laisse des degrés de liberté aux techniques alternatives.

## 2.3 Conclusions

Les méthodes d'analyse cellulaire sur table traditionnelles ont évolué sur plusieurs décennies et sont désormais la base d'instruments commerciaux « populaires dans les laboratoires de biologie » permettant l'étude morphologique des cellules, leur caractérisation biologique, la composition et le contenu de la composition cellulaire biochimique et la sorte cellulaire grâce à la capture et au traitement d'images et à l'analyse des données. Ils sont largement utilisés dans les laboratoires et cliniques pour étudier et analyser des cellules telles que les cellules cancéreuses et des cellules de différentes pathologies. Face à la (grande) puissance de ces techniques sur table, nous opposons un inconvénient majeur :

Toutes les techniques évoluées optiques reposent sur une étape de marquage (par tag fluorescent) préalable des cellules : cette étape est longue, parfois coûteuse, interdite pour certaines études/configurations. L'on est de plus en droit de se questionner sur l'interférence que peut avoir le tag avec le processus que l'on désire observer. Cette invasivité est de plus en plus totale lors de l'utilisation du MEB (échantillons fixés et séchés puis mis dans un vide pour analyse), et une solution innovante est apportée par l'utilisation de l'AFM en milieu liquide qui mobilise de plus en plus de recherches, mais encore non accessible en routine par les biologistes et médecins.

C'est pour apporter une réponse à cette déficience que de nombreuses techniques alternatives sont étudiées. De plus afin d'obtenir des systèmes faible coût, largement

diffusables dans le monde et aux grandes capacités d'analyse, ces nouvelles voies d'analyse doivent être intégrées grâce aux micro-(nano-) technologies. Ceci fait l'objet du paragraphe suivant.

### 3. Méthodes d'analyse sur puce

Depuis la création des MEMS : *Micro Electro Mechanical Systems* dans les années 1970 et leur large succès commercial consécutif, cette technologie s'est rapidement étendue aux domaines de la biologie et médical. En plus des composants de base, tels que les microcanaux, microvannes, micropompes, micromélanges et microréacteurs pour la gestion des flux de volumes microscopiques, divers nouveaux capteurs et plates-formes de détection ont été développés en conjonction de la microfluidique : les "BioMEMS" qui sont aussi connus sous les noms de "biosensors", "lab on chips" ou "μ-TAS" (pour Micro-Total Analysis Systems) [35-36]. Les bioMEMS regroupent maintenant un domaine en plein essor de recherche de fortes potentialités dans une grande variété d'applications biomédicales [37]. Les domaines « chauds » de recherche incluent le diagnostic de l'ADN, les micro-réseaux d'analyse de protéines; le développement de nouveaux matériaux pour Bio-MEMS ; la microfluidique ; l'ingénierie de surface des BioMEMS, les BioMEMS implantables; les systèmes de délivrance de médicaments, etc. [38]. Un grand nombre de MEMS pour la biologie et médecine a déjà été publié Le récent rapport de *Yole Développement* prévoit quant à lui une augmentation du marché de 1000 M\$ en 2009 à 4500 M\$ en 2015 (Figure I.12) [39].

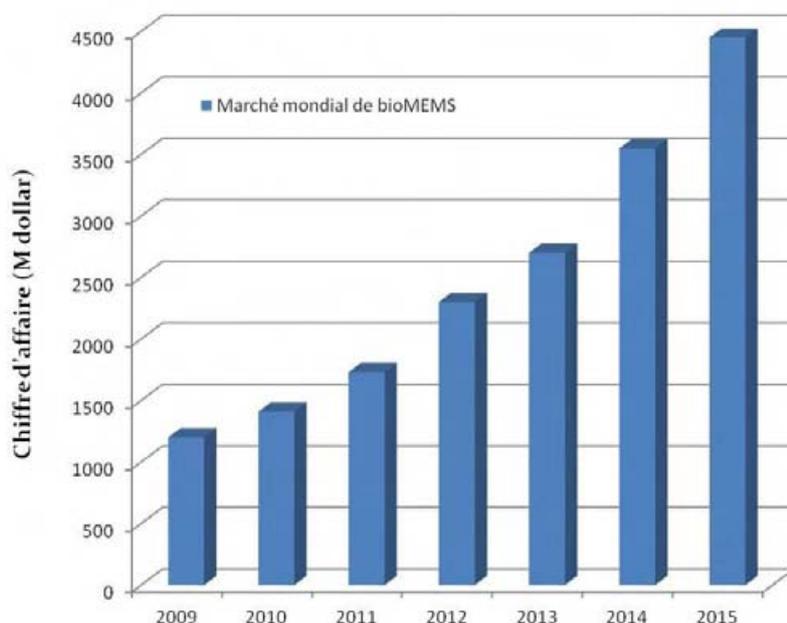


Figure I.12 Evolution et perspectives du marché mondial des BioMEMS depuis l'année 2009 [39].

Avec les bioMEMS, les échantillons biologiques peuvent être traités sous très faibles volumes (du microlitre jusqu'au picolitre), et analysés dans une manière rapide. Ils réduisent considérablement l'implication nécessaire de l'homme dans de nombreuses étapes de manipulation des échantillons et le traitement de données, et par conséquent, diminuent les problèmes de contamination, de fiabilité et de risques sécuritaires. Ils permettent ainsi d'améliorer la qualité des analyses, de réduire leur coût et leur durée tout en assurant une parallélisation massive des expérimentations [40].

Nous allons, dans les paragraphes suivants, discuter quelques exemples d'applications des bioMEMS dans le domaine de la biologie cellulaire notamment.

### 3.1 Biocapteurs

Les biocapteurs sont des dispositifs d'analyse qui combinent un élément biologiquement sensible avec un transducteur physique ou chimique pour sélectivement et quantitativement détecter la présence de composés spécifiques dans un environnement externe [41]. Ces biocapteurs peuvent être utilisés pour détecter des cellules, des protéines, de l'ADN, ou de petites molécules.

Les concepts de base de fonctionnement d'un biocapteur peuvent être illustrés à l'aide de la figure I.13. Un bioélément spécifique ou appelé biorécepteur, telle qu'une enzyme, identifie un échantillon spécifique et l'élément transducteur transforme cette identification en un signal électrique [42].

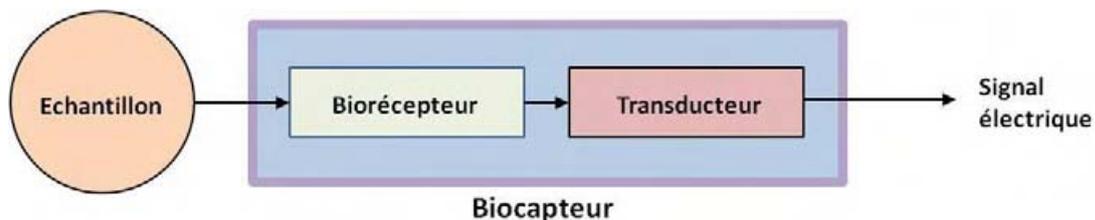


Figure I.13. Représentation schématique de fonctionnement d'un biocapteur [42].

Les biocapteurs peuvent être classés soit par leurs types de bio-récepteurs soit par leur type de transducteur (notre choix pour de ce chapitre). Certains types de capteurs couramment utilisés sont présentés ci-dessous, notamment à transduction : mécanique, optique, électrique, etc.

### 3.2 Détection mécanique

La détection mécanique d'entités ou de réactions biochimiques a été récemment miniaturisée par l'utilisation de poutres vibrantes micro- et nanométriques intégrées sur puce. En statique, une structure de type poutre se plie lorsque la contrainte mécanique n'est pas uniforme sur sa longueur. La contrainte sur l'une des surfaces de la poutre peut être modifiée par adsorption physique ou liaison chimique des molécules analysées, par exemple l'ADN [43], comme illustré à la figure I.14.

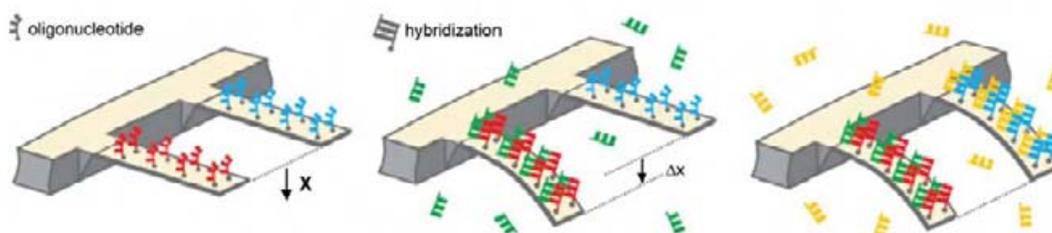


Figure I.14. Schéma de principe de la détection d'ADN en utilisant des poutres micromécaniques [43].

En dynamique, lorsque la poutre vibre, le raisonnement est basé sur la modification des propriétés de résonance de la poutre. Une modification de sa masse se traduira par une variation de la fréquence de résonance [44]. La détection des particules grosses comme des cellules ou des micro-organismes a été démontrée à l'aide de cette méthode [45-46].

Dans tous les modes de détection, un tel biocapteur devra transformer (= transduction) sa déformation mécanique en un signal électrique. Un certain nombre de principes de transduction ont été utilisés au cours des années pour convertir les déplacements mécaniques

en signaux électriques, tels que ceux basés sur l'optique (même principal que celui de l'AFM), la transduction capacitive, l'effet piézorésistif, etc. De plus, afin d'augmenter la sensibilité et la résolution des mesures, des éléments du traitement du signal peuvent être intégrés à côté du capteur mécanique sur une technologie CMOS [44, 47]. La figure I.15 présente une poutre résonnante intégrée en technologie CMOS.

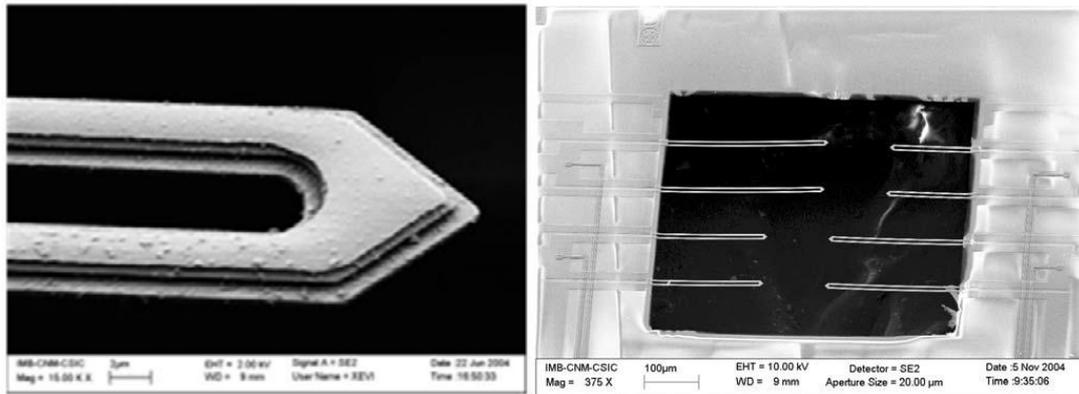


Figure I.15. Biocapteur mécanique intégré sur technologie CMOS [47].

La détection mécanique ne demande quant à elle, et à contrario des techniques optiques, pas de marqueur, ce qui représente une propriété intéressante pour un biocapteur. Cependant il exige une très grande précision de réalisation et une bio-fonctionnalisation. Le paragraphe suivant présente un cas particulier (important) de la détection mécanique qui a l'avantage d'utiliser un outil commercialement disponible.

### 3.3 Détection optique

Les techniques de détection optique tendent elles-aussi à se miniaturiser. T. Vo-Dinh et al [48] présente la détection optique sur puce CMOS (surface totale dans la gamme de la dizaine de  $\text{mm}^2$ ) d'E.Coli en utilisant des anticorps marqués par fluorescence. Un autre exemple exploite la bio-chimiluminescence (technique optique sans marquage) : génération de la lumière par la libération de l'énergie à la suite d'une réaction chimique. Dans [49], l'émission de lumière d'un réseau de microchambres imprimées dans un polymère (dénommé ChemChip) a été observée via un capteur CCD.

Nous ne nous attarderons pas plus sur toutes ces voies possibles de réaliser des biocapteurs miniaturisés. Elles sont toutes pertinentes, chacune ayant ses points forts et ses points faibles. Nous proposons de terminer notre tour d'horizon des techniques d'analyses biologiques par celles qui exploitent les ondes électriques.

### 3.4 Détection électronique

Les techniques de détection électrique ou électrochimique ont également été utilisées couramment dans les biocapteurs. Ils peuvent être déclinés en plusieurs familles suivant les techniques : ampérométrique, potentiométrique, conductimétrique [38], mais aussi capacitive, diélectrique, ...

Les biocapteurs électriques sont utilisés classiquement pour détecter le glucose ou la valeur du pH (il existe des instruments commerciaux de ce type depuis fort longtemps). Ils permettent aussi d'analyser des cellules : en 1991 Erwin Neher et Bert Sakmann à Göttingen reçoivent le prix Nobel de physiologie et médecine pour le développement (datant de 1976) de la technique dite de « patch-clamp » (technique de mesure du potentiel transmembranaire d'une cellule).

Des travaux récents, visent l'intégration de ces techniques sur puce, tirant ainsi profit des capacités d'intégration de circuits actifs (transistors) pour faire cohabiter biocapteur et circuit de traitement du signal. Par exemple, la respiration cellulaire et l'acidification due à l'activité des cellules ont été mesurées avec un ISFET-CMOS (*Ions-Sensible Field Effect Transistor* intégré en technologie *Complementary Metal Oxide Semiconductor*) grâce à la diffusion de protons ( $H^+$ ) et des molécules d'oxygène (Lehmann et al. [50]), comme illustré à la figure I.16.

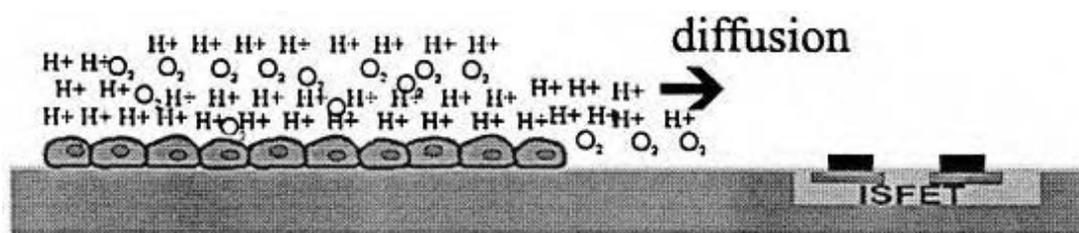


Figure I.16. Schéma de principe du biocapteur ISFET pour détecter la respiration cellulaire et l'acidification due à l'activité des cellules [50].

Mohamad Sawan et al présentent dans [51] un biocapteur capacitif qui intègre, sur technologie CMOS, le circuit de traitement des signaux (figure I.17, schéma de gauche). Le système de détection permet le suivi de la croissance de bactéries et est basé sur une architecture de mesure capacitive différentielle (figure I.17, schéma de droite) : le canal de référence contient du milieu de culture pur (de type Luria-Bertani –LB dans la figure I.14, à droite-), l'autre canal contient des bactéries Escherichia Coli (E. Coli) suspendues dans du LB et en prolifération.

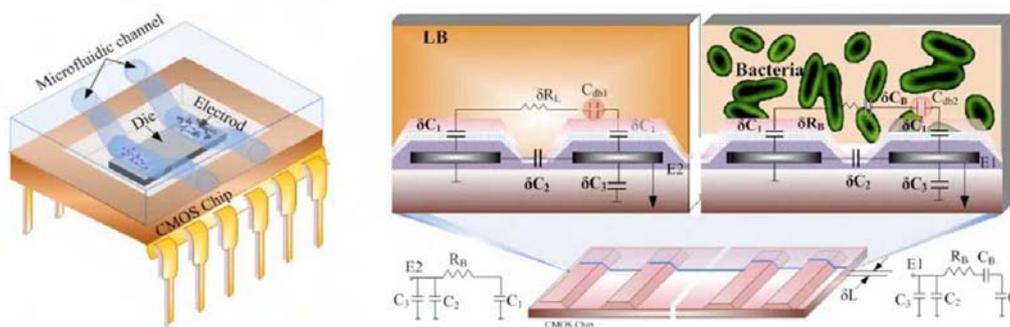


Figure I.17: à gauche : la vue schématique du système sur puce, à droite : le principe de mesure capacitive différentielle

Il y a un fort potentiel pour ces biocapteurs à fort degré d'intégrabilité sur technologie CMOS. En effet leur fabrication collective permet de réaliser des biocapteurs à faible coût qui peuvent être soit jetables, soit utilisables en batterie pour du criblage pharmaceutique par exemple. De plus ils peuvent être co-intégrés avec des circuits de communication sans fils et des circuits de récupération d'énergie en vue d'aboutir à des systèmes autonomes de surveillance de la santé des personnes. C'est donc à notre avis une voie attractive de recherche et, avant de présenter la famille «hautes fréquences » de ces biocapteurs, nous présentons un type de détecteur électrique reprenant le concept du cymomètre en flux (instrument vu dans le paragraphe «systèmes sur table »et pour lequel la détection est optique).

### 3.5 Micro-cytométrie et détection électrique

Les cytomètres conventionnels (« sur table ») basés sur la focalisation hydrodynamique des cellules et leur « lecture » optique sont des instruments complexes et coûteux. Le développement récent des technologies micro-électromécaniques (MEMS) fournit une réponse à ces inconvénients, car en raison de leurs aptitudes à la miniaturisation, les dispositifs MEMS peuvent manipuler efficacement les objets micrométriques (tels que les cellules biologiques), peuvent intégrer des systèmes de détections – électriques notamment- et peuvent être fabriqués en grandes quantités et à des faibles coûts [52].

Les efforts visant à miniaturiser un cytomètre en flux peuvent se scinder en trois activités : (1) la mise en place d'un système microfluidique pour la focalisation des particules, (2) l'intégration d'un système de détection, et (3) le développement d'un trieur et d'un compteur de cellules [52].

La focalisation de cellules par phénomène hydrodynamique est classiquement utilisée dans plusieurs microcytomètres. Dans la conception de Hodder et al [53], le flux de l'échantillon liquide est « pris en sandwich » entre deux flux latéraux. Les canaux fluidiques sont réalisés dans du polymère obtenu par moulage dans un répliquât de silicium gravé anisotropiquement, comme il est montré à la figure I.18 [54]. Lorsque les trois canaux fluidiques fusionnent en un, la focalisation hydrodynamique dans la direction latérale se produit. Une autre technique importante de focalisation de cellules repose sur le principe de la diélectrophorèse : la concentration du flux se faisant par champs électriques [55-57].

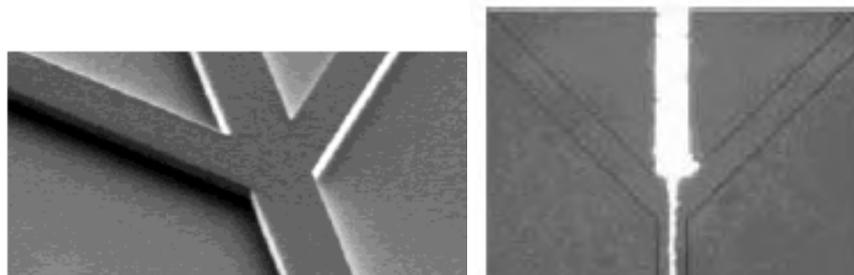


Figure I.18. Image MEB de moule en silicium servant de répliquât à un focaliseur de cellules microfluidique [54]. Photographie du dispositif microfluidique de focalisation de cellules montrant que le resserrement du flux de particules.

Pour la méthode de détection, malgré les défis de miniaturisation, le système de détection optique est toujours utilisé dans plusieurs modèles de microcytomètre. Ceci s'explique par la très bonne connaissance des propriétés optiques des particules biologiques. Par exemple, de petites diodes laser ou des diodes électroluminescentes (LED) sont montées ou fabriquées sur le canal microfluidique pour servir de source d'excitation [55-57]. Les propriétés des cellules peuvent être également analysées à l'aide d'un système de détection d'impédance intégré sur un cytomètre en microflux. Dans cette approche, l'impédance d'un milieu est surveillée. Lorsqu'un flux de particules traverse la zone de détection, l'impédance (en fait le signal associé) varie ce qui sert au comptage des cellules ainsi qu'à la mesure de leurs tailles. Cette technique est beaucoup moins compliquée que la méthode de détection optique, car elle ne nécessite pas de modification (marquage fluorescent) des cellules [58-60]. La figure I.19 présente un dispositif cytomètre en microflux mesurant le spectre d'impédance de particule biologique et développé au sein de l'équipe de Philippe Renaud [61].

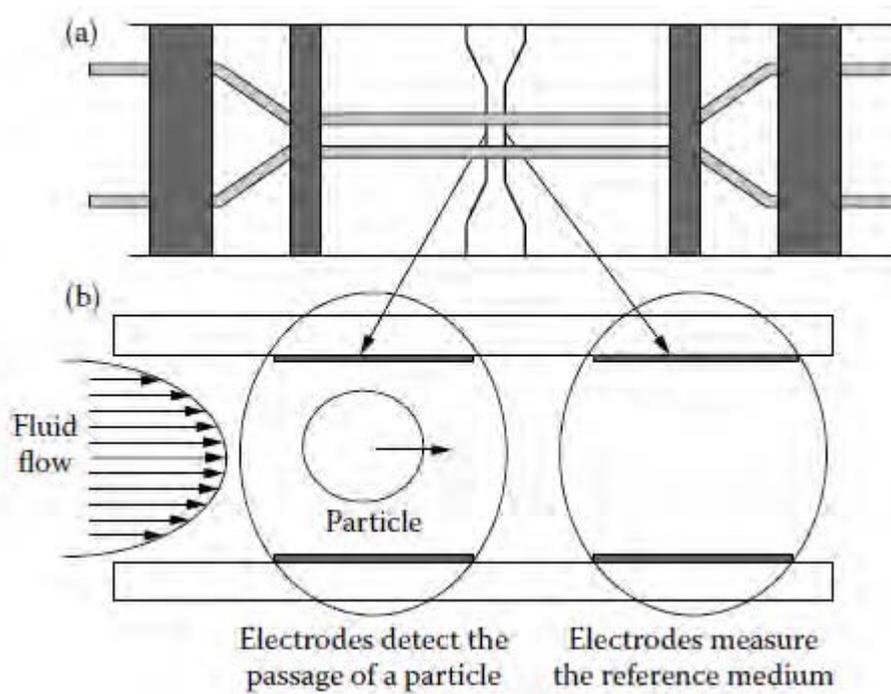


Figure I.19. Vues de dessus (a) et de côté (b) du canal microfluidique et des électrodes de mesure de l'impédance. Les impédances des deux paires d'électrodes sont comparées lors du passage d'une particule dans la région d'interrogation [61].

Un trieur ou un compteur de particules peuvent être ajoutés en aval du système de focalisation et de détection. Les auteurs de [62] ont utilisé la diélectrophorèse pour trier des particules biologiques. Dans les travaux de [54] et [63], le tri est hydrodynamique : les canaux horizontaux fluidiques sont utilisés pour dévier l'écoulement de particules, l'extrémité du canal principal pouvant être séparé en deux ou en plusieurs trajets afin de collecter les différents types de particules. Le système de tri de cellule de [54] est présenté à la figure I.20.

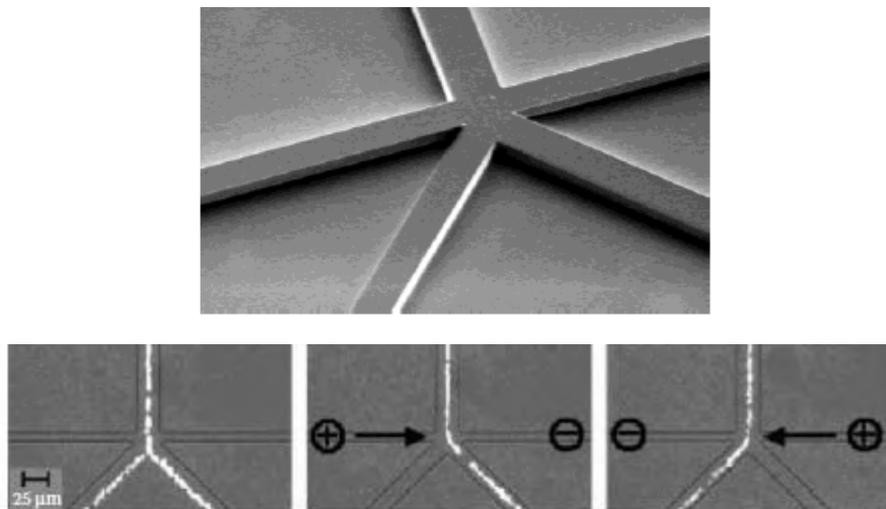


Figure I.20. Image MEB de moule en silicium de microcanal en PDMS de tri hydrodynamique [54]. Photographie d'un dispositif de tri hydrodynamique montrant que le flux de particules sans fluide de commutation (photo de gauche), avec un fluide de commutation injecté à gauche (photo du milieu), avec un fluide de commutation injecté à droite (photo de droite).

### 3.6 Discussions

La plupart des méthodes usuelles d'analyse cellulaire utilise des instruments commercialisés : microscopes optiques, microscopes à fluorescence, cytomètre en flux (ou FACS), etc. Ils sont couramment utilisés dans les laboratoires de biologie et les hôpitaux, car ils sont multifonctionnels et capables de fournir des résultats précis et rapides. Cependant ces instruments sont complexes, volumineux et coûteux.

Grâce au développement rapide des technologies MEMS de ces dernières décennies, de nouveaux instruments pour la biologie cellulaire, et notamment pour la cancérologie, émergent : les puces à cellules. Ces systèmes miniaturés d'analyse de cellules (et même d'une cellule) combinent des techniques microfluidiques, biochimiques, optiques, électriques, etc... et intègrent de nouveaux matériaux (pour la bio-fonctionnalisation). D'intenses travaux de recherche sont donc en cours depuis une dizaine d'années afin de proposer des techniques d'analyse compactes : intégration de systèmes optiques, développement de systèmes de détection électriques ou mécaniques. Chaque technique présente ses avantages et ses inconvénients et notre conviction est qu'elles cohabiteront toutes, chacune ayant sa spécificité et/ou toutes réunies afin de fournir des analyses multiparamétriques riches en potentiel de diagnostic.

Nous allons présenter dans le paragraphe suivant un (4<sup>ème</sup>) compétiteur à la détection biologique qui, outre la capacité de fournir une vision nouvelle du vivant, rassemble bon nombre d'atouts :

- sans marqueur ni altération des échantillons biologique,
- grande capacité d'intégration,
- ... à découvrir dans ce manuscrit ...

#### **4. Les potentialités de la détection électrique haute fréquence pour la biologie (cellulaire)**

Les applications exploitant les ondes électromagnétiques (la figure I.21) dans les domaines de la biologie et de la médecine sont nombreuses. Outre l'optique (microscopes, microscopes à fluorescence, cytométrie en flux pour ne citer qu'eux), les rayons X (X-rays) sont largement exploités dans les instruments hospitaliers tels que le scanner (à rayons X). Les ondes radio de quelques dizaines de MHz sont aussi à la base de l'Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

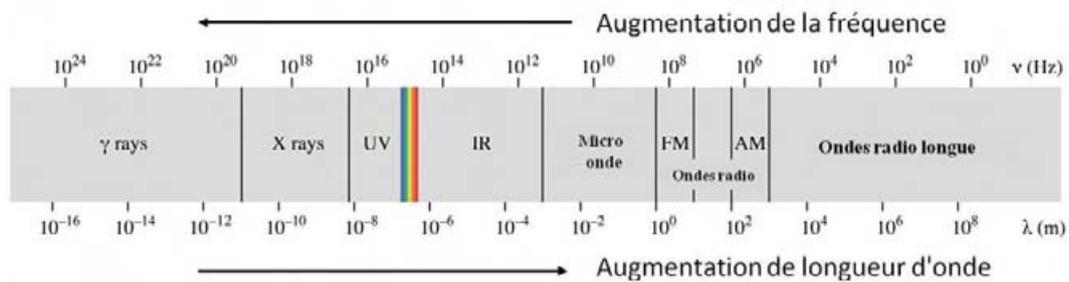


Figure I.21. Le spectre électromagnétique.

De plus, les hyperfréquences (parfois nommées Micro-ondes comme à la figure I.18) et allant typiquement du Gigahertz à la centaine de Gigahertz) ont ouvert la voie sur de nouvelles méthodes thérapeutiques et diagnostiques en médecine et biologie. Des applications thérapeutiques dans la gamme de fréquence du Mégahertz jusqu'à la dizaine de Gigahertz sont actuellement à l'étude pour des domaines tels que la cardiologie, l'urologie, la chirurgie, ophtalmologie, traitement du cancer et d'autres. Cette gamme fréquentielle est de plus exploitée par des applications de diagnostic pour la détection du cancer, l'imagerie d'organes, l'imagerie corporelle pour la sécurité aéroportuaire et plus encore [64]. De nombreuses recherches sont aussi focalisées sur l'étude des effets thermiques des ondes électromagnétiques hyperfréquences pour la thérapie ainsi que sur l'imagerie d'organe notamment [65-68].

L'utilisation des ondes électromagnétiques pour caractériser et étudier les propriétés diélectriques de substances biologiques telles que des tissus ou des fluides biologiques (sang) est bien établie notamment grâce au travail de Schwan et Stuchly [69-72]. L'essentiel des études a été mené à une échelle « macroscopique », c'est-à-dire aux échelles des organes (foie par exemple) ou des tissus (échantillons centimétrique d'organe ou de peau) [73]. Diverses autres techniques toujours volumineuses ont été investiguées, utilisant différents types de guides d'onde [74-76]. Ces études à échelle centimétrique n'en sont pas moins très précieuses. En effet, une très large variété de tissus, d'os, de liquides biologiques variés ont été mesurés et présentent tous des signatures diélectriques distinctes. Un autre fait marquant a également été démontré dans [73], [74] et [77] notamment : il existe un contraste important entre les paramètres diélectriques de tissus sains et de tissus cancéreux sur une large gamme de fréquence au-delà du Gigahertz, comme illustré à la Figure I.22.

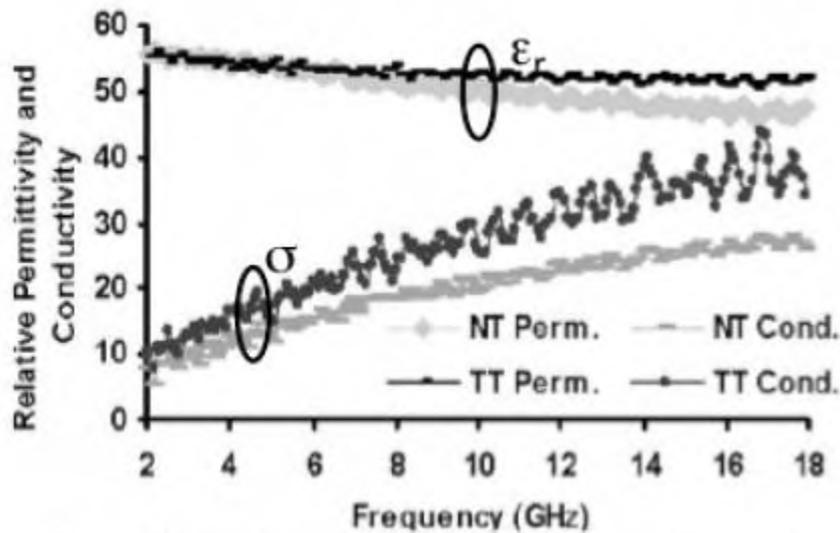


Figure I.22. Paramètres électriques de tissus mammaires sains et pathogènes (NT : Non-Tumorous Tissue and TT : Tumorous Tissue) [77].

Nous décrivons ci-après uniquement les techniques non-invasives (c'est-à-dire celles qui maintiennent la viabilité des cellules lors de l'analyse). En effet, [82] et [83] opèrent en milieu biologique séché ce qui, outre la modification apportée du vivant sous étude, tue le matériel biologique. Ce caractère « non-invasif » est, à nos yeux, une propriété chère à la technique hyperfréquence de détection, propriété qu'il est donc capital d'assurer.

Quelques références [79, 83] mettent en œuvre des micro-réservoirs (au-dessus de circuits hyperfréquences) dans lesquels sont placés par seringue les matériaux biologiques à analyser : hémoglobine, ADN- $\lambda$ , E-coli [79], et cellules en suspension [83]. Les mesures effectuées sont de plus effectuées sur une large gamme de fréquence ce qui permet l'acquisition de signatures des milieux biologiques (cf. Figure I.23 et Figure I.24).

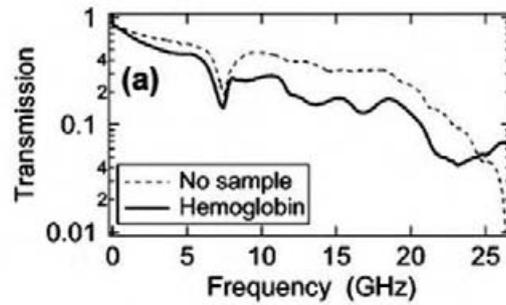
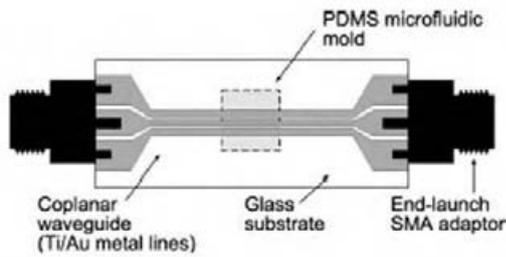


Figure I.23 Ligne coplanaire à micro-puit, test ée avec de l'hémoglobine [79].

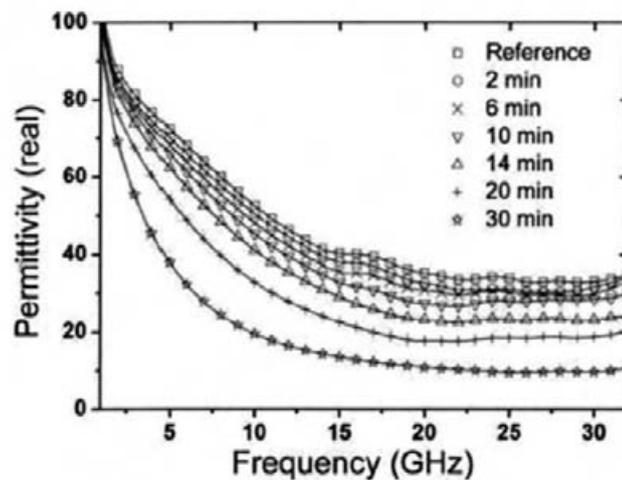
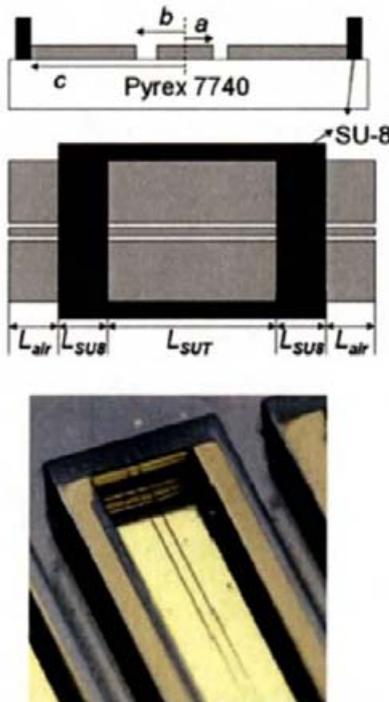


Figure I.24 Ligne coplanaire à microréservoir test ée avec des cellules HEK-293 et 10% de DMSO [83].

La publication de Pavlidis et al. [83] est particulièrement intéressante car elle montre également la capacité de suivi en temps réel de processus biologique par la technique hyperfréquence. En effet, la mort induite de cellules en suspension a été suivie durant une trentaine de minutes : les auteurs ont démontré des contrastes consécutifs sur la permittivité du fluide biologique comme l'illustre le graphique de droite sur la Figure I.24.

La caractérisation large-bande de population de cellules dans leur milieu de culture, donc sans altération de ces dernières, est faite par Katia Grenier et al [78]. Un contraste significatif sur la permittivité relative du liquide a été mesuré entre les 2 solutions : avec et sans cellules, ce qui montre la possibilité de détecter des cellules par la technique HF en milieu liquide

(Figure I.25). D'autres mesures ont également permis de quantifier et même d'identifier des cellules suivant leur état : vivante, morte à l'aide d'un circuit résonant [84].

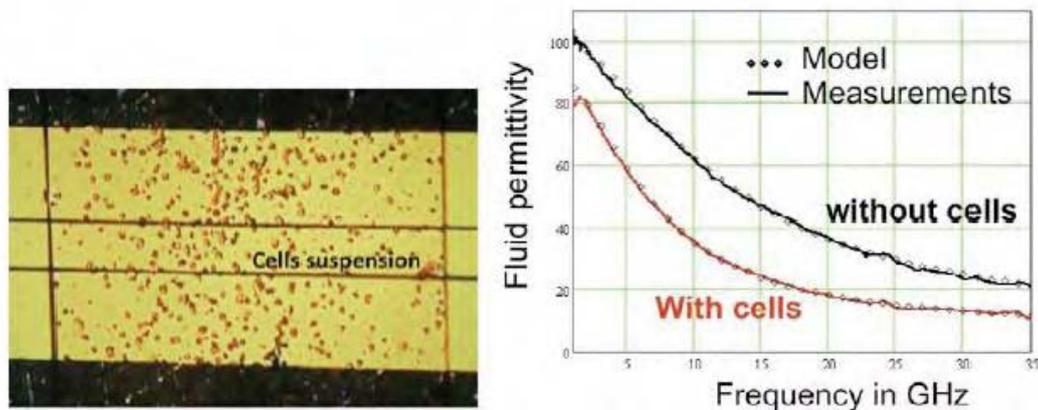


Figure I.25 Photographie de cellules en suspension dans le biocapteur RF et d'écoulement associé [78].

## 5. But de notre travail et conclusions

Dans ce chapitre nous avons introduit et discuté différentes méthodes d'analyse biologique : des instruments commercialisés aux solutions à base de bio-MEMS. Les méthodes d'analyses cellulaires usuelles sont capables d'analyser des matériaux, molécules biologiques, cellules, tissus, organe, corps entier ; mais pèchent par certains aspects qui peuvent cacher certains phénomènes biologiques et empêcher leurs études. Parmi ces inconvénients, on trouve notamment :

- ✓ La nécessité de marquage qui, bien que conduisant à de grande sensibilité et spécificité des analyses, impose des étapes « invasives » assez fastidieuses avant toute analyse. Par « invasive », nous entendons les faits suivants : (1) après analyse, les cellules sont généralement inutilisables et (2) pendant l'analyse, on peut se poser la question des interférences des marqueurs avec le processus que l'on souhaite étudier.
- ✓ Certaines techniques (sauf le cytométrie en flux, mais qui lui souffre de l'étape de marquage et du fait qu'après analyse les cellules ne sont « plus tout à fait en forme » car un laser les a éclairés) ne sont pas parallélisables.

C'est donc pour compléter les approches existantes, apporter des solutions aux inconvénients précédemment cités, développer une nouvelle manière de sonder le vivant que nous nous sommes orientés vers le développement de circuits hyperfréquences, intégrés avec les microtechnologies, pour l'analyse cellulaire.

Le but de notre travail de thèse est le développement d'un biocapteur hyperfréquence permettant la caractérisation diélectrique large-bande (que nous nommerons par la suite **spectroscopie diélectrique hyperfréquence** ou simplement spectroscopie) de cellules, **jusqu'à la cellule unique**. Nous visons à combiner le micro dispositif hyperfréquence avec des **fonctionnalités microfluidiques** assurant ainsi une compatibilité avec le concept de lab-on-a-chip au sein duquel notre biocapteur pourra cohabiter avec des fonctions microfluidiques de manipulation, tri, mélange, chauffage, .... Nous devons de plus assurer des propriétés, remarquables pour un système de détection lorsque toutes réunies, d'opération **en milieu de culture, sans-contact et sans marquage** : ceci assurant la bonne viabilité des cellules étudiées (non-invasivité), qui pourront par la suite être réutilisées pour d'autres analyses ou réintroduites dans d'autres expériences.

Enfin, l'**intégration par les microtechnologies** de l'approche hyperfréquence-fluidique permet d'envisager une **forte miniaturisation** de la détection (miniaturisation jusqu'à quelques micromètres de la zone d'analyse, ce qui correspond aux dimensions d'une cellule), ainsi qu'une **forte parallélisation** des analyses de part la fabrication collective des composants, ce qui ouvre des perspectives pour des applications de criblage pharmaceutique.

Le chapitre suivant présente le premier composant développé permettant d'effectuer une **spectroscopie diélectrique hyperfréquence** de milieu liquide sub-nanolitre (assurant une **forte miniaturisation** des volumes d'analyse), incluant des suspensions cellulaires localisées **microfluidiques**.

Les chapitres suivants sont quant à eux dédiés à l'analyse **jusqu'à la cellule unique** dans son **milieu de culture** et pour laquelle tant la technique hyperfréquence que l'**intégration par les microtechnologies** ont été optimisées.

## Bibliographes du Chapitre I :

- [1] P. Boutibonnes ; L'œil de Leeuwenhoek et l'invention de la microscopie, *Alliage*, 39: 58-66 ; 1999.
- [2] K. Gerald; *Cell and molecular biology: Concepts and Experiments*, 6<sup>th</sup> edition; chapter 1; 2009.
- [3] Wikipedia; LA definition of cell biology; 2009.
- [4] K. Gerald, *Cell and molecular biology: Concepts and Experiments*, 6<sup>th</sup> edition; chapter 18; 2009.
- [5] J. Paul Robinson, et al; *Handbook of Flow Cytometry Methods*; 1993.
- [6] A.L. Givan, *Flow Cytometry First Principles*; 2001.
- [7] H. M. Shapiro, *Practical Flow Cytometry*; 2003.
- [8] L. A. Sklar, *Flow Cytometry for Biotechnology*; 2005.
- [9] M . Abramowitz, M.W. Davidson, *Introduction to Microscopy. Molecular Expressions*.
- [10] J.W. Cross, *Scanning Probe Microscopy*.
- [11] S. Bradbury and B. Bracegirdle; *Introduction to Light Microscopy*; BIOS Scientific Publishers Ltd., Oxford, UK; p-123; 1998.
- [12] M. Abramowitz; *Photomicrography: A Practical Guide*; OlympusAmerica, Inc.; Melville, New York, p-73; 1998.
- [13] F. Zernike; Phase-contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects; Part I, *Physica*: 9, 686-698; 1942.
- [14] F. Zernike; Phase-contrast, a new method for microscopic observation of transparent objects. Part II., *Physica*: 9, 974-986; 1942.
- [15] K. Gerald; *Cell and molecular biology: Concepts and Experiments*, 6<sup>th</sup> edition, chapter 18; p-718, 2009.
- [16] K.R. Spring, M.W. Davidson; *Introduction to Fluorescence Microscopy*; Nikon Microscopy, 2008.
- [17] *The Fluorescence Microscope*, the Nobel Foundation, *Microscopes—Help Scientists Explore Hidden Worlds*, 2008.
- [18] M.W. Davidson and M. Abramowitz, *optical microscopy*, p-35; 2002.
- [19] K. Gerald, *Cell and molecular biology: Concepts and Experiments*, 6<sup>th</sup> edition, chapter 18, p719-720, 2009.
- [20] S. Bhawsar; *Sample preparation for microscopy*; [www.biotecharticles.com](http://www.biotecharticles.com); 2012.
- [21] E. Rolf, M.D. Rossell, C. Kisielowski, U. Dahmen; *Atomic-Resolution Imaging with a Sub-50-pm Electron Probe*; *Physical Review Letters* 102 (9): 096101; 2009.
- [22] *The Transmission Electron Microscope*, [www.Nobelprize.org](http://www.Nobelprize.org).
- [23] D. McMullan; "Scanning Electron Microscopy, 1928–1965". 51st Annual Meeting of the Microscopy Society of America. Cincinnati, OH; 1993.
- [24] G. Binnig, C. F. Quate, Ch. Gerber: *Atomic Force Microscope*. In: *Physical Review Letters*. 56, Nr. 9, S. 930–933; 1986.
- [25] D.J. Müller and Y.F. Dufrêne; *Atomic force microscopy: a nanoscopic window on the cell surface*, *Trends in Cell Biology*, Vol. 21, No. 8; 2011.
- [26] A. Guillaume: *Imaging the nanoscale organization of peptidoglycan in living Lactococcus lactis cells*, *Nature Communications* 1, Article number: 27; 2010.

- [27] A. Cerf, J.C. Cau, C. Vieu, E. Dague; Nanomechanical Properties of Dead or Alive Single-Patterned Bacteria , *Langmuir*, 25 (10), pp 5731–5736; 2009.
- [28] B.H. Villas; Flow cytometry: an overview, *Cell Vis*; 5(1):56-61: 1998.
- [29] M.G. Ormerod; *Flow Cytometry — a practical approach*, 3rd edition; 2000.
- [30] W. A. Bonner; Fluorescence Activated Cell Sorting, *Review of Scientific Instruments*, Volume 43, Issue 3, P 404 -409; 1972.
- [31] B. Dickinson; FACS MultiSET System.
- [32] S. Sari; Development of an in vitro model system for studying the interaction of caballus IgE with its high-affinity FcεRI receptor; 2011.
- [33] M. D áz; Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses, *Biochemical Engineering Journal*, Volume 48, Issue 3, pp 385–407;2010.
- [34] A. Orfao et al; Flow cytometry in the diagnosis of cancer, *Scand J Clin Lab Invest Suppl*; 221:145-52; 1995.
- [35] K.E. Petersen; Silicon as a mechanical material, *Proc. I.E.E.E.* 70 (5) 420–457; 1982.
- [36] K.D. Wise, K. Najafi; Microfabrication techniques for integrated sensors and microsystems, *Science* 254, 1335–1342; 1991.
- [37] M. Ferrari (Ed.); *Biomedical Nanotechnology*, Vol. I–IV, Kluwer Academic Publishers; 2004.
- [38] R. Bashir; BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects, *Advanced Drug Delivery Reviews* 56; 1565– 1586; 2004.
- [39] BioMEMS 2008-2012: How Microsystems and Semiconductor Industries make money out of the Life Science market? ”. Publi épar Yole Développement ; Mars 2008.
- [40] W.J. Wang, *Bio-MEMS Technologies and Applications*, chapter 1; 2007.
- [41] T. Vo-Dinh, B. Cullum, *Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics*, *J.Anal. Chem.* 366 (6– 7); 540–551; 2000.
- [42] P.S. Mohanty and E. Kougiannos; *Biosensors: A tutorial review*, *Ieee Potentials*; 2006.
- [43] J. Fritz, M.K. Baller, H.P. Lang, H. Rothuizen, P. Vettiger, E. Meyer, H. Guntherodt, C. Gerber, J.K. Gimzewski; Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics, *Science* 288;316– 318; 2000.
- [44] S. Ghatnekar-Nilsson, E. Fors é, G. Abadal, J. Verd, F. Campabadal, F. P érez-Murano, J. Esteve, N. Barniol, A. Boisen, L. Montelius; Resonators with integrated CMOS circuitry for mass sensing applications, fabricated by electron beam lithography, *Nanotechnology* 16; 98–102; 2000.
- [45] B. Ilic, D. Czaplewski, H.G. Craighead, P. Neuzil, C. Campagnolo, C. Batt; *Appl. Phys. Lett.* 77; 450; 2000.
- [46] A. Gupta, D. Akin, R. Bashir; Resonant mass biosensor for ultrasensitive detection of bacterial cells, *Microfluidics, Biomems, and Medical Microsystems Conference at SPIE’s Photonics West Micromachining and Microfabrication 2003 Symposium*, San Jose, Ca. Jan. 27, 2003. *Proceedings of SPIE, the International Society for Optical Engineering*, vol. 4982, pp. 21– 27; 2003.
- [47] G. Villanueva, F. P érez-Murano, M. Zimmermann, J. Lichtenberg, J. Bausells; Piezoresistive cantilevers in a commercial CMOS technology for intermolecular force detection; *Microelectronic Engineering* 83; 1302–130; 2003.

- [48] D.L. Stokes, G.D. Griffin, T. Vo-Dinh; Detection of *E. coli* using a microfluidics-based antibody biochip detection system; *J. Anal. Chem.* 369; 295–301; 2001.
- [49] D.A. Bartholomeusz, J.D. Andrade, A.B. Frazier; Bioluminescent based chemchip for point-of-care diagnostics, 1<sup>st</sup> Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology, IEEE, pp. 602– 606; 2000.
- [50] M. Lehmann, W. Baumann, M. Brischwein, H.J. Gahle, I. Freund, I.R. Ehret, S. Drechsler, H. Palzer, M. Kleintges, U. Sieben, B. Wolf; Simultaneous measurement of cellular respiration and acidification with a single CMOS ISFET, *Biosens. Bioelectron.* 16 (3); 195– 203; 2001.
- [51] E. Ghafar-Zadeh, M. Sawan, V. P. Chodavarapu, T. Hosseini-Nia; Bacteria Growth Monitoring through a Differential CMOS Capacitive Sensor, *IEEE Trans on biomed Circuits and systems*, Vol4, n<sup>o</sup> 4; 2010.
- [52] C.H. Yu and L. Shi; *Bio-MEMS Devices in Cell Manipulation chapter 9: Microflow Cytometry and Applications*; 2007.
- [53] P.S. Hodder, G. Blankenstein, and J. Ruzicka; Microfabricated flow chamber for fluorescence-based chemistries and stopped-flow injection cytometry; *Analyst*, 122, 883; 1997.
- [54] P.S. Dittrich and P. Schuille; An Integrated Microfluidic System for Reaction, High-Sensitivity Detection, and Sorting of Fluorescent Cells and Particles, *Anal. Chem.*; 75, 5767-5774; 2003.
- [55] P.R.C. Gascoyne, F.F. Becker, and X.B. Wang; Numerical analysis of the influence of experimental conditions on the accuracy of dielectric parameters derived from electrorotation measurements, *Bioelectrochem. Bioenerg*; 36, 115; 1995.
- [56] P.R.C. Gascoyne, X.B. Wang, Y. Huang and F.F. Becker, Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood, *IEEE Trans. Ind. Appl.*, 33, 670; 1997.
- [57] L. Cui, T. Zhang, and H. Morgan; Optical particle detection integrated in a dielectrophoretic lab-on-a-chip, *J. Micromech. Microeng*; 12 ,7; 2002.
- [58] J. Kruger, K. Singh, A. O'Neill, C. Jackson, A. Morrison and P. O'Brien, Development of a microfluidic device for fluorescence activated cell sorting; *J. of Micromechanics and Microengineering*, 12, 486; 2002.
- [59] M.L. Chabinyk, D.T. Chiu, J.C. McDonald, A.D. Stroock, J.F. Christian, A.M. Karger, and G.M. Whitesides; An integrated fluorescence detection system in poly(dimethylsiloxane) for microfluidic applications, *Anal. Chem.*, 73, 4491; 2001.
- [60] S. Gawad, L. Schildb and P.H. Renaud, Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing, *Lab on a Chip*, 1, 76; 2001.
- [61] K. Cheung, S. Gawad, and P. Renaud, Microfluidic impedance spectroscopy flow cytometer: particle size calibration, in *Proc. IEEE Microelectromech. Sys. (MEMS)*, 343; 2004.
- [62] S. Fiedler, S.G. Shirley, T. Schnelle, and G. Fuhr, Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem, *Anal. Chem.*, 70, 1909; 1998.
- [63] A.Y. Fu, C. Spence, A. Scherer, F.H. Arnold and S.R. Quake, A microfabricated fluorescence-activated cell sorter, *Nature Biotechnol.*, 17, 1109; 1999.
- [64] A.V. Vorst; *RF/Microwave Interaction with Biological Tissues, Introduction*; 2006.

- [65] N.B. Hornback, M.D; Radiation and Microwave Therapy in the Treatment of Advanced Cancer, *Radiology*, 130, 459-464; 1979.
- [66] M. Hiraoka, Y. Tanaka, K. Sugimachi, Y. Kotsuka, et al; Development of RF and microwave heating equipment and clinical application to cancer treatment in Japan, in A. Rosen, A. Vander Vorst, and Y. Kotsuka (Eds.), *Special Issue on Medical Applications and Biological Effect of RF/Microwaves*, *IEEE Trans.Microwave Theory Tech.*, Vol. 48, No. 48, pp. 1789–1799; 2000.
- [67] X. Li, E. Bond, B. Van Veen, and S. Hagness; An overview of ultra-wideband microwave imaging via space-time beamforming for early-stage breast-cancer detection; *Antennas and Propagation Magazine*, *IEEE*, vol. 47, pp. 19–34; Feb 2005.
- [68] S. Davis, X. Li, E. Bond, S. Hagness, and B. Van Veen; Microwave imaging via space-time beamforming for early detection of breast cancer: Beamformer design in the frequency domain, *J. of Electromagnetics: Waves and Appl*, pp.357–381; 2003.
- [69] P. Schwan; Electrical properties of blood and its constituents: Alternating current spectroscopy, *Ann. Hematol.*, vol. 46, pp. 185–197; 1983.
- [70] H. P. Schwan; Electrical properties of tissues and cell suspensions: Mechanism and models, in *Proc. 16th Annu. IEEE Int. Conf.* vol. 1, pp. A70–A71; 1994.
- [71] K. R. Foster and H. P. Schwan; *Biological Effects of ElectroMagnetic Field*. Boca Raton, FL: CRC, ch. 1; 1996.
- [72] M. A. Stuchly, A. Kraszewski, S. S. Stuchly, and A. M. Smith; Dielectric properties of animal tissues in vivo at radio and microwave frequencies: Comparison between species; *Phys. Med. Biol.*, vol. 27, no.7, pp. 927–936; 1982.
- [73] Ann P O'Rourke et al, Dielectric properties of human normal, malignant and cirrhotic liver tissue: in vivo and ex vivo measurements from 0.5 to 20 GHz using a precision open-ended coaxial probe, *Phys. Med. Biol.* 52 ; 4707–4719; 2007.
- [74] U. Khan. N.Al-Moayed, N. Nguyen, K. Korolev, M. Afsar, S. Naber, Broadband Dielectric Characterization of Tumorous and Nontumorous Breast Tissues, *IEEE Trans. On Microwave Theory and Techniques*, Vol. 55, n °12; dec. 2007.
- [75] J. L. Sebastian, S. Mufioz, J. M. Miranda and B. Ribas, A Simple Experimental Set-up for the Determination of the Complex Dielectric Permittivity of Biological Tissues at Microwave Frequencies , *EuMW 2004*.
- [76] F. Duhamel, I. Huynen, A.V. Vorst, Measurements of complex permittivity of biological and organic liquids up to 110 GHZ , *IEEE-MTT-S*; 1997.
- [77] U. Khan, N.Al-Moayed, N. Nguyen, M. Obol, K. Korolev, M. Afsar, S. Naber, High Frequency Dielectric Characteristics of Tumorous and Nontumorous Breast Tissues, *IEEE International Microwave Symposium, IMS2007*, Page(s):1341 – 1344; 3-8 June 2007.
- [78] K. Grenier et al, Integrated Broadband Microwave and Microfluidic Sensor Dedicated to Bioengineering, *IEEE Transactions on microwave theory and techniques*, VOL. 57, NO.12; 2009.
- [79] G. R. Facer, D. A. Notterman, L. L. Sohn, Dielectric spectroscopy for bioanalysis: From 40 Hz to 26.5 GHz in a microfabricated wave guide, *APL* 78, N °7; 12 Feb. 2001.
- [80] N. Deneff , L. Moreno-Hagelsieb , G. Laurent , R. Pampina, B. Foultierb, J. Remacle , D. Flandre , J-P. Raskin, RF detection of DNA based on CMOS inductive and capacitive sensors; *EuMW 2004*.

- [81] K. Grenier, D. Dubuc, M. Kumemura, H. Toshiyoshi, H. Fujita, Contact Less Radio-frequencies Biosensor for Biological Parameters Analysis , BIODEVICES,398-401; 2009.
- [82]C. Dalmay, A.Pothier, P. Blondy, F. Lalloue, M.-O. Jauberteau, Label Free Biosensors for Human Cell Characterization using Radio and Microwave Frequencies, IEEE MTT-S 2008.
- [83] S. Anghyun, T. Stintzing, I. Block, D. Pavlidis, M. Rieke, P. G. Layer, High frequency wideband permittivity measurements of biological substances using coplanar waveguides and application to cell suspensions, 2008 IEEE MTT-Symposium International, Page(s):915 – 918; 15-20 June 2008.
- [84] K. Grenier, D. Dubuc, P-E. Poleni, M. Kumemura, T. Fujii, H. Toshiyoshi, H. Fujita, Resonant based microwave biosensor for biological cells discrimination, Radio Wireless Symposium, New Orleans, USA, Jan. 2010.



# Chapitre II

Spectroscopie diélectrique  
HF : liquides biologiques et  
suspensions de cellules



# 1. Introduction

Une grande partie de notre travail de thèse a consisté à mettre au point de nouvelles approches, basées sur la spectroscopie diélectrique hyperfréquences (HF), de caractérisation de divers matériaux biologiques liquides ainsi que des cellules vivantes en suspension. La spectroscopie diélectrique HF présente des caractéristiques en rupture par rapport aux techniques existantes, présentées au chapitre précédent, elle permet notamment une analyse :

- sans contact avec le matériau à caractériser,
- en milieu liquide a contrario de certaines techniques qui requièrent une fixation (i.e. séchage) des échantillons biologiques (comme des cellules). On peut donc étudier des cellules vivantes en suspension dans leur milieu de culture,
- non-invasive (et non ionisante) du vivant (sous condition d'utiliser de très faible niveau de puissance, comme c'est le cas dans nos travaux), c'est à dire que la technique n'interfère pas avec le matériau biologique. On peut donc suivre, en temps réel, un processus biologique sans l'altérer ainsi que réutiliser l'échantillon biologique après test pour effectuer d'autre type d'analyse ou de traitement,
- sans marquage, ce qui rejoint le point précédent,

L'utilisation des ondes électromagnétiques permettant de caractériser et d'étudier les propriétés diélectriques de substances biologiques telles que les organes (décimétrique), les tissus (centimétrique) et même le sang (millilitre) a été établie dans les années 1980 notamment grâce aux travaux de Schwan et Stuchly [1]-[4]. Les travaux se sont néanmoins cantonnés aux fréquences basses du domaine hyperfréquences (jusqu'à quelques Gigahertz) et sur des échantillons centimétriques.

Nous présentons dans ce mémoire nos travaux sur les potentialités, pour les domaines de la biologie et du biomédical, apportés par la convergence entre :

- l'analyse spectroscopique hyperfréquence sur plusieurs (=3) décades (de 40MHz à 40GHz, tout à fait extensible jusqu'à 100-200GHz) d'échantillons biologiques en milieu liquide, donnant accès à une richesse d'informations,
- les microtechnologies permettant l'observation d'objets biologiques micrométriques, et notamment des cellules.

Nous allons notamment démontrer que, allié à la microfluidique [5], la technique HF permet une analyse sous très faible volume, dans la gamme du nano-litre comme c'est le cas dans ce chapitre, et même descendre jusqu'à l'échelle de la cellule (cf. chapitre III). Enfin, les capacités de fabrication collective des microtechnologies permettent d'envisager une parallélisation massive des détecteurs pour des applications de criblage biologique haut-débit.

Notre travail s'est tout d'abord concentré sur le développement d'un biocapteur miniature, opérant dans la gamme du nanolitre et compatible entre autre avec une analyse de suspension de cellules, analysant les propriétés diélectrique d'échantillons biologiques liquides sur une large gamme de fréquences hyperfréquences.

## 2. Interaction ondes HF et matières biologiques/liquides

Un matériau est classé comme 'diélectrique' lorsqu'il a la capacité de stocker de l'énergie électromagnétique quand un champ électrique externe lui est appliqué. Le vide, le verre, certains plastiques et certains liquides (pas les liquides conducteurs) sont des diélectriques et sont donc caractérisés par des propriétés diélectriques. Ces propriétés rendent compte de l'interaction entre le champ électrique et la matière (de sa capacité à stocker de l'énergie électromagnétique par exemple). Ce sont bien évidemment ces propriétés qui nous intéressent (leurs spectres dans le domaine hyperfréquences plus précisément) car elles constituent la signature électrique du matériau (biologique) considéré et permettent d'en déduire ses caractéristiques (biologiques).

Ce paragraphe décrit donc la physique derrière les propriétés diélectriques du matériau et notamment les liquides.

## 2.1 Propriétés diélectriques de matériaux

La Figure II.1 illustre l'interaction champ électrique-matière (hors vide). Tout matériau (à l'exception du vide) est constitué de molécules, d'atomes formant des dipôles électrostatiques qui interagissent avec un champ électrique. On parle de polarisation, car ces dipôles s'orientent (=se polarisent) suivant le champ qui leur est soumis. Cette polarisation vient donc de différents phénomènes physiques :

- la polarisation électronique, toujours présente, est induite par le déplacement et à la déformation de chaque nuage électronique des atomes,
- la polarisation atomique est due aux déplacements des atomes au sein d'une molécule.
- la polarisation dipolaire (ou dite d'orientation) existe lorsque des molécules présentent intrinsèquement un moment dipolaire : le barycentre des charges positives ne coïncidant pas avec celui des charges négatives. On parle alors de molécule dipolaire : la molécule d'eau ( $H_2O$ ) en est un exemple central.

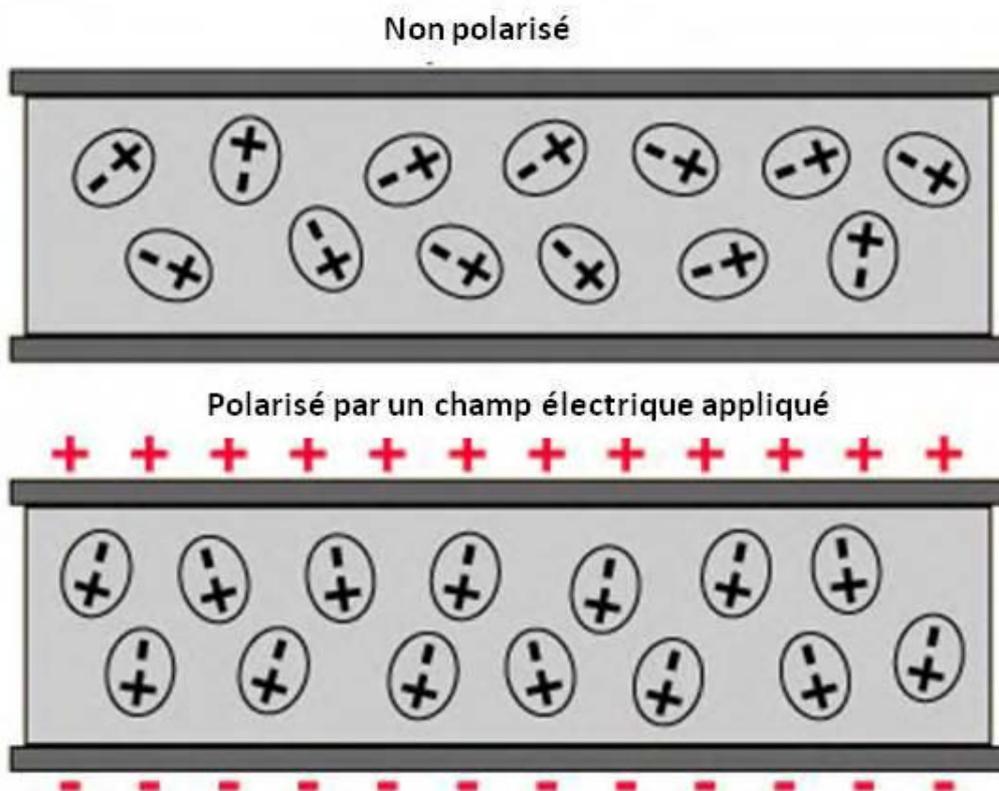


Figure II.1 Polarisation de milieu diélectrique par un champ électrique.

Le phénomène de polarisation (qui est un phénomène microscopique) se quantifie (macroscopiquement) par la polarisation du matériau ( $P$ ) qui est une quantité vectorielle

(orienté suivant les dipôles polarisés), qui dépend linéairement (sous champ modéré comme c'est le cas dans nos travaux) du champ électrique appliqué [7] :

$$\vec{P} = \epsilon_0 \chi \vec{E} \quad \text{Equation 2.1}$$

Où les constantes  $\epsilon_0$  et  $\chi$  sont nommées respectivement : permittivité du vide et susceptibilité du matériau.  $\epsilon_0 (= 8.854187 \times 10^{-12} \text{ F/m})$  est une constante absolue de physique au même titre que la constante de Boltzmann ou la vitesse de la lumière dans le vide. Par contre  $\chi$  est fonction du matériau et surtout des dipôles qui le constitue.

Lors du phénomène de polarisation, les dipôles s'orientent : il y a déplacement circulaire de charges (voir Figure II.1). Qui dit déplacement de charge dit densité de courant qui s'exprime par :

$$\vec{J}_D = \frac{d\vec{D}}{dt} \quad \text{Equation 2.2}$$

$\vec{J}_D$  quantifie la densité de courant de déplacement et  $\vec{D}$  se nomme champ déplacement électrique qui vaut :

$$\vec{D} = \epsilon_0 \vec{E} + \vec{P} \quad \text{Equation 2.3}$$

Ces deux expressions (2.2 et 2.3) montrent comment la polarisation d'un matériau contribue au champ déplacement électrique induisant ainsi un courant dit de déplacement. Au-delà de cette démonstration d'électromagnétisme, nous voulons pointer que ce mécanisme : **champ électrique**  $\rightarrow$  **polarisation**  $\rightarrow$  **champ déplacement électrique**  $\rightarrow$  **densité de courant de déplacement** identifie un matériau.

En développant l'équation 2.3 avec l'équation 2.1 il vient :

$$\vec{D} = \epsilon_0 (1 + \chi) \vec{E} \quad \text{Equation 2.4}$$

Ce qui nous permet d'introduire une quantité adimensionnelle caractérisant le matériau interagissant avec le champ électrique : la permittivité relative  $\epsilon_r$  (relative au vide):

$$\epsilon_r = (1 + \chi) \quad \text{Equation 2.5}$$

Le vide est choisi comme référence, car il est défini de manière absolue et indiscutable, il est linéaire, homogène, isotropique, et avec réponse instantanée.

C'est donc la permittivité relative qui résume (macroscopiquement) à elle seule la réponse (microscopique) du matériau au champ électrique. Nous allons voir dans les paragraphes suivants que cette quantité est complexe (c'est un nombre complexe) et fonction de la fréquence : c'est la signature électrique qui nous intéresse d'obtenir pour les matériaux biologiques à analyser.

## 2.2 Permittivité complexe et comportement fréquentiel

Par rapport à la réponse du vide, la réaction de tous matériaux soumis à des champs électromagnétiques dépend de la fréquence de ce dernier. Cette dépendance de la fréquence s'explique par le fait que la polarisation d'un matériel ne répond pas instantanément à un champ appliqué et si le champ varie trop rapidement la polarisation peut ne pas se produire, ce qui reviendrait à avoir  $\vec{P} = \vec{0}$ . Suivant le type de polarisation (électronique, atomique ou dipolaire) ce « décrochement » se produit à des fréquences différentes, comme illustré à la Figure II.2 (courbe  $\epsilon'$ ).

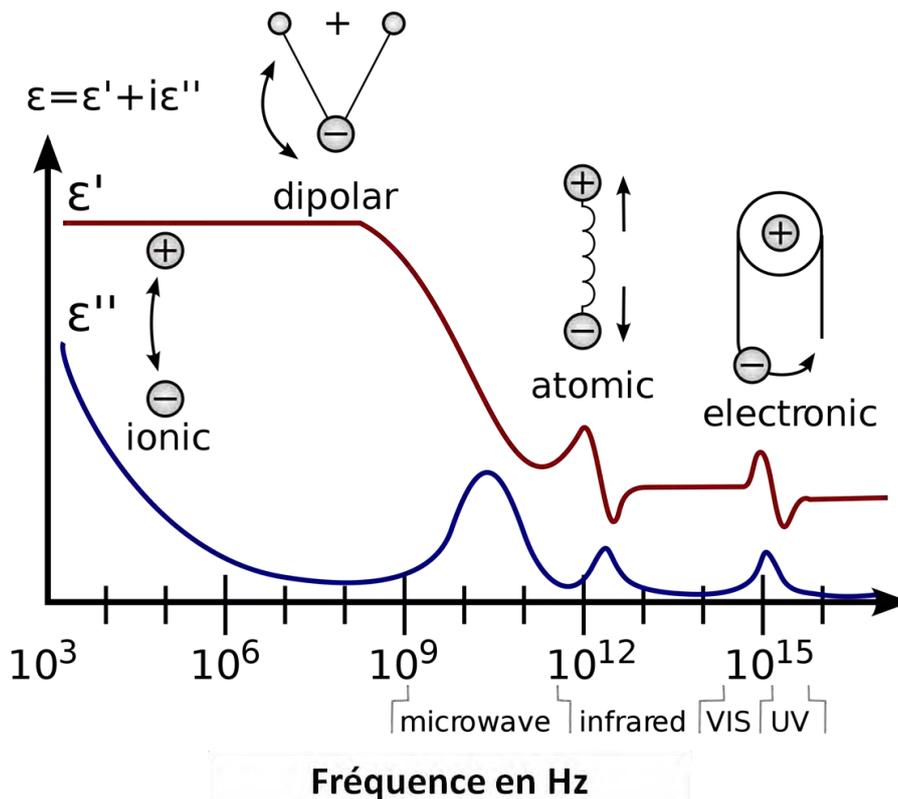


Figure II.2 La réponse en fréquence de la permittivité est liée avec les trois mécanismes de polarisation [6].

Cette figure illustre de plus l'intérêt d'opérer en gamme hyperfréquence (micro-onde) pour laquelle les signatures mesurées rendront compte de la dynamique du phénomène de polarisation dipolaire. Cette dynamique se nomme relaxation diélectrique : elle modifie la perte de polarisation, donc la perte d'énergie stockée, ainsi que l'augmentation de l'énergie absorbée par le milieu, dont l'image correspond à la courbe  $\epsilon''$  de la Figure II.2.

Le paragraphe suivant décrit plus en détail le phénomène de relaxation diélectrique et introduit le concept de permittivité complexe, rendant compte de l'énergie absorbée par le matériau.

## 2.3 La relaxation diélectrique

Dans le domaine temporel et d'une manière générale, le phénomène de relaxation d'un système identifie l'existence d'un retard de réponse de ce système lorsqu'il est soumis à une excitation extérieure. Dans le cas de la relaxation diélectrique qui nous intéresse, lorsqu'on applique brusquement un champ électrique à un matériau, sa polarisation s'établit avec un certain temps dit temps de relaxation  $\tau_R$ . Inversement, lorsque le champ est annulé, un temps de relaxation  $\tau_R$  est nécessaire pour que le matériau retourne dans son état de désordre moléculaire initial [9]. Le temps de relaxation  $\tau_R$  est défini comme le temps nécessaire pour que la polarisation croisse (ou décroisse) à  $1/e$  par rapport à sa valeur finale (initiale). Lors de cette phase de relaxation, les molécules (on se limite ici à la polarisation dipolaire de molécules) s'orientent donc, ce qui provoque des frictions internes. C'est le principe des fours micro-ondes, pour lesquels le champ électromagnétique agite les molécules d'eau : leurs frictions sur leurs environnements provoquent le chauffage de matériau pour que les molécules tournent lentement et approcher exponentiellement. Le phénomène de relaxation s'accompagne donc d'une déperdition d'énergie.

Transposé dans le domaine fréquentiel, ce phénomène de relaxation est de type « passe-bas » : au-dessous d'une fréquence limite (dite fréquence de relaxation  $=f_R$  qui dépend du temps de relaxation suivant l'équation 2.6) la polarisation dipolaire s'établit nominalement; en dessus de  $f_R$ , la polarisation dipolaire ne s'établit plus.

$$\tau = \frac{1}{\omega_R} = \frac{1}{2\pi f_R} \quad \text{Equation 2.6}$$

Où  $f_R$  est la fréquence de relaxation.

Ce phénomène de relaxation se modélise par une dépendance en fréquence de la permittivité relative du matériau. Pour tenir compte du phénomène de perte d'énergie, est introduite la notion de permittivité relative complexe décrit par l'équation 2.7.

$$\varepsilon(f) = \varepsilon'(f) - i\varepsilon''(f) \quad \text{Equation 2.7}$$

Avec  $\varepsilon'(f)$  la partie réelle de la permittivité relative complexe qui correspond à  $\varepsilon_r$  introduit par l'équation 2.5;  $\varepsilon''(f)$  la partie imaginaire (opposé à cause du signe négatif) de

la permittivité relative complexe qui traduit les dissipations (diélectriques) d'énergie du matériau [8].

Il existe plusieurs modèles de relaxation, la plus ancienne est introduite par P. Debye [10] (on parle de relaxation de Debye) et est décrite par:

$$\epsilon'(f) = \epsilon'_{f=\infty} + \frac{\epsilon'_{f=0} - \epsilon'_{f=\infty}}{1 + \left(\frac{f}{f_R}\right)^2} \quad \text{Equation 2.8}$$

$$\epsilon''(f) = \frac{(\epsilon'_{f=0} - \epsilon'_{f=\infty}) \cdot \left(\frac{f}{f_R}\right)}{1 + \left(\frac{f}{f_R}\right)^2} \quad \text{Equation 2.9}$$

Où  $\epsilon_{f=\infty}$  et  $\epsilon_{f=0}$  correspondent à la permittivité aux fréquences extrêmement hautes et extrêmement basses, respectivement.

Le tableau II.1 présente les valeurs du modèle de Debye pour de l'eau déionisée (DI) à 30 °C tandis que la Figure II.3 présente les parties réelle et imaginaire de la permittivité relative ainsi modélisée. Nous constatons que  $\epsilon'$  est constant au-dessus et au-dessous de la relaxation avec une transition se produisant à proximité de la fréquence de relaxation. En outre,  $\epsilon''$  est faible au-dessus et au-dessous la relaxation avec un maximum qui apparaît dans la zone de transition à la fréquence de relaxation.

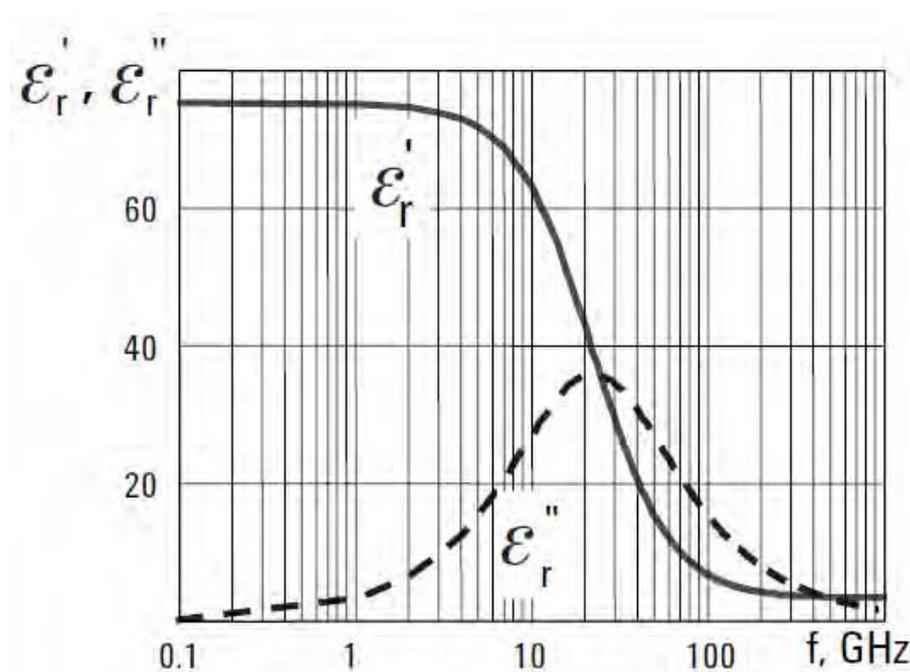


Figure II.3 La relaxation de Debye de l'eau à 30 °C [6].

TABLEAU II.1

	$\epsilon_{f=\infty}$	$\epsilon_{f=0}$	$f_R$
Eau 30 °C	4,9	76,47	22,10GHz

Obtenir des informations sur la relaxation diélectrique associée au phénomène de réorientation des molécules dipolaires n'est pas anecdotique : nous pensons qu'il permet de signer le contenu moléculaire d'une solution et d'un objet biologique. En milieu hétérogène (suspension de cellules par exemple), le phénomène de relaxation diélectrique HF correspondra à une observation globale de l'échantillon [11-12], rendant plus complexe l'interprétation mais ne remettant pas en cause les capacités d'analyse qui en découlent.

Les figures II.2 et II.3 démontrent que la gamme de fréquence de ce phénomène se situe, pour les milieux aqueux (c'est-à-dire tous les matériaux biologiques que nous sommes susceptible de rencontrer) dans les hyperfréquences (1-40GHz). C'est donc dans ce contexte que nous avons développé des systèmes de caractérisation en gamme HF de matériau biologique.

### 3. Conception d'un microsystème de spectroscopie HF de matériaux biologiques

Nous sommes imposés plusieurs objectifs principaux pour notre système d'analyse :

- réaliser une spectroscopie dans la gamme des hyperfréquences de paramètres électriques rendant compte de la relaxation dipolaire. Est ainsi attendue une signature riche et spécifique à l'objet observé,
- être capable d'analyser des objets biologiques
  - ✧ en milieu aqueux (contrairement à certains travaux/techniques opérant avec des objets biologiques fixés/secs). Nous souhaitons éviter tout pré-conditionnement de

l'échantillon spécifique à la technique (passage en milieu de sucrose, étape de marquage, ...),

- ✧ dans la gamme des dimensions micrométriques / des volumes du nanolitre, ceci permettant (1) de se rapprocher des dimensions des cellules et (2) d'envisager une parallélisation des détecteurs.

Ce dernier point impose de développer conjointement le biocapteur HF avec des circuits microfluidiques en charge du convoyage des échantillons biologiques dans la zone active du détecteur.

### 3.1 Principe de mesure des propriétés HF d'un matériau

Le mécanisme général de mesure des propriétés HF d'un matériau est le suivant :

- une source émet un champ (une énergie) électromagnétique,
- une partie du champ traverse le matériau à analyser, il s'en suit une interaction champ-matière qui impacte le champ électromagnétique,
- un récepteur capte ce changement de champ.

Par conséquent, il s'agit d'une séquence : source-interaction-récepteur, illustré par Figure II.4.

Les lois physiques décrivant la théorie des champs électromagnétiques déclinent plusieurs conséquences sur les ondes de l'interaction champ-matière : comme la réflexion, la diffraction, la dispersion, les interférences, ... [13].

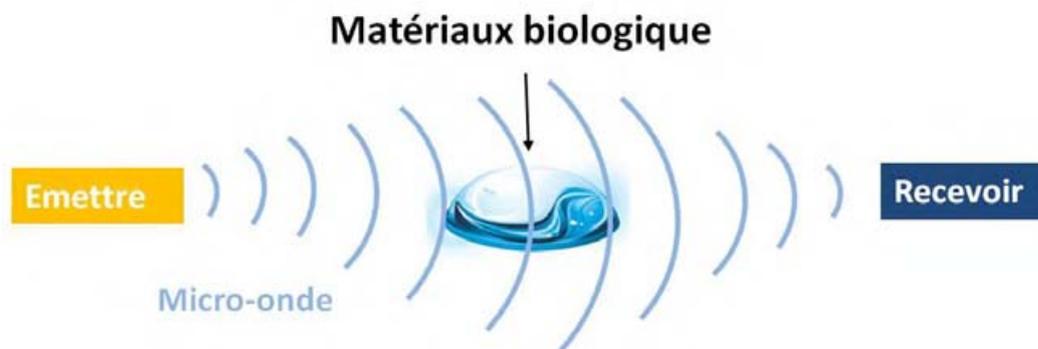


Figure II.4 Le mécanisme fondamental de mesure micro-onde de champ proche

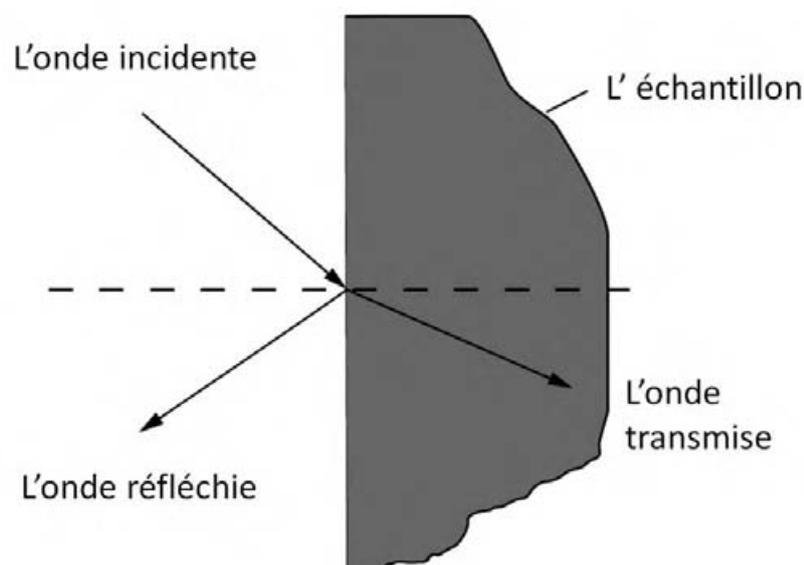
Deux situations doivent être distinguées :

- les ondes se propagent depuis la source vers le récepteur. Dans ce cas, la résolution spatiale est de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde. Dans notre cas, la longueur d'onde est centimétrique (1cm à 30GHz dans le vide) et compte tenu que nous souhaitons analyser des objets micrométriques, nous ne retiendrons pas cette situation.
- l'interaction champ-matière se fait en champs proche (proche voulant exprimer que les distances (source-objet-récepteur) sont très inférieures à la longueur d'onde). C'est dans cette configuration que nous avons focalisé nos travaux.

### 3.2 Méthodes de mesures des propriétés HF d'un matériau

Les méthodes électriques HF de caractérisation des matériaux se catégorisent généralement en : méthodes non résonantes et méthodes résonantes. Les méthodes non résonantes sont utilisées si l'on souhaite obtenir une connaissance générale des propriétés électromagnétiques sur une large gamme de fréquences (spectrométrie : c'est la voie qui nous intéresse), tandis que les méthodes résonantes sont utilisées pour déterminer les propriétés de matériau pour une fréquence unique ou plusieurs fréquences discrètes [13].

Pour les méthodes non résonantes, i.e. large bande, les propriétés des matériaux sont fondamentalement déduites de la réflexion des ondes sur l'objet ainsi que de leur transmission au travers de ce dernier (cf. Figure II.5). Très grossièrement, les amplitudes des ondes permettent de déterminer l'atténuation dans le matériau tandis que les phases donnent des indications sur la permittivité relative de ce dernier [14].



### 3.3 Choix de l'architecture du biocapteur

Considérant la co-intégration des circuits HF et microfluidiques, nous avons choisi la configuration coplanaire pour le capteur électromagnétique. Ce choix élimine de plus le besoin des trous traversants indispensables en technologie non-coplanaire (microstrip notamment) [11]. La détection sera capacitive : schématiquement le matériau sera placé entre 2 électrodes, la caractérisation électrique permettant la détermination de la capacité (image de la permittivité relative) et de la conductance (image des pertes du matériau). La Figure II.6 illustre ce concept en montrant sa transposabilité en technologie coplanaire : les 2 électrodes sont côte-à-côte sur le même plan : le champ électrique baignant, par effet dit de bord (fringing field), dans le matériau à analyser (en gris).

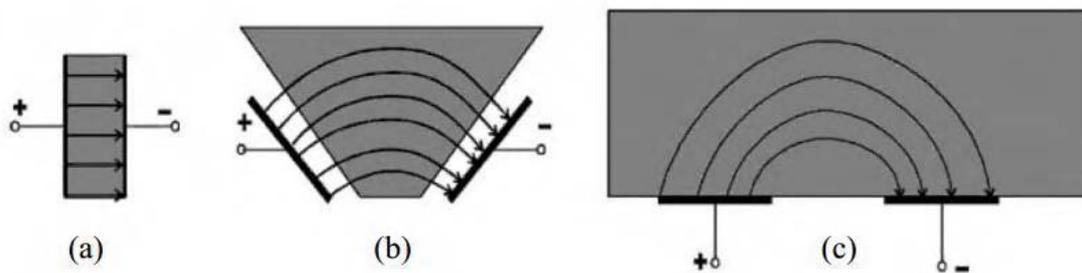


Figure II.6 Détection capacitive : (a) capacité à plaques parallèles (parallel plates) que l'on peut, par transformations successives (b) convertir en technologie coplanaire (c) CPW [15].

Cette configuration est parmi les solutions les plus largement utilisées pour les applications de détection de produits chimiques en raison de nombreux avantages tels que la simplicité de mise en œuvre. Ce principe de détection constitue donc un moyen simple et intégrable de réaliser la spectroscopie diélectrique du matériau sous investigations [15].

### 3.4 Conception du biocapteur

Notre biocapteur est constitué de deux parties principales :

- le circuit biocapteur hyperfréquence constitué de lignes coplanaires (CPW pour CoPlanar Waveguide) d'accès avec, au centre : la capacité de détection qui est une capacité interdigitée (nous verrons plus loin l'intérêt de cette configuration interdigitée),
- le canal microfluidique qui localise le fluide à analyse au-dessous de la zone active qui n'est autre que la capacité interdigitée.

La figure II.7 montre l'architecture du biocapteur : le choix de la configuration coplanaire de la détection capacitive facilite la co-intégration avec le canal microfluidique.

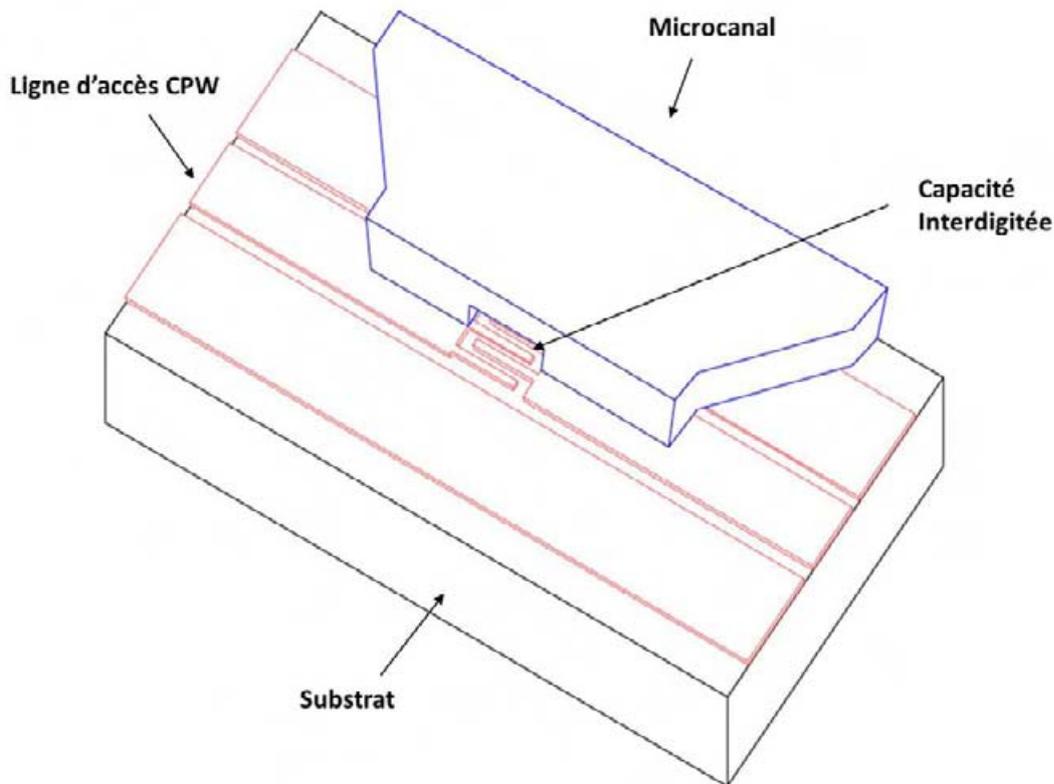


Figure II.7 Architecture du biocapteur muni de son micro-canal

### 3.4.1 Conception HF du biocapteur

Pour concevoir notre circuit électromagnétique, nous avons utilisé le logiciel commercial HFSS qui est un simulateur 3D de champs électromagnétiques hyperfréquences par éléments finis. Il permet de prédire les réponses électriques des circuits HF ainsi que de simuler les champs électromagnétiques dans les structures, ce qui est capital pour notre application de biocapteur HF.

La figure II.8. (A) illustre la distribution du champ électrique à 20GHz, qui est fortement concentré dans la zone de la capacité interdigitée. Cette forte intensité du champ électrique définit la zone active (i.e. sensible) du dispositif c'est-à-dire la zone dans laquelle l'interaction liquide-champ est maximale. Cette simulation montre de plus l'intérêt de la configuration multi-doigts (interdigitée) : le champ est uniformément intense sur une surface de  $150\mu\text{m} \times 150\mu\text{m}$  définissant ainsi la zone sensible au dessus de laquelle le micro-canal doit convoyer l'échantillon liquide à mesurer.

La figure II.8. (B) présente l'intensité du champ électrique en coupe transverse (transverse par rapport aux accès coplanaires). Le champ est fortement concentré jusqu'à  $10\mu\text{m}$  environ au-dessus de la capacité (la zone rouge identifie un champ compris entre 80% et 100% de la valeur maximale), il reste intense jusqu'à  $20\mu\text{m}$  (les zones verte et jaune identifient un champ compris entre 50% et 80% de la valeur maximale), et devient négligeable au-delà de  $40\mu\text{m}$ . Pour la suite nous considérerons une hauteur de zone sensible à  $20\mu\text{m}$  (critère des 50% correspondant à -3dB), ce qui donne un volume d'analyse de  $450 \times 10^3 \mu\text{m}^3$  équivalent à 0.45 nanolitre.

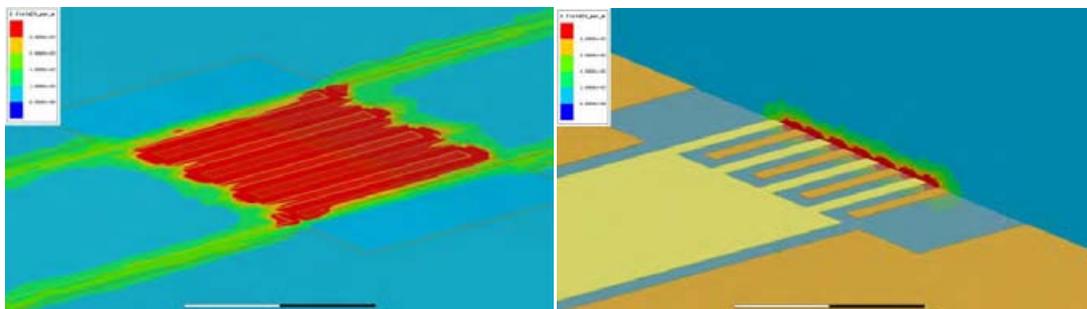


Figure II.8. (A) la distribution du champ électrique du dispositif CID en vue de dessus, (B) le champ électrique en vue en coupe.

Nos objectifs sont donc atteints : un dispositif large bande analysant les propriétés diélectriques de liquide et opérant dans la gamme du nanolitre.

La Figure II.9 et Tableau. II.2 détaillent le dimensionnement du biocapteur.

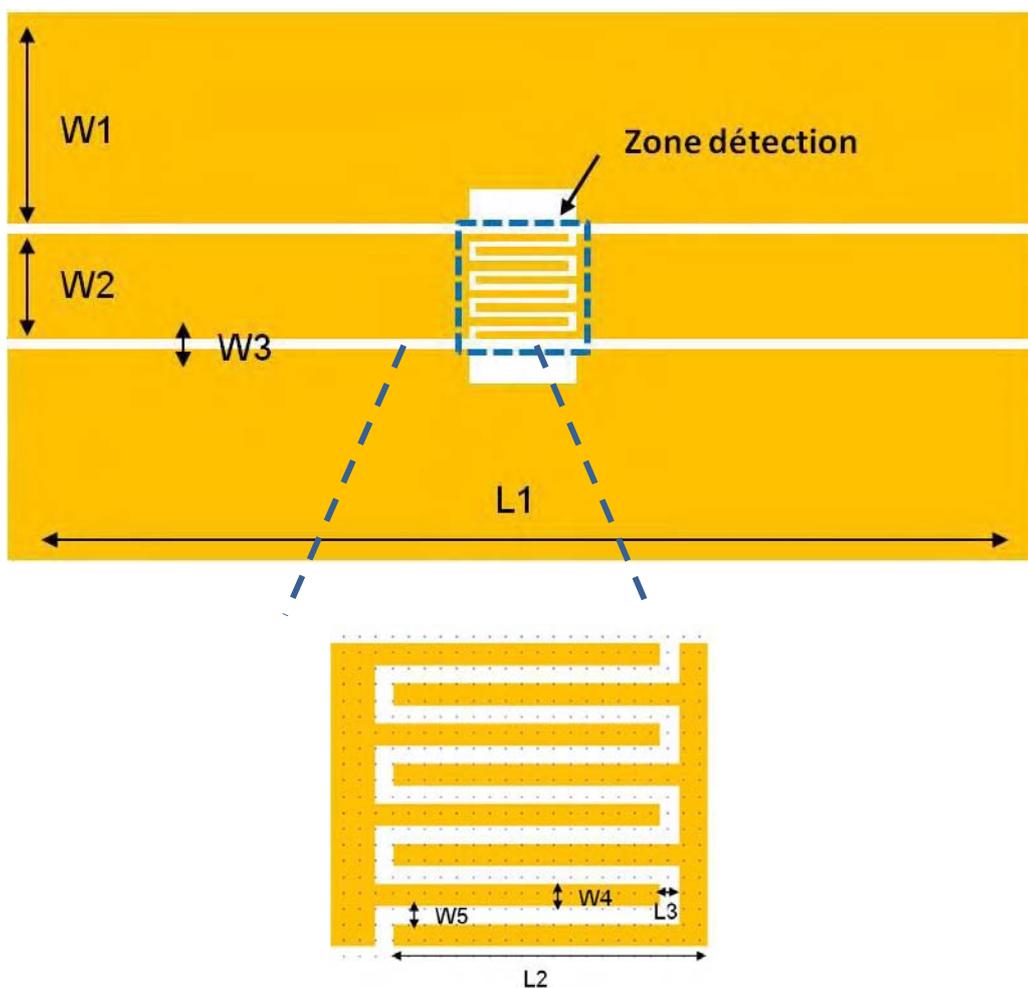


Figure II.9 Schéma du biocapteur HF avec un zoom pour la zone de détection.

TABLEAU II.2  
DIMENSIONS DU BIOCAPTEUR HF

	Dimensions		Valeurs	Dispersion
Electrodes		L1	1450µm	±0.5µm
		L2	140µm	±0.5µm
		L3	10µm	±0.5µm
		W1	300µm	±0.5µm
		W2	150µm	±0.5µm
		W3	15µm	±0.5µm
		W4, W5	10µm	±0.5µm

### 3.4.2 Conception de la partie microfluidique

La fonction du canal microfluidique est le guidage de l'échantillon fluide au niveau de la zone active du biocapteur. Les avantages d'opérer en microfluidique sont la faible consommation de réactif (nanolitre), le contrôle et la répétitivité des volumes mis en jeu, la parallélisation des opérations fluidiques ainsi que la possible production de masse à faible coût de dispositifs identiques [16]. La figure II.10 présente les vues de dessus et en coupe du micro-canal. Ce dernier est constitué de deux accès pour le liquide, la largeur de 1mm facilitant l'injection et la mobilité du liquide, et d'une constriction de 150 $\mu$ m large localisant le liquide au-dessus de la zone de détection. Nous avons fixé la hauteur du canal à 40 $\mu$ m. L'extension des champs électromagnétiques de 40 $\mu$ m au-dessus des dispositifs HF maximise son interaction avec le liquide.

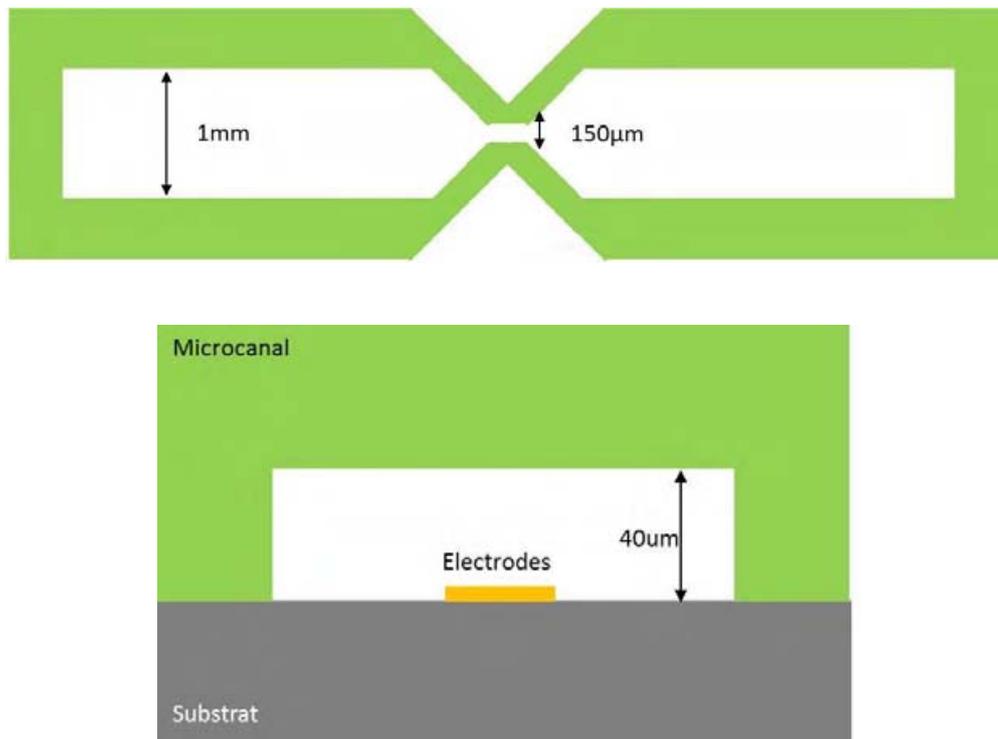


Figure II.10 Schéma du micro-canal en vue dessus et vue en coupe.

Le biocapteur HF conçu, nous l'avons ensuite fabriqué. La filière technologique correspondante est décrite dans le prochain paragraphe.

## 4. Fabrication du biocapteur

La fabrication du biocapteur comporte plusieurs étapes:

- l'élaboration des circuits HF sur un substrat quartz,
- l'élaboration du micro-canal réalisé dans l'élastomère Polydiméthylsiloxane (PDMS),
- et finalement l'assemblage des deux parties.

La fabrication du capteur HF/fluidique s'appuie sur des procédés de microfabrication traditionnels (photolithographie, gravure, croissance et dépôt de films, assemblage...) bien établis au LAAS.

Afin de réaliser notre biocapteur, la principale technique mise en œuvre est la photolithographie, correspondant à l'ensemble des opérations permettant de transférer une image (généralement présente sur un masque) vers un substrat. Cette technique est très utilisée dans l'industrie du semi-conducteur. Les motifs de l'image ainsi transférée deviendront par la suite les différentes zones des composants électroniques [17].

Après avoir dessiné les différents niveaux des structures sur le logiciel Cléwin 4, le jeu de masques est fabriqué au LAAS-CNRS avec le système d'écriture laser DWL 200 Heidelberg Instruments. Ce type d'équipement permet d'obtenir des masques de résolution inférieure au micromètre. Chaque niveau correspond à une étape technologique particulière. Dans le cas de ce biocapteur HF, seuls 2 niveaux sont requis: un pour la délimitation des circuits HF et un second pour la fabrication des canaux fluidiques.

### 4.1 Elaboration du circuit HF

Afin de s'affranchir des pertes induites par l'effet de peau, il est normalement préconisé d'utiliser une épaisseur de métallisation supérieure ou égale à trois fois l'épaisseur de peau, ce qui équivaut dans la gamme 1-40GHz à une épaisseur minimale de 2,5  $\mu\text{m}$ . Or pour assurer une bonne adhésion du canal fluidique sur les circuits HF et minimiser toute fuite, il est préférable d'utiliser une métallisation de faible épaisseur, choisie de 0,3  $\mu\text{m}$  dans notre cas. Nous avons donc opté pour une métallisation obtenue par la technique de "lift-off" plutôt qu'un dépôt électrolytique plus approprié à de fortes épaisseurs métalliques.

Le procédé lift-off est indiqué sur la Figure II.11.

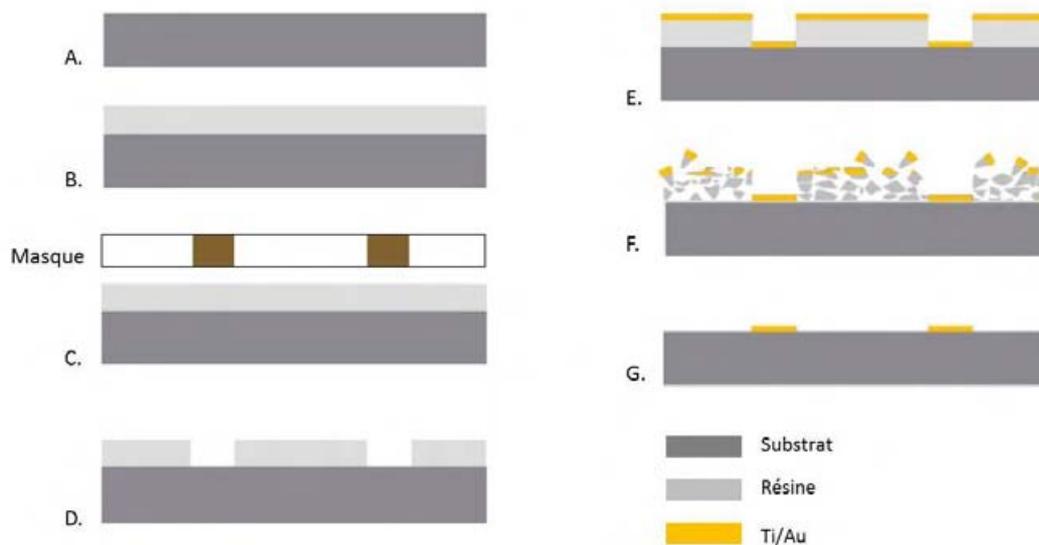


Figure II.11. Schéma de la fabrication des circuits hyperfréquence: (A) Nettoyage du substrat; (B) Dépôt de la résine photosensible; (C) Photolithographie par UV; (D) Développement de la résine; (E) Évaporation du métal; (F) Suppression de la résine; (G) Les électrodes sont prêtes.

Une fois les masques prêts, nous commençons par le nettoyage d'une plaquette de quartz, de 500  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, dans un mélange sulfochromique, appelé RT2, suivi d'un rinçage à l'eau De-Ionisée (DI) et d'une déshydratation (cf. étape A de la Figure II.11). Ensuite, une résine négative NLoF de 2,5  $\mu\text{m}$  d'épaisseur est déposée sur le substrat (cf. étape B de la Figure II.11). Il s'agit d'une résine dont les flancs après développement sont rentrants, ce qui favorise l'élimination finale de la résine (étape F de la Figure II.11). La résine est ensuite exposée aux UV au travers du masque correspondant aux circuits HF, puis développée dans le développeur MF-CD-26. Les solvants spécifiques contenus dans le développeur vont permettre d'éliminer la résine non exposée et ainsi structurer la couche de résine déposée sur le substrat [17] (étape D de la Figure II.11). La couche métallique en titane (500 $\text{\AA}$ ) et en or (300nm) est ensuite évaporée sur toute la plaquette à l'aide d'un canon à électrons. La résine et les zones métalliques non désirées sont éliminées grâce à un bain d'acétone qui attaque la résine (procédé Liff-off [18]), suivi d'un rinçage à l'eau DI. Le métal directement en contact avec le substrat reste quant à lui intacte. Le circuit HF sont alors prêts. La Figure II.12 illustre par quelques images les électrodes fabriquées.

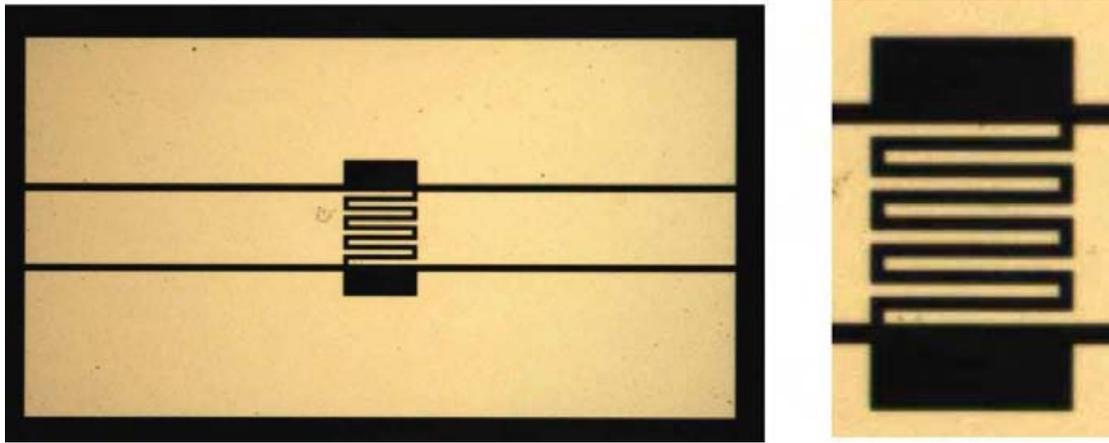


Figure II.12. Le circuit hyperfréquences : Photographie d'une ligne coplanaire avec une capacité interdigitée; et zoom de la zone de détection sur la photographie de droite.

L'étape suivante consiste à fabriquer les canaux microfluidiques.

## 4.2 Elaboration des micro-canaux en PDMS

Notre choix du matériau pour fabriquer les canaux microfluidiques s'est porté sur le Polydiméthylsiloxane (PDMS). Il présente en effet l'avantage d'être particulièrement bon marché, facile à répliquer en utilisant des techniques de micro-moulage, biocompatible, transparent, et bien d'autres atouts encore [19].

Les canaux microfluidiques sont obtenus par moulage. Le principe général du procédé est décrit sur la Figure II.13. Il comprend les étapes suivantes :

- la fabrication du moule qui correspond à une version en négatif des canaux,
- le moulage du PDMS liquide et sa réticulation
- suivi par son démoulage, puis perçage pour réaliser les accès et connexions fluidiques.

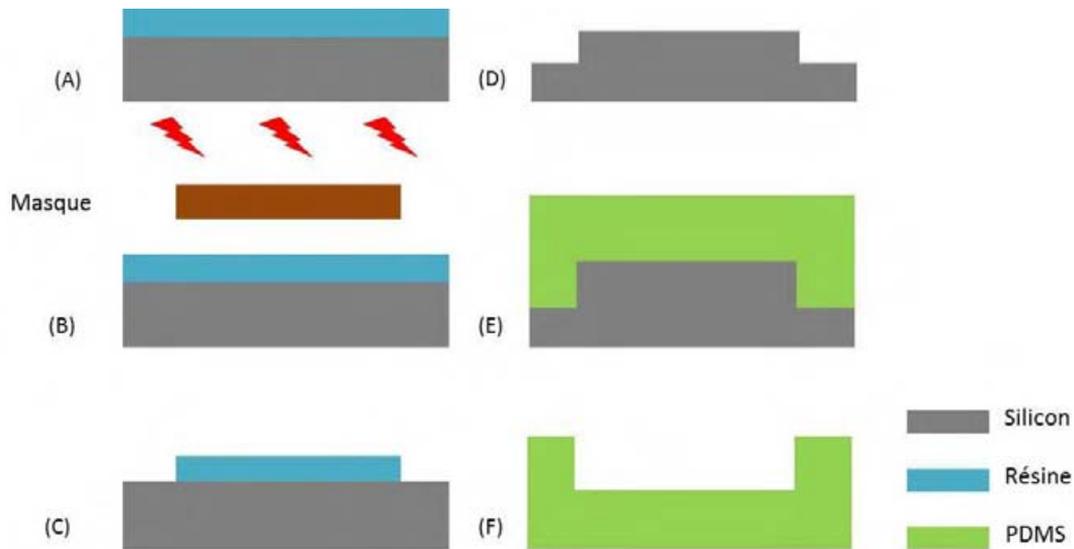


Figure II.13 : Le procédé de coulage du PDMS.

#### 4.2.1 Fabrication du moule

Le moule est fabriqué à l'aide d'une plaquette en silicium. Le procédé commence par un nettoyage du substrat. Une résine positive photosensible est ensuite déposée, recuite, insolée et enfin développée (cf. Fig. II.13 (A)-(C)). Cette résine sert de masque durant l'étape suivante de gravure profonde du silicium par Deep Reactive Ion Etching (DRIE). L'épaisseur gravée correspond à  $40\ \mu\text{m}$ , soit la hauteur souhaitée du micro-canal. Enfin, la résine résiduelle est retirée dans un bain d'acétone, comme indiqué sur la Fig. II.13 (D).

Afin de faciliter le démoulage des puces en PDMS, nous avons réalisé un traitement de la surface du moule en silicium avec un silane OTS (Octadecyltrichlorosilane) avec une concentration de 1% dans du xylène. Cette étape permet de rendre la surface du silicium hydrophobe (avec un angle de contact proche de  $110^\circ$ ). À cet égard, il est intéressant de noter que le PDMS non réticulé mouille les surfaces traitées à l'OTS, ce qui rend possible l'enduction à la tournette. En revanche, le PDMS réticulé n'adhère pas sur ces surfaces.

#### 4.2.2 Moulage, démoulage et perçage des canaux en PDMS

Le moule en silicium est rincé avec de l'isopropanol, puis séché avec de l'azote avant de faire le moulage. Puis, comme indiqué sur la Fig. II.13 (E), on verse 8 g de PDMS (de type Sylgard 184, avec un rapport base : agent réticulant de 10:1, qui aura préalablement dégazé

dans une cloche à vide pendant 30 minutes) sur le moule de silicium de 4 pouces de diamètre. Une fois la surface du PDMS bien homogène, on place le moule dans un four spécifique pour polymère à 75 °C pendant 1 heure. Les composants réticulés en élastomère PDMS peuvent alors être décollés du moule (cf. Fig. II.13 (F)). La Figure II.14 montre l'image MEB du micro-canal en PDMS ainsi obtenu. La hauteur des parois mesurée est  $\sim 39 \mu\text{m}$  et la largeur du passage restreint est ici de  $148 \mu\text{m}$ . Les canaux sont enfin percés et découpés.

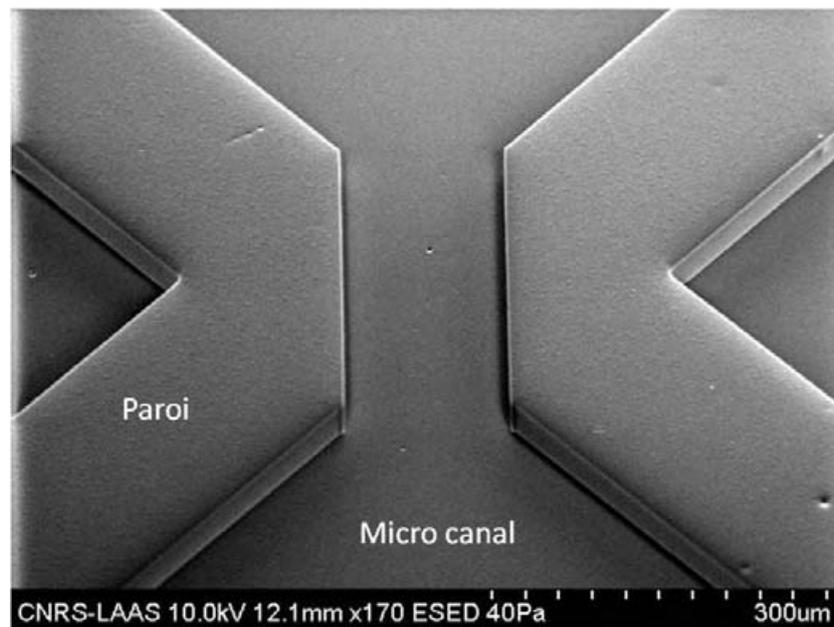


Figure II.14 L'image MEB du micro-canal en PDMS.

Le perçage des trous dans les puces est dédié à l'injection de liquide dans les micro-canaux.

#### 4.2.3 Hydrophylicité du PDMS par traitement de surface

L'un des défauts du PDMS réside dans son hydrophobicité ce qui rend difficile l'injection de liquides dans le micro-canal. La solution la plus couramment utilisée pour rendre le PDMS hydrophile consiste à faire un traitement de surface par plasma oxygène. Cependant, il est bien connu que la surface de PDMS oxydée reprend rapidement son hydrophobicité après l'oxydation [20]. Par conséquent, un autre traitement de surface publié par Yu and Han [21] a été mis en place afin d'assurer une plus longue période d'hydrophylicité de l'élastomère. Il s'agit de faire interagir un PEG (Poly -éthylène glycol) avec le PDMS en utilisant un procédé de gonflement-dégonflement du PDMS.

Le protocole de traitement est le suivant. Tout d'abord, un plasma oxygène est appliqué sur le PDMS. Il est effectué dans un système plasma (PVA de Tepla 300, Allemagne) à une fréquence de 2,45 GHz. Un débit constant d'oxygène (1000 mTorr) et 200 W de puissance RF est utilisé pendant 30 sec. Le PDMS est ensuite immergé dans 0,17 ml de 2-[méthoxy (polyéthylèneoxy) propyl] triméthoxysilane 90% (de ABCR GmbH & Co, Allemagne), qui a été préalablement mélangé à 50 ml de toluène (à partir de Sigma-Aldrich, USA) pendant 1 h pour préparer un PDMS traité au PEG avec sa propriété de surface contrôlée [22]. Puis, le PDMS est plongé dans de l'isopropanol avec application d'ultrasons appliqués à 35 kHz pendant 1 min pour éliminer les restes de solvant du traitement. Les micro-canaux en PDMS traités sont alors prêts après deux étapes finales: rinçage et séchage dans une cloche à vide pendant 2 h.

Afin de mettre en évidence la longévité de l'hydrophobicité du PDMS grâce au traitement PEG, les angles de contact pour des échantillons de PDMS non traité, de PDMS traité par plasma O<sub>2</sub> et de PEG-PDMS ont été mesurés en utilisant la technique de la goutte, et en l'occurrence avec des gouttelettes d'eau déionisée. Les résultats sont présentés sur la figure II.15. Le PDMS non traité présente un angle de contact de l'ordre de 110° et est donc hydrophobe en permanence. Le PDMS traité uniquement par plasma oxygène retrouve un caractère hydrophobe avec un angle de contact supérieur à 90° après une durée de 100 min. Enfin, le PDMS traité par la méthode du PEG présente une bonne stabilité d'angle de contact restant faible pendant une dizaine de jours, ce qui est suffisant pour nos mesures. De plus, la couche PEG est résistante à l'adsorption de protéines [23], ce qui confère un attrait supplémentaire à la technique de traitement pour nos tests de matériaux biologiques.

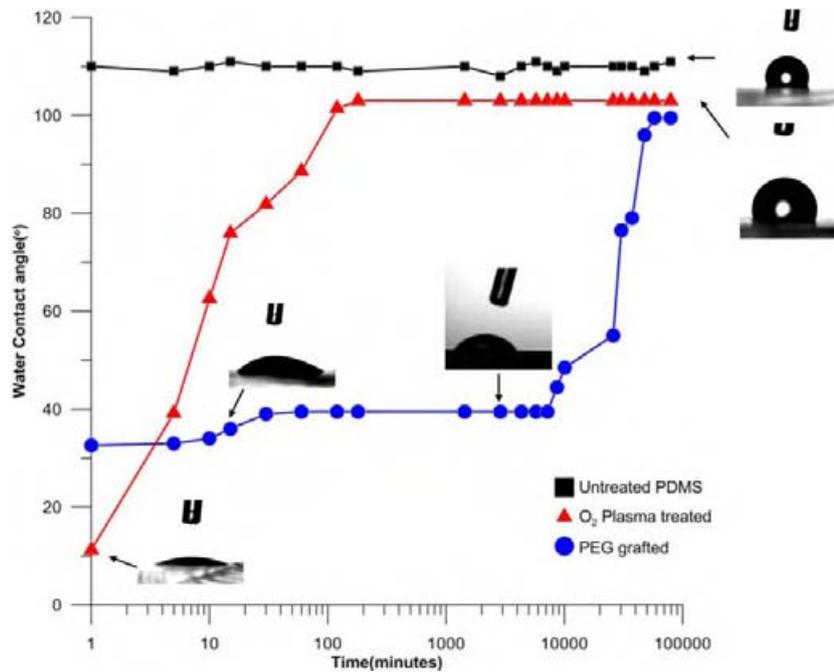


Figure II.15. L'angle de contact de PDMS non traité, de PDMS traité par plasma O<sub>2</sub> et de PEG-PDMS.

### 4.3 L'assemblage de circuit HF et des micro-canaux

La dernière étape de fabrication des puces est l'assemblage. On a choisi d'abord la méthode classique : coller la partie PDMS sur la plaquette métallisée à l'aide d'un traitement au plasma O<sub>2</sub>. L'alignement des deux parties est fait sous un microscope d'assemblage. La figure II.16 montre l'image d'un biocapteur ainsi obtenu.

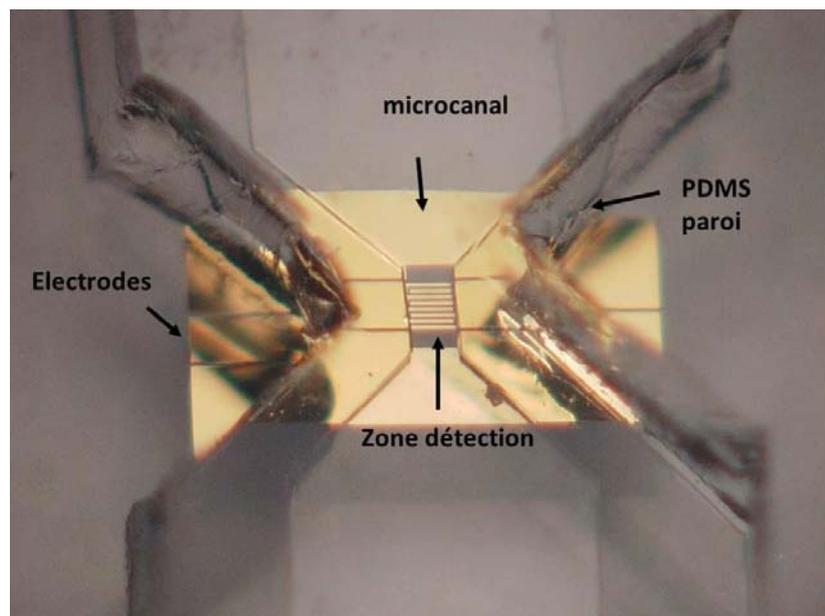


Figure II.16 Image d'un biocapteur coplanaire HF avec capacité interdigitée au niveau de la zone de détection

Cependant, il peut parfois subsister des problèmes de fuites en raison de l'épaisseur de circuit HF qui impliquent de fait un relief non négligeable pour le collage. Ceci est particulièrement dommageable durant la caractérisation des composants et peut endommager les pointes de mesure. Ceci est illustré sur la figure II.17 avec le schéma du composant vu en coupe et son image MEB, sur lesquels on peut observer une zone non scellée. Afin d'optimiser le collage des canaux PDMS sur les électrodes, nous avons testé l'ajout d'une couche intermédiaire de résine SU8 entre le PDMS et le substrat pour favoriser l'adhérence et l'étanchéité des deux parties. Le protocole est précisé sur la figure II.18. Tout d'abord, une couche d'environ 10 $\mu$ m de résine SU8 est déposée sur une plaquette vierge et non recuite. Le canal PDMS est alors transféré sur cette plaquette et mis en contact avec la résine SU8 en utilisant la méthode dite de 'soft lithographie' (stamping). Après décollement, le bas des murs des canaux sont estampés d'une couche SU-8. Les canaux avec SU8 sont ensuite placés sur le circuit HF et fixés via un recuit et donc le durcissement de la couche SU8.

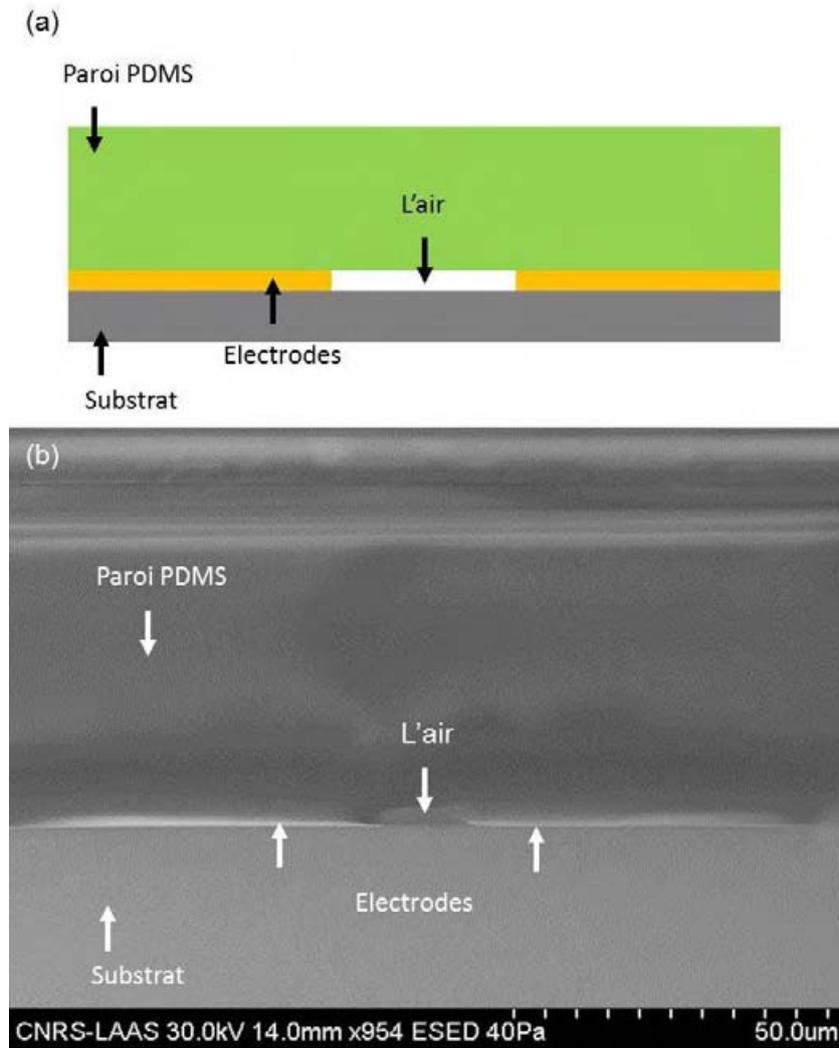


Figure II.17 (a) Schéma d'une zone non étanche entre une paroi de PDMS et le substrat (b) Image MEB d'un canal en PDMS dont l'accroche n'est pas complète sur les métallisations inférieures après collage par traitement au plasma  $O_2$ .

Après optimisation du collage par SU8, nous avons observé l'état du collage entre le PDMS et le substrat métallisé à l'aide d'un MEB. La figure II.19 montre que les écarts ont été remplis par la couche SU8. Cette méthode permet donc de résoudre les possibles fuites des composants et fournit de plus une force collage suffisante (de l'ordre de 25-35 psi).

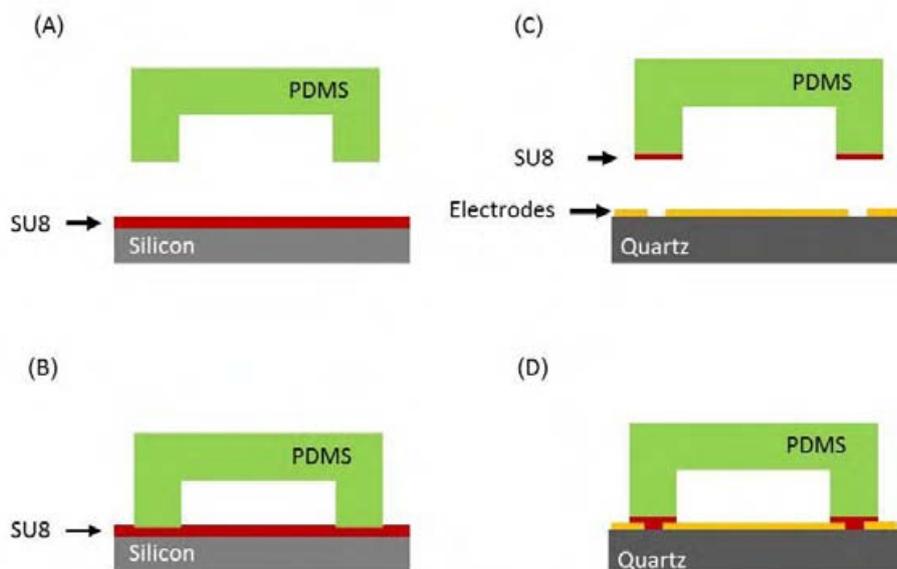


Figure II.18 Le procédé de collage de canaux en PDMS sur des électrodes à l'aide d'une couche intermédiaire SU8.

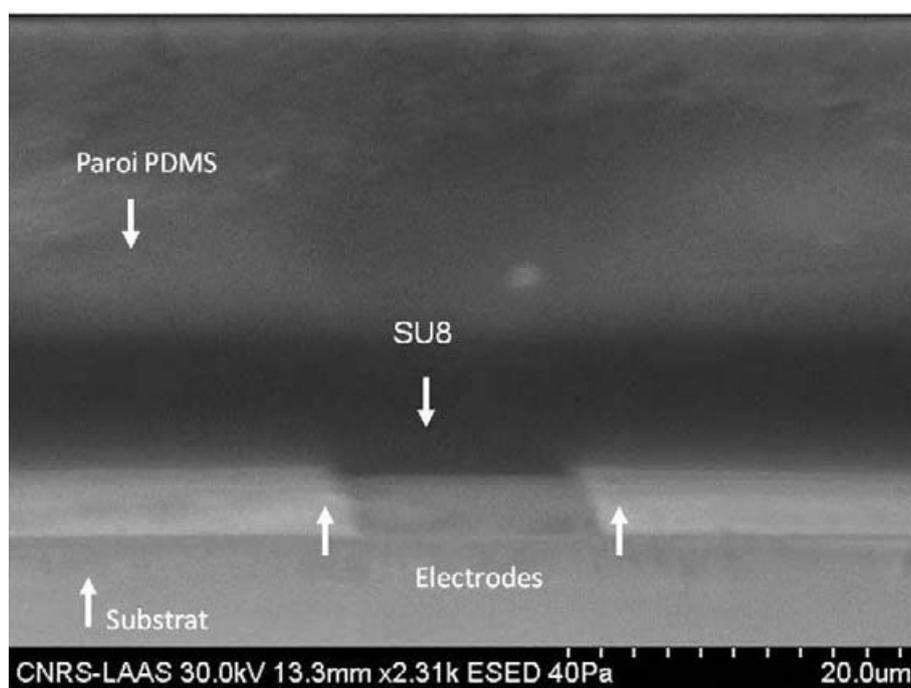


Figure II.19 Image du collage d'un canal en PDMS sur le circuit HF via une couche SU8.

## 5. Expérimentations

### 5.1 Matériels et méthodes

Les mesures sont effectuées directement sur plaquettes grâce à deux sondes coplanaires ‘masse-signal-masse’ connectées à un analyseur de réseau en charge des mesures électriques larges bandes. Le banc de test prend également en charge l’injection des échantillons fluidiques et biologiques via un pousse seringue de précision. De plus, l’observation des fluides est effectuée à l’aide d’un microscope muni d’une caméra CCD connectée à un ordinateur. Le dispositif est placé sur une semelle dont la température est réglée à 20 °C. L’architecture du banc expérimental est présentée à la figure II.20.

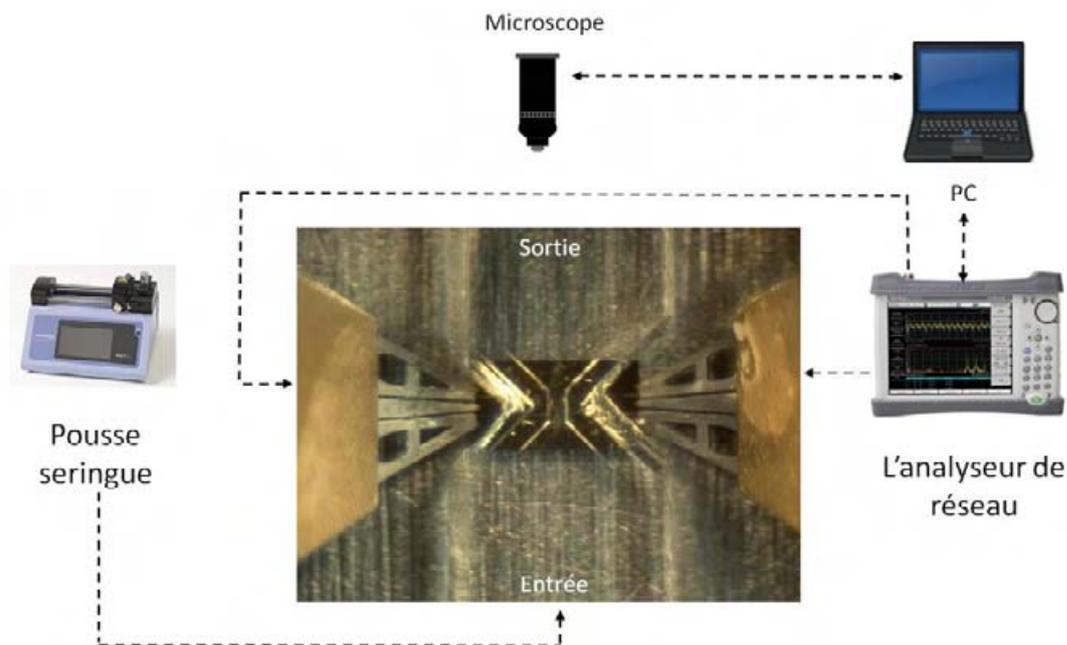


Figure II.20. L'architecture du test micro-onde et microfluidique

Les paramètres S (paramètres de réflexion et de transmission de puissance) sont mesurés de 40 MHz à 40 GHz. Un calibrage ‘Short-Open-Load-Through’ (SOLT) ramène les plans de mesure au niveau du bout des pointes des sondes coplanaires, c'est-à-dire aux extrémités des lignes d'accès [24].

## 5.2 Procédure d'extraction de paramètres du liquide et validation

Nos mesures sont donc associées à l'ensemble 'ligne d'accès + mur du micro-canal + capacité de détection + mur du micro-canal + ligne d'accès', mais c'est uniquement les caractéristiques (admittance) de la capacité de détection qui nous intéresse. Pour extraire cette admittance complexe, nous avons développé la méthode suivante :

- la structure vide (avec de l'air) a été mesurée et nous en avons déduit le modèle des deux lignes d'accès coplanaires, les deux capacités parasites correspondant à l'impact des parois du micro-canal et le capteur électrique (IDC). La figure II.21 présente les paramètres de réflexion et transmission mesurés et ainsi modélisés.

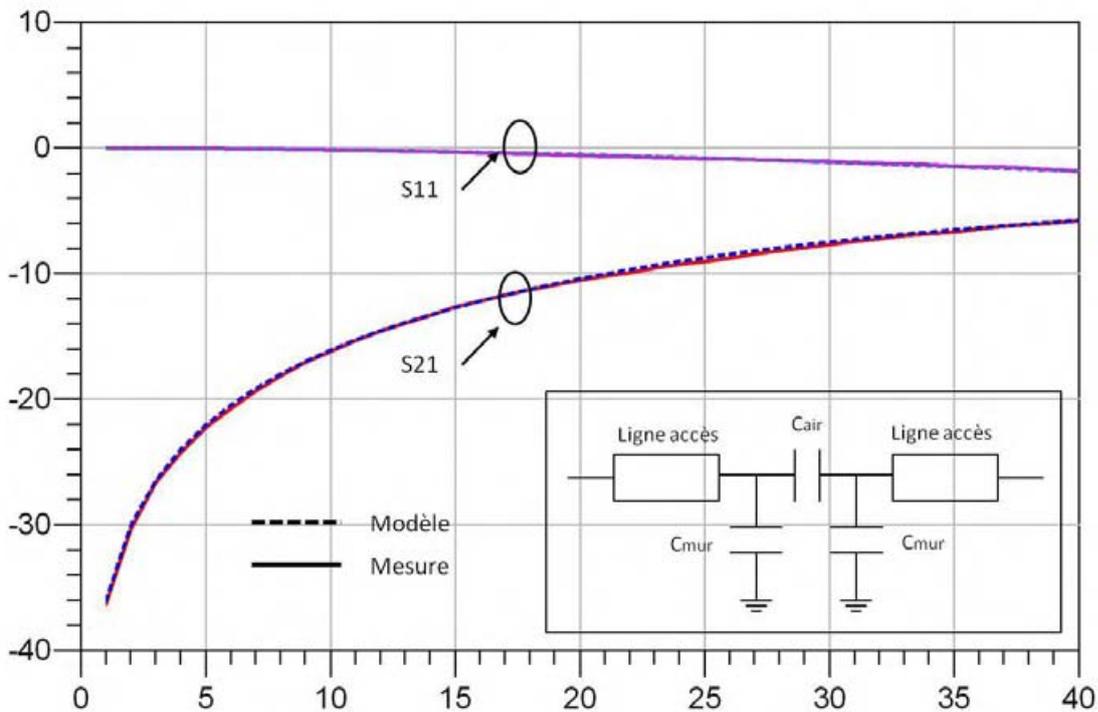


Figure II.21. Paramètres de réflexion et transmission mesurés et modélisés (insert : modèle électrique du dispositif à vide).

- la structure est ensuite mesurée avec un liquide chargé et une procédure d'épluchage ('de-embedding' en anglais) est appliquée pour supprimer les effets des lignes d'accès

de  $C_{\text{mur}}$  et  $C_{\text{air}}$  pour finalement extraire  $C_{\text{fluide}}$  et  $G_{\text{fluide}}$  indiqués sur le modèle électrique du dispositif chargé de la Figure II.22.

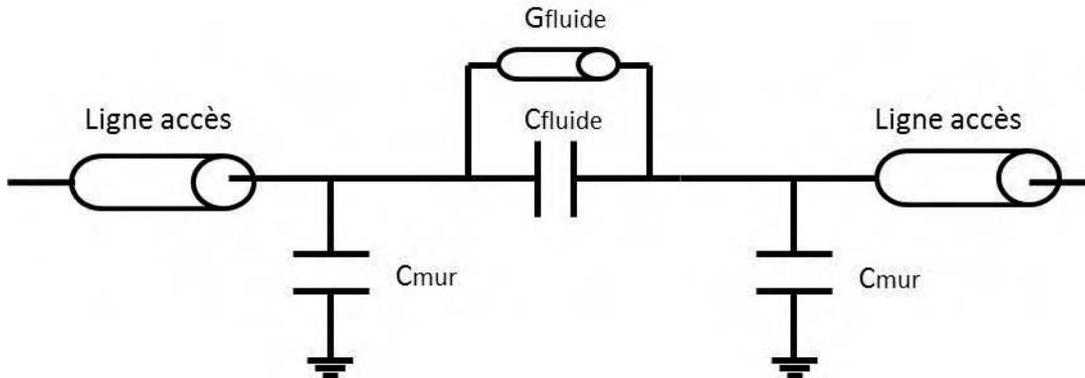


Figure II.22. Modèle électrique du dispositif chargé

- l'extraction de  $C_{\text{fluide}}$  et  $G_{\text{fluide}}$  requiert une dernière étape de post-traitement car l'étape précédente permet de calculer la matrice admittance de ces 2 éléments. Le modèle électrique équivalent associé au fluide et les conventions utilisés sont présentés à la figure II.23 :

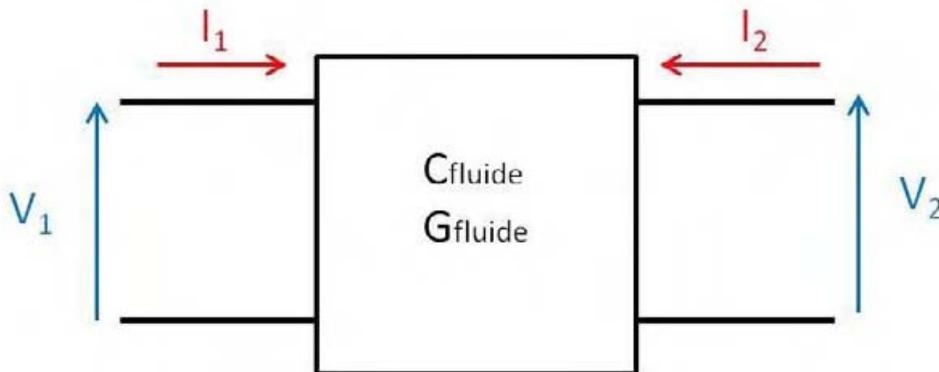


Figure II.23. Modèle électrique équivalent associé au fluide et conventions utilisés

La matrice admittance est définie de la façon suivante:

$$I_1 = Y_{11}V_1 + Y_{12}V_2$$

$$I_2 = Y_{22}V_2 + Y_{21}V_1$$

Equation 2.10

C'est l'admittance de transfert inverse qui nous intéresse, elle est définie lorsque l'entrée du quadripôle est en court-circuit ( $V_1=0$ ).

$$I_2 = Y_{21}V_2 \text{ lorsque } V_1 = 0$$

Or d'après le schéma électrique de la figure II.21, l'admittance  $Y_{21}$  vaut l'opposé de l'admittance constituée par la mise en parallèle de la capacité et la conductance :

$$-Y_{21} = Y = G_{fluide} + j\omega C_{fluide} \quad \text{Equation 2.11}$$

Donc,

$$G_{fluide} = -Re(Y_{21})$$

$$C_{fluide} = -Im(Y_{21})/2\pi f \quad \text{Equation 2.12}$$

Ce qui finalise notre post-traitement et nous donne accès à  $C_{fluide}$  et  $G_{fluide}$  en fonction de la fréquence (de 40MHz à 40GHe dans notre cas). La figure II.24 présente les 2 situations servant au processus d'extraction de  $C_{fluide}$  et  $G_{fluide}$ , qui en représente *in fine* le contraste.

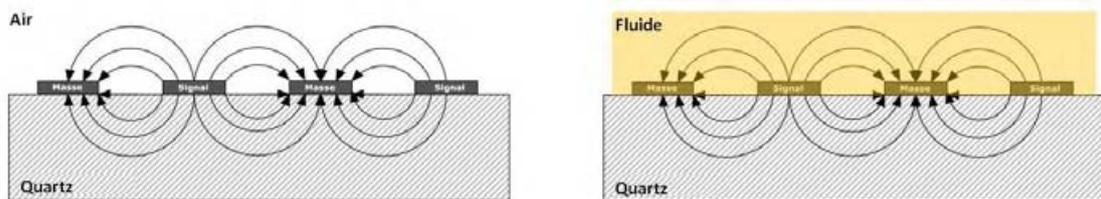


Figure II.24. Schématiques de capteur chargé par l'air ou fluide.

Nous pouvons déduire que :

$$C_{fluide} = \varepsilon_0 \frac{\varepsilon'_{fluide}-1}{2} K$$

$$G_{fluide} = \varepsilon_0 \frac{\varepsilon''_{fluide}-0}{2} K \times \omega \quad \text{Equation 2.13}$$

Où  $K$  est un paramètre qui ne dépend que de la géométrie de la capacité interdigitée.

Afin de vérifier la fonctionnalité du capteur et la justesse de la procédure d'extraction des paramètres du fluide présentée ci-dessus, nous avons extrait  $C_{\text{fluide}}$  et  $G_{\text{fluide}}$  pour de l'eau déionisée à 20 °C en fonction de la fréquence. Nous avons comparé les résultats issus de mesures avec ceux provenant de simulations réalisées par le logiciel HFSS. Les simulations ont considéré un modèle de Debye pour l'eau conformément aux équations 2.6 et 2.7 et dont les paramètres ont été extraits à l'aide d'une technique précédemment développée dans l'équipe [24].

La figure II.25 nous démontre qu'un bon accord entre mesures et simulations est atteint, ce qui valide la fabrication de notre biocapteur, son fonctionnement correcte et valide la procédure d'extraction de  $C_{\text{fluide}}$  et  $G_{\text{fluide}}$ .

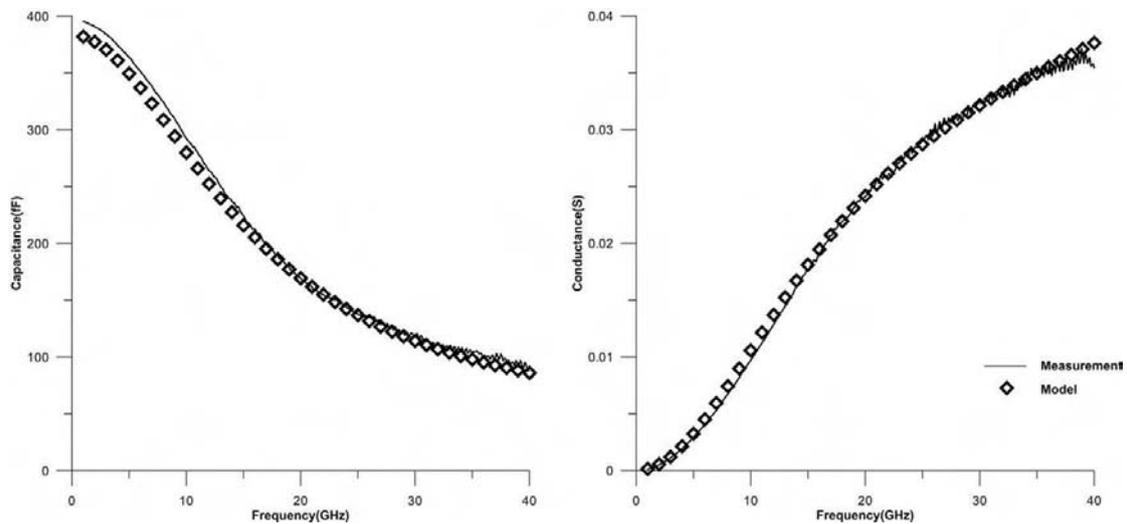


Figure II.25. Valeurs de la capacité et de conductance ( $C_{\text{fluide}}$  et  $G_{\text{fluide}}$ ) en fonction de la fréquence pour de l'eau DI, comparaison simulations/mesures.

*NOTE : On peut être gêné par le fait que  $C_{\text{fluide}}$  ne soit pas linéairement lié à  $\epsilon'_{\text{fluide}}$  mais dépende de  $\epsilon'_{\text{fluide}} - 1$ , le fameux “-1” provenant du fait que l’on considère le contraste par rapport à l’eau. Nous verrons cependant par la suite que chaque fluide sera référencé par un autre fluide (de référence) et l’on exprimera toujours des contrastes :  $C_{\text{fluide}} - C_{\text{fluide, ref}}$  et  $G_{\text{fluide}} - G_{\text{fluide, ref}}$ . La figure II.26 illustre ceci : les échantillons B et C sont référencés par rapport au fluide A.*

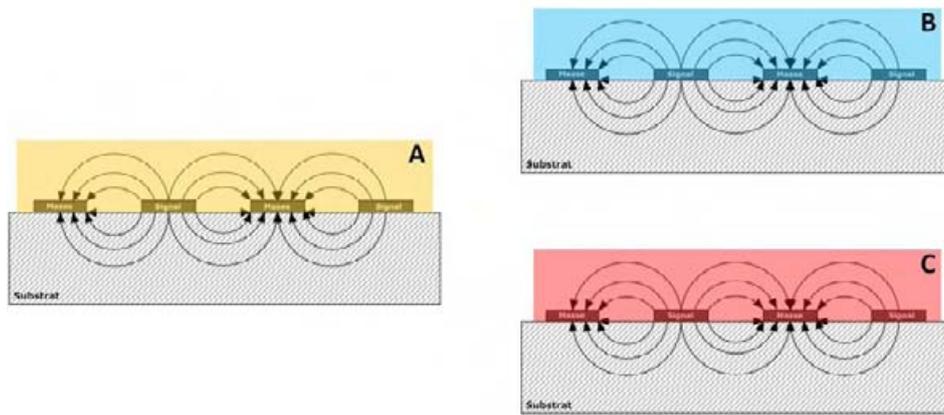


Figure II.26. Les paramètres électriques extraits sont toujours référencés (notion de contrastes) par rapport à un fluide (de référence). Ici, les échantillons B et C sont référencés par rapport au fluide A.

On a donc :

$$C_A = \varepsilon_0 \frac{\varepsilon'_A - 1}{2} K \propto \varepsilon'_A - 1$$

$$C_B = \varepsilon_0 \frac{\varepsilon'_B - 1}{2} K \propto \varepsilon'_B - 1 \quad \text{Equation 2.14}$$

Qui donnent, en contraste l'un (B) par rapport à l'autre (A) :

$$\Delta C_{BA} = C_B - C_A = \varepsilon_0 \frac{\varepsilon'_B - \varepsilon'_A}{2} K \propto \varepsilon'_B - \varepsilon'_A \quad \text{Equation 2.15}$$

De même pour la conductance :

$$\Delta G_{BA} \propto \varepsilon''_B - \varepsilon''_A \quad \text{Equation 2.16}$$

Ainsi les contrastes de  $C_{\text{fluide}}$  et  $G_{\text{fluide}}$  sont bien proportionnels aux contrastes des parties réelle et imaginaire des permittivités des fluides considérés. Ainsi, cette partie théorique démontre bien que, si l'on s'intéresse aux spectres de la permittivité dans le domaine des HF (et l'on a démontré tout l'intérêt de ceci au paragraphe 2 de ce chapitre), extraire les comportements fréquentiels de  $C_{\text{fluide}}$  et  $G_{\text{fluide}}$  est pertinent. Nos raisonnements futurs se porteront donc sur ces derniers paramètres et plus précisément sur leurs contrastes vis-à-vis d'un milieu de référence. Cette notion de contraste est capitale car, même s'il est important de connaître les propriétés absolues d'un échantillon, il est souvent indispensable en biologie de comparer 2 états biologiques, l'un pris comme référence. Les paragraphes suivants exploitent

ces développements pour la caractérisation de milieu binaire, biologique et de suspensions de cellules.

## 5.2 Mélange binaire éthanol/eau

Des mélanges binaires éthanol/eau de différentes concentrations ont tout d'abord été caractérisés. Ces deux composés étant bien connus, cette étude permet d'évaluer les réponses du capteur fluide dans le cas où l'eau est prise comme référence. Différents fluides sont générés à partir de cette eau de référence, et caractérisés.

Nous avons précisément dilué 1%, 5%, 10% et 20% d'éthanol pur dans de l'eau déionisée. Nous avons chronologiquement mesuré l'eau pure (c'est notre fluide de référence) puis les 4 mélanges binaires éthanol/eau. Les contrastes  $\Delta C$  sont présentés à la figure II.27 en fonction de la fréquence et pour les 4 concentrations. Remarquons que le zéro correspond à l'eau déionisée pure, pris comme référence. Le contraste de permittivité entre l'eau et l'éthanol se retrouve dans le contraste de capacité: l'éthanol possède, quel que soit la fréquence une permittivité plus faible que l'eau. Ainsi plus la proportion d'éthanol dans l'eau est importante plus le contraste est fort. Nous constatons que de très faibles traces d'éthanol (1%) sont mesurables: un contraste maximal de 7 fF est atteint à 12GHz. Aux faibles valeurs de concentration d'éthanol (1%, 5% et 10%), le contraste capacitif est linéaire avec la proportion d'éthanol: pour 5% d'éthanol, 35fF est atteint toujours à 12GHz.

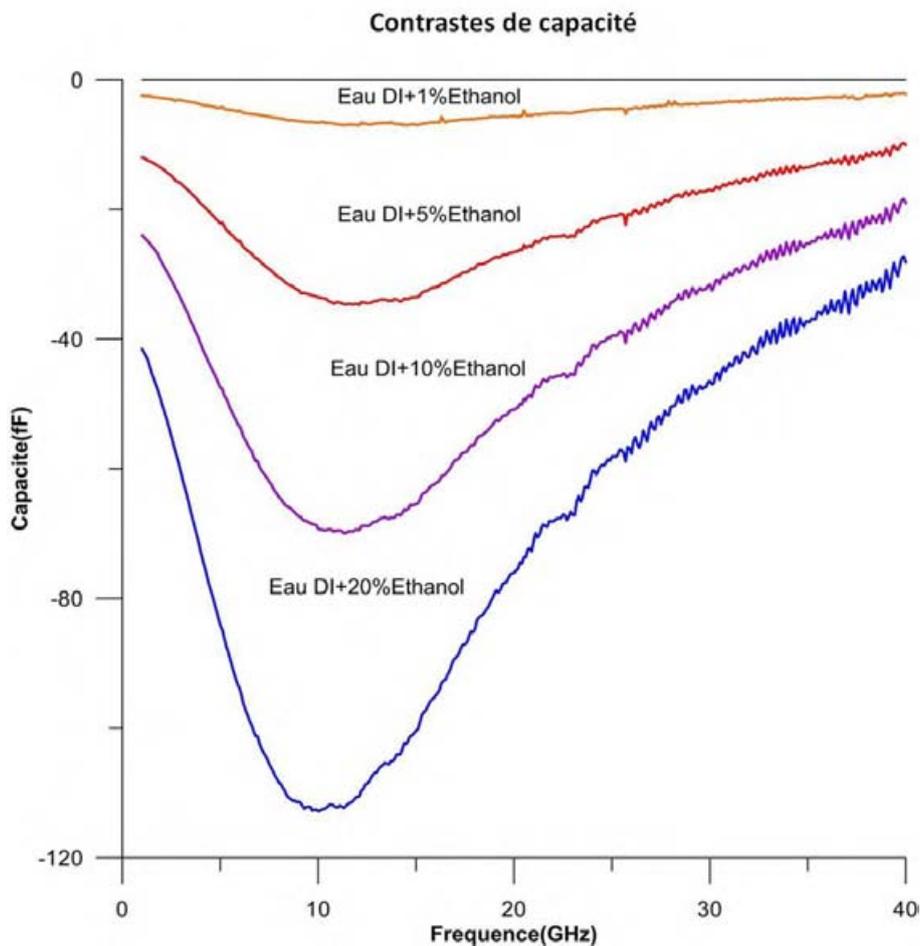


Figure II.27. Contraste capacitif ( $\Delta C$ ) en fonction de la fréquence : éthanol en solution aqueuse à différentes concentrations par rapport de l'eau désionisée pure.

Les contrastes de conductance  $\Delta G$  sont présentés à la figure II.28. Le maximum d'absorption se situe aux alentours de 5 à 10GHz pour l'éthanol et 20GHz pour l'eau. Il est donc normal que l'éthanol (et même des mélanges d'éthanol/eau) présente plus de pertes aux voisinages de 5-10GHz que l'eau pure, rendant ainsi le contraste de conductance positif. Par contre, autour de 20GHz, ici de 10 à 40GHz, c'est l'eau pure qui absorbe le plus l'énergie électromagnétique : le contraste devient alors négatif et croissant. Les contrastes les plus forts sont atteints à 40GHz : 1 mS de  $\Delta G$  pour 1% éthanol et 5 mS pour 5% éthanol. On constate encore une dépendance linéaire de  $\Delta G$  avec la fraction d'éthanol, au moins pour les faibles concentrations.

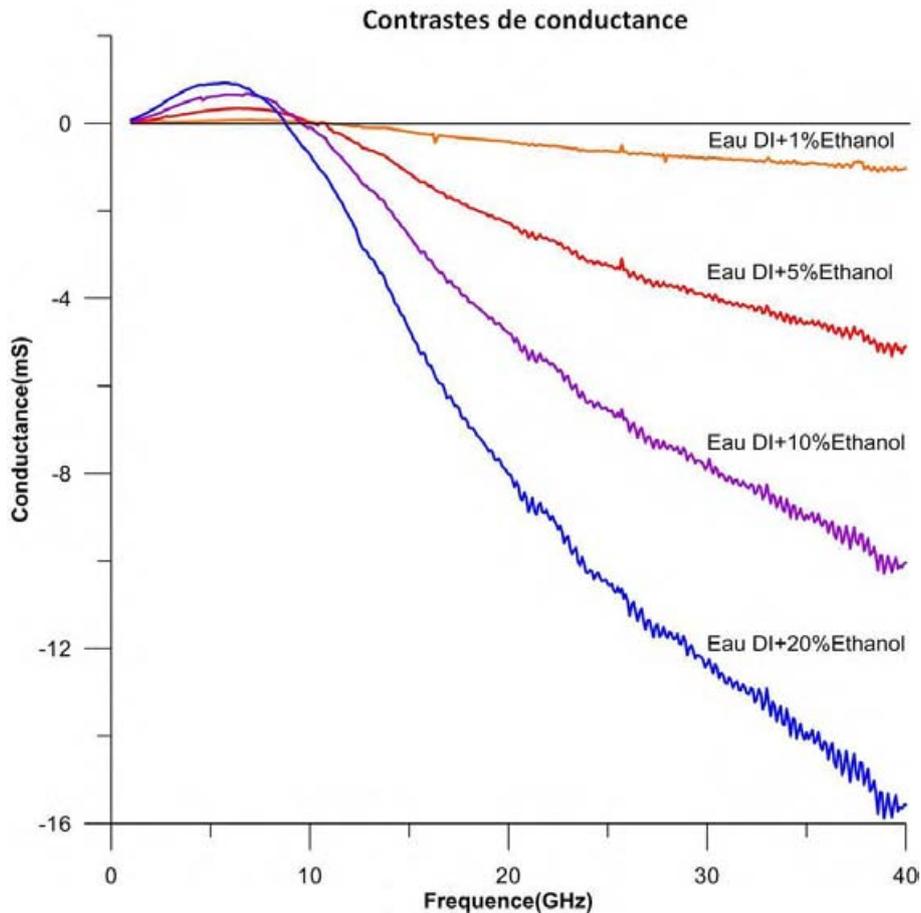


Figure II.28. Contraste de conductance ( $\Delta G$ ) en fonction de la fréquence : éthanol en solution aqueuse à différentes concentrations par rapport de l'eau désionisée pure.

La figure II.29 présente  $\Delta C$  et  $\Delta G$ , respectivement à 12GHz et 40GHz, en fonction de la concentration de l'éthanol en solution aqueuse. On remarque ainsi que, pour des proportions d'éthanol inférieures à 10%, les contrastes varient linéairement avec la fraction d'éthanol. Cependant, cette linéarité n'est plus parfaite au-delà de 10%, à 20% dans notre cas, deux hypothèses peuvent expliquer ceci : (1) lorsque la proportion d'éthanol est forte, les durées des opérations d'injection du milieu et de mesure sont trop longues et l'éthanol s'évapore (ce qui ne se produit pas sous faible concentration d'éthanol) et/ou (2) théoriquement, cette relation linéaire n'est vraie qu'aux faibles fractions volumiques.

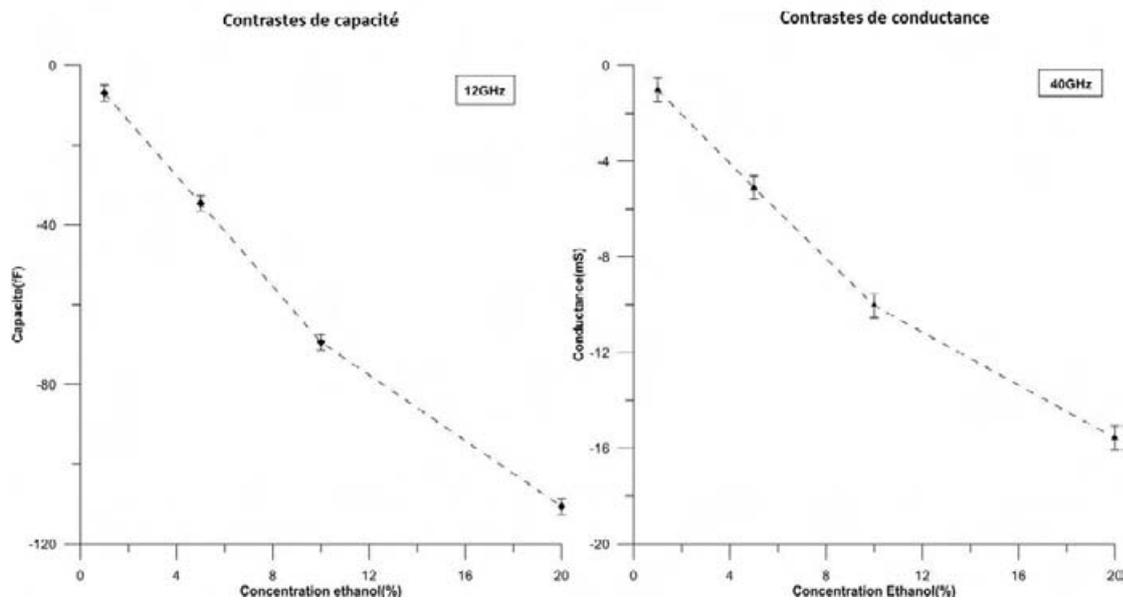


Figure II.29.  $\Delta C$  et  $\Delta G$ , respectivement à 12GHz et 40GHz, en fonction de la concentration de l'éthanol en solution aqueuse.

Cette étude montre que le raisonnement proposé sur les contrastes de capacité et conductance est efficient. Ces derniers permettent de retrouver les comportements caractéristiques (qui nous intéressent) de la permittivité de liquide dans la gamme des hyperfréquences. Nous constatons de plus d'excellente sensibilité de la technique : une trace de 1% d'éthanol se traduit par 7fF de contraste et, considérant une résolution de 0,1 fF (c'est notre bruit de mesure à 12GHz), de très faibles traces d'éthanol, voisines de 100 ppm, pourraient être détectées grâce à cette technique.

Quelle est la situation avec des milieux **biologiques** ?

### 5.3 Milieu biologique : sérum de veau fœtal en milieu aqueux

Afin d'étudier les performances de notre (bio) capteur avec des milieux biologiques, nous avons caractérisé et analysé des solutions aqueuses du sérum de veau fœtal (SVF). Le SVF est un sérum issu de fœtus de vache, qui est largement utilisé en culture cellulaire. Les protéines globulaires, nommées albumine de sérum bovin (ASB et BSA en anglais), en sont le composant majeur et permettent ainsi de maintenir la croissance et la multiplication (i.e. la culture) des cellules [25].

En utilisant le même protocole de dilution que pour l'éthanol, nous avons préparé 5% et 10% de SVF en solution aqueuse (l'eau déionisée est là encore prise comme référence), qui sont les concentrations habituellement utilisées pour la culture cellulaire. La figure II.30 présente les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  en fonction de la fréquence pour les deux concentrations de SVF. Pour 5% SVF, il a environ 5fF à 5GHz de contraste par rapport de l'eau pure, ce qui est beaucoup plus faible que pour l'éthanol à même concentration. Ceci démontre que le contraste de permittivité éthanol/eau est beaucoup plus important (7 fois plus important) que celui entre le SVF et l'eau. Malgré tout, nous estimons que 0,1%=1000ppm de SVF peut être détecté en solution aqueuse. Les allures sont les mêmes que pour le paragraphe précédent mais les caractéristiques diffèrent : niveaux de contrastes, fréquences d'apparition des extremums, rendant ainsi la signature (c'est-à-dire :  $\Delta C$  et  $\Delta G$  en fonction de la fréquence) :

- proportionnelle à la concentration du milieu additif (que l'on veut analyser) dans la solution de référence, sous réserve de faibles concentrations ajoutées (ici aussi cette linéarité se confirme),
- unique et associé au type de milieu mis en solution aqueuse.

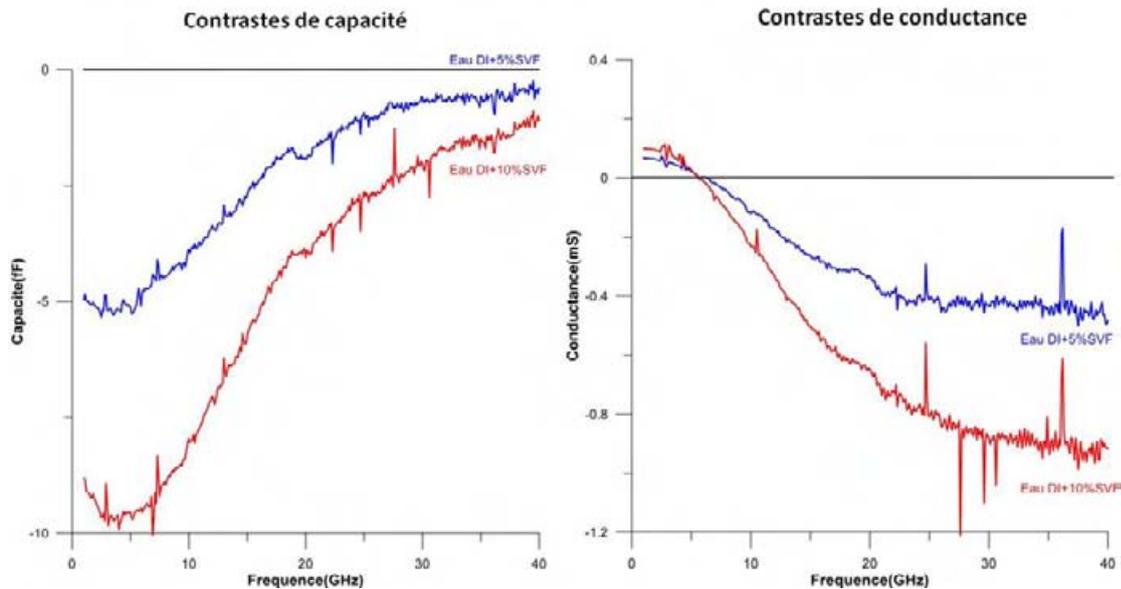


Figure II.30. Les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  en fonction de la fréquence pour 5% et 10% SVF dans l'eau désionisée.

Cette unicité de signature est un postulat, qui sera à démontrer expérimentalement pour chaque composé et dont il faudra établir les limites (car il y en aura, comme par exemple : qu'en est-il si deux composés sont ajoutés dans de l'eau pure, est-on capables de les identifier tous les deux ?), permettra d'identifier le composé dont la concentration varie entre 2 échantillons (notion de sélectivité).

Quelle est la situation avec des milieux biologiques vivants ?

## 5.4 Cellules en suspension dans leur milieu de culture

Afin d'explorer les capacités de notre dispositif pour la détection et l'analyse de cellules vivantes en suspension dans leur microenvironnement de culture, nous avons étudié les réponses de notre biocapteur lorsque chargé par des suspensions de lymphomes B, cultivés dans l'équipe de Jean-Jacques Fournié et avec l'aide précieuse de Mary Poupot, tous deux chercheurs à l'INSERM (Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse -UMR 1037). Un lymphome B est une cellule cancéreuse du système lymphatique qui se développe aux dépens des lymphocytes B. Elle est caractérisée par une prolifération maligne (ou cancéreuse) dans les organes lymphoïdes secondaires. Les cellules de lymphome B constitue un modèle de référence dans le monde entier de cellules tumorales pour les biologistes.

Les cellules sont obtenues à partir d'une culture cellulaire réalisée dans un incubateur, qui fournit des conditions appropriées pour la croissance cellulaire (37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, environnement très humide) (Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse -UMR 1037). Après centrifugation, le surnageant est retiré et remplacé par un milieu de culture «neuf » et connu. La suspension de cellules est ensuite injectée dans le micro-canal de notre biocapteur via une micropipette. Ce processus est décrit à la figure II.32. Notons que le milieu de culture cellulaire utilisé est ici du RPMI (abréviation de Roswell Park Memorial Institute medium) auquel on adjoint 10% de SVF (on nommera ce milieu du «RPMI+10%SVF » par la suite). Ce milieu est traditionnellement utilisé pour la croissance des cellules lymphoïdes humaines et contient de nombreux composés avec notamment une grande quantité de phosphate.

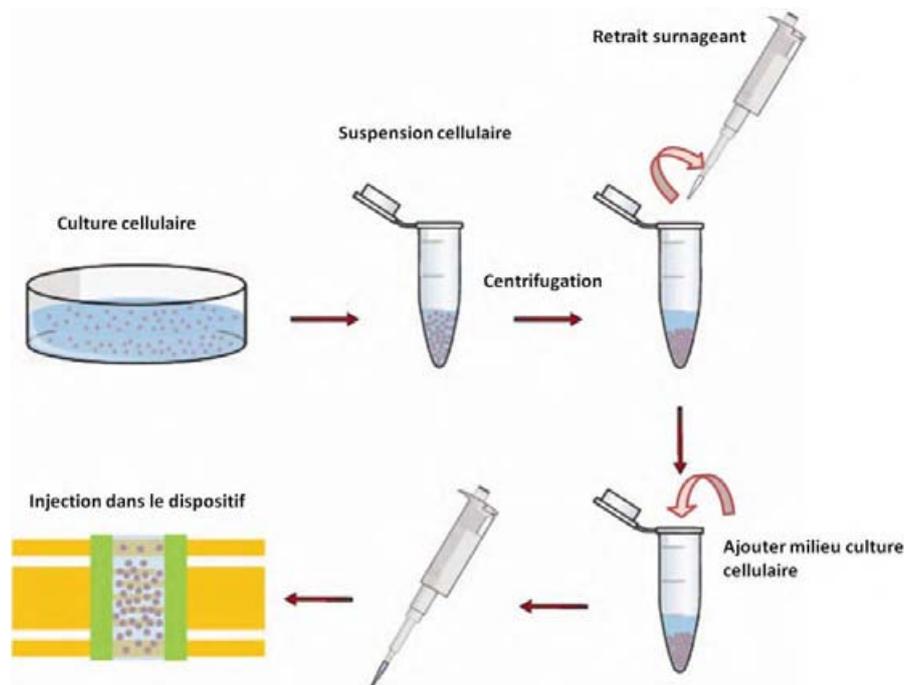


Figure II.31. Protocole de préparation et d'injection de suspension de cellules.

Différentes concentrations de cellules vivantes ont été mesurées et les résultats sont présentés à la figure II.32. Un comptage optique de cellules en interaction avec les champs électromagnétiques (c'est à dire dans la zone active du détecteur) a été effectué. Le milieu de référence pour ces courbes est le RPMI+10%SVF, qui n'est autre que le milieu de suspension des cellules.

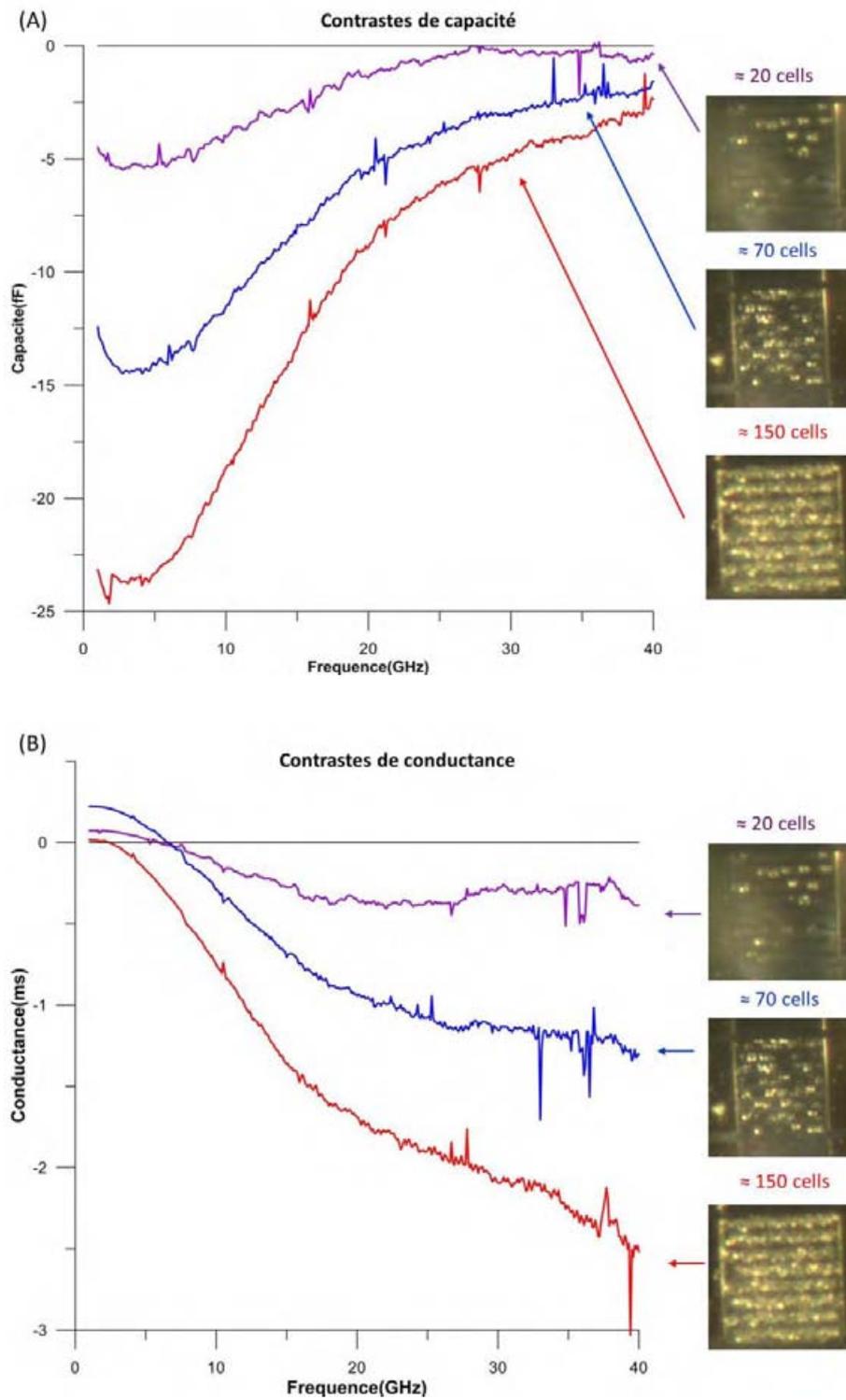


Figure II.32.  $\Delta C$  (A) et  $\Delta G$  (B) pour différentes concentrations de cellules lymphomes B dans du RPMI+10%SVF pris comme milieu de référence.

Ces courbes amènent plusieurs remarques :

- plus la concentration de cellules augmente et plus les contrastes se prononcent. Là encore, on retrouve le fait que les  $\Delta C$  et  $\Delta G$  sont des fonctions croissantes du contraste de permittivité cellule/RPMI+10%SVF ainsi que la fraction cellule/RPMI+10%SVF,
- des contrastes significatifs sont : environs 5fF à 5GHz pour 20 cellules dans la zone active du biocapteur, 14fF pour 70 cellules et 24fF pour 150 cellules. La même remarque vaut pour les contrastes sur la conductance,
- les réponses ne sont pas linéairement dépendantes avec le nombre de cellule. Nous faisons l'hypothèse que théoriquement, cette relation linéaire n'est vraie qu'aux faibles concentrations cellulaires (c'est-à-dire au moins inférieure à 70 cellules dans la zone active de détection) (hypothèse déjà formulée lors de l'étude de milieu binaire éthanol/eau).
- Pour 20 cellules dans la zone active, nous obtenons un contraste capacitif de 5fF à 5GHz. Compte tenu de la résolution à 0.1fF, nous pouvons avec confiance tenter la caractérisation d'une seule cellule, ce qui fait l'objet du chapitre suivant.

Ce résultat est capital pour nos travaux de recherche car il démontre que nous sommes capables, grâce aux dispositifs développés et à la technique d'extraction des contrastes capacitif et conductif, de caractériser (spectrographier dans le domaine HF) **des cellules vivantes dans leur milieu de culture**. Soulignons aussi que les échantillons analysés occupent un volume dans la gamme du nanolitre et que la technique est non-invasive, les cellules pouvant être réutilisées pour d'autres études.

Ce type de capteur pourrait par exemple être utilisé pour le suivi non-invasif et en temps réel de la prolifération cellulaire.

Quelle est la situation avec des **situations biologiques (un peu) plus complexes** ?

## 5.5 Différentiation de cellules vivantes/mortes en suspension dans leur milieu de culture

Pour aller encore plus loin, nous avons comparé les réponses de cellules vivantes avec celles de cellules mortes, toujours de lymphomes B de type RL. Un lot de cellules vivantes a été divisé en deux sous-lots, un replacé dans l'incubateur : les cellules continueront à vivre et se multipliées (=lot #1); l'autre sous-lot a été placé dans un frigo à 4 °C pendant 7 jours : conduisant à la mort des cellules (=lot #2).

Après 7 jours, un test de viabilité cellulaire utilisant du bleu trypan, classiquement utilisé par les biologistes, a été effectué sur les 2 sous-lots. La figure II.33 présente les résultats du test. A gauche le bleu trypan n'a pas pénétré dans les cellules du lot #1, ce qui démontre leur viabilité tandis que, à droite, les cellules du lot #2 apparaissent bleu démontrant ainsi leur mort.

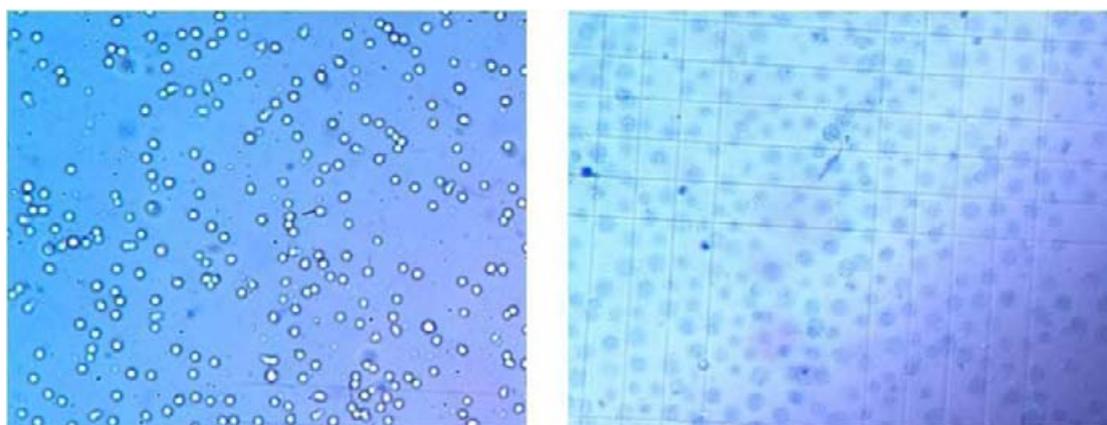


Figure II.33. Test de viabilité des cellules des 2 sous-lots. A gauche le bleu trypan n'a pas pénétré dans les cellules du lot #1 ce qui démontre leur viabilité tandis que, à droite, les cellules du lot #2 apparaissent bleu démontrant ainsi leur mort.

Ont été préparées des cellules vivantes et mortes avec la même concentration (a été utilisé une très forte concentration cellulaire amenant à la confluence des cellules dans la zone active du dispositif), et suivant le protocole déjà établi. Les contrastes sont extraits par rapport au même milieu de référence : le RPMI+10%SVF et sont présentés à la figure II.34.

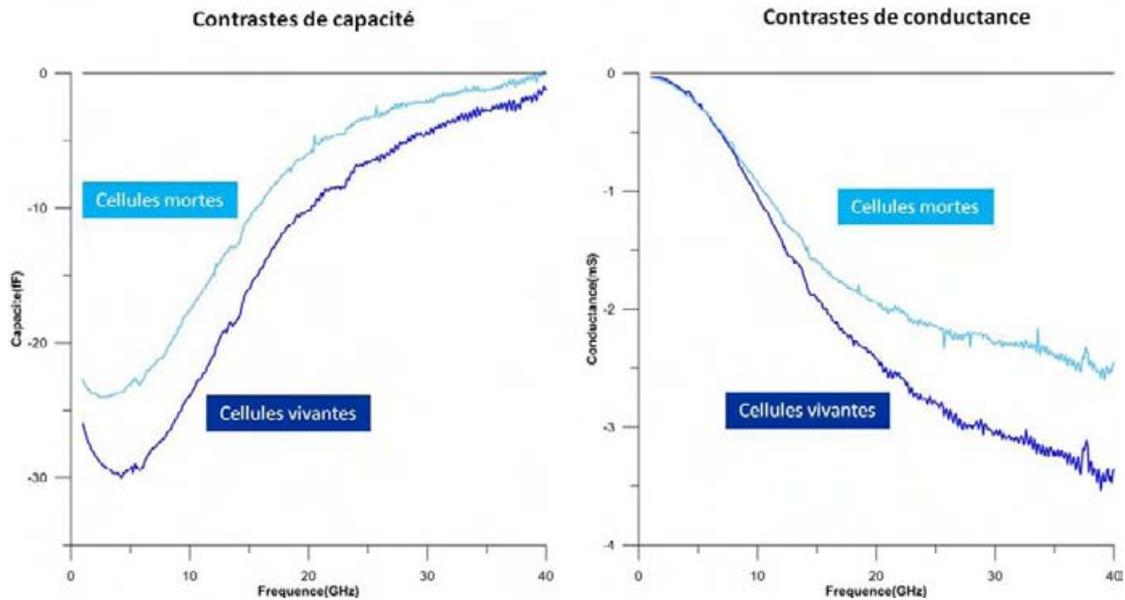


Figure II.34. Les contrastes de capacité et conductance de cellules vivantes et mortes vérifiés par la technique de marquage au bleu trypan.

Les cellules mortes présentent des contrastes plus faibles que les vivantes : de 6fF sur  $\Delta C$  à 5GHz et de 1 mS sur  $\Delta G$  à 40GHz. Ces différences ne peuvent pas s'expliquer par une différence de concentration et sont donc la conséquence de la différence d'état des cellules : vivantes/mortes. Ce résultat est logique, car les membranes des cellules mortes devenant perméables au milieu de suspension (comme le démontre l'entrée du bleu trypan), le RPMI+10%SVF pénètre donc dans la cellule : le contraste cellules/ RPMI+10%SVF s'affaiblit donc.

## 6. Conclusions et perspectives

Dans ce chapitre, nous avons présenté une technique innovante de spectroscopie hyperfréquence d'échantillons biologiques. Innovante car :

- large bande. Nous opérons de 40MHz à 40GHz, mais rien n'interdit d'explorer des gammes de fréquence allant de quelques dizaines de kHz à quelques centaines de GHz avec le même dispositif (seul va changer l'appareillage),

- opérant en milieu liquide et de façon non-invasive, sans préparation lourde au préalable ni marquage. Ceci permet d'opérer en milieu de culture (certaines techniques requièrent des milieux d'analyse spécifiques) et l'on peut envisager de réutiliser les cellules après analyse (des travaux dans l'équipe ont montré qu'après tests électriques, sous certaines conditions, une reprise de prolifération est possible [26]),
- opérant en faible volume : dans la gamme du nanolitre. Ceci assure la compatibilité avec le concept de lab-on-a-chip dans lequel la microfluidique permet un traitement précis et massif des échantillons biologiques et sans consommer trop de réactifs (analyse du sang à partir d'une microgoutte par exemple).

Les résultats ont montré que de très faibles traces d'éthanol et de SVF sont détectables et quantifiables grâce à nos dispositifs et qu'il est de plus possible de suivre une prolifération cellulaire dans son milieu de culture. Nous avons de plus démontré que l'on pouvait discriminer des états pathologiques cellulaires différents (différents et très tranchés : vivant/mort).

Des travaux conséquents doivent être menés afin (1) de tirer profit de la richesse des signatures obtenues, (2) d'explorer les capacités d'indentification de milieux complexes (à 3 composants par exemple ou suspensions hétérogènes de cellules vivantes et mortes) et enfin (3) d'évaluer la capacité discriminatoire d'états pathologiques cellulaires différents (et moins tranchés que vivant/mort).

Dans le cadre de nos travaux de thèse, nous nous sommes focalisés sur l'exploration de la possibilité (évoqué plus haut) de spectrographie dans le domaine HF d'une cellule unique :

- le chapitre suivant (chapitre III) présente le dispositif associé à la spectrographie HF d'une cellule unique.
- le chapitre IV présente les développements technologiques permettant d'augmenter encore la précision de mesure.

## Bibliographies du chapitre II :

- [1] P. Schwan, Electrical properties of blood and its constituents: Alternating current spectroscopy, *Ann. Hematol.*, vol. 46, pp. 185–197, 1983.
- [2] H. P. Schwan, Electrical properties of tissues and cell suspensions: Mechanism and models, in *Proc. 16th Annu. IEEE Int. Conf.*, vol. 1, pp. A70–A71; 1994.
- [3] K. R. Foster and H. P. Schwan, *Biological Effects of ElectroMagneticField*. Boca Raton, FL: CRC, ch. 1, 1996.
- [4] M. A. Stuchly, A. Kraszewski, S. S. Stuchly, and A. M. Smith, Dielectric properties of animal tissues in vivo at radio and microwave frequencies: Comparison between species, *Phys. Med. Biol.*, vol. 27, no.7, pp. 927–936, 1982.
- [5] G. M. Whitesides, The origins and the future of microfluidics, *Nature*, vol. 442, pp. 368–373, Jul. 2006.
- [6] Basics of measuring the dielectric properties of materials, Agilent Note, Agilent Technologies, 2006.
- [7] C.J.F. Böttcher, *Theory of Electric Polarization: Dielectric Polarization*, ISBN 0-444-41579-3.
- [8] P.Y. Yu, Manuel Cardona. *Fundamentals of Semiconductors: Physics and Materials Properties*. Berlin: Springer. p.261. ISBN 3-540-25470-6; 2001.
- [9] H.M. Altschuler, Dielectric Constant, Chapter IX of *Handbook of Microwave Measurements*, M. Sucher and J. Fox ed., Wiley 1963.
- [10] P. Debye, *Ver. Deut. Phys. Gesell.* 15, 777; reprinted 1954 in collected papers of Peter J.W. Debye Interscience, New York. 1913.
- [11] R. Bansal, *Handbook of Engineering Electromagnetics*, Marcel Dekker; 2004.
- [12] C. Gabriel, S. Gabriely and E. Corthout, The dielectric properties of biological tissues: I. Literature survey, *Phys. Med. Biol.* 41; 2231–2249; 1996.
- [13] A.V. Vorst, A. Rosen, Youji Kotsuka, *RF/Microwave Interaction with Biological Tissues*, Chapitre 1, John WILEY & SONS, Inc Publication.
- [14] L.F. Chen, C.K. Ong, C.P. Neo, V.V. Varadan and V.K. Varadan, *Microwave Electronics Measurement and Materials Characterization*, Chapter 2, John Wiley & Sons Ltd; 2004.
- [15] A. V. Mamishev, S. R. Kishore, F. Yang, Y. Du, M. Zahn, Interdigital Sensors and Transducers, *Proceedings of the IEEE*, vol. 92, no. 5, 808-845; May 2004.
- [16] P. Tabeling, *Introduction to Microfluidics*. Oxford University Press; 2005.
- [17] R.C. Jaeger, "Lithography". *Introduction to Microelectronic Fabrication* (2nd ed.). Upper Saddle River: Prentice Hall. ISBN 0-201-44494-1; 2002.
- [18] S. Wolf and R. N. Tauber, *Silicon Processing for the VLSI Era Vol. 1*, Lattice Press.
- [19] J.C. McDonald and G.M. Whitesides, Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices, *VOL. 35, NO. 7, Accounts of Chemical Research*; 2002.
- [20] D. Bodas, C. Khan-Malek, Hydrophilization and hydrophobic recovery of PDMS by oxygen plasma and chemical treatment—An SEM investigation, *Sensors and Actuators B* 123; 368; 2007.
- [21] Yu.K, Han.Y, A stable PEO-tethered PDMS surface having controllable wetting property by a swelling–deswelling process, *Soft Matter* 2; 705; 2006.
- [22] B. Kim, E.T.K. Peterson, Long-term stability of plasma oxidized PDMS surfaces, *Proceedings of*

the 26<sup>th</sup> Annual International Conference of the IEEE EMBS; 2004.

[23] J.M. Harris; Poly(ethylene glycol) chemistry: biotechnical and biomedical applications. New York: Plenum Press; 1992.

[24] K. Grenier, D. Dubuc et al, Integrated Broadband Microwave and Microfluidic Sensor Dedicated to Bioengineering, Ieee Transactions on Microwave Theory and Techniques, VOL. 57, NO. 12; 2009.

[25] "Serum." Encyclopædia Britannica. Encyclopædia Britannica Online. 29 Apr. 2009 <http://search.eb.com/eb/article-9015704>; 2009.

[26] F.Artis, D.Dubuc, MC.Blatche, K.Grenier, Biological cells proliferation in microwave Microsystems, International Microwave Symposium (IMS 2012), Montréal (Canada), 17-22, 2012.

# Chapitre III

Spectroscopie diélectrique

HF : jusqu'à la cellule unique



# 1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté notre biocapteur à base de capacité interdigitée et démontré ses capacités pour la caractérisation, dans le domaine micro-onde, de substances chimiques (composés binaires eau-éthanol) et biochimiques (à base de sérum de veau fœtal par exemple). Nous avons de plus montré que les paramètres électriques de sortie de cette technique, les spectres dans le domaine hyperfréquence (40MHz-40GHz) des contrastes capacitifs et conductifs, permettaient la quantification et même l'identification de population de cellules cancéreuses vivantes et mortes dans leur milieu de culture. Les potentialités sont riches dans les domaines de la biologie en général ainsi qu'en oncologie pour lesquelles discriminer l'état pathologique des cellules de manière simple (sans aucune préparation préalable), en temps réel et de manière non-invasive est une réelle rupture par rapport à l'existant, permettant d'envisager de nouvelles méthodologies d'analyses biologiques complémentaires aux moyens traditionnels.

En revanche, dans le cas du composant proposé au chapitre II, l'analyse porte sur une population de cellules dans laquelle chaque cellule (pourtant du même type) a sa propre caractéristique biologique et peut se différencier qualitativement de l'ensemble. Ces différences individuelles entre cellules sont décrites dans la littérature comme l'individualité cellulaire : dans une population de cellules, ou même au sein d'un organisme multicellulaire, chaque cellule suit une vie unique, et pas une seule cellule n'est complètement identique à une autre [1]. Ainsi, pour certaine étude, il peut être indispensable d'avoir la vision moyenne/collective d'une population (par exemple si l'on a des cellules non-synchrones dans le cycle de division cellulaire et que l'on veut avoir la vision globale de l'effet d'une drogue), par contre d'autres familles d'études requièrent d'étudier les réponses de quelques cellules seulement, voir même d'une cellule unique. En conséquence, nous avons développé un autre biocapteur spécifique à l'analyse et l'étude d'une cellule unique, et utilisant la même technique mentionnée au chapitre précédent. La partie fluidique, décrite dans le prochain paragraphe, aura pour rôle non seulement l'acheminement des cellules dans la zone d'analyse, mais aussi la capture d'une cellule et sa localisation précise dans la zone d'étude tandis que la partie de détection hyperfréquence (troisième partie de ce chapitre) devra restreindre l'interaction champs électromagnétique-matériau biologique à la cellule unique ainsi capturée.

La dernière partie du chapitre présente la partie expérimentale basée sur les composants proposés.

## 2. Dispositif de piégeage de cellule unique

### 2.1 Manipulation des cellules

Notre objectif, rappelons-le, est d'obtenir le piégeage d'une seule cellule dans une zone d'analyse définie, la cellule doit rester dans son milieu de culture et sera analysée par la technique hyperfréquence. Evidemment, une étape cruciale du développement du capteur est la réalisation du blocage d'une seule cellule, qui de plus, devra être compatible avec la méthode de mesure. Nous allons présenter plusieurs méthodes existantes pour manipuler individuellement des cellules.

#### 2.1.1 Micromanipulation optique

C'est Johannes Kepler (1571-1630) qui remarqua les premiers effets de la lumière sur des particules. Il observa en fait le phénomène de pression radiative, conséquence du bombardement des photons sur un objet. C'est cette force de radiation que les ingénieurs essaient aujourd'hui d'utiliser, pour propulser les sondes dans l'espace à l'aide de voile solaire. Sur terre, employer cette force s'annonce bien difficile aux vues des forces de frottement, de gravité etc. D'autant plus qu'il faut disposer d'une source de photons considérable. Tous ces problèmes peuvent être contournés grâce aux fortes puissances des LASER (Light Amplification by Stimulated Emission of Radiation). De plus, en se mettant à l'échelle microscopique, les surfaces considérées sont faibles et la pression radiative résultante est importante (ceci sous-entend la focalisation de la puissance sur ces petites surfaces). Des sources lumineuses extrêmement collimatées sont donc nécessaires afin d'exercer une pression de rayonnement ciblé suffisante pour manipuler des particules micrométriques ou sub-micrométriques, comme les cellules microbiennes par exemple [2-3]. En conséquence, les forces optiques peuvent être utilisées pour déplacer, déformer ou piéger des cellules à l'échelle individuelle. C'est ce que l'on appelle une pince optique. Umehara et al. [4] ont employé des pinces optiques pour isoler et positionner des bactéries dans une microchambre (voir la figure III.1).

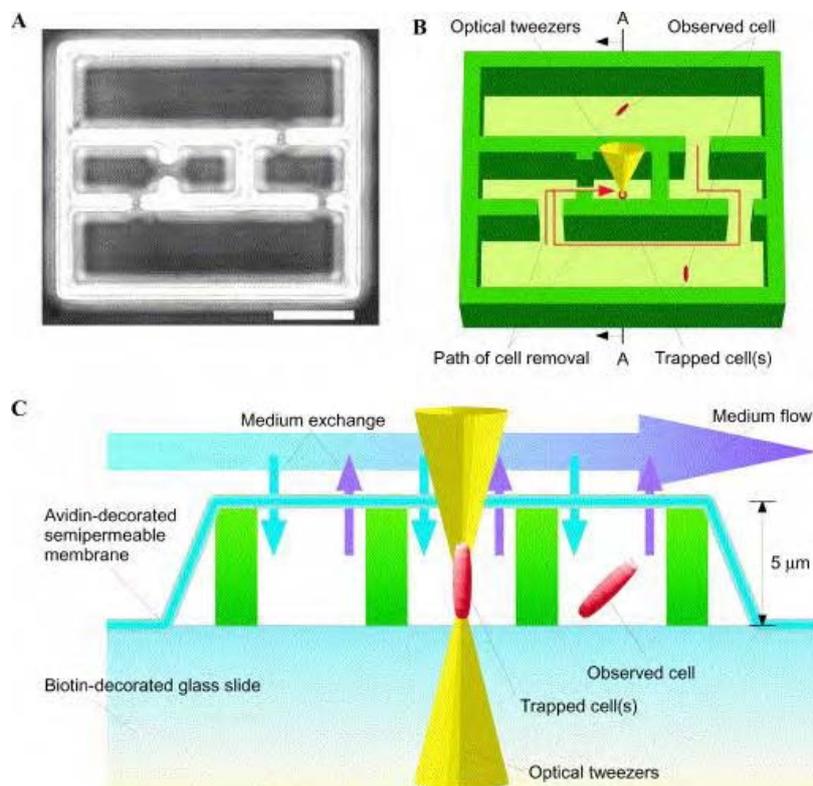


Figure III.1. Les bactéries sont positionnées dans des microchambres fabriquées sur une lame de verre par la pince optique [4].

Néanmoins, cette technique nécessite un équipement complexe, encombrant et coûteux, limitant pour l'instant leur utilisation aux laboratoires de recherche.

### 2.1.2 Micromanipulation mécanique

L'application principale de la manipulation mécanique de cellule sur puce est la séparation de cellules cibles dans des structures microfluidiques afin de les cultiver et tester [5]. Ceci peut être réalisé par des constrictions : microfiltres, micropuits, "microgrippers", ou par l'ingénierie de la surface intérieure de micro-canaux avec des revêtements réactifs d'anticorps ou d'enzymes [6-15]. Kohl et al [16] ont développé une pince mécanique dont le mécanisme repose sur deux actionneurs permettant de commander l'ouverture et la fermeture de la pince (figure III.2). Les deux actionneurs sont à base d'alliage à mémoire de forme. À partir d'un certain seuil en température, ici de l'ordre de 40°, le matériau reprend la forme qu'il a « mémorisé ».

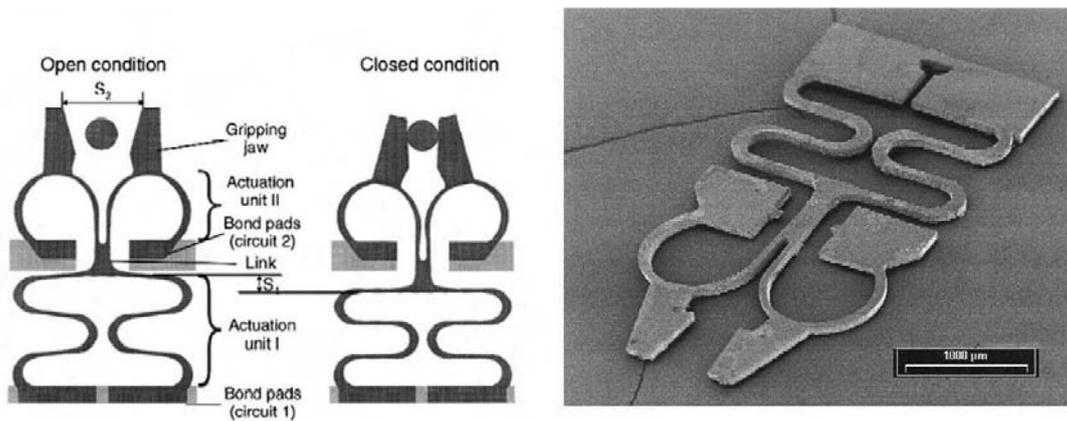


Figure III.2. Schéma de la pince de Kohl en modes ouvert et fermé (à gauche). Image au microscope électronique de la pince de Kohl (à droite) [16].

Néanmoins, la complexité des dispositifs mécaniques rend leur intégration difficile dans notre capteur.

### 2.1.3 Manipulation électrique

Le phénomène de la diélectrophorèse (DEP) trouve son origine dans les propriétés diélectriques des matériaux qui se polarisent sous champ électrique [17]. Si le champ électrique appliqué est spatialement non-uniforme à l'échelle d'une particule diélectrique (une cellule dans notre cas), celle-ci va subir des forces qui vont l'entraîner soit du côté de la zone où le champ électrique est plus intense (diélectrophorèse positive) soit du côté où le champ est plus faible (diélectrophorèse négative). On trouve aujourd'hui de nombreuses applications, parmi lesquelles le piégeage de particule, le tri cellulaire, l'électrofusion, la caractérisation diélectrique de matériaux et de cellules, etc. Voldman et al. [18] ont développé un cytomètre microfluidique dans lequel la force DEP a été utilisée pour confiner des cellules et les maintenir contre la perturbation des flux de fluide. Le réseau cellulaire est composé d'électrodes extrudées à géométrie asymétrique quadripolaire et électriquement adressable (Figure III.3 (B) (C)). Il s'agit d'une technique compliquée à mettre en place, mais très efficace, permettant de former un champ intense pour piéger une seule cellule en son centre. Il est également possible de libérer la cellule préalablement piégée en commutant la tension de l'électrode de commande de + V à -V (Figure III.3 (A)).

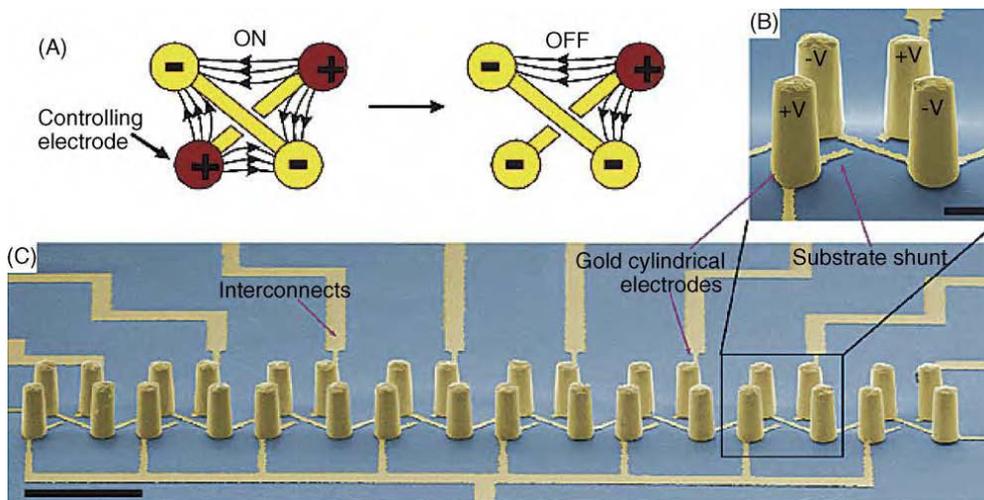


Figure III.3 Réseau de pièges de cellules composés de quadripolaires extrudés asymétriques et adressables électriquement [18].

Néanmoins la plupart des démonstrations de piégeage diélectrophorétique de cellules sont basés sur l'exploitation de forces DEP négatives [19-21]: la cellule est capturée dans une zone de faible champ électrique. Afin d'obtenir ce mode diélectrophorétique, il est indispensable de modifier le milieu de suspension des cellules et d'opter pour un milieu présentant une permittivité et/ou conductivité plus faibles que celles des cellules [22]. Ceci exclut donc le milieu de culture des cellules, trop riche en ions et donc présentant une forte conductivité. Est classiquement utilisé un milieu aqueux de sucrose avec lequel la survie des cellules n'est pas aussi bien assurée qu'avec le milieu de culture. Certaines démonstrations sont néanmoins faites à l'aide d'une DEP positive [23-24], avec donc une possibilité d'utilisation de milieu de culture. Ces systèmes sont malheureusement complexes et difficilement co-intégrables avec nos biocapteurs HF.

Afin de ne pas rendre notre technique (intrinsèquement non-invasive) invasive par un choix inapproprié du moyen de piégeage, nous nous sommes orientés vers une manipulation hydrodynamique (voir ci-dessous) plus simple et non-invasive.

#### 2.1.4 Manipulation hydrodynamique

Afin de conserver un milieu hôte de culture de cellules, d'autres études plus récentes se sont focalisées sur l'utilisation du flux pour piéger les cellules. Un exemple de la manipulation hydrodynamique est réalisé par Wei-Heong Tan et al. , qui ont développé une

série de pièges pour capturer les cellules à l'aide de la force hydrodynamique [25]. La figure III.4 présente le schéma de principe et la photographie de ce dispositif.

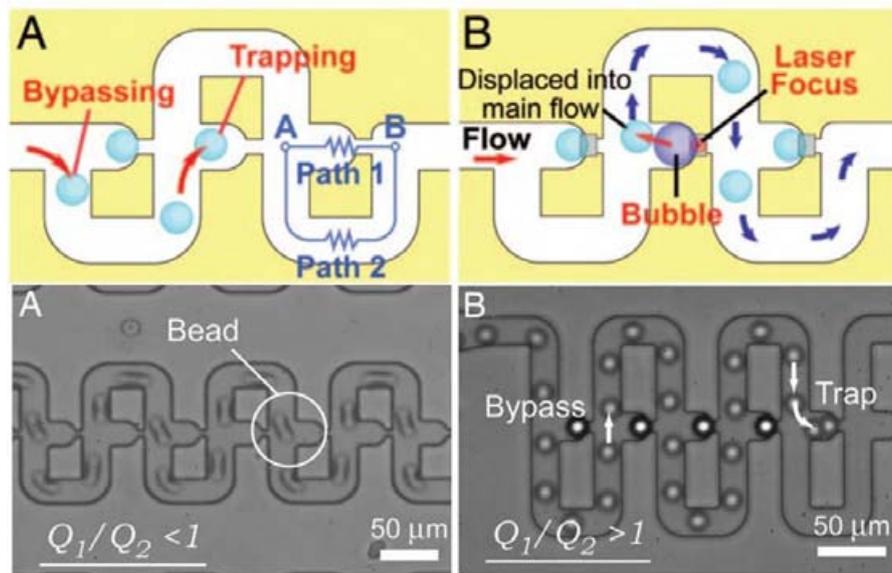


Figure III.4 Exemple de capture de cellules à l'aide de la force hydrodynamique [25].

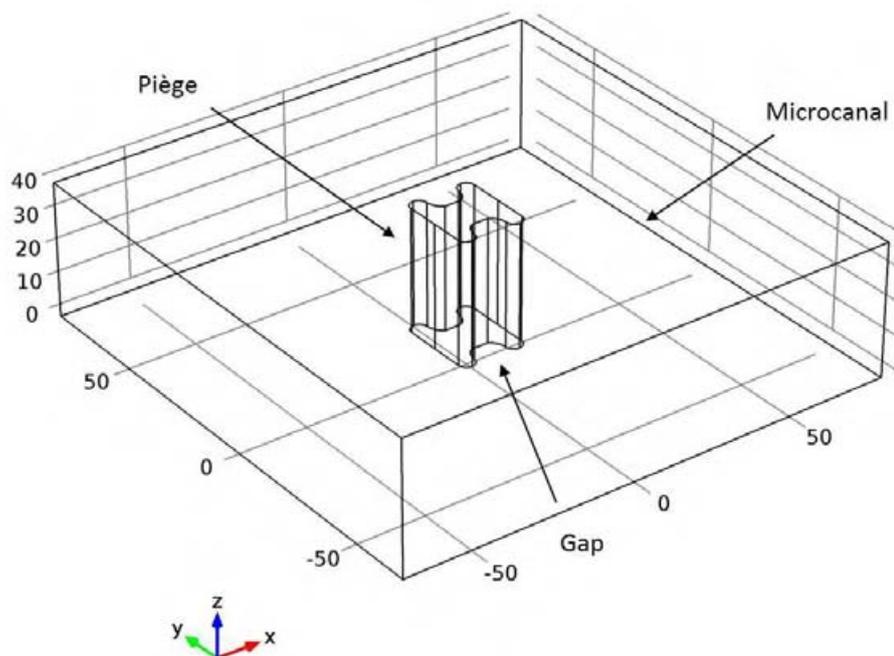
Le principe consiste à bloquer une cellule en la « coinçant » grâce à la force hydrodynamique tout en laissant passer les autres cellules par une autre voie. Cette technique a l'avantage d'être rapide et fortement parallélisable [25]. C'est une technique de piégeage d'une cellule particulièrement adaptée à notre cas de part sa comptabilité d'intégration avec notre capteur HF et sa capacité de piéger des cellules uniques. Le prochain paragraphe détaille le dimensionnement que nous avons réalisé d'un tel piégeage.

## 2.2 Piégeage hydrodynamique d'une cellule unique

### 2.2.1 Conception du dispositif de piégeage

Notre dispositif de piégeage d'une cellule unique par la force hydrodynamique est inspiré de celui développé par de Dino Di Carlo [26]. Il est constitué d'un pilier solide, localisé au centre du micro canal, et comportant une face concave (ou les 2 faces opposées) transversale au sens de l'écoulement du fluide. La forme de cette (ces) face(s) est conçue pour s'adapter à celle de l'objet à recevoir, donc à bloquer (forme sphérique dans notre cas pour le piégeage

des cellules de lymphome B de diamètre  $10\mu\text{m}$  environ). Une vue schématique 3D du dispositif est présentée en figure III.5.



Figure

III.5. Une vue schématique 3D du dispositif de piégeage.

Entre le substrat et le fond du piège, un gap d'air permet le passage d'une fraction de fluide. Les microsphères (les cellules) en suspension dans un fluide hôte (milieu de culture), sont injectées dans le micro-canal. Un écoulement laminaire du liquide (cellules comprises) est généré par un système seringue/pousse seringue externe. Grâce à la fraction de fluide passant sous le piège, des lignes de courant fluidique conduisent une sphère vers le piège. Une fois la sphère piégée dans la forme concave, elle obstrue le gap sous le piège, ce qui limite les lignes de courant vers le piège : les autres cellules en suspension sont déviées de part et d'autre, comme le présente la figure III.6.

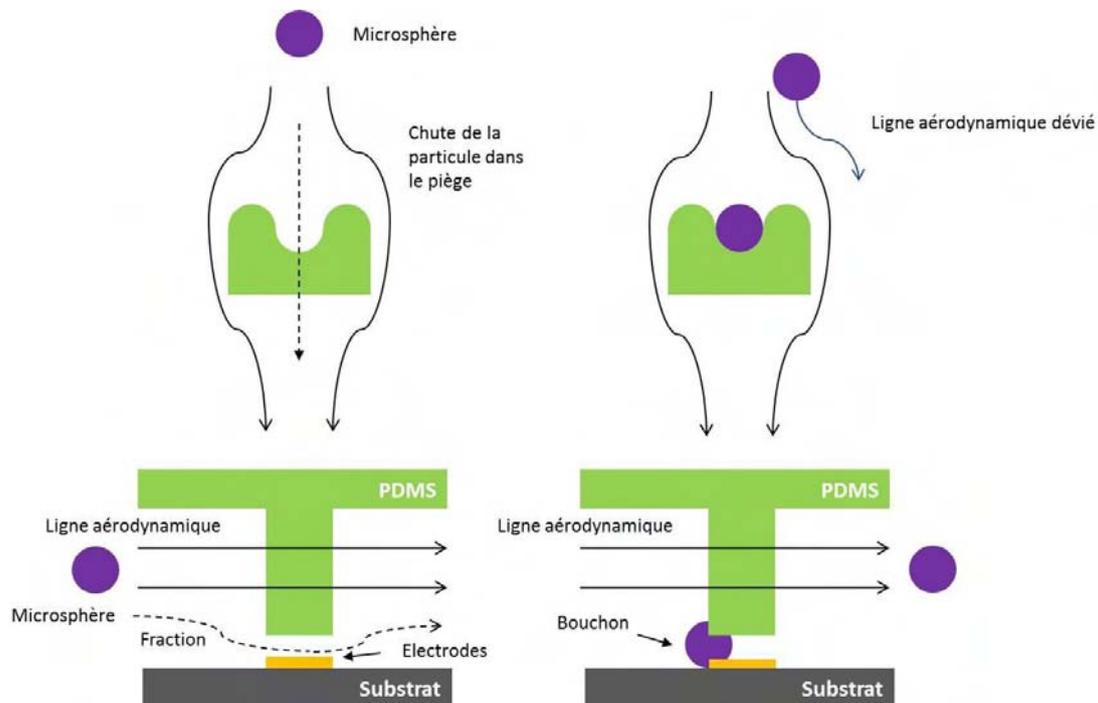


Figure III.6. Le schéma du principe du mécanisme du piège hydrodynamique.

Pour vérifier la fonction de piège, nous avons étudié les lignes de courant (= vitesse) du fluide. Les simulations ont été effectuées avec le logiciel COMSOL Multiphysics 4. Le micro-canal considéré présente une hauteur de  $40\ \mu\text{m}$ , une largeur de  $150\ \mu\text{m}$ , la hauteur du bloqueur est fixé à  $37\ \mu\text{m}$  laissant un gap d'air de  $3\ \mu\text{m}$ . Le matériau de liquide utilisé pour les simulations aura les propriétés de l'eau (densité et viscosité) et le débit de fluide est fixé à  $0.5\ \text{mm/s}$ . L'ensemble du dispositif maillé par COMSOL (à l'exception du piège) est présenté à la figure III.7.

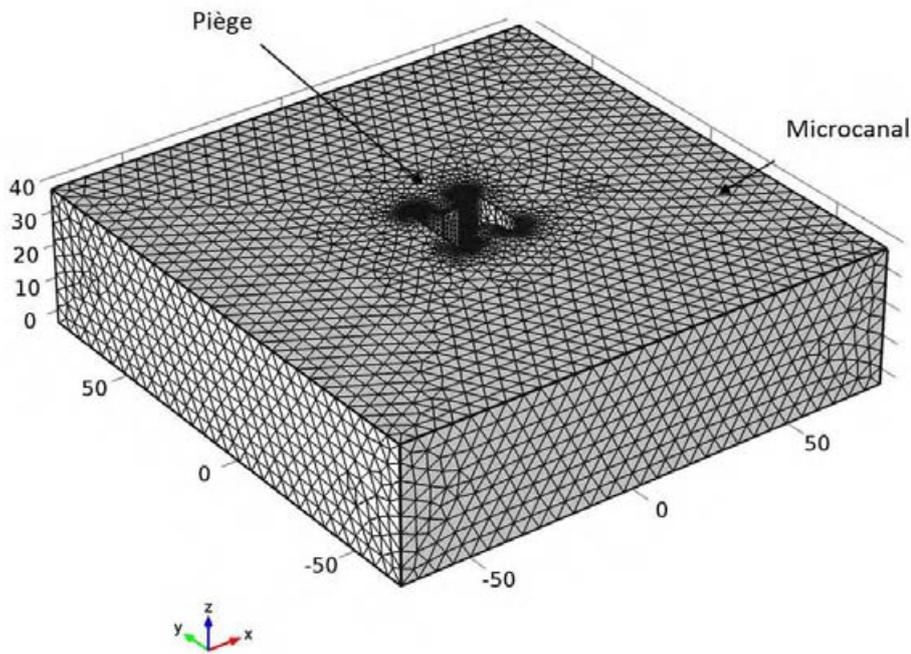
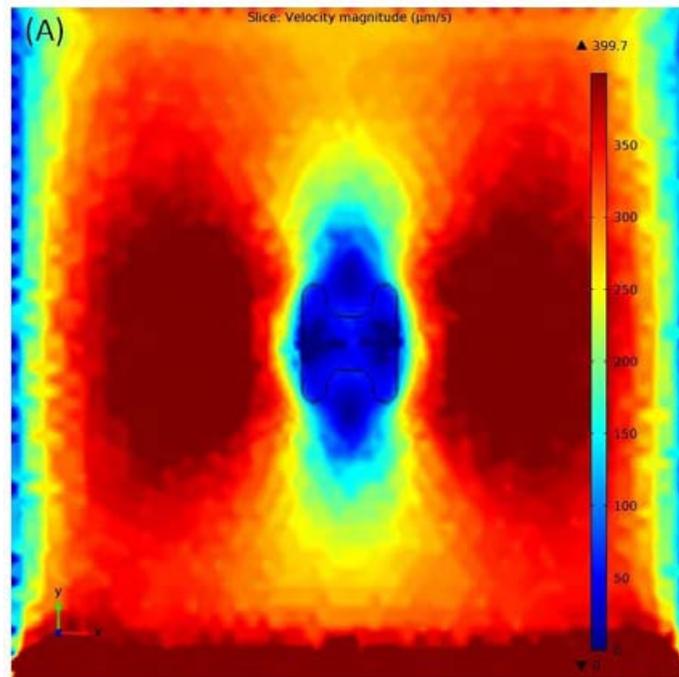


Figure III.7. Maillage du dispositif de piégeage hydrostatique par COMSOL.

Les résultats de simulation sont présentés à la figure III.8, qui montre l'intensité du champ de vitesse du fluide (figure III.8 (A)) et les lignes de courant du fluide. Il apparaît clairement que la vitesse du fluide dans le gap de  $3\mu\text{m}$  sous le bloqueur, est beaucoup plus faible que celle de part et d'autre. Cependant, il y a toujours une (petite) fraction du fluide passant dans le gap : la figure III.8 (B) montre en effet qu'une ligne de courant suit ce chemin et permet ainsi de supposer qu'une cellule empruntera ce chemin conduisant à son blocage.



(B)

Streamline: Velocity field

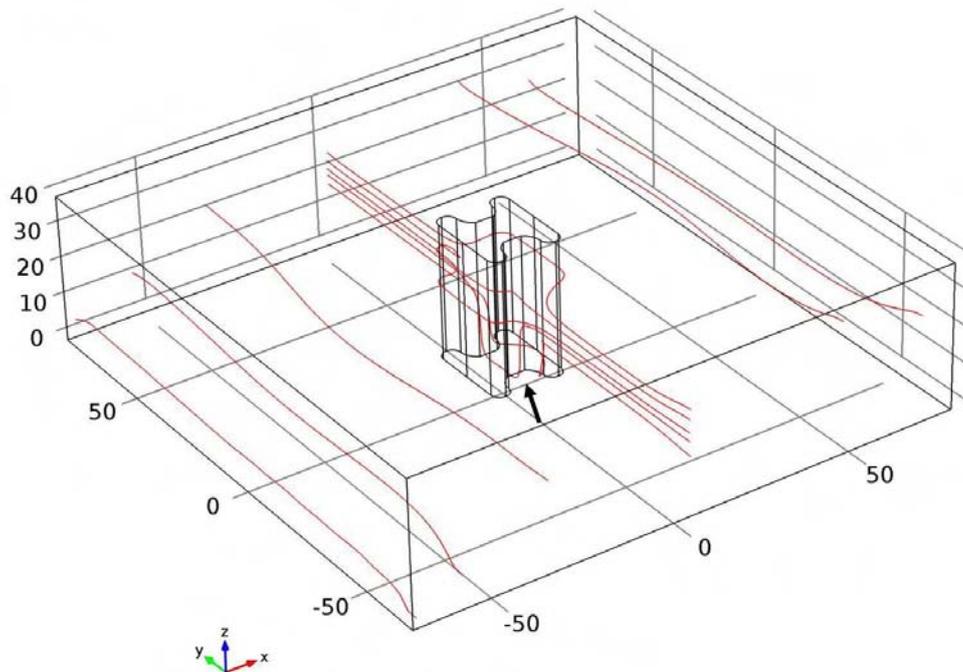


Figure III.8. (A) Intensité du champ de vitesse du fluide. (B) Les lignes de courant hydrodynamiques : une flèche indique qu'une ligne de courant passe sous le gap du bloqueur.

Ces simulations ont été reprises avec une sphère piégée par le bloqueur et les résultats sont présentés sur la figure III.9. Nous pouvons observer qu'il n'existe plus de ligne de courant passant sous le gap. Ainsi les autres microparticules présentes dans le milieu vont contourner l'obstacle médian et sortir du micro-canal.

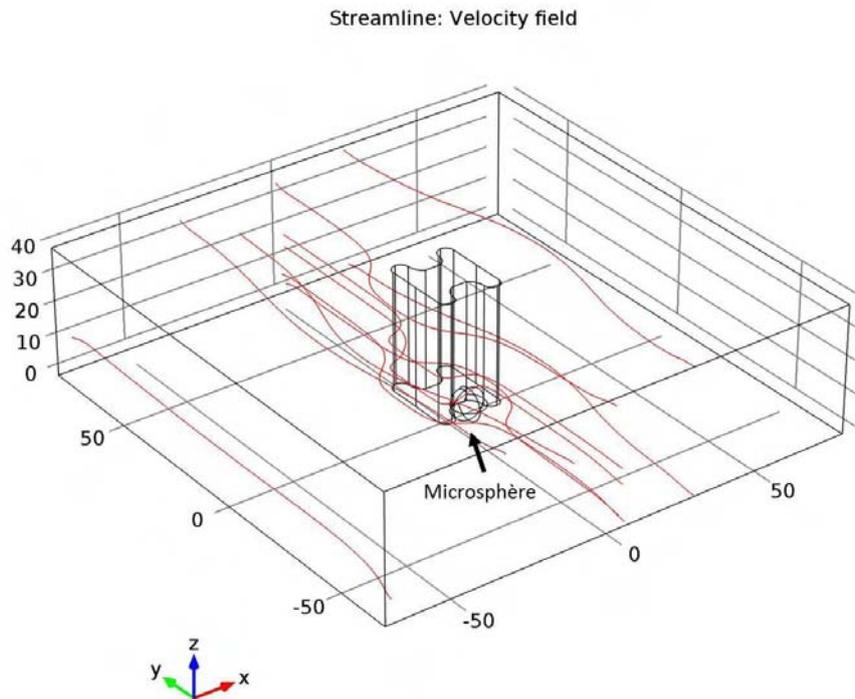


Figure III.9. Lignes de courant hydrodynamiques lorsqu'une microsphère est déjà piégée: il n'y a plus de ligne de courant passant sous le gap du bloqueur.

Les intensités de la vitesse du fluide suivant un axe  $y$  passant sous le gap du bloqueur dans les cas où une bille est ou non piégée sont présentées à la figure III.10:

- La courbe à gauche, sans microsphère piégée, montre que la vitesse du fluide sous le gap représente 10% de celle du flux maximum.
- La courbe de droite, lorsqu'une microsphère est piégée, montre que la vitesse du fluide sous le gap diminue de moitié par rapport à la situation sans particule piégée. La vitesse ne s'annule donc pas car la forme sphérique indéformable considérée lors des simulations n'obstrue pas à 100% le gap.

En pratique, on peut s'attendre à ce que les cellules épousent mieux les formes du bloqueur par pression hydrostatique et obstruent ainsi mieux le gap. Conjugué au fait que le bloqueur n'est conçu que pour accueillir une seule particule, nos prédictions nous permettent d'anticiper que le piégeage d'une particule unique est envisageable.

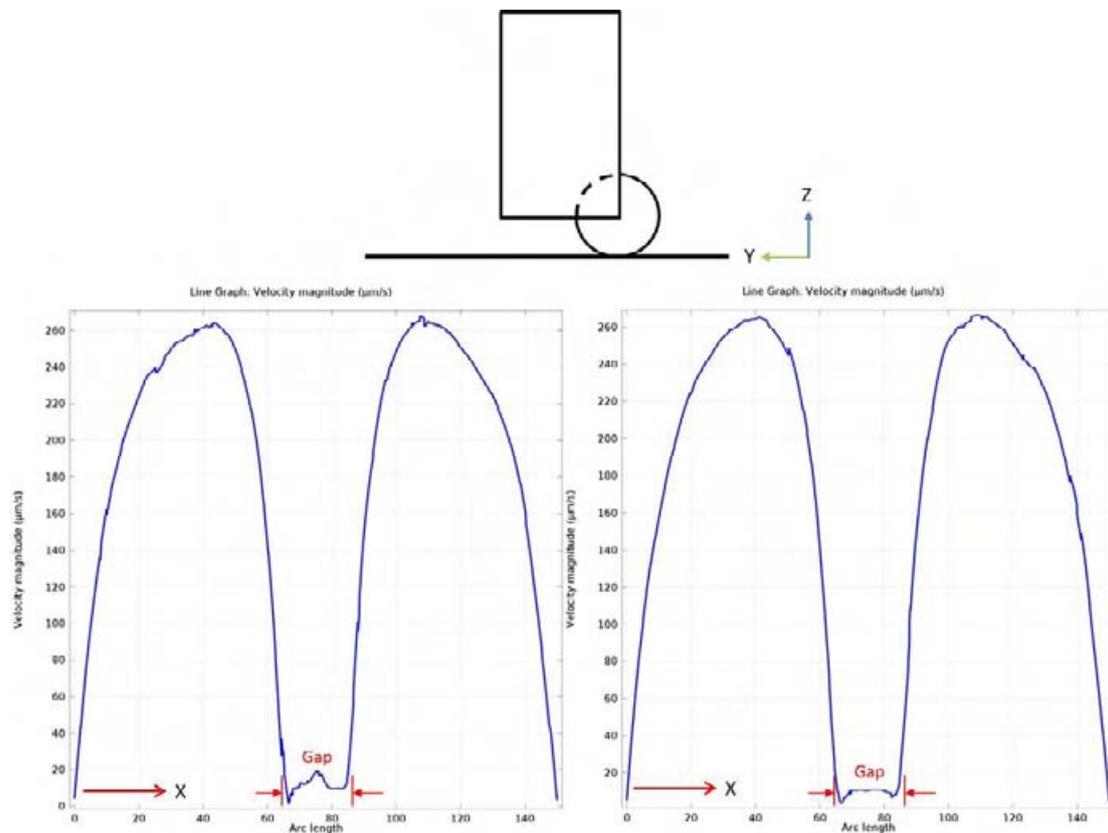


Figure III.10. Les vitesses de fluide dans l'écart sans microsphère et avec une microsphère.

## 2.3 La fabrication des composants

Nous allons, dans ce paragraphe, décrire les différences de réalisation technologique par rapport aux descriptions faites au chapitre II.

Le procédé de fabrication du moule de PDMS a été modifié afin de réaliser le micro-canal muni du bloqueur en son centre et dont la hauteur doit être telle qu'après assemblage, un gap d'air existe entre le bas du bloqueur et le substrat recevant le PDMS. Le procédé est décrit à la figure III.11. Une première gravure du moule (D) est effectuée après la photolithographie associée au micro-canal (A => C). L'épaisseur gravée correspond à celle du gap d'air souhaité soit de l'ordre de 3 µm maximum. Puis une deuxième photolithographie (E => G), suivie d'une seconde gravure DRIE (H) est mise en œuvre. La profondeur de cette seconde gravure est de l'ordre de 40 µm, soit l'épaisseur du canal désirée. Ce procédé permet après moulage/démoulage du PDMS (I => J) d'assurer que l'épaisseur du bloqueur soit 3 µm inférieure à celle des murs du micro-canal.

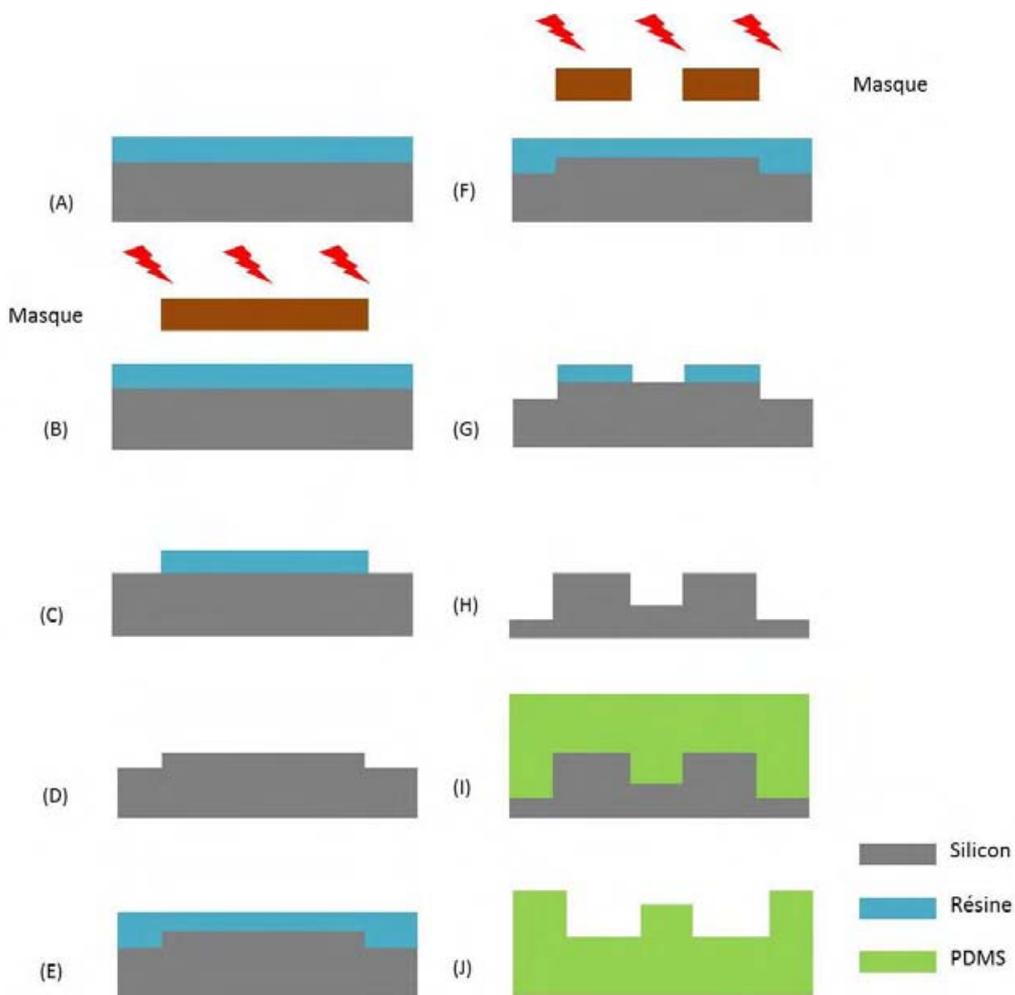


Figure III.11. Etapes de fabrication du micro-canal avec bloqueur en PDMS.

Les images MEB du micro-canal, muni en son centre du bloqueur, sont présentés à la figure III.12.

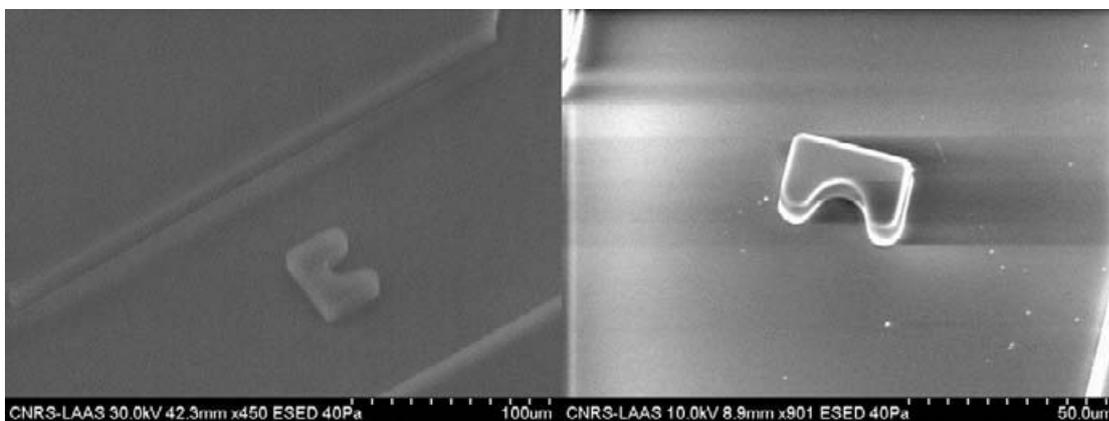


Figure III.12. Images MEB du micro-canal avec bloqueur en PDMS.

Le micro-canal en PDMS est ensuite nettoyé dans un bain d'isopropanol additionné d'ultrasons, traité par plasma O<sub>2</sub> puis assemblé avec le substrat comportant les circuits HF dont nous allons décrire la conception dans le paragraphe suivant.

### 3. Conception de circuits HF compatible l'analyse d'une cellule unique

Partant de la structure HF à base d'une capacité interdigitée présentée au chapitre précédent, nous avons cherché à miniaturiser la zone de détection capacitive. Nous avons conservé la même configuration : des lignes de transmission coplanaires véhiculent les signaux HF des deux pointes coplanaires HF vers la capacité, dont la zone de détection est réduite pour être compatible avec la taille d'une cellule unique (10 μm de diamètre pour une cellule de lymphome B). Une structure simple avec un conducteur central progressivement rétréci (« taper » en anglais) a été choisie. La figure III.13 présente la structure retenue.

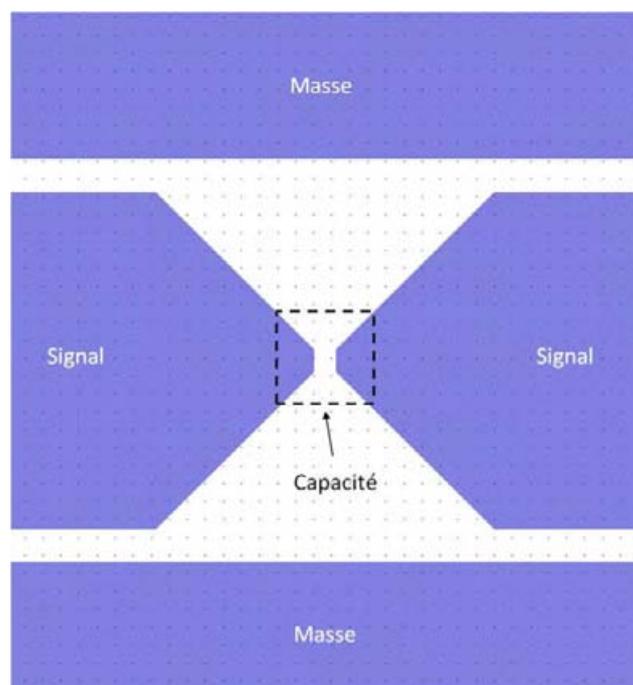


Figure III.13. Structure HF pour analyser une cellule unique.

Le microcanal est ensuite assemblé au substrat comportant ce circuit HF avec le circuit, le piège devant être localisé correctement afin que la particule piégée soit située au-dessus de la capacité de détection. La figure III.14 présente une vue 3D du dispositif final.

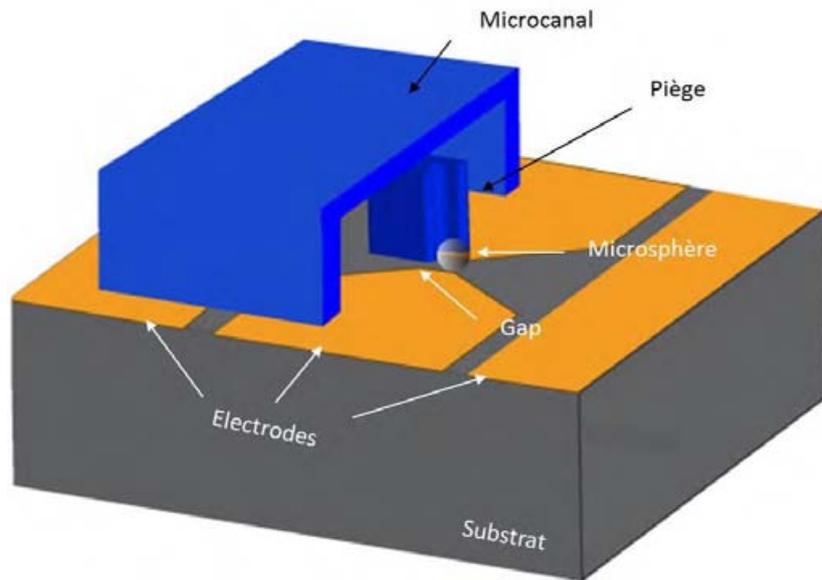


Figure III.14. Vue 3D du dispositif d'analyse HF d'une cellule unique.

### 3.1 Simulations électromagnétiques

Des simulations électromagnétiques ont été effectuées par le logiciel HFSS, déjà utilisé pour la prédiction des performances des CID du chapitre II.

Notre objectif est de visualiser la distribution des champs électromagnétiques (et donc de voir l'interaction ondes-fluide) ainsi que de prédire les paramètres S de la structure lorsque le canal est rempli d'air, d'eau DI, et d'eau DI avec une bille en polystyrène piégée.

La figure III.15 nous présente le modèle 3D de la structure dessiné sur HFSS. Les paramètres du modèle diélectrique de Debye de l'eau ont été définis à partir de mesures faites précédemment dans l'équipe [27]. Un balayage discret de la fréquence a été effectué de 1GHz à 40GHz.

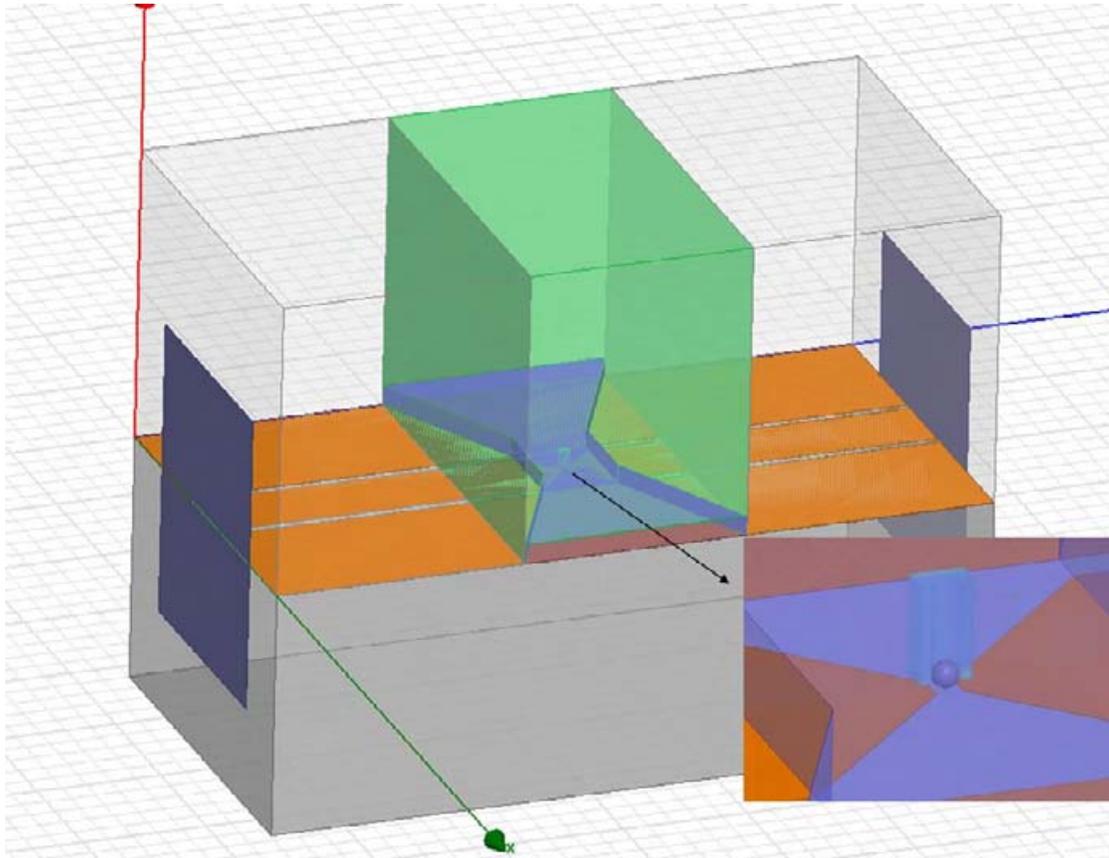


Figure III.15. Mod èle 3D du dispositif dessin é sur HFSS.

La figure III.16 présente des simulations effectu ées lorsque le micro-canal est rempli d'eau DI. Le champ électric est fortement concentr é dans les gaps coplanaires ainsi que dans le gap de la capacit ée d'éclection avec une extension au-dessus du substrat d'environ  $20\mu\text{m}$ . Ces simulations d émontrent que l'interaction microsph ère-champ électromagn étique est optimale tant que le diam ètre de la particule à analyser reste inf érieur à  $20\mu\text{m}$  (ce qui est le cas avec nos cellules de lymphomes RL).

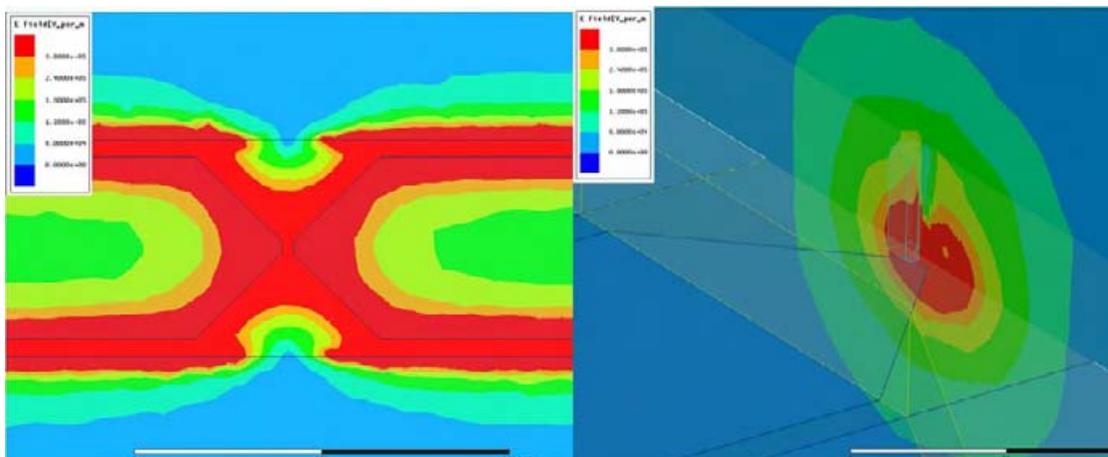


Figure III.16. Intensité du champ électromagnétique du biocapteur HF de cellule unique.

Nous avons de plus simulé l'impact du décentrage de la position de microbille vis-à-vis du centre de la zone de détection, qui n'est autre que le centre de la capacité formée par les 2 conducteurs rétrécis. Nous avons simulé des billes localisées sur des cercles concentriques de rayons de 5,7  $\mu\text{m}$ , 11,3  $\mu\text{m}$ , 14,1  $\mu\text{m}$  et 28,2  $\mu\text{m}$ , comme présenté à la figure III.17 (A).

La figure III.17 (B), montre que les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  diminuent, ce qui est normal puisque l'on écarte la bille, cause du contraste, de la zone de détection. Par exemple, un décalage de 14.1  $\mu\text{m}$  de la bille (position D) conduit à une diminution de moitié de  $\Delta C$  et  $\Delta G$  par rapport à une bille parfaitement centrée (position A).

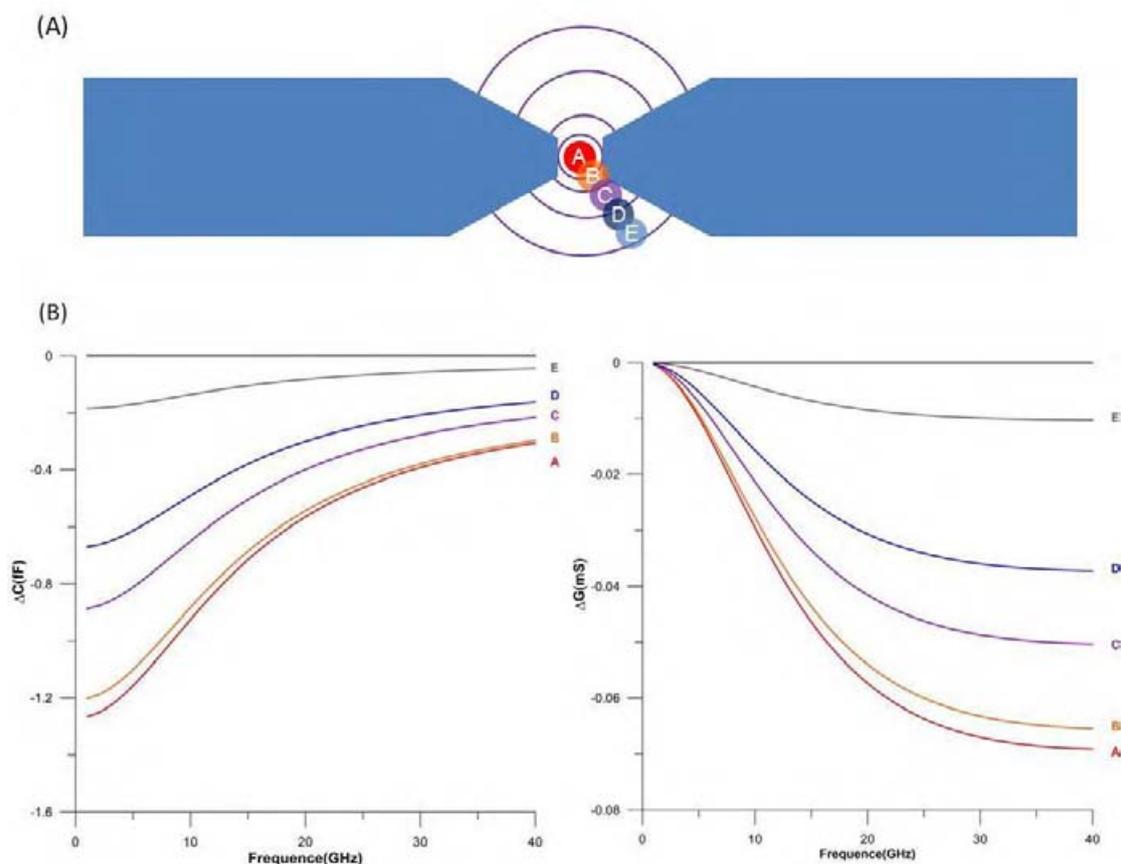


Figure III.17. (A) Différentes positions de bille simulées (B) les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  simulés en fonction de la fréquence pour les différentes positions de bille.

Nous avons de plus pr édit un positionnement vertical non-parfait (positionnement bas) de la bille. Diff érentes positions verticales de bille au-dessus de la zone de d étection ont é été simul ées conform ément à la figure III.18 (A). La position A correspond au cas idéal car il y a interaction bille/champ électromagn étique maximale. Nous avons d écal é successivement la bille de 5  $\mu\text{m}$  en 5  $\mu\text{m}$  au-dessus du substrat et les r éultats des simulations ont é été regroup éés sur la figure III.18 (B).

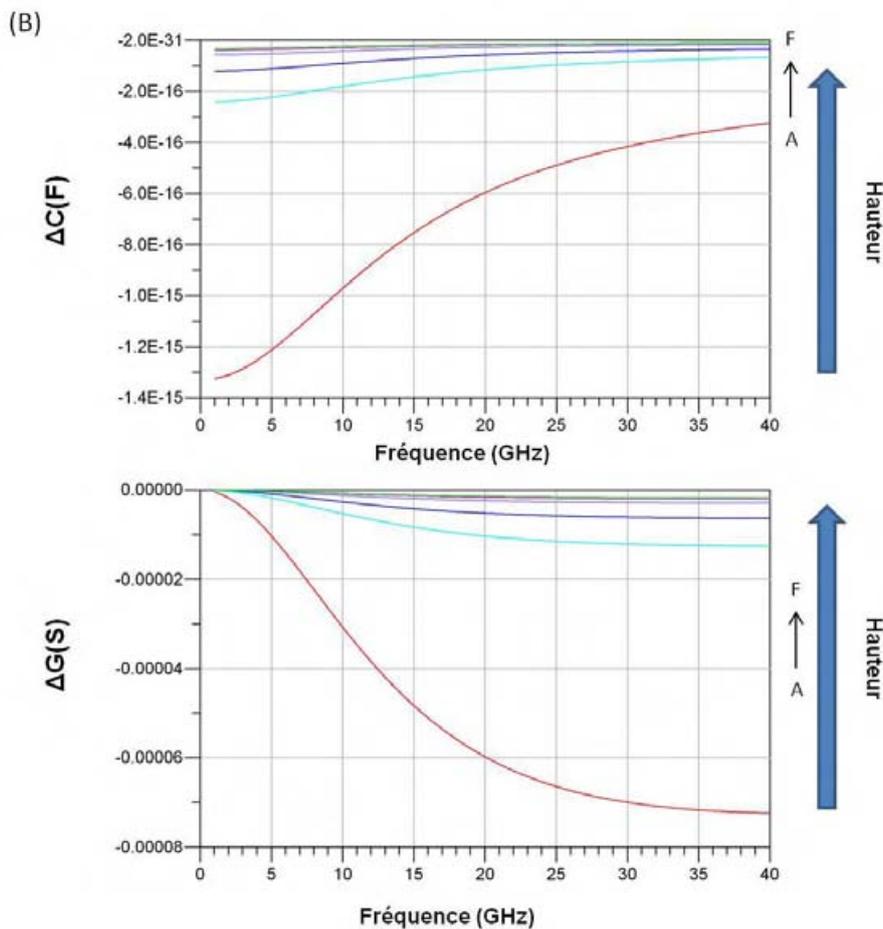
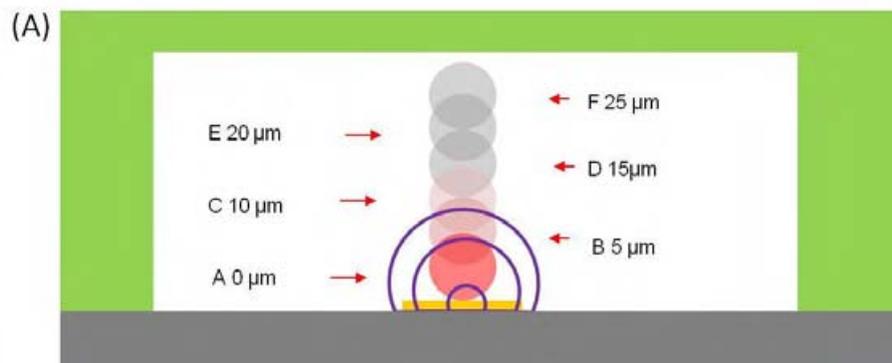


Figure III.18. (A) Différents positions de bille simulées (B) les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  simulés en fonction de la fréquence pour les différentes positions de bille.

Les résultats nous démontrent que les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  diminuent drastiquement si la microbille piégée n'est pas « plaquée » sur la zone de détection. Par exemple, pour la position B, pour laquelle la distance entre le centre de la microbille et le substrat vaut  $5 \mu\text{m}$ , le contraste capacitif ( $\Delta C$ ) à 5GHz est divisé sur 6 par rapport à la situation idéale A. De plus, si la bille s'écarte encore plus du substrat, les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  deviennent négligeables. Ces résultats expliquent la nécessité du gap entre le bloqueur et le substrat dont résulte la force hydrodynamique qui plaque la bille (ou cellule) sur la zone de détection.

De plus, cet inconvénient lié à la grande sensibilité de la position verticale de la particule sur les contrastes électriques se traduit en avantage. Dans le cas où plusieurs particules se positionnent les unes sur les autres dans le bloqueur : seule sera analysée la particule proche de la zone de détection, les autres étant trop loin pour provoquer une influence sur les  $\Delta C$  et  $\Delta G$ .

### 3.2 Fabrication finale des dispositifs.

La figure III.19 présente les images du masque et des électrodes en or réalisés. L'épaisseur de métallisation vaut 300nm et la largeur du gap capacitif de la capacité de détection est de  $10 \mu\text{m}$ . Notons que cette largeur a été corrigée de  $0,5 \mu\text{m}$  sur le masque pour tenir compte du comportement de la résine lors de l'élaboration des électrodes.

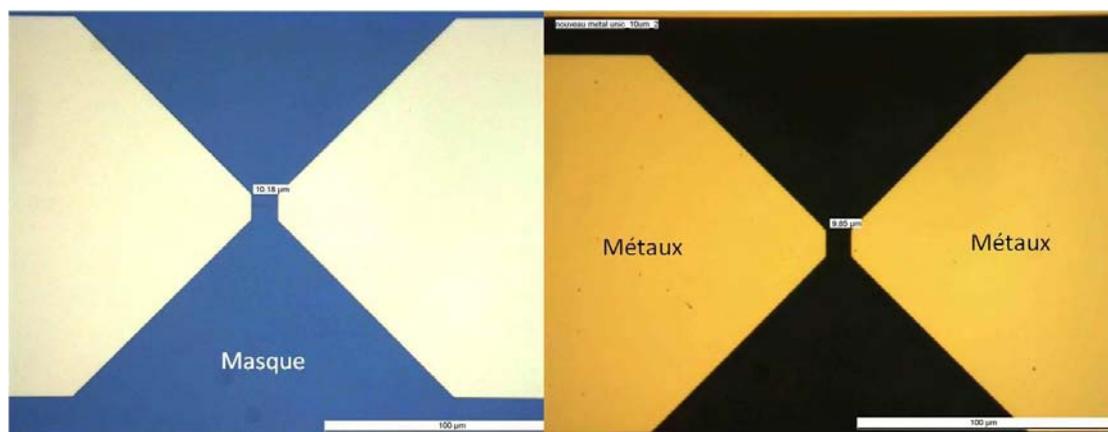


Figure III.19. Images du masque et des électrodes fabriqués du biocapteur HF de cellule unique.

La figure III.20 nous présente une image du biocapteur HF de cellule unique après assemblage du micro-canal en PDMS et du circuit de détection HF.

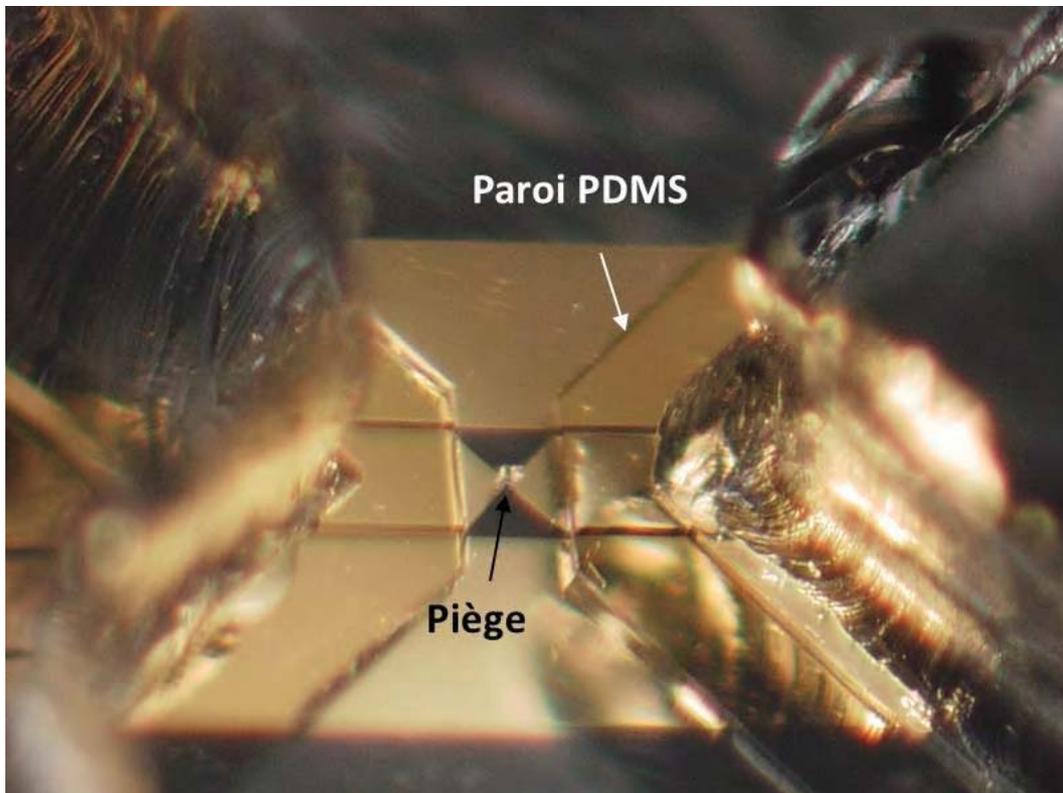


Figure III.20. Image au microscope 3D du biocapteur HF de cellule unique.

## 4. Expérimentations

### 4.1 Validation avec des microbilles polystyrènes

Nous avons tout d'abord validé les performances de notre capteur, en le mesurant, chargé d'eau DI. Après nous avons extrait la capacité et la conductance (en fonction de la fréquence de 40MHz à 40GHz), que nous avons comparées avec les simulations faites avec HFSS. La figure III.21 nous montre un bon accord entre les mesures et les simulations et valide la fabrication et le bon fonctionnement du biocapteur, ainsi que les simulations prédictives effectués.

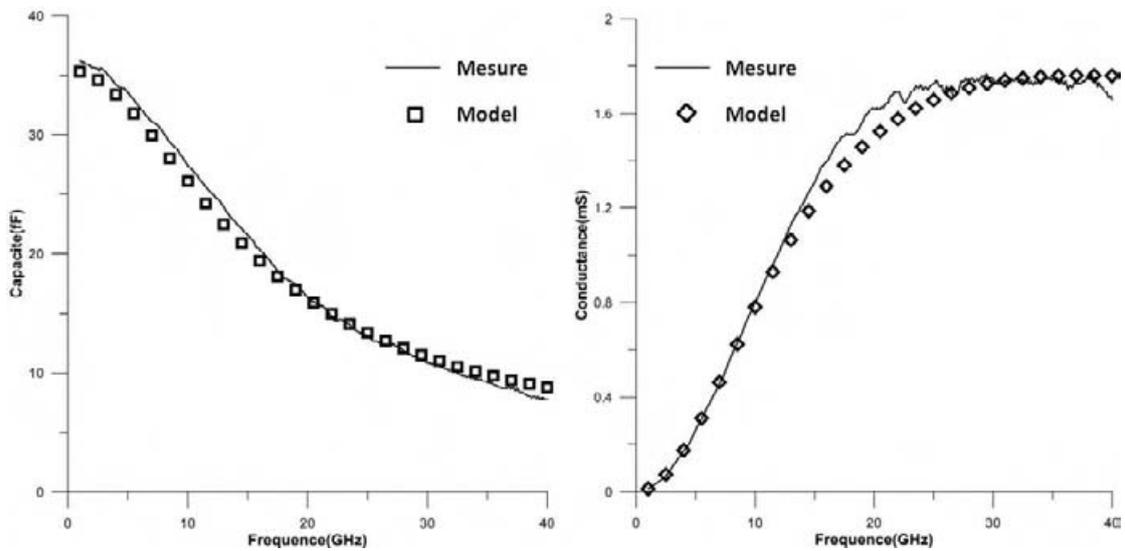


Figure III.21. Capacité et conductance mesurées et simulées du biocapteur chargé d'eau DI.

Après cette validation «HF» de notre dispositif, nous avons évalué ses capacités de piégeage de particule unique. Avant les manipulations avec des cellules humaines, nous avons opté pour l'emploi de microbilles de polystyrène simulant le comportement (mécanique mais non électrique) des cellules dans le milieu. Les microsphères (Polyscience Inc, cf. figure III.22.) ont un diamètre de  $10\mu\text{m}$  (comme les cellules de lymphome B RL), et sont en suspension aqueuse avec une concentration de  $4.55 \times 10^7$  particules/ml.

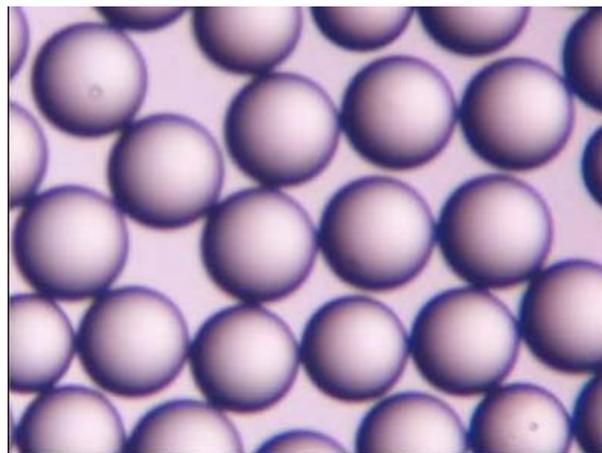


Figure III.22. Image au microscope des microbilles en polystyrène.

Les microbilles ont été suspendues dans de l'eau DI avec différentes concentrations (nous avons utilisé le même protocole mentionné au chapitre précédent) : 0.1 million/ml, 1million/ml et 10 millions/ml. Pour chaque concentration nous avons testé différentes vitesses de fluide : 0,5 mm/s ,5mm/s et 20mm/s. Nous avons trouvé que si la concentration ou la vitesse du fluide sont trop faibles, il est difficile de piéger une microbille. Cependant, si la concentration ou la vitesse sont trop élevées, plusieurs billes sont piégées. Le tableau III.1 présente les résultats des tests effectués.

TABLEAU III.1  
NOMBRE DE MICROSPHERE(S) PIEGEE(S)

	Concentrations		
Vitesse de fluide	0.5million/ml	1 million/ml	10 million/ml
0,5 mm/s	0	0	1
5 mm/s	0	1	2-3
20 mm/s	0	1-2	3-4

Forts de ces tests, nous avons choisi d'utiliser des concentrations de particules de 1 million de particules/ml et une vitesse de flux pour le piégeage de 5mm/s.

La seconde partie de la validation de nos composants à l'aide de microsphère de polystyrène doit répondre à la question : est-il possible de caractériser électriquement une microsphère unique ? Pour répondre à cette question, nous avons répliqué le protocole d'extraction de  $\Delta C$  et  $\Delta G$  (contrastes capacitif et conducteur avec et sans microsphère) mentionné au chapitre précédent. Nous avons pour cela mesuré les paramètres S (40MHz à 40GHz) du composant avant et après piégeage d'une bille suspendue dans de l'eau DI. La figure III.23 montre les images du dispositif avant et après le piégeage d'une microbille de polystyrène.

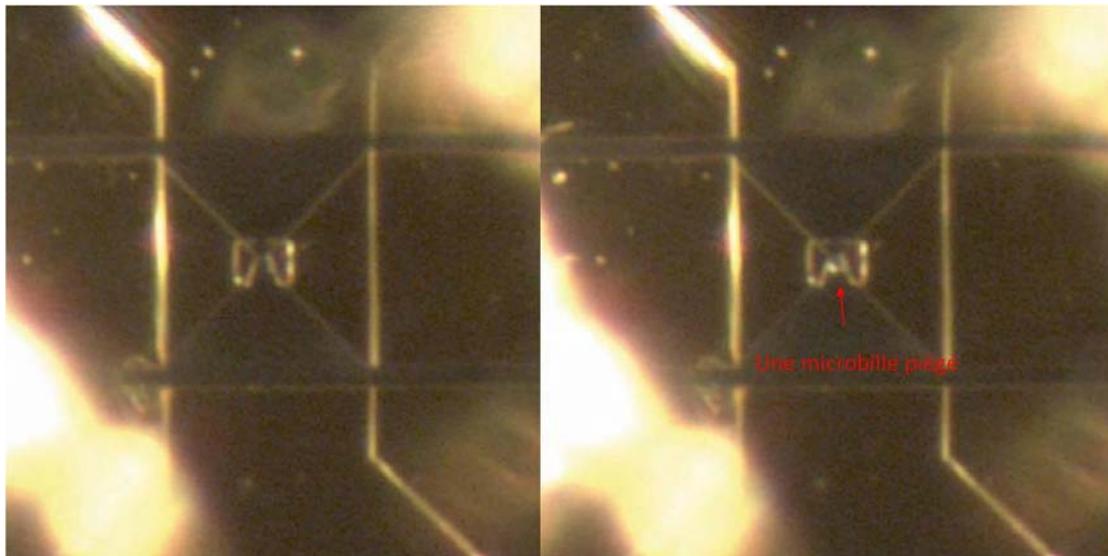


Figure III.22. Images du dispositif avant et après le piège d'une microbille de polystyrène.

Les extractions de  $\Delta C$  et  $\Delta G$  à partir des mesures sont comparées avec celles issues des simulations sur HFSS. Malgré l'optimisation de la concentration de billes et de la vitesse de flux pour ne piéger qu'une microsphère, il est parfois arrivé d'en piéger deux (le PDMS étant élastique donc déformable : deux billes peuvent se « serrer » dans le piège), comme le montre la figure III.23. Nous avons donc, non-seulement simulé le cas du piégeage avec une seule microbille, mais aussi celui avec deux microbilles capturées (la position des billes lors de cette simulation a été calquée sur celle de la figure III.23 qui correspond à la mesure associée). Les résultats de ces simulations et leur confrontation avec les mesures sont illustrés à la figure III.24.

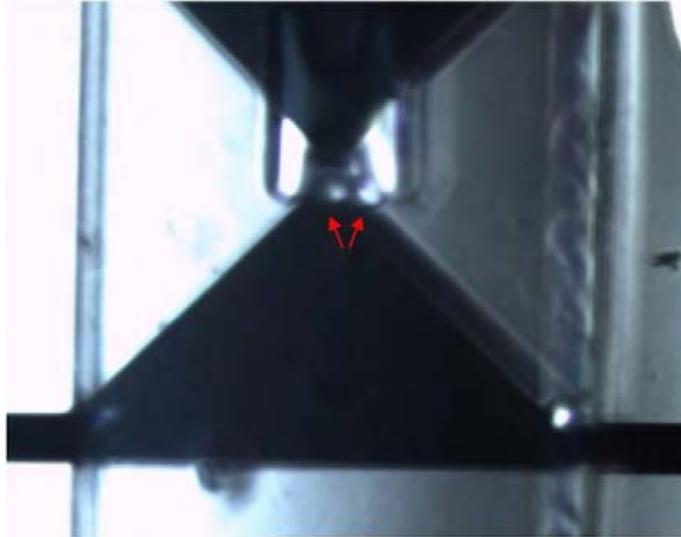


Figure III.23. Les images de piège avec 2 microbilles.

La figure III.24 illustre une bonne concordance simulations/mesures à l'exception des courbes de contraste de conductance qui «déchangent» au-delà de 10-20GHz selon les cas, sans toutefois indiquer que les modèles ou les mesures ne sont pas valides. Par contre l'adéquation mesures/simulations sur  $\Delta C$  est saisissante. Pour une bille piégée, le  $\Delta C$  mesuré vaut 1,2 fF à 5GHz à comparer avec les 1,4 fF issus des simulations. Pour 2 billes piégées, les  $\Delta C$  à 5GHz sont identiques et valent : 2,1fF. Rappelons que, pour ce dernier cas, le positionnement des billes a été calqué sur celui des mesures d'où la correspondance simulations/mesures. Dans le cas d'une bille unique, les simulations ont été faites avec une bille localisée parfaitement au centre du dispositif, alors que dans la réalité le piège n'est pas exactement localisé au centre de la zone de détection à cause de la précision d'alignement manuel lors de l'assemblage « PMDS sur wafer de quartz » comme le montre la figure III.25 (dans ce cas le décalage est d'environ  $8\mu\text{m}$  vers le haut et  $8\mu\text{m}$  vers la gauche). Ceci peut expliquer la différence de contraste simulations/mesures pour la bille unique comme l'indiquent les simulations présentées dans le paragraphe 2 de ce chapitre.

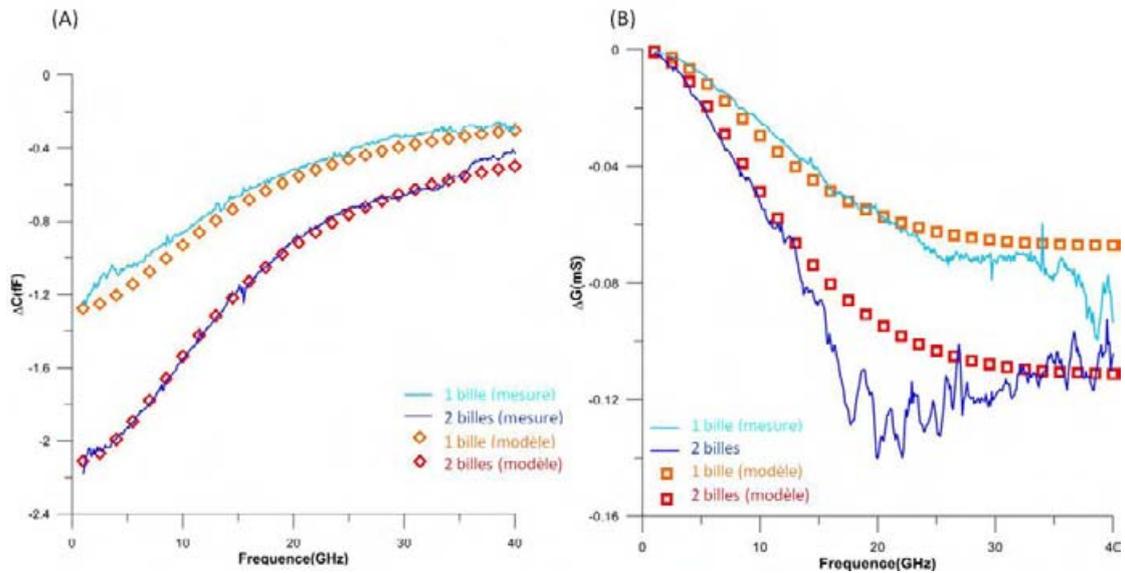


Figure III.24. Contrastes capacitifs et conductifs mesurés et simulés pour une et deux billes de polystyrène piégées.

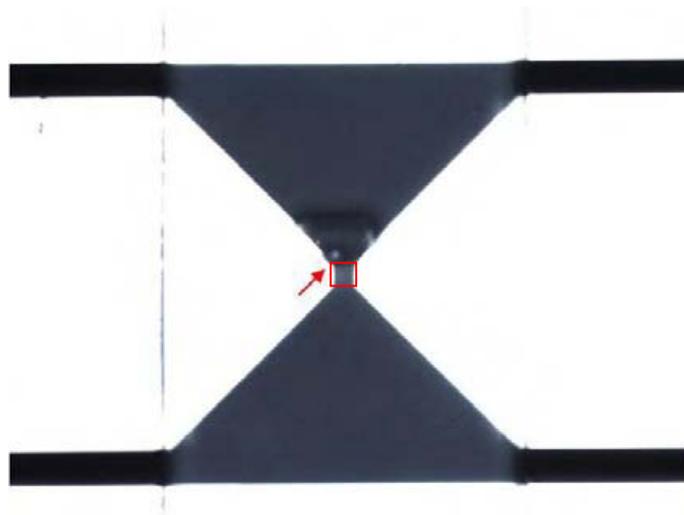


Figure III.25. Images d'un cas où une bille unique est piégée, mais le décalage piège/ zone de détection se traduit in fine par un décalage bille/ zone de détection.

Des essais de répétitivité avec plusieurs composants ont enfin été effectués. La figure III.26 regroupe les résultats de mesures obtenus (noirs, gris foncé et gris clair). Les différences observées proviennent du décentrage non-reproductif bille / zone de détection induit par l'alignement manuel non reproductif lors de l'assemblage « PMDS sur wafer de

quartz ». Cette origine est confirmée si l'on compare les résultats expérimentaux avec les simulations présentées au paragraphe 3 de ce chapitre et tenant compte de ce décalage.

Après analyse, nous avons estimé un décalage d'environ  $6\mu\text{m}$ ,  $10\mu\text{m}$ , et  $12\mu\text{m}$  pour les 3 mesures effectuées. Ces décalages ont été de plus corroborés par l'analyse des photographies prises lors des mesures.

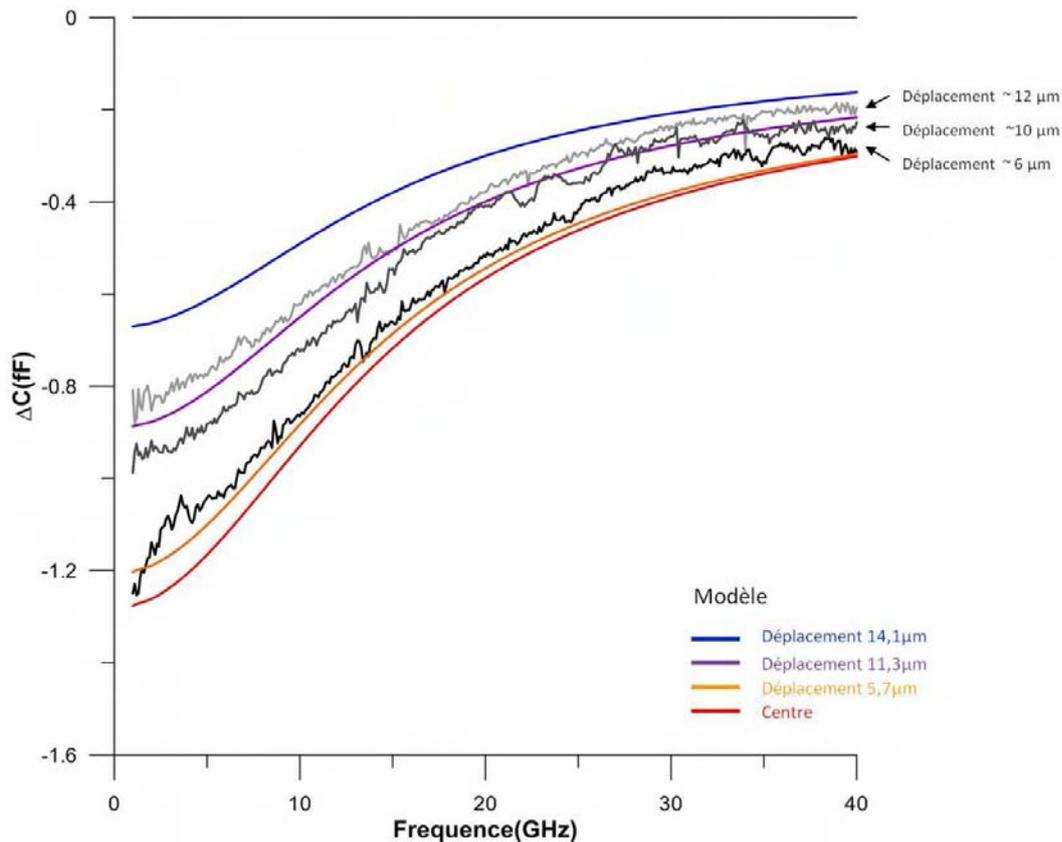


Figure III.26. Contrastes capacitifs  $\Delta C$  de 3 dispositifs différents et simulations prédisant l'effet d'une bille / zone de détection.

## 4.2 Lien contrastes capacitif/conductif et contraste diélectrique

Ce paragraphe va décrire comment, à partir des contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$ , nous pouvons extraire les contrastes de permittivité (complexes) entre la particule piégée (billes ou cellules) et son milieu environnant. Le schéma du dispositif sans (gauche) et avec (droite) particule piégée est présenté à la figure III.27.



Figure III.27. Schéma du dispositif sans (gauche) et avec (droite) particule piégée.

Lorsque le capteur est chargé avec le milieu hôte (=médium) seul (sans cellule), la capacité et conductance du capteur sont :

$$C_{medium} = \epsilon_0 * \frac{\epsilon'_{medium} + \epsilon'_{quartz}}{2} * K_{Geom} \quad \text{Equation 3.1}$$

$$G_{medium} = \epsilon_0 * \frac{\epsilon''_{medium}}{2} * K_{Geom} * \omega \quad \text{Equation 3.2}$$

Ici, le  $K_{Geom}$  est un coefficient qui ne dépend que de la distribution des champs électromagnétiques du capteur. Nous avons de plus simplifié l'équation 3.2 en négligeant  $\epsilon''_{quartz}$  devant  $\epsilon''_{medium}$ .

Lorsqu'une particule (=part.) est piégée dans le dispositif, nous avons :

$$C_{medium+part.} = \epsilon_0 * [\epsilon'_{medium} * K_{Geom} * (0.5 - A) + \epsilon'_{part.} * K_{Geom} * A + \epsilon'_{quartz} * 0.5]$$

$$\text{Equation 3.3}$$

$$G_{medium+part.} = \epsilon_0 * [\epsilon''_{medium} * K_{Geom} * (0.5 - A) + \epsilon''_{part.} * K_{Geom} * A] * \omega$$

$$\text{Equation 3.4}$$

Le coefficient A correspond à la proportion des lignes de champs électrique dans la particule, et donc (1-A) correspond à la proportion des lignes dans la médium. En conséquence, les contrastes «medium + part.» - «medium», notés  $\Delta C$  et  $\Delta G$  valent :

$$\Delta C = C_{medium+part.} - C_{medium} = \varepsilon_0 * (\varepsilon'_{part.} - \varepsilon'_{medium}) * K_{Geom} * A$$

Equation 3.5

$$\Delta G = G_{medium+part.} - G_{medium} = \varepsilon_0 * (\varepsilon''_{part.} - \varepsilon''_{medium}) * K_{Geom} * A * \omega$$

Equation 3.6

Les deux relations III. 5 et III. 6 démontrent que :

- $\Delta C$  est fonction du contraste de partie réelle de la permittivité relative entre la cellule et son milieu hôte,
- $\Delta G$  est fonction du contraste de partie imaginaire de la permittivité relative entre la cellule et son milieu hôte.

A 5GHz, le contraste  $\Delta C$  vaut -1,2fF, tandis que la partie réelle de la permittivité du medium est égale à  $\varepsilon'_{medium}=79,1$  (valeur issue de [27]). Sachant que la permittivité relative de la bille de polystyrène vaut  $\varepsilon'_{part.}=2,6$ , nous pouvons calculer d'après l'Equation III. 5 le coefficient de proportionnalité  $K_{Geom} * A \approx 1,77 * 10^{-6}$  m. Connaissant ce paramètre, la valeur de  $\Delta G = -9,89 * 10^{-6}$  S à 5GHz et négligeant les pertes du polystyrène, nous pouvons estimer d'après l'Equation III. 6 que  $\varepsilon''_{medium}$  vaut 20,1, ce qui est 5% inférieur à la valeur (=21,21) issue de [27]. Ceci montre qu'il est possible d'établir un lien entre les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  et les valeurs de permittivités des matériaux mis en jeu.

Cette partie a ainsi démontré les capacités de piégeage et de mesures HF du dispositif proposé sur microbilles de polystyrène. Nous avons de plus une bonne adéquation mesures/simulations, ce qui valide notre approche prédictive par simulation électromagnétique et donc la compréhension de la physique de notre dispositif. Cette partie indique enfin qu'une faiblesse réside dans l'assemblage manuel rendant non-nul et non-reproductible l'alignement bille/zone de détection. Nous avons donc (1) pris un soin particulier d'assemblage (rejetant les structures non-satisfaisantes) pour les mesures effectuées sur cellules vivantes et présentées ci-après et (2) pris comme action de résoudre ce problème, ce qui fait l'objet du chapitre IV.

### 4.3 Spectroscopie hyperfréquence d'une cellule de type Lymphome B

Comme présentés au chapitre précédent, nos objectifs sont (1) la spectroscopie hyperfréquence de paramètres électriques (ici  $\Delta C$  et  $\Delta G$ ) de cellules vivantes dans leur milieu de culture ainsi que (2) la discrimination d'état biologique par ces paramètres électriques. Une première partie démontre que la métrologie que nous avons développée (le dispositif et le traitement des résultats associés) permet la spectroscopie de 40MHz à 40GHz d'une cellule unique vivante et dans son milieu de culture. Une seconde partie démontre qu'il est possible de discriminer une cellule vivante d'une cellule morte (mort par lyse) ouvrant ainsi la voie à une discrimination d'état cellulaire en temps réel et de manière non-invasive.

#### 4.3.1 Piégeage et caractérisation d'une cellule de type Lymphome B

Les cellules de type lymphome B vivantes sont suspendues dans du milieu de culture (RPMI+10%SVF) avec une concentration de 1 million de cellules /ml. Nous injectons puis mesurons les paramètres S du dispositif :

- le milieu de culture seul,
- la suspension de cellules avec une vitesse de flux de 5mm/s (piégeage optimal) jusqu'à obtenir le piégeage d'une cellule.

Un post-traitement des mesures permet l'extraction de la capacité C et la conductance G en fonction de la fréquence (même protocole d'extraction que celui de chapitre II). La figure III.28 (A) présente une image d'une cellule piégée au centre du capteur. La partie gauche de la figure III.28 (B) présente les paramètres C et G de milieu culture seul et de cellule unique dans le milieu de culture. La partie droite de la figure III.28 (B) présente les contrastes «cellule unique dans le milieu de culture » - «milieu culture seul » sur C et G :  $\Delta C$  et  $\Delta G$  respectivement.

Les contrastes obtenus sont nets et indiquent que notre dispositif permet la spectroscopie hyperfréquence d'une cellule unique, vivante, dans son milieu de culture. Un contraste capacitif  $\Delta C$  maximal atteint autour de 5GHz et vaut : 0,56 fF, tandis que  $\Delta G$  est maximum à 40GHz et atteint : 0,05mS (le pic autour 35GHz a été rejeté).

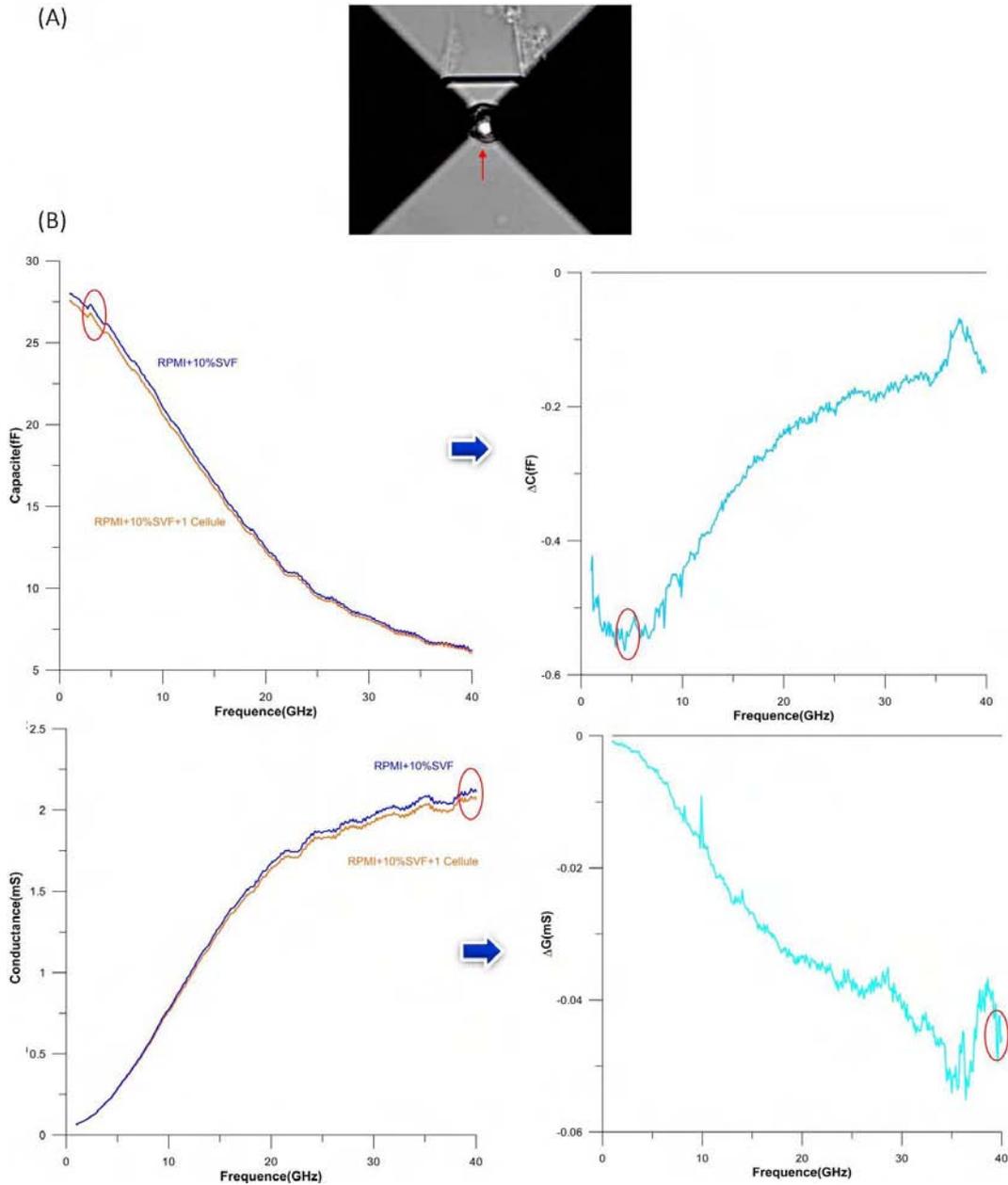


Figure III.28. (A) Image vue par un microscope inversé d'une cellule bloquée dans le biocapteur HF et (B) résultat associé pour une cellule vivante piégée.

#### 4.3.2 Lien contrastes capacitif et conductif et contraste diélectrique

Reprenant les calculs effectués dans le cas de suspension de billes de polystyrène, nous allons dans ce paragraphe estimer les propriétés diélectriques d'une cellule de lymphome B à 5 GHz. La technique [27] nous permet de connaître la permittivité complexe du milieu de culture (RPMI+10%SVF) à 5 GHz :  $\epsilon_{\text{medium}} = 77,15 + j 25,95$ . Supposant que la géométrie d'une cellule est une sphère parfaite de 10  $\mu\text{m}$  de diamètre, le facteur  $K_{\text{Geom}} * A$  vaut

toujours  $1,77 \cdot 10^{-6}$  m, nous pouvons en déduire que la permittivité expérimentale d'une cellule vaut en moyenne  $\epsilon_{\text{cellule}} = 39 + j 13$ .

Dans cette partie, nous avons montré que nous obtenons des spectres HF nets d'une cellule unique : un contraste capacitif de 0.56fF à 5GHz est obtenu, bien plus grand que notre résolution de mesure estimée à 0,01 fF. Fort de cette dynamique (voisine de 50), nous pouvons inférer que notre technique est capable de discriminer des variations biologiques dans une cellule.

#### **4.3.3 Discrimination par spectroscopie hyperfréquence de cellules vivante et morte**

Nous avons reproduit les expériences précédentes sur le même type cellulaire que précédemment, mais avec des cellules mortes. Afin de tuer les cellules, nous avons utilisé une substance toxique dite 'Lyse' (provenant d'un kit fourni avec le FACS et constitué essentiellement de méthanol) que l'on a dilué dans du milieu de culture pour éviter l'éclatement quasi immédiat des cellules. La figure III.29 présente les images de cellules sans lyse, avec 50% en volume de lyse et 2% de lyse. Avec de trop fortes concentrations de lyse, les cellules ont pour la plupart éclatées. Une incubation d'une minute dans une solution de milieu de culture avec 2% de lyse, permet (1) de ne pas faire éclater les cellules (indispensable pour notre analyse en cellule unique) et (2) de tuer les cellules, ce que nous avons vérifié par la technique du «bleu trypan » (les cellules mises dans une solution de bleu trypan apparaissent en bleu uniquement si elles sont mortes).

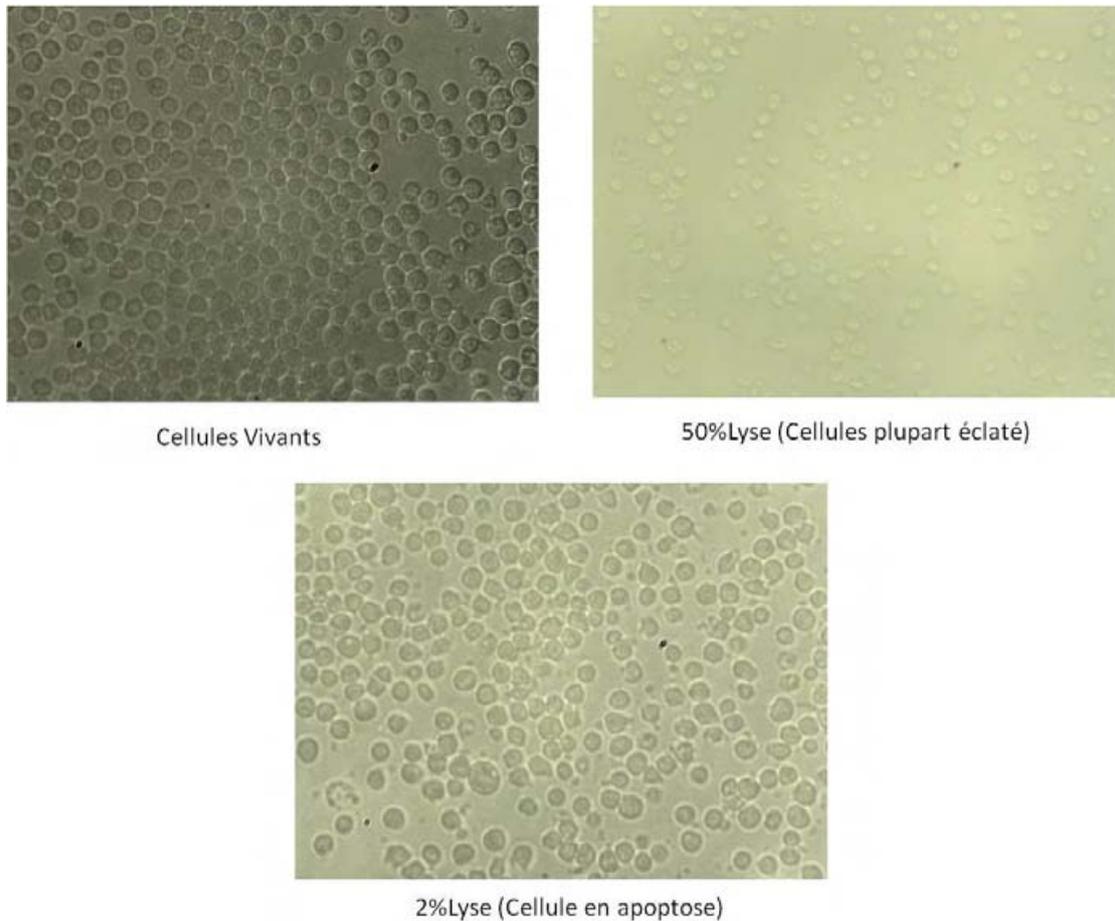


Figure III.29. Les cellules lymphome B dans leur milieu de culture (RPMI+10%SVF) sans lyse, avec 50% puis 2% de lyse.

Nous avons suivis le processus expérimental suivant :

- sans cellule, mesure du milieu de culture (RPMI+10%SVF)
- sans cellule, mesure du milieu toxique (RPMI+10%SVF+2%Lyse), puis rinçage avec du milieu de culture pur,
- piégeage et mesure d'une cellule lymphome B vivantes suspendues dans leur milieu de culture
- avec la cellule bloquée dans son piège, injection du milieu toxique et attente de quelques minutes puis mesures HF.

Les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  ont été extraits pour les 5 manipulations et sont présentés sur la figure III.30. Nous pouvons observer un écart significatif des contrastes entre cellule vivante

et cellule morte. Dans le cas des cellules mortes, la membrane de la cellule étant perméable, le contraste milieu intracellulaire / milieu extracellulaire est plus faible que pour le cas des cellules vivantes. Il est donc normal que les contrastes des cellules mortes soient plus faibles que celui des cellules vivantes : un écart de  $\Delta C$  ( $\Delta G$ ) à 5GHz (40GHz) entre cellules vivantes et mortes 0,25 fF (0,03mS) est atteint (on rappelle que notre résolution est voisine de 0,01fF (0,001mS)).

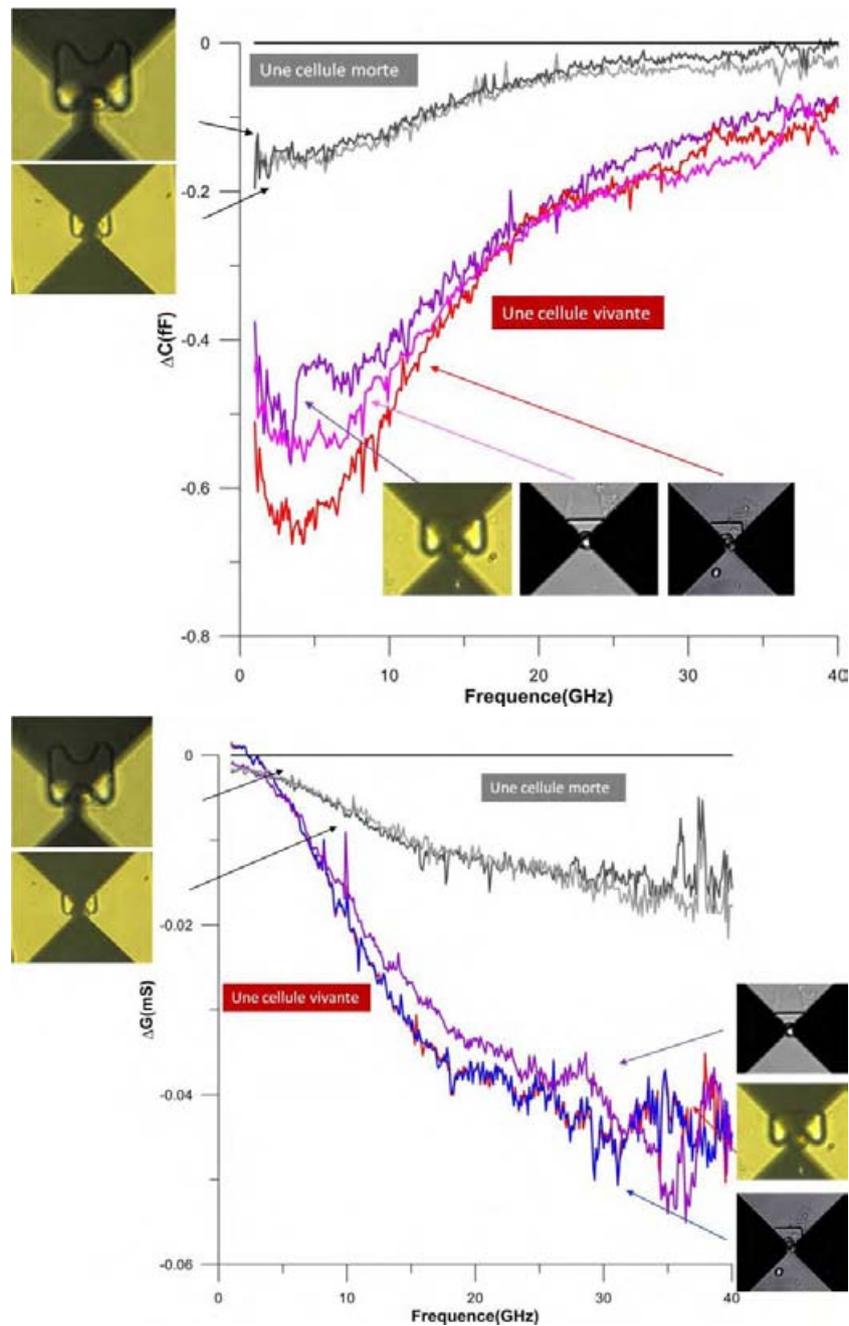


Figure III.30. Spectre HF des contrastes de cellules lymphome B vivantes et mortes.

Nous avons de plus suivi en temps réel la mort d'une cellule Lymphome B. Nous avons suivi le protocole suivant: (1) piégeage d'une cellule de lymphome B vivante suspendue dans son milieu de culture et mesure, (2) ajout du milieu toxique (RPMI+10%SVF+2% Lyse), (3) enregistrement des mesures toutes les 2 minutes. Pour chaque mesure, nous avons extrait les contrastes. La figure III.31 présente les résultats correspondants pour le contraste capacitif. Nous pouvons tout d'abord constater une différence de contraste lors du changement du medium. Ceci s'explique par les équations III.5 et III.6. Plus intéressant, nous observons une dérive du contraste au cours du temps, montrant ainsi l'aptitude de la technique au suivi longitudinal de réactions biochimiques. Nous retrouvons de plus la diminution du contraste capacitif lorsque l'on passe d'un état cellulaire vivant à un état de mort.

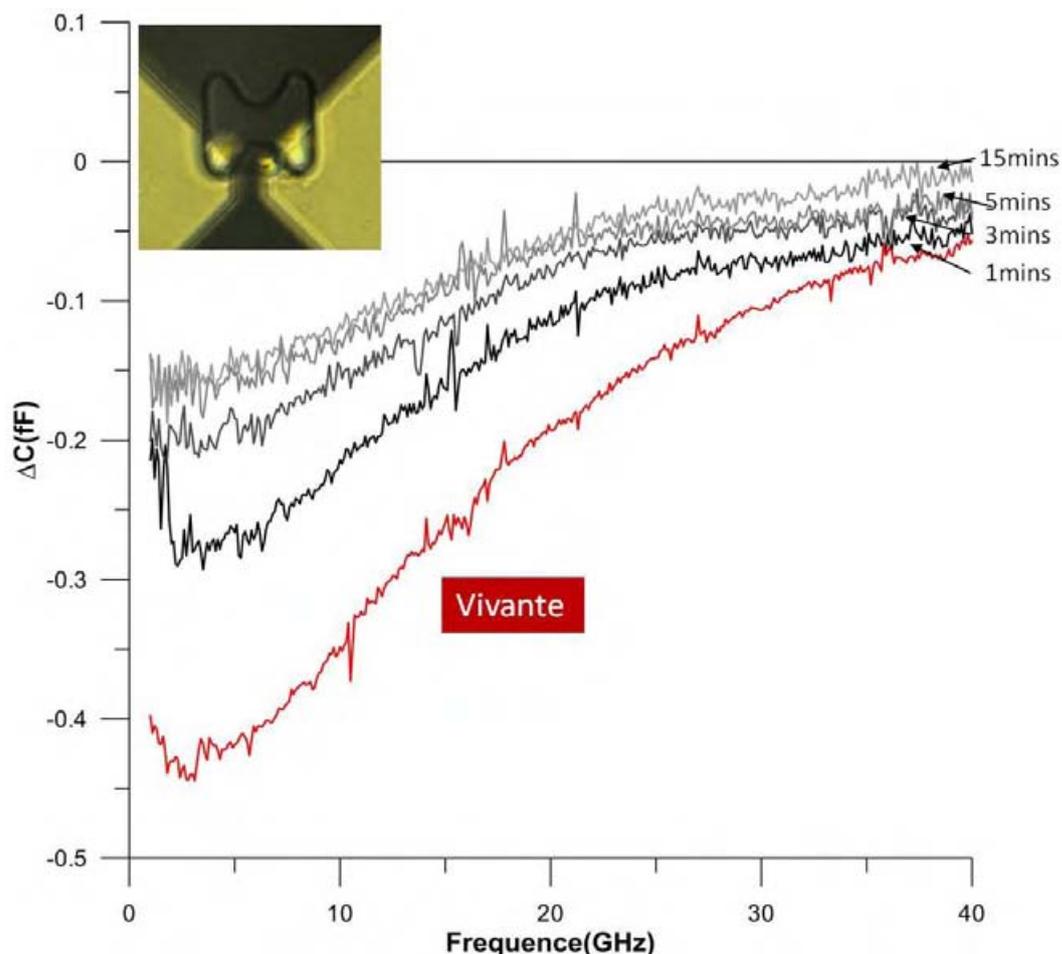


Figure III.31. Spectre HF des contrastes capacitifs de cellules lymphome B vivantes et les contrastes lorsque la cellule subit le milieu toxique.

## 5. Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons démontré qu'il est possible de faire de la spectroscopie diélectrique (1) d'une cellule unique (2) vivante et suspendue dans son milieu de culture. Ces deux points représentaient chacun de réels challenges :

- capacité de sortir des paramètres électriques associés à un objet de taille 10  $\mu\text{m}$  de ceux, parasites, associés d'un dispositif de taille millimétrique,
- capacité d'opérer en milieu liquide « défavorable » pour une analyse électrique. « Défavorable » car chargé d'ions pouvant écranter les champs électromagnétiques,

Nous avons de plus démontré que la technologie développée et la technique de traitement des données expérimentales permettait la discrimination nette entre cellules vivantes et mortes. Ceci indiquant notre :

- capacité de répéter des expériences sur du matériel biologique identique, les variations sur les paramètres électriques étant expliquées par les variabilités biologiques entre cellules,
- capacité de discriminer entre des états biologiques différents,
- capacité de suivre en temps réel le changement d'états biologiques (dans notre cas, à l'échelle de la minute, mais pouvant être optimisé pour descendre jusqu'à la microseconde ou augmenter sur plusieurs heures).

Nous avons de plus pointé les limitations de la technologie décrite dans ce chapitre : le placement manuel et donc non-reproductible du canal en PDMS et donc du bloqueur sur les circuits HF amène une dispersion systématique pour un même composant et aléatoire d'un composant à l'autre. Combiné au désir de répondre à la question : « est-il possible de discriminer des états biologiques plus fin de vivant/mort ? », nous avons consacré la dernière partie de nos travaux de thèse au développement d'une technologie supprimant l'assemblage manuel et assurant un positionnement du bloqueur sur nos circuits HF au micromètre près.

## Bibliographe du chapitre III:

- [1] J.Zhao, Cell individuality: A basic multicellular phenomenon and its role in the pathogenesis of disease, *Medical Hypothese*, 44, 400-402; 1995.
- [2] A. Ashkin, Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure, *Phys. Rev. Lett.* 24 (4): 156–159. Bibcode 1970.
- [3] A. Ashkin, Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. *PNAS*, 94: p. 4853–4860; 1997.
- [4] S. Umehara, Y. Wakamoto, I. Inoue, K. Yasuda, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (305) 534; 2003.
- [5] C.Q. Yi, C.W. Li, S.L. Ji, M.S. Yang, Microfluidics technology for manipulation and analysis of biological cells, *Analytica Chimica Acta* 560; 1–23; 2003.
- [6] L. Zhu, Q. Zhang, H.H. Feng, S. Ang, F.S. Chau, W.T. Liu, *Lab Chip* 4;337; 2004.
- [7] A. Khademhosseini, J. Yeh, S. Jon, G. Eng, K.Y. Suh, J.A. Burdick, R. Langer, *Lab Chip* 4; 425; 2004.
- [8] H. Tani, K. Maehana, T. Kamidate, *Anal. Chem.* 76; 6693; 2004.
- [9] M.S. Yang, C.W. Li, J. Yang, *Anal. Chem.* 74; 3991; 2002.
- [10] J. Yang, C.W. Li, M.S. Yang, *Lab Chip* 4; 53; 2004.
- [11] J. Lahann, M. Balcells, H. Lu, T. Rodon, K.F. Jensen, R. Lange, *Anal. Chem.* 75; 2117; 2003.
- [12] S.K. Murthy, A. Sin, R.G. Tompkins, M. Toner, *Langmuir* 20; 11649; 2004.
- [13] A. Revzin, K. Sekine, A. Sin, R.G. Tompkins, M. Toner, *Lab Chip* 5; 30; 2004.
- [14] W.C. Chang, L.P. Lee, D. Liepmann, *Lab Chip* 5; 64; 2005.
- [15] T.H. Chen, D.A. Small, M.K. McDermott, W.E. Bentley, G.F. Payne, *Biomacromolecules* 4 ;1558; 2003.
- [16] M. Kohl, E. Just, W. Pfleging and S. Miyazaki. SMA microgripper with integrated antagonism. *Sensors and Actuators A*, 83, pages 208–213, 2000.
- [17] T.B. Jones. *Electromechanics of Particles*. Cambridge University Press, Cambridge, 1995.
- [18] J. Voldman, M.L. Gray, M. Toner, M.A. Schmidt, A microfabrication-based dynamic array cytometer, *Anal. Chem.* 74; 3984; 2002.
- [19] A. Rosenthal and J. Voldman, Dielectrophoretic Traps for Single-Particle Patterning, *Biophysical Journal* Volume 88; 2193–2205; March 2005.
- [20] M. Frenea et al., Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis. *Materials science & Engineering C.* 23(5): p. 597-603; 2003.
- [21] J. Voldman, et al., Holding Forces of Single-Particle Dielectrophoretic Traps. *Biophysical Journal.* 80: p. 531-541; 2001.
- [22] T. B. Jones, *Electromechanics of particles*, Cambridge University Press, 1995.
- [23] B.M. Taff and J. Voldman, A Scalable Addressable Positive-Dielectrophoretic Cell-Sorting Array. *ANALYTICAL CHEMISTRY.* 77: p. 7976-7983; 2005.
- [24] D.R. Albrecht, et al., Photo- and electropatterning of hydrogel-encapsulated living cell arrays. *Lab on a Chip.* 5: p. 111-118; 2004.

- [25] W.H. Tan and S. Takeuchi, A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray application. PNAS. 104(4): p. 1146-1151; 2006.
- [26] D.D. Carlo, N. Aghdam, and L.P. Lee, Single-Cell Enzyme Concentrations, Kinetics, and Inhibition Analysis Using High-Density Hydrodynamic Cell Isolation Arrays, Anal. Chem, 78, 4925-4930; 2006.
- [27] K. Grenier et al, Integrated Broadband Microwave and Microfluidic Sensor Dedicated to Bioengineering, IEEE Transactions on microwave theory and techniques, VOL. 57, NO.12; 2009.



# Chapitre IV:

Optimisation et amélioration  
du système de spectroscopie  
diélectrique HF de cellule  
unique

# 1. Introduction

Dans le chapitre II et III, nous avons présenté nos travaux sur les biocapteurs pour la spectroscopie diélectrique hyperfréquences en milieu liquide de solutions aqueuses, de suspensions de cellules et jusqu'à la cellule unique. Dans ce dernier cas, le capteur focalise le champ électromagnétique sonde dans une cellule préalablement bloquée mécaniquement. Ces développements nous ont permis, pour la première fois à notre connaissance, d'effectuer la spectroscopie diélectrique d'une cellule unique vivante dans son milieu de culture.

Néanmoins, plusieurs insuffisances subsistent et sont inhérentes aux faibles dimensions atteintes de l'objet à spectrographier (la dizaine de micromètres) :

- la technologie des chapitres II et III implique un alignement manuel, donc fortement imparfait, du micro-canal en PDMS, et donc du piège « à cellule unique » et du circuit de détection HF. Les désalignements qui s'en suivent apportent donc des imprécisions de mesure et de la non-reproductibilité
- l'efficacité de piégeage est faible : il nous faut plus de 12  $\mu\text{l}$  de solution à 1 million de cellules par ml pour piéger une cellule. Notre objectif serait d'atteindre un volume consommé inférieur à 3  $\mu\text{l}$  qui correspond au volume d'une goutte élémentaire de solution injecté dans notre composant (faire moins serait pour l'instant inutile),
- les paramètres de sortie, à savoir  $\Delta C$  et  $\Delta G$ , sont fonction de la taille de la cellule analysée. C'est un point capital car il est alors impossible d'imputer les contrastes observés entre 2 cellules à soit la taille, soit une différence d'état.

En conséquence, nous avons développé une nouvelle filière technologique qui implique essentiellement des procédés de fabrication collectifs, et notamment l'élaboration des micro-canaux réalisés directement sur le substrat métallisé. Ceci donne accès à différents avantages. Tout d'abord, cela nous permet de nous affranchir des défauts d'alignement manuel des canaux fluidiques en PDMS et des possibles imperfections de collage et d'étanchéité des canaux sur les circuits micro-ondes. L'utilisation de technologies collectives nous permet aussi de diminuer les dimensions des canaux et ainsi d'accéder à des volumes d'analyse particulièrement petits, de l'ordre de grandeur de quelques nano litres, voir même jusqu'aux pico litres. Elle assure également une meilleure reproductibilité des composants réalisés et

donne ainsi accès à une meilleure répétabilité des structures fabriquées. Enfin, cette nouvelle filière autorise plus de latitude du point de vue dimension et forme des pièges de cellules, ce qui laisse envisager une meilleure efficacité de blocage des cellules.

Nous avons de plus exploré l'amélioration du circuit HF de détection permettant de rendre les contrastes observés les plus insensibles possibles aux diamètres des cellules analysées.

Dans ce chapitre, nous présentons ces développements sur :

- (1) l'ingénierie du biocapteur HF vis à vis du diamètre de la particule analysée, cf. paragraphe 2,
- (2) le piégeage mécanique afin d'en augmenter son efficacité, cf. paragraphe 3,
- (3) la technologie d'intégration d'un réseau microfluidique en technologie SU8, cf. paragraphe 4.

## 2. Optimisation du biocapteur de cellule unique

Dans le chapitre précédent, nous avons utilisé comme biocapteur de cellule unique, un détecteur capacitif ayant un gap de largeur. Nous avons étudié principalement des objets de diamètre  $10\mu\text{m}$  (microsphères de polystyrène) car cela correspond au diamètre moyen des cellules que nous analysons. Mais concrètement, par exemple dans un contexte *cancer*, les diamètres des cellules cancéreuses sont plus importants (3 à 5 microns) que ceux des cellules saines et d'une manière générale, ces diamètres sont dispersés (de 1 à 2 microns). Nous nous sommes donc interrogés sur la sensibilité de notre capteur au diamètre de la particule piégée. Des simulations avec une bille en polystyrène de diamètre variable ont été effectuées, et les spectres des contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  résultants sont présentés à la figure IV.1.

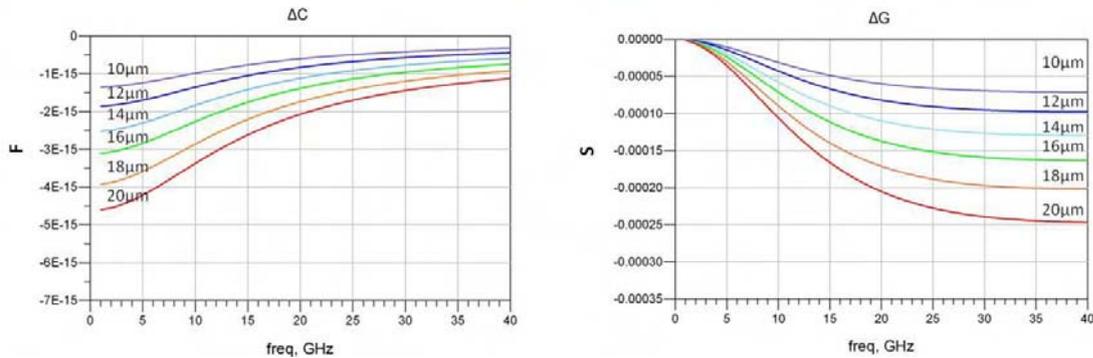
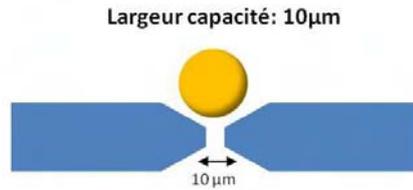


Figure IV.1 Simulations des spectres de  $\Delta C$  et  $\Delta G$  d'une bille de polystyrène de diamètre allant de 10 $\mu\text{m}$  à 20 $\mu\text{m}$  biocapteur ayant un gap de 10 $\mu\text{m}$ .

Comme démontré à la figure IV.1, les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  se prononcent avec l'augmentation de diamètre de microbille : ils deviennent plus importants quand une bille plus grande est piégée. Par exemple, à 5GHz, nous pouvons observer que le  $\Delta C$  pour une bille de 12 $\mu\text{m}$  vaut 1,7fF, tandis qu'il est de 1,2fF pour une bille 10 $\mu\text{m}$ . Ainsi lorsque le diamètre de la particule augmente de 2  $\mu\text{m}$ , la variation relative de capacité atteint 38% ce qui correspond à un niveau de dispersion inacceptable.

Afin de proposer un remède à ce problème, nous avons tout d'abord effectué des simulations électromagnétiques du champ électrique de sonde afin d'identifier clairement les origines de cette sensibilité au diamètre. La figure IV.2 présente l'intensité du champ électrique dans la zone d'analyse. La figure indique de plus les contours de différentes particules fictives de diamètre allant de 10 à 20  $\mu\text{m}$ . Ainsi, nous voyons que lorsque le volume de la microparticule augmente, la proportion du champ électrique (noté 'A' dans les équations 3.5 et 3.6) augmente.

$$\Delta C = C_{medium+cell} - C_{medium} = \epsilon_0 * (\epsilon'_{cell} - \epsilon'_{medium}) * K_{Geom} * A$$

Equation 3.5

$$\Delta G = G_{medium+cell} - G_{medium} = \epsilon_0 * (\epsilon''_{cell} - \epsilon''_{medium}) * K_{Geom} * A * \omega$$

Equation 3.6

En conséquence, les  $\Delta C$  et  $\Delta G$  deviennent plus importants et l'on comprend alors bien les courbes de la figure IV.2.

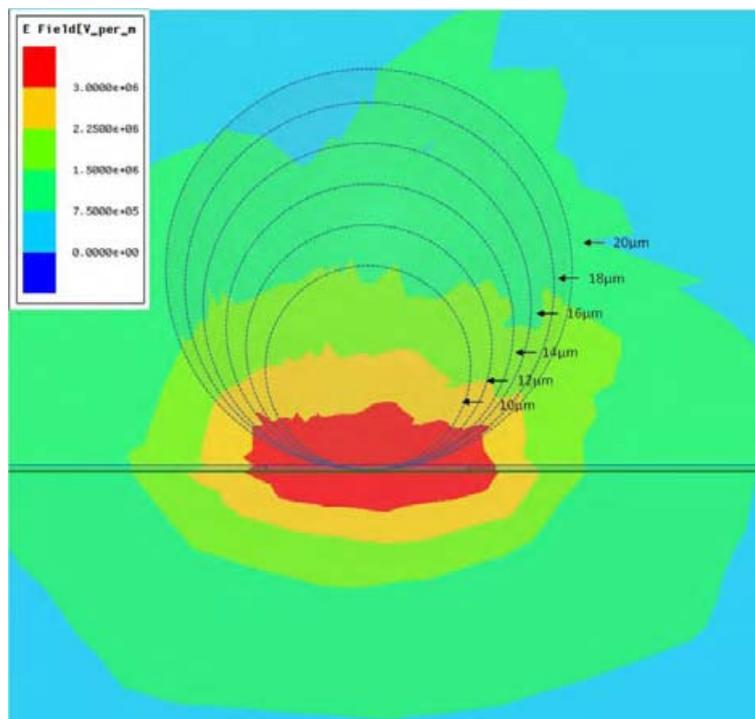


Figure IV.2 Distribution du champ électrique dans la zone d'analyse. Simulation faite avec une particule piégée, (milieu = eau DI). Indication des contours d'une sphère fictive de diamètre allant de 10µm à 20µm avec biocapteur ayant un gap de 10µm.

Ainsi, le diamètre (en fait le volume, donc le diamètre au cube) d'une particule affecte (fortement si l'on considère le diamètre car il impact le résultat à la puissance 3) les résultats de notre spectroscopie diélectrique hyperfréquence.

L'optimisation du biocapteur est faite en diminuant son gap à 5µm puis 1µm : l'objectif étant une focalisation encore plus forte du champ électrique dans la particule piégée et ce quel

que soit son diamètre. Les simulations électromagnétiques ont été réalisées dans ces 2 situations. La figure IV.3 présente les résultats de simulations pour lesquels les échelles des champs ont été ajustées pour toujours associer la même couleur au champ maximal de la structure. A la vue de ces résultats, il apparaît évident que la proportion du champ électrique en interaction avec une microsphère donnée augmente lorsque le gap du détecteur capacitif diminue. Consécutivement, lorsque le diamètre de la particule piégée augmente, la variation de la proportion champ électrique en interaction est plus faible et donc, les variations relatives de  $\Delta C$  et  $\Delta G$  sont moins marquées.

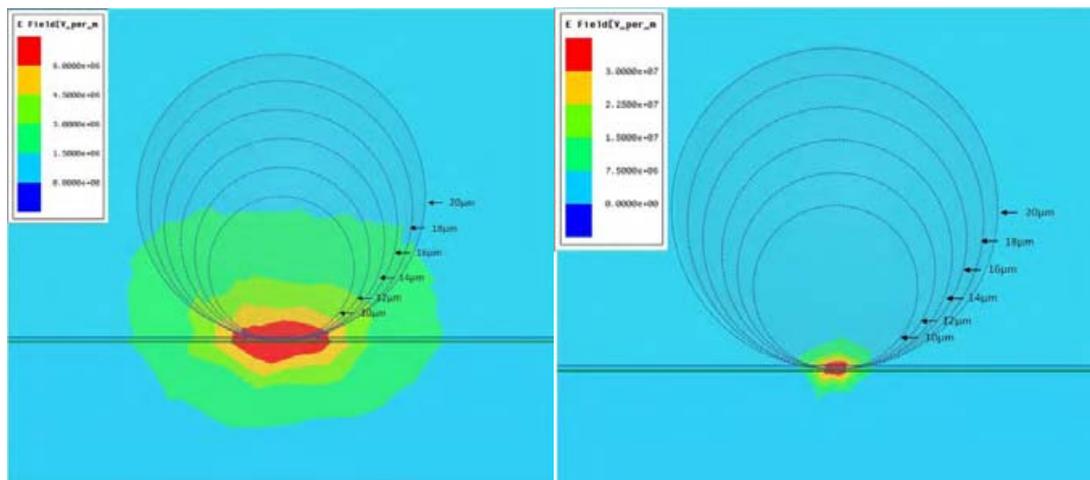


Figure IV.3 Distribution du champ électrique dans la zone d'analyse. Simulation faite avec particule piégée, (milieu = eau DI). Indication des contours d'une sphère fictive de diamètre allant de 10 µm à 20 µm - biocapteur ayant un gap de 5 µm (gauche) et de 1 µm (droite).

Cette conclusion qualitative est corroborée par les résultats quantitatifs des courbes de la figure IV.4. En effet, lorsque le diamètre de la particule passe de 10 µm à 12 µm la variation relative de capacité atteint 36% pour un gap de 5 µm et 20% pour un gap de 1 µm.

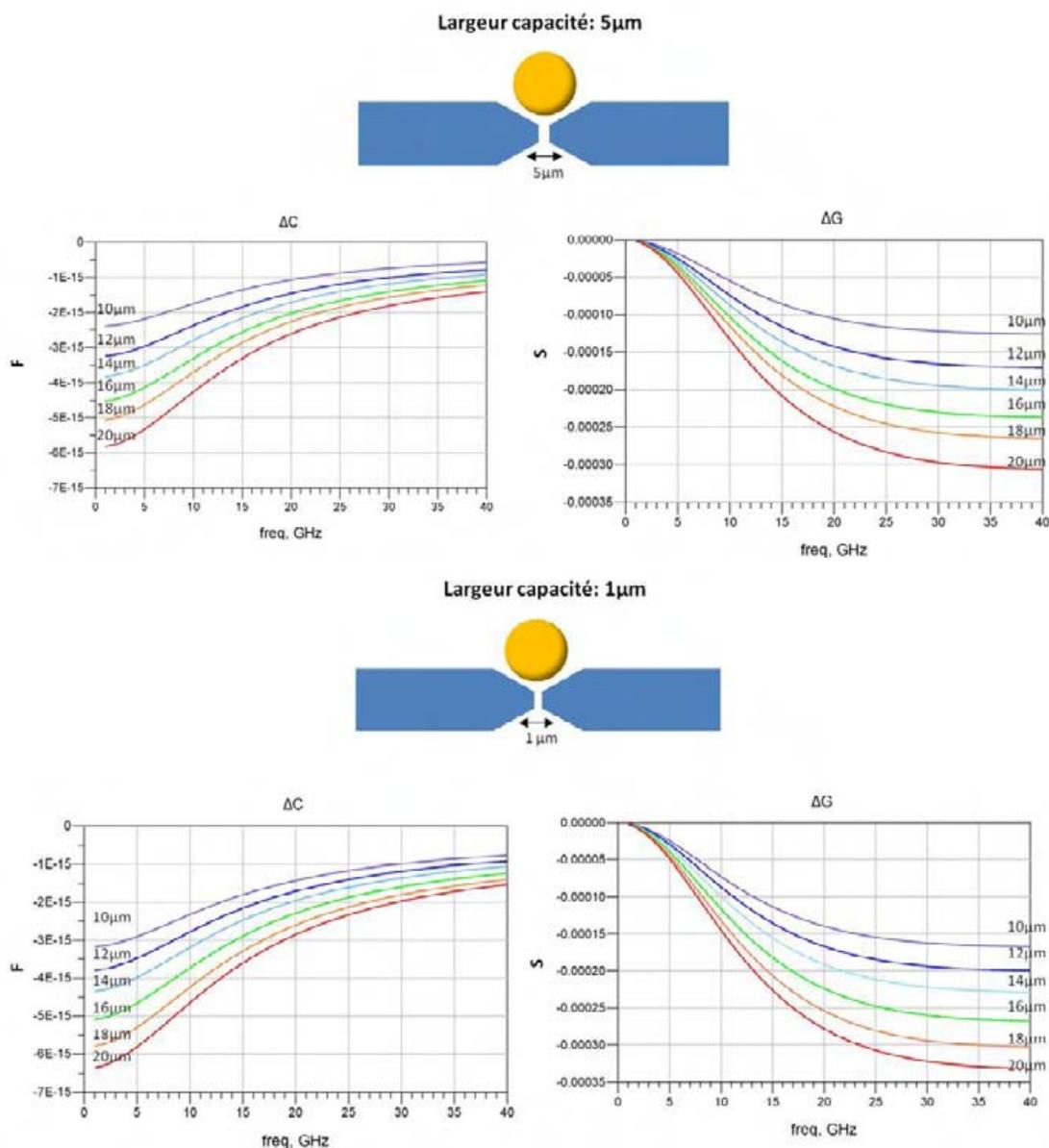


Figure IV.4 Simulations des spectres de  $\Delta C$  et  $\Delta G$  d'une bille de polystyrène de diamètre allant de  $10\mu\text{m}$  à  $20\mu\text{m}$  - biocapteur ayant un gap de  $5\mu\text{m}$  (en haut) et de  $1\mu\text{m}$  (en bas).

Cette étude comparative démontre théoriquement que les contrastes de  $\Delta C$  et  $\Delta G$  issus de notre spectroscopie hyperfréquence sont fortement dépendant du diamètre de la particule piégée. Nous avons de plus proposé une voie d'amélioration de notre biocapteur pour le rendre le plus insensible possible au diamètre de la particule piégée. Néanmoins, la sensibilité au diamètre reste notable et l'on devra donc toujours observer les éléments piégés pour vérifier que les dispersions des diamètres ne soient « pas trop élevées ». « Pas trop élevées » veut dire : conduisant à des variations de  $\Delta C$  et  $\Delta G$  significativement plus faibles que celles consécutives des phénomènes que nous souhaitons observer.

### 3. Optimisation du piégeage (bloqueur) de cellule unique

Des simulations du flux hydrodynamique dans le canal et au voisinage du bloqueur ont été effectuées avec le logiciel COMSOL Multiphysics 4. Nous avons comparé différents modèles de bloqueur, comme présentés sur les vues 3D de la figure IV.4. :

- à gauche, le bloqueur, nommé de type A, reprend l'architecture développée au chapitre III, mais avec une hauteur de passage augmentée à  $5\mu\text{m}$  (contre  $3\mu\text{m}$  pour le chapitre III),
- à droite, le bloqueur, nommé de type B, est constitué d'un passage ('canyon') plus large en son centre. Ce 'canyon' fait  $6\mu\text{m}$  de large et  $20\mu\text{m}$  de haut (=hauteur totale de canal microfluidique).

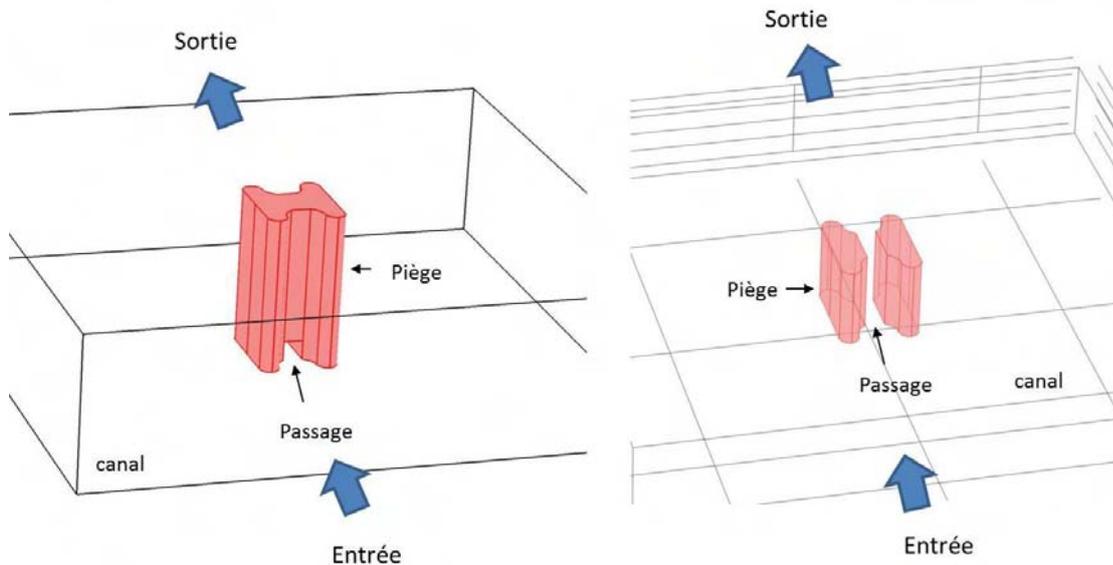


Figure IV.5 Deux types de bloqueur, à gauche : bloqueur de type A, à droite : bloqueur de type B.

Nous avons défini des paramètres de simulation identiques à ceux du chapitre III. Les figures IV.6 et IV.7 présentent différentes vues des vitesses simulées du fluide pour les 2 types de piège.

Pour le bloqueur de type A, la figure IV.6 montre que :

- le flux au travers du piège va guider la particule contre le substrat et donc au contact du circuit HF de détection, ce qui est favorable (images du haut),

- dans les conditions de simulation, l'intensité de la vitesse du fluide dans l'orifice au travers du bloqueur atteint  $50 \mu\text{m/s}$  soit 20% de la vitesse du fluide de part et d'autre du bloqueur. Cette valeur correspond au double de celle obtenue au chapitre III, qui doit être considérée comme faible car elle est responsable de la faible efficacité de piégeage. Ainsi nous attendons une efficacité de piégeage doublée par rapport à la situation du chapitre III.

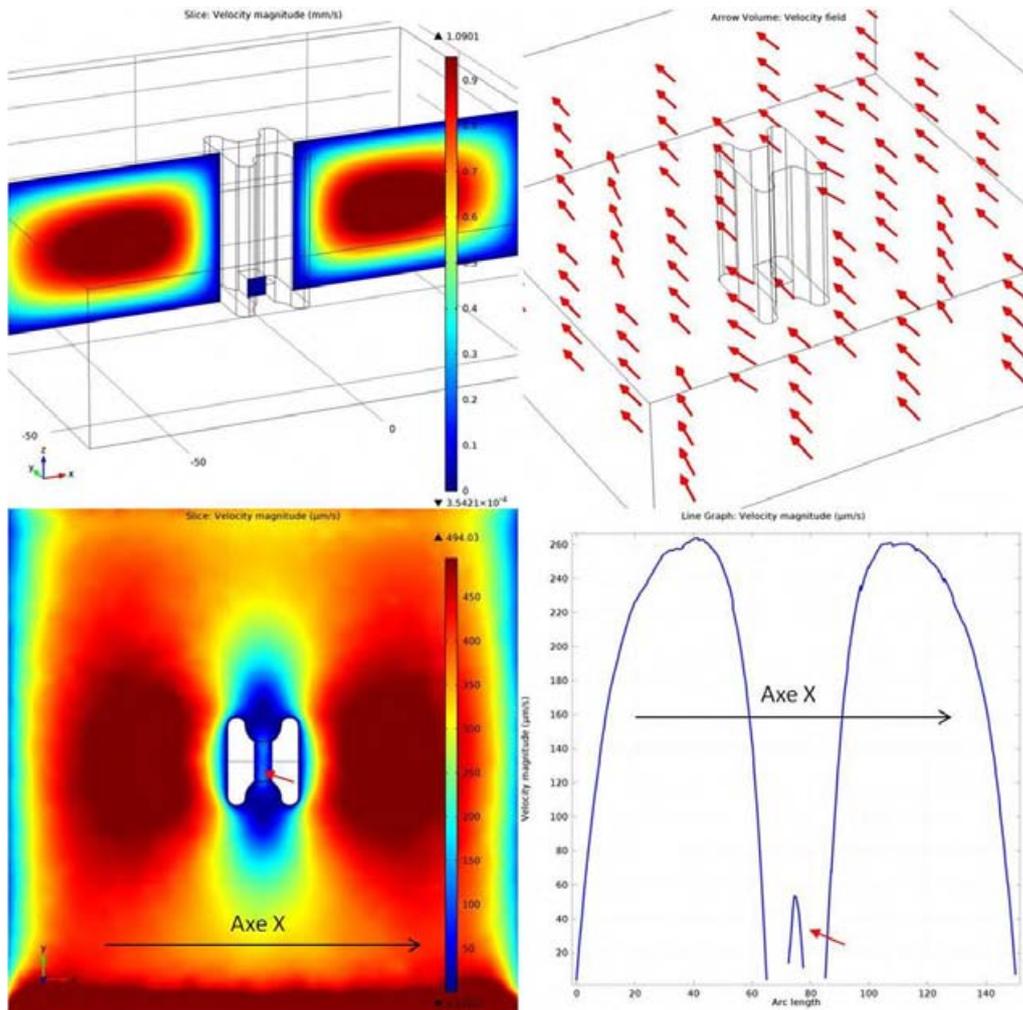


Figure IV.6 Bloqueur de type A. En haut : intensité (à gauche) et vecteur (à droite) de la vitesse du flux fluide dans le canal. En bas à gauche : intensité de la vitesse de flux en vue de dessus à  $2.5 \mu\text{m}$  au-dessus de substrat. En bas à droite : intensité de la vitesse de flux suivant l'axe x.

Pour le bloqueur de type B, la figure IV.7 montre que :

- le flux de fluide guidera les cellules vers le piège, mais sur toute la largeur du canyon : par conséquent, il est susceptible de piéger plusieurs cellules verticalement. Nous avons

donc diminu é la hauteur de canal à  $20\ \mu\text{m}$ , ce qui limite le nombre de cellules pi ég ées à deux au maximum.

- l'intensité de la v élocité repr ésente dans ce cas  $\sim 50\%$  de la v élocité du fluide de part et d'autre du bloqueur. En cons équence, une efficacit é de pi égeage quintupl ée est attendue par rapport à la situation du chapitre III.

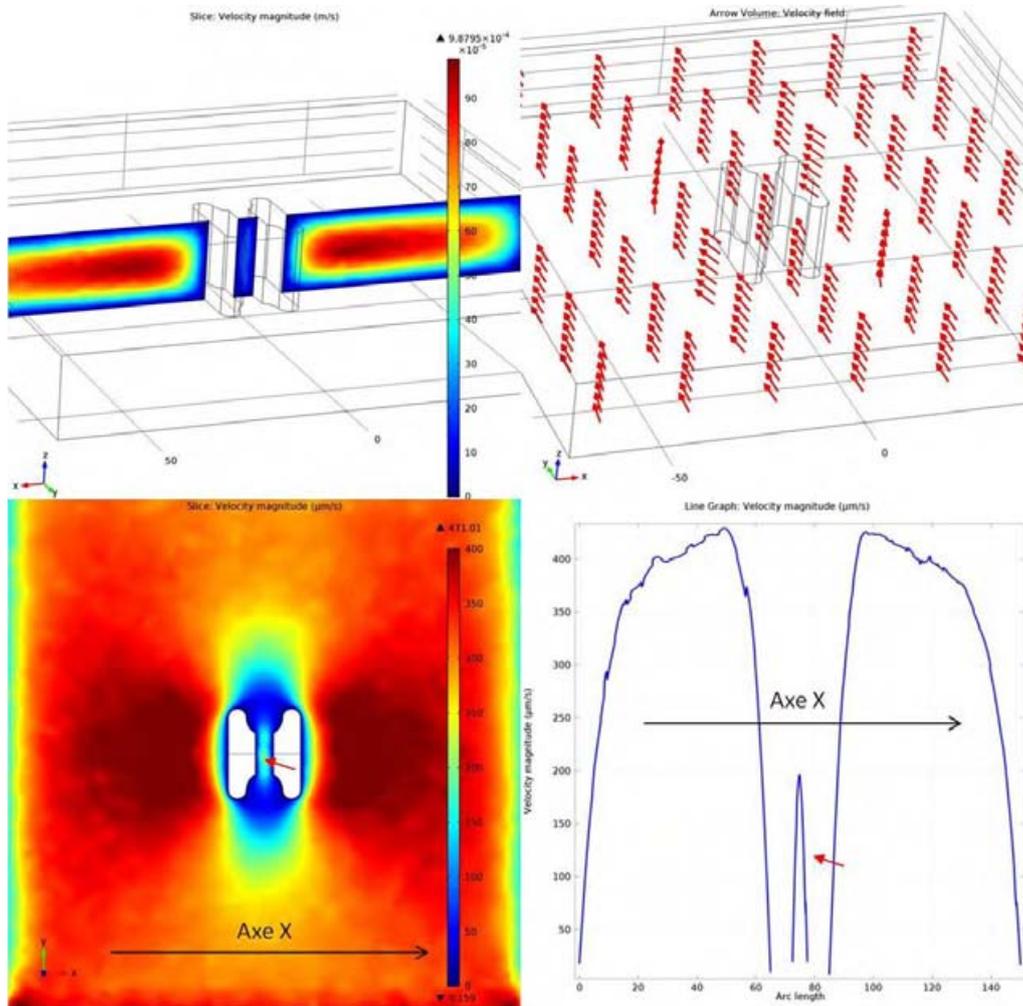


Figure IV.7 Bloqueur de type B. En haut : intensit é (à gauche) et vecteur (à droite) de la v élocité du flux fluide dans le canal. En bas à gauche : intensit é de la v élocité de flux en vue de dessus à  $2.5\ \mu\text{m}$  au-dessus de substrat. En bas à droite : intensit é de la v élocité de flux suivant l'axe x.

Ainsi, nous proposons 2 types de bloqueur « améliorés » par rapport à la version du chapitre III. Le type A permettra d'augmenter par 2 l'efficacité de pi égeage tout en assurant un positionnement vertical de la particule contre le détecteur. Le type B quant à lui n'assure pas le positionnement vertical de la particule pi ég ée mais permet une efficacit é de pi égeage

optimale. Dans la partie expérimentale, nous discuterons des résultats expérimentaux de ces 2 types de piégeage et les comparerons aux expérimentations du chapitre III.

## **4. Optimisation de la technologie biocapteur HF de cellule unique**

### **4.1 Améliorations de la technologie d'intégration « circuit HF » / « circuit microfluidique »**

L'avantage évident du canal réalisé en PDMS est sa simplicité de mise en œuvre. Cependant elle présente plusieurs inconvénients dans notre cas [1]:

- la difficulté d'aligner précisément et manuellement le canal avec les électrodes, comme indiqué sur la Fig. IV.1 (A). Outre un défaut de reproductibilité et de répétabilité des structures, ceci sous-entend également le placement individuel de chaque canal, très consommateur en temps et avec des dimensions manipulables.
- des défauts de collage et d'étanchéité du canal en PDMS avec le substrat métallisé. Dans le cas des structures à cellule unique, le bloqueur de cellule, de part son faible interstice avec le substrat, peut également se retrouver coller et ainsi empêcher tout piégeage.

L'alternative que nous avons choisie est de construire le réseau microfluidique avec une résine photosensible polymérisable sur le circuit HF, faisant appel à des procédés de fabrication collectifs. Le choix de la résine s'est porté sur la SU-8, matériau déjà utilisé dans la littérature pour la fabrication de micro-canaux [2-3]. Il s'agit d'un matériau photosensible, transparent, hydrophile, qui nous permet d'utiliser uniquement des procédés de fabrication collective, basés sur l'utilisation d'aligneurs conventionnels. Ceci confère une excellente précision d'alignement de niveau à niveau, un faible coût et un gain de temps remarquable. De plus, la hauteur totale du canal est diminuée à quelques centaines de micromètres au lieu de 1mm par technique de moulage PDMS. La visibilité au travers du canal est alors largement améliorée par rapport à celle accessible avec du PDMS. En outre, nous avons ajouté une couche sacrificielle pour créer le passage secondaire de fluide.

La figure IV.8 donne un résumé des deux stratégies d'intégration du réseau fluide sur les électrodes: (A) par voie de moulage en PDMS avec report, qui correspond à la technologie utilisée dans le chapitre III et (B) par fabrication collective avec l'utilisation d'une couche sacrificielle et l'élaboration de la partie microfluidique en SU-8, filière présentée dans ce chapitre.

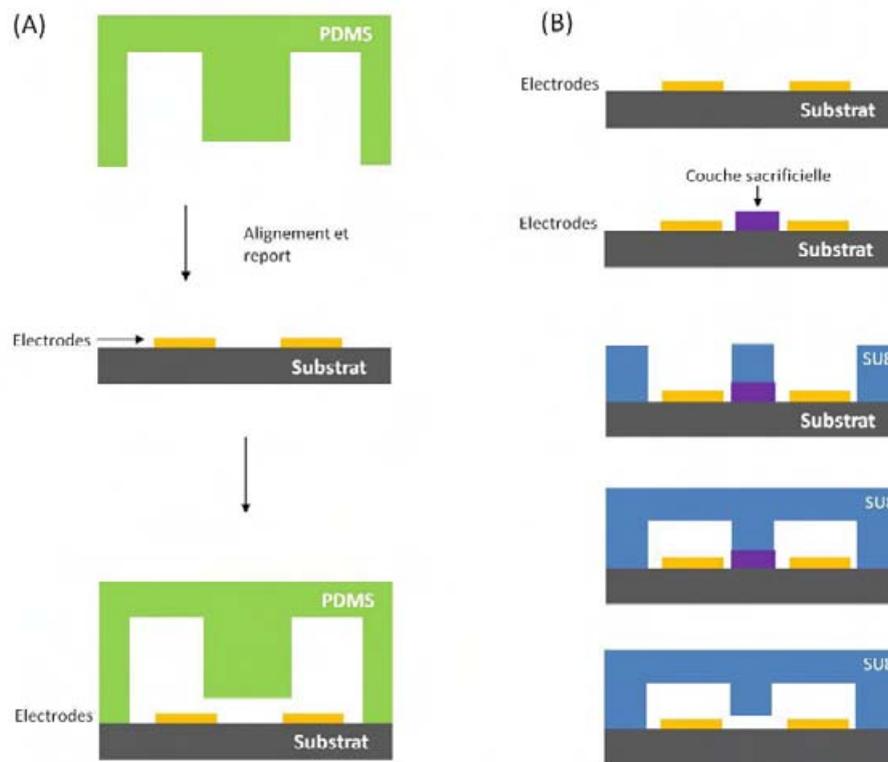


Figure IV.8 Deux stratégies de fabrication du microsystème fluide sur substrat métallisé (A) via l'assemblage par report d'un réseau microfluidique en PDMS pré-structuré par moulage et (B) par construction collective niveau par niveau avec des résines photosensibles polymérisables et une couche sacrificielle.

La dimension visée pour la hauteur du micro-canal est comprise dans une gamme de 20 à 40  $\mu\text{m}$ . La SU-8 est un matériau disponible, avec une large gamme d'épaisseurs possibles, structuré avec une excellente résolution par simple photolithographie, avec des propriétés planarisantes, une très forte résistance aux solvants, une excellente transparence, et enfin elle est biocompatible. Le groupe de M. Hennemeyer et al [4] a notamment démontré une bonne biocompatibilité de ce matériau lors de la culture de cellules sur SU-8.

## 4.2 Technologie d'élaboration des bloqueurs optimisés pour la capture efficace de cellule unique

Afin d'obtenir une meilleure précision d'alignement et d'efficacité de piégeage, nous avons développé une filière technologique collective avec réseau microfluidique en SU-8. Les bloqueurs de cellule optimisés dans le paragraphe 3 sont illustrés par la Fig. IV.9 vis à vis de leur réalisation technologique. Le premier intègre une ouverture entre le bloqueur et le substrat métallisé uniquement au centre du bloqueur, ce qui implique l'utilisation d'une couche sacrificielle. Le deuxième design comporte une ouverture sur toute la hauteur du piège, ce qui peut être réalisé en même temps que les murs des canaux.

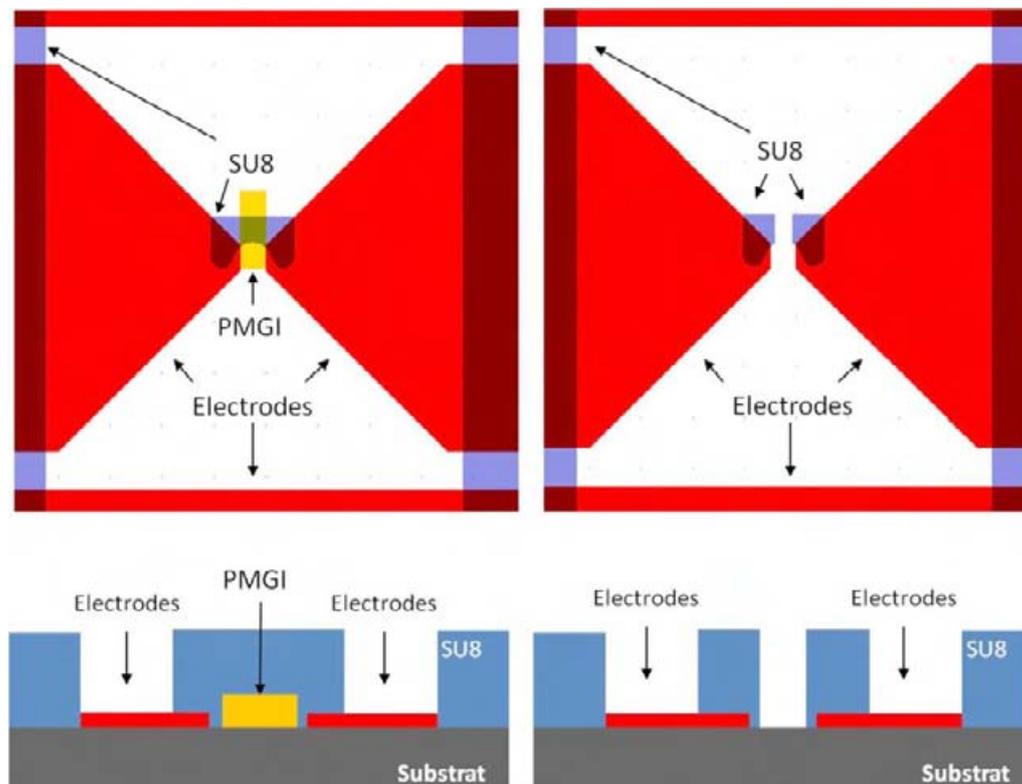


Figure IV.9 Structure à cellule unique avec différents pièges en SU-8: (A) piège de type A à gauche avec une couche sacrificielle pour réaliser le passage de fluide au bas et au centre du bloqueur et (B) piège de type B à droite avec un canyon de 5  $\mu\text{m}$  de largeur au centre du bloqueur.

La couche sacrificielle indiquée en jaune pour la structure de type A présente une largeur de 5  $\mu\text{m}$  et une hauteur également de 5  $\mu\text{m}$ , tandis que le canyon du piège de type B est de 5  $\mu\text{m}$  de largeur.

D'un point de vue global, les canaux fluidiques présentent

- un passage principal de 1 mm de largeur afin de faciliter la pénétration de liquide et la connectivité de tubes fluidiques,
- ainsi qu'un rétrécissement de 150  $\mu\text{m}$  de largeur au niveau de la zone d'analyse pour orienter les cellules vers le piège.

Les parois du canal en SU-8 sont de 140  $\mu\text{m}$  de large, ce qui correspond à un compromis entre perte des signaux HF, qualité du capotage en SU-8, et hauteur du canal de 40  $\mu\text{m}$ . Une vue globale d'une structure est illustrée par la figure IV.10.

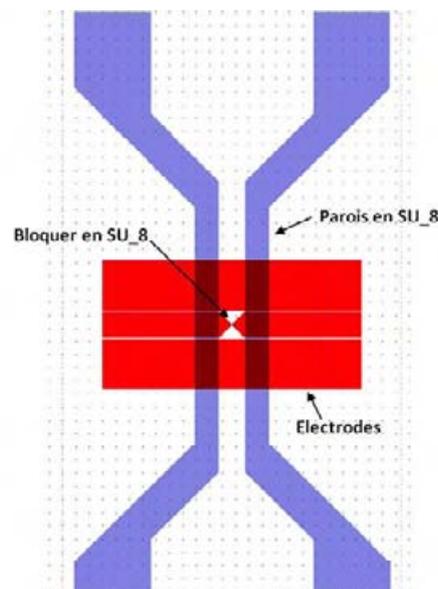


Figure IV.10 Vue globale d'une structure et de son canal fluidique.

### 4.3 Optimisation des volumes de liquide consommé

Afin de minimiser les volumes des fluides consommés, nous avons réduit à 20  $\mu\text{m}$  la hauteur des canaux microfluidiques. De plus, nous allons intégrer sur cette nouvelle technologie des capteurs CID du chapitre II, et dans un souci de pousser à l'extrême la miniaturisation des volumes fluidiques, nous avons diminué la largeur du canal à 20  $\mu\text{m}$  au lieu de 150  $\mu\text{m}$ . La figure IV.11 montre le design du masque et un modèle 3D.

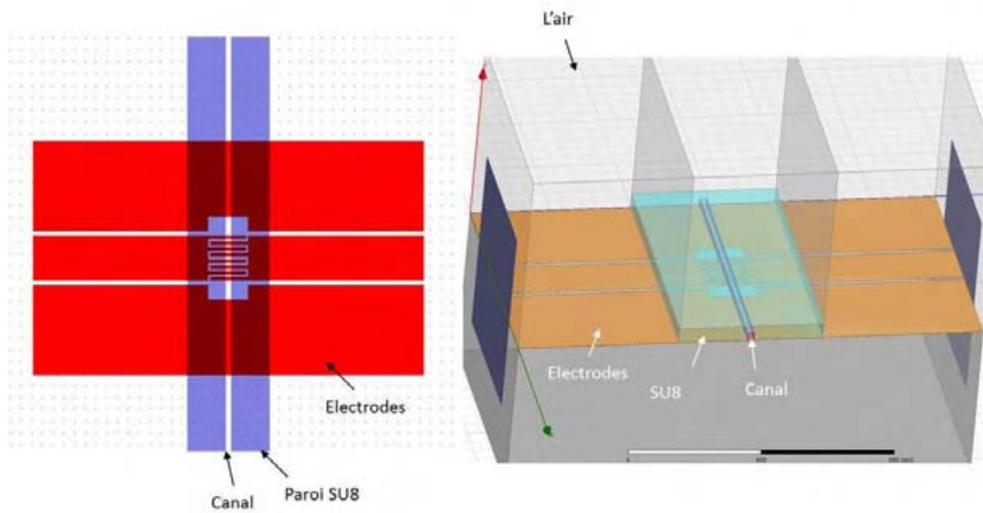


Figure IV.11 Le design du masque et la mod è 3D de nouveau canal fine de capteur CID.

Ce capteur nous permet ainsi l'analyse de 70pl de liquide.

Sur ces trois strat égies (d écrites aux paragraphes 4.1, 4.2 et 4.3), nous avons d évelopp é la fili ère technologique d écrite dans le paragraphe suivant.

#### **4.4. Développement de la fili ère de fabrication collective de micro-canaux à base de SU-8**

La Figure IV.12 présente les étapes clés de la fili ère technologique des canaux microfluidiques à base de SU-8.

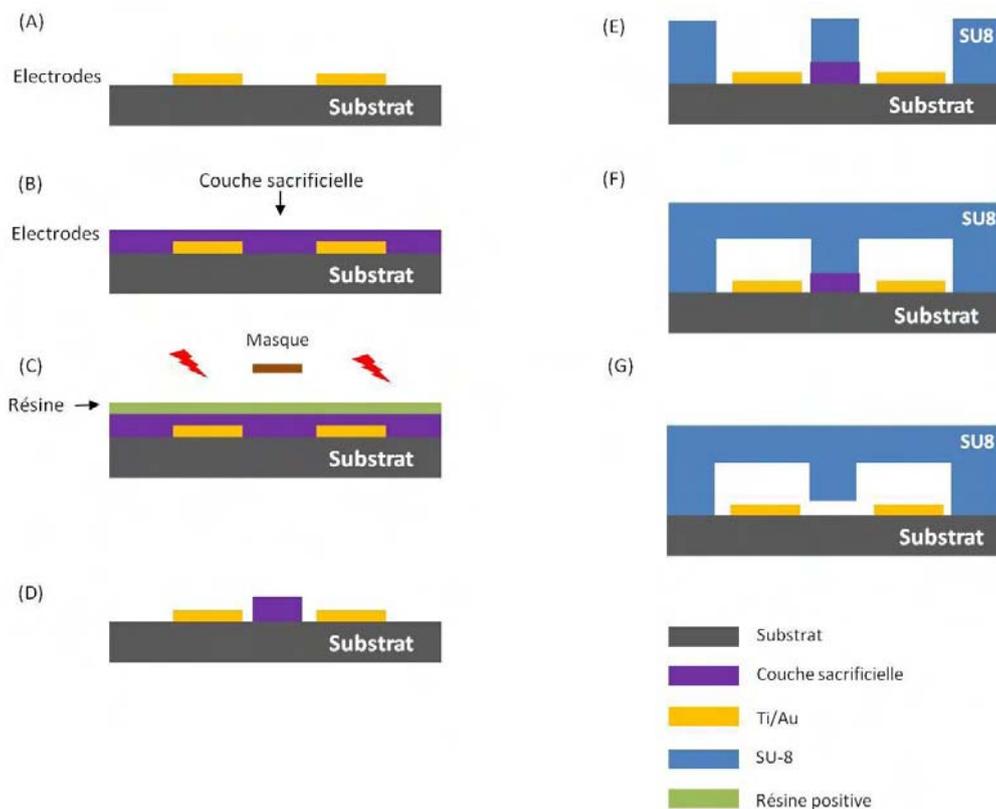


Figure IV.12 Vue globale de la fabrication des micro-canaux fluidiques avec bloqueur de cellule en technologie SU-8.

La réalisation des structures commence par l'élaboration d'une couche sacrificielle (cf. Figure IV.12 (B)-(D)). Suit alors l'élaboration des murs des canaux fluidiques en SU-8, comme illustré sur la Figure IV.12 (E). Après capotage des canaux sur la Figure IV.12 (F), la couche sacrificielle est finalement supprimée (cf. Figure IV.12 (G)).

#### 4.4.1 Couche sacrificielle

Afin de réaliser l'interstice localisé entre le bloqueur et les électrodes, une couche sacrificielle est utilisée. Elle doit pouvoir être déposée et structurée dans une gamme de 1 à 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur et sa suppression ne doit pas avoir d'incidence sur la résine SU-8 des micro-canaux en fin de processus. Le matériau choisi correspond au polydiméthylglutarimide (PMGI), qui est une résine positive d'UV profond, principalement utilisé pour réaliser des bicouches en procédé lift-off. Elle constitue un bon candidat en tant que couche sacrificielle parce qu'elle présente une grande variété d'épaisseurs, elle peut être facilement structurée et a

une température de transition vitreuse supérieure aux températures de recuit requises pour la SU-8 [5].

Le procédé utilisé est indiqué sur la figure IV.13. Tout d'abord, une couche de PMGI est déposée à la tournette sur le circuit HF préalablement réalisés sur une plaquette de quartz (cf. chapitre 2 pour le procédé technologique des électrodes). Une seconde résine photosensible positive de type ECI 2.5  $\mu\text{m}$  est ensuite déposée et insolée. Lors du développement, le développeur de l'ECI sert également à graver chimiquement la couche de PMGI. Enfin, la résine de masquage ECI est supprimée à l'acétone, sans que la couche sacrificielle en PMGI ne soit altérée.

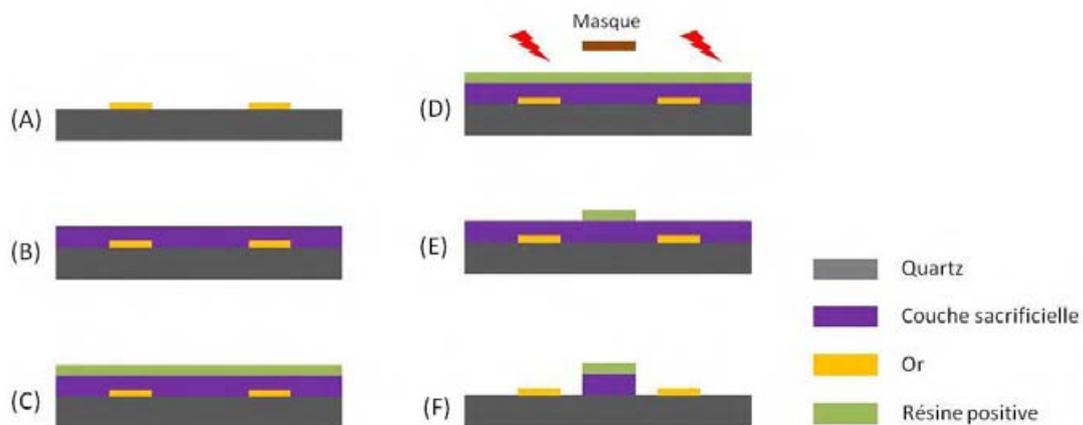


Figure IV.13 Schéma de la structuration de la couche sacrificielle.

La figure IV.14 présente l'image prise au microscope de la couche en PMGI structurée au centre des électrodes. L'épaisseur du motif mesuré par la profilomètre optique est de 5,8  $\mu\text{m}$ . La largeur de la PMGI est de 7  $\mu\text{m}$ .

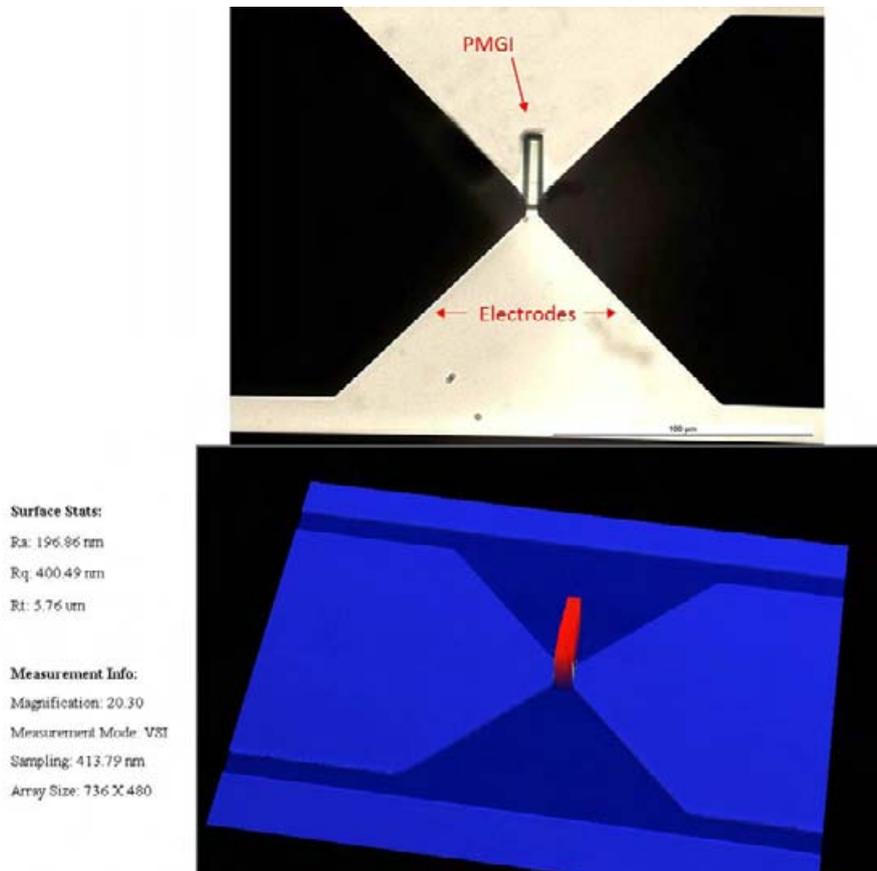


Figure IV.14 L'image de la couche sacrificielle en PMGI sur les électrodes en or ainsi que sa mesure au profilomètre optique

#### 4.4.2 Elaboration des murs des canaux fluidiques en SU-8

Les murs des canaux fluidiques sont ensuite réalisés en SU-8 par photolithographie, dont le procédé est présenté sur la figure IV.15. Une couche épaisse de SU-8 est enduite à la tournette sur la plaquette. A partir des indications du fabricant, la première phase du recuit est exécutée à 65 °C. La température est ensuite montée à 95 °C (à une vitesse de 10 °C.min<sup>-1</sup>), stabilisée pendant une durée dépendante de l'épaisseur du film désirée, puis diminuée à température ambiante avec une vitesse de 5 °C.min<sup>-1</sup>. Ces profils de températures sont présentés sur la figure IV.16.

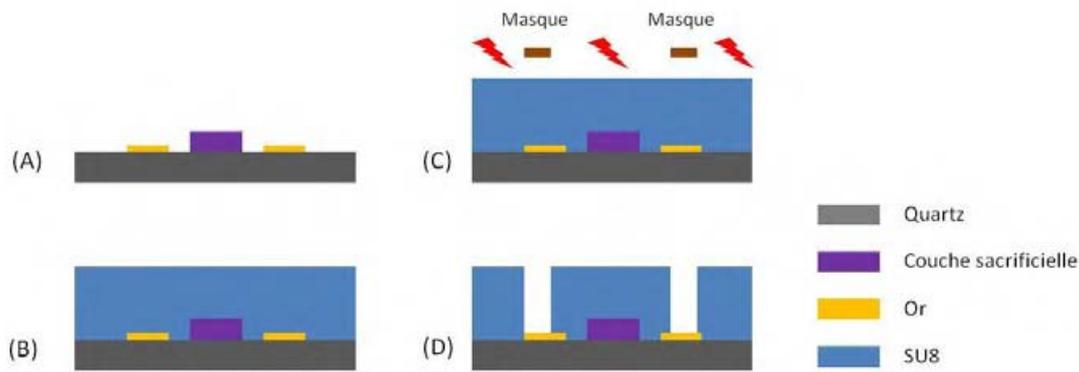


Figure IV.15 Schéma de la structuration de murs des canaux en SU-8.

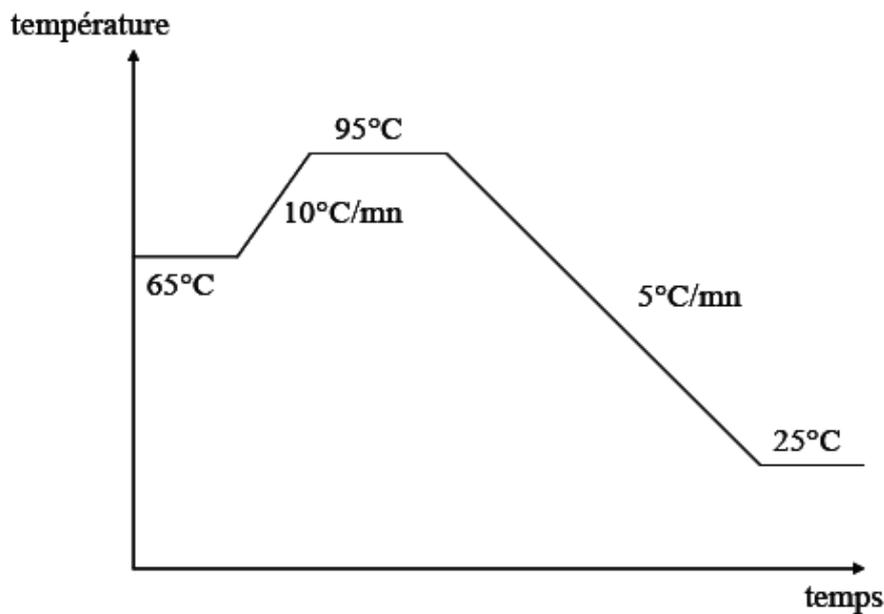


Figure IV.16 Conditions de recuit de la couche SU-8.

La résine est ensuite insolée sous UV, puis réticulée lors d'un second recuit dit Post-Exposure-Bake (PEB). La couche ainsi structurée servira de base à la future canalisation microfluidique.

Diverses canalisations microfluidiques réalisées en SU-8 sont montrées sur la figure IV.17. Les flancs des micro-canaux sont bien définis et présentent un profil vertical, que ce soit pour des canaux larges, moyennement larges ou encore fins. De plus, on peut observer sur la figure IV.17 (C) une vue zoomée d'un piège en SU-8 avec couche sacrificielle en PMGI. Cette

dernière ne correspond pas parfaitement un cube (figure IV.17 C) à cause de la gravure anisotrope du développeur. Mesurée à l'aide du MEB, la partie plus fine de PMGI est d'environ  $5\ \mu\text{m}$ , la partie plus large est de l'ordre de  $7\ \mu\text{m}$ .

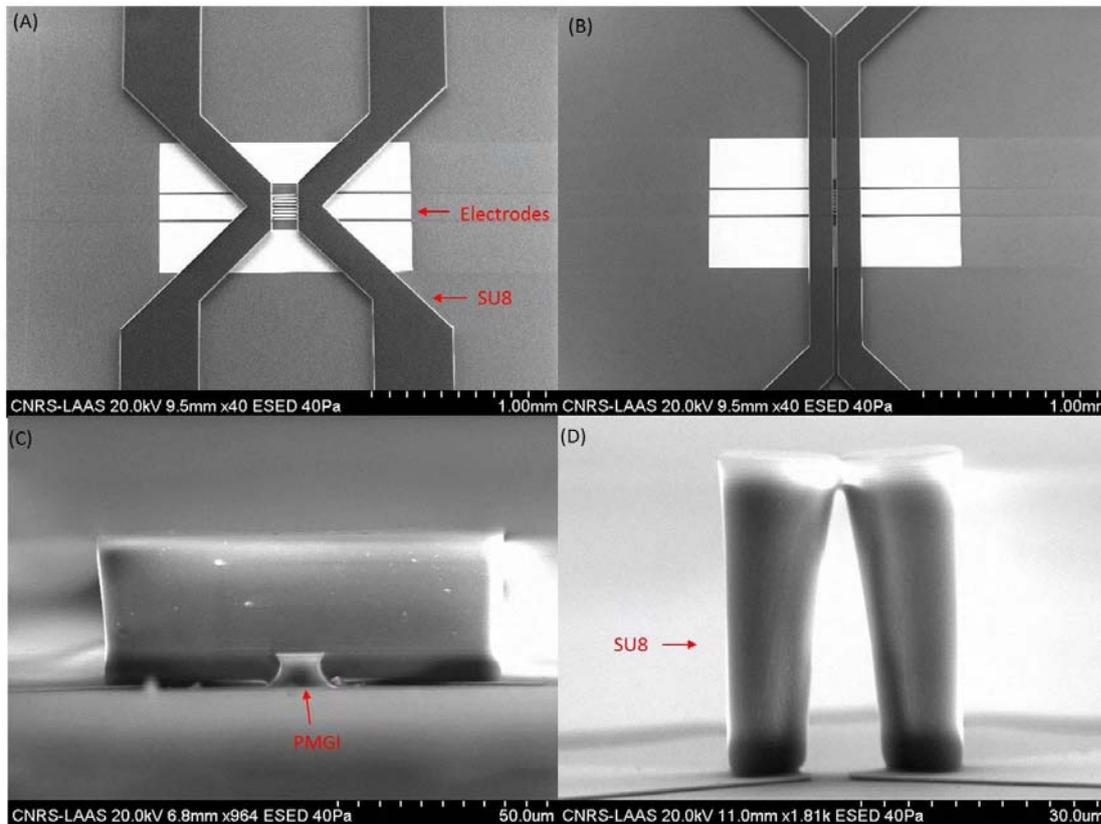


Figure IV.17 Images MEB de différents motifs en SU-8. Canaux en SU-8 situés au-dessus de l'électrode CID avec une largeur de (A)  $150\ \mu\text{m}$  et (B)  $20\ \mu\text{m}$  ; (C) vue zoomée d'un piège en SU-8 avec le motif sacrificiel en PMGI ; (D) motif d'un piège en SU-8 avec un canyon central.

#### 4.4.3 Capotage des canaux fluidiques en SU-8 par laminage

Pour réaliser les canaux microfluidiques hermétiques, il est nécessaire de les fermer. Il y a deux solutions principales proposées pour le capotage d'une structure ouverte en SU-8 : la première solution est de reporter un film déjà épiculé de SU-8 sous une pression de plusieurs bars à une température comprise entre  $100\ ^\circ\text{C}$  et  $120\ ^\circ\text{C}$  [6]. Cette technique nécessite un alignement précis et la résolution est limitée par la qualité de cet alignement. La deuxième méthode consiste à reporter un film sec encore photosensible de SU-8 sur la structure ouverte [7-8]. L'insolation s'effectue donc après le report du film sec au travers d'un substrat transparent aux UV. La précision de la photolithographie constitue un avantage incontestable de la méthode. L'utilisation d'un support flexible pour la couche de SU-8 à capoter,

présentant une faible adhérence avec la SU-8 et transparent aux rayonnements UV, est recommandée. Plusieurs recherches ont été réalisées pour trouver un substrat approprié [9-10]. P. Abgrall, qui a mené ses travaux de thèse au LAAS-CNRS [11], a montré qu'un film en polyester de type PET présente de sérieux avantages : une faible adhérence avec le polymère, une résistance chimique et une compatibilité avec les solvants de la SU-8, ainsi qu'une transparence optique... Notre choix du procédé de fabrication du réseau microfluidique s'est donc porté sur cette deuxième solution avec le laminage d'un film sec encore photosensible, suivi d'une photolithographie.

Le procédé d'élaboration du film sec à capoter est similaire au procédé de fabrication de la structure ouverte en SU-8 illustré sur la figure IV.15. Seuls les paramètres de vitesse de tournette et recuit doivent être modifiés pour faire en sorte d'obtenir une épaisseur de SU-8 de 25 µm. De plus, ce processus technologique est initié par le laminage sur un substrat hôte (en silicium dans notre cas) d'un film adhésif double face suivi de celui d'un film en PET, réalisé par un lamineur qui est composé de deux rouleaux métalliques gainés d'une matière caoutchouteuse. Ces rouleaux peuvent être chauffés et réglés indépendamment l'un de l'autre. La rotation motrice est transmise au rouleau inférieur ; la vitesse de rotation étant un paramètre réglable. Le rouleau supérieur a un degré de liberté en translation verticale permettant deux positions, la séparation ou le contact (avec le rouleau inférieur). La pression de contact est réglable via un robinet alimenté en air pressurisé. Le rouleau supérieur entre en rotation par transmission lors du contact avec le rouleau inférieur. Le lamineur utilisé au laboratoire LAAS est illustré à la figure IV.18.



Figure IV.18 Image du lamineur utilisé dans la salle blanche du LAAS.

Le procédé de laminage d'un film adhésif double face et d'un film PET est illustré à la figure IV.19. Une couche de SU-8 est ensuite enduite, subit un premier recuit, dont la durée est augmentée d'environ 30% par rapport aux indications du fabricant de manière à évaporer un maximum de solvant et éviter que la couche de SU-8 ne flue dans les canaux lors de l'étape de laminage. L'ensemble, film de protection du PET et film sec de SU-8 photosensible, est ensuite pelé du substrat hôte. L'optimisation des conditions d'élaboration de ce film sec photosensible permet un contrôle précis de ses dimensions et en particulier de son épaisseur.

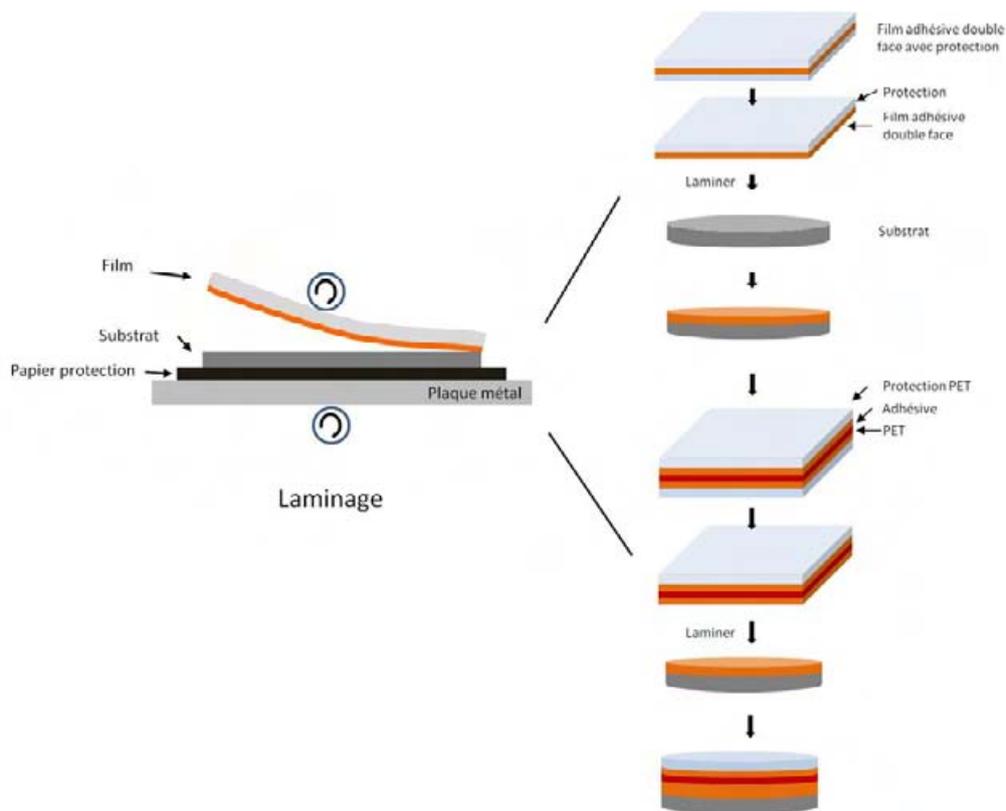


Figure IV.19 Schéma du procédé de préparation du film PET flexible par laminage.

Le procédé de capotage est illustré par la figure IV.20.

Cette couche constitue le ‘plafond’ de la structure. Afin d'améliorer l'adhérence entre les couches de SU-8 (capot laminé et murs des canaux), un traitement au plasma oxygène est préalablement appliqué. Le film flexible de SU-8 est ensuite laminé à une pression fixe et une température située au-dessus de la température de transition vitreuse de la résine SU-8 non réticulée valant 50 °C [12] (cf. Figure IV.20. (C)). A ce stade, on note que la surface est collée de manière homogène, contrairement aux résultats obtenus et reportés dans la littérature qui utilise un support rigide. L'ensemble est ensuite aligné et insolé, comme l'indique la figure IV.20. (D). L'absorbance à 365nm du film de protection est inférieure à la résolution de l'appareil de mesure, soit une valeur inférieure à 0,5%. Il n'est donc pas nécessaire d'augmenter la dose de rayonnement du fait de la présence du film PET. La réticulation est ensuite complétée par un recuit, et le film de protection est alors retiré et la résine développée (cf. Figure IV.20. (E)). Donc les entrées et sorties du fluide sont définies. Un recuit final à 115 °C est éventuellement exécuté afin de compléter la réticulation et de garantir une résistance chimique maximale. En fin de processus, la couche sacrificielle en PGMI est supprimée.

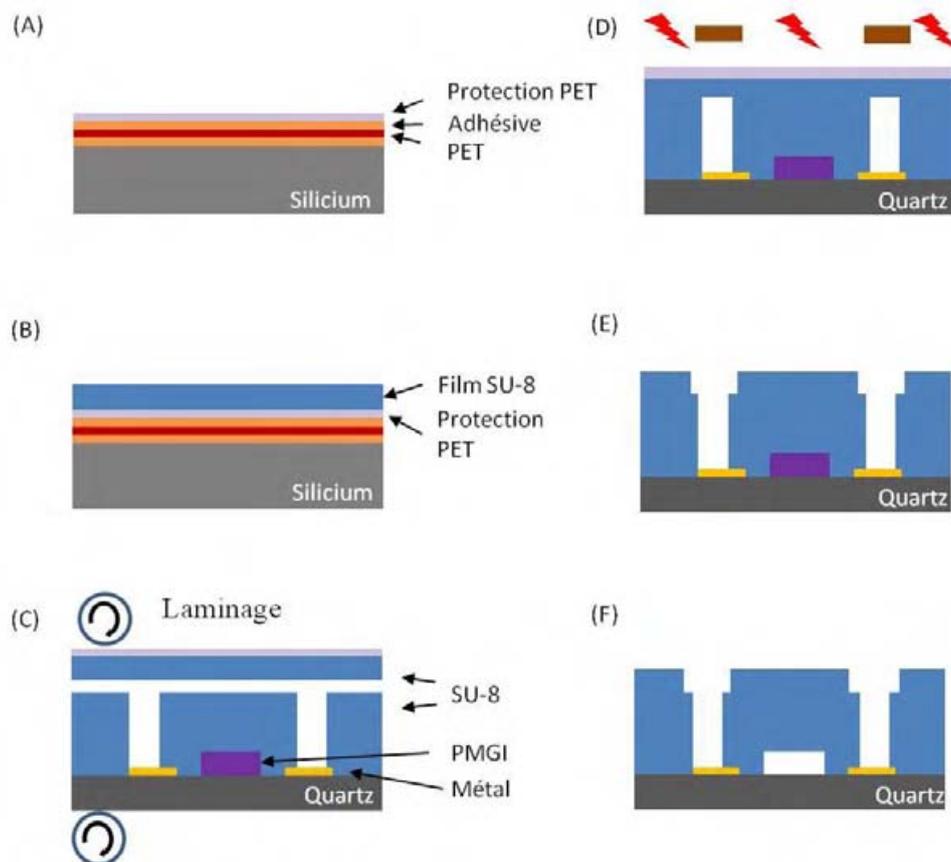


Figure IV.20. Schéma du procédé de capotage avec définition des entrées et sorties fluidiques.

#### 4.4.5 Optimisation des paramètres de capotage

Les canaux fermés doivent avoir les propriétés suivantes : assurer une étanchéité parfaite; garder intact les profils verticaux des canalisations; les capoter sans effet de flambage ou fluage. Sachant que les paramètres de pression, de température de laminage, de température de PEB et le temps d'isolation influencent de façon croisée les profils des canaux fermés et le capot SU-8, nous avons fait plusieurs tests en ne modifiant qu'un paramètre à la fois pour la mise au point de la filière technologique et l'optimisation du procédé de laminage. Les résultats présentés ci-après ont été obtenus pour des structures ayant les caractéristiques principales suivantes: 45  $\mu\text{m}$  de hauteur des parois, 25  $\mu\text{m}$  d'épaisseur du capot, avec des largeurs comprises entre 150  $\mu\text{m}$  et 1mm.

##### 4.4.5.1 Pression de laminage

Nous avons testé 2 pressions: 2 bars et 1.5 bars, et nous avons étudié son influence en fixant la température des rouleaux à  $T=65\text{ }^\circ\text{C}$  et leur vitesse de rotation à  $v=1\text{m/min}$ . Le sens de d'insertion des micro-canaux entre les rouleaux est perpendiculaire. Nous avons trouvé que, lorsque la pression est inférieure à 2 bars, le capot laminé se sépare des parois après développement final. En conséquence, nous avons opté pour une pression de 2 bars.

##### 4.4.5.2 Température de laminage

Nous avons testé la température de laminage sur le profil des canalisations microfluidiques pour des valeurs de pression et de vitesse des rouleaux fixées respectivement à 2 bars et 1m/min. Pour un laminage à température ambiante, une mauvaise adhérence entre les deux niveaux est observée. Entre 50 et 65  $^\circ\text{C}$  (la température de transition vitreuse est égale à 45  $^\circ\text{C}$  avant réticulation de la résine), une bonne adhésion entre le capot et les murs du micro-canal est assuré comme le montrent les photographies MEB de la figure IV.21.

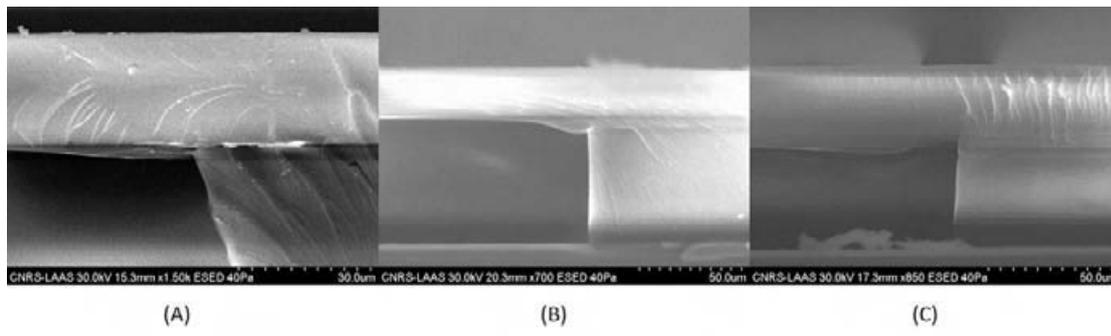


Figure IV.21. Photos de coupes montrant l'effet de la température de laminage sur le profil de capotage: (A) 50 °C, (B) 55 °C et (C) 65 °C.

#### 4.4.5.3 Durée de l'insolation UV

Nous remarquons un gap entre les deux niveaux du canal lorsque la durée de l'insolation UV après le laminage n'est pas suffisante. La partie basse du capot n'est pas réticulée complètement et ne peut donc pas être gravée par le développeur, comme l'indique la figure IV.22. Une durée d'insolation optimisée permet d'éviter ce problème.

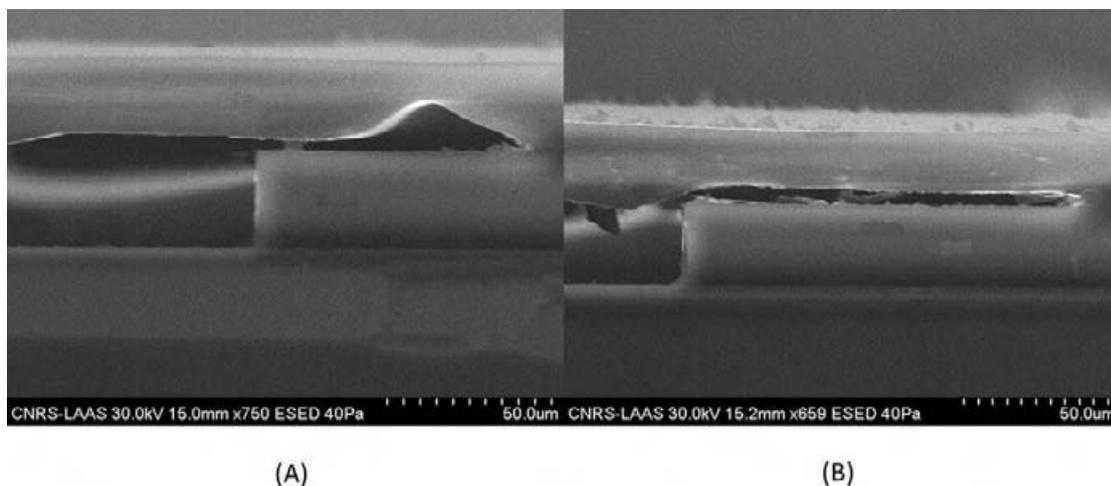


Figure IV.22. Effet d'une durée d'insolation trop courte sur la section de canaux.

#### 4.4.5.4 Température de second recuit (PEB)

La résine insolée peut devenir visqueuse au cours de sa réticulation, lors du second recuit. La température a alors un double rôle : celui d'accélérer la réticulation, mais aussi de faciliter le fluage de la couche SU-8 tant que celle-ci n'est pas suffisamment réticulée. Nous avons

notamment observé un énorme fluage du capot dans le canal après le second recuit avec une température de PEB de 95 °C, comme indiqué sur la figure IV.23.

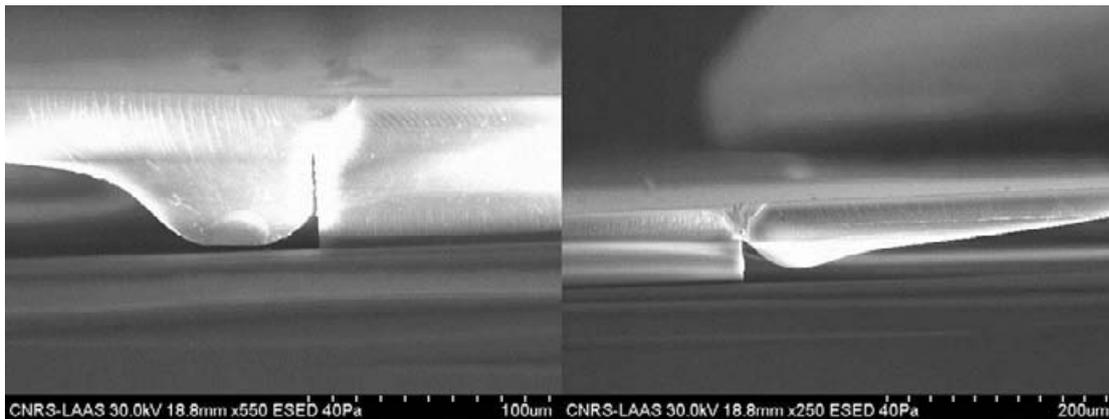


Figure IV.23. Le fluage dans les canaux avec la température de PEB à 95 °C.

Avec une optimisation de la température de PEB, ce phénomène de fluage peut être drastiquement diminué, comme c'est le cas sur les photos de la figure IV.24.

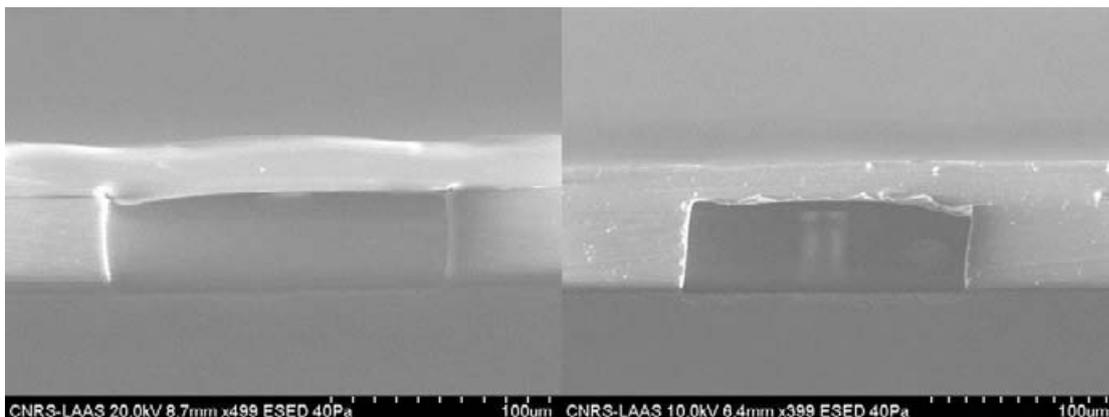


Figure IV.24. Photos en vue en coupe de canaux avec une température de PEB optimisée.

#### 4.4.6 Observation des structures réalisées avec canaux et piège en SU-8 pour cellule unique

Le procédé technologique mis au point a été appliqué avec succès. La section d'un canal microfluidique entièrement réalisé en SU-8 sur circuit HF est montré sur la figure IV.25. Les canaux et pièges sont correctement élaborés. Avec les figures IV.25 (A) et (B), nous pouvons observer le passage sous le piège après l'enlèvement de la couche PMGI, qui est de l'ordre de

5,5  $\mu\text{m}$  de haut. De plus, la largeur du passage de fluide sous le piège n'est pas uniforme à cause de la gravure anisotrope humide de la couche sacrificielle. Les pièges sont bien définis et présentent une erreur d'alignement inférieure à  $2\mu\text{m}$ . Notons qu'il existe une petite déformation (de 6 à  $8\mu\text{m}$ ) du capot autour de la jonction du piège avec le capot (cf. Figure IV.25 (C) et (D)), qui peut être optimisée éventuellement en modifiant légèrement les paramètres de laminage.

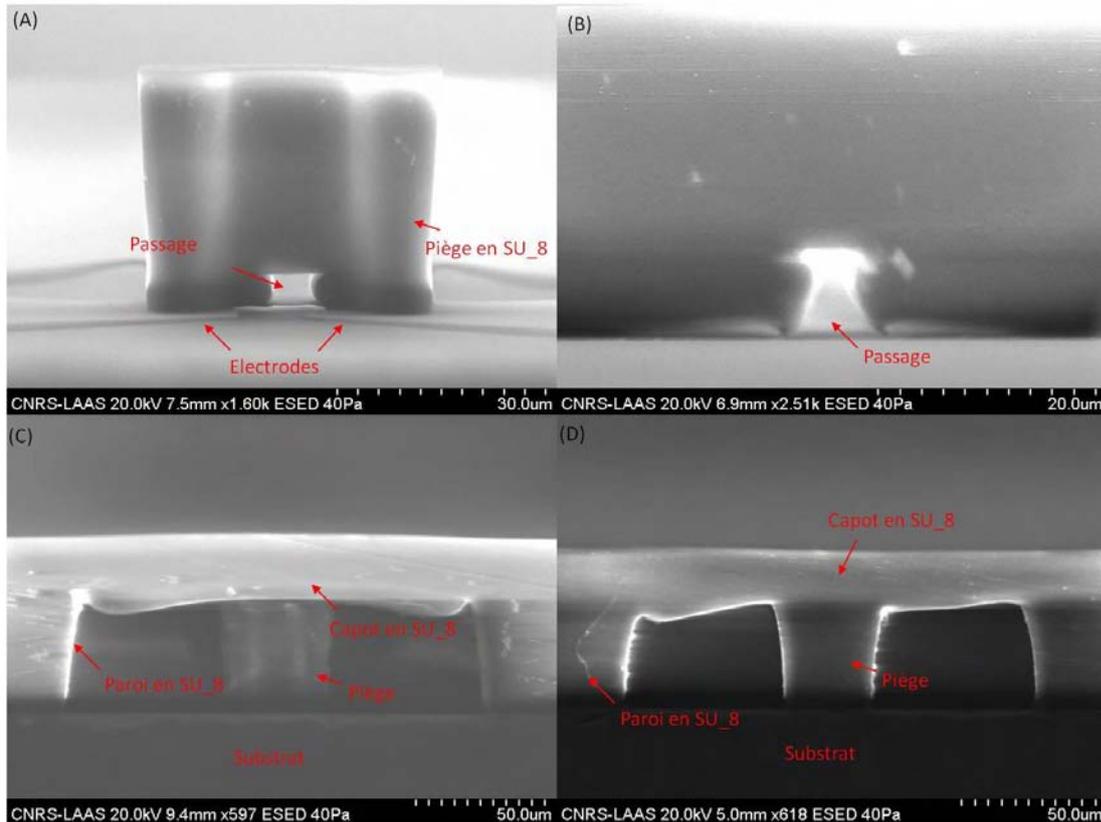


Figure IV.25. Images MEB des canaux en SU-8 avec pièges.

## 5. Caractérisation avec des cellules

### 5.1 Comparaison avec la technologie du chapitre III

Nous avons tout d'abord mesuré nos nouveaux dispositifs avec des cellules de lymphome B vivantes. Les cellules sont suspendues dans leur milieu de culture (RPMI+10%SVF) avec une concentration de 1 million de cellules /ml. Après avoir au préalable mesuré le dispositif

avec du milieu de culture seul, sans cellules, nous avons injecté la suspension de cellule avec un flux de vitesse 5mm/s jusqu'à obtenir le piégeage d'une cellule.

Compte tenu des optimisations des pièges, les diverses expériences de piégeage menées se sont révélées être 4 à 5 fois plus efficace qu'avec la structure du chapitre III. Nous sommes passés de 12 $\mu$ l consommé avec les composants en PDMS à 3 $\mu$ l avec nos nouvelles structures. Notons que cette quantité de 3 $\mu$ l représente le minimum à injecter pour remplir nos composants et qu'il n'est donc plus nécessaire de pousser les optimisations.

La figure IV.26 présente les contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  d'une cellule vivante mesurée par le dispositif présenté au chapitre III et par notre nouveau composant. Afin de permettre la comparaison, nous présentons les résultats pour une capacité de gap=10 $\mu$ m. Les contrastes obtenus par les 2 composants sont non-significativement différents, le faible écart s'explique par des composants, certes de conception identique, ce qui vient se rajouter à la variabilité biologique toujours présente.

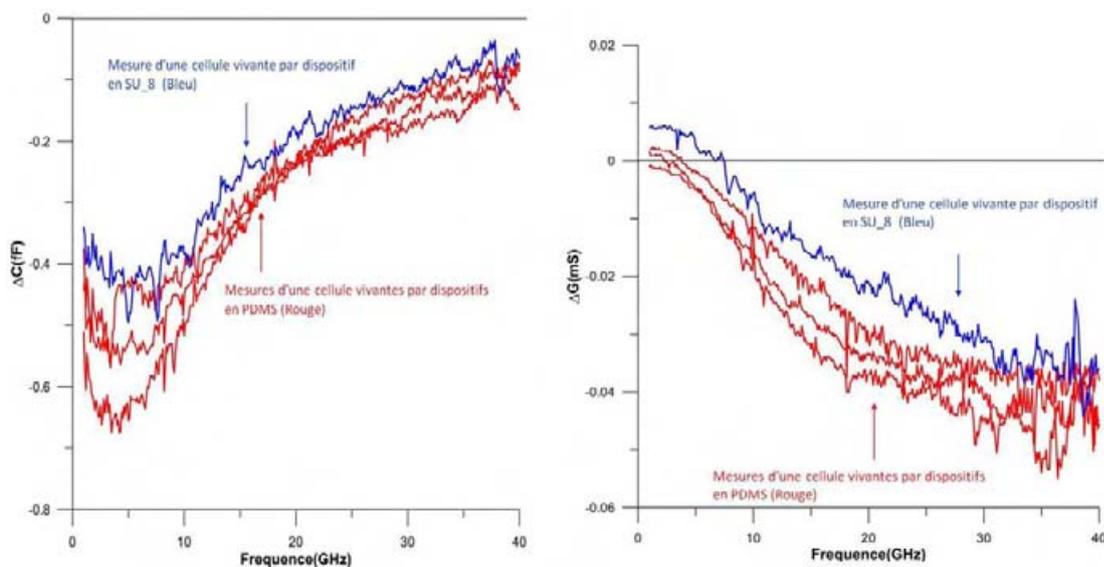


Figure IV.26. Contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  d'une cellule vivante mesurée par le nouveau dispositif (en SU 8) et le composant présenté au chapitre III (en PDMS).

## 5.2 Impact de la diminution du gap de capacité de détection

Nous avons déjà discuté l'ingénierie du détecteur au paragraphe 2 de ce chapitre : afin d'obtenir des valeurs de contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  plus importantes, nous avons diminué le gap de

la capacité de détection de  $10\ \mu\text{m}$  à  $5\ \mu\text{m}$ . Le protocole de mesure d'une cellule vivante restant le même, la figure IV.27 présente les spectres de  $\Delta C$  et  $\Delta G$  d'une cellule vivante mesurée par le dispositif en SU-8 avec une capacité de  $10\ \mu\text{m}$  de gap puis de  $5\ \mu\text{m}$ . Comme prévue par les simulations du paragraphe 2, une augmentation des contrastes résulte d'une diminution du gap de la capacité d'analyse.

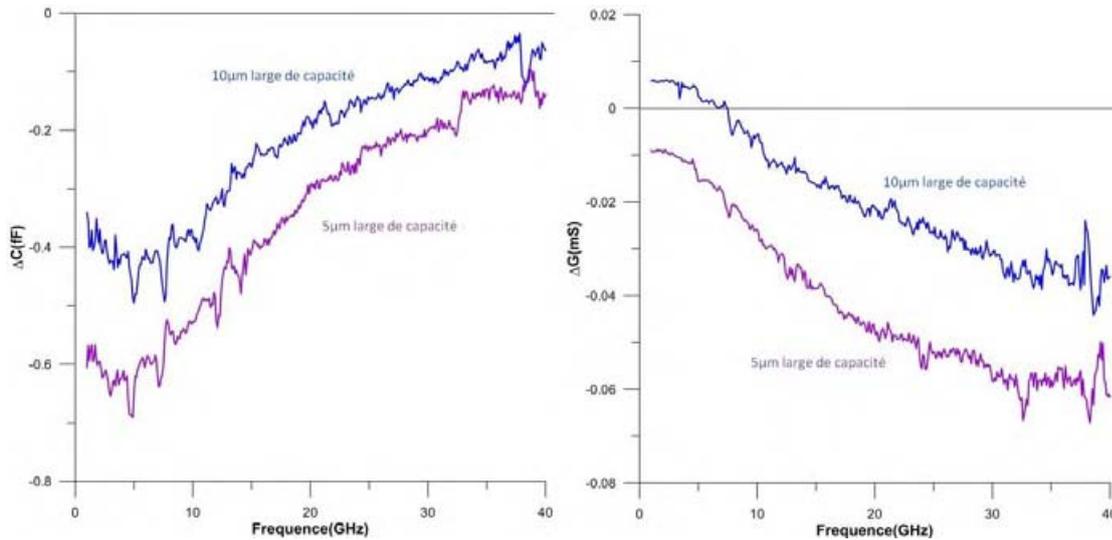
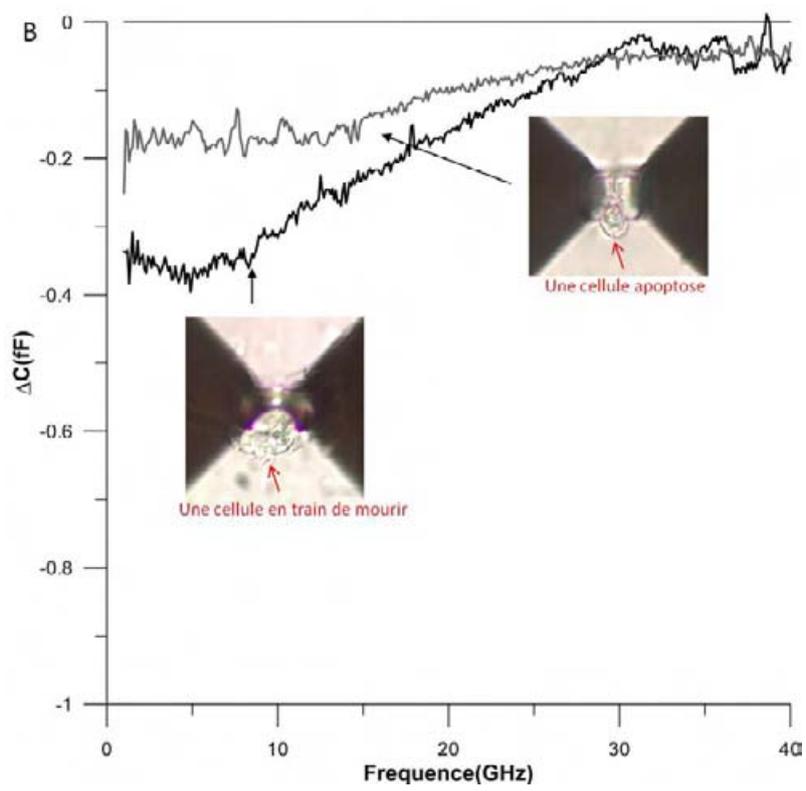
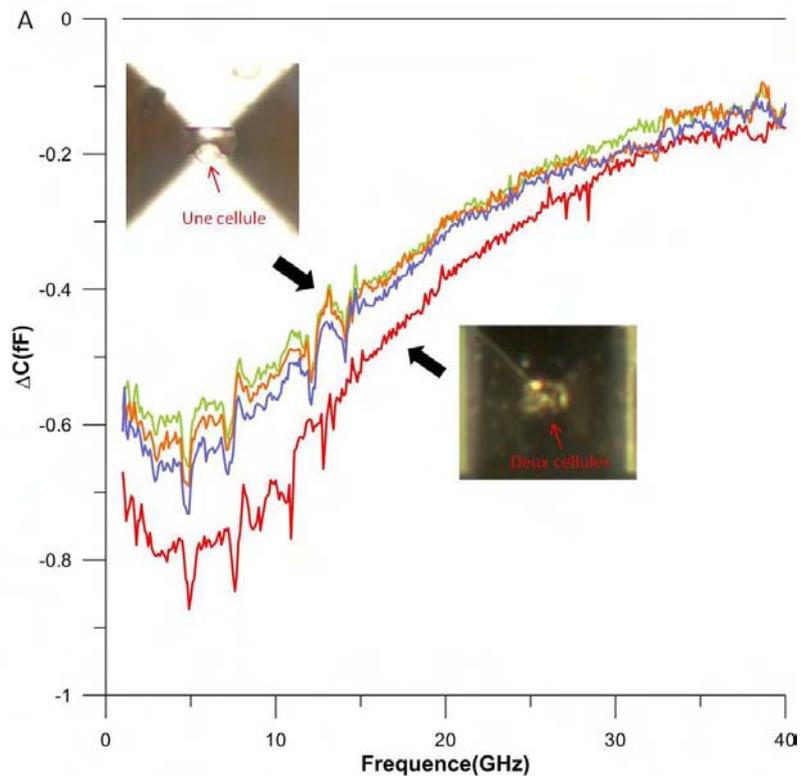


Figure IV.27. Contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  d'une cellule vivante mesurée par le dispositif en SU-8 avec une capacité de  $10\ \mu\text{m}$  de gap puis de  $5\ \mu\text{m}$ .

### 5.3 Mesures de cellules vivante et morte

Les nouveaux composants en SU-8 avec une capacité de  $\text{gap}=5\ \mu\text{m}$  ont été utilisés pour mesurer une cellule vivante et aussi une cellule morte.

Pour obtenir la mort cellulaire, nous avons utilisé une solution de 'saponine' qui présente une activité hémolytique, agissant sur la perméabilité des membranes [13] et donc tuant les cellules. Les contrastes sont toujours extraits par rapport au même milieu de référence : le RPMI+10%SVF. La figure IV.28 (A) présente les contrastes  $\Delta C$  quand une cellule vivante est bloquée et (B) lorsque une cellule morte est bloquée. La figure IV.28(C) (D) présente les contrastes  $\Delta G$  dans ces 2 situations.



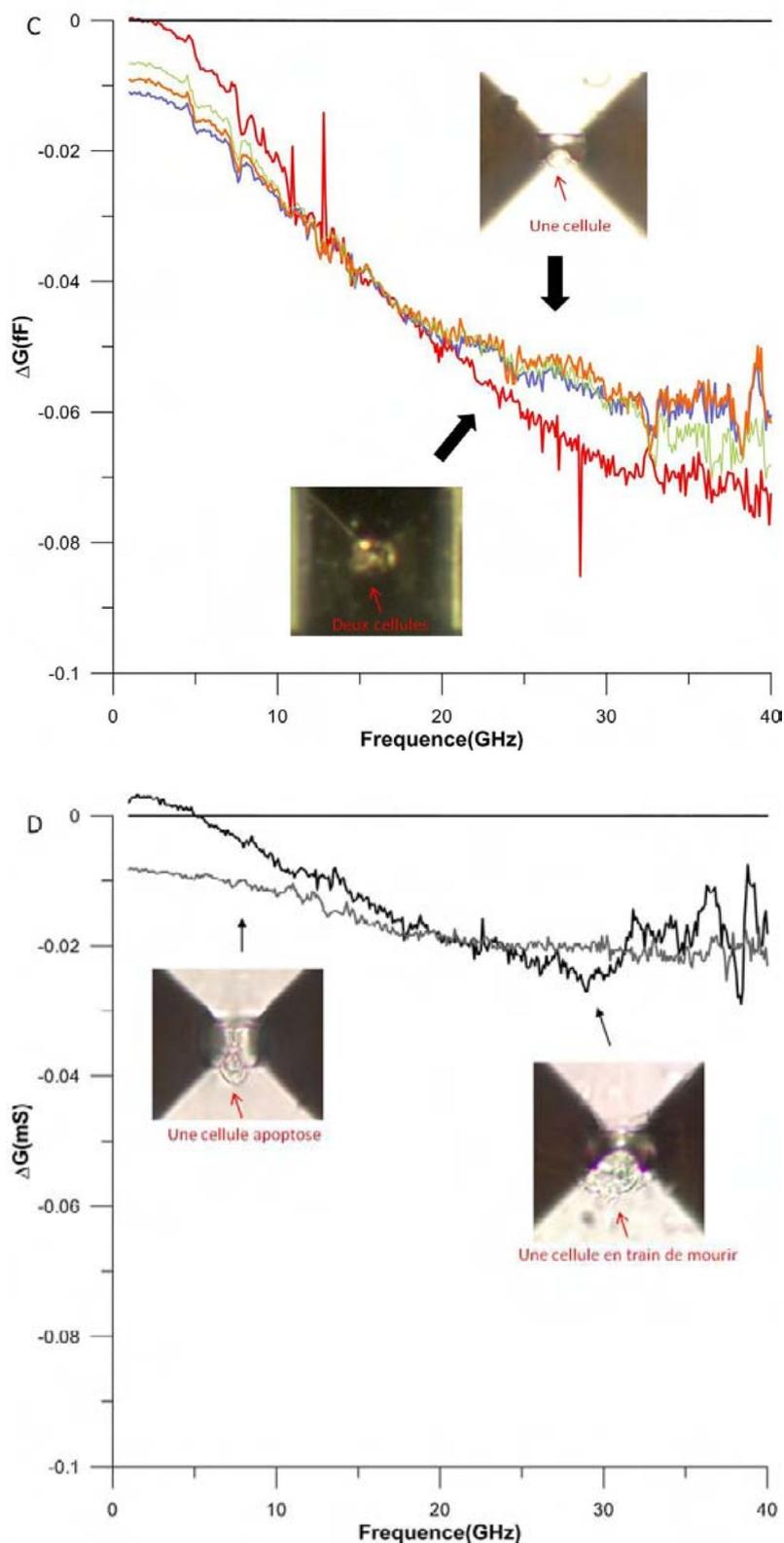


Figure IV.28. Nouveau dispositif en SU-8 avec capacité de détection à gap=5  $\mu\text{m}$  : (A) contrastes  $\Delta C$  d'une cellule vivante bloquée (3 mesures) et avec deux cellules bloquées; (B)  $\Delta C$  avec une cellule morte et avec une cellule en train de mourir; (C) les spectres  $\Delta G$  dans la même situation que pour (A); (D) Les spectres  $\Delta G$  dans la même situation que pour (B).

Nous pouvons observer une diminution significativement des contrastes  $\Delta C$  et  $\Delta G$  lorsque les cellules sont mortes par rapport à la situation où elles sont vivantes. On retrouve ainsi le même résultat que celui obtenu au chapitre 3.

Le tableau IV synthétise les différentes valeurs de contrastes  $\Delta C$  à 5GHz et  $\Delta G$  à 40GHz. Il est important de noter que le rapport de  $\Delta C$  entre cellule vivante et morte vaut 2.5 à 2.6 et ce, quel que soit le composant (gap capacitif 5 ou 10 $\mu\text{m}$ ). Il en est de même pour  $\Delta G$  pour lequel le rapport est voisin de 2,7-2,8.

TABLEAU IV

Largeur	Cellule vivante		Cellule apoptose	
	10 $\mu\text{m}$	5 $\mu\text{m}$	10 $\mu\text{m}$	5 $\mu\text{m}$
$\Delta C$ (fF) à 5GHz	-0,45fF	-0,65fF	-0,18fF	-0,25fF
$\Delta G$ (mS) à 40GHz.	-0.05mS	-0.07mS	-0.018mS	-0.025mS

Des caractérisations complémentaires ont été effectuées afin d'évaluer la reproductibilité des mesures HF réalisées sur nos composants "cellule unique". Le bilan des résultats en termes de  $\Delta C$  à 5GHz et  $\Delta G$  à 40GHz avec des cellules vivantes ou mortes est présenté à la figure IV.29. La dispersion entre cellules de même état pathologique (vivant ou mort) reflète la variabilité biologique intrinsèque d'une population de cellule (cycle cellulaire, diamètre, état apoptotique...). Malgré cette variabilité, une différence significative entre cellules vivantes et mortes est obtenue, démontrant ainsi l'aptitude de la technique pour caractériser la viabilité cellulaire, de façon non invasive, sans marquage ni préparation préalable.

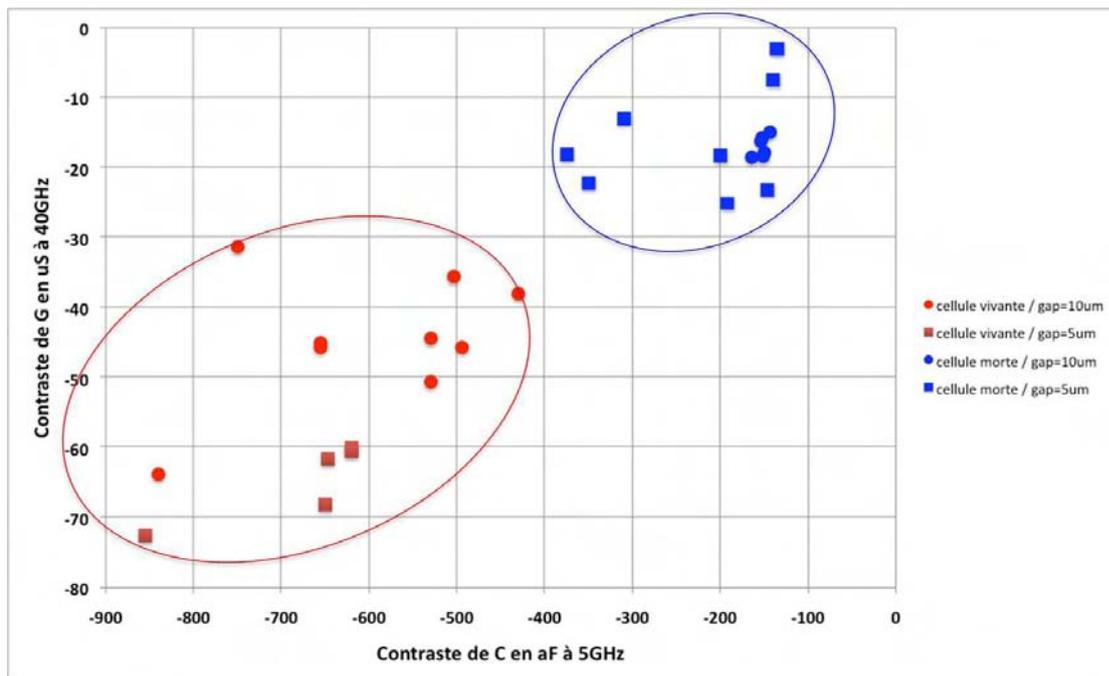


Figure IV.29. Cellules vivantes et mortes dans le plan ( $\Delta C$  à 5GHz,  $\Delta G$  à 40GHz) pour 2 dispositifs de gap=5  $\mu\text{m}$  et 10  $\mu\text{m}$ .

## 6. Conclusions

D'un point de vue technologique, une nouvelle filière technologique a été mise en place et permet la réalisation complète de circuits métallisés hyperfréquences sur substrat en quartz avec des canaux fluidiques entièrement obtenus avec des techniques de fabrication collective. Les canaux fluidiques sont réalisés dans le matériau SU-8, particulièrement adapté pour cette application. De plus, le blocage de cellule pour la mesure de cellule unique a également été intégré par technologies collectives avec succès. Pour cela, une technologie basée sur l'utilisation d'une couche sacrificielle en PMGI a été élaborée et adaptée aux contraintes induites par la fabrication des micro-canaux fluidiques en SU-8. Enfin, l'utilisation de technologie collective permet de s'affranchir de toute difficulté inhérente à un report de canal de façon manuelle. En conséquence, nous avons pu encore diminuer les dimensions du circuit HF (par rapport au chapitre III) avec une zone capacitive de détection de gap=5  $\mu\text{m}$  uniquement, qui permet d'augmenter le contraste de mesure et de minimiser l'impact de la taille des cellules. Enfin, l'optimisation hydrodynamique des pièges à cellules permet

d'augmenter l'efficacité de piégeage d'au moins un facteur 4 par rapport au précédent bloqueur réalisé en PDMS.

L'optimisation du dispositif afin d'obtenir de meilleurs contrastes et une meilleure efficacité de piégeage a été validée expérimentalement. Ainsi le nouveau dispositif permet d'obtenir des contrastes 40% plus élevés qu'avec le composant présenté au chapitre III. Ce gain se retrouvera ainsi sur le pouvoir discriminant du détecteur ce qui est donc notable. De plus, l'efficacité de piégeage est optimale ce qui nous permet de procéder à nos expériences de manière la plus optimale possible. Enfin, des expérimentations complémentaires sont en cours afin de vérifier :

- la robustesse du nouveau dispositif vis à vis du diamètre des cellules,
- la meilleure reproductibilité des expérimentations du fait de la technologie.

## Bibliographies du chapitre IV:

- [1] H. Wu, T.W. Odom, D.T. Chiu, G.M. Whitesides, Fabrication of Complex Three-Dimensional Microchannel Systems in PDMS, *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 554, 2003.
- [2] J. Zhang, K.L. Tan and H.Q. Gong , Characterization of the polymerization of SU-8 photoresist and its applications in micro-electro-mechanical systems (MEMS) *Polymer Testing* 20 693-701; 2001.
- [3] Y.J. Chuang et al, A novel fabrication method of embedded micro-channels by using SU-8 thick-film photoresists, *Sensors and Actuators A* 103, 64-69; 2003.
- [4] M. Hennemeyer, F. Walther, S. Kerstan, K. Schürzinger, A. M. Gigler, R. W. Stark, “Cell proliferation assays on plasma activated SU-8”, *Microelectr. Eng.* 85, 1298-1301; 2008.
- [5] I.G. Foulds et al, Polydimethylglutarimide (PMGI) as a sacrificial material for SU-8 surface-micromachining, *J. Micromech. Microeng.* 18 075011, 2008.
- [6] F.J. Blanco, M. Agirregabiria, J. Garcia, J. Berganzo, M. Tijero, M.T. Arroyo, J.M. Ruano, I. Aramburu and K. Mayora, Novel three-dimensional embedded SU-8 microchannels fabricated using a low temperature full wafer adhesive bonding *Journal of Micromechanics and Microengineering* 14 1047-56; 2004.
- [7] R.J. Jackman, T.M. Floyd, R. Ghodssi, M.A. Schmidt and K.F. Jensen, Microfluidic systems with on-line UV detection fabricated in photodefinable epoxy *Journal of Micromechanics and Microengineering* 11 263-9; 2001.
- [8] M.C. Cheng, A.P. Gadre, J.A. Garra, A.J. Nijdam, C. Luo, T.W. Schneider, R.C. White, J.F. Currie and M. Paranjape, Dry release of polymer structures with anti-sticking layer *Journal of Vacuum Science & Technology A* 22 837-41; 2004.
- [9] S. Tuomikoski and S. Franssila, Free-standing SU-8 microfluidic chips by adhesive bonding and release etching *Sensors and Actuators a-Physical* 120 408-15, 2005.
- [10] D. Haefliger, M. Nordstrom, P.A. Rasmussen and A. Boisen, Dry release of all-polymer structures *Microelectronic Engineering* 78-79 88-92; 2005.
- [11] P. Abgrall, C. Lattes, V. Conedera, X. Dollat, S. Colin and A.M. Gue, A novel fabrication method of flexible and monolithic 3D microfluidic structures using lamination of SU-8 films *Journal of Micromechanics and Microengineering* 16 113-21; 2006.
- [12] R. Feng, R.J. Farris, Influence of processing conditions on the thermal and mechanical properties of SU8 negative photoresist coatings, *J. Micromech. Microeng.*, 13, 80, 2003.
- [13] Saponine, Wikipedia, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Saponine>.



# Conclusion générale

Nos travaux de thèse ont porté sur le développement d'une technique et d'une technologie associée de spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellules en suspension et jusqu'à la cellule unique. La force de cette approche est de permettre d'analyser la ou les cellule(s) dans leur milieu de culture sans marquage ni préparation préalable, de façon non-invasive et sans contact entre détecteur et cellules. De plus, la technique est intégrable par les microtechnologies, ce qui assure sa miniaturisation pour (1) son utilisation avec des objets biologiques à analyser jusqu'à quelques microns, (2) son utilisation au sein de laboratoire sur puce par exemple et (3) la forte parallélisation des analyses (microtechnologie=fabrication collective) ouvrant des perspectives pour des applications de criblage.

Nos travaux de recherche se sont organisés en deux phases de complexité graduelle.

Un microsystème de spectroscopie diélectrique hyperfréquence de liquides biologiques et de cellules en suspension a tout d'abord été abouti. L'aboutissement d'un tel démonstrateur nécessita de développer la conception électromagnétique du circuit détecteur, l'intégration par les microtechnologies des parties HF et fluïdique, l'extraction de paramètres électriques pertinents. Fort de ce démonstrateur, nous avons pu démontrer la bonne sensibilité de détection, le potentiel de discrimination de solutés en solution aqueuse, la discrimination d'états biologiques (certes tranchés : vie/mort) de cellules en suspension dans leur milieu de culture. Ces résultats apportent la preuve au concept « d'analyse hyperfréquence du contenu et de l'état biologique de cellules » [3-6, 8-9].

Tirant pleinement profit des capacités de miniaturisation des microtechnologies, nous avons dans un second temps réduit en taille ce démonstrateur pour aboutir à l'analyse d'une cellule unique. Outre la convergence des expertises en conception hyperfréquence, microtechnologies et expérimentations hyperfréquences, nous avons aussi considéré l'aspect hydrodynamique du piégeage d'une cellule dans un micro-canal [1]. Deux technologies de complexité croissante ont été successivement mises au point et ont permis, pour la première fois à notre connaissance :

- d'acquérir le spectre diélectrique hyperfréquence d'une cellule unique [6],

- de montrer des différences significatives entre une cellule vivante et une cellule morte.

Nos travaux ont ainsi permis de franchir une étape importante : la spectroscopie diélectrique d'une cellule unique dans son milieu de culture est possible et l'on peut clairement identifier sur les réponses électriques si la cellule est vivante ou morte. De nombreux travaux restent néanmoins à faire pour une utilisation fonctionnelle de cette technique par les biologistes : comprendre et exploiter l'ensemble des spectres mesurés, discriminer des états biologiques plus fins que vie/mort, améliorer la sensibilité et la sélectivité l'intégration en associant des circuits pour le traitement des signaux hyperfréquences [2], ...

Les applications de cette technique «hyperfréquence-microfluidique » pour le domaine de cancérologie sont pressenties [9], nos études contribuant à en établir les bases. Nos travaux ont toujours été menés dans cet esprit de part notre étroite collaboration avec Mary Poupot et Jean-Jacques Fournié du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse.

Puisse un jour cette technique «hyperfréquence pour l'analyse de cellule unique» contribuer aux recherches contre le cancer.

## **Publications de nos travaux de recherche**

### Congrès nationaux

- [1] T. Chen et al, Dielectrophoretic Capture of single cell for Microwave Bio-analysis, Journées Nationales du Réseau Doctoral en Microélectronique (JNRDM 2011), Paris (France), 23-25 Mai 2011.
- [2] T.Chen et al, Bio-capteur hyperfréquence dédié à la spectroscopie diélectrique micro-onde d'une cellule biologique unique et vivante dans son milieu de culture, JNM2013(soumission)

### Congrès internationaux

- [3] K.Grenier, D.Dubuc, T.Chen, T.Chretiennot, M.Poupot, J.J.Fournie, Microfluidic on-chip for biomedical applications,IEEE Bipolar/BiCMOS Circuits and Technology Meeting, Atlanta (USA), 9-11 Octobre 2011, pp.129-132.
- [4] T.Chen, D.Dubuc and K.Grenier, Accurate Nanoliter Liquid Complex Admittance Characterization up to 40 GHz for Biomedical Applications, IEEE- IMS2012 p1-3, 2012.
- [5] T.Chen, D.Dubuc and K.Grenier, Resonant-based Microwave Biosensor for Physiological Liquid Identification, IEEE-EMW2012, 2012.
- [6] T. Chen, D. Dubuc, M. Poupot, J-J. Fournié & K. Grenier 'Broadband discrimination of living and dead lymphomas cells with a microwave interdigitated capacitor', IEEE Biowireless, Austin, USA, Jan. 2013
- [7] K. Grenier, D. Dubuc, T. Chen, F. Artis, M. Poupot, J-J. Fournié 'Microwave dielectric spectroscopy: an emerging analyzing technique for biological investigations at the cellular level', invited paper at IEEE Biowireless, Austin, USA, Jan. 2013.
- [8] T. Chen, F.Artis et al, Microwave biosensor dedicated to the dielectric spectroscopy of a single alive biological cell in its culture medium, IMS2013.(soumission )

### Revue internationale

- [8] T.Chen, K.Grenier, D.Dubuc, Long-time hydrophilization and bonding ability of PEG grafted PDMS microchannels for microfluidic applications, Sensors and Actuators B: Chemical. (Submitted)
- [9] T.Chen, K.Grenier, D.Dubuc, M.Poupot, J.J.Fournie, Accurate Nanoliter Liquid Characterization up to 40GHz for Biomedical Applications: Toward Non-invasive Living Cells Monitoring, IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques. (Accepted)
- [10] K. Grenier, D. Dubuc, T. Chen, F. Artis, T. Chretiennot, M. Poupot, J-J. Fournié 'Recent advances in Microwave-based Dielectric Spectroscopy at the Cellular Level for Cancer Investigations', invited paper at Biomedical Applications of RF/Micro. Tech. Special Issue of IEEE T-MTT, 2013, under peer-review

## Summary:

### Development of microwave microfluidic bio-sensors for non-invasive dielectric spectroscopy of single cell: Applications in Cancerology

Biological analysis at the level of the single cell, allowing the understanding of cellular mechanisms, is of great importance in the fields of biology, medicine and especially in oncology. Microtechnology has opened up the prospect of such devices and many researches are underway on the development of analysis systems which are non-invasive, rapid, label-free or has no cell damage. The convergence of bio-microwave sensors with microfluidics can meet these challenges.

We developed jointly (1) micro-devices for microwave dielectric spectroscopy of biological fluids and (2) microfluidic systems for manipulation of cell populations and single cell in the culture medium. The electromagnetic fields engineering was conducted to optimize the fluid volume analysis and the detection sensitivity. Microfabrication performed at LAAS-CNRS allowed controlled positioning of single cell in the analysis area. We finally demonstrated experimentally significant dielectric contrast between cancer cells alive and RL lymphoma apoptosis with more tracking capability longitudinal of apoptosis.

These researches work on non-invasive analysis of single cell, the discriminatory capacity of different biological states, the possibility of temporal tracking of biological mechanisms open new perspectives for the cell analysis in cancerology.

**Keywords:** biology, single cell, microwave, biosensor, dielectric spectroscopy, microfluidic, cancerology.