

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2009

Thèse N° 49-2009

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : “Electronique des Hautes Fréquences et Optoélectronique”

présentée et soutenue par

Claire DALMAY

le 23 Octobre 2009

**Conception et réalisation de bio-capteurs
électromagnétiques pour l'analyse cellulaire aux
fréquences micro-ondes**

Thèse dirigée par Arnaud POTHIER et Pierre BLONDY

JURY :

Rapporteurs :

Monsieur D. REBIÈRE

Professeur, IMS, Bordeaux

Monsieur V. SENEZ

Directeur de recherche CNRS, IEMN, Lille

Examineurs :

Monsieur C. BERGAUD

Directeur de recherche CNRS, LAAS, Toulouse

Monsieur P. LÉVÊQUE

Chargé de recherche, CNRS, XLIM, Limoges

Madame V. MADRANGEAS

Professeur, XLIM, Limoges

Monsieur A. TREIZEBRE

Maitre de conférences, IEMN, Lille

Monsieur P. BLONDY

Professeur, XLIM, Limoges

Monsieur A. POTHIER

Chargé de recherche CNRS, XLIM, Limoges

Invités :

Monsieur J. BREVIER

Maitre de conférences, XLIM, Limoges

Madame M-O. JAUBERTEAU

Professeur, HCP, Limoges

Monsieur F. LALLOUÉ

Maitre de conférences, HCP, Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE Science – Technologie – Santé

FACULTE DES SCIENCES ET TECHNIQUES

Année : 2009

Thèse N° 49-2009

Thèse

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LIMOGES

Discipline : “Electronique des Hautes Fréquences et Optoélectronique”

présentée et soutenue par

Claire DALMAY

le 23 Octobre 2009

**Conception et réalisation de bio-capteurs
électromagnétiques pour l'analyse cellulaire aux
fréquences micro-ondes**

Thèse dirigée par Arnaud POTHIER et Pierre BLONDY

JURY :

Rapporteurs :

Monsieur D. REBIÈRE

Professeur, IMS, Bordeaux

Monsieur V. SENEZ

Directeur de recherche CNRS, IEMN, Lille

Examineurs :

Monsieur C. BERGAUD

Directeur de recherche CNRS, LAAS, Toulouse

Monsieur P. LÉVÊQUE

Chargé de recherche, CNRS, XLIM, Limoges

Madame V. MADRANGEAS

Professeur, XLIM, Limoges

Monsieur A. TREIZEBRE

Maitre de conférences, IEMN, Lille

Monsieur P. BLONDY

Professeur, XLIM, Limoges

Monsieur A. POTHIER

Chargé de recherche CNRS, XLIM, Limoges

Invités :

Monsieur J. BREVIER

Maitre de conférences, XLIM, Limoges

Madame M-O. JAUBERTEAU

Professeur, HCP, Limoges

Monsieur F. LALLOUÉ

Maitre de conférences, HCP, Limoges

À mes grands parents,

À mes parents, à mon frère,

À mon fiancé.

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué à l'Institut de Recherche XLIM, au sein du département Micro et Nanotechnologies pour composants Optoélectroniques et Micro-ondes (MINACOM).

Je tiens à exprimer ma profonde gratitude à Monsieur le professeur **D. Cros**, Directeur d'XLIM., de m'avoir accueilli au sein de son laboratoire ainsi qu'aux professeurs **S. Verdeyme** et **V. Madrangeas** pour m'avoir permis de mener mes travaux de thèse au sein du département MINACOM.

Je remercie également Madame le professeur **V. Madrangeas**, responsable du département MINACOM, pour l'honneur qu'elle me fait en acceptant aujourd'hui de présider le jury de cette thèse.

J'exprime mes profonds remerciements à Monsieur le professeur **D. Rebière** du Laboratoire IMS de l'Université de Bordeaux et à Monsieur **V. Senez** de l'IEMN de Lille pour l'intérêt qu'ils ont porté à ces travaux en acceptant de les rapporter.

Je tiens à remercier le laboratoire d'Homéostasie cellulaire et Pathologies de l'Université de Limoges et plus particulièrement Madame le professeur **M-O. Jauberteau** et Monsieur **F. Lalloué** pour leur accueil au sein de l'équipe ainsi que pour leur participation à ce jury. Nos échanges fructueux et votre enthousiasme nous ont permis de mener à bien ces travaux. Je tiens également à associer **Mathilde Cheray** à ces remerciements pour son investissement et son aide si précieux au cours des phases de validations biologiques.

Je témoigne ma reconnaissance à Monsieur **C. Bergaud**, Directeur de recherche CNRS au LAAS à Toulouse, à Monsieur **A. Treizebré**, Maître de Conférences à l'IEMN de Lille, à Monsieur **P. Lévêque**, Chargé de recherche CNRS à l'institut de recherche XLIM de Limoges et à Monsieur **J. Brevier**, Maître de Conférences à l'institut de recherche XLIM d'avoir accepté d'examiner ce mémoire et de participer à ce jury.

J'adresse mes plus vifs remerciements à Monsieur le professeur **P. Blondy** et à Monsieur **A. Pothier**, pour ces trois années passées à leur côté. Un grand merci pour toute la

confiance et le soutien que vous m'avez témoignés, pour le partage de votre culture scientifique et de votre savoir faire technologique. Je demeure convaincue qu'un bon apprentissage passe obligatoirement par un excellent encadrement et pour cela je vous suis très reconnaissante.

Mes remerciements vont également aux différents membres de l'équipe pour leur soutien qui, de près ou de loin, a contribué au bon déroulement de cette thèse. Une dédicace spéciale à **Laetitia Rigau** pour ses précieux conseils et son soutien inconditionnel et à **Aurélien Verger** pour sa présence au quotidien et les bons moments de rigolade qui me manqueront. Ces années passées ensemble resteront un très bon souvenir.

Un grand merci à **M-L. Guillaud**, notre secrétaire, qui contribue de façon très importante au bon déroulement de notre vie au laboratoire.

Je remercie également toutes les nombreuses personnes, aussi bien de l'**IUT Mesures Physiques du Limousin** que de la **Faculté des Sciences et Techniques de Limoges**, pour m'avoir donné l'opportunité d'enseigner durant mes trois années de thèse. Cette expérience unique m'a permis de prendre pleinement conscience du plaisir que j'ai à enseigner et pour cela je vous suis reconnaissante.

Un remerciement chaleureux à mes collègues et amis thésards : **Mary, Manu, Mimi, Crash, Alice, Julien, Audrey, Ben, les Fabien et David, Romain, François-Xavier, Philippe, Christophe, Stanis** et tous les autres que j'oublie.

Merci également à tous mes amis de longue date (ils se reconnaîtront) venus aujourd'hui m'écouter et me soutenir.

Enfin, je voudrais remercier du fond du cœur **ma famille** et en particulier **mes parents** et **mon frère** pour leur présence et leur affection ainsi que **mon fiancé** pour tout le soutien et le réconfort qu'il m'apporte au quotidien.

Table des matières

Introduction générale	1
------------------------------------	----------

Chapitre I Potentialités de la spectroscopie diélectrique pour la détection cellulaire	7
---	----------

I. Introduction	9
------------------------------	----------

II. Les besoins des biologistes.....	10
---	-----------

II.1 Généralités sur les cellules.....	10
---	-----------

II.1.1 La cellule : sous l'œil d'un biologiste.....	10
--	-----------

II.1.2 La cellule : sous l'œil d'un physicien.....	12
---	-----------

II.2 Les cellules du système nerveux : des cellules spécifiques à caractériser	14
---	-----------

II.2.1 Les cellules du système nerveux	14
---	-----------

II.2.1.a Les neurones	14
-----------------------------	----

II.2.1.b Les cellules gliales	15
-------------------------------------	----

II.2.1.c Les cellules souches neurales (CSN)	16
--	----

II.2.1.d Cellules souches cancéreuses (CSC).....	17
--	----

II.2.2 Problématique posée par l'étude des cellules souches cancéreuses	17
--	-----------

II.3 Apports de la spectroscopie diélectrique cellulaire aux fréquences micro ondes	19
--	-----------

III. La spectroscopie diélectrique cellulaire	20
--	-----------

III.1 Historique	20
-------------------------------	-----------

III.2 Domaine spectral d'analyse	24
---	-----------

III.3 Apport des micro technologies	31
--	-----------

III.3.1 Naissance des technologies BioMEMS	31
---	-----------

III.3.2 Les domaines d'application	32
---	-----------

III.4 Applications diagnostiques : détection et caractérisation cellulaire.....	33
--	-----------

III.4.1 Méthodes de détection optique.....	34
---	-----------

III.4.1.a Méthodes de fluorescence.....	34
---	----

III.4.1.b Interactions avec les ondes du spectre optique	37
--	----

III.4.2 Méthodes de détection mécanique	39
--	-----------

III.4.3 Méthodes de détection électrique.....	42
--	-----------

III.4.3.a Capteurs électrochimiques (10^1 - 10^7 Hz).....	43
--	----

IV. Conclusion 52

**Chapitre II Conception des dispositifs hyper-fréquences passifs
pour l’analyse cellulaire 59**

I. Introduction 61

II. Généralités sur les résonateurs micro ondes..... 62

II.1 Choix de la technologie 62

II.2 Les circuits résonants RLC 65

II.2.1 Circuit résonant série 65

II.2.2 Circuit résonant parallèle 68

II.2.3 Topologie retenue..... 71

III. Application à l’étude de cellules biologiques 72

III.1 Remarques préliminaires..... 72

III.1.1 Principe de bio-détection 72

III.1.2 Paramètres diélectriques à évaluer..... 74

III.1.3 Contraintes de conception 76

III.2 Mise au point des bio-capteurs 79

III.2.1 Topologie des résonateurs 79

III.2.2 Prise en compte de l’effet du milieu biologique 82

III.2.2.a Etude préliminaire 82

III.2.2.b Milieu biologique d’analyse : le ficoll..... 84

III.2.3 Précision attendue de la méthode et principales limitations..... 87

III.3 Amélioration de la sensibilité et de la précision des bio-capteurs..... 89

III.3.1 Fonctionnalisation des zones d’analyse 89

III.3.2 Présentation des différents résonateurs 92

III.3.3 Vers la caractérisation d’une seule cellule à la fois 95

**IV. Développement de micro-capteurs hyper sensibles : vers l’analyse de
cellules uniques..... 95**

IV.1 Quelques principes de conception des filtres hyper-fréquences..... 96

IV.1.1 Résonateur $\lambda_g/2$ distribué..... 96

IV.1.2 Couplage de deux résonateurs.....	97
IV.2 Mise au point de bio-capteurs basés sur une architecture de filtre.....	99
IV.2.1 Topologie des filtres.....	99
IV.2.2 Principe de détection.....	103
IV.2.3 Optimisation de la sensibilité de la capacité de couplage.....	105
V. Conclusion.....	108

Chapitre III Mise en œuvre expérimentale et caractérisation des cellules du système nerveux 111

I. Introduction	113
II. Fabrication des bio capteurs.....	114
II.1 Procédé de fabrication des résonateurs.....	114
II.1.1 Métallisation du substrat.....	114
II.1.2 Définition des lignes d'or.....	115
II.1.3 Epaisseur des lignes d'or	116
II.1.4 Dépôt et formation des anneaux épais de SU8	118
II.2 Procédé de fabrication des filtres.....	120
II.2.1 Réalisation de la métallisation en face arrière.....	120
II.2.2 Réalisation de la face avant.....	121
III. Protocole initial de mesure et résultats	124
III.1.1 Protocole biologique développé.....	124
III.1.1.a Culture cellulaire	124
III.1.1.b Préparation des cellules	125
III.1.2 Protocole de mesure	126
III.1.3 Résultats expérimentaux.....	128
III.1.4 Procédé d'extraction des paramètres diélectriques cellulaires	131
III.1.4.a Procédé d'extraction utilisé	131
III.1.4.b Paramètres diélectriques extraits	133
IV. Culture cellulaire sur puces et résultats.....	135
IV.1.1 Protocole biologique développé	136
IV.1.1.a Mise en culture des cellules sur les circuits.....	136
IV.1.1.b Préparation des cellules.....	139

IV.1.2 Protocole de mesure	140
IV.1.3 Résultats expérimentaux.....	141
IV.1.3.a Bio-capteurs à base de résonateurs	141
IV.1.3.b Bio-capteurs à base de filtres.....	147
V. Mesures préliminaires sur cellules souches	151
V.1.1 Protocole biologique développé.....	151
V.1.2 Résultats expérimentaux	154
V.1.2.a Bio-capteurs basés sur les résonateurs	154
V.1.2.b Bio-capteurs à base de filtres	155
Conclusion	158
Conclusions générales/Perspectives	161
Production scientifique.....	167

Introduction générale

Introduction générale

Ces dernières années, d'importants besoins dans le domaine biomédical ont suscité un vif intérêt pour l'étude des bio-capteurs qui permettent une analyse précise et rapide d'éléments biologiques tels que les bio-molécules ou les cellules. Différentes méthodes de bio-détection ont donc été développées. Elles peuvent être essentiellement optiques, mécaniques ou électriques. Les systèmes de bio-détection par voie optique ont fait l'objet d'intenses recherches depuis déjà plusieurs années et permettent une analyse efficace des systèmes biologiques. Elles présentent en revanche certains inconvénients comme notamment le recours à des marqueurs spécifiques qui peuvent influencer chimiquement l'entité biologique à analyser. En parallèle les méthodes basées sur une détection éclectique connaissent un intérêt croissant car elles permettent de développer des outils d'analyse ne nécessitant pas le recours à des marqueurs spécifiques.

Ces grandes avancées ont été possibles grâce notamment au développement de la microélectronique qui apporte de nouvelles possibilités et perspectives au domaine biomédical. En particulier, associée à l'utilisation des hautes fréquences, cette technologie permet la miniaturisation des bio-capteurs de façon à travailler à une échelle se rapprochant de celle d'une cellule unique. Ce dernier point représente aujourd'hui un enjeu majeur dans la compréhension de nombreux phénomènes biologiques tel que l'apoptose cellulaire (mort cellulaire) ou encore le développement de cancers. Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons travaillé en étroite collaboration avec le laboratoire d'Homéostasie cellulaire et Pathologies (EA 3842) de l'Université de Limoges. Ce laboratoire, dirigé par le professeur Marie-Odile Jauberteau, travaille sur les cellules du système nerveux et en particulier sur l'étude de nouveaux traitements contre les problématiques de récurrence des cancers du cerveau humain. En effet, depuis plusieurs années les travaux des chercheurs de ce laboratoire sont orientés vers l'étude de cellules souches cancéreuses, à la base des cellules du système nerveux. L'approche la plus courante, utilisée de nos jours par les biologistes pour l'analyse des cellules souches, repose sur l'utilisation de la cytométrie en flux avec les techniques de FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) qui permettent de séparer les cellules après avoir effectué un immuno marquage avec des anticorps spécifiques couplés à des fluorophores. La difficulté de cette approche sur les cellules souches cancéreuses repose sur le fait qu'elles présentent un caractère indifférencié. Par conséquent il est complexe de cibler des anticorps spécifiques de marquage pour ces cellules. Il existe plusieurs marqueurs connus et utilisés à ce

jour pour les cellules souches, en particulier le CD133. Cependant, depuis peu, ce dernier est fortement remis en cause par la communauté scientifique car il a été prouvé qu'il ne s'exprimait pas uniquement chez les cellules souches mais également sur des cellules en cours de différenciation.

Dans ce contexte, l'analyse des propriétés diélectriques des cellules souches cancéreuses aux hautes fréquences peut apporter une réponse aux problématiques posées par ces cellules en permettant de les différencier et à terme de les trier. L'intérêt de la méthode proposée est qu'elle est sans marquage et lève deux points épineux. Le premier, concernant l'incertitude de l'efficacité du marquage des cellules souches et le deuxième concernant la probabilité qu'ont ces marqueurs, type anticorps, de modifier le type cellulaire analysé et son intégrité.

Ainsi, nos travaux de thèse concernent la mise au point de bio-capteurs, basés sur une méthode de détection électrique, pour l'analyse cellulaire, sans marquage, aux fréquences micro ondes. En effet, le principe de bio-détection mis à profit dans le cadre de cette thèse, repose sur l'utilisation de dispositifs planaires résonants qui sont par nature très sensibles à de petites variations de paramètres. Ainsi, l'introduction de cellules sur ces résonateurs implique un décalage de la fréquence de résonance des capteurs qui peut directement être relié aux propriétés diélectriques des cellules à savoir leur bio-impédance. Selon le type cellulaire considéré, son état pathologique et potentiellement son état de différenciation, ces paramètres sont différents et permettent de discriminer et de trier différents types cellulaires. Les capteurs sont réalisés grâce à un procédé de microélectronique standard qui, combiné aux fréquences micro ondes, permet de fabriquer des dispositifs miniaturisés et ainsi, de travailler proche de l'échelle de la cellule.

Ce manuscrit se divisera donc en trois parties. Dans un premier chapitre nous verrons en détail la problématique posée par les biologistes ainsi que les outils d'investigations qui existe aujourd'hui pour l'analyse cellulaire. Dans une deuxième partie, nous verrons comment nous avons conçu les bio-capteurs dédiés à l'analyse d'une très petite concentration de cellules jusqu'à la cellule unique. Enfin, dans le dernier chapitre nous détaillerons les procédés de fabrication utilisés pour fabriquer les bio-capteurs. Nous verrons les protocoles expérimentaux développés en collaboration avec les biologistes pour mesurer et caractériser les cellules d'intérêt. Les résultats seront présentés et discutés. Nous verrons que nos études portant sur des cellules cancéreuses ont montré que les paramètres diélectriques des deux types cellulaires principaux constituant le système nerveux (les cellules gliales et les

neurones) sont différents et permettent de les discriminer. Ces recherches ont permis l'optimisation des performances des bio-capteurs qui nous permettent aujourd'hui de détecter et d'analyser jusqu'à une cellule unique. Les premiers travaux concernant les cellules souches cancéreuses sont aussi été présentés. Ils semblent montrer qu'il existe des différences d'impédances significatives permettant de discriminer ce type de cellules. Ces premiers résultats semblent comme nous le verrons prometteurs et pourraient à terme conduire à une identification efficace de ces cellules dans le but d'étudier leur comportement et de cibler des traitements appropriés.

Chapitre I

Potentialités de la spectroscopie diélectrique pour la détection cellulaire

I. Introduction

Le travail présenté dans ce manuscrit concerne la conception et la réalisation de bio-capteurs dédiés à l'analyse cellulaire aux fréquences radio et micro ondes. Il a été mené en collaboration avec le laboratoire d'Homéostasie cellulaire et Pathologies de l'Université de Limoges qui travaille sur les cellules du système nerveux et en particulier sur l'étude des mécanismes responsables des récives des cancers au niveau du cerveau. Notre travail s'appuie donc sur la mise en commun des connaissances des biologistes et des physiciens pour mettre au point un nouvel outil de caractérisation et de tri pour ces cellules spécifiques.

Afin de bien appréhender le contexte de notre étude, nous allons tout d'abord, au travers de ce chapitre premier, nous intéresser à l'évolution de l'étude des propriétés diélectriques des cellules dans le spectre électromagnétique ainsi qu'aux récentes applications des micro technologies aux domaines biologique et biomédical communément regroupées sous le nom de BioMEMS (Biological Micro-Electro-Mechanical Systems). Après avoir rappelé quelques généralités sur les cellules, nous nous focaliserons sur les problématiques actuelles des biologistes et nous introduirons les différents types cellulaires étudiés aux cours de nos travaux. Dans un deuxième temps, nous dresserons donc l'évolution historique de l'étude des propriétés diélectriques des cellules et nous mettrons en évidence les différents domaines fréquentiels d'analyse. Nous identifierons alors les grandes potentialités qu'offrent les micro et nano technologies puis nous nous focaliserons plus particulièrement sur la réponse qu'elles offrent aux besoins liés à la détection et à l'analyse à l'échelle cellulaire. Diverses méthodes de détection et de caractérisation seront comparées afin de mettre en lumière une méthode particulière basée sur une technique de détection électrique qui fera l'objet de nos recherches dans les chapitres suivants.

II. Les besoins des biologistes

Comme nous venons de le voir l'étude présentée dans ce manuscrit a été réalisée en forte interaction avec les biologistes pour qui les nouvelles technologies ouvrent de nouvelles perspectives dans l'analyse cellulaire et l'identification de nouveaux traitements. Ainsi, pour bien comprendre les besoins et les intérêts mis en jeu dans cette discipline nous allons dans un premier temps présenter la cellule biologique et les moyens dont disposent les biologistes actuellement pour les étudier.

II.1 Généralités sur les cellules

II.1.1 La cellule : sous l'œil d'un biologiste

La cellule (du latin *cellula* signifiant « petite chambre ») est l'unité structurale et fonctionnelle constituant tout être vivant. Il en existe une grande diversité et tous les êtres vivants sont constitués de cellules pouvant se définir comme des « petits compartiments limités par une membrane et remplis d'une solution aqueuse concentrée de substances chimiques » [I.1]. Les formes de vie les plus simples sont des cellules isolées, alors que les organismes supérieurs tels que les êtres humains sont formés de regroupements de cellules remplissant des fonctions spécialisées et reliées par des systèmes complexes de communication.

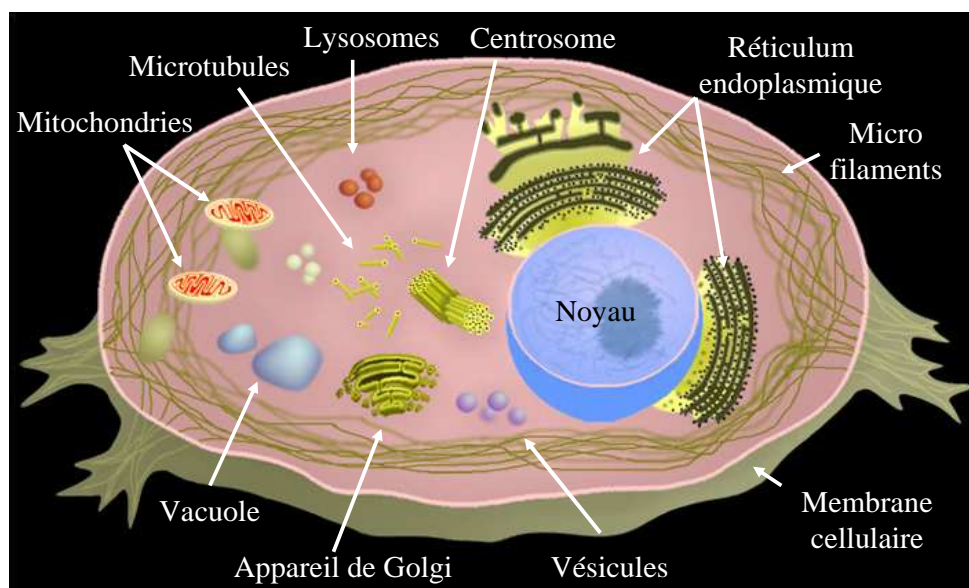


Figure I-1 : Modèle simplifié d'une cellule vivante [I.2].

Dans la nature se distinguent deux types de cellules : les cellules procaryotes et eucaryotes. Leur différence fondamentale repose sur la particularité des cellules procaryotes qui ne possèdent pas de noyau. Elles sont en effet constituées d'une membrane cellulaire qui sépare les milieux intra et extra cellulaires, et le matériel génétique de la cellule baigne dans le milieu intra cellulaire ou cytoplasme. Le diamètre des cellules procaryotes varie entre environ 1 et 10 μm . Les cellules eucaryotes quant à elles sont plus complexes. Elles sont caractérisées par une membrane cellulaire et un noyau qui renferme le matériel génétique de l'individu et l'isole ainsi du cytoplasme (Figure I-1). Elles possèdent de plus, à la différence des cellules procaryotes, un cytosquelette : squelette interne formé de filaments protéiques qui donnent à la cellule sa forme, sa capacité à se mouvoir et son aptitude à ordonner ses organites et à les transporter d'un endroit à un autre de la cellule. Le diamètre des cellules eucaryotes varie en moyenne entre 10 et 100 μm . Ce dernier type cellulaire retiendra toute notre attention par la suite car c'est lui qui constitue l'être humain (à l'inverse des cellules procaryotes qui correspondent au monde végétal). En effet, la juxtaposition de ces cellules eucaryotes et leur capacité à être reliées entre elles donnent naissance aux tissus qui forment eux-mêmes nos organes [I.1].

Ainsi, au cœur de la cellule eucaryote se trouve le noyau au sein duquel l'ADN est stocké séparément du reste du contenu cellulaire, appelé cytoplasme et dans lequel ont lieu la plupart des réactions métaboliques de la cellule. Autour du noyau, dans le cytoplasme, gravitent les organites cellulaires nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. Ainsi, nous trouvons :

- le réticulum endoplasmique, formé de réseaux de feuillettes aplatis dont le rôle est de synthétiser et de transporter les lipides et protéines transmembranaires,
- l'appareil de Golgi qui représente un système de sacs aplatis impliqués dans la modification, le tri et l'emballage de macro molécules qui doivent être transportées vers d'autres organites,
- les lysosomes et vésicules impliqués dans la digestion intra cellulaire,
- le cytosquelette, formé des microtubules et autres filaments,
- et les mitochondries qui servent de centrales électriques aux cellules en exploitant l'énergie obtenue en combinant l'oxygène avec les molécules alimentaires pour fabriquer l'ATP.

Enfin, un élément très important de la cellule dans le cadre de notre étude est sa membrane plasmique. Cette membrane cellulaire est constituée, selon le modèle de Singer et

Nicholson, d'une bicouche de lipides de quelques nanomètres d'épaisseur (de 5 à 7 nm) (Figure I-2). En plus d'assurer les conditions nécessaires à la survie de la cellule à savoir le maintien des différences indispensables entre le milieu cellulaire et l'environnement extérieur, elle agit comme un filtre sélectif, qui maintient l'inégalité des concentrations ioniques de part et d'autre et laisse pénétrer les substances nutritives dans la cellule et en laisse sortir les déchets.

Un point important relève du fait que cette membrane se comporte comme un diélectrique : elle a une conductance assez faible de sorte qu'elle laisse passer les lipides et bloque complètement les ions. Elle est traversée par des canaux ioniques qui permettent aux ions spécifiques d'entrer et de sortir de la cellule et confère ainsi son caractère perméable à la cellule.

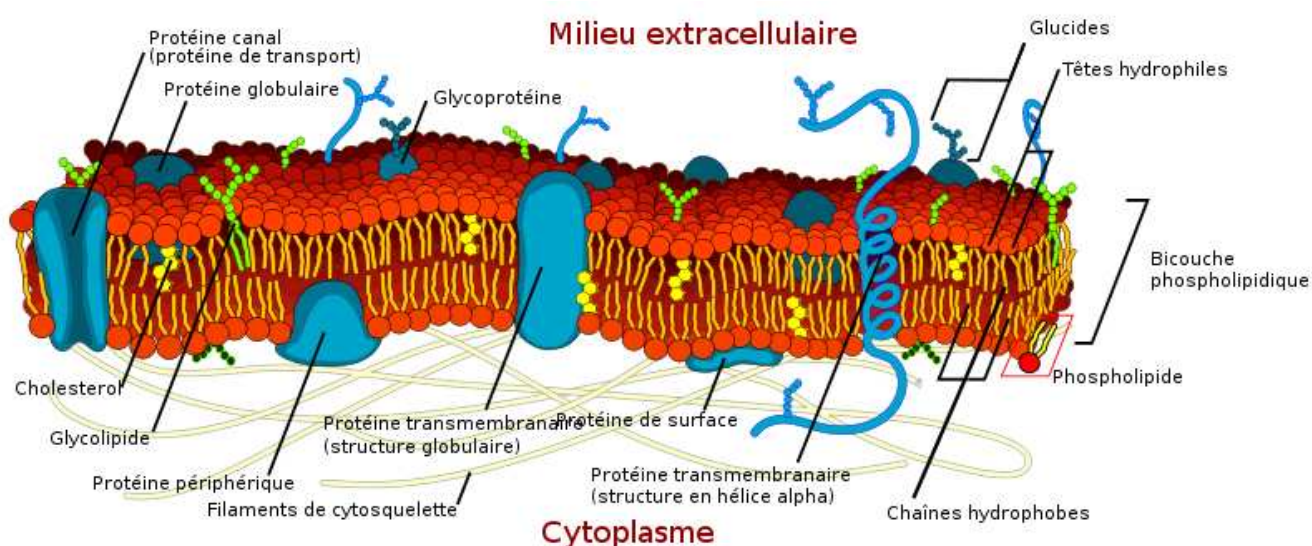


Figure I-2 : Représentation schématique d'une membrane plasmique [I.3].

Pour la suite, il sera alors intéressant de regarder la cellule d'un point de vue électrique de façon à pouvoir définir ses propriétés électriques et la modéliser par ses paramètres diélectriques.

II.1.2 La cellule : sous l'œil d'un physicien

La modélisation électrique des cellules existe depuis longtemps. En effet, dès les années 1910, Höber a étudié l'évolution de la résistivité d'un échantillon de sang aux basses et hautes fréquences [I.4] et a démontré que celles-ci diffèrent de façon remarquable. Il postule donc l'existence, autour des érythrocytes (contenus dans le sang), d'une membrane qui possède une faible conductance aux basses fréquences et force le courant à contourner les

cellules. Aux hautes fréquences, la capacité introduite par la membrane est court-circuitée et le milieu intra cellulaire participe alors au phénomène de conduction. Höber fut donc le premier à postuler l'existence d'une membrane cellulaire en se basant sur une expérience purement électrique [I.5]. A la suite de ces premières observations, Fricke a proposé dans la première moitié du 20^{ème} siècle un modèle afin de rendre compte du comportement diélectrique des cellules [I.6]. La membrane cellulaire est assimilable à un condensateur tandis que les milieux intra et extra cellulaires peuvent être considérés comme des électrolytes liquides (Figure I-3).

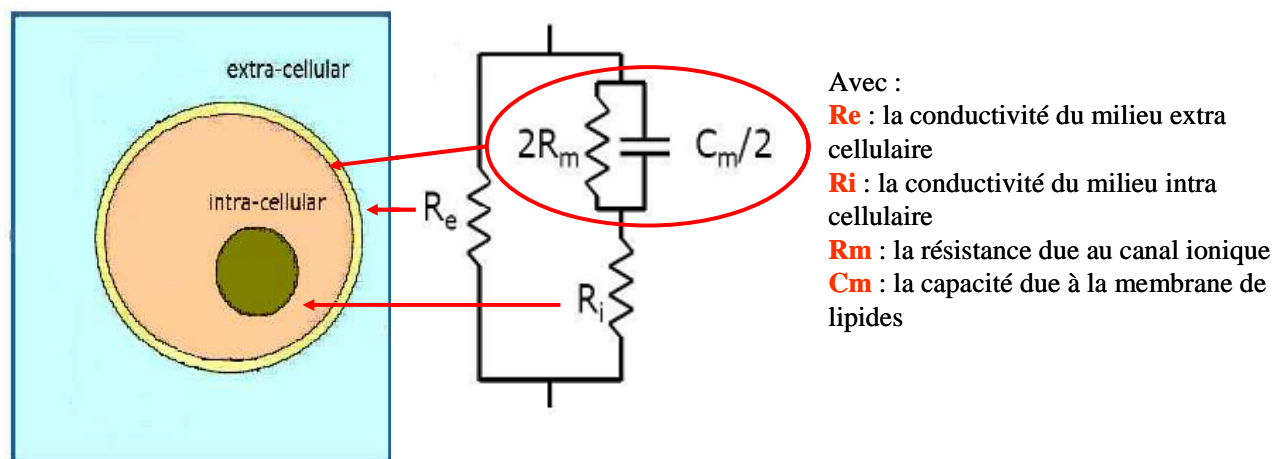


Figure I-3 : Modèle de Fricke d'une cellule biologique.

Il est donc largement reconnu depuis de nombreuses années l'intérêt d'étudier les propriétés diélectriques des cellules pour comprendre divers phénomènes biologiques et compléter les études réalisées grâce aux méthodes classiques utilisées en biologie : microscopie, culture cellulaire, fractionnement des cellules et de leur contenu, marquage par des isotopes radioactifs et des anticorps ou encore, technologie de l'ADN recombinant.

En particulier l'utilisation des fréquences radio et micro ondes pour l'investigation des cellules biologiques paraît très prometteuse car à ces fréquences, la membrane cellulaire est transparente et il est donc possible de pénétrer à l'intérieur de la cellule pour étudier les propriétés diélectriques du milieu intra cellulaire. C'est donc ce que nous allons mettre en œuvre pour l'étude des cellules qui nous intéressent particulièrement dans ce travail, à savoir les cellules du système nerveux.

II.2 Les cellules du système nerveux : des cellules spécifiques à caractériser

Le corps humain est constitué de plus de 200 types de cellules. Celles-ci sont regroupées au sein de tissus comme par exemple, l'épithélium, le tissu conjonctif, les muscles ou encore les tissus nerveux. La plupart des tissus sont constitués d'un mélange de types cellulaires. Parmi les cellules couramment étudiées en biologie, nous trouvons les cellules du système nerveux. Les tissus nerveux sont constitués de deux grands types cellulaires : les neurones, cellules très allongées capables de conduire des signaux électriques et les cellules gliales qui jouent un rôle de support aux circuits neuraux [I.1].

L'étude de ces cellules présente un vif intérêt car elle permet notamment la compréhension de nombreux mécanismes biologiques. Nous pouvons citer à titre d'exemple, les mécanismes de neuroprotection et de régénération dans le système nerveux central, les mécanismes de contrôle des cellules souches neurales normales ou encore les mécanismes de résistance à la mort cellulaire induite des cellules souches tumorales dans les glioblastomes (cellules gliales cancéreuses) et les neuroblastomes (cellules neuronales cancéreuses).

II.2.1 Les cellules du système nerveux

II.2.1.a Les neurones

Le système nerveux est composé de neurones (Figure I-4) qui sont des cellules hautement spécialisées capables d'établir entre elles des milliards de connections contribuant au traitement des informations. Ces cellules sont donc électriquement excitables comme il existe une différence de potentiel de part et d'autre de la membrane plasmique.

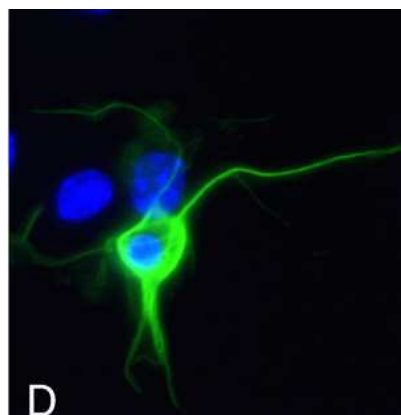


Figure I-4 : Neurones.

Les neurones sont entourés d'une gaine protectrice, la myéline, et sont formés de trois parties principales : le corps cellulaire, les dendrites et l'axone (Figure I-5).

Le corps cellulaire représente le centre de la synthèse biologique et contient le noyau et les organites présentés précédemment. Les dendrites forment un ensemble de branchements qui s'allongent comme des antennes depuis le corps cellulaire et offrent ainsi une plus grande surface de réception pour les signaux qui proviennent d'autres cellules. L'axone est une excroissance cellulaire qui permet de véhiculer les potentiels d'action du corps cellulaire vers des cibles éloignées. Les neurones que nous utilisons pour notre étude sont issus d'une lignée de neuroblastome humain nommée SH-SY5Y.

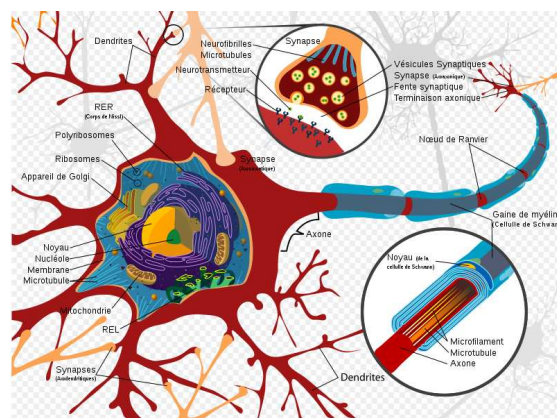


Figure I-5 : Représentation schématique d'un neurone.

II.2.1.b Les cellules gliales

Pour assurer le soutien et la nutrition des neurones, il existe les cellules gliales (Figure I-6) qui sont à peu près dix fois plus nombreuses que les neurones dans le système nerveux central. De plus, elles jouent un rôle dans l'établissement de nouvelles connections. Il existe quatre types de cellules gliales :

- les astrocytes qui assurent un support à la fois mécanique et métabolique aux circuits neuronaux en contrôlant la composition chimique des fluides dans lesquels baignent les cellules nerveuses,

- les oligodendrocytes qui constituent les gaines de myéline,

- les épendymocytes qui bordent les alvéoles internes du système nerveux central,

- la microglie qui représente un type particulier de macrophage.

Les cellules gliales qui nous intéressent particulièrement pour notre étude sont des cellules cancéreuses issues de la lignée appelée U87-MG qui se différencie principalement en astrocytes.

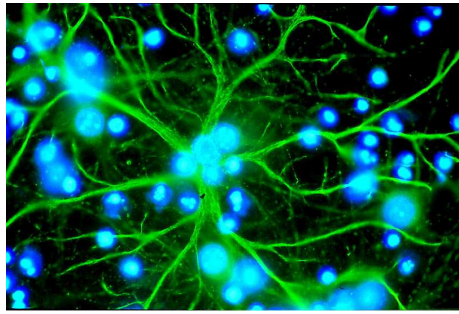


Figure I-6 : Cellules gliales.

II.2.1.c Les cellules souches neurales (CSN)

Les cellules qui constituent les tissus du système nerveux sont issues de cellules souches neurales. Ces cellules sont capables de se multiplier tout en conservant leur potentiel à créer, entretenir et régénérer les différents types cellulaires de nos tissus et organes.

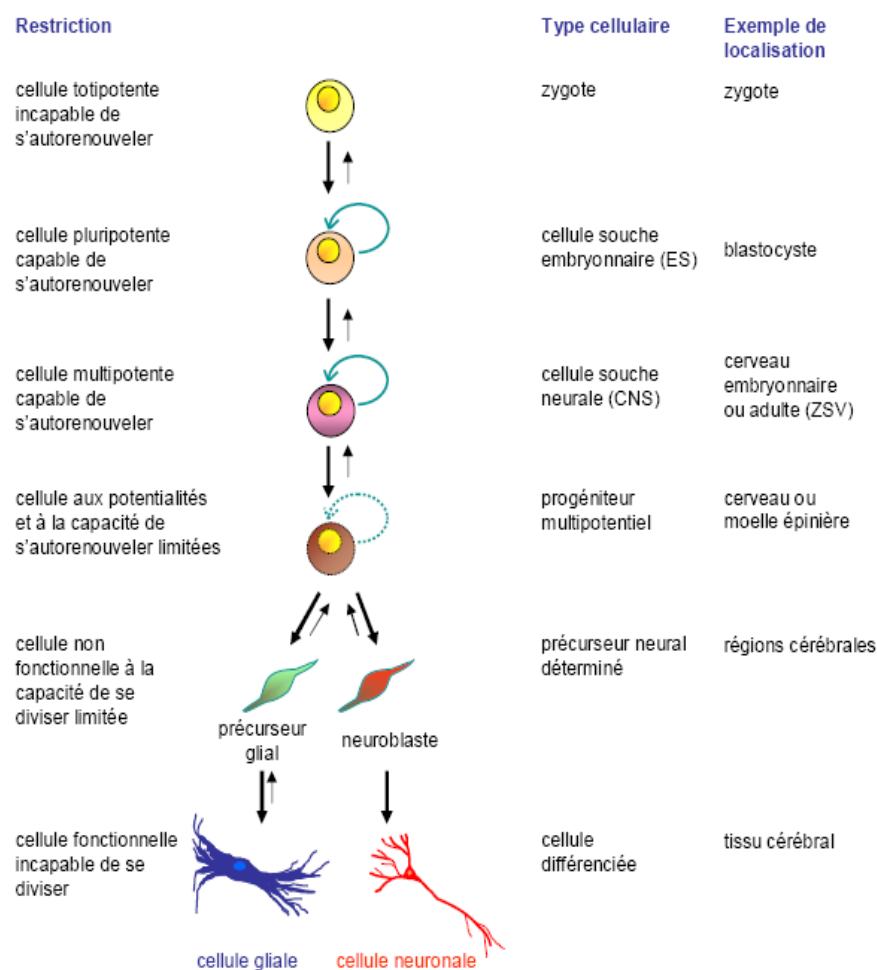


Figure I-7 : Schéma de différenciation d'une cellule souche neurale normale.

Les cellules souches, dites multipotentes, sont capables de s'auto renouveler de façon quasi illimitée et peuvent se diviser de deux manières possibles : division symétrique (une cellule souche donne deux cellules souches) et division asymétrique (une cellule souche donne une cellule souche et un progéniteur). Lors de la division asymétrique, les progéniteurs vont être à l'origine de plusieurs types de cellules différenciées dont les deux qui vont particulièrement nous intéresser dans nos travaux : les neurones et les cellules gliales (Figure I-7).

II.2.1.d Cellules souches cancéreuses (CSC)

En 1971, du concept de l'hétérogénéité des tumeurs développée par Park [I.7], a été montré l'existence de cellules souches cancéreuses, appelées de cette manière de part leurs similitudes avec les cellules souches normales, et dotées des mêmes caractéristiques à savoir la prolifération quasi illimitée et le caractère multipotent notamment [I.8]. Ces cellules acquièrent des propriétés d'immortalité et pourraient être à l'origine de différents types de tumeurs tels que les glioblastomes et les neuroblastomes qui font partie des tumeurs cérébrales les plus fréquentes et feront l'objet de notre étude. Le développement de la masse tumorale à partir des CSC conduit à l'obtention de cellules tumorales différenciées qui ont des caractéristiques proches des cellules saines différenciées issue du tissu normal. Ainsi, dans le cas du glioblastome les CSC donneront des astrocytes tumoraux et dans le neuroblastome des neurones tumoraux. Bien que ces deux types cellulaires cancéreux possèdent comme leurs homologues normaux des rôles distincts dans le système nerveux central, ils sont néanmoins issus du même tissu comme cela a pu être décrit précédemment. Il est donc intéressant de pouvoir étudier les propriétés diélectriques de ces tissus aux fréquences radio et micro ondes pour pouvoir les discriminer d'un point de vue électrique. Les cellules souches cancéreuses utilisées dans nos travaux sont issues de la lignée U87-MG. Sous certaines conditions de culture, il est en effet possible d'enrichir cette lignée en cellules souches cancéreuses.

II.2.2 Problématique posée par l'étude des cellules souches cancéreuses

Dans le cadre de notre étude, les cellules souches cancéreuses étudiées sont issues de glioblastomes (de grade IV) qui représentent l'une des formes les plus agressives et les plus fréquentes de tumeurs cérébrales (1 cas sur 23330 détecté par an en France). C'est la forme la plus mortelle de tumeur cérébrale chez l'enfant et l'adulte où elles conduisent dans les deux ans qui suivent le diagnostic au décès de la grande majorité des patients. Paradoxalement, les

progrès concernant le diagnostic et le traitement de ces tumeurs cérébrales sont faibles et le taux de mortalité des patients développant la pathologie reste très élevé étant donné l'absence de prise en charge thérapeutique efficace.

L'une des caractéristiques majeures des glioblastomes reste en effet leur résistance aux traitements radio-thérapeutiques et chimio-thérapeutiques ainsi qu'à la mort induite par les inducteurs de la voie des récepteurs à domaine de mort (Fas L). Le développement de cette résistance aux traitements pourrait s'expliquer par la présence de cellules souches tumorales au sein des tumeurs qui auraient la capacité de régénérer la masse tumorale à la suite du traitement (Figure I-8).

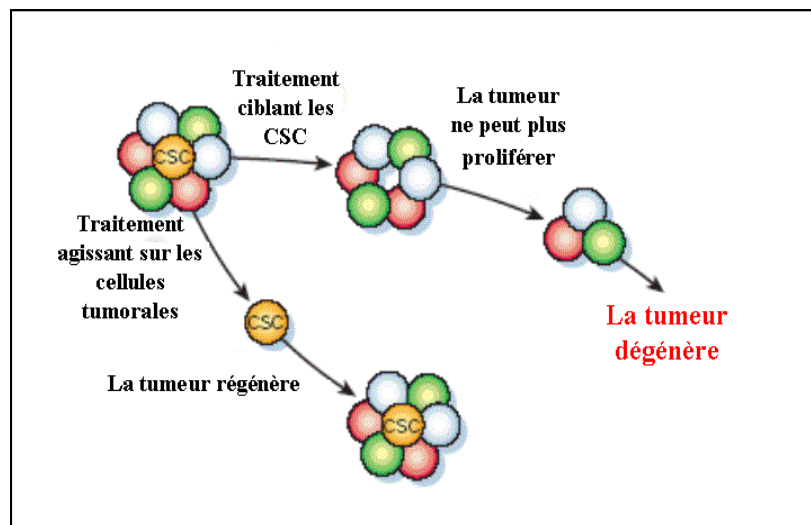


Figure I-8 : Principe communément admis de régénération d'une tumeur par les cellules souches [I.8].

En effet, ces propriétés d'auto-renouvellement et de prolifération quasi illimitée que semblent posséder ces cellules souches pourraient fournir une explication concernant leur résistance aux traitements classiques. Leur activation ainsi que leur différenciation permettraient de régénérer la masse tumorale conduisant à une récurrence du cancer. C'est pourquoi la sensibilisation de ces cellules souches aux traitements existants ainsi que la mise au point de nouvelles molécules candidats médicaments serait une réelle avancée pour traiter la maladie.

Cependant, l'isolement et la caractérisation des cellules souches restent complexes en raison de leur caractère indifférencié. L'absence de marqueurs spécifiques sur ces cellules ne permet pas ou avec difficulté de trier ces dernières selon les méthodes traditionnelles de tri cellulaire (cytométrie en flux, FACS). En effet, les seuls marqueurs des cellules souches

tumorales répertoriés et considérés comme significatifs à l'heure actuelle sont le CD 133, la Vimentine et la Nestine (Figure I-9).

Cependant, les données concernant ces différents marqueurs sont aujourd'hui fortement remises en cause par une partie de la communauté scientifique [I.9] et rendent incertains à la fois le bon isolement et la caractérisation des cellules souches tumorales. En effet, il se pourrait que ces marqueurs ne soient pas vraiment spécifiques à ces cellules, sous-entendu qu'ils pourraient également être exprimés par des cellules déjà différenciées.



Figure I-9 : Marquage et identification à priori de cellules souches tumorales.

Cette forte incertitude explique que les biologistes ont besoin aujourd'hui de dispositifs innovants permettant de mesurer des paramètres cellulaires spécifiques à ces cellules souches tumorales pour permettre une réelle avancée dans le traitement des cancers induits par ces cellules et aussi compléter la classification actuelle des tumeurs établie jusqu'à présent selon une approche anatomo-pathologique qui définit le stade d'avancée des tumeurs (grade de I à IV).

II.3 Apports de la spectroscopie diélectrique cellulaire aux fréquences micro ondes

L'approche la plus courante, utilisée de nos jours par les biologistes pour l'analyse des cellules souches, repose donc sur la cytométrie en flux avec les techniques de FACS (Fluorescent Activated Cell Sorting) qui permettent de séparer les cellules après avoir effectué un immuno marquage avec des anticorps spécifiques couplés à des fluorophores. La difficulté de cette approche sur les cellules souches cancéreuses repose sur le fait qu'elles ont un caractère indifférencié. Par conséquent il est complexe de cibler des anticorps spécifiques

contre ces cellules. De plus, cet immuno marquage va modifier l'intégrité physiologique de la cellule et peut poser des problèmes lorsque celle-ci doit être transplantée dans un nouvel organisme par la suite. La transplantation de cellules souches normales dans le traitement des lésions médullaires illustre parfaitement ce problème et donc le moyen de parvenir à greffer des cellules dans de bonnes conditions serait d'obtenir un tri sans « pollution » par des anticorps spécifiques du tri. De plus, il est nécessaire de développer une technique d'analyse des paramètres cellulaires qui soit à la fois rapide et qui permettent de conserver la cellule dans des conditions d'intégrité maximales. Le développement de nouvelles approches permettrait d'apporter des outils afin de définir de nouveaux paramètres pour l'isolement des cellules souches cancéreuses, aboutissant ainsi à tester de nouveaux traitements ciblés contre ces cellules. D'autre part, la caractérisation des cellules souches neurales normales pourrait faciliter leur transplantation en évitant les phénomènes de rejet.

L'analyse des propriétés diélectriques des cellules souches aux hautes fréquences peut apporter une réponse à ces différentes problématiques. En effet, s'il est possible de discriminer deux types cellulaires différents issus d'un même tissu, par exemple des glioblastomes et des neuroblastomes, il est alors tout à fait envisageable de se servir de ces mêmes propriétés électriques pour différencier et trier des cellules souches cancéreuses. L'intérêt de la méthode proposée est qu'elle est sans marquage et lève deux points épineux. Le premier, concernant l'incertitude de l'efficacité du marquage des cellules souches et le deuxième concernant la possibilité qu'ont ces marqueurs, type anticorps, de modifier le type cellulaire analysé et son intégrité.

Nous allons donc dans la suite de ce chapitre premier étudier l'évolution de la spectroscopie diélectrique cellulaire et montrer les avancées qu'apportent les micro technologies dans le domaine des bio-capteurs cellulaires afin d'apporter une nouvelle approche à la problématique posée.

III. La spectroscopie diélectrique cellulaire

III.1 Historique

Les propriétés diélectriques des tissus biologiques résultent de l'interaction entre une onde électromagnétique et les cellules qui composent ces tissus. L'étude de ces propriétés diélectriques des matériaux biologiques en fonction de la fréquence, appelée spectroscopie diélectrique, est depuis très longtemps étudiée. L'intérêt de déterminer les propriétés

électriques des matériaux biologiques est en effet né dans les années 1850 à partir du moment où les appareils permettant une mesure précise de résistances électriques et finalement de capacités ont été développés [I.10].

Pendant environ un siècle, les chercheurs se sont particulièrement intéressés aux propriétés électriques des tissus et du sang. Ils se sont rapidement rendus compte que leurs propriétés électriques différaient fortement de ceux de simples solutions d'électrolytes. Par exemple, ils observèrent qu'à l'application d'un échelon de tension DC, la valeur du courant évolue au cours du temps avec un phénomène d'hystérésis. Ces effets étaient alors peu connus à l'époque et les résultats annoncés semblaient pouvoir souffrir d'artéfacts introduits par la polarisation des électrodes d'application de la tension DC. DuBois-Reymond, éminent neurophysiologiste, résuma ces premiers travaux dans son livre « Investigations About Animal Electricity » [I.11].

Au début des années 1900, avec les progrès technologiques des appareils électriques, les chercheurs purent commencer à mesurer la réponse de tissus excités par des courants alternatifs sinusoïdaux et montrer une dépendance complexe des propriétés diélectriques des tissus avec la fréquence. Plusieurs chercheurs étudièrent dans le même temps l'impédance électrique de solutions sanguines et permirent de grandes avancées pouvant être appliquées à des tissus plus complexes. Par exemple, Stewart mesura la résistivité du sang aux basses fréquences et reconnut que les érythrocytes apparaissaient comme étant des particules non conductrices [I.12]. Les travaux d'Höber [I.13-I.14] sur la conductivité de solutions sanguines en fonction de la fréquence aidèrent à comprendre le phénomène observé et permirent de mettre en évidence l'existence et l'effet de la membrane cellulaire en fonction de la fréquence mais aussi d'identifier le mécanisme de dispersion aujourd'hui connu sous le nom de dispersion β . A la suite de cela, Tesla, utilisant des courants alternatifs dans une gamme de fréquence non spécifiée mais probablement allant de 10 à 100 kHz, proposa que les tissus se comportent comme des « condensateurs » c'est-à-dire qu'ils offrent une faible résistivité aux hautes fréquences [I.14]. En résumé, avant la Première Guerre Mondiale, les scientifiques s'accordent à dire que les tissus sont des conducteurs d'électricité, dont la résistivité varie en fonction de la fréquence, et que les mécanismes de conduction sont liés au mouvement des ions dans la matière. Ils reconnurent également que les membranes cellulaires jouent un rôle dans les propriétés électriques des tissus et également dans l'anisotropie des propriétés électriques au sein des tissus musculaires et nerveux même si la raison n'était pas encore complètement établie à l'époque. Le concept de « polarisation des tissus » révélant leurs

propriétés capacitives fut ainsi établi. Les recherches furent, dans ce domaine, très actives pendant cette période. Toutefois l'origine de la « polarisation des tissus » restait encore inconnue et les mécanismes complexes qui se produisent lors de l'excitation électrique des tissus ne pouvaient pas être clairement séparés des processus linéaires passifs tels que les effets de charges qui se produisent au niveau de la membrane cellulaire.

Pendant l'entre deux guerres, l'étude des propriétés diélectriques a vu son spectre fréquentiel d'analyse ainsi que la diversité des matériaux biologiques analysés augmenter. La sophistication des outils d'analyse permit également de mieux comprendre les mécanismes mis en jeu. McClendon publia les valeurs de résistivité et de capacité du sang de 266 Hz à 2 MHz [I.15] et était sûrement le premier à mesurer deux composantes de l'impédance complexe de tissus sur cette gamme de fréquences. De plus, durant cette période, les chercheurs imaginèrent toutes sortes de schémas électriques équivalents pour décrire la dépendance fréquentielle de ces grandeurs et reconnurent que la structure des cellules et des membranes était largement responsable des phénomènes observés. Pendant les années 1920 à 1930, Fricke, Curtis et Cole développèrent une instrumentation poussée permettant d'évaluer avec précision à la fois la permittivité et la conductivité de tissus sur une gamme importante de fréquences. La contribution de leurs travaux est importante et commence à apporter des solutions à certains problèmes biologiques. Par exemple, en 1926, Fricke avance l'idée que la mesure de telles grandeurs peut apporter une méthode très pratique dans le diagnostic de tumeurs malignes [I.16]. Dans le même temps, Rajewsky et Schwan mesurèrent aussi la conductivité de nombreux matériaux biologiques sur une gamme de fréquences allant de quelques kilohertz à 100 MHz en utilisant des ponts aux fréquences audio et radio (Figure I-10) et des lignes de transmission à plus haute fréquence.

Puis la Seconde Guerre Mondiale engendra un rapide développement des technologies micro ondes, incluant le développement des lignes de transmission, des guides d'ondes et des oscillateurs opérant à des fréquences supérieures à 10 GHz. Les chercheurs adaptèrent les technologies à la mesure des propriétés diélectriques des matériaux biologiques. Rajewsky et Schwan sont ainsi les premiers, en 1948, à mesurer la permittivité complexe du sang à des fréquences allant jusqu'à presque 1 GHz [I.17] et leurs mesures furent confirmées et étendues en fréquence par Cook en Angleterre [I.18]. A partir de la fin des années 1940, plusieurs chercheurs britanniques incluant Cook et Grant commencèrent l'étude des propriétés diélectriques des systèmes biologiques aux fréquences micro ondes. De plus Schwan découvrit l'existence de phénomènes de dispersions supplémentaires d'abord aux fréquences

micro ondes puis aux fréquences audio et inférieures et il fut le premier à démontrer ces phénomènes dans des suspensions de différents matériaux comme des cellules ou des billes de latex.

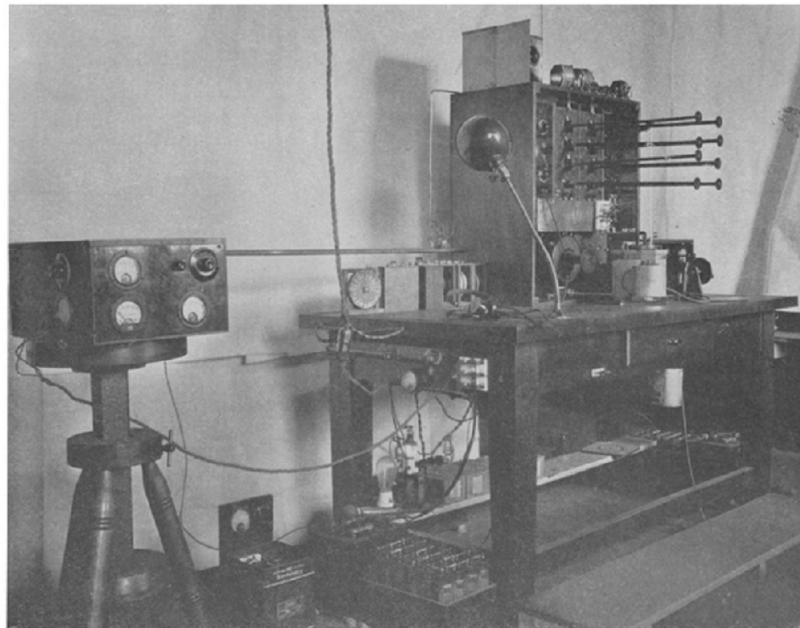


Figure I-10 : Photographie du pont de Wheatstone utilisé pour mesurer les propriétés diélectriques des tissus biologiques (1925).

Depuis la fin des années 1980, Schwan et Gabriel ont publié des travaux complémentaires faisant état de leurs recherches jusqu'au domaine des micro ondes [I.19-I.20-I.21]. Ils ont ainsi montré grâce à des mesures par sondes coaxiales sur différents tissus que la permittivité et la conductivité variaient d'un tissu à l'autre (Figure I-11). Cette étude démontre alors la possibilité de discriminer différents types cellulaires constituant les tissus par l'étude de leurs propriétés diélectriques.

Fort de ces résultats, des recherches ont montré dans les années 1990, les possibilités qu'offraient la connaissance des propriétés diélectriques des tissus aux fréquences micro ondes [I.22]. A savoir qu'il a été montré que la permittivité et la conductivité de cellules cancéreuses étaient supérieures à celle de cellules saines confirmant les grandes potentialités de la spectroscopie diélectrique cellulaire en termes de discrimination cellulaire et d'applications diagnostiques.

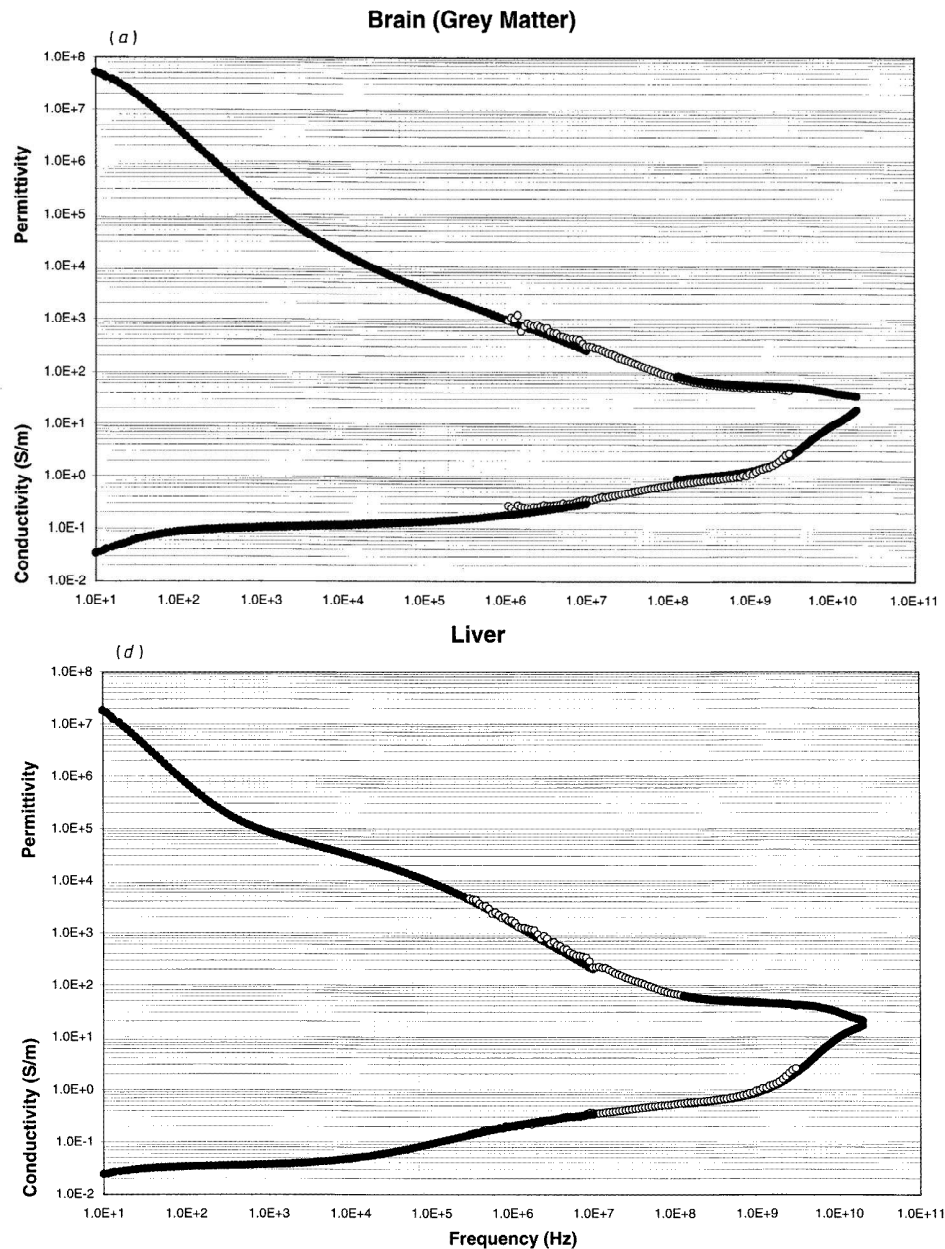


Figure I-11 : Evolution de la permittivité et de la conductivité de tissus humains prélevés au niveau du cerveau et du foie en fonction de la fréquence [I.21].

III.2 Domaine spectral d'analyse

Une cellule biologique est donc assimilable à une particule diélectrique qui peut être définie par sa permittivité ϵ et sa conductivité σ . La permittivité d'un matériau peut se définir comme sa capacité à se polariser en réponse à l'application d'un champ électrique, alors que sa conductivité représente sa capacité à déplacer ses charges mobiles en réponse au champ électrique appliqué. Une cellule peut donc se modéliser de façon simplifiée, à partir du

modèle de la double couche, par une sphère homogène comme le montre la Figure I-12. C'est ce modèle que nous utiliserons lors de nos travaux.

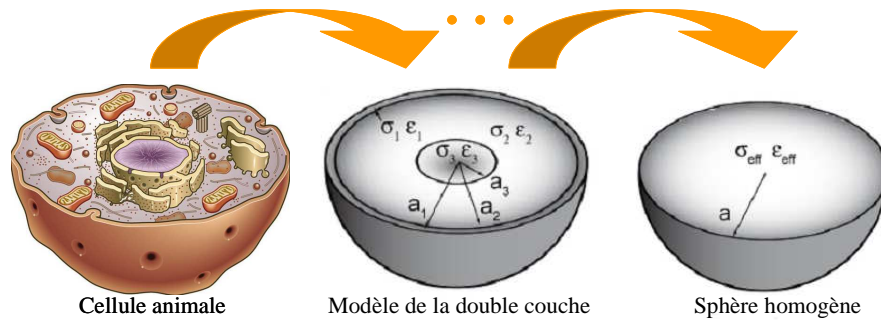


Figure I-12 : Modèle d'une cellule animale [I.23].

Comme il a été mis en évidence précédemment, la spectroscopie diélectrique cellulaire passe par la compréhension des phénomènes de relaxation diélectrique existants au sein de la cellule. En effet, la cellule, comme toute particule diélectrique, va se polariser en réponse à un champ électrique. Ainsi, en fonction de la fréquence du champ appliqué, cinq phénomènes de polarisations différents présentés sur la Figure I-13 apparaissent.

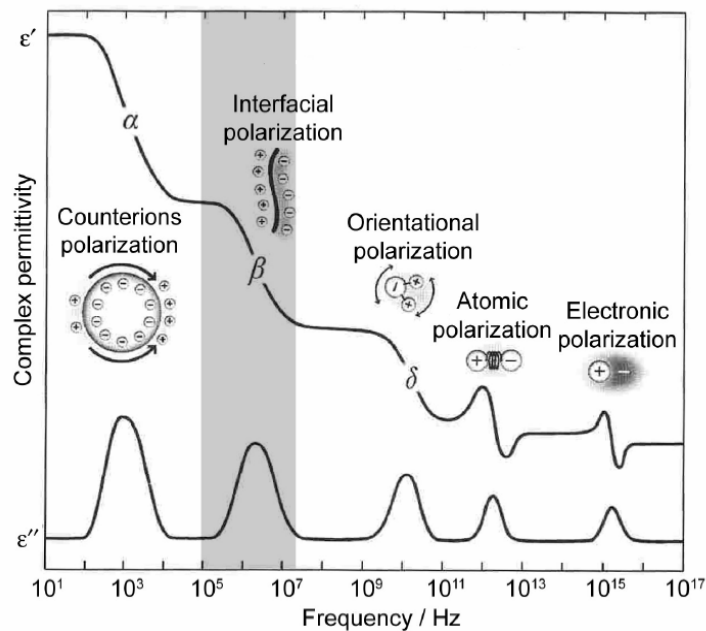


Figure I-13 : Principaux phénomènes de dispersion observés dans les tissus biologiques [1.23].

La permittivité effective d'un tissu peut atteindre des valeurs de l'ordre de $10^6 - 10^7$ à des fréquences inférieures à 100 Hz. Puis, quand la fréquence augmente, la permittivité relative diminue en trois étapes principales connues sous le nom de domaines de dispersion : à

basse fréquence, apparaît la dispersion α (entre 10 KHz et 10 MHz), puis la dispersion β et à partir des fréquences micro ondes on trouve la dispersion γ . Il est possible d'ajouter deux zones de relaxation supplémentaires à plus hautes fréquences dues à des phénomènes de polarisation électronique et atomique.

Bien évidemment, en termes de détection et d'analyse cellulaire, il est particulièrement intéressant de travailler dans des zones de dispersion, là où il existe une forte variation de permittivité en fonction de la fréquence. Ainsi les chercheurs exploitent ces zones de dispersion dont l'origine est bien connue.

La dispersion α est associée à un processus de diffusion ionique au niveau de la membrane cellulaire. Il apparaît alors un phénomène de relaxation des contrions ainsi qu'un phénomène de polarisation des canaux ioniques. Les contrions sont des espèces chimiques chargées qui permettent, dans un milieu, de maintenir la neutralité électrique. Pour expliquer ce phénomène de dispersion, Schwartz [I.24] a considéré le cas où les contrions sont libres de bouger latéralement mais pas transversalement sur la surface de la cellule. Quand un champ externe est appliqué, le système est polarisé car les contrions vont se déplacer relativement vite par rapport à la cellule. Le rétablissement de l'état initial, c'est-à-dire avant l'application du champ externe, va être contrôlé par les lois de diffusion. La constante de temps correspondante en accord avec la théorie de Schwartz est :

$$\tau = \frac{a^2 e}{2\mu kT} \quad (I.1)$$

où a est le rayon de la cellule, e représente la charge élémentaire et μ la mobilité des contrions. Ce mécanisme conduit à une dispersion de la permittivité.

La dispersion β quant à elle est principalement due à la polarisation de la membrane cellulaire qui agit comme une barrière entre les milieux intra et extra cellulaires pour les flux d'ions. L'effet produit est appelé effet Maxwell - Wagner. Cet effet est un processus de relaxation d'interface qui intervient dans tout système pour lequel le courant électrique doit passer au travers de deux diélectriques. Cet effet s'illustre bien au moyen d'un condensateur plan contenant deux matériaux homogènes différents insérés en série entre ses armatures comme indiqué Figure I-14.

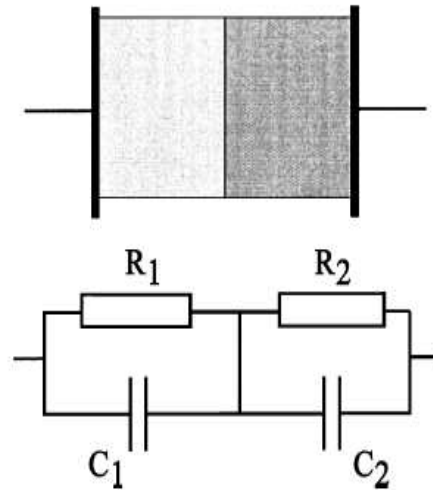


Figure I-14 : Circuit équivalent de l'effet Maxwell – Wagner.

La relaxation des dipôles dans le diélectrique, et donc le phénomène de dispersion, est modélisé par une conductance placée en parallèle à la capacité pour chaque diélectrique, de sorte que l'interface peut être chargée.

A une interface sans charge libre, le vecteur déplacement \vec{D} est continu en accord avec l'équation de Poisson. Comme $\vec{D} = \epsilon \cdot \vec{E}$, le champ électrique va être plus faible du côté où la permittivité est la plus élevée. Le rapport des densités de courant J_1 et J_2 des côtés 1 et 2 de l'interface est alors égal à :

$$\frac{J_1}{J_2} = \frac{\sigma_1 \cdot E_1}{\sigma_2 \cdot E_2} = \frac{\sigma_1 \cdot \epsilon_2}{\sigma_2 \cdot \epsilon_1} \quad (I.2)$$

Dans le cas particulier où $\sigma_1 \cdot \epsilon_1 = \sigma_2 \cdot \epsilon_2$, l'interface a une densité de charges nulle. Toutefois, si $\sigma_1 \cdot \epsilon_1 \neq \sigma_2 \cdot \epsilon_2$, la différence des densités de courant implique que l'interface est chargée. Elle sera également chargée si $\sigma_1 = 0$ et $\sigma_2 > 0$. Maxwell a déterminé une solution analytique pour la conductivité σ d'une suspension de particules sphériques (cellules) en prenant en compte les effets d'interface :

$$\frac{\sigma - \sigma_2}{\sigma + 2\sigma_2} = \frac{p(\sigma_1 - \sigma_2)}{\sigma_1 + 2\sigma_2} \quad (I.3)$$

où p représente la fraction volumique des sphères (l'indice 1 représente la particule et l'indice 2 le milieu). L'équation de Maxwell s'applique rigoureusement aux solutions diluées. Hanai a étendu la théorie pour des fractions volumiques élevées. La différence entre les valeurs attendues par les théories de Maxwell et Hanai n'est pas très prononcée sauf dans le cas de particules faiblement conductrices où par exemple, pour une fraction volumique de 0,5,

les conductivités de la suspension diffèrent d'environ 11 %.

Dans le but d'améliorer le modèle des systèmes biologiques comme le sang ou les cellules en suspension, cette théorie a été modifiée pour s'appliquer aux suspensions diluées de sphères recouvertes par une membrane dont l'épaisseur d est inférieure au rayon a de la sphère. Fricke a ainsi donné l'expression de la conductivité complexe :

$$\overline{\sigma}_1 = \frac{\overline{\sigma}_i - (2d/a)(\overline{\sigma}_i - \overline{\sigma}_{sh})}{(1 + d/a)(\overline{\sigma}_i - \overline{\sigma}_{sh})/\overline{\sigma}_{sh}} \quad (I.4)$$

où l'indice i représente le matériau de la sphère, sh celui de la membrane.

Pauly et Schwan [I.24] ont adapté ces équations au cas de suspensions de cellules avec une membrane de capacité C_m .

$$\begin{aligned} \Delta\epsilon' &= 9paC_m/4\epsilon_0 \\ \sigma_s &= \sigma_2(1 - 3p/2) \\ \tau &= aC_m(1/2\sigma_2 + 1/\sigma_1) \end{aligned} \quad (I.5)$$

Ces équations de Pauly-Schwan correspondent à une dispersion, aux radio fréquences, due aux effets de charges de la membrane cellulaire et une dispersion aux fréquences supérieures due à la différence de conductivité entre le cytoplasme et le milieu extra cellulaire.

Aux fréquences auxquelles nous travaillons pour notre étude, nous nous situons dans le domaine de dispersion γ . C'est Rajewsky et Schwan qui ont mis en avant l'existence de ce troisième domaine de dispersion aux fréquences micro ondes [I.17]. Il est dû principalement à un phénomène de relaxation des molécules d'eau car ce sont des molécules dites polaires. La forte électronégativité de l'oxygène par rapport à l'hydrogène implique l'apparition de charges partielles ayant pour effet de créer un moment dipolaire permanent (Figure I-15). De plus, comme pour tout dipôle, l'action d'un champ électrique local se traduit par la création d'un moment qui tend à l'aligner avec le champ électrique.

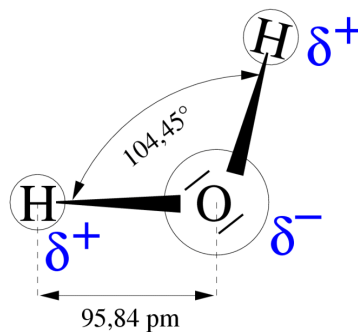


Figure I-15 : Dipôle de la molécule d'eau.

L'orientation des molécules polaires dans un champ électrique demande un certain temps, appelé temps de relaxation (τ), qui cause un phénomène appelé absorption dipolaire de Debye. Il en résulte que :

$$\underline{\epsilon}' = \epsilon_{\infty} + \frac{\epsilon_{rs} - \epsilon_{\infty}}{1 + j\omega\tau} \quad (I.6)$$

avec ϵ_{∞} la permittivité à haute fréquence et ϵ_{rs} la permittivité à basse fréquence.

Il est possible à partir du temps de relaxation τ de définir la fréquence caractéristique f_{car} qui représente la fréquence à laquelle la permittivité atteint sa valeur moyenne lors de la transition entre deux paliers sur la courbe de dispersion (Figure I-16). On a :

$$f_{car} = \frac{1}{2\pi\tau} \quad (I.7)$$

Les fréquences caractéristiques sont typiquement de l'ordre de 15 à 20 GHz pour l'eau. On note également que la fréquence caractéristique varie selon le type de cellule étudiée. Les cellules ayant une grande teneur en eau, il est donc particulièrement intéressant de sonder le contenu intracellulaire avec ces gammes de fréquences.

L'équation de Debye peut être séparée en ses parties réelles et imaginaires qui peuvent être tracées en fonction de la fréquence ou l'une par rapport à l'autre dans le plan complexe (diagramme d'Argand). Comme le montre la Figure I-16, on retrouve alors bien le phénomène de dispersion avec une chute brutale de la partie réelle de la permittivité en fonction de la fréquence et une augmentation de sa partie imaginaire qui peut être reliée à l'augmentation de conductivité observée sur les courbes de la Figure I-11.

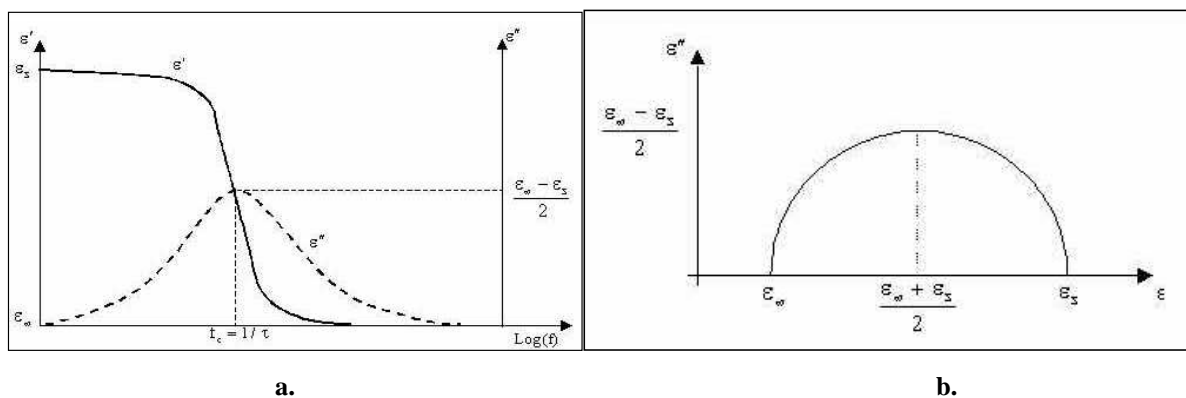


Figure I-16: a. Parties réelle et imaginaire de la permittivité ; b. Partie imaginaire de la permittivité en fonction de sa partie réelle (diagramme d'Argand).

Cette relation n'est valable que pour un mécanisme à un temps de relaxation. Toutefois, dans les milieux inhomogènes, il n'est pas rare de trouver non pas un temps de

relaxation mais une distribution de constantes de temps. De façon à en tenir compte, l'équation précédente devient :

$$\underline{\epsilon}_r = \epsilon_{r\infty} + \frac{\Delta\epsilon_1}{1 + j\omega\tau_1} + \frac{\Delta\epsilon_2}{1 + j\omega\tau_2} + \frac{\Delta\epsilon_3}{1 + j\omega\tau_3} + \dots \quad (I.8)$$

Cependant, le modèle de Debye ne permet d'introduire qu'une suite de valeurs discrètes des constantes de temps. C'est pourquoi afin d'exprimer les propriétés des tissus biologiques, l'équation de Cole-Cole est utilisée. En effet, le modèle de Cole-Cole permet d'introduire la notion de dispersion, au sens où les constantes de temps sont réparties suivant une distribution gaussienne autour d'une constante de temps moyenne notée τ_c . L'équation de Cole-Cole est la suivante :

$$\underline{\epsilon}_r = \epsilon_{r\infty} + \frac{\epsilon_{rs} - \epsilon_{r\infty}}{1 + j\omega\tau_c^{(1-\alpha)}} \quad (I.9)$$

Le paramètre α permet d'ajuster la largeur de la dispersion. Lorsque $\alpha = 0$, il n'y a pas de dispersion et on retrouve l'équation de Debye. Le tracé de la partie imaginaire de cette équation en fonction de sa partie réelle dans le plan complexe montre que cette nouvelle formulation permet de rendre compte de faits expérimentaux non retrouvés avec le modèle de Debye. En particulier, la hauteur maximale du cercle (maximum de ϵ'') observée expérimentalement est inférieure à la valeur prévue par le modèle de Debye. Le modèle de Cole-Cole permet de rendre compte de ce phénomène.

Ainsi, aux fréquences micro ondes, la membrane cellulaire est transparente permettant aux ondes de pénétrer à l'intérieur de la cellule. De plus, les propriétés diélectriques des cellules sont essentiellement liées à leur teneur en eau. Sachant que des cellules cancéreuses ont une teneur en eau plus importante que des cellules saines, elles auront donc une permittivité et une conductivité plus élevées [I.22]. Les fréquences micro ondes présentent donc de fortes potentialités pour la réalisation de capteurs visant à des applications diagnostiques comme par exemple la discrimination de cellules saines et cancéreuses. Toutefois l'utilisation de sondes coaxiales comme le montre la Figure I-17 reste très macroscopique et insuffisant pour sonder avec précision de très petits éléments comme les cellules. C'est pourquoi, avec le développement des micro technologies, de nombreuses études visent à mettre au point des bio-capteurs miniaturisés, permettant, comme nous allons le voir dans ce qui suit, une investigation à l'échelle microscopique.

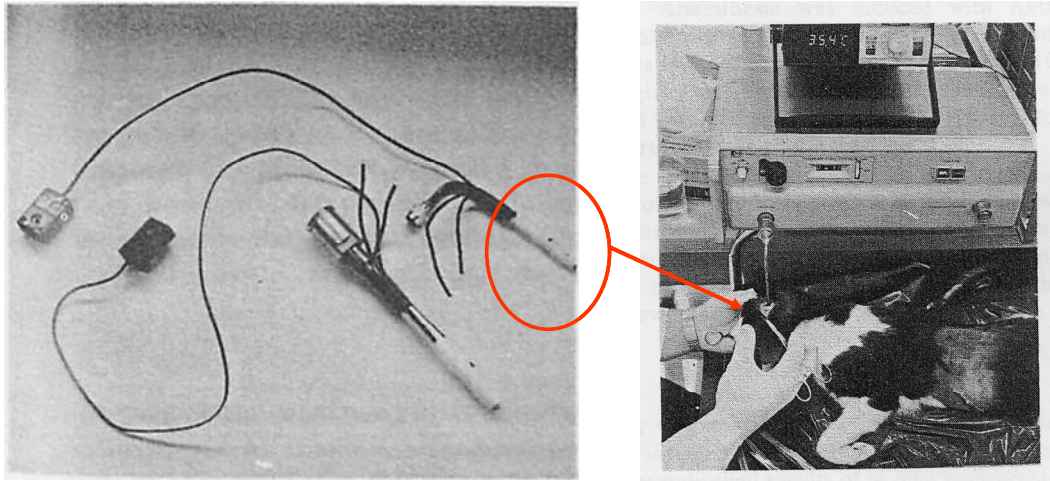


Figure I-17: Photographies : a. sondes coaxiales utilisées pour la caractérisation hautes fréquences de tissus biologiques et b. mesures in vivo [I.25]

III.3 Apport des micro technologies

Comme nous l'avons vu, l'étude des propriétés diélectriques des tissus biologiques renforce les connaissances voir apporte de nombreuses réponses au domaine de la biologie. Toutefois, un enjeu majeur réside depuis maintenant plusieurs années dans la miniaturisation des dispositifs d'analyse. En effet, un des objectifs majeurs à l'heure actuelle, consiste à développer des bio-capteurs permettant de travailler non plus à l'échelle des tissus mais à l'échelle de la cellule unique. Jusqu'alors, il n'était possible de faire qu'une observation sur un grand nombre de cellules, et les cellules rares étaient noyées dans l'effet de masse. Ainsi, l'information obtenue représentait une moyenne de la population analysée et c'est pourquoi les chercheurs s'intéressent aujourd'hui à une seule cellule en temps que système biologique.

Le développement des micro technologies a rendu possible cette avancée technique en levant un verrou technologique à savoir, la réalisation de très petits objets compatibles avec la taille de la cellule biologique.

III.3.1 Naissance des technologies BioMEMS

Les micro technologies permettent ainsi la mise au point de nouvelles approches pour l'investigation des milieux biologiques afin d'améliorer considérablement les applications biomédicales [I.26-I.27]. Il devient alors possible d'imaginer de nouveaux outils d'analyses à la fois plus sensibles, plus rapides et permettant une analyse en temps réel des échantillons. Ainsi, il est très rapidement apparu intéressant d'appliquer les micro technologies aux

domaines biologique et biomédical faisant ainsi émerger les technologies bioMEMS (Biological Micro-Electro-Mechanical Systems) qui facilitent le développement de puces biologiques complexes permettant une analyse complète d'éléments biologiques depuis leur manipulation jusqu'à leur analyse. De façon générale, les BioMEMS peuvent être définis comme des « dispositifs ou systèmes construits grâce à des techniques inspirées des micro/nano technologies. Ils se retrouvent donc utilisés pour le développement, la distribution, la manipulation, l'analyse ou la construction d'entités biologiques et chimiques » [I.28]. Ainsi, en permettant la mise en commun d'un nombre important de données, ces véritables « laboratoires sur puces » ou « lab-on-a-chip », représentent une avancée technique fondamentale pour la recherche biomédicale. Leur utilité est en effet scientifiquement incontestable car il devient alors possible, outre l'étude de cellules très ciblées, d'étudier de manière indépendante, des mécanismes biologiques particuliers indispensables aujourd'hui à la compréhension de nombreux phénomènes biologiques. On peut citer comme exemple le développement des cancers, l'apoptose cellulaire, ou encore l'identification de nouveaux traitements et la mise au point de nouveaux outils de diagnostic.

III.3.2 Les domaines d'application

Les champs de recherches et d'applications des BioMEMS sont donc très vastes. La Figure I-18 résume ces domaines à fort potentiel parmi lesquels nous pouvons notamment citer :

- les applications diagnostiques avec les bio-capteurs permettant de façon générale la détection et l'analyse cellulaire,
- les applications thérapeutiques englobant les micro systèmes pour l'administration de médicaments ainsi que les micro moteurs,
- les bio systèmes hybrides pour le développement entre autres d'organes artificiels en trois dimensions,
- le développement de nouveaux matériaux pour la micro fluidique, l'auto assemblage ADN/protéines,
- les matériaux dits « bio-inspirés » qui pourraient permettre par exemple, l'auto cicatrisation des tissus ou la réparation cellulaire.

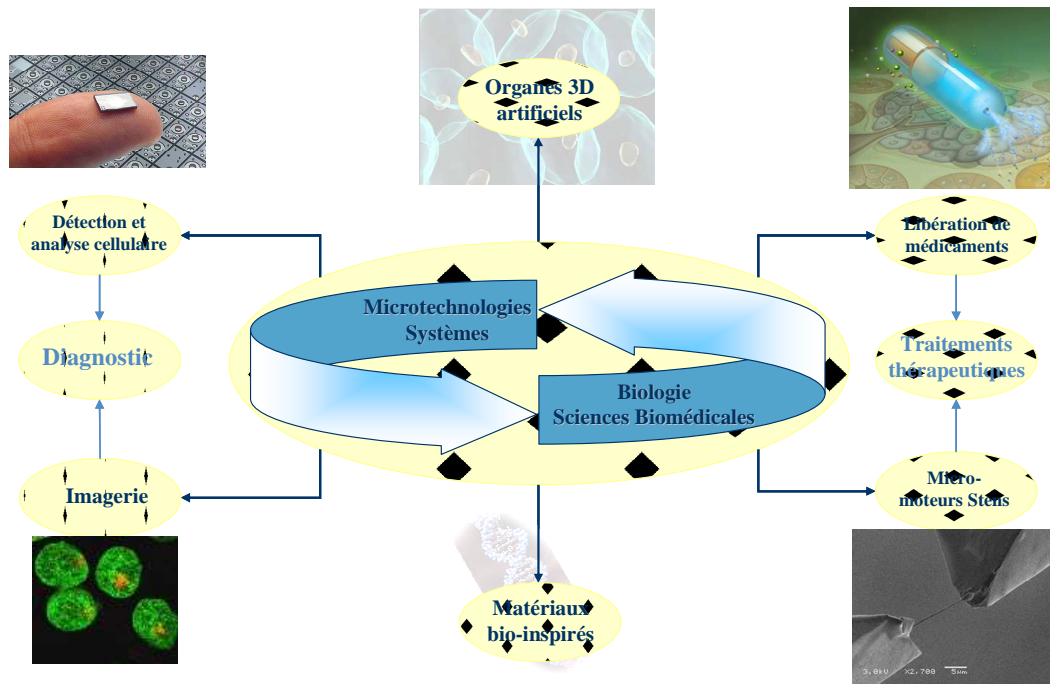


Figure I-18: Différents champs d'applications résultant de l'interaction entre les micro et nano technologies et les sciences biomédicales.

Parmi ce vaste champ d'investigation, nous nous focaliserons, dans notre travail, sur l'application aux diagnostics au travers du développement de micro bio-capteurs pour l'analyse cellulaire. Un second intérêt majeur d'utiliser les fréquences micro ondes pour la caractérisation cellulaire apparaît ici clairement. En effet, combinées aux micro technologies, il sera possible de miniaturiser fortement la taille des capteurs dédiés à la caractérisation cellulaire.

III.4 Applications diagnostiques : détection et caractérisation cellulaire

La plus importante part de recherches à ce jour, dans le domaine des BioMEMS, est consacrée aux applications diagnostiques. Ces appareils, aussi connus sous le nom de biopuces, sont utilisés pour permettre la détection et l'analyse de cellules, de microorganismes, de virus, de protéines ou encore de brins d'ADN. Comme nous l'avons introduit précédemment, l'utilisation des micro/nano technologies permet une détection à l'échelle micro/nanométrique et donc à l'échelle des cibles biologiques visées. Il en résulte une sensibilité plus élevée, une réduction du volume des échantillons et donc des coûts et du temps d'analyse, la réalisation de mesures en temps réel pour suivre éventuellement en direct

des processus biologiques mal connus, et enfin il est possible de tendre vers des systèmes d'analyse complets et portables.

Différentes méthodes de détection peuvent être mises en œuvre incluant les méthodes optique, mécanique, ou encore électrique. Nous nous attachons donc, dans ce paragraphe, à présenter quelques exemples de ces méthodes de détection, et à les comparer, de façon à mettre en évidence les potentialités de la méthode de caractérisation cellulaire choisie pour notre étude.

III.4.1 Méthodes de détection optique

III.4.1.a Méthodes de fluorescence

Les méthodes de détection et de caractérisation basées sur des techniques optiques sont probablement les plus répandues du fait de leur facilité de mise en œuvre en biologie et dans les sciences de la vie de manière générale. Une première approche utilise des techniques de marquage des éléments biologiques à analyser par des molécules fluorescentes.

Dans ce cas, des marqueurs fluorescents, capables d'émettre de la lumière à des longueurs d'ondes spécifiques, sont utilisés pour signaler une réaction d'association de molécules. La Figure I-19 illustre ce phénomène dont l'utilisation la plus connue concerne les biopuces à ADN. Le fonctionnement d'une biopuce à ADN repose sur le principe d'hybridation, qui se caractérise par l'appariement spécifique des bases entre elles : Adénine (A) avec Thymines (T) et Cytosine (C) avec Guanine (G). Ainsi une séquence AAGTC s'hybridera spécifiquement à sa séquence complémentaire TTCAG. Le principe de ces puces est toujours le même : une grille ordonnée de sondes, fragments d'ADN de séquence connue, fixées sur un support, est mise en présence de fragments d'ADN de séquence inconnue (dits « ADN cibles ») marqués par un fluorophore. Grâce à la spécificité de la réaction d'hybridation, les sondes retiennent uniquement leurs séquences complémentaires éventuellement présentes dans l'échantillon.

Des techniques optiques d'analyse de la fluorescence (Figure I-20) permettent par la suite de détecter l'interaction sonde/cible et d'en déduire la présence d'ADN hybridé. Ainsi, après une étape de lavage, permettant d'éliminer les cibles non hybridées, la quantification des signaux obtenus et l'identification des fragments de gènes reconnus sont possibles grâce à un système d'acquisition d'images puis d'analyse des données faisant appel à des logiciels informatiques spécialement conçus à cet effet. Les résultats obtenus sont ensuite validés sur le plan statistique [I.29].

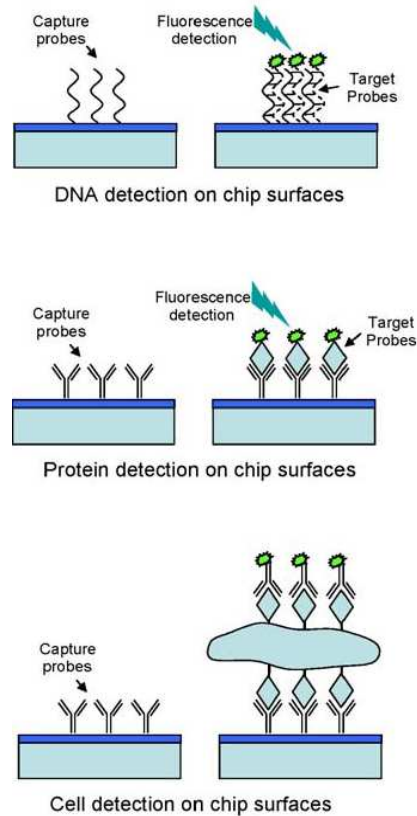


Figure I-19: Schéma de principe utilisé pour la détection par marquage avec des particules fluorescentes [I.28].

L'attachement des brins d'ADN [I.30], des protéines [I.31] ou autres molécules sur des surfaces le plus souvent en métal comme l'or ou isolant comme l'oxyde de silicium est très critique pour capturer de façon efficace la cible biologique et fait l'objet de recherches pour fonctionnaliser les surfaces de réception.

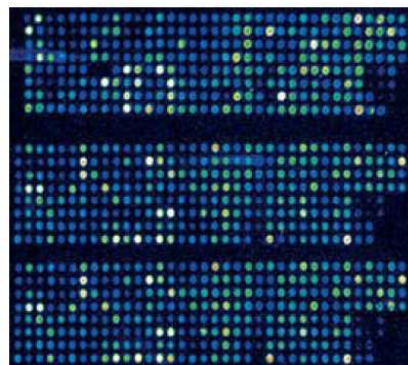


Figure I-20: Image obtenue par scanner de fluorescence d'une biopuce à ADN [I.29].

Des progrès plus récents en détection par fluorescence ont permis de mettre au point des biopuces pour la détection de cellules uniques [I.32].

Un autre exemple de technique de détection optique est basé sur la recherche dans le domaine des Quantum dots (Qdots). En effet, ces semi-conducteurs qui présentent des propriétés fluorescentes hors normes, permettent d'atteindre de fortes résolutions pour l'imagerie et l'analyse cellulaire. En effet, l'imagerie avec des Qdots ouvre de nouvelles voies dans le suivi de processus biologique en temps réel. Le Quantum peut être utilisé comme sonde attaché à une protéine ou à un récepteur pour voir avec quelles autres molécules il réagit, dans quelle partie de la cellule il intervient et quelle voie de signalisation la protéine peut utiliser pour réaliser des fonctions normales ou anormales chez la cellule, fonctions anormales qui peuvent conduire au développement de cancers. Les Qdots se dégradent moins rapidement que les autres marqueurs et permettent donc une exploration des processus biologiques plus longue qu'avec des marqueurs classiques. De plus, leur taille nanométrique (Figure I-21), permet d'atteindre de bon contraste en microscopie électronique. Les chercheurs espèrent qu'un jour ces nanoparticules permettront à la fois le diagnostic et le traitement de tumeurs : la technologie QDots permettrait de localiser efficacement la tumeur et de déterminer de quel type de cancer il s'agit, et peut être, armé de substances toxiques pourrait tuer les cellules lésées [I.33].

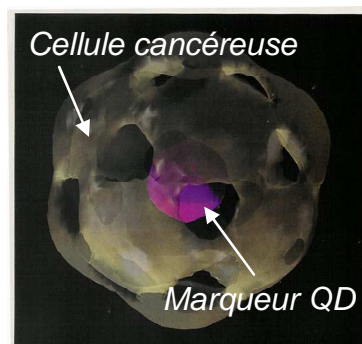


Figure I-21: Marquage d'une cellule cancéreuse par un QDot (taille entre 1 et 10 nm)
[I.34].

Les inconvénients majeurs de ces techniques de détection optiques restent l'utilisation de marqueurs spécifiques qui rendent la préparation des échantillons plus longue, plus complexe et plus coûteuse. Par-dessus tout, ces marqueurs peuvent contaminer le milieu biologique à analyser ou tout du moins influencer son comportement et rendre plus complexe la réutilisation des échantillons après analyse. La question de la dégradation de ces marqueurs dans le corps se pose également.

Pour parer à cette problématique des études consistent à développer l'utilisation de marqueurs dits « naturels ». Par exemple, nous pouvons citer les travaux de M. Chalfie, O.

Shimomura, et R. Y. Tsien concernant respectivement la découverte, l'utilisation et l'amélioration de la GFP (Green Fluorescent Protein) [1.35]. Cette protéine fluorescente verte est naturelle (Figure I-22). Etant donné que c'est une protéine, elle est produite de la même façon que toutes les autres à savoir par la traduction de l'information contenue dans l'ADN des cellules. M. Chalfie a donc fusionné le gène codant pour la GFP avec celui codant pour une protéine d'intérêt de sorte que lorsque cette protéine est synthétisée par la cellule, la GFP l'est aussi. Ainsi, la protéine produite que l'on souhaite étudier est naturellement fluorescente [1.35].

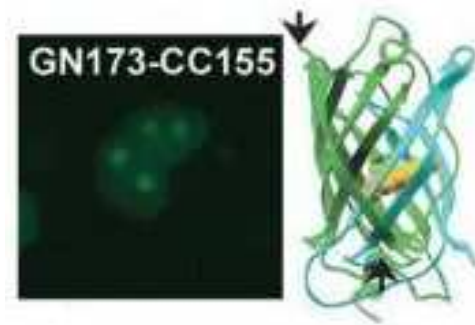


Figure I-22: Réassemblage multicolore de la protéine fluorescente GFP [1.35].

Cette découverte révolutionnaire a valu à ces trois chercheurs le prix Nobel de Chimie en 2008. Notons que la préparation de l'échantillon nécessite toutefois encore un traitement génétique, complexe et coûteux.

III.4.1.b Interactions avec les ondes du spectre optique

Une seconde approche consiste à utiliser les ondes du domaine optique pour sonder les éléments biologiques. Prenons l'exemple des cellules qui représentent l'enjeu de notre étude. L'idée consiste à mesurer leur indice de réfraction effectif en les considérant dans leur globalité (modèle de la sphère homogène). En effet, cet indice est lié à la concentration de protéine au sein de la cellule. Etant donné qu'une cellule cancéreuse présente une concentration en protéines plus élevée, la mesure de l'indice de réfraction effectif doit permettre la discrimination d'une cellule saine et cancéreuse pour un même type cellulaire. Dans l'exemple choisi, une méthode différentielle présentée Figure I-23 est utilisée.

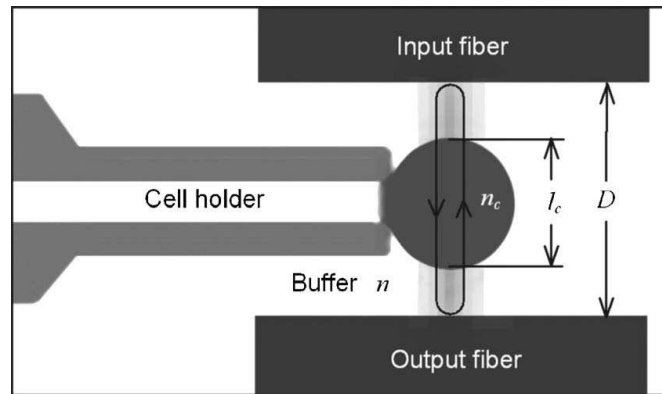


Figure I-23: Principe de fonctionnement d'une puce utilisant une cavité Fabry-Pérot pour la détection cellulaire [I.36].

Elle consiste en deux fibres monomodes alignées face à face et d'un dispositif de maintien d'une cellule submergée dans une solution tampon. La cellule est donc maintenue fixe entre les deux fibres dont les faces sont traitées pour être hautement réfléchissantes de sorte qu'elles forment une cavité Fabry-Pérot. La présence ou non de cellules, ainsi que leur état et leur taille, influence la réponse spectrale du Fabry-Pérot. Ainsi, la réponse d'une solution tampon sans cellule et comparée à la réponse de la même solution tampon contenant les cellules sous test. La présence des cellules dans la solution tampon induit un décalage en longueur d'onde de la réponse spectrale de la cavité. Ainsi, il est possible d'extraire la taille de la cellule analysée ainsi que son état pathologique. La méthode présente l'avantage de ne pas nécessiter le recours à des marqueurs spécifiques et permet la détection et la discrimination (cellule saine/cellule cancéreuse) de cellules vivantes uniques issue du même type cellulaire avec une bonne précision [I.36]. De plus, l'utilisation des fibres optiques dans le domaine de la détection cellulaire par voie optique est particulièrement intéressante puisqu'elle permet l'intégration des dispositifs contrairement aux méthodes optiques classiques avec marqueurs. Notons que la détection sans marqueur est possible dans ce cas grâce à l'étude de l'interaction onde/matière biologique. Ce dernier point est une étape indispensable pour s'affranchir de l'utilisation de marqueurs.

Même si de nouvelles perspectives se dessinent, ce type de capteurs reste en marge, et la majorité des méthodes de détections basées sur des techniques optiques nécessitent le marquage des cellules à analyser, étape qui reste problématique comme nous l'avons vu précédemment. L'affranchissement de l'utilisation de marqueurs spécifiques passe par l'utilisation de méthodes de détection sensibles aux phénomènes d'interaction ondes/matières, permettant de développer des outils pour la spectroscopie cellulaire.

III.4.2 Méthodes de détection mécanique

Dans ce cas, la détection d'entités biologiques ou de réactions biochimiques se fait grâce à l'utilisation de micro/nano cantilevers. Comme le montre la Figure I-24, ces cantilevers peuvent être utilisés de deux façons différentes basées sur la modification du stress du cantilever, ou sur la variation de sa masse.

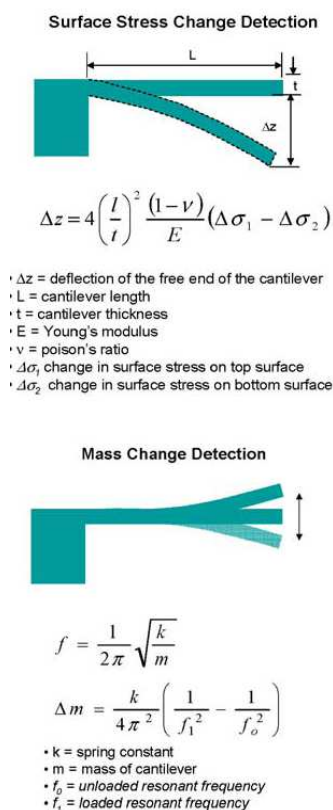


Figure I-24: Schémas illustrant le principe de détection et d'analyse de réactions biochimiques avec un cantilever.

Dans le premier cas, la réaction biochimique a lieu préférentiellement à la surface du cantilever et provoque une modification de son énergie libre. Cela implique donc une variation du stress appliqué à la surface qui peut se mesurer par la courbure du cantilever. La déflexion de celui-ci peut alors se mesurer de façon optique, par AFM, ou de façon électrique avec par exemple une résistance piézoélectrique incorporée au niveau de l'ancrage du cantilever. Pour augmenter la sensibilité du cantilever au stress, sa constante d'élasticité doit être réduite tandis que l'ensemble de sa surface définit le nombre de molécules qui doivent être fixées pour induire une variation significative de son stress. Dans le second cas, basé sur le principe de détection par variation de masse, le cantilever est excité mécaniquement de sorte qu'il vibre à sa fréquence de résonance qui est mesurée de façon optique ou électrique et

comparée à celle obtenue après la fixation d'entités biologiques. La variation de masse peut être perçue par détection d'une variation de la fréquence de résonance, en supposant que la constante d'élasticité de varie pas. Il est à noter qu'en milieux liquides, le facteur de qualité diminue fortement et qu'il est alors plus difficile de détecter efficacement une variation de masse. C'est pour cette raison que la méthode basée sur la variation du stress du cantilever est préférée en milieu liquide.

Un des principaux avantages de ces méthodes repose sur leur capacité à détecter l'interaction entre entités sans avoir à introduire de marqueurs. Ces dernières années, des avancées importantes en termes de détection biochimiques ont été réalisées. La détection de brins d'ADN et de protéines sans marqueur, basée sur une variation de stress, a été démontrée en utilisant des cantilevers en Silicium [I.37], comme l'illustre la Figure I-25.

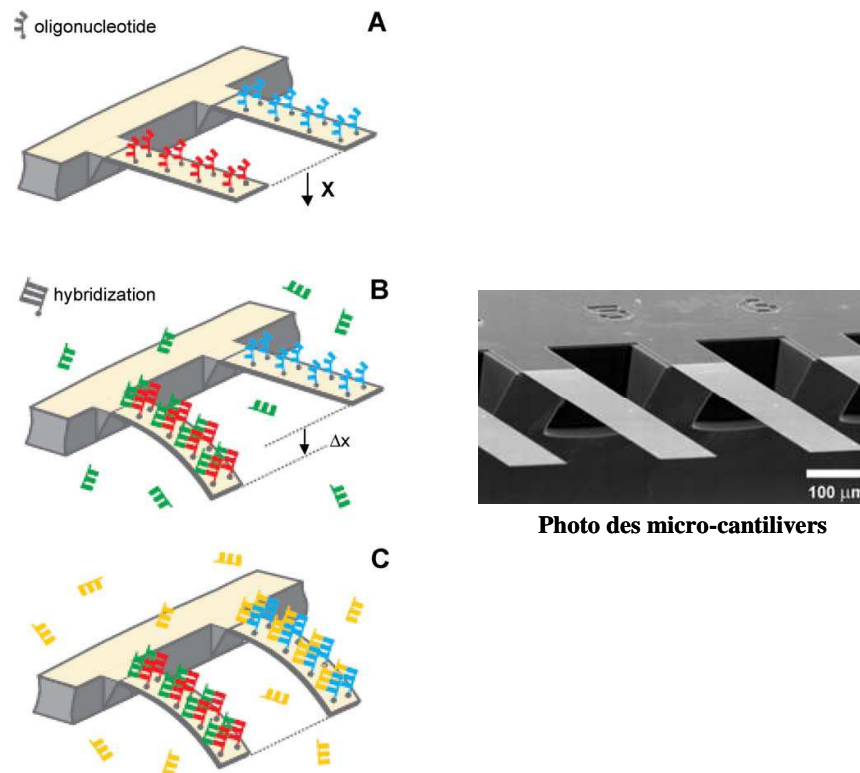


Figure I-25: Détection sans marqueur de l'hybridation de brins d'ADN [I.37].

Etant donné que cette technique est basée sur une modification de l'énergie libre de surface des cantilevers, la sensibilité sera meilleure si nous considérons des interactions uniformes comme par exemple les couches que forme l'ADN hybridé à la surface des cantilevers. Il sera donc très difficile voir impossible de détecter par cette méthode des cellules attachées de façon ponctuelle à la surface des cantilevers.

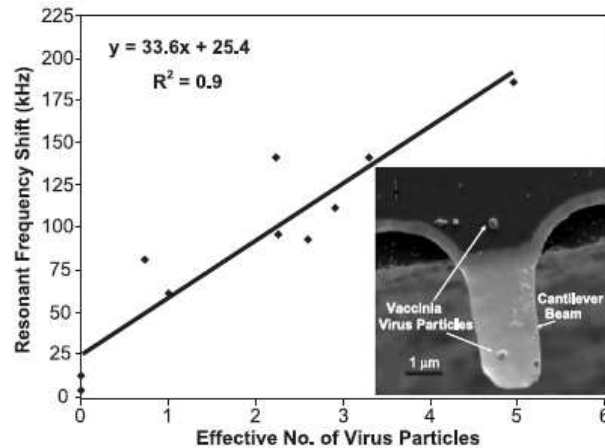


Figure I-26: Variation de la fréquence de résonance d'un cantilever en fonction du nombre de virus capturés [L.38].

Par contre, la détection de cellules ou de microorganismes a été démontrée en utilisant la méthode de détection par variation de masse et donc par variation de la fréquence de résonance des cantilevers. Nous pouvons citer comme exemple la détection d'une seule particule du Vaccinia virus (virus utilisé comme vaccin contre la variole) illustrée sur la Figure I-26 [L.38].

Parmi ces dispositifs, basés sur les méthodes de détection mécaniques, les systèmes à ondes acoustiques ont aussi connu un grand intérêt. Les résonateurs à ondes acoustiques présentent des modes de vibrations, chacun d'entre eux étant caractérisé par sa fréquence de résonance spécifique et son facteur d'atténuation qui correspondent respectivement à l'énergie acoustique stockée et à l'énergie dissipée. Ils sont aujourd'hui utilisés aussi bien pour l'étude de paramètres cinétiques ou thermodynamiques de réactions biochimiques que pour l'étude de systèmes biologiques. Ces capteurs fonctionnent sur le principe de piézoélectricité découvert en 1880 par les frères Curie. Ce phénomène repose sur la formation de charges électriques à la surface d'un solide suite à l'application d'une pression. A l'opposé, la déformation mécanique provoquée par l'application d'un champ électrique est appelé l'effet piézoélectrique inverse.

Ainsi, il est par exemple possible de détecter la présence du parasite *Cryptosporidium parvum* qui se développe dans l'eau courante. Le principe du capteur repose sur la variation de masse du cantilever excité de façon piézoélectrique. Le capteur est formé d'une couche conductrice en zirconate de titane (PZT) liée à une couche non piézoélectrique de 1 mm d'épaisseur. La couche PZT sert à la fois de couche d'actionnement par effet piézoélectrique et d'élément sensible aux parasites. Quand un champ électrique est appliqué à travers le film

de PZT, il se déforme dans sa longueur en provoquant la courbure de la couche non piézoélectrique. Si le champ appliqué est alternatif, le capteur résonne quand la fréquence d'excitation coïncide avec la fréquence de résonance propre du cantilever. La surface des cantilevers est fonctionnalisée pour obtenir un attachement du type anticorps-parasite. Sur le principe de variation de masse détaillé précédemment, la fixation des parasites provoque un décalage de la fréquence de résonance des cantilevers comme le montre la Figure I-27 [I.39].

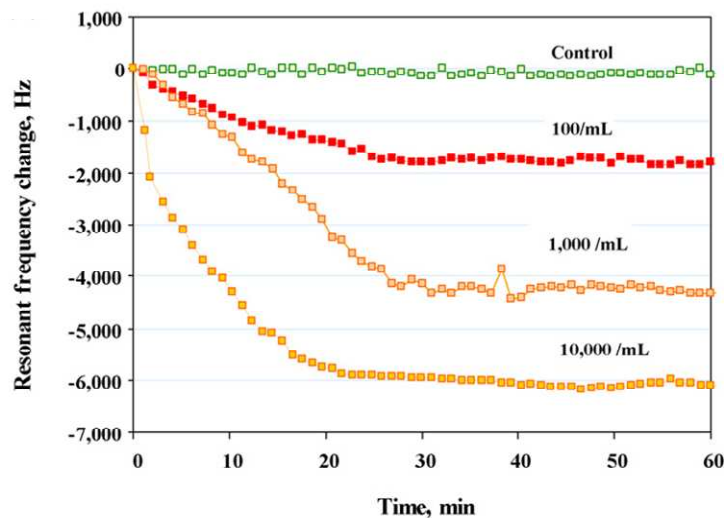


Figure I-27: Variation de la fréquence de résonance d'un cantilever en fonction de la concentration de parasites immobilisés [I.39].

Toutefois, même si ces méthodes de détections mécaniques ne nécessitent pas de marqueur spécifique, leur inconvénient majeur reste la fonctionnalisation souvent délicate des surface des cantilevers et leur manque de sensibilité à la présence de cellules en milieu liquide.

III.4.3 Méthodes de détection électrique

Ces méthodes offrent, par rapport aux méthodes de détection optique, des possibilités plus vastes en termes d'études de l'interaction onde/matière biologique. D'une part parce que le spectre fréquentiel concerné est plus vaste et englobe plus de phénomènes physiques au sein des tissus biologiques (Figure I-13), mais aussi parce qu'elles permettent de mettre en place plus facilement des techniques de détection dites « sans marqueur », qui peuvent être particulièrement intégrées et portables.

III.4.3.a Capteurs électrochimiques (10^1 - 10^7 Hz)

De façon très générale, aux basses fréquences, c'est-à-dire dans le domaine de dispersion β , il existe trois principaux types de détection comme le montre la Figure I-28. Notons que nous ne parlerons pas ici du domaine de dispersion α , peu exploité avec ces méthodes étant donné qu'il existe des effets de polarisation des électrodes de mesure souvent difficiles à contrôler.

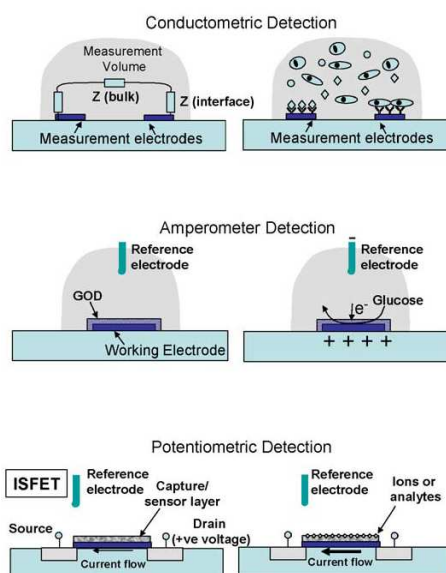


Figure I-28: Schémas de principe de détection basés sur des méthodes conductimétriques, ampérométriques ou potentiométriques [I.28].

Les bio-capteurs potentiométriques permettent d'obtenir une information sur l'échantillon analysé à partir de la différence de potentiel mesurée entre deux électrodes. Les bio-capteurs ampérométriques mesurent quant à eux le courant résultant d'un potentiel appliqué entre une électrode de référence et une électrode de travail de façon à provoquer une réaction d'oxydoréduction sur des espèces électro réactives. Enfin, les bio-capteurs conductimétriques mesurent une variation de conductance associée à des changements dans la totalité du milieu ionique entre deux électrodes et ce à différentes fréquences [I.40]. Très souvent, un courant alternatif est utilisé pour les mesures et il est alors aussi possible de déterminer des variations d'impédance capacitive. On parle alors de capteurs de bio-impédance. Ils permettent donc de mesurer les variations de conductivité et de permittivité de différentes espèces qui peuvent être biologiques étant donné que ce sont des matériaux à la fois diélectriques et conducteurs de courant. Plusieurs considérations pratiques rendent ces méthodes conductimétriques très attractives, à savoir leur faible coût et aussi particulièrement

leur simplicité de mise en œuvre étant donné qu'il n'est pas nécessaire d'utiliser une électrode de référence comme c'est le cas dans les deux autres approches. Ces méthodes sont d'ailleurs très utilisées pour la détection d'entités biologiques.

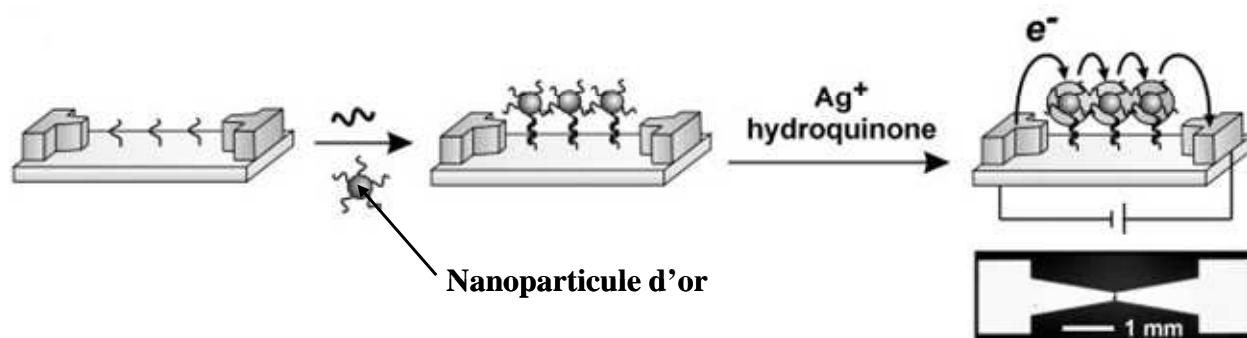


Figure I-29: Détection d'ADN par conductimétrie [I.41].

Par exemple, la Figure I-29 illustre le principe de détection développé par des chercheurs pour étudier l'hybridation de brins d'ADN par la mesure de la variation de conductance entre deux électrodes. Des séquences d'ADN sont marquées par des nanoparticules d'or. La séquence d'ADN ciblée possède d'une part les bases complémentaires au brin de « capture » mais aussi aux bases attachées aux nanoparticules d'or. Quand le capteur, composé de deux électrodes Au/Ti séparées de $20\ \mu\text{m}$ réalisées sur un substrat de silicium et fonctionnalisées pour fixer les brins d'ADN de « capture », est immergé dans une solution contenant l'ADN « cible » appropriée, les nanoparticules d'or viennent obstruer le gap entre les deux électrodes entraînant une variation de conductivité ou de capacité qui permet de déduire le nombre de particules et donc de molécules « cibles » qui obstruent le gap [I.41]. Pour amplifier la variation de conductivité et ainsi augmenter la sensibilité du capteur, le dispositif est exposé à une solution constituée d'Argent(I) et d'hydroquinone. Les nanoparticules d'or servent alors de promoteurs pour la réduction des ions Argent en Argent métallique à leur surface [I.42]. Cette méthode, qui nécessite le recours à des particules d'or comme marqueurs, constitue une avancée en termes de détection car elle présente l'avantage (contrairement aux méthodes optiques) de ne pas utiliser de réactifs qui peuvent modifier chimiquement les entités biologiques ciblées.

La détection de cellules [1.43] et de bactéries [1.44] a aussi été démontrée par ces techniques qui permettent la mise en place de procédés, basés sur l'interaction d'un champ électromagnétique avec la matière biologique et n'utilisant ainsi pas de marqueur spécifique, ce qui constitue un véritable point fort pour ces techniques dites de bio-impédance.

Le principe de base repose donc sur la détection d'une variation d'impédance causée par la présence d'éléments biologiques placés entre des électrodes métalliques. Par exemple, il est possible de détecter la présence de bactéries uniquement par la variation d'impédance qu'elles engendrent en s'immobilisant entre des électrodes inter-digitées en or.

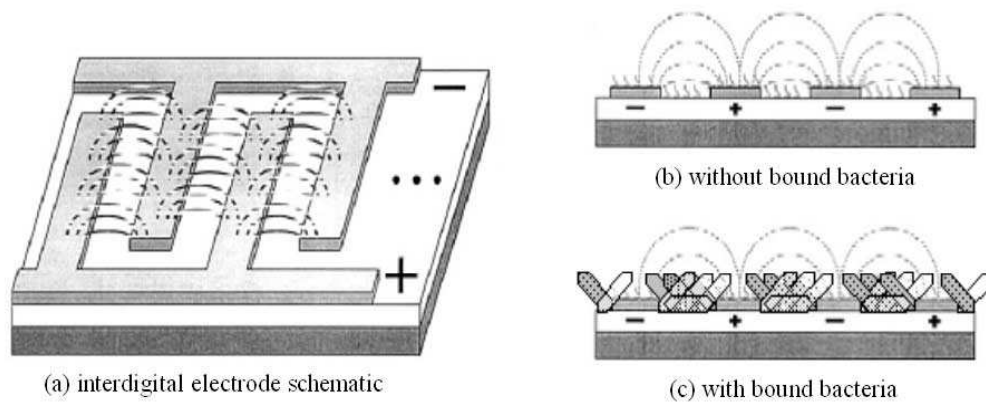


Figure I-30: Répartition du champ électrique entre (a) des électrodes inter-digitées, (b) vue en coupe des électrodes, (c) vue en coupe des électrodes avec des bactéries immobilisées à leur surface [I.44].

Comme le montre la Figure I-30, dans la configuration présente, il y a une forte interaction entre les bactéries *Escherichia Coli* immobilisées entre les électrodes d'or et le champ électromagnétique qui s'y propage. Ainsi, la résistivité du cytoplasme des bactéries (106 Ohm/cm^2) ainsi que la conductance de la membrane ($1 \mu\text{F.cm}^2$) induisent une variation d'impédance entre les électrodes d'or illustrée par la Figure I-31. R_{SOL} représente la résistance de la solution. La capacité C_{SOL} est représentative du comportement diélectrique de la solution. R_{CYT} , R_{BLM} et C_{BLM} représentent l'impédance de la bactérie à savoir respectivement la résistance du cytoplasme, la résistance de la membrane cellulaire et sa capacité.

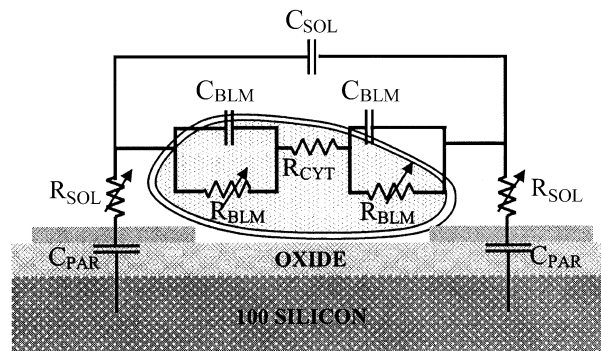


Figure I-31: Modélisation de l'impédance introduite par une bactérie immobilisée entre deux électrodes inter-digitées [I.44].

Les capteurs sont fabriqués avec un procédé de microélectronique standard et des anticorps sont fixés à la surface des électrodes pour permettre la fixation des bactéries. Lorsque les capteurs sont plongés dans une solution contenant les bactéries, les antigènes de ces dernières réagissent avec les anticorps et les bactéries se retrouvent immobilisées à la surface des électrodes (Figure I-32-a).

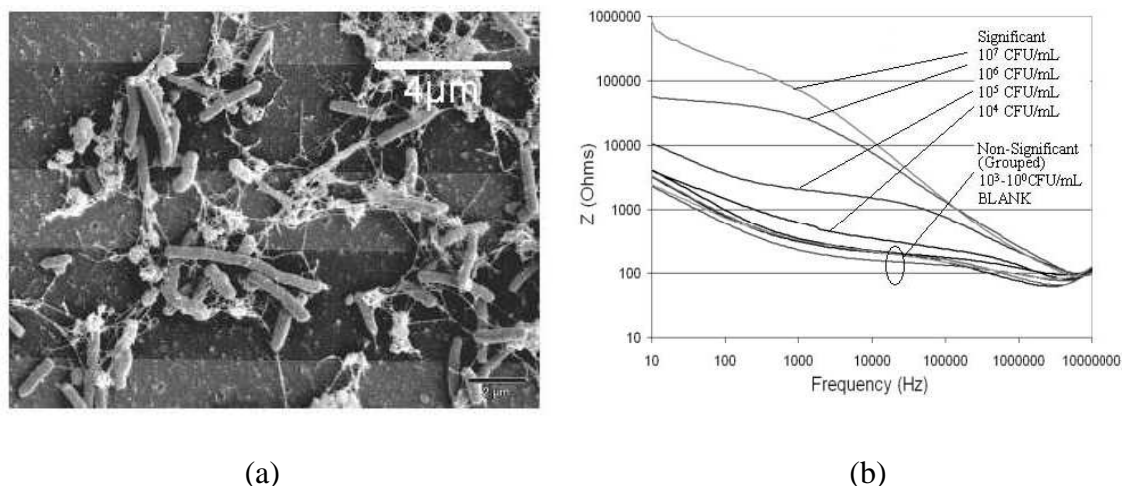


Figure I-32: (a) Photographie prise au microscope électronique à balayage de bactéries liées aux électrodes d'or (concentration dans la solution : 10^6 cellules/mL) – (b) Impédances mesurées pour différentes concentration de solutions sur la gamme de fréquences 10 Hz-10 MHz.

Un potentiel de 50 mV est appliqué entre les électrodes puis l'amplitude et la phase de l'impédance des bio-capteurs sont enregistrées à l'aide d'un impédance-mètre. Les impédances mesurées pour différentes concentrations de cellules (de 10^0 à 10^7 cellules/mL) montrent que l'impédance du bio-capteur augmente linéairement avec le nombre de cellules présentes dans la solution d'analyse. L'effet de polarisation de la bactérie à la surface du capteur (dispersion β) ne commence à faire varier l'impédance qu'à partir d'une concentration minimale de 10^4 cellules/mL [I.44]. Aux plus hautes fréquences, en limite de la zone de dispersion β , l'effet des bactéries est moindre et la sensibilité de détection du dispositif est très diminuée. Les valeurs d'impédance de la solution chargée par des bactéries tendent alors vers celles de la solution d'analyse pure, d'où la convergence des valeurs d'impédance observées sur la courbe de la Figure I-32-b.

Les méthodes basées sur les mesures de bio-impédance permettent donc l'analyse de cellules sans avoir recours à des marqueurs spécifiques grâce à l'étude de l'interaction ondes électromagnétiques/matière biologique. Comme ce dernier exemple l'indique, la détection est

optimale dans la zone de dispersion. Pour travailler plus haut en fréquence, il est nécessaire de développer des outils d'analyse particuliers, sensibles aux phénomènes de relaxation des molécules d'eau (dispersion γ) qui ont alors lieu dans la matière biologique.

III.4.3.b Capteurs de bio-impédance pour les hautes fréquences

L'étude de l'interaction ondes électromagnétiques/matière vivante aux fréquences micro ondes repose donc sur la capacité à créer des dispositifs sensibles au phénomène de dispersion γ . Les systèmes hyper-fréquences développés pour l'analyse cellulaire ont des similitudes en termes de conception et de méthodes de détection avec les méthodes impédance-métriques détaillées précédemment.

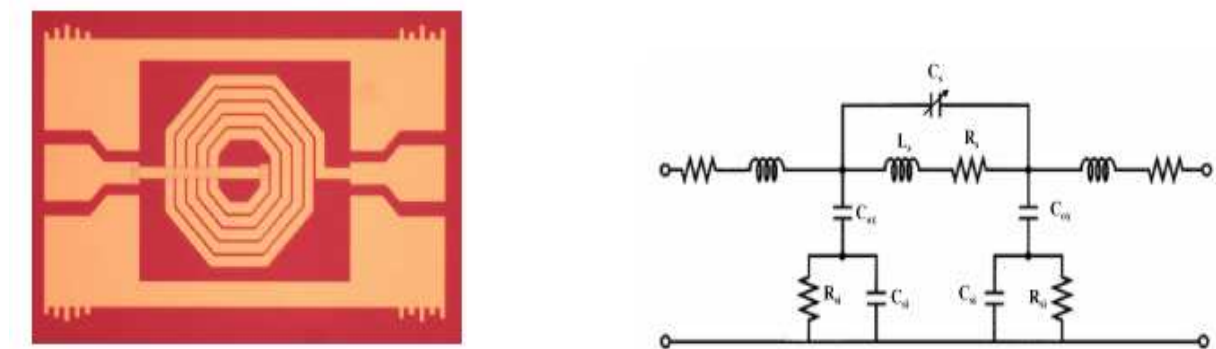


Figure I-33: Structure d'une inductance avec son modèle électrique équivalent pour la détection de l'hybridation de séquences d'ADN.

Un exemple typique concerne les premiers micro-dispositifs hyper-fréquences pour l'analyse biologique qui ont vu le jour et qui étaient dédiés à l'étude du séquençage de brins d'ADN. En effet, il a été montré que la détection d'ADN hybridé était possible grâce à l'utilisation de circuits intégrés passifs opérant sur une bande de fréquence de 40 MHz à 40 GHz [I.45-I.46]. Différentes structures, comme une inductance en spirale (Figure I-33) ou une capacité inter-digitée ont été proposées.

Le principe de la méthode de bio détection utilisée repose sur la réaction chimique, vue précédemment, entre l'ADN hybridé marqué par des particules d'or et une solution à base d'argent [I.47] comme le montre la Figure I-34.

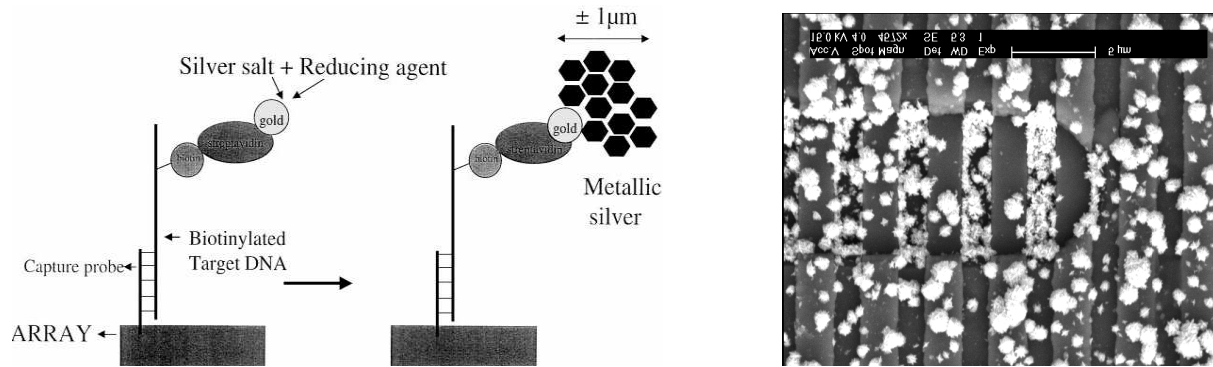


Figure I-34: Procédé de détection d'hybridation d'ADN par précipité d'argent.

L'hybridation de l'ADN provoque la précipitation de micro particules d'argent sur la structure ce qui entraîne une variation de la capacité C_s et donc une variation de la fréquence de résonance de l'inductance. Cette variation est d'autant plus forte qu'il y a d'ADN hybridé. Elle peut se mesurer simplement grâce à un analyseur de réseaux vectoriels. Ce dispositif micro ondes d'analyse permet la détection d'une variation de la fréquence de résonance avec une précision de 50 MHz au minimum. Cette forte sensibilité du dispositif résonant permet d'envisager la détection d'ADN hybridé dans de très faibles concentrations.

Toutefois, dans ce cas, le signal RF mesuré est caractérisé par des composants tels que des résistances, des capacités, des inductances ou encore une combinaison de ces éléments. La conception de ces micro bio-capteurs RF est basée sur l'exploitation de lignes de transmission dont l'implémentation permet d'atteindre différentes réponses et différentes sensibilités à des fréquences dans le domaine des GigaHertz [I.48-I.49]. Des exemples d'implémentation simples sont donnés par la Figure I-35.

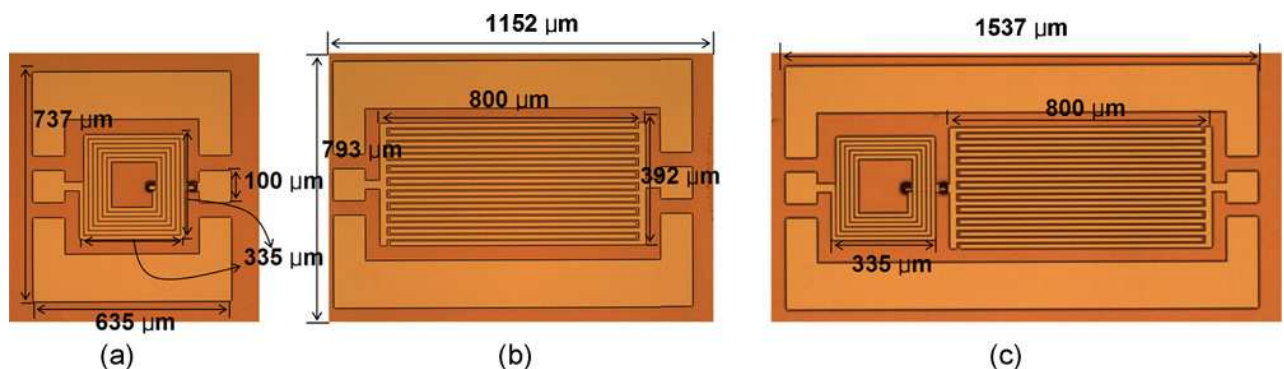


Figure I-35: Exemple de dispositifs hyper-fréquences pour l'analyse d'éléments biologiques [I.48] : (a) inductance, (b) capacité et (c) résonateur LC.

Tout comme dans le cas des capteurs impédance-métriques, un intérêt majeur de ces capteurs RF concerne la possibilité, grâce à l'étude de l'interaction onde/matière, de développer des méthodes sans marqueur. En effet, dans les dispositifs hyper-fréquences, l'énergie du signal d'entrée est concentrée à la surface des lignes impliquant des pertes d'insertion et des pertes par réflexion. Si une bio molécule (protéine ou cellule par exemple) qui a des propriétés diélectriques intrinsèques (permittivité, conductivité), se retrouve près des lignes, des changements peuvent être enregistrés dans les effets capacitifs ou inductifs. Dans ce cas, il est alors possible de détecter des variations dans les caractéristiques RF du dispositif de la même façon que l'on observait une variation d'impédance dans le cas des dispositifs plus basse fréquence. Il est bien connu qu'une variation de permittivité aura un effet plus important sur l'effet capacitif, alors qu'une variation de conductivité aura un effet prépondérant sur l'effet inductif. Dans tous les cas, il a été montré que pour des systèmes larges bandes constitués uniquement d'une inductance ou d'une capacité, la variation induite par des éléments biologiques sur les paramètres RF caractéristiques des dispositifs n'est pas très significative et même si elle existe demeure très faible [I.45]. En revanche, la combinaison d'une inductance et d'une capacité, autrement dit la conception de dispositifs résonants LC, permet un effet de synergie sur les caractéristiques RF rendant de tels dispositifs beaucoup plus sensibles à de très petites variations de paramètres et donc beaucoup plus sensibles à la présence d'une très faible quantité de cellules. Ainsi, la détection de bio molécules devient possible en mesurant par exemple les pertes qu'elles induisent sur la réponse en réflexion du dispositif LC. Comme le montre la Figure I-36, la présence de bio molécules agit comme une résistance et cette augmentation globale de la résistance du dispositif conduit à une variation significative de l'impédance du dispositif [I.46].

Ainsi, il est possible avec ce type de dispositif de détecter et d'identifier des cellules en mesurant leur conductivité et/ou leur permittivité. Ces techniques ne nécessitent pas le recours à des marqueurs spécifiques du type molécules fluorescentes ou particules d'or et permettent donc d'envisager la réutilisation de la matière biologique après analyse.

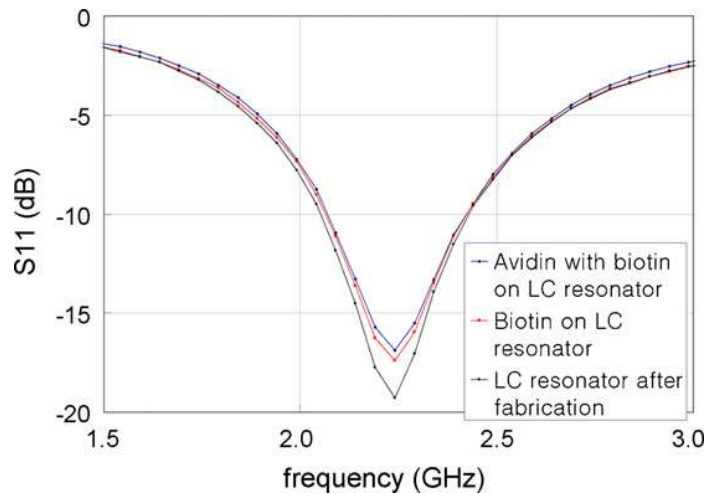


Figure I-36: Réponse en réflexion d'un dispositif LC – Comparaison des réponses du résonateur à vide, après fonctionnalisation de sa surface et après fixation de biomolécules.

Dans les exemples cités, il est nécessaire de fonctionnaliser les surfaces pour immobiliser les éléments biologiques mais le développement de la microfluidique ouvre une voie alternative. En effet, il est facile d'intégrer à ce genre de dispositifs planaires des réseaux de canaux de façon à amener les éléments biologiques à analyser sans avoir à traiter les surfaces des bio-capteurs et ainsi fabriquer de véritables laboratoires sur puce intégrant différentes fonctions tout en gérant la manipulation des cellules à analyser.

Des investigations sont aussi réalisées aux très hautes fréquences, dans le domaine des Téra hertz, pour exploiter des effets à une échelle encore plus petite au niveau de la cellule. Ainsi, la propagation d'ondes THz le long de fils nanométriques permet l'investigation de phénomènes biologiques ciblés au sein de cellules uniques. Ces fils nanométriques, propageant des modes particuliers dits modes de Goubau [I.50], sont implémentés au sein d'une puce qui intègre un réseau microfluidique pour gérer la circulation des cellules analysées [I.51]. Un schéma ainsi qu'une photo de la puce sont donnés avec la Figure I-37.

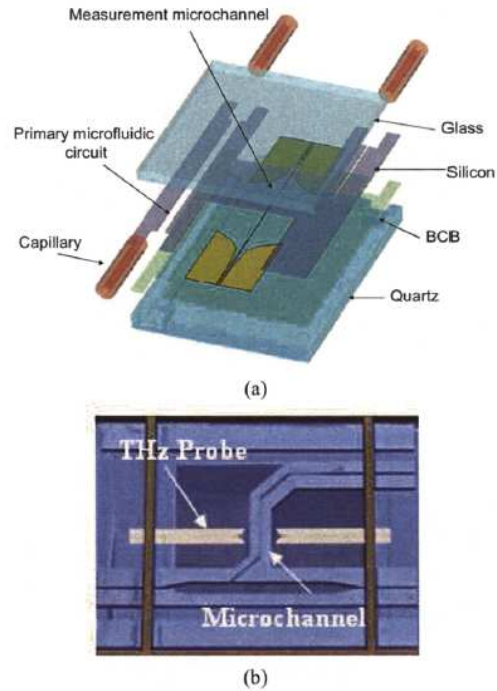


Figure I-37: (a) Schéma du bioMEMS – (b) Photographie du bioMEMS réalisé.

Les lignes de Goubau sont utilisées pour sonder le milieu analysé et les paramètres large bande mesurés en transmission et en réflexion ont permis d'obtenir des informations telles que l'étude de phénomènes d'interaction et de communication à l'échelle de la cellule via la caractérisation de l'interaction ligand-récepteur dans des cellules CHO (cellules d'ovaires de hamsters chinois).

IV. Conclusion

A la lecture de ce premier chapitre, nous pouvons dire que les propriétés diélectriques des cellules sont étudiées avec intérêt depuis très longtemps pour apporter des réponses au domaine de la biologie. Le développement des micro technologies et leurs récentes applications au domaine médical ont permis la mise au point de micro dispositifs permettant de travailler à l'échelle de la cellule et d'accéder ainsi à des informations ciblées et non plus à une moyenne sur une grande population cellulaire. Il est alors possible de suivre en temps réel de nombreux phénomènes biologiques au niveau de la cellule permettant de grandes avancées dans le domaine biomédical. Après avoir comparé les différentes techniques de bio détection développées, nous avons mis en évidence, les méthodes de détection électriques très en vue à l'heure actuelle. En effet, ces techniques permettent de développer des outils d'analyse sans marqueur. Combinées à l'utilisation des fréquences micro ondes, qui permettent de pénétrer à l'intérieur de la cellule pour en sonder son milieu intracellulaire, il est alors possible de développer des outils d'analyse performants et dont la taille micrométrique permet l'étude de cellules uniques. Dans les chapitres suivants, nous allons ainsi détailler la conception et la réalisation de bio-capteurs basés sur des dispositifs résonants pour la spectroscopie diélectrique cellulaire aux fréquences micro ondes. Grâce à la très forte sensibilité de ces capteurs, la détection et l'analyse de cellules saines ou cancéreuses du système nerveux (allant même jusqu'à l'examen de cellules uniques) seront proposées, le tout sans marqueur, ouvrant ainsi la voie au développement de nouveaux outils de tri cellulaire et de diagnostic.

Chapitre Premier

[I.1] B. ALBERTS, D. BRAY, J. LEWIS, M. RAFF, K. ROBERTS, J. D. WATSON : « **Biologie moléculaire de la cellule** », *Flammarion Médecine Sciences*, Chapitre 1, pp.4-41, 1986.

[I.2] CELLS Alive, <<http://www.cellsalive.com/cells/cell.model>>, Avril 2009.

[I.3] Wikipédia, <http://fr.wikipedia.org/wiki/Membrane_plasmique>, Avril 2009.

[I.4] R. HÖBER : « **Eine Methode, die elektrische Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen** », *Arch Ges Physiol*, Vol. 133, pp. 237-259, 1910.

[I.5] H. P. SCHWAN : « **Electrical properties of blood and its constituents : Alternating current spectroscopy** », *Annal of Hematology*, Vol. 46, n° 4, pp.185-197, 1983.

[I.6] FRICKE : « **The theory of electrolytic polarization** », *Phil. Mag.*, pp.310-318, 1932.

[I.7] PARK, C.H. BERGSAGEL, D.E. & McCULLOCH : « **E.A. Mouse myeloma tumor stem cells : a primary cell culture assay** », *J. Natl Cancer Inst.*, Vol. 46, pp. 411-422, 1971.

[I.8] T. REYA, S.J. MORRISON, M.F. CLARKE, I.L. WEISSMAN : « **Stem cells, cancer, and cancer stem cells** », *Nature*, Vol. 414, pp. 105-111, 2001.

[I.9] BIDLINGMAIER et al. : « **The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells** », *J. Mol. Med.*, Vol. 86, pp. 1025-1032, 2008.

[I.10] M. GILDEMEISTER : « **Die passiven elektrischen Erscheinungen im Tier- und Pflanzenreich** », *Handbook d. Norm. und Pathol. Physiol.*, Vol. 8, 1928.

[I.11] E. DUBOIS-REYMOND : « **Untersuchungen über Tierische Elektrizität** », *G. Reimer*, Berlin, 1849.

[I.12] G. N. STEWART : « **The remative volume or weight of corpuscles and plasma in blood**, *J. Physiol. (London)*, Vol. 24, 1899.

[I.13] R. HÖBER : « **Ein zweites Verfahren die Leitfähigkeit im inner von Zellen zu messen** », *Pfluegers Arch. Gesamte Physiol. Menschen Tiere*, 1912.

[I.14] N. TESLA : « **High frequency oscillators for electro-therapeutic and others purposes** », *8th Annu. Meet. Am. Electro-Therapeutic Assoc.*, Buffalo, N. Y., Septembre 1898.

[I.15] J. F. McCLENDON : « **Colloidal properties of the surface of the living cell II. Electric conductivity and capacity of blood to alternating currents of long duration and varying in frequency from 266 to 2,000,000 cycles per second** », *J. Biol. Chem.*, Vol. 69, 1926.

[I.16] C. VEDRUCCIO : « **Ultra High Frequency and Microwave Non-Linear Interaction Device for Cancer Detection and Tissue Characterization** », *International Review of the Armed Forces Medical Services*, Vol. 78/2, pp. 120-126, 2005.

[I.17] B. RAJEWSKY, H. P. SCHWAN : « **Die Dielektrizitätskontante und Leitfähigkeit des Blutes bei ultrahohen Frequenzen** », *Naturwissenschaften*, Vol.35, 1948.

[I.18] H. F. COOK : « **Dielectric behavior of human blood at microwave frequencies** », *Nature*, Vol.168, 1951.

[I.19] K. R. FOSTER, H. P. SCHWAN : « **Dielectric properties of tissues and biological materials : a critical review** », *Critical Reviews in Biomedical Engineering*, Vol. 17, Issus 1, pp.25-104, 1989.

[I.20] C. GABRIEL, S. GABRIEL, E. CORTHOUT : « **The dielectric properties of biological tissues : I. Literature survey** », *Phys.Med.Biol.*, Vol.41, pp.2231-2249, 1996.

[I.21] S. GABRIEL, S.W. LAU, C. GABRIEL : « **The dielectric properties of biological tissues : II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz** », *Phys.Med.Biol.*, Vol.41, pp.2251-2269, 1996.

[I.22] B. BLAD, B. BALDETORP : « **Impedance spectra of tumour tissue in comparison with normal tissue; a possible clinical application for electrical impedance tomography** », *Physiol.Meas.*, Vol.17, pp.A105-A115, 1996.

[I.23] N. DEMIERRE : « **Continuous-Flow Separation of Cells in a Lab-on-a-Chip using "Liquid Electrodes" and Multiple-Frequency Dielectrophoresis** », *Thèse de l'Ecole Polytechnique Fédéral de Lausanne*, Suisse, pp. 35-43, 2008.

[I.24] G. MARTINSEN, S. GRIMMES, H. P. SCHWAN : « **Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue** », *Encyclopedia of Surface and Colloid Science*, pp. 2643-2652, 2002.

[1. 25] M. A. STUCHLY, et al. : « **Dielectric properties of animal tissues in vivo at radio and microwave frequencies : comparison between species** », *Phys. Med. Biol.*, vol. 27, n° 7, pp. 927-936, 1982.

[I.26] K. E. PETERSON : « **Silicon as mechanical material** », *Proc. IEEE*, Vol.70, pp.420-457, 1982.

[I.27] K.D. WISE, K. NAJAFI : « **Microfabrication techniques for integrated sensors and Microsystems** », *Sciences*, vol. 254, pp.1335-1342, 1991.

[I.28] R. BASHIR : « **BioMEMS : State-of-the-art in detection, opportunities and prospects** », *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol.56, pp.1565-1586, 2004.

[I.29] CEA, <<http://www.cea.fr/fr/magazine/dossiers.asp>>, consulté en avril 2009.

[I.30] T.M. HERNE, M.J. TARLOV : « **Characterization of DNA probes immobilized on gold surfaces** », *J. Am. Chem. Soc.* 119 (38) 8916, 1997.

[I.31] G. MACBEATH, S.L. SCHREIBER : « **Printing proteins as microarrays for high-throughput function determination** », *Science*, Vol.289, pp. 1760-1763, 2000.

[I.32] W.E. MOERNER, M. ORRIT : « **Illuminating single molecules in condensed matter** », *Science*, Vol.283, pp. 1670-1676, 2001.

[I.33] X. MICHALET, F.F. PINAUD, L.A. BENTOLILA, J.M. TSAY, S. DOOSE, J.J. LI, G. SUNDARESAN, A.M. WU, S.S. GAMBHIR, S. WEISS : « **Quantum Dots for Lice Cells, in Vivo Imaging, and Diagnostics** », *Science*, Vol.307, pp. 538-544, 2000.

[I.34] S. K. DIXIT, N. L. GOICOCHEA, M.-C. DANIEL, A. MURALI, L. BRONSTEIN, M. DE, B. STEIN, V. ROTELLO, C. C. KAO, B. DRAGNEA : « **Quantum Dot Encapsulation in Viral Capsids** », *Nano Letters*, Vol.6, pp. 1993-1999, 2006.

[I.35] M. CHALFIE, S. KAIN : « **Green Fluorescent Protein : Properties, Applications and Protocols** », *Edition 2 illustrée*, publié par J. Wiley and Sons, 2005.

[I.36] W. Z. SONG, X. M. ZHANG, A. Q. LIU, C. S. LIM : « **Refractive index measurement of single living cells using on-chip Fabry-Pérot cavity** », *Applied Physics Letters*, Vol. 89, 2006.

[I.37] J. FRITZ, M. K. BALLER, H. P. LANG, H. ROTHUIZEN, P. VETTIGER, E. MEYER, H. J. GÜNTERRÖDT, C. GERBER, J. K. GIMZEWSKI : « **Translating Biomolecular Recognition into Nanomechanics** », *Science*, Vol. 288, n° 5464, pp. 316-318, 2000.

[I.38] A. GUPTA, D. AKIN, R. BASHIR : « **Single virus particle mass detection using microresonators with nanoscale thickness** », *Applied Physics Letters*, Vol. 84, pp. 1976-1978, 2004.

[1. 39] G. A. CAMPBELL, R. MUTHARASAM : « **Near real-time detection of Cryptosporidium parvum oocyst by IgM-functionalized piezoelectric-excited millimeter-sized cantilever biosensor** », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 23, pp. 1039-1045, 2007.

[I.40] N. R. STRADIOTTO, H. YAMANAKA, M. V. B. ZANONI : « **Electrochemical sensors : A powerful tool in analytical chemistry** », *Analytica Chimica Acta*, Vol. 510, pp. 127-138, 2004.

[I.41] S. -J. PARK, T. A. TATON, C. A. MIRKIN : « **Array-Based Electrical Detection of DNA with Nanoparticle Probes** », *Science*, Vol. 295, pp. 1503-1506, 2002.

[I.42] T. A. TATON, C. A. MIRKIN, R. L. LETSINGER : « **Scanometric DNA Array Detection with Nanoparticle Probes** », *Science*, Vol. 289, pp. 1757-1760, 2000.

[1.43] V. SENEZ, E. LENNON, S. OSTROVIDOV, T. YAMAMOTO, H. FUJITA, Y. SAKAI, T. FUJII : « **Integrated 3-D Silicon electrodes for Electrochemical Sensing in Microfluidic Environments : Application to Single-Cell Characterization** », *IEEE Sensors Journal*, Vol. 8, n° 5, pp. 548-557, 2008.

[1.44] S. M. RADKE, E. C. ALOCILJA : « **Design and Fabrication of a Microimpedance Biosensor for Bacterial Detection** », *IEEE Sensors Journal*, Vol. 4, n° 4, pp. 434-440, 2004.

[1.45] Y. I. KIM, T. S. PARK, J. H. KANG, M. C. LEE, J. T. KIM, J. H. PARK, H. K. BAIK : « **Biosensors for label free detection based on RF and MEMS technology** », *Sens. Actuators B*, Vol. 119, pp. 592-599, 2006.

[1.46] Y. -I. KIM, Y. Park, H. K. BAIK : « **Development of LC resonator for label-free biomolecule detection** », *Sensors and Actuators A*, Vol. 143, pp. 279-285, 2008.

[1.47] I. ALEXANDRE, S. HAMELS, S. DUFOUR, J. COLLET, N. ZAMMATTEO, F. DE LONGUEVILLE, J.-L. GALA, J. REMACLE : « **Colorimetric silver detection of DNA micro-arrays** », *Anal. Biochem.*, Vol. 295, pp. 1-8, 2001.

[1.48] N. DENEFF, L. MORENO-HAGELSIEB, G. LAURENT, R. PAMPIN, B. FOULTIER, J. REMACLE, D. FLANDRE, J. P. RASKIN : « **RF detection of DNA based on CMOS inductive and capacitive sensors** », *34th European Microwave Conference*, Amsterdam, pp. 669-672, 2004.

[1.49] G. LAURENT, L. M. HAGELSIEB, D. LEDERER, P. E. LOBERT, D. FLANDRE, J. REMACLE, J. P. RASKIN : « **Development DNA electrical detection based on inductor resonance frequency in standard CMOS technology** », *Solid-State Circuits Conference*, 2003. ESSCIRC apos;03. Proceedings of the 29th European, pp. 337-340, 2003.

[1.50] A. TREIZEBRE, T. AKALIN, B. BOCQUET : « **Planar Excitation of Goubau Transmission Lines for THz BioMEMS** », *IEEE Microwave and Wireless Components Letters*, Vol. 15, n° 12, 2005.

[1.51] A. TREIZEBRE, B. BOCQUET, D. LEGRAND, J. MAZURIER : « **Studies of cellular informative transfer by THz BioMEMS** », *33rd International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves, IRMMW-THz 2008*, Pasadena, CA, 2008.

Chapitre II

Conception des dispositifs hyper-fréquences passifs pour l'analyse cellulaire

I. Introduction

Au cours de ce second chapitre, nous allons nous intéresser à la conception électromagnétique de capteurs dédiés à l'analyse de cellules humaines. Dans le chapitre premier, nous avons montré que l'intérêt d'utiliser les fréquences micro ondes pour investiguer les cellules pouvait être double. En effet, à ces fréquences, les ondes permettent à la fois de pénétrer la membrane cellulaire pour sonder le contenu des cellules et, combinées avec les micro technologies, elles permettent aussi d'obtenir des dispositifs d'analyse de taille très réduite et ainsi d'atteindre une sensibilité accrue au niveau de la cellule. Comme nous l'avons vu précédemment, des structures résonantes, qui sont par nature plus sensibles à de petites variations de paramètres que des dispositifs large bande, semblent être de très bons candidats pour la mise au point de micro-capteurs ultra sensibles. Nous allons donc mettre à profit ces derniers points pour concevoir des bio-capteurs permettant l'analyse cellulaire par spectroscopie diélectrique micro ondes. Ainsi, l'objectif sera de mettre au point une méthode ne nécessitant pas le recours à des marqueurs, et qui permettra de sonder le contenu intra cellulaire par des ondes millimétriques afin d'en extraire des informations sur le type cellulaire étudié ainsi que sur son état pathologique.

Dans ce contexte, après la présentation de quelques généralités concernant le fonctionnement des résonateurs hyper-fréquences, nous verrons comment adapter ces dispositifs à l'étude de cellules biologiques tout en respectant les contraintes liées à l'étude du vivant. Nous nous concentrerons en premier lieu sur l'étude d'un résonateur (et donc une fréquence d'analyse) de façon à optimiser sa topologie et prouver la faisabilité de la méthode. Ensuite nous étendrons la gamme fréquentielle d'étude en ajustant la géométrie de ces résonateurs. Puis, en nous appuyant sur des simulations électromagnétiques nous verrons comment optimiser la sensibilité de ces dispositifs, via la conception de filtres, pour tendre vers la détection et la caractérisation de la cellule unique qui reste un enjeu majeur pour de nombreuses applications biomédicales. Ces différentes évolutions ont été engendrées par les différentes expérimentations. L'approche expérimentale que nous avons suivie au cours de ces travaux ainsi que les résultats des mesures seront plus amplement détaillés dans le troisième chapitre de ce manuscrit.

II. Généralités sur les résonateurs micro ondes

II.1 Choix de la technologie

On considère généralement le spectre micro onde comme le domaine fréquentiel s’étendant de 300 MHz à 300 GHz. Ces fréquences présentent donc un fort potentiel dans le domaine de l’analyse cellulaire car elles permettent de concevoir des dispositifs miniaturisés dont l’échelle se rapproche de celle de la cellule.

Les résonateurs jouent un rôle important dans de nombreuses applications micro ondes. En effet, ils sont en particulier à la base des filtres et des oscillateurs, très utilisés dans le domaine des communications. Ils permettent de combiner ou de séparer différentes fréquences et sont intégrés dans les chaînes d’émission et de réception des systèmes de télécommunications. En fonction de l’application et du cahier des charges souhaités, les résonateurs hyper-fréquences peuvent être conçus avec des éléments localisés ou distribués (Figure II-1). De même, il existe différentes topologies de résonateurs comme par exemple, les résonateurs planaires, volumiques, mécaniques ou encore acoustiques. Dans le cas de notre étude, nous avons opté pour la technologie planaire qui nous permet de réaliser des capteurs sur substrats, miniaturisés, facilement manipulables et sur lesquels il est possible d’observer les cellules mais aussi d’intégrer à terme un réseau microfluidique ainsi que des fonctions complémentaires pour la fabrication de laboratoires sur puces. C’est donc cette technologie qui retiendra toute notre attention.

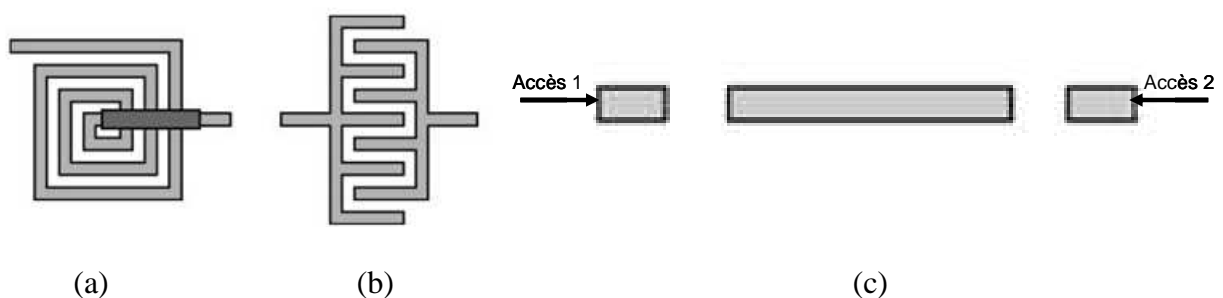


Figure II-1: (a) Inductance – (b) Capacité inter-digitée réalisée en éléments localisés – (c) Résonateur en éléments distribués [II.1]

Les résonateurs à éléments localisés sont réalisés par la transposition directe d’un modèle équivalent RLC. Ainsi, il est possible de fabriquer des inductances en spirales (Figure

II-1-a) ou en méandres, ainsi que des capacités à lignes inter-digitées (Figure II-1-b) [II.1]. Ces résonateurs présentent l'avantage de permettre une forte intégration, ce qui peut constituer un atout majeur dans la conception de bio-capteurs. En revanche, les pertes induites sur la propagation du signal sont élevées et liées aux faibles facteurs de qualité généralement obtenus avec des éléments localisés [II.2].

Les résonateurs distribués sont quant à eux réalisés à partir de lignes demi ou quart d'onde faibles pertes, et chargées à leurs extrémités par des courts circuits ou des circuits ouverts (Figure II-1-c). L'encombrement devient alors plus important mais les facteurs de qualité à vide pouvant être obtenus sont plus élevés et nous verrons par la suite à quel point ce paramètre est important pour optimiser la sensibilité des bio-capteurs.

Dans les deux cas, différents types de lignes de transmission peuvent être utilisés pour la conception de résonateurs hyper-fréquences, comme notamment les lignes coplanaires (Figure II.2) ou microrubans (Figure II.3). Dans le cas des lignes coplanaires, les conducteurs métalliques formant la ligne de signal et les lignes de masse sont situés dans le même plan sur un substrat diélectrique. Les ondes électromagnétiques se propagent selon un mode quasi TEM comme le montre la Figure II.2. Le champ électromagnétique et donc l'énergie du signal RF se trouve fortement localisée au-dessus de la ligne ce qui permet d'avoir une forte interaction entre le champ EM et des cellules présentes à la surface du substrat. Par conséquent, l'introduction d'un milieu biologique à la surface pourra engendrer une forte perturbation de la réponse fréquentielle du résonateur qu'il est de coutume de présenter sous la forme de paramètres S. En effet, un dispositif hyper-fréquence peut se modéliser par un quadripôle possédant des ports d'entrée et de sortie. On définit alors des ondes incidentes et réfléchies sur chacun de ces ports, qui permettent de définir les paramètres de réflexion S_{11} et S_{22} ainsi que les paramètres de transmission S_{12} et S_{21} . Les paramètres de réflexion traduisent la réflexion du signal incident à chacun des accès tandis que les paramètres de transmission traduisent la propagation du signal à travers le dispositif. Dans le cas de systèmes réciproques, comme c'est notre cas, les paramètres S_{11} , S_{22} et S_{12} , S_{21} sont égaux. Nous étudierons donc les paramètres S_{11} et S_{21} pour qualifier respectivement la réflexion et la transmission du signal RF au niveau du bio-capteur.

Avec cette technologie, des modes de fentes parasites peuvent apparaître mais sont facilement évitables en reliant les deux lignes de masse qui entourent le conducteur central pour s'assurer que ces dernières soient bien au même potentiel. De plus, cette technologie

uniplanaire a l’avantage de ne nécessiter qu’un seul niveau de métallisation, facilitant sa mise en œuvre.

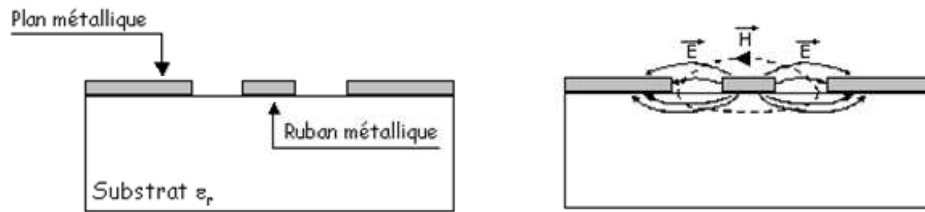


Figure II-2: Vue en coupe d’une ligne coplanaire et de la distribution du champ électrique \vec{E} et magnétique \vec{H} .

Dans le cas des lignes microrubans, la ligne signal est constituée par un conducteur métallique mince, déposé à la surface d’un substrat diélectrique. La face opposée du substrat est métallisée pour former le plan de masse. Dans cette configuration, le champ électromagnétique est rapidement confiné dans le substrat et son interaction avec une cellule placée à la surface du substrat sera plus limitée que dans le cas d’une ligne coplanaire où le champ rayonne de façon plus importante dans l’espace libre. En revanche, cette technologie est fortement utilisée pour la conception de filtres car elle permet de concevoir simplement des résonateurs ayant une forme originale et sans contrainte d’agencement avec les lignes de masse. De plus le confinement du champ dans le substrat permet d’atteindre des meilleurs facteurs de qualité, si ce dernier est faiblement dispersif.

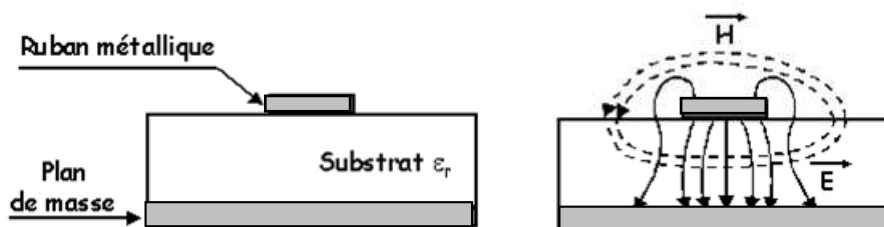


Figure II-3: Vue en coupe d’une ligne microruban et de la distribution du champ électrique \vec{E} et magnétique \vec{H} .

Concernant les pertes, elles ont, pour les deux technologies, des origines diverses. On dénombre des pertes diélectriques liées à la qualité du substrat utilisé, ou encore des pertes métalliques liées à la qualité de la métallisation formant les conducteurs qui possèdent une conductivité finie. Enfin, nous trouvons les pertes par rayonnement qui sont dues aux discontinuités présentes dans les conducteurs. L’ensemble de ces pertes contribuent à

diminuer le facteur de qualité des résonateurs, c'est pourquoi, il convient donc de les réduire au maximum.

Les technologies coplanaires et microrubans présentent donc toutes les deux des avantages pour la conception de résonateurs pour l'analyse cellulaire. Ainsi, dans le but de détecter et d'analyser des cellules présentes à la surface d'une structure planaire résonante, il nous faudra choisir entre ces deux technologies et optimiser à la fois l'interaction champ électromagnétique/cellules, favorisée plutôt par la technologie coplanaire et le facteur de qualité à vide des dispositifs, favorisé plutôt par la technologie microruban. Comme nous le verrons au cours de ce chapitre, des compromis seront donc nécessaires pour optimiser la sensibilité des bio-capteurs et converger vers une détection d'une cellule unique.

Dans tous les cas, le principe de base des bio-capteurs que nous avons développé repose sur le fonctionnement de résonateurs micro ondes simples qui présentent l'avantage d'être modélisables électriquement par de simples circuits RLC, comme nous allons le voir maintenant.

II.2 Les circuits résonants RLC

La représentation électrique d'un résonateur micro onde fonctionnant sur un mode donné et à une fréquence donnée, se modélise par un circuit RLC série ou parallèle. En effet, même si un résonateur présente, dans ses conditions normales d'utilisation, différentes fréquences de résonance correspondant à autant de modes propres, une première approximation consiste à négliger l'effet d'une résonance sur l'autre en considérant les fréquences de résonance suffisamment éloignées. Ainsi, le résonateur peut être caractérisé au voisinage d'une fréquence par un seul circuit résonant.

II.2.1 Circuit résonant série

Aux fréquences micro ondes, un résonateur passe-bande peut se modéliser par l'association en série d'une capacité C , d'une inductance L et d'une résistance de pertes R comme le montre la Figure II-4.

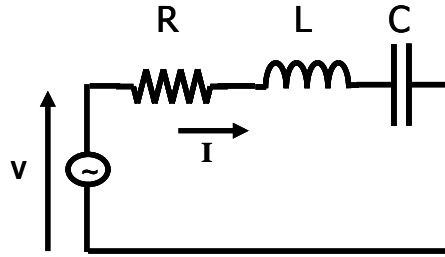


Figure II-4: Circuit RLC série [II.3].

L'impédance d'entrée présentée par ce circuit peut donc s'écrire sous la forme :

$$Z_{in} = R + jL\omega - \frac{j}{C\omega} \quad (\text{II.1})$$

La puissance complexe P_{in} délivrée au résonateur se définit alors par :

$$P_{in} = \frac{1}{2} \mathbf{V} \mathbf{I}^* = \frac{1}{2} Z_{in} |\mathbf{I}|^2 = \frac{1}{2} Z_{in} \left| \frac{\mathbf{V}}{Z_{in}} \right|^2 = \frac{1}{2} |\mathbf{I}|^2 \left(R + jL\omega - \frac{j}{C\omega} \right) \quad (\text{II.2})$$

Et la puissance liée aux pertes du dispositif, P_{loss} , vaut :

$$P_{loss} = \frac{1}{2} R |\mathbf{I}|^2 \quad (\text{II.3})$$

Le phénomène de résonance apparaît quand les énergies moyennes magnétiques (II.4) et électriques (II.5) stockées par le résonateur sont égales.

$$W_m = \frac{1}{4} |\mathbf{I}|^2 L \quad (\text{II.4})$$

$$W_e = \frac{1}{4} |V_c|^2 C = \frac{1}{4} |\mathbf{I}|^2 \frac{1}{\omega^2 C}, \text{ avec } V_c \text{ est la tension aux bornes de la capacité} \quad (\text{II.5})$$

La puissance délivrée au résonateur et l'impédance d'entrée du dispositif peuvent alors s'écrire sous la forme :

$$P_{in} = P_{loss} + 2j\omega(W_m - W_e) \quad (\text{II.6})$$

$$Z_{in} = \frac{2P_{in}}{|\mathbf{I}|^2} = \frac{P_{loss} + 2j\omega(W_m - W_e)}{|\mathbf{I}|^2 / 2} \quad (\text{II.7})$$

Or, à la résonance, on obtient :

$$\begin{aligned} W_e &= W_m \\ Z_{in} &= \frac{P_{loss}}{|\mathbf{I}|^2 / 2} = R \end{aligned} \quad (\text{II.8})$$

Il est important de retenir qu'à la résonance, l'impédance d'entrée est purement réelle et la pulsation de résonance est alors donnée par l'expression :

$$W_m = W_e \Rightarrow \omega^2 LC = 1 \Rightarrow \omega_0 = \frac{1}{\sqrt{LC}} \quad (\text{II.9})$$

Ainsi, il est intéressant de regarder l'évolution de l'impédance d'entrée du circuit en fonction de la fréquence. Comme le montre la Figure II-5, à la fréquence de résonance, l'impédance d'entrée du résonateur diminue de sorte que l'énergie, autour de la résonance soit transmise au travers du résonateur qui se comporte alors comme un passe-bande (Figure II-6).

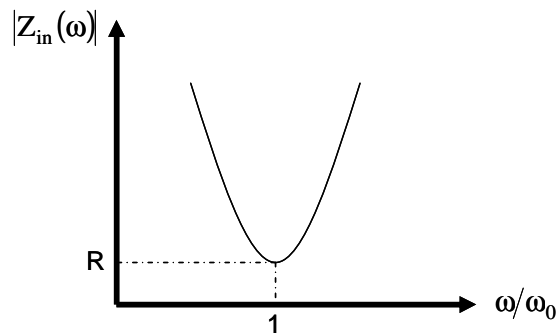


Figure II-5: Evolution de l'impédance d'entrée du résonateur en fonction de la fréquence, pour un circuit série.

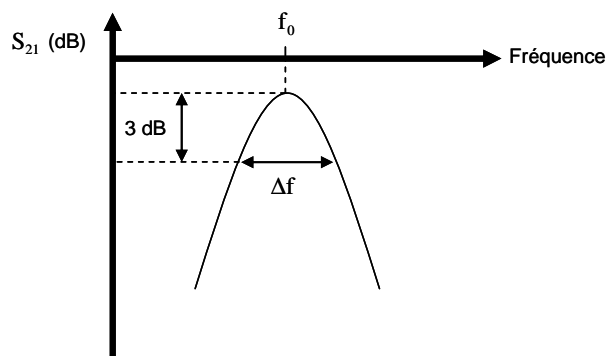


Figure II-6: Evolution du paramètre de transmission du résonateur en fonction de la fréquence, pour un circuit série.

Un autre paramètre important dans la conception des résonateurs concerne son facteur de qualité à vide Q_0 . En l'absence de charge connectée au circuit, il se définit par :

$$Q_0 = \omega \frac{\text{énergie moyenne stockée}}{\text{énergie dissipée}} = \omega \frac{W_m + W_e}{P_{\text{loss}}} \quad (\text{II.10})$$

Pour un circuit série, à la résonance, nous avons donc :

$$Q_0 = \omega_0 \frac{2W_m}{P_{\text{loss}}} = \frac{\omega_0 L}{R} = \frac{1}{\omega_0 RC} \quad (\text{II.11})$$

Lorsque le résonateur est chargé, on définit le coefficient de qualité en charge Q_1 qui est donné par l'expression :

$$Q_1 = \frac{f_0}{\Delta f}, \text{ avec } \Delta f \text{ la bande passante à -3dB} \quad (\text{II.12})$$

Ainsi, nous retiendrons que le facteur de qualité à vide du résonateur augmente quand la résistance de pertes diminue. Dans la configuration série, pour réaliser un dispositif à fort facteur de qualité, il faudra alors limiter les pertes ohmiques. Mais il est aussi important de noter que ce facteur de qualité augmente lorsque la valeur de la capacité diminue. Il sera donc judicieux de concevoir des capacités présentant de faibles valeurs pour augmenter le facteur de qualité des résonateurs dans le cas d'un circuit série.

II.2.2 Circuit résonant parallèle

Un résonateur micro onde stop bande est quant à lui modélisable par l'association en parallèle d'une capacité C et d'une inductance L . Si le condensateur est de bonne qualité, sa résistance de fuite sera négligeable et c'est la résistance de l'inductance R_s qui prédomine. Comme le montre la Figure II-7.a, R_s est en série avec la bobine mais d'un point de vue pratique, il est possible de modéliser son effet par une résistance R_p en parallèle avec l'inductance L et la capacité C (Figure II-7.b).

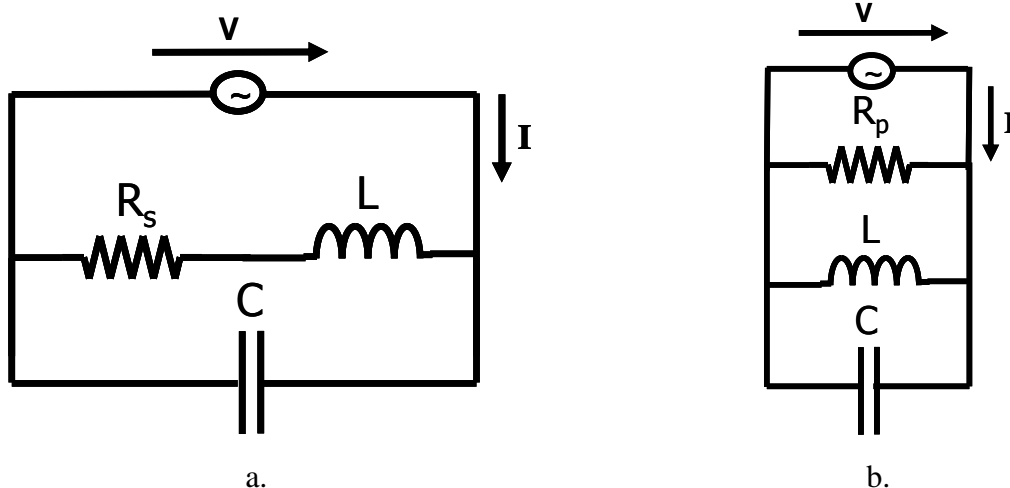


Figure II-7 : a. Circuit stop-bande utilisé dans notre étude – b. Schéma équivalent RLC parallèle.

A la résonance, les réactances de la capacité X_c et de la self X_L sont égales et il est alors possible de calculer R_p à partir de R_s :

$$R_p = \frac{X_L^2}{R_s} = \frac{(2\pi f_0 L)^2}{R_s} \quad (\text{II.13})$$

L'impédance d'entrée présentée par le circuit de la Figure II-7.b s'écrit alors :

$$Z_{in} = \frac{1}{\frac{1}{R_p} + \frac{1}{jL\omega} + jC\omega} \quad (\text{II.14})$$

La puissance délivrée au résonateur et celle dissipée par la résistance R se mettent alors sous la forme suivante :

$$P_{in} = \frac{1}{2} |V|^2 \left(\frac{1}{R_p} - \frac{j}{L\omega} + jC\omega \right) \quad (\text{II.15})$$

$$P_{loss} = \frac{1}{2} \frac{|V|^2}{R_p} \quad (\text{II.16})$$

Comme dans le cas du circuit série, le phénomène de résonance apparaît lorsque les énergies moyennes magnétiques (II.17) et électriques (II.18) stockées par le résonateur sont égales.

$$W_m = \frac{1}{4} |I_L|^2 L = \frac{1}{4} |V|^2 \frac{1}{\omega^2 L}, \text{ avec } I_L \text{ le courant traversant l'inductance} \quad (\text{II.17})$$

$$W_e = \frac{1}{4} |V|^2 C \quad (\text{II.18})$$

La puissance délivrée au résonateur et l'impédance d'entrée du dispositif peuvent alors s'écrire sous la forme :

$$P_{in} = P_{loss} + 2j\omega(W_m - W_e) \quad (\text{II.19})$$

$$Z_{in} = \frac{P_{loss} + 2j\omega(W_m - W_e)}{|I|^2 / 2} \quad (\text{II.20})$$

Par conséquent, à la résonance, on obtient :

$$\begin{aligned} W_e &= W_m \\ Z_{in} &= \frac{P_{loss}}{|I|^2 / 2} = R_p \end{aligned} \quad (\text{II.21})$$

De même que dans le cas du circuit RLC série, à la résonance, l’impédance d’entrée est purement réelle et la pulsation de résonance est donnée par l’expression :

$$W_m = W_e \Rightarrow \omega^2 LC = 1 \Rightarrow \omega_0 = \frac{1}{\sqrt{LC}} \quad (\text{II.22})$$

Si l’on regarde l’évolution de l’impédance d’entrée du circuit, autour de la fréquence de résonance, l’impédance d’entrée du résonateur augmente de sorte que l’énergie soit stockée dans le résonateur qui se comporte alors comme un stop-bande (Figure II-8).

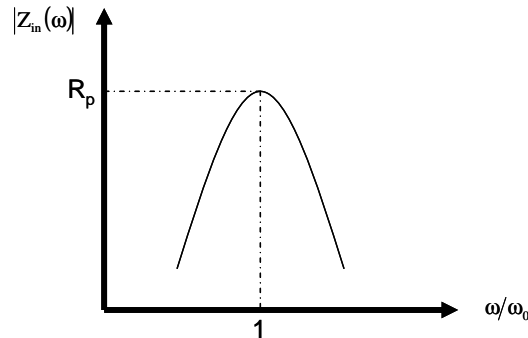


Figure II-8 : Evolution de l’impédance d’entrée du résonateur en fonction de la fréquence, pour un circuit parallèle.

La Figure II-9 illustre l’évolution du paramètre de transmission S_{21} du résonateur en fonction de la fréquence.

Notons que, dans le cas de notre étude, cette configuration est particulièrement intéressante car la concentration du champ électromagnétique dans le résonateur permet une forte interaction avec le milieu biologique à son contact. C’est donc cette configuration de résonateur qui est la plus favorable dans le cadre de nos travaux.

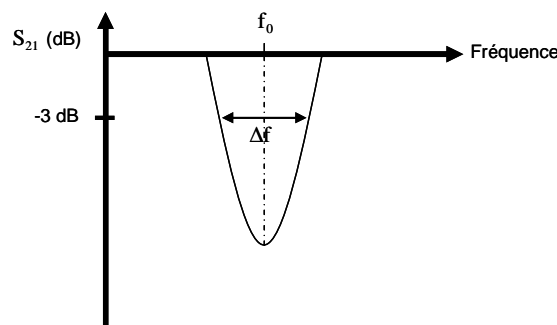


Figure II-9 : Evolution du paramètre de transmission du résonateur en fonction de la fréquence, pour un circuit parallèle.

Concernant le facteur de qualité à vide Q_0 du résonateur, à la fréquence de résonance, il s’écrit alors sous la forme :

$$Q_0 = \omega_0 \frac{2W_m}{P_{\text{loss}}} = \frac{R_p}{\omega_0 L} = \omega_0 R_p C \quad \text{ou} \quad Q_0 = \frac{R_p}{X_L} = \frac{R_p}{2\pi f_0 L} \quad (\text{II.23})$$

En considérant la formule (II.13), on retrouve :

$$Q_0 = \frac{2\pi f_0 L}{R_s} = \frac{1}{2\pi f_0 R_s C} \quad (\text{II.24})$$

Et le facteur de qualité en charge Q_1 s’écrit :

$$Q_1 = \frac{f_0}{\Delta f}, \quad \text{avec } \Delta f \text{ la bande passante à -3dB} \quad (\text{II.25})$$

Dans cette configuration également, une faible résistance en série R_s est souhaitable pour améliorer le facteur de qualité à vide du résonateur.

II.2.3 Topologie retenue

Ainsi, comme nous venons de le voir, les résonateurs planaires représentent de bons candidats pour le développement de bio-capteurs sensibles, miniaturisés et facilement intégrables dans des dispositifs plus complets tels que les laboratoires sur puces. Nous avons vu qu’il existait plusieurs approches pertinentes pour la conception des bio-capteurs. Notre première approche s’est orientée vers le choix de la technologie coplanaire dans l’objectif de privilégier l’interaction entre les ondes électromagnétiques et les cellules à analyser. Nous nous sommes intéressés à une configuration stop-bande en cherchant à maximiser l’effet des cellules sur le champ électromagnétique.

Dans une deuxième approche, nous verrons que la technologie microruban présente aussi de grandes potentialités de détection car elle donne une possibilité d’améliorer fortement les facteurs de qualité à vide des résonateurs micro ondes utilisés.

Nous allons donc, dans ce chapitre, détailler la conception des capteurs électromagnétiques en tenant compte des contraintes imposées par l’étude et la manipulation de cellules biologiques. Notre objectif étant de caractériser une très petite concentration de cellules (d’une dizaine à une cellule unique) sans modifier leur l’état ou du moins, en les conservant le plus proche possible de leur état naturel du fait de s’affranchir de marqueur.

III. Application à l'étude de cellules biologiques

Le terme micro ondes englobe l'ensemble des ondes électromagnétiques dont la fréquence est comprise entre 300 MHz et 300 GHz. Or, nous avons vu précédemment qu'il est intéressant de travailler dans une zone de dispersion, là où la permittivité varie fortement en fonction de la fréquence. Dans nos travaux, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au spectre fréquentiel couvrant le domaine de dispersion γ qui varie entre 10 GHz et 35 GHz (Figure I-13).

III.1 Remarques préliminaires

III.1.1 Principe de bio-détection

Le principe de bio détection que nous proposons repose sur la modification des conditions de résonance des capteurs par l'introduction de cellules biologiques à proximité voir à leur contact.

La cellule d'un point de vue électrique peut se modéliser simplement par l'association série d'une résistance et d'une capacité. Ainsi, la présence de cellules sur notre capteur introduit une capacité C_{cell} ainsi qu'une résistance R_{cell} , en parallèle, qui modifient l'impédance du résonateur comme le montre la Figure II-10.

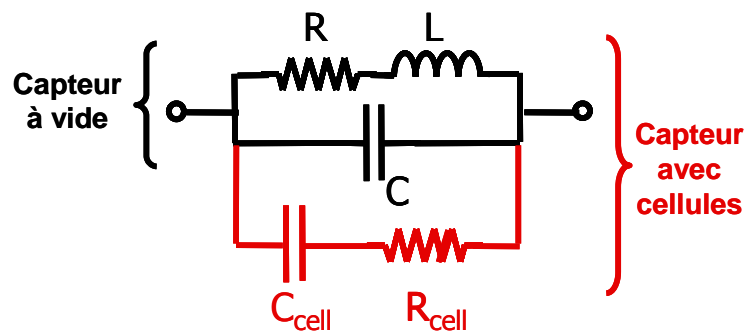


Figure II-10 : Modèle équivalent du résonateur micro ondes chargé par des cellules biologiques.

Ainsi la fréquence de résonance du dispositif devient :

$$f_0 = \frac{1}{2\pi\sqrt{L(C//C_{\text{cell}})}} \quad (\text{II.26})$$

La présence des cellules induit donc un décalage de la fréquence de résonance qui est directement relié, d'après la formule (II.26), à la valeur de la capacité C_{cell} , liée aux propriétés

diélectriques des cellules analysées et notamment à leur permittivité. La résistance R_{cell} dépend de la conductivité et de la tangente de pertes du milieu intra cellulaire. Elle aura pour effet d'augmenter les pertes du résonateur. Comme nous l'avons vu précédemment, ces propriétés étant relatives au type cellulaire considéré ainsi qu'à son état pathologique, la valeur de C_{cell} et donc le décalage fréquentiel observé doit permettre l'identification et l'analyse des cellules sous test.

Il faut préciser que ce décalage fréquentiel observé en présence des cellules va aussi dépendre de paramètres liés aux conditions expérimentales à savoir par exemple le nombre de cellules analysées, leur position sur le capteur ainsi que la température à laquelle seront menées les expérimentations. Nous verrons au travers de ce chapitre comment s'affranchir de ces variables ou du moins les contrôler au maximum.

Notons également que les performances de détection des résonateurs et donc leur sensibilité passe par l'optimisation de deux paramètres majeurs. Le premier concerne la manière dont interagissent le champ électromagnétique et les cellules à analyser. En effet, nous avons intérêt à maximiser l'interaction entre le champ et les cellules pour avoir une plus forte influence de ces dernières sur la réponse en fréquence du micro-capteur. Ceci implique de dimensionner l'espacement des lignes où se propage le signal RF correctement selon la taille des cellules à analyser. Ainsi, il sera nécessaire de concevoir des tailles de gaps entre les lignes du même ordre de grandeur que les cellules à analyser. Dans cet objectif, différentes dimensions de gaps ont été testées allant de 5 à 20 μm pour finalement retenir des gaps compris entre 10 et 15 μm pour les cellules qui nous intéressent. Notons que ces tailles de gaps sont facilement accessibles en utilisant des procédés de microélectronique classiques.

Enfin, dans le cas de la technologie coplanaire, nous privilégierons des métallisations épaisses de façon à maximiser une zone d'interaction la plus uniforme possible entre le champ électromagnétique et les cellules comme l'illustre la Figure II-11.

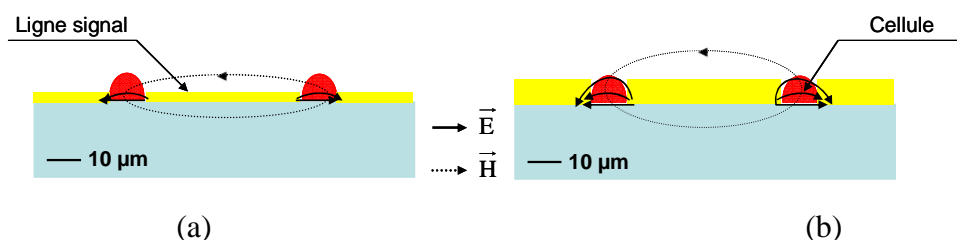


Figure II-11 : Interaction entre les cellules et le champ électromagnétique propagé par la ligne coplanaire pour : (a) une faible épaisseur de métallisation – (b) une couche épaisse de métal.

Le second paramètre consiste à optimiser le facteur de qualité des résonateurs qui contrôle sa sélectivité en fréquence. En effet, un résonateur à fort facteur de qualité est dit plus sélectif car son pic de résonance est plus fin qu’un résonateur avec un facteur de qualité plus limité. En fait, plus le pic de résonance sera fin et plus il sera facile de détecter avec précision un petit décalage de celui-ci (Figure II-12).

L’optimisation à la fois de la taille des gaps entre les lignes d’or et du facteur de qualité à vide des bio-capteurs est, dans notre cas, difficilement réalisable simultanément. Il s’agira donc de faire des compromis entre l’optimisation de la forme du résonateur via l’agencement des lignes de transmission et de son facteur de qualité comme nous allons le voir par la suite.

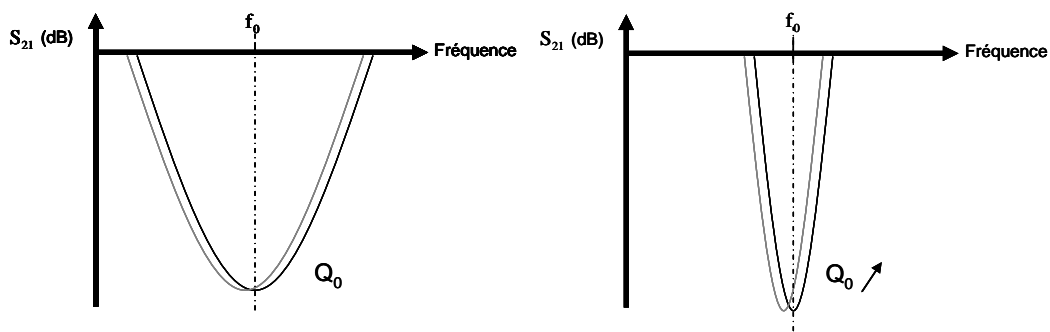


Figure II-12 : Sensibilité du pic de résonance d’un résonateur stop-bande en fonction de son facteur de qualité à vide.

Enfin, si l’utilisation de structures résonantes permet d’obtenir une très bonne sensibilité de détection, l’information obtenue n’est en revanche valable que sur une petite plage de fréquences autour de la résonance. C’est pourquoi différents résonateurs vont être dimensionnés afin d’explorer un spectre fréquentiel plus large.

III.1.2 Paramètres diélectriques à évaluer

Les résonateurs seront donc conçus de façon à être particulièrement sensibles à l’impédance des cellules analysées que l’on souhaite extraire. En accord avec le modèle de Fricke (Figure I-3) ainsi que celui de la sphère homogène (Figure I-12), nous allons modéliser la cellule par sa permittivité relative complexe :

$$\underline{\epsilon}_r = \epsilon'_r - j\epsilon''_r \tag{II.27}$$

Où, ϵ'_r représente la permittivité relative réelle du diélectrique, tandis que ϵ''_r est représentative des pertes du matériau que l’on définit par une conductivité globale ou par la tangente de pertes :

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''_r}{\epsilon'_r} \quad (\text{II.28})$$

La tangente de pertes représente donc l’affaiblissement du champ dans le milieu diélectrique. Ces pertes sont dues à la fois :

- aux porteurs liés : dipôles formés par les molécules d’eau composant le milieu intracellulaire
- aux porteurs libres : comme les ions présents à l’intérieur de la cellule dont l’effet peut être caractérisé par une conductivité ionique σ_i .

Par conséquent, le modèle de Cole-Cole, donné par l’équation (I.9), devient :

$$\epsilon_r = \epsilon_{r\infty} + \frac{\epsilon_{rs} - \epsilon_{r\infty}}{1 + j\omega\tau^{(1-\alpha)}} - j \frac{\sigma_i}{\omega\epsilon_0} \quad (\text{II.29})$$

Il est à noter que ce modèle est très utilisé dans la littérature pour étudier les propriétés diélectriques des tissus (principalement constitués d’eau) en fonction de la fréquence [II.4].

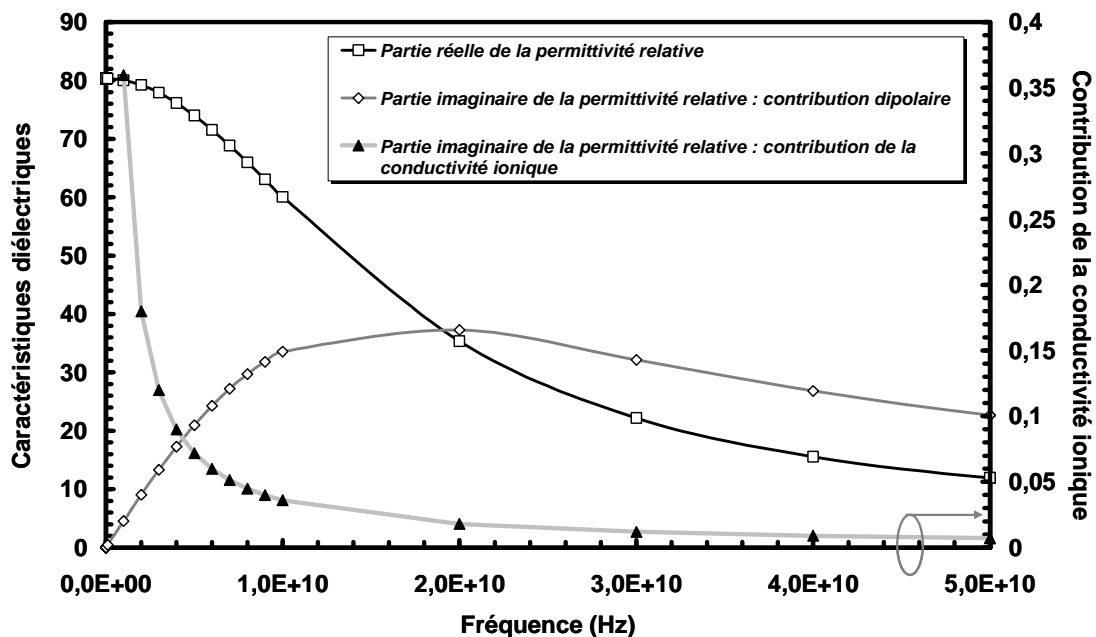


Figure II-13 : Evolution des paramètres diélectriques de l’eau en fonction de la fréquence [II.5].

En particulier, une étude de tissus provenant de la matière grise du cerveau a été menée. Il ressort de ces études que la contribution de la conductivité ionique aux pertes globales des tissus est très faible aux fréquences micro ondes, comme l’illustre la Figure II-13 qui compare l’évolution de la permittivité relative réelle de l’eau avec les différentes

contributions de sa partie imaginaire : les pertes dues au terme faisant intervenir la conductivité ionique du milieu intra cellulaire (considérée à 0,04 S/m pour le cas des tissus de la matière grise) et le terme représentant les pertes liées à la relaxation des molécules d'eau. Par conséquent, l'effet de la conductivité ionique des cellules est très faible dans le domaine de fréquences que nous visons et sera en première approximation négligé par la suite. En revanche, aux basses fréquences, cela n'est plus du tout vrai.

Nous avons supposé tout d'abord que des phénomènes similaires peuvent se produire à l'échelle de la cellule : nous nous sommes par conséquent orientés vers la conception de bio-capteurs sensibles à la fois à une variation locale de permittivité relative (partie réelle de $\underline{\epsilon}_r$) mais aussi à l'introduction de pertes (représentées par la partie imaginaire $\underline{\epsilon}_r$), via la tangente de pertes diélectriques dans notre cas.

Le principe de détection que nous avons considéré (Figure II.10) est sensible à ces deux paramètres principaux et devrait permettre leur détermination. En effet, la variation de permittivité localement à proximité du résonateur va induire un décalage de sa fréquence de résonance. Les pertes globales associées au milieu intracellulaire vont, quant à elles, entraîner une remontée du niveau du paramètre de transmission S_{21} du résonateur qu'il nous faudra mesurer.

III.1.3 Contraintes de conception

L'étude d'éléments biologiques tels que les cellules nécessite la prise en compte de contraintes particulières qui vont fortement influencer la méthodologie de conception des bio-capteurs.

L'une des principales contraintes à considérer est la nécessité d'assurer l'intégrité des cellules biologiques durant la caractérisation. Les cellules biologiques sont des éléments fragiles dont la dénaturation voir la mort peuvent intervenir très rapidement si des paramètres agressifs extérieurs se produisent. Ainsi, lors de la fabrication des bio-capteurs, il est nécessaire d'utiliser des matériaux biocompatibles qui ne soient pas toxiques ou agressifs envers les cellules analysées. Nous avons donc effectué plusieurs tests de biocompatibilité pour choisir les bons matériaux parmi ceux qui étaient à notre disposition. Le choix des matériaux qui constituent au final les résonateurs a été motivé par cet aspect.

Ainsi, le substrat que nous avons utilisé est de la silice fondue (verre purifié). L'intérêt d'utiliser ce type de substrat est double dans notre cas : d'une part le verre est un matériau très

utilisé en biologie et beaucoup de types cellulaires, dont notamment ceux du système nerveux, sont cultivés sans encombre, directement sur des lamelles de verre sans additif ou traitement de surface particulier. D'autre part, l'observation des cellules durant leur culture se fait en biologie grâce à un microscope inversé. La transparence de ce matériau permet donc de faciliter l'observation des cellules sur la surface de la puce.

D'un point de vue hyper-fréquence, ce matériau est intéressant dans la mesure où il présente une faible permittivité et de faibles pertes et permet ainsi de limiter les pertes diélectriques du substrat.

Les lignes de métallisation sont, quant à elles, réalisées en or. Ce métal est bien connu pour ces propriétés biocompatibles. De plus, sa grande conductivité, de l'ordre de $2,7 \cdot 10^7$ S/m, permet de limiter les pertes métalliques des résonateurs et donc d'atteindre de meilleurs facteurs de qualité.

La partie la plus critique dans le choix des matériaux a principalement concerné le polymère utilisé pour définir les zones d'analyse du capteur et contenir le milieu biologique à analyser. Il doit à la fois permettre la réalisation de couches à fort facteur de forme et de grande épaisseur mais aussi permettre une répartition des cellules préférentiellement là où il n'y a pas de résine de façon à concentrer les cellules dans la zone d'intérêt. C'est pourquoi nous avons réalisé des tests de culture et de toxicité sur des résines photosensibles et autres polymères classiquement utilisés en microélectronique. Différentes résines ont donc été déposées sur des lamelles de verre. Les tests ont été effectués avec du BCB, de la SU8 et de la S1828. Les cellules ont été mises en culture sur les différentes lamelles et observées 72h après. Le tableau II.1 résume les résultats. Les tests réalisés mettent en évidence que la configuration privilégiée consiste à former des puits de culture en résine sur le verre. La résine SU8 a été choisie car, en plus d'être biocompatible et de permettre la concentration des cellules sur le verre, elle est transparente et permet d'obtenir des forts facteurs de forme associés à des épaisseurs de résine élevées. De plus ses performances dans la gamme de fréquences qui nous intéresse sont bien connues pour être faibles pertes. Elle est aussi stable dans le temps et résiste à la plupart des solvants et alcools utilisables pour nettoyer les capteurs.

Tableau II.1 : Résultats des tests de biocompatibilité

Matériaux déposés sur lamelles de verre	Observations après 72h de culture
Coating BCB Pleine plaque	Formation d'amas cellulaires => mort cellulaire, grande zone sans cellule, quelques zones éparses avec cellules ayant émis des prolongements
Coating S1828 Pleine plaque	Cellules poussent sur la résine mais dans de mauvaises conditions, cellules en souffrance qui adhèrent par défaut sur la résine
Formation de puits en S1828 sur les lamelles de verre	Très peu de croissance des cellules sur la S1828 et très forte concentration des cellules sur le verre au fond des puits
Coating BCB et formation de puits en SU8-2010	Peu de cellules sur la SU8, environ 5 fois plus de cellules au fond des puits / Cellules rondes => mourantes
Coating SU8-2010 Pleine plaque	Les cellules se développent sur la résine mais pas dans des conditions optimales, elles adhèrent par défaut sur la résine
Formation de puits en SU8-2010 sur les lamelles de verre	Très peu de croissance des cellules sur la SU8 et très forte concentration des cellules sur le verre au fond des puits / Cellules en bon état presque arrivées à confluence

La seconde contrainte importante que nous aurons à considérer est la nécessité de travailler dans un milieu biologique support pour maintenir les cellules intègres durant les phases de mesure. Il est donc nécessaire d'en tenir compte lors de la conception des bio-capteurs car la plupart des milieux classiquement utilisés en biologie sont aqueux et fortement salins ce qui perturbe de façon importante le fonctionnement des résonateurs micro ondes.

Dans un premier temps, nous allons donc détailler la conception des résonateurs hyper-fréquences ainsi que l'optimisation de leur sensibilité. Ceci sera réalisé en prenant en compte uniquement l'effet des cellules sur le résonateur. Cela a en effet du sens si nous considérons que la mise au point des zones sensibles du capteur dépend essentiellement des

cellules à analyser et de leur taille. Le milieu n'a finalement que peu d'influence sur la géométrie du capteur. En revanche, dans un deuxième temps, une fois la topologie du capteur mise au point, nous regarderons l'influence qu'a le milieu biologique sur la réponse du résonateur et comment conserver sa sensibilité à la présence des cellules.

III.2 Mise au point des bio-capteurs

III.2.1 Topologie des résonateurs

Ainsi, en prenant en compte ces spécifications, la première génération de bio-capteurs développée dans ces travaux est basée sur un résonateur RLC stop bande. Il est formé par une inductance en méandre et une capacité inter-digitée conçues en technologie coplanaire. La topologie et le schéma électrique équivalent de ce résonateur sont présentés par la Figure II-14.

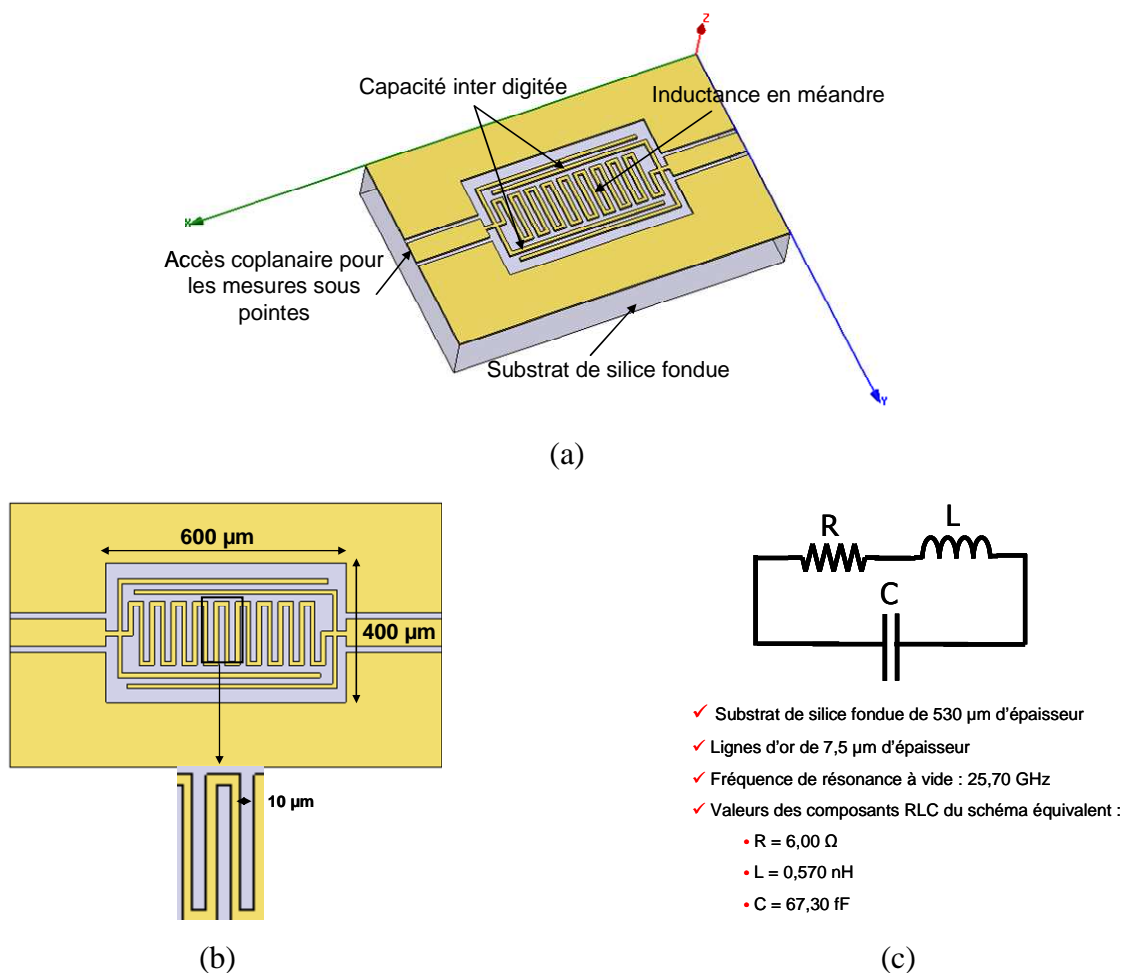


Figure II-14 : (a) Vue 3D du résonateur – (b) Vue de dessus et dimensions du résonateur (c) Schéma électrique équivalent.

De façon à réaliser des tests préliminaires, une première version des capteurs a été fabriquée. Le substrat de silice fondue utilisé a une épaisseur de 530 μm et les lignes d’or ont une épaisseur de 7,5 μm . L’espace entre les lignes est dans le cas considéré de 10 μm . L’inductance est volontairement repliée de façon à obtenir un effet inductif fort tout en restant sur un seul niveau de métallisation. Les inductances en spirale requièrent une métallisation suspendue, pour rejoindre le centre de la spirale, que nous avons voulu éviter pour travailler sereinement dans un milieu liquide. Pour régler la fréquence de résonance du système, une capacité inter digitée est placée en parallèle de l’inductance. L’intérêt d’utiliser ce type de capacité est double. D’une part, cette configuration permet de limiter l’encombrement du dispositif, et d’autre part, les doigts capacitifs, espacés de 10 μm , forment des zones confinées, dans lesquelles les cellules peuvent se loger et fortement interagir avec le champ électromagnétique. De plus, cette topologie permet, à la fréquence de résonance, de localiser le champ électromagnétique dans le résonateur (Figure II.15). En particulier, le champ électrique va se concentrer dans la capacité inter digitée qui représente alors une zone d’interaction privilégiée avec le milieu diélectrique des cellules comme le montre la Figure II-15.a.

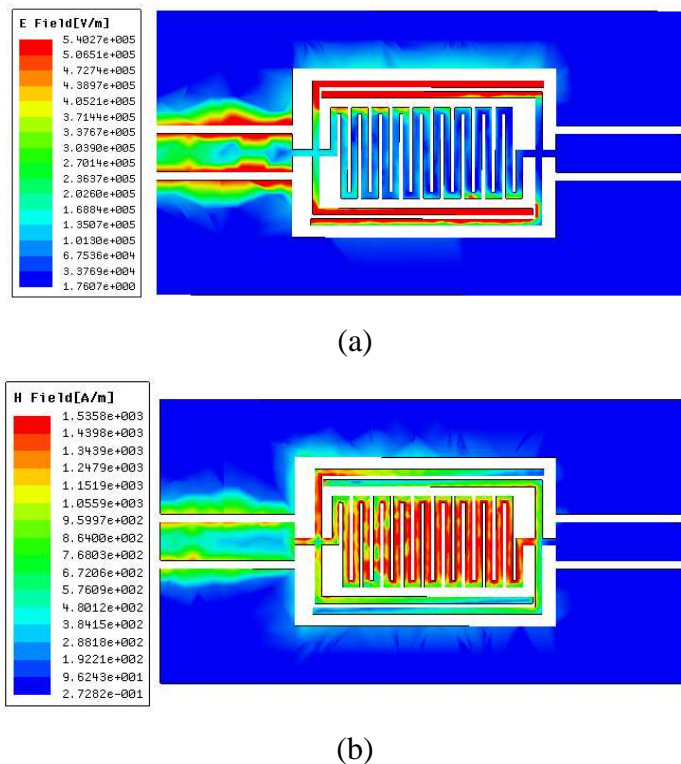


Figure II-15 : Répartition du champ (a) électrique et (b) magnétique à la fréquence de résonance.

Ce dispositif planaire a été simulé grâce au logiciel de simulation électromagnétique 3D HFSS d’Ansoft qui permet d’obtenir à la fois la répartition des champs électromagnétiques et les paramètres S du résonateur. Les simulations 3D permettront également de simuler la présence des cellules comme nous le verrons par la suite.

Le logiciel ADS a quant à lui été utilisé pour les simulations circuits qui permettent d’extraire les valeurs des composants RLC correspondants. La réponse en fréquence de cette structure est donnée Figure II-16. Comme prévu, nous retrouvons bien l’allure d’un résonateur stop-bande, avec un minimum du paramètre S_{21} à la fréquence de résonance.

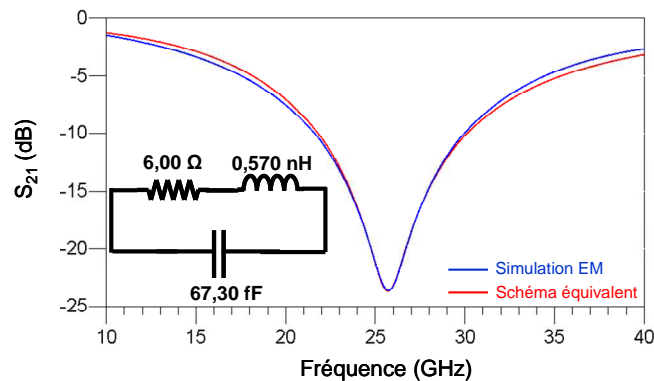


Figure II-16 : Comparaison du paramètre de transmission simulé du capteur avec celui de son schéma électrique équivalent.

Notons que si l’espacement des lignes formant le résonateur doit être du même ordre de grandeur que celui des cellules, un autre paramètre important dans l’optimisation de la sensibilité du capteur est son facteur de qualité. Dans le cas présent, ce dernier est estimé à 15 ce qui est une valeur correcte dans un premier temps. Il faut reconnaître que cette topologie de résonateur aux métallisations étroites n’est pas adaptée pour présenter de forts facteurs de qualité. En effet, nous avons dû faire un compromis entre ce dernier et l’agencement des lignes du résonateur permettant de maximiser l’interaction champ/cellules et la compacité du résonateur. Ainsi, il apparaît difficile d’atteindre de très bons facteurs de qualité tout en maintenant une taille de capteur compacte. En favorisant une interaction intense, nous avons privilégié l’observation d’un décalage fréquentiel suffisamment significatif pour être facilement détecté, même avec un facteur de qualité modéré.

Une fois la topologie du résonateur optimisée en fonction du type cellulaire à analyser, il est important de prendre en compte la nécessité d’utiliser un milieu biologique support pour maintenir les cellules dans un état stable durant les caractérisations. Notons que ce milieu va

interagir lui aussi avec le champ électromagnétique rayonné par le capteur et qu'il est donc important de bien connaître son effet sur ce dernier.

III.2.2 Prise en compte de l'effet du milieu biologique

III.2.2.a Etude préliminaire

Les milieux classiquement utilisés en biologie pour maintenir les cellules en vie sont nombreux. Nous pouvons citer parmi les plus couramment utilisés, le PBS (Phosphate Buffered Saline) et le KFSM (Keratinocyte Serum-Free Medium). Ces milieux aqueux sont fortement salins et représentent donc aux fréquences de travail des milieux à très fortes pertes. Déposés en grande quantité sur le capteur, ils vont donc dégrader fortement les performances RF des résonateurs, et diminuent leur facteur de qualité et leur capacité de détection.

Ainsi, de façon à évaluer l'influence de ces milieux sur les bio-capteurs développés, des tests préliminaires ont été réalisés avec des bio-capteurs fabriqués dans la salle blanche au laboratoire comme nous le détaillerons dans le chapitre suivant.

Les mesures sont réalisées sous pointes en comparant la réponse du capteur à vide avec celle obtenue après avoir déposé une goutte du milieu à étudier avec une micro pipette hamilton qui permet de déposer des petits volumes de l'ordre de la dizaine de nL de façon à recouvrir la surface entière du capteur.

Afin de contenir la goutte de liquide analysée, nous avons formé à la surface des capteurs une cuvette, dans laquelle la goutte sera confinée. Les micro-cuvettes sont réalisées en résine SU8. La Figure II-17 montre un schéma de l'implémentation de cette cuvette en résine SU8. Le milieu à analyser sera modélisé comme un milieu diélectrique comptant des sphères de caractéristiques différentes représentant les tissus.

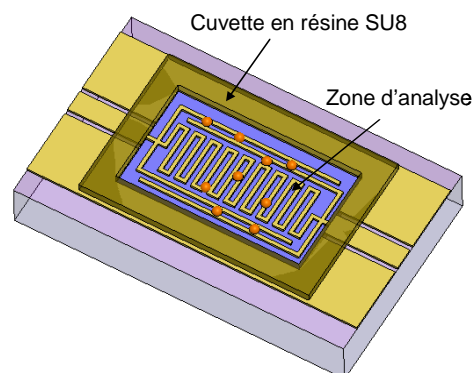


Figure II-17 : Schéma du capteur dont la zone d'analyse est délimitée par un anneau en résine SU8.

Notons que la résine SU8 présente l’avantage d’être transparente et biocompatible mais elle présente également des propriétés diélectriques qui ne perturbent pas le fonctionnement du capteur et en particulier, n’altère pas de façon conséquente son facteur de qualité. La Figure II-18 compare la réponse du capteur avec et sans l’anneau de SU8.

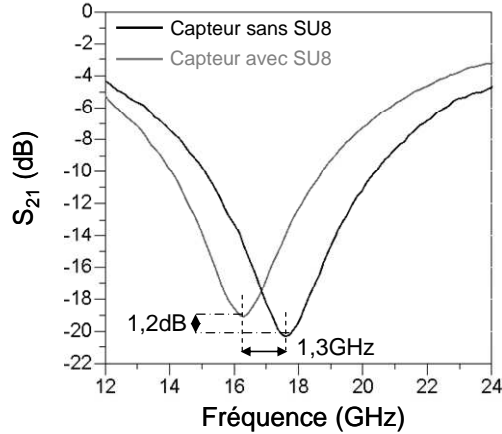


Figure II-18 : Comparaison des paramètres de transmission du résonateur mesurés avec et sans l’anneau de SU8 dans la configuration de la Figure II-24 (cas le plus défavorable).

Au travers de différents tests, nous avons voulu observer l’influence de différents milieux biologiques aqueux sur les performances du capteur et définir avec quels milieux il est préférable de travailler pour ne pas dégrader de façon trop importante la sensibilité des capteurs.

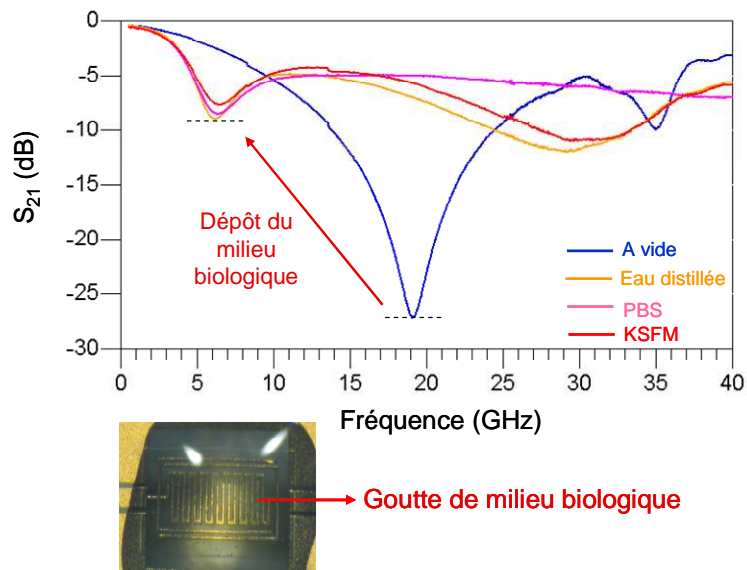


Figure II-19 : Mesures de l’impact de différents milieux biologiques sur le paramètre de transmission du bio-capteur.

La Figure II-19 montre bien que, présent sur toute la surface du capteur, les milieux aqueux que nous avons testés introduisent des pertes très conséquentes qui dégradent le facteur de qualité des résonateurs au point de ne plus pouvoir envisager la détection efficace de cellules.

La meilleure solution pour parer à ce problème serait de développer un réseau microfluidique à la surface du capteur de façon à ce qu'une très petite quantité de liquide interagisse avec le champ électromagnétique. Ainsi en travaillant avec de petits volumes, les pertes introduites par les liquides seraient limitées et il devient alors envisageable de faire de la détection cellulaire. Toutefois, l'implémentation d'un réseau microfluidique n'a pas été privilégiée dans un premier temps. Elle demande un travail de développement technologique et de fabrication assez long puisqu'elle n'était pas encore développée au laboratoire. Ainsi, dans le souci de valider le bio-capteur et son principe de détection, nous avons opté pour une autre approche que nous allons présenter par la suite. Par ailleurs, ces milieux, riches en éléments nutritifs nécessaires à la survie des cellules, peuvent avoir une influence importante sur les caractéristiques RF des capteurs. Ainsi pour garder un maximum de contraste et une bonne sensibilité de détection, nous avons intérêt à travailler dans une solution faiblement ionique.

En résumé, le milieu biologique qui permettrait de conserver au maximum la sensibilité de détection des capteurs serait un milieu peu salin et dont la teneur en eau serait faible. C'est pourquoi nous nous sommes orientés vers l'utilisation d'un milieu couramment utilisé en biologie, connu sous le nom de ficoll : un gel polymère dont nous allons voir maintenant les propriétés intéressantes pour notre étude.

III.2.2.b Milieu biologique d'analyse : le ficoll

Ce milieu se présente sous la forme d'un gel qui est un polymère du saccharose. Ainsi, la composition de ce milieu qui contient essentiellement de l'eau et du sucre est très intéressante dans le cadre de notre étude. En faisant évaporer l'eau qu'il contient, le ficoll prend l'aspect d'un gel qui forme une matrice solide pouvant protéger les cellules. L'avantage de pouvoir laisser l'eau s'évaporer et que la matrice polymère solide ainsi obtenue présente de faibles pertes pour le capteur.

En effet, comme le montre la Figure II-20 qui présente des résultats de mesures obtenus avec le ficoll, ce milieu ne dégrade pas de façon trop importante le facteur de qualité du résonateur qui, une fois chargé par le ficoll polymérisé avoisine une valeur de 9 et permet

de conserver les capacités de détection des résonateurs. Ce milieu présente en effet une permittivité et une tangente de pertes faible qui permettent de conserver la sensibilité des bio-capteurs à un niveau raisonnable, même si la dégradation n’est pas négligeable.

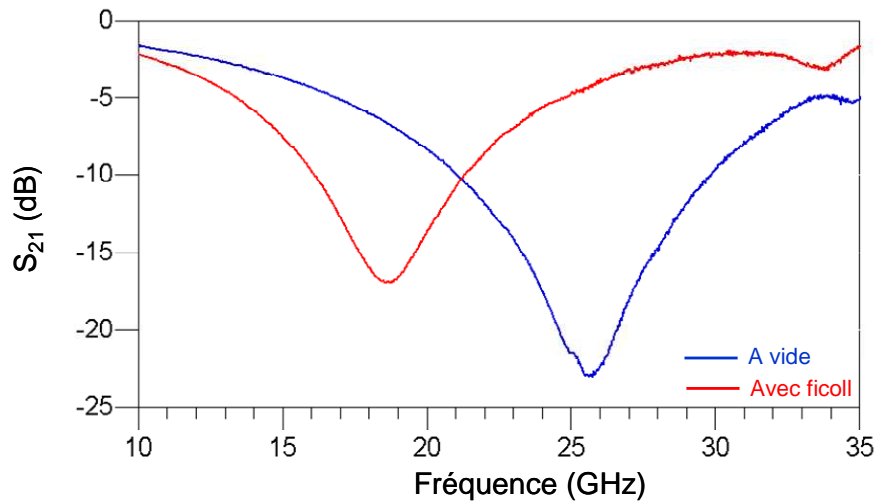


Figure II-20 : Mesure de l’impact du ficoll sur le paramètre de transmission du bio-capteur.

Cette mesure préliminaire nous a permis, grâce à des rétro simulations à partir du logiciel HFSS, de déterminer la permittivité et la tangente de pertes de ce milieu de façon à pouvoir réaliser des simulations EM pour optimiser la conception du capteur. La Figure II-21 compare les paramètres de transmission simulés et mesurés du capteur chargé par du ficoll.

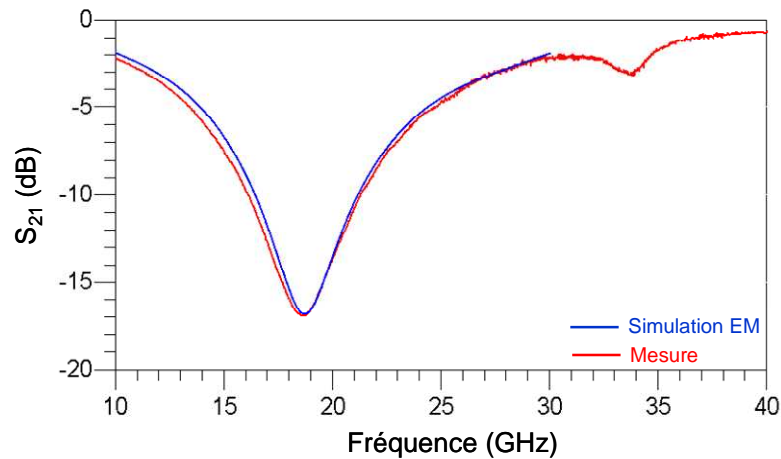


Figure II-21 : Comparaison des paramètres de transmission mesurés et simulés du résonateur chargé par du ficoll.

Ainsi la permittivité relative du milieu est estimée à $3,3 \pm 0,3$ et sa tangente de perte à $0,040 \pm 0,004$ à 18 GHz. Ces valeurs seront utilisées dans la suite pour réaliser l'optimisation du bio-capteur par simulations EM 3D.

Etant donné que le ficoll n'est pas complètement transparent aux fréquences micro ondes, sa présence sur le capteur induit un décalage fréquentiel dont il faudra tenir compte lors de la caractérisation de cellules dans ce milieu. C'est pourquoi, avant toute mesure avec des cellules, il sera nécessaire de réaliser une calibration du dispositif en enregistrant sa fréquence de résonance avec du ficoll pur.

Cette étape peut alors s'avérer délicate dans la mesure où le volume déposé sur le capteur a une influence sur le décalage de sa fréquence de résonance. La première solution consiste à déposer le même volume de milieu pour la calibration du capteur et pour la caractérisation des cellules. Toutefois ce paramètre n'est pas toujours facile à maîtriser étant donné les faibles volumes mis en jeu. C'est pourquoi, nous avons étudié par des simulations électromagnétiques, l'influence du volume de ficoll déposé sur le capteur. Comme le montre la Figure II-22, au-delà d'une épaisseur de 20 μm de ficoll déposé sur le capteur, le champ électromagnétique n'interagit plus avec cette partie supérieure du milieu qui n'a pas d'effet sur le dispositif. Ainsi, l'épaisseur de la cuvette de résine SU8 utilisée est fixée à 20 μm . Dans ce cas, en remplissant complètement la cuvette de ficoll, l'influence de ce milieu sur la réponse du capteur est plus facilement reproductible. Nous nous assurerons donc que pour chaque mesure, les cuvettes de SU8 soient entièrement remplies de ficoll de façon à introduire dans chaque cas, la même perturbation sur la réponse en fréquence du résonateur.

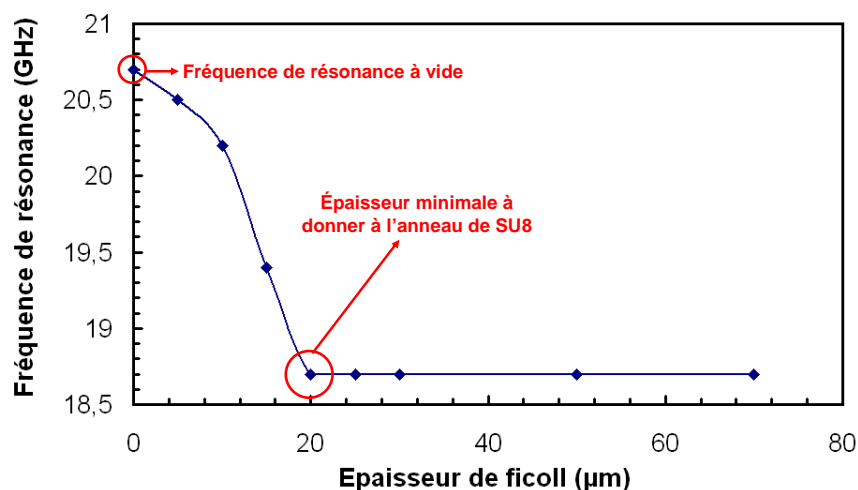


Figure II-22 : Simulation de l'influence de l'épaisseur de ficoll en interaction avec le bio-capteur.

Une fois l'influence du ficoll sur le capteur bien maîtrisée, il est envisageable d'étudier l'effet des cellules à l'intérieur du ficoll, et ceci fera l'objet du chapitre suivant.

III.2.3 Précision attendue de la méthode et principales limitations

A la suite des mesures réalisées dans le ficoll, les paramètres diélectriques du milieu intracellulaire analysé sont extraits par rétro simulation électromagnétiques. Les cellules sont alors modélisées, par des demi-sphères ayant une permittivité et une conductivité uniformes. En effet, aux fréquences auxquelles nous travaillons, la membrane cellulaire est quasi transparente et donc difficile à mettre en évidence. De plus, la longueur d'onde de travail (de l'ordre de 0,9 à 3 cm sur la bande d'analyse) est trop grande pour permettre de distinguer des organites à l'intérieur de la cellule dans le milieu intra cellulaire. Dans ce cas, nous avons modélisé les cellules par des sphères homogènes constituées d'un milieu diélectrique uniforme (Figure I-12).

Plusieurs rétro simulations électromagnétiques permettent d'ajuster les courbes obtenues en mesure avec celles obtenues par simulation en faisant varier pas à pas la conductivité et la permittivité des cellules modélisées. Ces optimisations sont faites manuellement mais des outils d'optimisation automatiques peuvent très bien être utilisés. Nous verrons plus en détails comment sont effectuées les rétro simulations ainsi que des exemples dans le chapitre suivant.

Les paramètres qui influencent le décalage fréquentiel sont dans ce cas multiples. Ils dépendent à la fois du nombre de cellules, de leur type, de leur état physiologique, et de leur position par rapport au capteur. Ce dernier point est particulièrement problématique avec l'utilisation d'une matrice de ficoll qui engendre les principales sources d'erreur lors de l'extraction des paramètres diélectriques cellulaires. En effet, il est difficile, en utilisant le ficoll comme support pour les cellules, de contrôler leur position exacte à la fois dans le plan du capteur mais aussi leur altitude dans l'épaisseur du ficoll. Nous pouvons estimer par simulation l'impact d'une couche de ficoll, même fine, présente entre les cellules et le capteur. La Figure II-23 montre donc que si les cellules ne sont pas en contact avec le substrat mais légèrement au-dessus, la réponse fréquentielle du résonateur ne va pas être modifiée de la même façon. La simulation est réalisée avec une cellule dont la taille a été volontairement exagérée (diamètre considéré : 30 μm) pour montrer sur une seule cellule l'effet de son altitude par rapport au capteur. De plus, l'observation des cellules dans le ficoll, réalisée sous microscope, permet de constater qu'elles conservent une forme arrondie. C'est pourquoi, pour

rester le plus près possible de la réalité, nous les modélisons par des demi-sphères diélectriques dont la permittivité relative est fixée à 42 (valeur moyenne choisie d'après la littérature [II.5]).

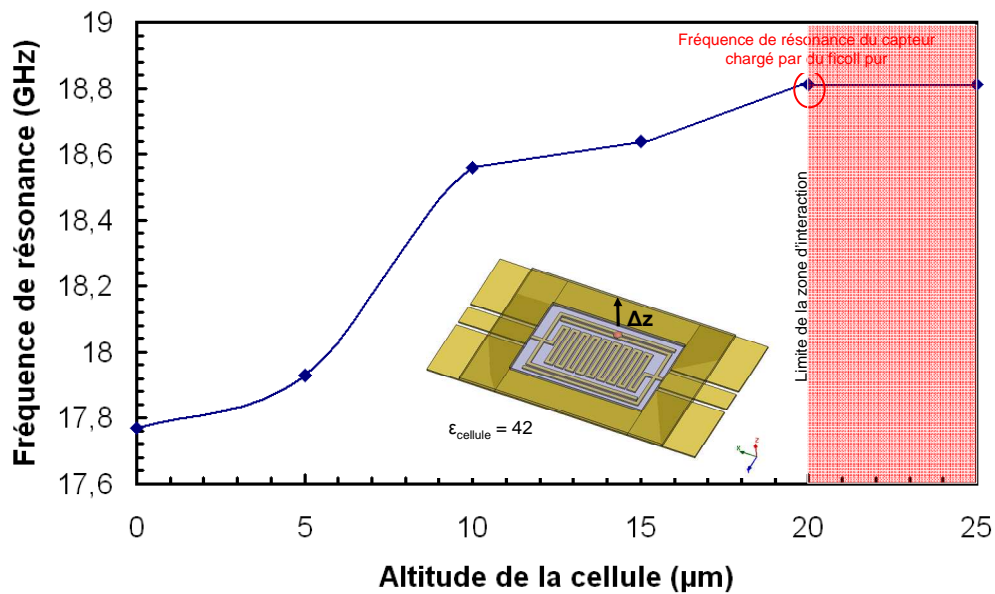


Figure II-23 : Simulation montrant l'influence de la position des cellules par rapport à l'axe z.

De plus, comme nous l'avons montré précédemment, même si les cellules sont situées dans le plan du capteur, les champs électriques et magnétiques ne sont pas homogènes sur toute la surface du capteur. Par conséquent, les cellules n'auront pas la même influence en fonction de leur position sur le capteur. Il est alors nécessaire, une fois les cellules déposées sur le capteur, de réaliser visuellement, sous microscope, une cartographie de leur répartition dans le plan du capteur qu'il faudra respecter minutieusement pour disposer les éléments diélectriques lors de la phase de simulations électromagnétiques.

Cette première génération de bio-capteurs comporte un certain nombre de limitations et son utilisation n'est pas encore optimale pour la détection et l'analyse précise de cellules. Cependant, elle nous a permis d'effectuer nos premières expérimentations et d'appréhender les principales problématiques liées aux mesures avec des milieux biologiques. Nous verrons, également, dans le chapitre suivant, que grâce à ces premiers capteurs, nous avons réussi à démontrer la faisabilité et la pertinence de la méthode d'identification cellulaire par spectroscopie diélectrique EM à ces fréquences et à cette échelle. A partir des résultats de ces

expérimentations, nous allons voir comment nous avons fait évoluer le design de ce type de bio-capteurs pour améliorer leur sensibilité de détection ainsi que leur précision d'analyse.

III.3 Amélioration de la sensibilité et de la précision des bio-capteurs

Nous avons particulièrement travaillé sur la définition des zones d'analyse grâce à la résine SU8 pour résoudre les deux points essentiels, à savoir, l'augmentation à la fois de la sensibilité de détection des bio-capteurs et de leur précision (réduction de l'incertitude) dans l'analyse des paramètres diélectriques cellulaires.

La première étape passe par la nécessité de s'affranchir du ficoll lors des mesures. Ce point a fait l'objet du développement d'un nouveau protocole de mesure consistant à cultiver les cellules directement sur les bio-capteurs. Ce procédé, a été mis au point avec les biologistes et sera plus particulièrement détaillé dans le chapitre suivant. Ainsi, ce dernier nous assure que lors des mesures, les cellules sont bien en contact avec le substrat des résonateurs et localisées entre les métallisations dans la zone qui nous intéresse. Un second point important réside dans le fait que désormais les mesures pourront être réalisées sans aucun milieu biologique support, directement à l'air libre. Cela implique un gain de temps très important dans la phase de rétro simulations, car désormais seule la présence des cellules compte. La phase de calibration du capteur chargé par un milieu biologique support n'est maintenant plus nécessaire. Ainsi, dans les simulations EM 3D, nous pourrions nous affranchir de tout milieu biologique extérieur et des paramètres supplémentaires qu'il engendrait dans l'extraction de la bio-impédance des cellules analysées permettant de limiter l'incertitude liée à la modélisation EM de la mesure réellement effectuée.

Ce point important étant résolu, la principale limitation reste l'incertitude liée à la position des cellules sur la surface du capteur.

III.3.1 Fonctionnalisation des zones d'analyse

Lors de nos premiers tests, nous avons pu observer que la zone capacitive, qui concentre de façon intense le champ électrique, était une partie du bio-capteur particulièrement sensible à la présence des cellules. En effet, cette zone est très sensible à des variations de permittivité et nous allons donc avec cette version de bio-capteurs nous concentrer sur cette zone. Rappelons que notre objectif étant de discriminer différents types

cellulaires mais aussi d'isoler des cellules souches cancéreuses, la mesure précise de la permittivité de la cellule est une information primordiale.

C'est pourquoi, nous avons délimité les zones d'analyse sur le capteur aux capacités inter digitées. Ces zones vont de plus être restreintes aux parties où le champ électrique est homogène de façon à ce que quelque soit la position d'une cellule à la surface du substrat, son influence soit la même sur le décalage de la fréquence de résonance. La Figure II-24 montre la nouvelle implémentation des zones d'analyses.

Etant donné que les cellules sont cultivées directement sur la puce, la résine SU8 est placée aussi au niveau des accès coplanaires pour éviter que des cellules y adhèrent et modifient l'adaptation à 50Ω du résonateur à son entrée et à sa sortie. Cette désadaptation pourrait entraîner des modifications supplémentaires et peu reproductibles sur la réponse du capteur.

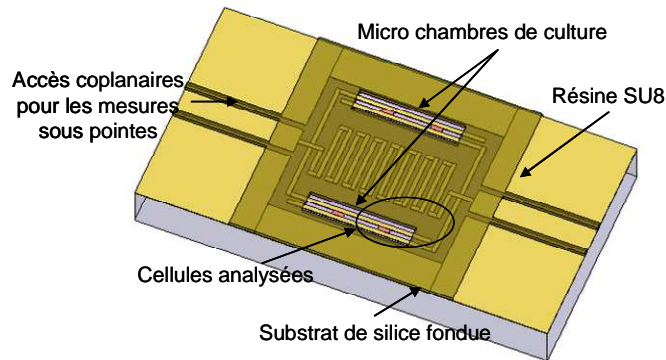


Figure II-24 : Schéma de la deuxième génération de bio-capteurs.

De plus, l'épaisseur de la résine SU8 a été choisie égale à $20 \mu\text{m}$ car, comme nous avons vu, au-delà de cette épaisseur le champ électromagnétique n'interagit plus avec les éléments extérieurs au capteur. Ainsi, toute cellule présente sur la SU8 n'est censée avoir aucune incidence sur la réponse électromagnétique du bio-capteur et seules les cellules présentes dans les micro-chambres de culture seront à prendre en compte. Nous verrons par la suite que les cellules, lors de nos expérimentations, ont démontré une bien meilleure affinité à adhérer sur le substrat que sur la SU8 et que par conséquent, il n'y a que très peu de cellules, voir aucune, sur la SU8.

Avec ce protocole, les cellules adhèrent au capteur ce qui a pour conséquence une légère modification de leur forme. Elles vont avoir tendance à s'étaler sur la surface en émettant des prolongements. En conséquence, elles occuperont une surface plus importante

mais présenteront en contrepartie une épaisseur plus fine. C'est pourquoi, l'épaisseur des lignes de métallisation de nos bio-capteurs est réduite relâchant certaines contraintes technologiques. En effet, 3 à 5 μm leur suffiront pour assurer un maximum d'interaction avec le champ électromagnétique.

Ainsi, le décalage fréquentiel induit par l'introduction de cellules n'est dû, dans cette configuration, qu'au type cellulaire analysé, à leur état pathologique et à leur nombre interagissant avec le capteur. Ainsi, en rétro simulation, le gain de temps est très significatif et la précision sur les paramètres diélectriques extraits bien meilleure en déterminant le nombre de cellules et la surface qu'elles occupent à l'aide d'un microscope. Notons, comme le montre la Figure II-25, qu'un décalage fréquentiel significatif peut être observé potentiellement avec seulement quelques cellules présentes sur le capteur. La précision sur la détermination de la bio-impédance d'une seule cellule s'en verra fortement améliorée.

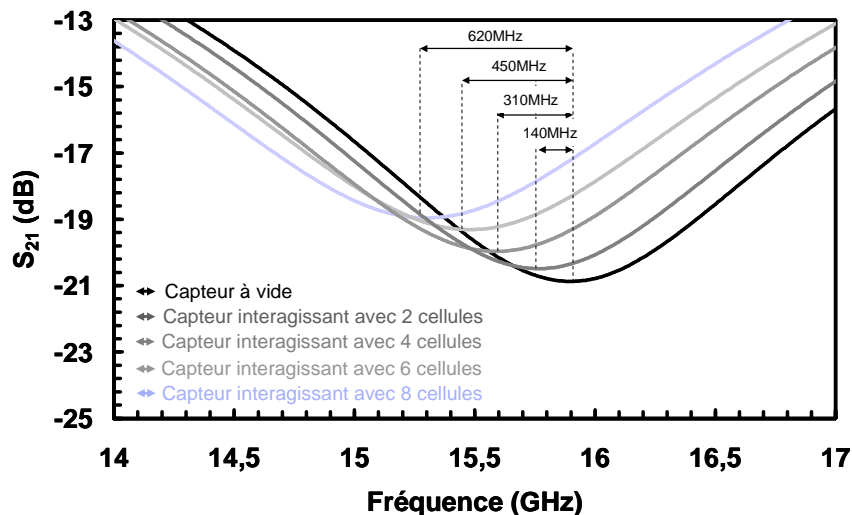


Figure II-25 : Simulations de l'évolution du paramètre de transmission du micro résonateur en fonction du nombre de cellules présentes ($\epsilon'_r = 42$, $\tan\delta = 0,3$).

Ainsi, la sensibilité de ces bio-capteurs permet de détecter et d'analyser facilement moins de dix cellules sur le capteur. La principale source d'imprécision reste la bonne évaluation du volume de la cellule qui interagit avec le champ électromagnétique. La forme allongée des cellules est difficile à reproduire avec exactitude en simulation et leur épaisseur effective reste complexe à déterminer optiquement avec une grande précision.

III.3.2 Présentation des différents résonateurs

Rappelons que pour avoir accès à une caractérisation sur une large plage de fréquence, plusieurs résonateurs ont été dimensionnés pour sonder les types cellulaires étudiés sur le spectre fréquentiel 10 GHz - 35 GHz.

Deux types cellulaires différents vont être préférentiellement étudiés dans notre étude : les cellules gliales U87 et les neurones SH-SY5Y, provenant chacune de lignées cellulaires bien connues. Afin de maximiser l'interaction avec les cellules, nous avons dimensionné l'espacement entre les doigts inter digités des bio-capteurs de façon à rester au plus près des dimensions des cellules analysées. Des résonateurs dont les gaps font 10 μm ont donc été réalisés pour analyser spécifiquement les cellules U87, tandis que des gaps de 15 μm ont été réalisés pour analyser les neurones SH-SY5Y d'ordinaire légèrement plus volumineux que les cellules U87. Trois points de fréquences ont été visés dans notre étude : 15,7 GHz – 20,5 GHz et 34,5 GHz. Par conséquent, 6 résonateurs ont été dimensionnés pour cette campagne de mesure. L'utilisation de ces différents résonateurs permet de couvrir la gamme de fréquences d'analyse et de connaître pour un type cellulaire donné, l'évolution de son paramètre de transmission en fonction de la fréquence. Ainsi, pour un type cellulaire donné, il est possible de connaître sa signature électromagnétique par pas de fréquence discret.

La Figure II-26 montre deux résonateurs fonctionnant tous les deux à 15,7 GHz mais présentant des gaps de 10 et 15 μm . La longueur de l'inductance et le dimensionnement de la zone capacitive étant ajustée pour conserver la même fréquence de travail.

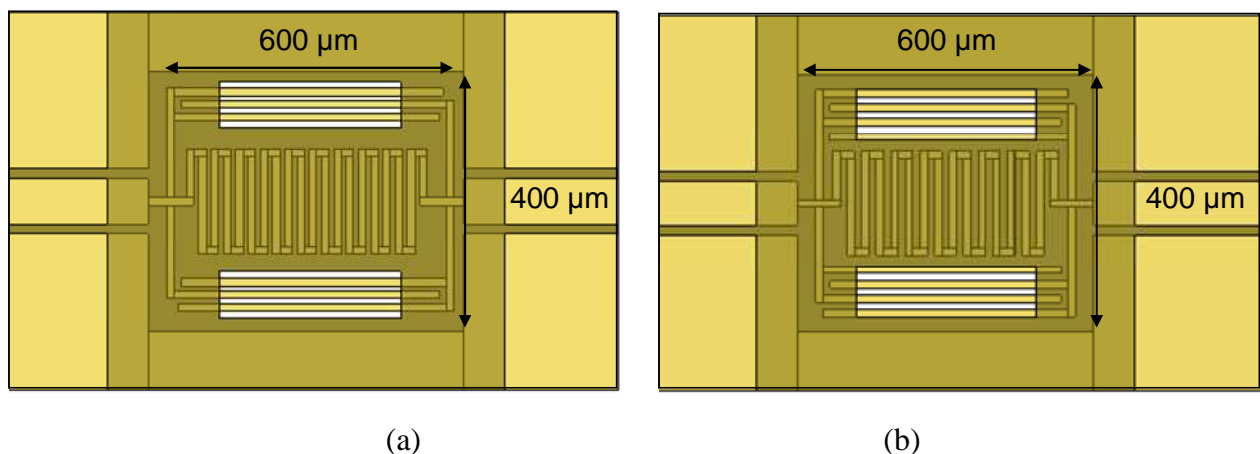


Figure II-26 : Schémas de deux résonateurs : (a) taille des gaps 10 μm et (b) taille des gaps 15 μm .

Comme le montre la Table II-2, la topologie choisie pour nos résonateurs permet assez simplement, par le dimensionnement adéquat de l’inductance et de la capacité, d’obtenir les différentes fréquences de résonance tout en restant relativement compact. En particulier, le tableau II-2 résume les différents résonateurs que nous avons utilisés avec leur fréquence de résonance en l’absence de cellules, les valeurs des éléments RLC correspondant à une modélisation sous forme d’éléments électriques localisés similaires à celle présentée Figure II-10. La Figure II-27 montre les paramètres S des résonateurs simulés dans ADS et comparés aux résultats de mesures.

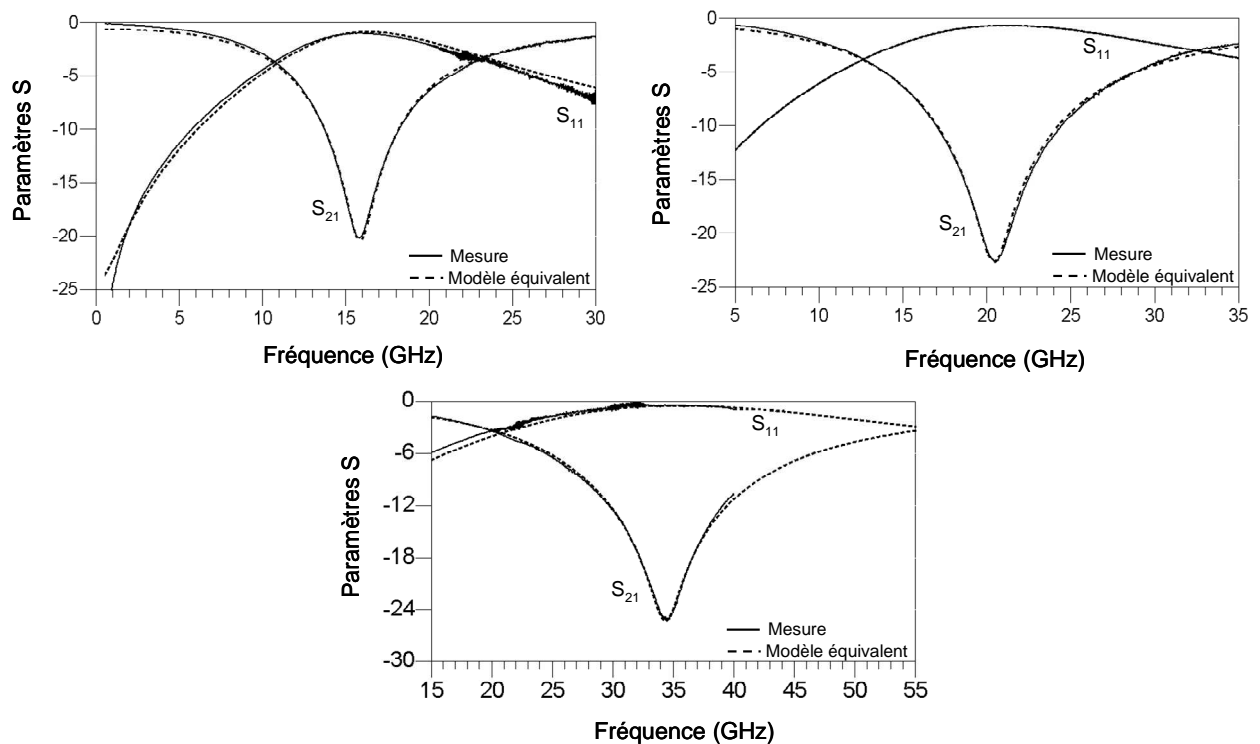
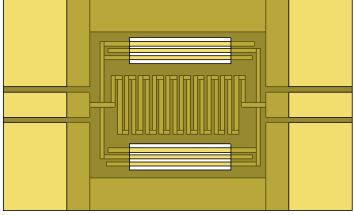
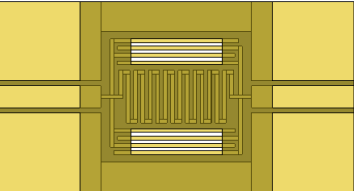
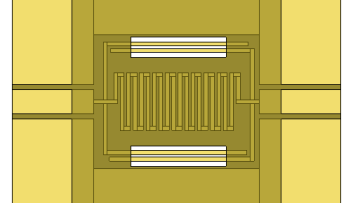
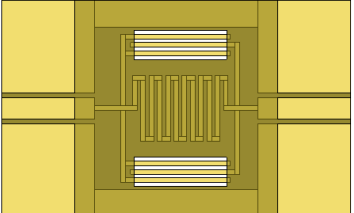
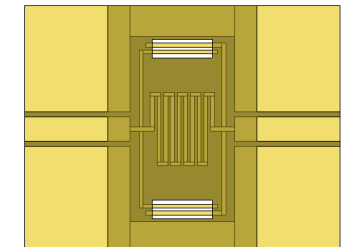
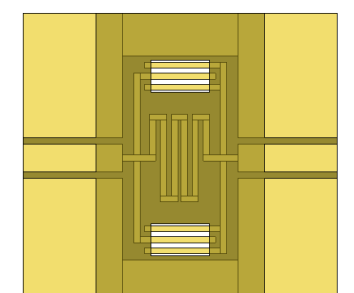


Figure II-27 : Comparaison des paramètres S modélisés et mesurés des résonateurs conçus. Les composants RLC du schéma équivalent sont donnés Tableau II-2.

Tableau II.2 : Spécifications des résonateurs.

Structure — 250 μm	Taille des gaps (μm)	Fréquence de résonance (GHz)	L (nH)	C (fF)	R (Ω)	Q_0
	10	15,7	0,79	127	6,6	11,8
	15	15,7	0,69	145	5,0	13,4
	10	20,5	0,78	78	7,5	13,4
	15	20,5	0,65	96	4,5	18,3
	10	34,5	0,48	45	6,2	16,7
	15	34,5	0,35	61	3,1	24,4

III.3.3 Vers la caractérisation d'une seule cellule à la fois

Cette nouvelle génération de bio-capteur nous permet donc de franchir une étape importante. Il est possible d'analyser avec une bonne précision une concentration très faible de cellules (de 2 à une dizaine). La sensibilité a été optimisée pour pouvoir déterminer avec précision et relativement rapidement la permittivité du milieu intra cellulaire et obtenir pour deux types différents leur signature dans le spectre électromagnétique. Nous nous sommes rendu compte que l'information sur la tangente de pertes reste cependant assez incertaine. Le dispositif n'est adapté pour extraire des valeurs fiables. La faisabilité de la méthode a été démontrée à partir du protocole de culture cellulaire sur puce que nous avons mis au point, comme nous le verrons dans le prochain chapitre. Cette approche semble être une bonne solution pour l'étalonnage des bio-capteurs fabriqués et la première détermination des paramètres électriques des objets observés.

Toutefois le facteur de qualité de tels résonateurs planaires reste limité et ne permet pas ou très difficilement d'atteindre la mesure sur la cellule unique. Il est donc nécessaire pour améliorer la sensibilité de détection de concevoir des dispositifs à plus fort facteur de qualité et dont la zone d'analyse, c'est-à-dire là où le champ électromagnétique et la cellule interagissent, soit fortement sensible à de très petites perturbations.

IV. Développement de micro-capteurs hyper sensibles : vers l'analyse de cellules uniques

Ainsi, pour permettre des mesures sur cellule unique une nouvelle approche est ici proposée avec des structures également résonantes mais dont la sélectivité en fréquence est accrue et combinée à une zone d'interaction champ/cellule hyper sensible.

L'amélioration du facteur de qualité des structures passe par l'utilisation de résonateurs distribués réalisés en technologie microruban. Même si le champ électromagnétique pouvant interagir avec le milieu biologique situé sur le capteur est moins important, l'utilisation de la culture des cellules sur puce limite l'épaisseur des cellules qui adhèrent à la surface du substrat. L'utilisation de la technologie coplanaire pour maximiser l'interaction entre le champ électromagnétique et les cellules ne se justifie alors plus autant et il est facile de trouver un bon compromis avec l'utilisation de lignes microrubans.

Le micro-résonateur développé est constitué de deux résonateurs. L'énergie est couplée d'un résonateur à l'autre par l'intermédiaire d'une capacité inter-digitée. Cette zone

du capteur concentre le champ électrique et représente donc une zone extrêmement sensible. La moindre petite variation de capacité va fortement modifier l'échange d'énergie inter-résonateur provoquant une modification de la réponse en fréquence du filtre. La sensibilité de détection devrait donc avec ce principe être améliorée pour atteindre potentiellement la mesure et la caractérisation d'une cellule unique.

Après avoir rappelé quelques principes de conception de filtres hyper-fréquences, nous verrons comment nous avons en quelques sortes « détourné » la conception de filtres pour l'analyse des paramètres diélectriques cellulaires.

IV.1 Quelques principes de conception des filtres hyper-fréquences

IV.1.1 Résonateur $\lambda_g/2$ distribué

Le concept de bio-détection que nous proposons ici est basé sur deux résonateurs demi-onde distribués que nous allons associer pour former une fonction de filtrage spécifiquement sensible à la présence de cellules.

Un résonateur demi-onde se comporte comme un circuit parallèle résonant quand il a une longueur égale à la longueur d'onde guidée divisée par 2 ou un multiple. Le phénomène de résonance apparaît quand $l = n \frac{\lambda_g}{2}$, soit :

$$l = n \frac{c}{2\sqrt{\epsilon_{\text{eff}}} f} \quad (\text{II.30})$$

Avec c la célérité de la lumière dans le vide et ϵ_{eff} la permittivité effective du substrat. L'expression II-30 permet de calculer la longueur à donner au résonateur en fonction de la permittivité effective du substrat et de la fréquence de résonance désirée.

En particulier, si l'on regarde la répartition du champ électromagnétique le long du résonateur, on s'aperçoit qu'il existe un maximum de champ électrique aux extrémités de la ligne et un maximum de champ magnétique en son centre comme le montre la Figure II-28.

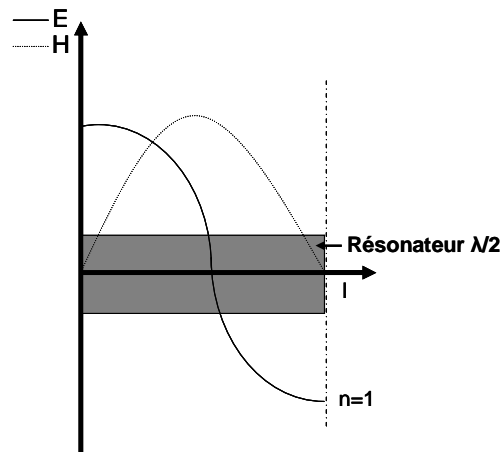


Figure II-28 : Répartition du champ électrique et magnétique le long du résonateur $\lambda_g/2$.

Il apparaît que les extrémités des résonateurs présentent un maximum de champ électrique. Il semble donc pertinent de les coupler électriquement. Le couplage devra être judicieusement choisi afin d'accroître la sensibilité du capteur.

IV.1.2 Couplage de deux résonateurs

En couplant deux résonateurs identiques, la réponse en transmission fait apparaître deux pics de résonance f_1 et f_2 répartis de part et d'autre de la fréquence f_0 intrinsèque à chaque résonateur. Pris séparément et qui correspond à la fréquence centrale du filtre (Figure II-29).

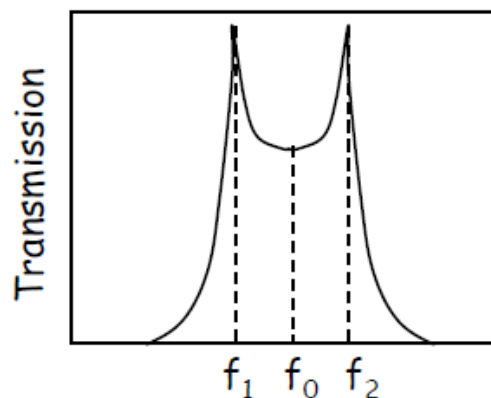


Figure II-29 : Réponse en transmission d'un filtre passe-bande [II.6].

Ces deux fréquences correspondent aux résonances des modes pairs (f_m) et impairs (f_e), qui sont physiquement établis par l'introduction d'un mur magnétique, dans le cas du mode pair, et électrique, dans le cas du mode impair, dans le plan de symétrie TT' des deux résonateurs. Le phénomène physique à l'origine de l'apparition de ces deux fréquences est dû

au couplage qui peut simultanément augmenter et diminuer l'énergie stockée dans le résonateur [II.6].

Le coefficient de couplage, est alors déterminé en fonction des fréquences f_e et f_m . Plus l'écart entre ces deux fréquences est élevé, plus le couplage est fort. Dans le cas d'un couplage électrique, le filtre peut se modéliser, au voisinage de la résonance, comme illustré sur la Figure II-30.

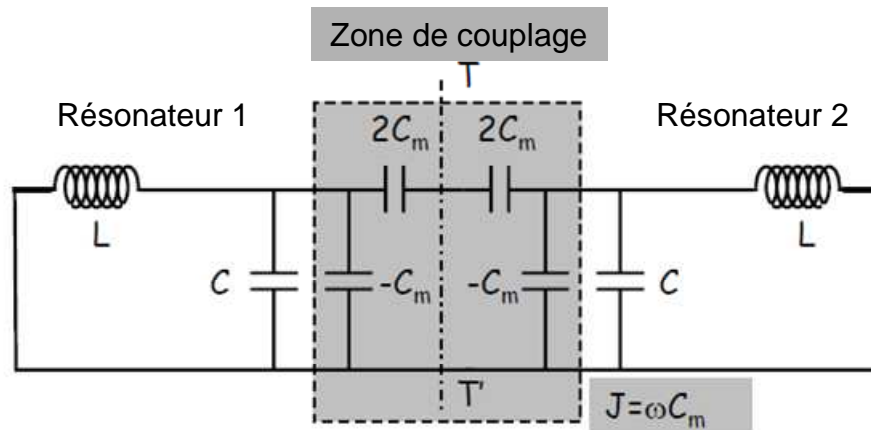


Figure II-30 : Schéma équivalent d'un filtre deux pôles au voisinage de la résonance dans le cas d'un couplage électrique [II.6].

Ainsi, les résonateurs sont modélisables par des circuits LC parallèles et le couplage est représenté par la mutuelle capacitance C_m . Dans ce cas, si l'on introduit un mur électrique (conditions de CCE) dans le plan de symétrie TT' des deux résonateurs, la fréquence du mode résonant impair s'écrit :

$$f_e = \frac{1}{2\pi\sqrt{L(C + C_m)}} < f_0 \quad (\text{II.31})$$

Si l'on introduit un mur magnétique (conditions de CCM) dans le plan de symétrie TT' des deux résonateurs, la fréquence du mode pair s'écrit alors :

$$f_m = \frac{1}{2\pi\sqrt{L(C - C_m)}} > f_0 \quad (\text{II.32})$$

Et le coefficient de couplage inter résonateurs k_e peut donc se mettre sous la forme :

$$k_e = \frac{f_m^2 - f_e^2}{f_m^2 + f_e^2} = \frac{C_m}{C} \quad (\text{II.33})$$

Ainsi, on vérifie que la valeur du couplage électrique croît lorsque que la mutuelle capacitance augmente.

Dans notre cas, l'approche de bio-détection proposée met à profit cette zone de couplage pour détecter et analyser les cellules en observant la modification du couplage inter résonateurs lors de leur introduction. Nous allons voir que l'un des intérêts du bio-capteur développé est que seul le pic résonant du mode impair est sensible à la présence de cellules. En effet, si l'on regarde les schémas équivalents des modes de propagation pairs et impairs présentés Figure II-31, seul le mode impair est censé être sensible à une perturbation diélectrique au niveau de la zone de couplage.

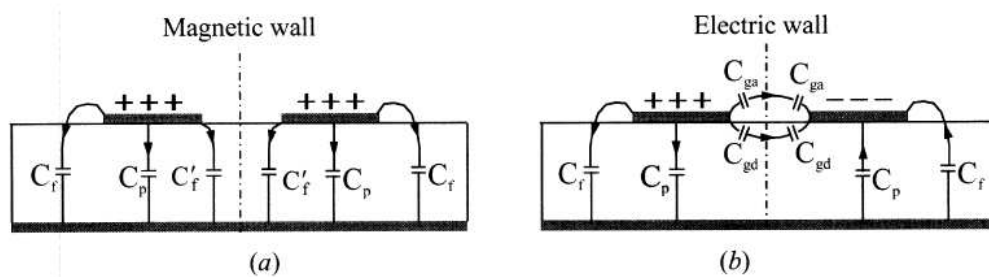


Figure II-31 : Modes quasi-TEM d'un couple de lignes microrubans : (a) mode pair - (b) mode impair [II.7].

IV.2 Mise au point de bio-capteurs basés sur une architecture de filtre

IV.2.1 Topologie des filtres

La Figure II-32 montre l'implémentation du filtre que nous allons utiliser. Pour les mêmes raisons que précédemment, les matériaux utilisés sont la silice fondue pour le substrat, l'or pour les lignes de métallisation et la résine SU8 pour définir la zone d'analyse. Les métallisations ont une épaisseur de l'ordre de $3\ \mu\text{m}$ permettant ainsi une interaction optimale avec les cellules, comme le champ électromagnétique se retrouve très rapidement confiné près du substrat au niveau de la zone de couplage inter-résonateur.

Etant donné que ces dispositifs sont destinés à être placés en culture pour permettre l'adhésion des cellules, l'anneau de SU8 protège les zones critiques qui ne doivent pas être en contact avec les cellules de façon à ne pas modifier les couplages entrées/sorties des

résonateurs. Ainsi, les variations observées sur la réponse du filtre ne pourront être normalement attribuées qu'aux cellules présentes dans la zone de couplage inter-résonateurs.

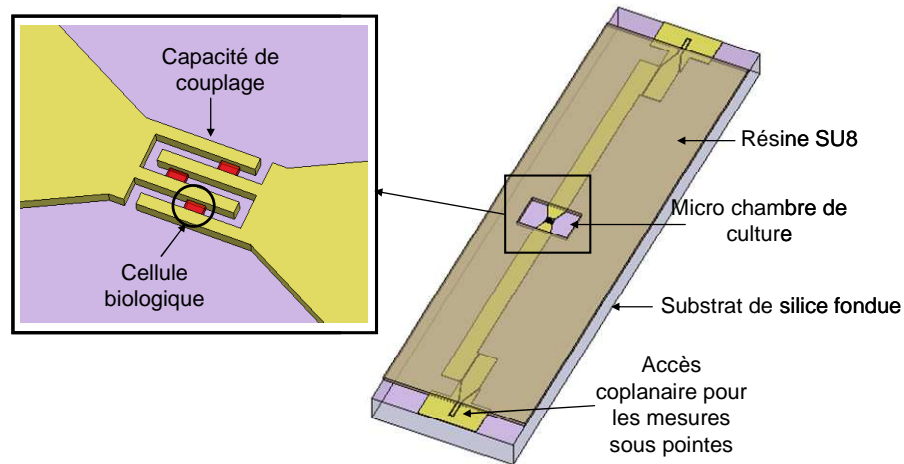


Figure II-32 : Schéma du filtre avec la modélisation de cellules au niveau de la capacité de couplage.

Pour démontrer les capacités de détection de tels dispositifs, un démonstrateur dont la fréquence centrale est 13 GHz a été réalisé. La longueur des résonateurs, calculés à partir de l'expression (II.31), ainsi que toutes les dimensions du dispositif sont données Figure II-33. La capacité C_v schématisée sur la figure représente la zone de couplage inter-résonateur sous la forme d'une capacité inter-digitée. Une transition coplanaire à l'entrée et à la sortie du filtre permet de réaliser simplement des mesures sous pointes RF.

Pour concevoir le filtre pour la détection d'éléments biologiques, notre approche diffère légèrement des techniques usuelles de synthèse de filtres passe-bandes où une faible ondulation dans la bande passante est généralement recherchée. Dans notre cas, de façon à accentuer les pics de résonance liés aux modes pairs et impairs et ainsi augmenter la sensibilité du filtre, le couplage entrée/sortie est volontairement faible, de façon à introduire une forte ondulation dans la bande passante (Figure II-34). Ainsi, la topologie de filtre choisie nous permet de différencier clairement chaque pic de résonance induit par les modes pairs et impairs se propageant le long des lignes de transmission.

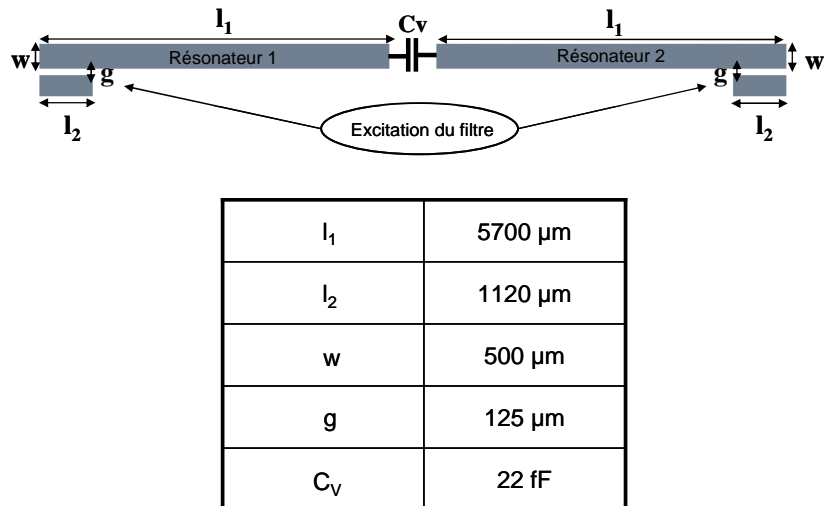


Figure II-33 : Modélisation et dimensions du filtre développé.

Le facteur de qualité de chaque résonateur, estimé à 40, permet d’améliorer la finesse des pics de détection et donc la sensibilité du capteur à la présence de quelques cellules. En contre partie, l’encombrement du bio-capteur augmente de façon importante : la structure complète (comprenant les transitions coplanaires) mesure 15 mm de longueur et 1,6 mm de largeur. Toutefois, il est possible d’envisager le repliement des résonateurs pour limiter la taille globale du capteur. De plus, ce démonstrateur fonctionne ici à une fréquence de 13 GHz. Ainsi, ces problèmes d’encombrement peuvent être en partie résolus par des arrangements topologiques et par la montée en fréquence sur la bande d’investigation comme le montre la formule (II.30). En effet, la longueur des résonateurs diminue quand leur fréquence de résonance augmente. D’autres solutions consisteraient à amincir l’épaisseur du substrat ou à utiliser des substrats de plus fortes permittivités mais cela au détriment du facteur de qualité.

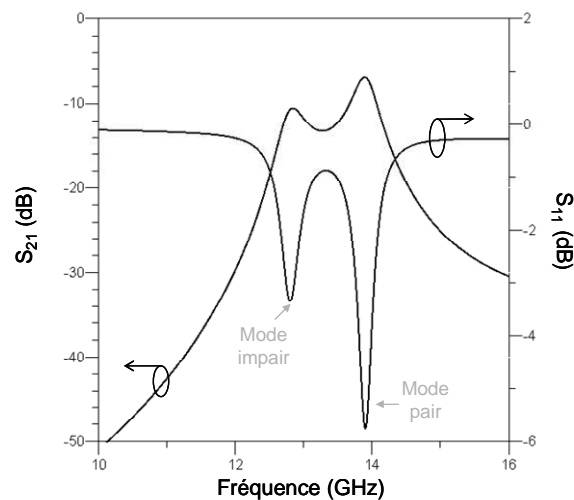


Figure II-34 : Simulation EM de la réponse en fréquence du filtre.

Dans la configuration microruban, il est nécessaire de métalliser la face arrière pour réaliser le plan de masse rendant impossible l’observation des cellules lors de la culture cellulaire qui se fait généralement au travers du substrat. C’est pourquoi, pour parer à ce problème, une ouverture est réalisée dans le plan de masse de façon à avoir une fenêtre d’observation juste au-dessus de la zone d’analyse (Figure II-35). La taille de l’ouverture est ajustée de façon à ce qu’elle n’est que très peu d’influence sur la réponse en fréquence du filtre, celui-ci étant disposé sur le chuck métallique de la station sous pointes lors de la mesure.

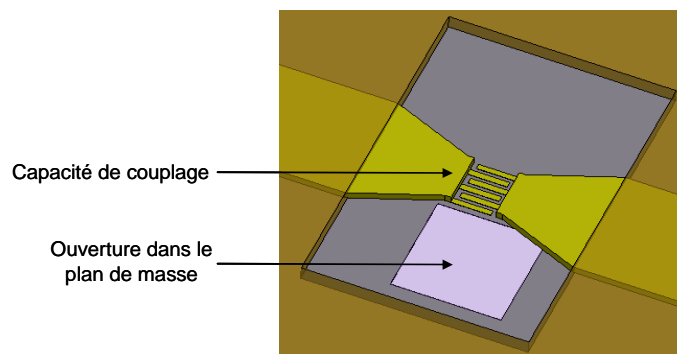


Figure II-35 : Schéma de l’ouverture du plan de masse.

La micro-chambre de culture et donc l’ouverture du plan de masse sont réalisées en regard, au niveau de la capacité inter digitée de couplage. En effet, compte tenu de la distribution du champ électrique le long des résonateurs demi-ondes (Figure II-28), la sensibilité du bio-capteur sera maximale si l’interaction se produit au niveau de la capacité inter-digitée qui, à la fréquence de travail, concentre un fort niveau de champ électrique comme le montre la Figure II-36.

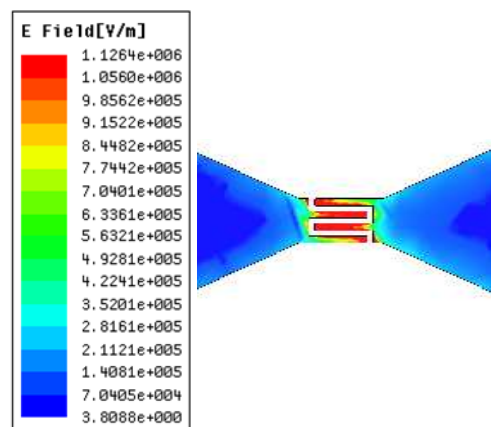


Figure II-36 : Répartition du champ électrique au niveau de la capacité de couplage à la fréquence de travail du filtre.

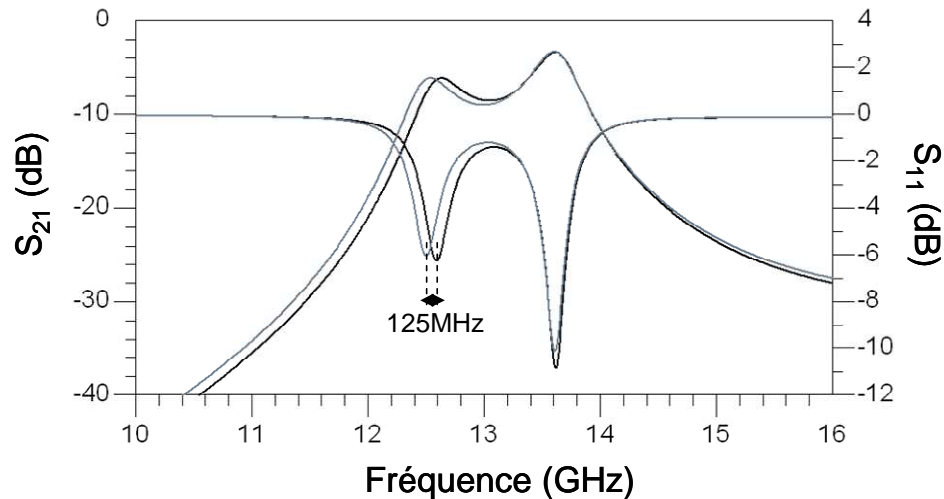


Figure II-37 : Simulation EM de l'influence d'une petite variation ($3fF$) de la capacité de couplage C_v du filtre.

Comme le montre la Figure II-37, l'intérêt d'utiliser la capacité de couplage comme élément de détection est que seulement l'un des deux modes de résonance est sensible à une faible variation de la capacité, l'autre pouvant ainsi servir de référence. En revanche, le dimensionnement de cette capacité de couplage est un point clé dans l'optimisation de la sensibilité des bio-capteurs comme nous allons le voir à présent.

IV.2.2 Principe de détection

Le principe de bio-détection développé repose donc sur la modification de la capacité de couplage inter résonateurs induite par l'introduction de cellules biologiques. La présence des cellules sur la zone capacitive ajoute une capacité en parallèle à la capacité de couplage à vide C_v . Ainsi, la capacité de couplage va globalement croître, provoquant une augmentation du couplage inter résonateurs et donc un décalage fréquentiel du pic résonant du mode de propagation impair (Figure II-38). Ce décalage peut être relié à la permittivité relative intrinsèque des cellules ainsi qu'à leur nombre.

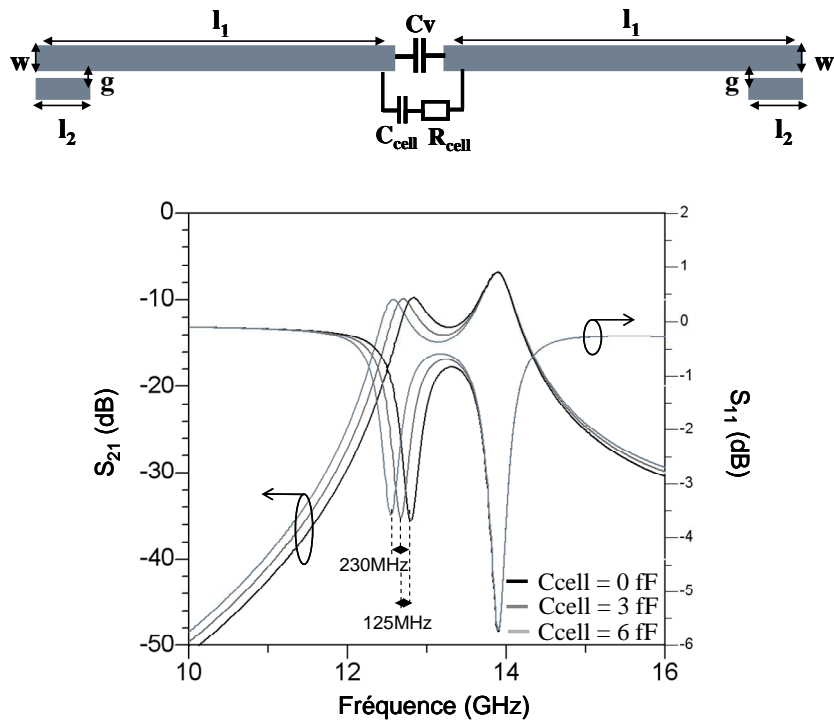


Figure II-38 : Modélisation du filtre chargé par des cellules biologiques et influence de la capacité C_{cell} sur la réponse en fréquence du filtre.

Si l'on considère à présent l'effet de la tangente de pertes du milieu intra cellulaire sur la réponse du filtre, cette dernière va avoir un impact significatif notamment sur le niveau des pertes en réflexion. Comme le montre la Figure II-39, le signal RF sera d'autant plus réfléchi en entrée et sortie du filtre que la conductivité des cellules sera élevée. Grâce à ces capteurs, une seule mesure permet donc d'avoir accès aux deux informations constituant la bio-impédance de la cellule.

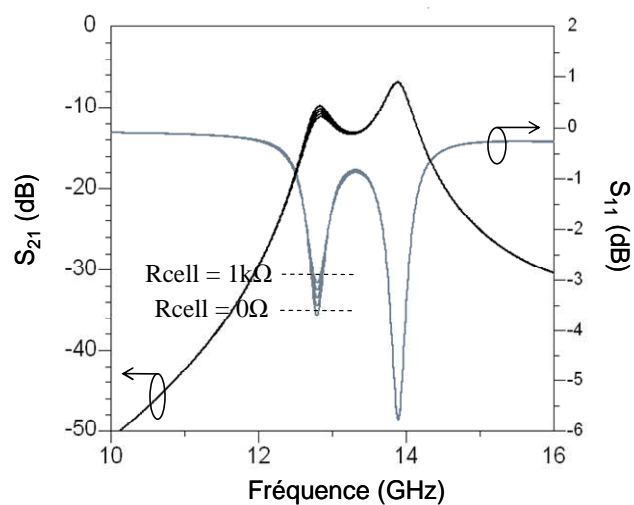


Figure II-39 : Capacité du bio-capteur à détecter une augmentation de résistivité de cellules biologiques.

IV.2.3 Optimisation de la sensibilité de la capacité de couplage

Pour ce capteur, le principal point clé consiste à détecter une capacité parallèle introduite par les cellules présentes entre les doigts de la capacité inter digitée qui va avoir une valeur très faible de l'ordre de quelques femto Farads (fF). Pour atteindre une bonne sensibilité à la présence d'une très petite concentration de cellules, il est donc nécessaire de travailler sur la géométrie de la capacité inter digitée de couplage.

Tout comme la première génération de bio-capteurs, il est important que la taille des gaps entre les doigts inter-digités soit du même ordre de grandeur que celle des cellules. Ces gaps devront donc être compris entre 10 et 15 μm pour permettre une interaction optimale entre le champ électromagnétique et les cellules du système nerveux analysées.

Le deuxième point clé réside dans la valeur à donner à la capacité inter digitée en l'absence de cellule, notée C_v . En effet, pour permettre une variation significative de la capacité de couplage lorsqu'elle sera chargée par une capacité de seulement 2 ou 3 fF, il faut que la valeur de la capacité de couplage à vide soit initialement relativement faible. La Figure II-40 montre le décalage fréquentiel induit par une capacité $C_{\text{cell}} = 3 \text{ fF}$ pour différentes valeurs de C_v . On voit ici qu'il serait intéressant que cette valeur reste comprise entre 10 et 30 fF pour permettre une détection efficace. La valeur minimale acceptable pour C_v est en effet de 10 fF car en-dessous de cette valeur, la capacité est difficilement réalisable.

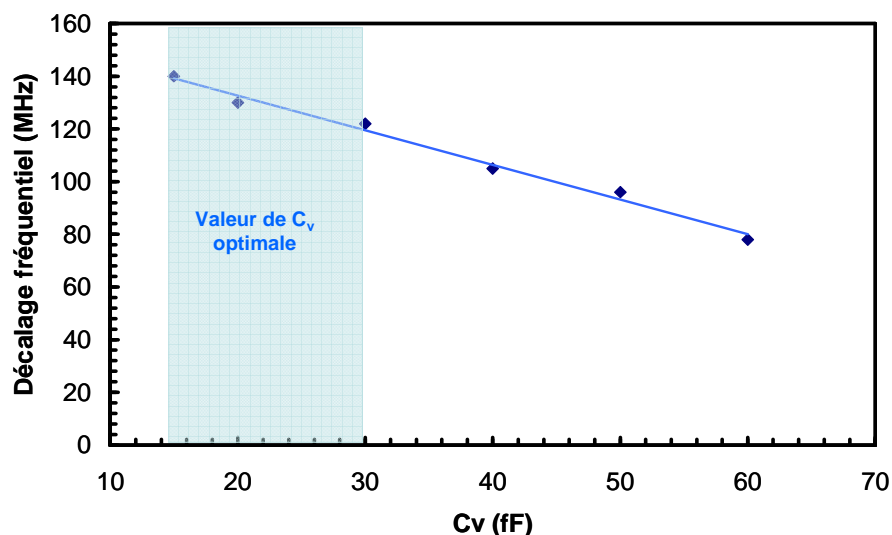


Figure II-40 : Evolution du couplage inter résonateurs pour différentes valeurs de C_v ; $C_{\text{cell}} = 3 \text{ fF}$.

Enfin, la longueur et le nombre de doigts de la capacité doivent être correctement dimensionnés dans la mesure où ils doivent être suffisamment longs et nombreux pour

maximiser nos chances d'obtenir une adhérence des cellules dans les gaps lors de la culture cellulaire.

C'est donc en prenant en compte l'ensemble de ces critères que la capacité de nos filtres a été dimensionnée. Pour résumer, la taille des gaps est comprise entre $10\ \mu\text{m}$ et $15\ \mu\text{m}$ et la longueur des doigts reste inférieure à $200\ \mu\text{m}$. De plus le nombre de doigts inter digités doit être maintenu à 4 tout en conservant la valeur de cette capacité de l'ordre de 10 à 30 fF. La Figure II-41 présente les dimensions de la capacité inter digitée choisie pour le démonstrateur à 13 GHz qui répondent aux spécifications souhaitées. La valeur de la capacité réalisée est, dans ces conditions, de 22 fF. Notons que d'un point de vue réalisation technologique, il nous a été difficile de fabriquer des capacités inter digitée dont la valeur serait inférieure à 20 fF en prenant en compte toutes les contraintes topologiques données précédemment.

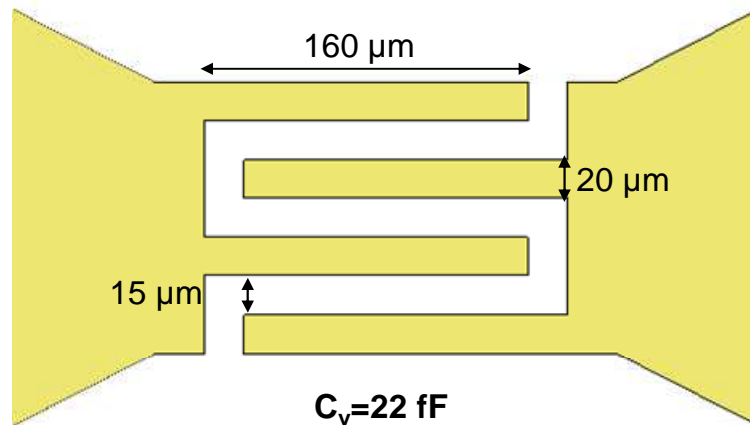


Figure II-41 : Dimensions de la capacité à vide C_v réalisée pour une valeur de 22 fF.

Le dernier point de cette étude théorique consiste à valider ces modélisations circuits par des simulations électromagnétiques 3D prenant en compte des cellules modélisées comme des éléments diélectriques avec une permittivité et une conductivité données. Tout comme pour la première génération de capteur, les cellules ont été modélisées par des éléments diélectriques de permittivité 42 et de tangente de pertes de 0,3. Les cellules sont ici représentées par des parallélépipèdes se rapprochant assez bien de la forme des cellules adhérentes. La Figure II-42 montre l'évolution de sa réponse en fréquence du capteur, dans le cas où un nombre différent de cellules serait présent à sa surface.

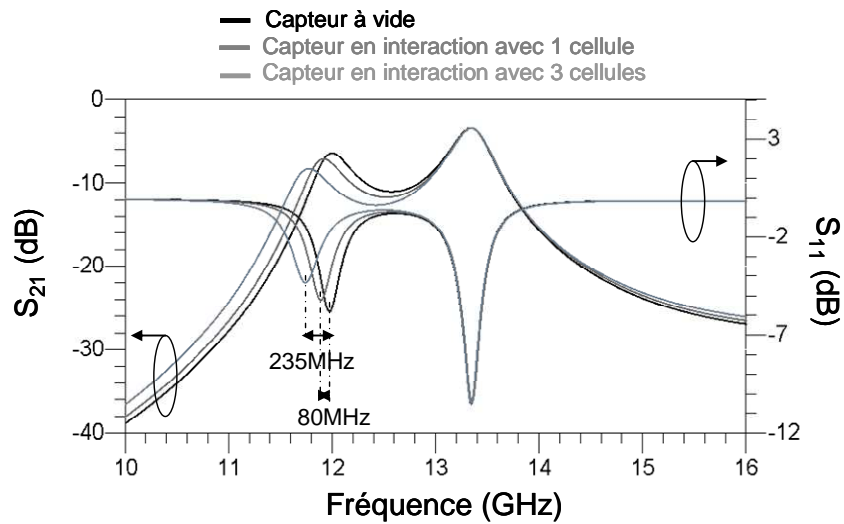


Figure II-42 : Simulation EM de l'influence du nombre de cellules sur la réponse du filtre en considérant une permittivité de 42 et une tangente de perte de 0,3.

Comme attendu, la présence des cellules dans les gaps de la capacité inter digitée augmente le couplage inter résonateurs entraînant un décalage significatif en fréquence et une augmentation des pertes par réflexion sur le mode résonant impair. De plus, nous montrons ici en simulation que cette nouvelle génération de bio-capteurs permet la détection d'une cellule unique puisque la présence d'une seule cellule en simulation permet d'observer une modification potentiellement détectable du mode résonant impair.

V. Conclusion

Au travers de ce second chapitre, nous avons abordé les problèmes de conception qui se posent lorsque l'on souhaite mener des mesures RF sur de la matière vivante. Ainsi, après avoir vu, d'un point de vue théorique, le principe de fonctionnement des dispositifs hyper-fréquences, nous avons étudié comment adapter ces dispositifs à l'étude de cellules humaines. Nous avons alors mis en avant l'importance de la topologie des résonateurs dans la sensibilité de détection et à quel point la prise en compte du milieu biologique d'analyse a orienté nos choix de conception. Une première génération de bio-capteurs nous a permis de mieux comprendre et maîtriser les paramètres essentiels à prendre en compte pour une détection cellulaire optimale. Après avoir ainsi prouvé la faisabilité de la méthode avec ces capteurs, nous avons montré leurs limites et proposé une nouvelle génération (via les filtres), plus sensibles, permettant potentiellement la détection et l'analyse de cellules uniques.

Il faut préciser que la phase de conception des bio-capteurs va de pair avec la mise en place des protocoles expérimentaux de mesure, car au fur et à mesure des expérimentations menées, les bio-capteurs et leur implémentation ont évolué progressivement jusqu'à leur forme actuelle. Par suite, nous allons voir au cours du dernier chapitre comment a été abordé la partie expérimentale de ces travaux qui représente une part importante de nos recherches. Nous présenterons également les principaux résultats expérimentaux obtenus sur les cellules du système nerveux humain et dresserons un bilan de ces travaux de recherche.

Chapitre Second

[II.1] E. RAMPNOUX : « **Analyse, conception et réalisation de filtres planaires millimétriques appliqués à la radiométrie spatiale** », *Thèse de l'Université de Limoges*, France, Chapitre I, 2003.

[II.2] M. MAKIMOTO, S. YAMASHITA : « **Microwave Resonators and filters for Wireless Communication** », *Advanced Microelectronics*, Springer, 2001.

[II.3] D.M. POZAR : « **Microwave Engineering** », *John Wiley & Sons*, second edition, 1998.

[II.4] S. GABRIEL, S.W. LAU, C. GABRIEL : « **The dielectric properties of biological tissues : II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz** », *Phys.Med.Biol.*, Vol.41, pp.2251-2269, 1996.

[II.5] R. BUCHNER, J. BARTHEL, J. STAUBER : « **The dielectric relaxation of water between 0°C and 35°C** », *Chemical Physics Letters*, Vol. 306, pp. 57-63, Septembre 1998.

[II.6] J-S. HONG, M. J. LANCASTER : « **Couplings of microstrip square open-loop resonators for cross-coupled planar microwave filters** », *IEEE Trans. Microwave Theory Tech.*, vol. 44, n°12, pp 2099-2109, 1996.

[II.7] J-S. HONG, M. J. LANCASTER : « **Microscrip Filters for RF/Microwave Applications** », *Wiley Series in Microwave and Optical Engineering*, 2001.

Chapitre III

Mise en œuvre expérimentale et caractérisation des cellules du système nerveux

I. Introduction

Au cours de ce dernier chapitre, nous allons présenter l'approche expérimentale suivie pour l'analyse des cellules du système nerveux. Nous verrons dans un premier temps les procédés de fabrication utilisés pour la réalisation des bio-capteurs, qui a été menée dans la salle blanche du laboratoire XLIM.

Nous présenterons, ensuite, les différents protocoles expérimentaux développés, en collaboration avec le laboratoire d'Homéostasie Cellulaire et Pathologies, pour l'analyse de cellules biologiques. Notre attention se portera tout particulièrement sur les cellules gliales (type U87-MG), neuronales (type SHSY5Y) et les cellules souches issues de la lignée U87-MG. Le premier protocole mis au point, utilise le ficoll comme milieu support pour assurer l'intégrité des cellules lors des mesures. Nous verrons les premiers résultats expérimentaux obtenus avec ce protocole ainsi que ses limites. Des améliorations ont ensuite été apportées au protocole expérimental qui n'utilise alors plus aucun milieu support pour les éléments biologiques. Les cellules sont cultivées directement sur la puce et mesurées à l'air, sous certaines conditions que nous détaillerons. Les résultats obtenus avec ce protocole seront présentés et nous verrons comment ces mesures nous permettent d'extraire les paramètres diélectriques des cellules. Les résultats obtenus avec les différents protocoles expérimentaux seront comparés.

Nous verrons que la première génération de bio-capteurs conçue et basée sur les résonateurs nous a permis de mettre au point ces protocoles expérimentaux et d'extraire les paramètres diélectriques cellulaires des cellules gliales et neuronales sur la bande de fréquence 10-35 GHz. Fort de ces résultats, la deuxième génération de bio-capteurs, basée sur l'utilisation des filtres deux pôles, a été testée pour étudier les cellules gliales. Nous verrons ainsi les avantages de ces capteurs et nous comparerons les résultats obtenus avec ceux des résonateurs.

Pour finir, nous verrons les premières mesures réalisées sur des cellules issues d'un milieu enrichi en cellules souches. Nous détaillerons le protocole expérimental qui a dû être adapté à ce type cellulaire spécifique. Après avoir validé le protocole utilisé, nous présenterons les résultats obtenus.

II. Fabrication des bio capteurs

Les bio-capteurs dédiés à l'analyse cellulaire sont réalisés grâce à des procédés de microélectronique standards restant relativement simples à mettre en œuvre. Les matériaux utilisés lors de la fabrication et susceptibles d'être en contact avec les cellules biologiques sont biocompatibles et ont fait l'objet de tests de biocompatibilité présentés dans le chapitre précédent.

Avant toute étape de fabrication, les substrats de silice fondue sont nettoyés grâce à un bain RCA. Cette procédure de nettoyage permet d'éliminer les substrats de tous les résidus organiques et de certains métalliques qui pourraient polluer la surface de silice fondue [III.1]. Le mélange utilisé, constitué d'acide sulfurique, d'eau oxygénée et d'eau désionisée, est porté à une température de 100°C. Les substrats sont plongés dans le bain acide pendant environ 3 ou 4 heures, rincés à l'eau désionisée et séchés à l'air comprimé.

Après cette étape préliminaire, nous allons voir que les procédés de fabrication des résonateurs et des filtres diffèrent légèrement.

II.1 Procédé de fabrication des résonateurs

II.1.1 Métallisation du substrat

La première étape qui suit le nettoyage des substrats consiste à métalliser leur surface. Les lignes de métallisations seront constituées d'or. Ce métal n'ayant pas de très bonnes propriétés d'adhérence sur la silice fondue, une couche d'accroche en chrome est utilisée. Une couche de Cr/Au est donc déposée sur le substrat par évaporation thermique.

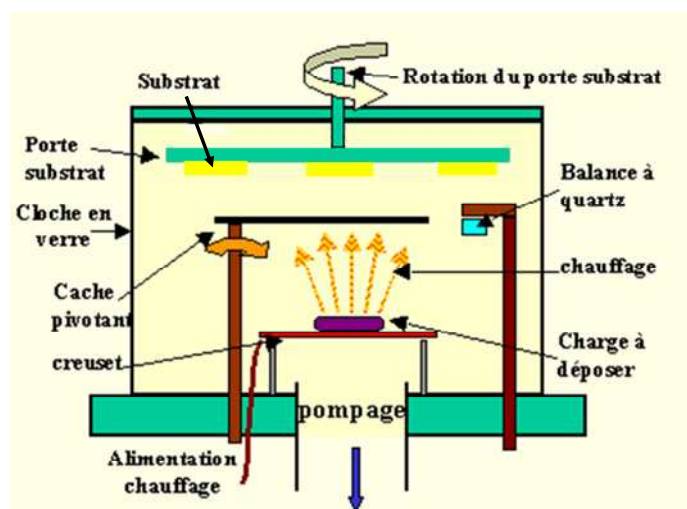


Figure III-1 : Bâti de dépôt par évaporation thermique [III.2].

Ce procédé de dépôt consiste, dans un bâti sous vide, à chauffer le matériau par effet Joule pour provoquer sa vaporisation et son dépôt sur le substrat. Un vide secondaire de l'ordre de 10^{-6} bar est nécessaire. Comme le montre la Figure III-1, le matériau, sous forme solide, est déposé dans un creuset au travers duquel est appliqué un courant qui provoque son échauffement. Quand la température de fusion du métal est atteinte, il commence à se vaporiser et à se déposer sur le substrat. L'épaisseur de la couche Cr/Au, qui est dans notre cas de $150 \text{ \AA} / 1500 \text{ \AA}$, est contrôlée par une balance à quartz qui détecte la dérive des oscillations du quartz par la modification de sa masse lors de la croissance de la couche déposée. La mesure du décalage de fréquence en fonction du temps permet aussi de mesurer la vitesse du dépôt qui est un paramètre important pour la qualité de la couche (limitation du stress essentiellement). Le chrome est évaporé à environ 2 \AA/s et l'or à une vitesse comprise entre 3 et 8 \AA/s . Enfin, de façon à assurer une bonne homogénéité des couches déposées, le porte-substrat peut être mis en rotation.

II.1.2 Définition des lignes d'or

Les lignes d'or des résonateurs sont ensuite définies par photolithographie UV et gravure des couches de chrome et d'or comme indiqué sur la Figure III-2.

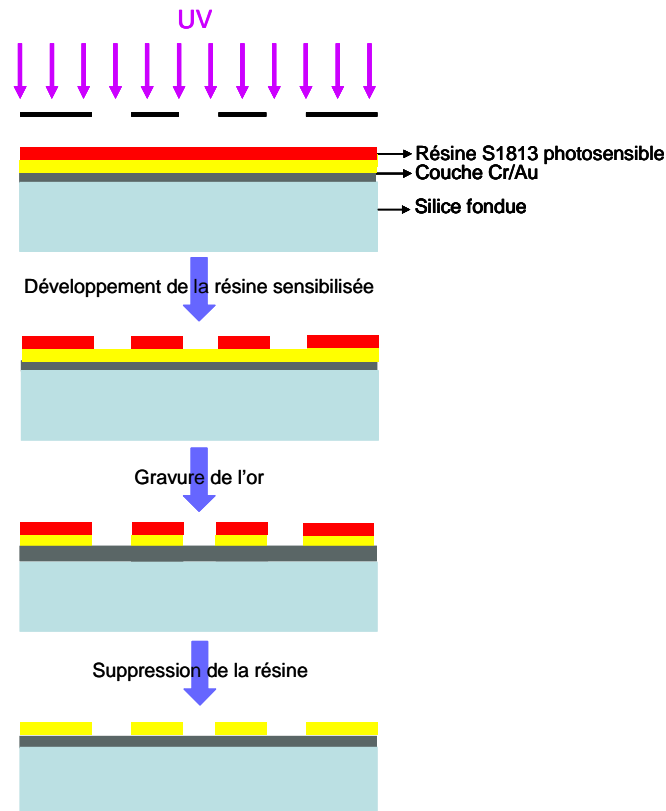


Figure III-2 : Principe de photographie par gravure.

La couche métallique est recouverte d'une résine photosensible positive S1813. Cette résine est ensuite insolée au travers d'un masque qui permet de définir les motifs à réaliser dans les métallisations. Les parties insolées de la résine sont sensibilisées et seront développées (avec le développeur Concentrate) après l'exposition au rayonnement UV. Ainsi, cette étape permet de protéger les zones de métallisation à ne pas graver conformément aux motifs du masque.

Puis, il ne reste plus qu'à graver par voie chimique la couche d'or pour former les résonateurs. La couche de chrome est volontairement conservée en l'état pour la prochaine étape. La résine est ensuite enlevée après une exposition UV totale. Les circuits sont ensuite passés dans un bain d'acétone suivi d'un plasma d'oxygène à 100W pendant 2 minutes de façon à enlever toute trace ou résidu de résine.

Suite à ces étapes, les résonateurs dont les lignes d'or ont une épaisseur d'environ 1500 Å sont formés à la surface du substrat. Il est donc nécessaire, à ce stade, d'épaissir les lignes de métallisation.

II.1.3 Epaississement des lignes d'or

Pour réaliser cette phase, une électrolyse partielle des lignes d'or jusqu'à des épaisseurs pouvant atteindre 8 µm est menée. La couche de chrome a volontairement été laissée pour assurer la conduction du courant sur tout le substrat entre les différents motifs à épaissir lors de l'électrolyse. Le bain électrolytique, constitué d'aurocyanure de potassium, est porté à 55°C sous agitation. Puis un courant alternatif est appliqué entre une grille métallique et une pince en contact avec le circuit. Lors de la réaction électrochimique, les particules d'or sont déposées sur les métallisations existantes de façon à les épaissir. Il est donc nécessaire de protéger les zones où l'on ne souhaite pas déposer d'or. Pour cela, nous utilisons un moule formé grâce à la résine SU8-2010 par photolithographie UV. Cette résine négative permet de réaliser des épaisseurs importantes tout en conservant un fort facteur de forme [III.3]. Pour électrolyser les lignes d'or jusqu'à 8 µm, il est nécessaire de fabriquer un moule d'une épaisseur de 10 µm minimum. De plus, étant donné la forme en méandre du résonateur un fort facteur de forme est nécessaire. La résine SU8-2010 est donc bien appropriée pour la fabrication du moule. Il est à noter que la taille des gaps du méandre et de la capacité interdigitée, de l'ordre de 10 à 15 µm, est très faible. L'enlèvement de la résine de protection SU8 après l'électrolyse peut s'avérer délicat compte tenu de la très petite taille de ces zones. Pour faciliter cette étape, une couche de stripage (Omniccoat® de MicroChem) est déposée

préalablement entre la surface du substrat métallisée et la résine SU8. Cette couche est pratique d'utilisation car se grave très simplement par voie chimique, permettant un décollage de la SU8 de la surface du substrat.

Le courant à appliquer entre la grille et le circuit est calculé à partir de l'aire de la surface d'or à électrolyser. Cette valeur de courant étant directement proportionnelle à l'épaisseur d'or déposée par minute, il est facile d'évaluer la valeur à donner au courant et le temps nécessaire pour l'électrolyse.

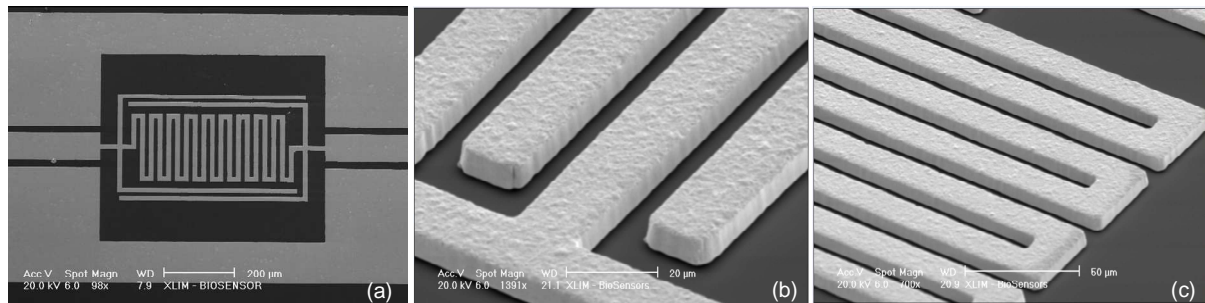


Figure III-3 : Photographies prises au microscope électronique à balayage : (a) bio-capteur, (b) zoom sur une zone capacitive, (c) zoom sur une zone inductive.

Un contrôle de l'épaisseur des métallisations est réalisé grâce à un analyseur de profil et celle-ci peut être réajustée si nécessaire. Notons que ces deux paramètres sont importants. En effet, d'une part il ne faut pas avoir des temps d'électrolyse supérieur à 40 minutes car au-delà, la résine SU8 est dégradée par le bain électrolytique. D'autre part, le courant à appliquer ne doit pas être trop élevé de façon à avoir une électrolyse homogène et une surface d'or qui n'est pas trop contrainte. Les pertes métalliques des résonateurs fabriqués vont être fortement influencées par l'état de surface de l'or électrolysé. Il s'agit donc de faire des compromis entre les temps d'électrolyse et la valeur des courants appliqués. La Figure III-3 montre des images des capteurs, obtenues à partir d'un microscope électronique à balayage, juste après l'électrolyse. Pour finir, la SU8 est enlevée dans plusieurs bains de solvants (Remover Nano PG® de MicroChem). La couche de chrome est enfin gravée chimiquement (Figure III-4).

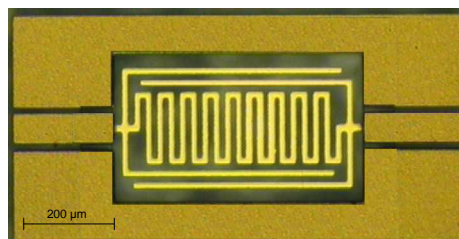


Figure III-4 : Photographie du bio-capteur après gravure de la couche de chrome.

Les bio-capteurs sont alors passés dans un plasma d'oxygène à 100 W pendant 2 minutes pour nettoyer la surface de toute impureté, avant le dépôt définitif de la couche de SU8 qui délimite les zones d'analyse spécifiques des bio-capteurs.

II.1.4 Dépôt et formation des anneaux épais de SU8

Les tests de biocompatibilité ont révélé que la résine SU8 présentait des propriétés intéressantes pour travailler avec des cellules biologiques. En plus de son caractère biocompatible et transparent, ce polymère favorise, pour le protocole de culture sur puce, la concentration des cellules dans les zones d'intérêt. D'un point de vue technologique, cette résine permet d'atteindre l'épaisseur minimale requise pour la couche qui a été évaluée à 20 μm .

La couche de SU8-2010 est spin coatée directement à la surface des bio-capteurs. L'anti adhérent ne peut pas être utilisé à ce stade. En effet, si la couche de SU8 n'est pas bien fixée au substrat, elle peut se décoller et faire apparaître des fuites qui, lors du dépôt ou de la culture des cellules, laisseront du liquide s'échapper vers des zones du capteur volontairement non privilégiées pour l'interaction avec tout milieu biologique.

Les motifs sont ensuite formés dans la couche de résine par lithographie UV. Après développement, la résine est recuite sur plaque chauffante à 150°C pendant 2 minutes. Cette étape nous permet de stabiliser la résine qui pourra, en fonction des protocoles expérimentaux, être par la suite chauffée jusqu'à 150°C pour la stérilisation des circuits par exemple. La Figure III.5 montre une photographie d'un bio-capteur conçu pour le protocole avec ficoll.

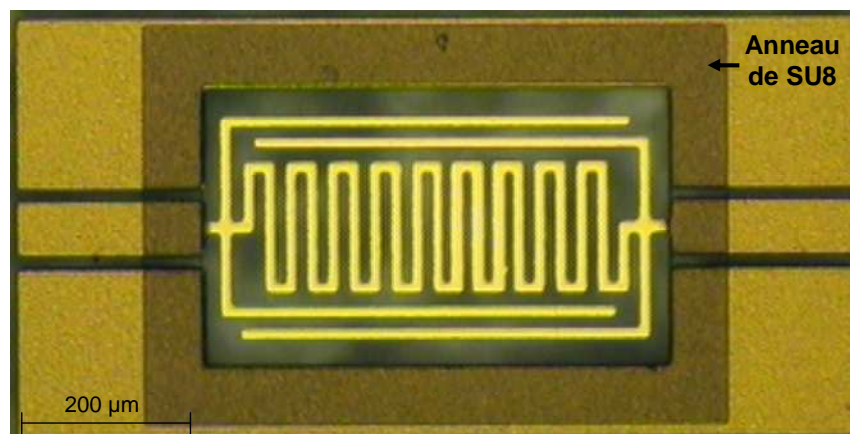


Figure III-5 : Photographies du bio-capteur développé pour le protocole avec ficoll et résonant à vide à 25,7 GHz.

La Figure III-6 montre, quant à elle, des photographies des 6 bio-capteurs développés dans le cadre du protocole de culture cellulaire sur puce.

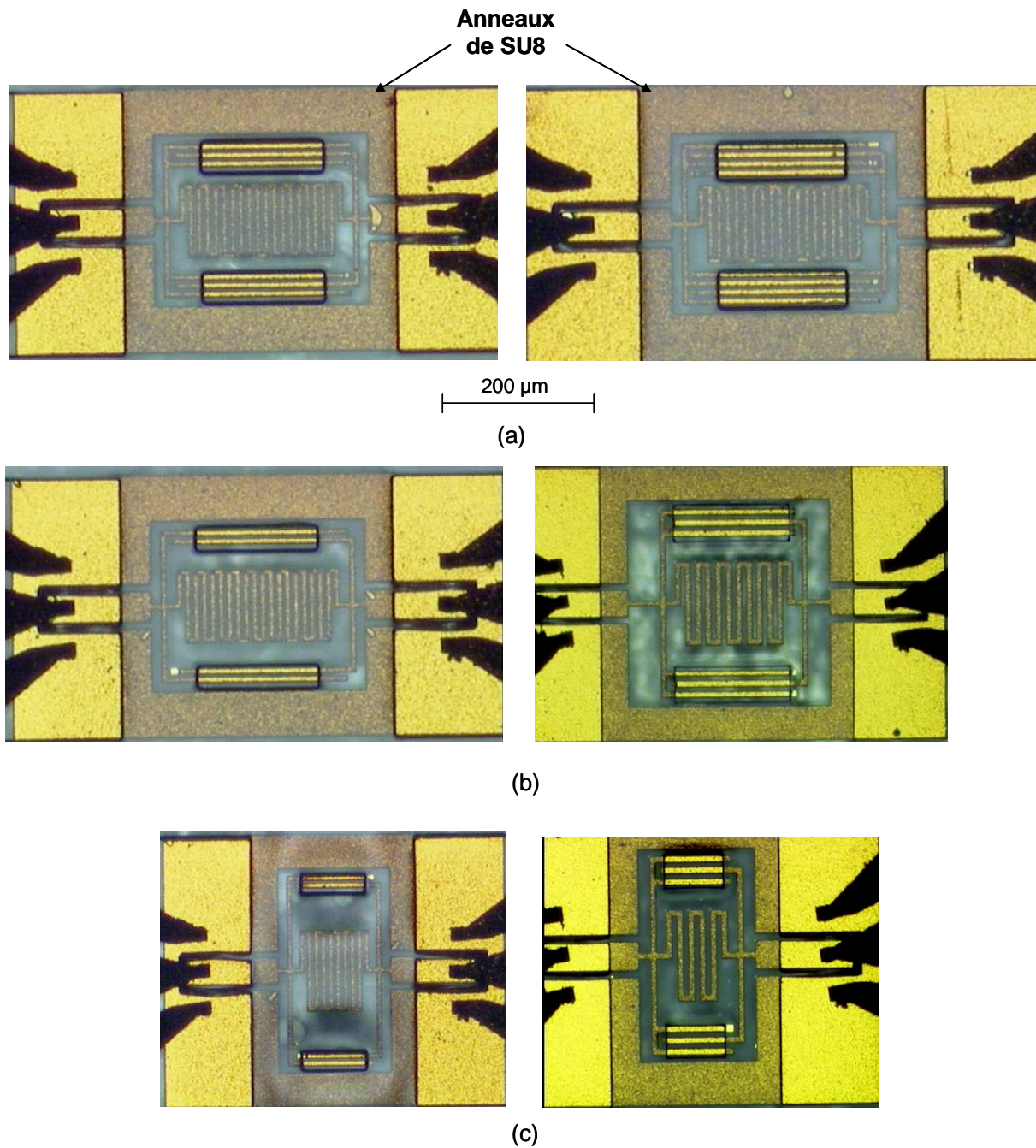


Figure III-6 : Photographies des bio-capteurs développés pour le protocole de culture cellulaire sur puce résonants à vide à : (a) 15,7 GHz, (b) 20,5 GHz, (c) 34,5 GHz.

Le substrat est ensuite découpé en plusieurs puces comprenant chacune environ 8 à 10 bio-capteurs. La découpe permet à la fois de réduire la taille des puces pour pouvoir les placer dans des plaques de culture 6 puits mais aussi d'avoir sur une seule puce pas plus de 10 mesures à réaliser à la fois.

II.2 Procédé de fabrication des filtres

Le procédé de fabrication des filtres est lui aussi basé sur un procédé de microélectronique simple à mettre en œuvre et faisant appel aux mêmes techniques de fabrication que celles vues précédemment. La différence fondamentale entre les deux procédés est que les filtres, en technologies microruban, nécessitent une étape supplémentaire de fabrication sur la face arrière qui est réalisée en premier pour protéger la face avant et éviter de la détériorer.

II.2.1 Réalisation de la métallisation en face arrière

Après le nettoyage RCA des substrats, une couche de Cr/Au de 150Å/1500Å d'épaisseur est déposée par évaporation thermique dans les mêmes conditions qu'indiquées précédemment. L'or déposé en face arrière est alors électrolysé sur toute la face de façon à épaissir la métallisation face arrière jusqu'à environ 3 µm.

Les ouvertures dans le plan de masse, nécessaires à l'observation des cellules, sont ensuite réalisées par photolithographie UV. La résine S1813 est utilisée pour réaliser les motifs puis les couches d'or et de chrome sont gravées en voie humide. Compte tenu de l'épaisseur d'or à graver, la solution est chauffée au bain marie à 50°C. La couche de chrome est également gravée afin de permettre l'alignement optique entre les deux faces du substrat. Le chrome présente ici un phénomène de sous gravure important car il est exposé plusieurs fois à sa solution d'attaque notamment pendant la gravure de la face avant (Figure III-7).

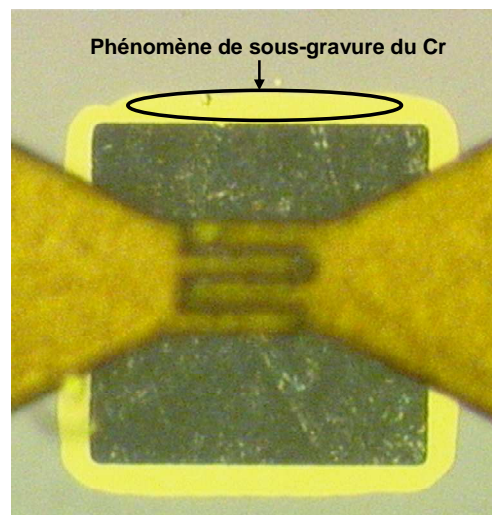


Figure III-7 : Photographie de l'ouverture du plan de masse de la face arrière vu par transparence au travers du substrat montrant le phénomène de sous-gravure du chrome.

Ce phénomène est gênant car, s'il se produit également sur la face avant, il peut provoquer une mauvaise adhésion de l'or sur le substrat et un arrachement des métallisations, notamment lors de la phase de formation des micro-puits de SU8. Pour éviter ce problème, les fabrications suivantes ont été réalisées en utilisant le Titane comme couche d'accroche.

Une fois la face arrière terminée, la face avant du substrat est nettoyée et peut être traitée à son tour.

II.2.2 Réalisation de la face avant

Différents procédés ont été testés pour réaliser la face avant. La première a consisté à utiliser la méthode de lift-off illustrée sur la Figure III-8. Cette technique présente plusieurs avantages. Tout d'abord, elle nous permet de réaliser des capacités inter-digitées dont l'espacement entre les doigts peut être réduit lors de la fabrication afin d'atteindre des tailles de gap de 10 à 15 μm avec des masques dont la taille initiale des gaps est de 20 μm . De plus, avec ce procédé, la formation du moule en SU8 pour l'électrolyse n'est plus nécessaire.

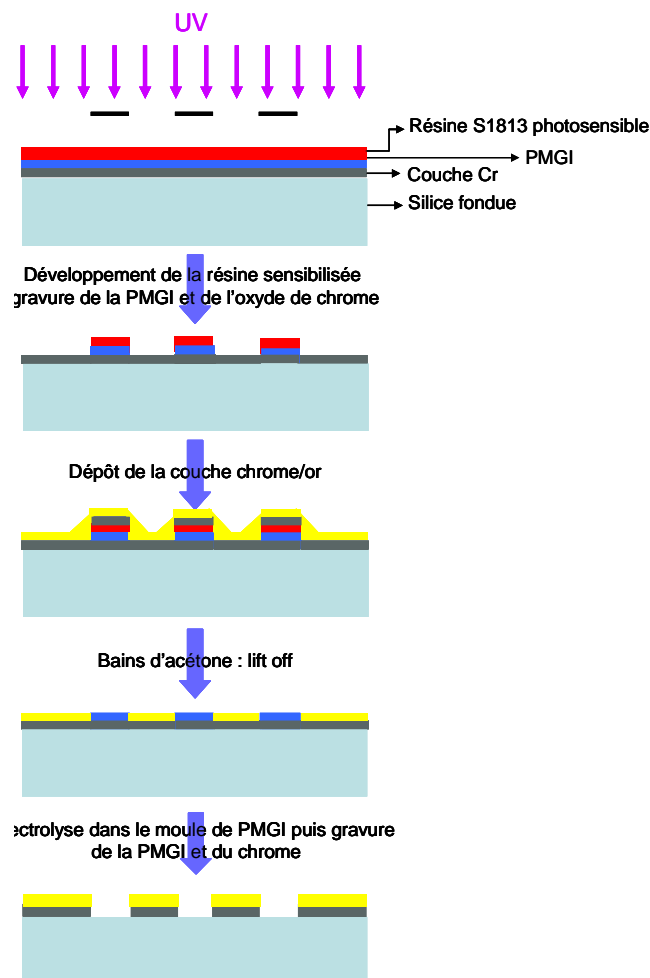


Figure III-8 : Procédé de lift-off utilisé pour la réalisation des filtres.

La première étape consiste donc à évaporer une couche de chrome de 200 Å sur la face avant. Une couche de PMGI (non photosensible aux longueurs d'ondes accessibles à XLIM) est ensuite déposée à la surface de l'échantillon par spin coating. La résine S1813 est ensuite utilisée pour définir, par photolithographie UV, le négatif des motifs sur l'échantillon. Un alignement face avant / face arrière est réalisé pour positionner les ouvertures du plan de masse avec les capacités inter-digitées. La face arrière est éclairée par un rayonnement IR dont les motifs sont alors visibles via une caméra. La face avant est quant à elle éclairée classiquement par le haut et son image se superpose à celle de la face arrière permettant un alignement des motifs de ces deux faces. La difficulté réside dans le contrôle de la netteté de l'image liée à la profondeur de champ de l'objectif utilisé. La gravure de la PMGI est ensuite réalisée au travers de la S1813. Puis, la couche d'oxyde de chrome est gravée laissant une couche conductrice à la surface du substrat. Un dépôt de Cr/Au de 150Å/1500Å est ensuite réalisé à la surface de la face avant. Par lift-off, les motifs se trouvent libérés, en utilisant plusieurs bains d'acétone pour enlever toute la résine S1813. La couche de PMGI est conservée et sert de moule pour l'électrolyse des lignes d'or. Avec ce procédé, les lignes peuvent être électrolysées jusqu'à 3 µm qui est l'épaisseur souhaitée pour notre application.

Après l'électrolyse, la PMGI et la couche de chrome sont totalement gravées et la couche de SU8 peut être déposée et traitée pour former les micro-chambres de culture.

Le problème lié à la sous-gravure du chrome apparaît à ce niveau. En effet, la couche d'or, qui adhère difficilement, peut durant cette étape être arrachée. C'est pour cette raison que les premières mesures qui vont être présentées, réalisées avec les filtres, concernent des capteurs sur lesquels la couche en SU8 n'a pas été faite afin de ne pas perdre les niveaux de métallisation. La Figure III-9 présente une photographie d'un des filtres réalisé sans la couche de SU8.

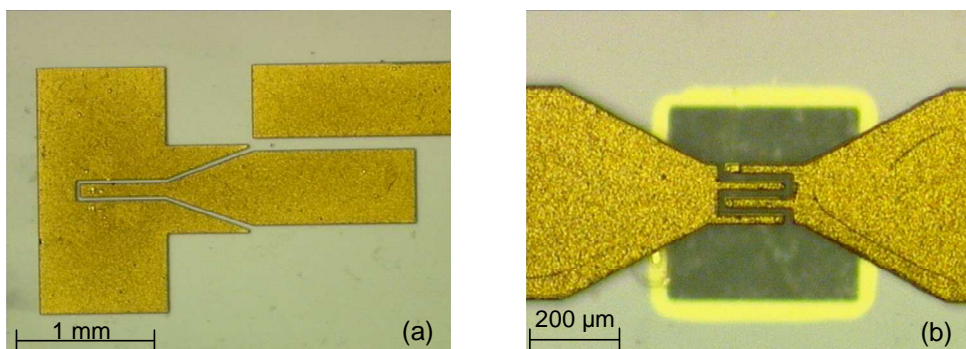


Figure III-9 : Photographies d'un filtre fabriqué : (a) zoom sur l'accès d'entrée et (b) zoom sur la capacité de couplage inter-résonateurs.

Pour permettre de fabriquer les capteurs avec la couche de SU8, nous avons par la suite eu recours à un procédé différent qui se rapproche de celui utilisé pour les résonateurs. Dans un premier temps, une couche de chrome de 200 Å est déposée à la surface du substrat. Les motifs des bio-capteurs sont alors définis dans la couche par photolithographie UV avec de la résine S1813. Le chrome est ensuite gravé. Cette première couche est utilisée pour réaliser par la suite l'alignement des faces avant et arrière qui serait impossible directement sur la couche d'or étant donné qu'elle est très réfléchissante. Puis, une couche de Cr/Au de 150Å/1500Å d'épaisseur est évaporée. Les motifs sont définis par photolithographie UV et la couche de chrome permet leur alignement. L'or est ensuite gravé. En suivant le même protocole que pour les résonateurs, les lignes d'or sont électrolysées jusqu'à l'épaisseur souhaitée qui peut aller dans ce cas jusqu'à 8 µm. Enfin, les micro-chambres de culture en SU8 sont formées à la surface des filtres. Une petite variante dans certaines fabrications consiste à remplacer la couche de chrome par du Titane pour éviter les problèmes de sous-gravure du chrome. La Figure III-10 montre une photographie des filtres réalisés avec l'anneau de SU8.

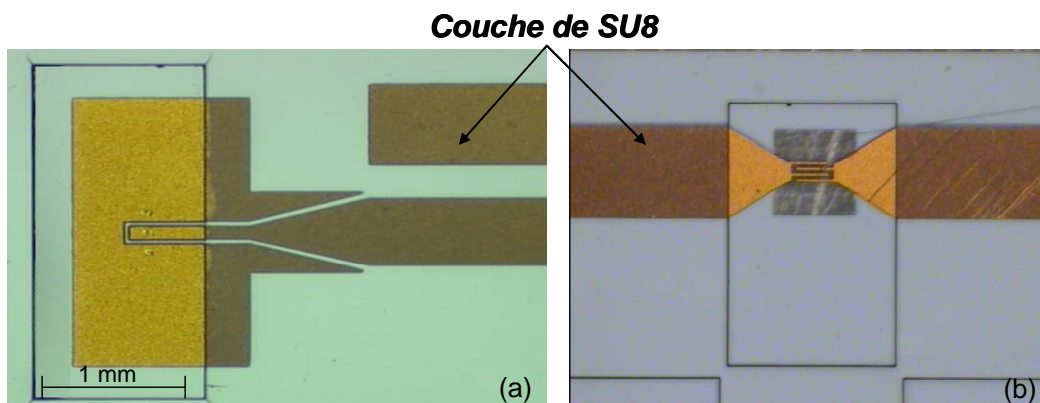


Figure III-10 : Photographies d'un filtre fabriqué avec la couche de SU8 : (a) zoom sur l'accès d'entrée et (b) zoom sur la capacité de couplage inter-résonateurs.

Suite à la fabrication, les bio-capteurs sont découpés pour former des puces individuelles dont la photographie est donnée par la Figure III-11.



Figure III-11 : Photographie d'une puce comprenant un filtre après découpe.

La découpe des bio-capteurs permet une nouvelle fois de réduire la taille des puces mais aussi d'éviter les effets de résonance parasites qui se produisent lorsque deux filtres sont situés trop proches l'un de l'autre.

III. Protocole initial de mesure et résultats

La mise au point du protocole expérimental s'est faite avec les résonateurs. Suite à l'étude préliminaire concernant l'influence des différents milieux de culture fréquemment utilisés en biologie (Figure II-19), il est rapidement apparu comme nous l'avons montré dans le chapitre précédent, qu'il était nécessaire de trouver un milieu support alternatif à faibles pertes pour réaliser les mesures sur les cellules. Le protocole expérimental initialement développé repose donc sur l'utilisation du ficoll qui permet, comme nous l'avons vérifié au préalable d'un point de vue expérimental, de conserver les propriétés de détection des bio-capteurs (Figure II-20). En biologie, le ficoll est usuellement utilisé comme milieu de séparation en utilisant ses propriétés de viscosité. Nous pouvons citer par exemple l'isolation des globules blancs du sang obtenu par différence de densité [III.4]. Pour notre application, outre les caractéristiques RF intéressantes montrées dans le chapitre second, ce milieu, qui présente une pression osmotique faible, assure une bonne préservation de l'intégrité morphologique et fonctionnelle des cellules et de ses organites. De plus, grâce à ces propriétés, le ficoll est un milieu qui ne pénètre pas les membranes biologiques et qui peut être utilisé comme milieu de culture pour les cellules [III.5]. Nous allons donc voir comment nous avons adapté un protocole couramment utilisé en biologie pour préparer les cellules à analyser et réaliser les mesures.

III.1.1 Protocole biologique développé

III.1.1.a Culture cellulaire

Les premières cellules analysées dans le cadre de notre étude portent sur les cellules gliales humaines issues de la lignée U87-MG. Elles sont cultivées dans un milieu essentiel

minimum (MEM) contenant différents sels inorganiques mélangés à du dextrose et complété avec 10% de serum de veau fetal ainsi que des antibiotiques : le milieu basal. Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂. La Figure III-12.a montre des cellules U87-MG en cours de multiplication.

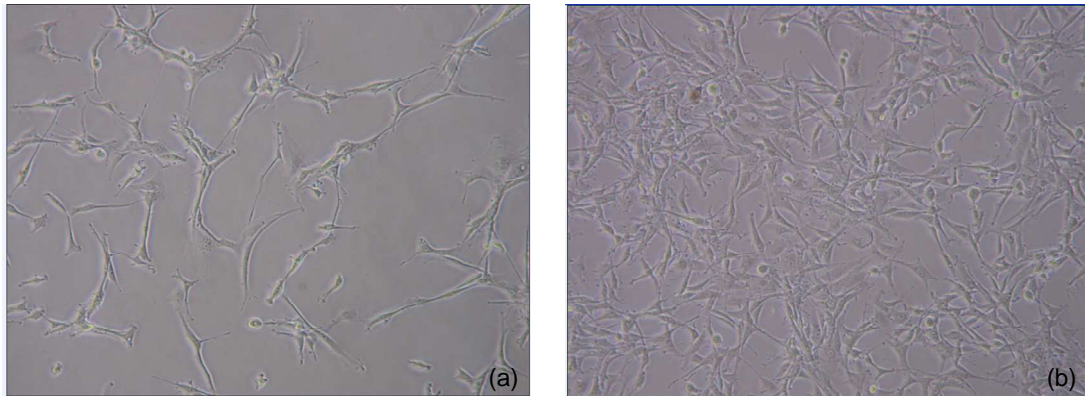


Figure III-12 : Photographies de cellules gliales (U87-MG) : (a) en cours de multiplication et (b) arrivées à confluence.

Une fois arrivées à confluence (Figure III-12.b), les cellules sont récupérées et comptées sur cellule de Malassez. En fonction du nombre de cellules présentes dans la solution, des dilutions sont effectuées pour obtenir la concentration de cellules souhaitées pour notre mesure.

III.1.1.b Préparation des cellules

Le protocole de mesure nécessite l'évaporation de l'eau du ficoll avant d'enregistrer la réponse en fréquence des capteurs. Cette étape d'évaporation peut s'avérer délicate pour les cellules qui peuvent subir des pressions importantes. D'autre part, lors de cette phase, leur équilibre peut être menacé. C'est pour ces raisons que les cellules sont ensuite fixées au paraformaldéhyde (PFA) 4% : un dérivé du formol. La solution est préparée en mélangeant dans les proportions requises, du formaldéhyde à de l'eau distillée. Le PFA est préparé dans l'eau de façon à ne pas introduire de sels qui pourraient fausser les mesures RF. Les cellules à fixer sont laissées 10 à 15 minutes dans la solution à température ambiante.

Après fixation, les cellules sont dites « mortes », dans le sens où elles n'évolueront plus d'un point de vue biologique. Des mesures sur le suivi de processus biologique en temps réel ne sont donc pas envisageables avec des cellules fixées. En revanche, la fixation des cellules est très importante dans notre cas pour l'optimisation des capteurs et la mise en œuvre de mesures sans l'utilisation de réseaux microfluidiques. En effet, cette étape assure que les

cellules vont garder, au cours des caractérisations, leur forme, leur contenu intracellulaire et leurs propriétés diélectriques qu'elles avaient avant la fixation. Fixer les cellules revient en fait à figer la cellule comme elle est à l'état vivant ce qui nous permet d'assurer l'intégrité des cellules au cours des mesures. La fixation des cellules est d'ailleurs très souvent utilisée en biologie pour réaliser des analyses immunologiques [III.6].

Les cellules fixées sont ensuite rincées à l'eau désionisée pour stopper le processus de fixation et éliminer toute trace de PFA. Elles sont, pour finir, suspendues dans le ficoll à température ambiante pour être analysées. L'ensemble du protocole est résumé sur la Figure III-13.

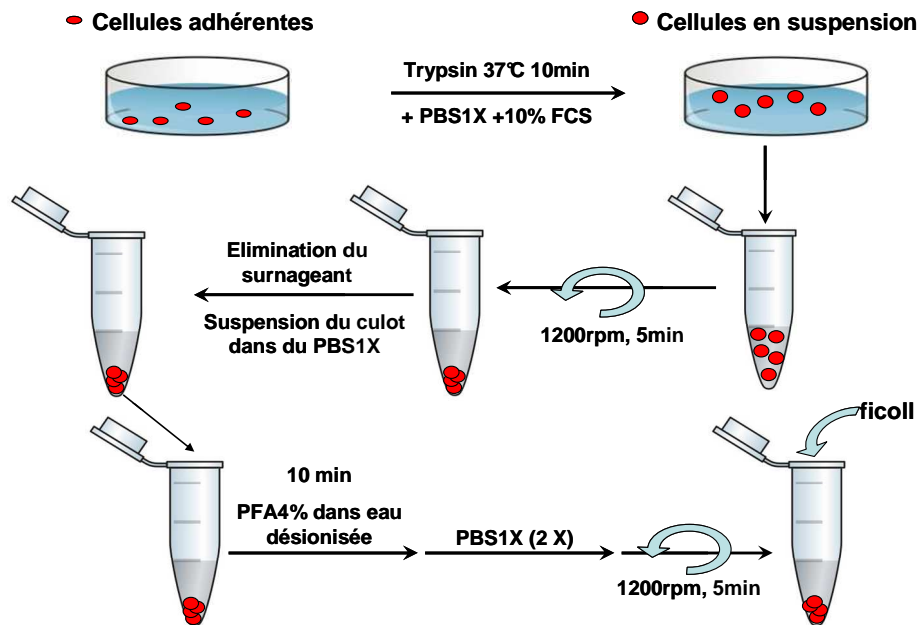


Figure III-13 : Protocole expérimental mis en œuvre pour analyser les cellules fixées dans le ficoll.

Dans ces conditions, nous disposons de plusieurs heures pour effectuer les mesures, avant que les cellules ne soient détériorées.

III.1.2 Protocole de mesure

Les mesures sont réalisées avec des pointes coplanaires GSG ACP de la société Cascade et d'un analyseur de réseaux vectoriel HP 8722ES. La souplesse d'utilisation de ce banc de mesure sous pointe, schématisé sur la Figure III-14.a, permet de réaliser un nombre important de mesures en peu de temps. Avant les mesures, le banc de mesure est étalonné sur la bande de fréquence 0,5 GHz - 40 GHz avec 1601 points de mesure, grâce à un kit de calibration sur substrat fourni, dans notre cas, par la société Cascade.

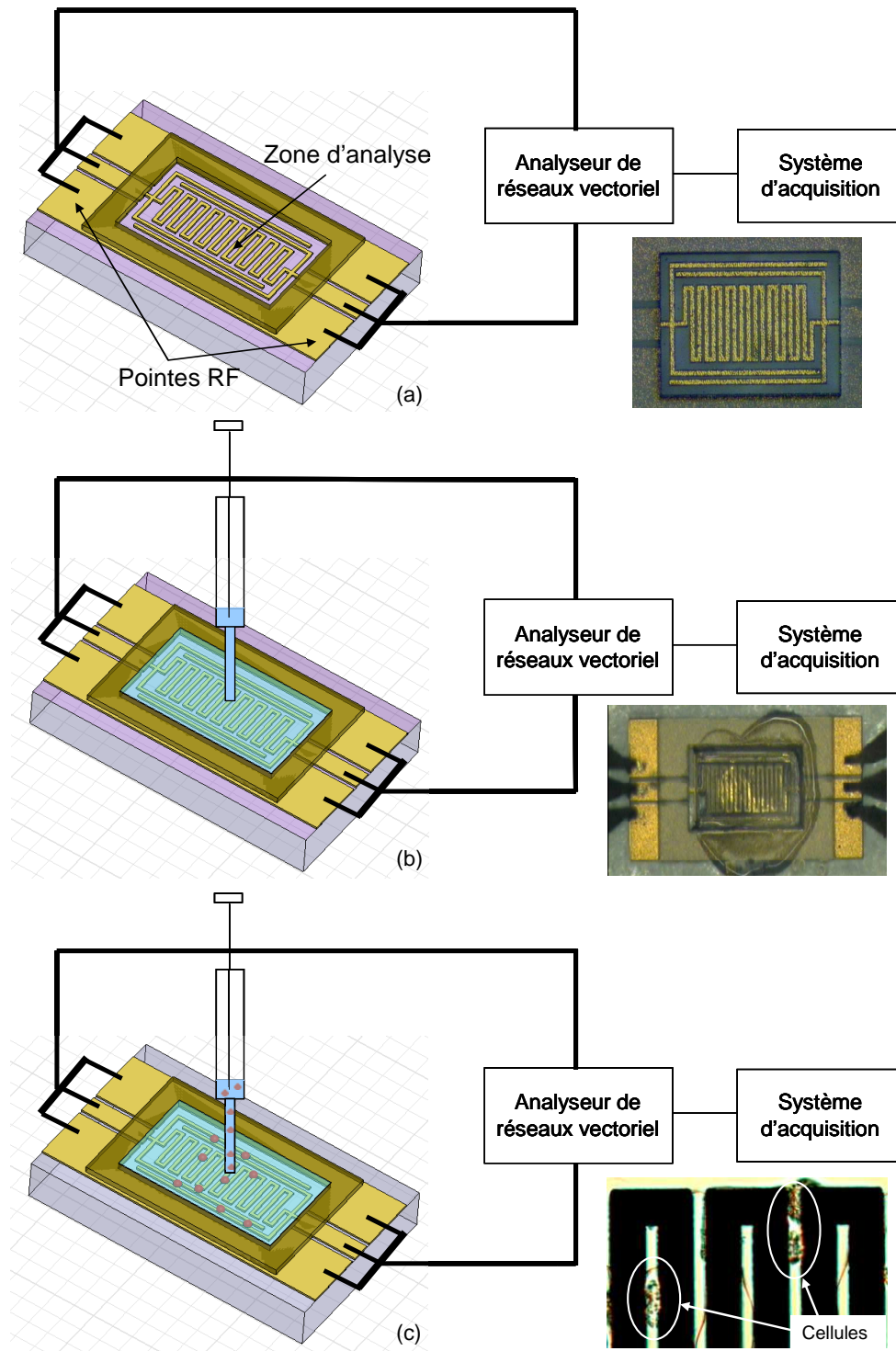


Figure III-14 : Les trois étapes de mesure : (a) à vide, (b) avec ficoll pur et (c) avec le ficoll contenant les cellules à analyser.

La mesure est réalisée en trois étapes successives. Dans un premier temps, il est nécessaire d'enregistrer les paramètres S du bio-capteur à vide (Figure III-14.a). Puis, pour calibrer le dispositif, la réponse en fréquence du capteur chargé par du ficoll pur est mesurée.

Pour cela, une goutte de ficoll dont le volume est contrôlé, est déposée à la surface du capteur à l'aide d'une seringue Hamilton. La totalité de la cuvette de SU8 est remplie de ficoll de façon à ce que le volume de ficoll en interaction avec le capteur ait une influence reproductible sur ses paramètres S. La Figure III-14.b illustre cette étape. La réponse du bio-capteur est enregistrée après la polymérisation du ficoll, quand toute l'eau qu'il contient s'est évaporée. Cette phase peut prendre plusieurs minutes.

Les bio-capteurs sont ensuite rincés à l'eau désionisée. Le ficoll, soluble dans l'eau, est très facilement enlevé. Il est possible de vérifier par une mesure après cette étape, que les caractéristiques intrinsèques du résonateur sont inchangées.

La dernière étape de mesure consiste à déposer une goutte de ficoll contenant cette fois-ci les cellules à analyser. La cuvette en SU8 est à nouveau remplie de ficoll pour que le décalage fréquentiel induit par ce milieu soit le même que lors de l'étalonnage. Les paramètres S du dispositif sont enregistrés une fois que toute l'eau du ficoll se soit évaporée. Pendant l'évaporation de l'eau, les cellules descendent par gravité vers la surface du capteur puis sont, après évaporation, protégées dans la matrice de ficoll polymérisée (Figure III-14.c).

III.1.3 Résultats expérimentaux

Les premières expérimentations ont été menées avec des bio-capteurs résonants à vide à 25,7 GHz. Après avoir déposé une goutte de ficoll pur pour étalonner le capteur, sa fréquence de résonance diminue à 18,6 GHz et le facteur de qualité du résonateur est alors de l'ordre de 9 (contre 15 initialement). Comme le montre la Figure III-15, la sélectivité du pic de résonance reste suffisante pour permettre la détection et l'analyse de cellules biologiques.

Les premières cellules à avoir été mesurées grâce à ce protocole expérimental sont des cellules issues de tissus de peau provenant de la lignée HaCaT. Ce type cellulaire a été utilisé car disponible très rapidement pour réaliser les premiers tests et évaluer les capacités de détection des bio-capteurs. Il est à noter que différentes phases d'optimisation nous ont permis d'ajuster le protocole expérimental développé.

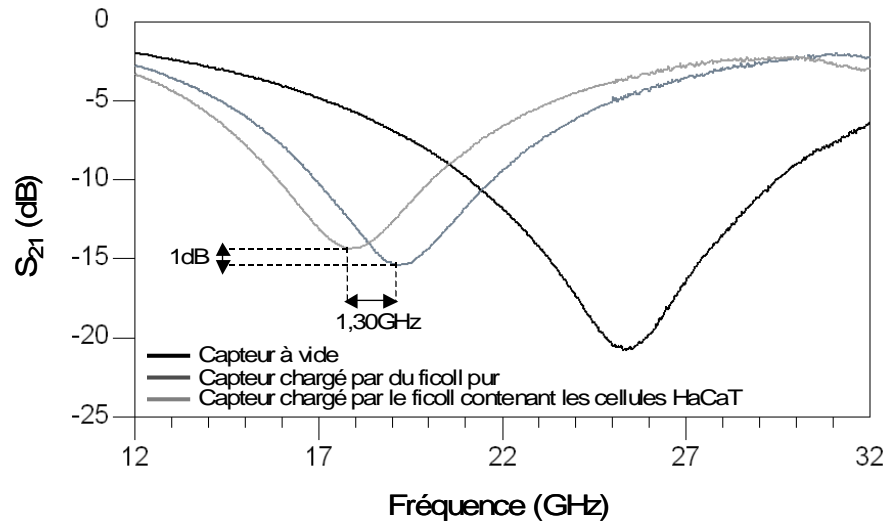


Figure III-15 : Mesures du bio-capteur : à vide, avec ficoll et avec le ficoll contenant les cellules HaCaT à analyser.

La Figure III-15 montre les résultats expérimentaux principaux, obtenus à 18 GHz et 25°C. Environ 15 cellules (Figure III-16) à proximité du capteur induisent un décalage fréquentiel de 1,3 GHz. Comme attendu, une remontée du pic de transmission d'un dB est également à noter.

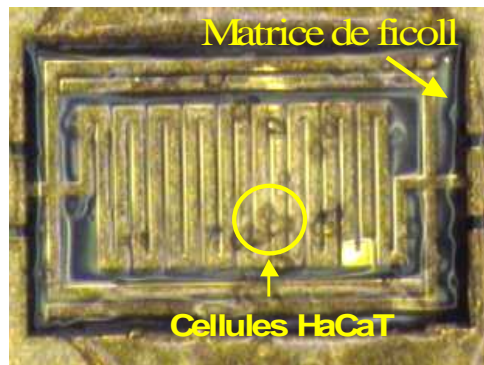


Figure III-16 : Photographie du bio-capteur chargé par les cellules HaCaT.

Ces premiers résultats montrent que les bio-capteurs sont sensibles à la présence d'une faible quantité de cellules biologiques (une quinzaine de cellules à leur proximité, dans le cas présenté). Pour réaliser un dispositif pour l'analyse et le tri cellulaire, la seconde étape nécessaire à valider est sa capacité à détecter et discriminer différents types cellulaires. La campagne de mesures suivante a donc visé l'étude des cellules gliales U87. Elles ont été mesurées dans les mêmes conditions que les cellules HaCaT avec des bio-capteurs dont les fréquences de résonance initiales sont égales à 25,7 GHz.

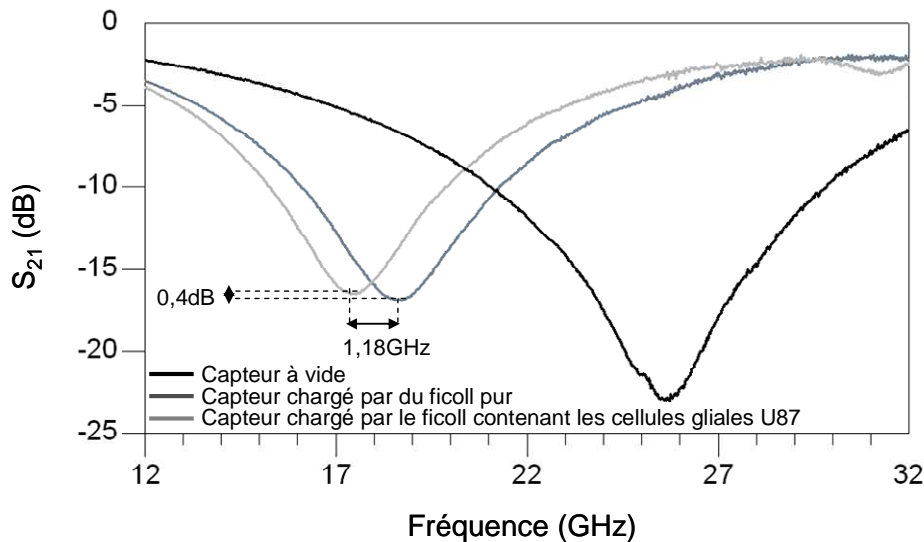


Figure III-17 : Mesures du bio-capteur : à vide, avec ficoll et avec le ficoll contenant les cellules gliales U87 à analyser.

Comme le montre la Figure III-17, la présence de ficoll sur le capteur a la même influence à chaque mesure est diminuée la fréquence de résonance des dispositifs à 18,6 GHz.

Dans ce cas, une dizaine de cellules gliales (Figure III-18) induisent un décalage de la fréquence de résonance de 1,18 GHz avec une remontée du pic de transmission faible autour de 0,4dB.

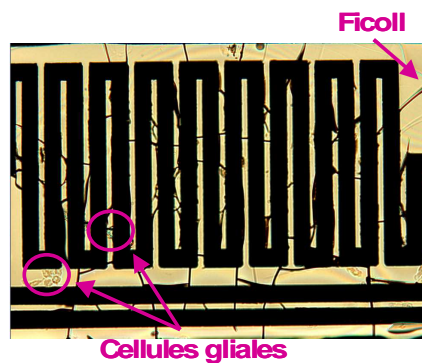


Figure III-18 : Photographie du bio-capteur chargé par les cellules gliales.

Vu le décalage fréquentiel et le nombre de cellules en interaction avec le bio-capteur, il semble en effet que les bio-capteurs soient sensibles à la nature des cellules déposées. Il est nécessaire à ce stade de l'étude d'extraire les paramètres diélectriques de ces deux types cellulaires pour confirmer ces observations.

III.1.4 Procédé d'extraction des paramètres diélectriques cellulaires

III.1.4.a Procédé d'extraction utilisé

Les paramètres diélectriques cellulaires, à savoir la permittivité relative réelle des cellules et leur tangente de pertes sont extraits des mesures par rétro simulations électromagnétiques 3D avec HFSS. Ce logiciel est basé sur la méthode des éléments finis pour résoudre les équations de Maxwell et calculer les paramètres S, les fréquences de résonance et les champs électromagnétiques. Les trois principales étapes du calcul du simulateur sont résumées par la Figure III-19.

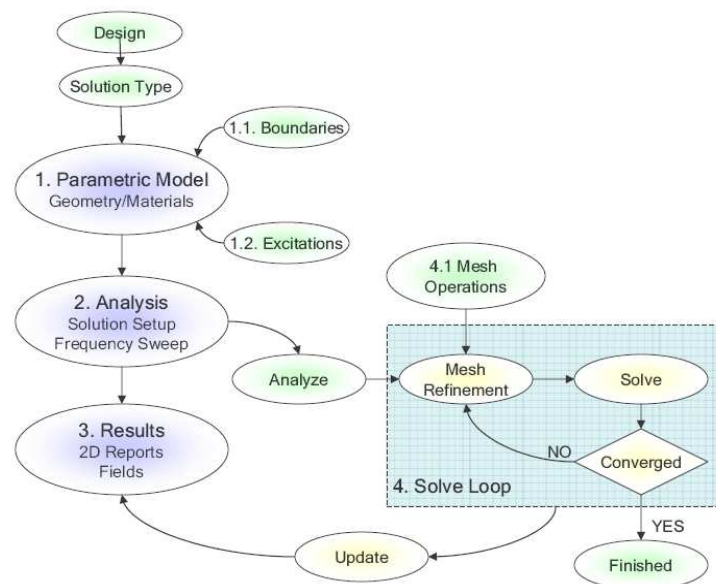


Figure III-19 : Processus de simulation utilisé par HFSS [III.7].

La méthode d'analyse des éléments finis consiste dans un premier temps à mailler la structure, c'est à dire à découper le domaine d'étude en sous-espaces élémentaires et à donner des conditions aux limites pour conduire à l'unicité des solutions. Les sous-espaces générés sont appelés les éléments du maillage. Des fonctions d'approximation de la solution sont définies sur chacun des éléments (des tétraèdres le plus souvent) à partir des valeurs calculées en un nombre fini de points positionnés aux extrémités de chaque élément (les nœuds du maillage). Ces valeurs nodales sont appelées les degrés de liberté. Pour finir, la solution finale est déterminée en sommant toutes les fonctions d'approximation.

Dans ce contexte, il est à noter que le maillage de la structure est une étape délicate. Des optimisations ont été réalisées de façon à assurer un maillage suffisamment fin pour obtenir une solution stable. En particulier, nous avons maillé plus finement l'intérieur des

cellules qui représentent des petits éléments au sein desquels le champ électromagnétique est concentré. La Figure III-20 montre un exemple de maillage optimisé pour extraire les paramètres diélectriques cellulaires.

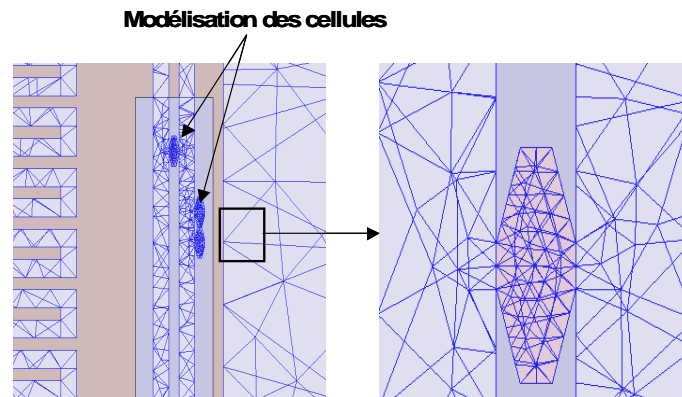


Figure III-20 : Exemple de maillage réalisé à 15,7 GHz.

La première étape de rétro simulation consiste à comparer la réponse du capteur à vide mesurée et simulée pour étalonner le modèle électromagnétique vis-à-vis des tolérances de fabrication de chaque capteur mesuré. Si nécessaire, la géométrie du capteur est affinée et la permittivité du substrat ainsi que la conductivité des lignes de métallisation sont ajustées pour que les courbes soient en très bon accord.

Le protocole avec le ficoll nécessite ensuite deux phases de simulation : la comparaison des paramètres de transmission du capteur chargé par du ficoll pur puis par le ficoll contenant les cellules. Il est à noter que le protocole de culture cellulaire sur puce est plus rapide car ne nécessite qu'une seule phase de simulation correspondant à la mesure des cellules sur le bio-capteur. Dans les deux cas, de façon à comparer les réponses fréquentielles simulées à vide, avec ficoll et avec cellules, il faut s'assurer de conserver un maillage identique d'une simulation à l'autre. Pour cela, la structure à vide est également simulée avec le maillage des éléments biologiques présents sur la capteur (ficoll et cellules). Dans ce cas, la permittivité de ces éléments est fixée à 1 et leur tangente de pertes à 0. De même pour la calibration du capteur avec le ficoll pur, pour laquelle ces éléments se voient attribuer les caractéristiques du ficoll. Finalement, la dernière étape consiste à trouver, par itérations successives, la valeur de la permittivité et de la tangente de pertes à donner à ces éléments pour converger vers la réponse mesurée du capteur en présence de cellules.

La forme et le volume occupés par les cellules joue un rôle important dans les rétro simulations. Ces paramètres sont difficiles à reproduire parfaitement en simulation mais dans chaque cas, leur forme est donc ajustée pour être la plus fidèle possible à la réalité.

Dans le ficoll, nous avons pu observer que les cellules gardaient leur forme arrondie. C'est donc pour cette raison que les cellules sont modélisées par des demi-sphères. Nous supposons comme le montre la Figure III-21 que les cellules sont toutes en contact avec le substrat. Leur répartition à la surface du capteur pour la simulation est réalisée à partir d'une cartographie 2D réalisée sous microscope.

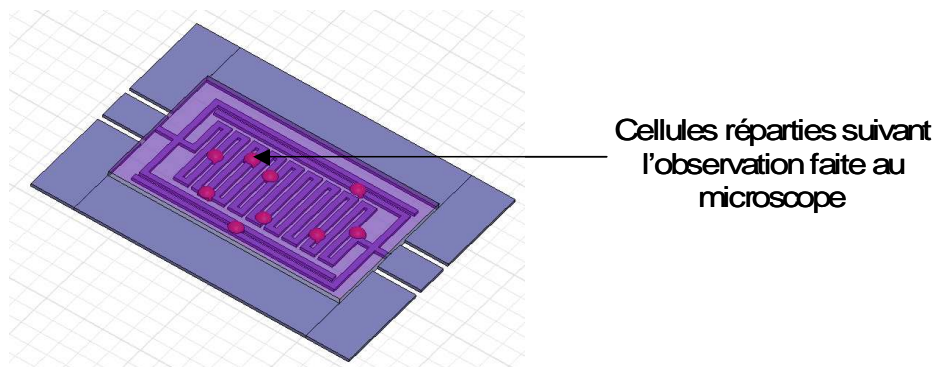


Figure III-21 : Modélisation des cellules pour l'extraction de leurs paramètres diélectriques.

Les courbes mesurées et simulées sont donc comparées et ajustées en changeant progressivement les valeurs de permittivité et de tangente de pertes données aux éléments biologiques. Il faut préciser que la tangente de pertes du milieu, représentative de la partie imaginaire de la permittivité relative, n'a une influence significative que sur le niveau du paramètre de transmission du capteur ; l'effet de la tangente de pertes sur le décalage fréquentiel est négligeable, du moins lorsque celle-ci est inférieure à 1, comme dans notre cas. Le décalage fréquentiel est en fait dominé par la partie réelle de la permittivité relative.

Cette phase de rétro simulation est donc fastidieuse et peut être longue à mettre en œuvre. En effet, plusieurs itérations sont nécessaires pour évaluer la valeur des paramètres diélectriques des cellules analysées. Le maillage utilisé implique des simulations d'environ une heure par itération.

III.1.4.b Paramètres diélectriques extraits

La Figure III-22 compare les paramètres de transmission simulés et mesurés avec les cellules HaCaT dans le cas où la superposition est atteinte.

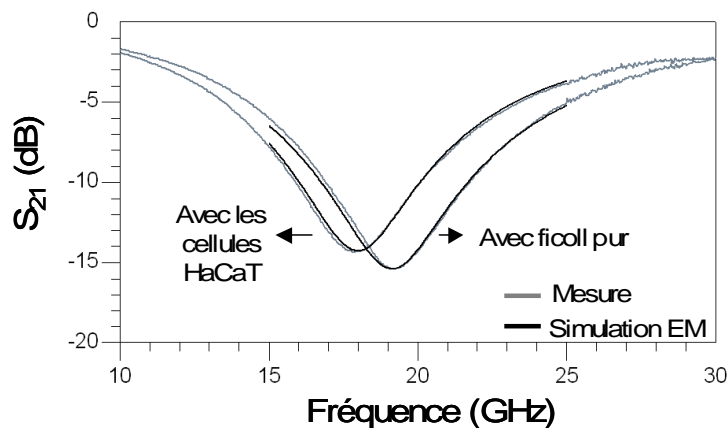


Figure III-22 : Comparaison des paramètres de transmission mesurés et simulés du bio-capteur chargé par les cellules HaCaT.

Les paramètres diélectriques des cellules gliales U87 sont extraits de la même manière. Les paramètres diélectriques extraits sont résumés dans le Tableau III-1.

Tableau III-1 : Paramètres diélectriques extraits à 18 GHz et 25°C.

	Permittivité relative réelle	Tangente de pertes
Ficoll	$3,3 \pm 0,2$	$0,070 \pm 0,006$
Cellules HaCaT	42 ± 3	$0,090 \pm 0,008$
Cellules gliales U87	36 ± 3	Difficile à évaluer avec une précision satisfaisante

Outre la difficulté de reproduire exactement la forme de la cellule en simulation, la principale source d'imprécision est liée au fait que toutes les cellules sont simulées en contact avec le capteur. En effet, lorsque le ficoll est déposé, les cellules descendent à la surface du capteur pendant l'évaporation de l'eau. Or, certaines cellules peuvent être prises dans la matrice de ficoll polymérisé avant d'avoir atteint cette surface. Il est alors très difficile d'apprécier l'altitude des cellules dans le ficoll et donc leur impact. La Figure II- 23 montre l'influence non négligeable de ce paramètre, influençant directement les résultats extraits. Dans ce contexte, il est donc intéressant de travailler avec le protocole de culture sur puce pour affiner les résultats.

Ces premiers résultats valident le concept de détection développé puisque nous avons réussi avec succès à détecter la présence des cellules mais aussi d'extraire les paramètres diélectriques correspondants. De plus, ces premiers résultats semblent confirmer que des différences de permittivité relative sont observables entre des types cellulaires différents. Partant de cette constatation, nous allons comparer plus particulièrement dans la suite deux types cellulaires qui nous intéressent pour notre étude à savoir les cellules gliales et neuronales.

IV. Culture cellulaire sur puces et résultats

Pour améliorer la précision du protocole, l'idée est donc double. D'une part, il est nécessaire de définir des zones d'analyse plus ciblées et fonctionnalisées de façon à ce que quelque soit la position de la cellule sur la zone sensible, elle est la même influence. Ceci a été réalisé, comme nous l'avons vu dans le chapitre second, en définissant de nouveaux anneaux de SU8 dont l'implémentation est rappelée sur la Figure III-23.

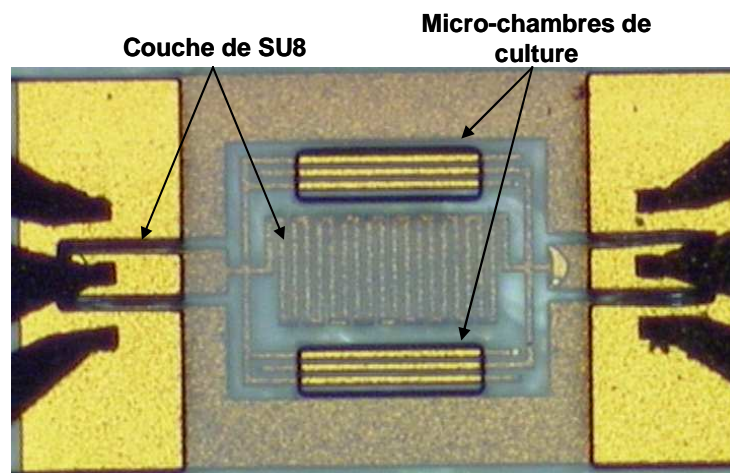


Figure III-23 : Implémentation de la couche de SU8 pour le protocole de culture cellulaire sur puce.

La seconde incertitude à lever concerne l'altitude des cellules par rapport à la surface du capteur. Les cellules du système nerveux étudiées étant des cellules adhérentes, il est possible de développer un protocole expérimental qui consiste à faire croître et adhérer les cellules sur les bio-capteurs directement (élimination de l'utilisation du ficoll). La couche de SU8 est donc pensée également à cet effet. Dans cette configuration, les cellules sont à même de pousser sur n'importe quelle partie du capteur. Toute zone dont nous ne souhaitons pas

qu'il y ait interaction avec les cellules et donc masquée avec une couche de SU8 de 20 μm d'épaisseur. De plus, les gaps des accès coplanaires sont aussi protégés par la résine de sorte que, si des cellules se logent au niveau des gaps, elles ne modifient pas l'adaptation du dispositif (Figure III-23). Nous allons donc voir maintenant comment nous avons adapté le protocole de biologie à nos bio-capteurs.

IV.1.1 Protocole biologique développé

Le protocole biologique a été développé et optimisé pour l'utilisation de cellules gliales (U87-MG). De manière plus générale, ce protocole reste applicable à tout type de cellules sous réserve qu'elles soient adhérentes. Dans ce contexte, des études ont aussi été menées sur des cellules neuronales.

IV.1.1.a Mise en culture des cellules sur les circuits

Toute culture cellulaire doit être mise en œuvre à l'aide d'instruments stériles dans une salle de culture équipée de hôtes de culture qui assure une atmosphère dépourvue de bactéries. Même si les milieux de culture utilisés contiennent un agent antibiotique, la moindre bactérie résistante se développe très rapidement pour contaminer l'ensemble des cultures. C'est pourquoi cette étape est réalisée au laboratoire d'Homéostasie Cellulaire et Pathologies.

La première étape consiste donc à stériliser les bio-capteurs avant de les mettre en culture. Cette phase est réalisée au stérilisateur qui autoclave les circuits pendant une durée de deux heures à une température de 150°C. Les capteurs ayant été recuits avant cette étape, ils ne subissent aucune modification et il est possible de vérifier avant et après autoclave que ses paramètres de transmission n'ont pas été modifiés comme le montre la Figure III-24. A noter que les circuits sont au préalable enveloppés dans du papier aluminium et n'en seront sortis qu'une fois positionnés sous la hôte de culture.

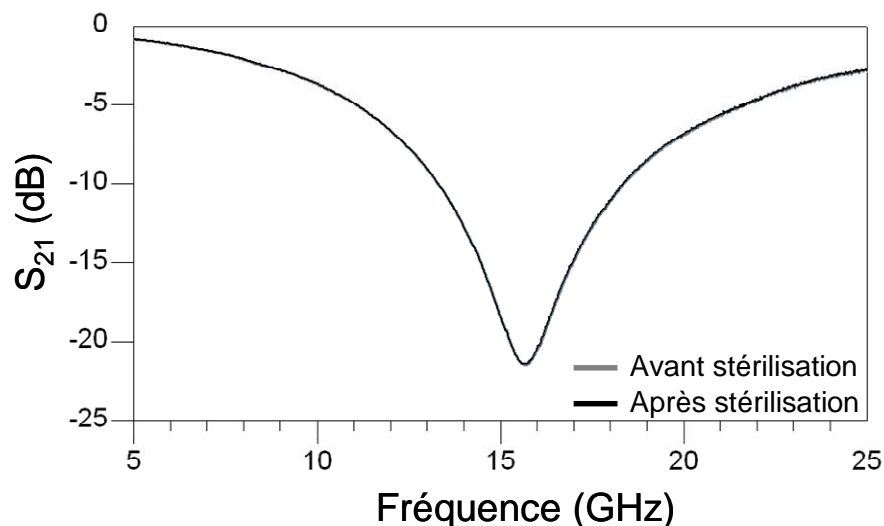


Figure III-24 : Comparaison des paramètres de transmission d'un bio-capteur avant et après stérilisation.

Les cellules gliales sont issues de la même lignée que pour le protocole précédent utilisant le ficoll et cultivées dans les mêmes conditions.

Les cellules neuronales sont issues d'une lignée humaine de neuroblastomes nommée SHSY5Y. Elles sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 qui est complété avec des sels inorganiques, du sérum de veau fœtal et des antibiotiques. Les cellules sont placées dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO₂. La Figure III-25 montre des cellules neuronales en culture.

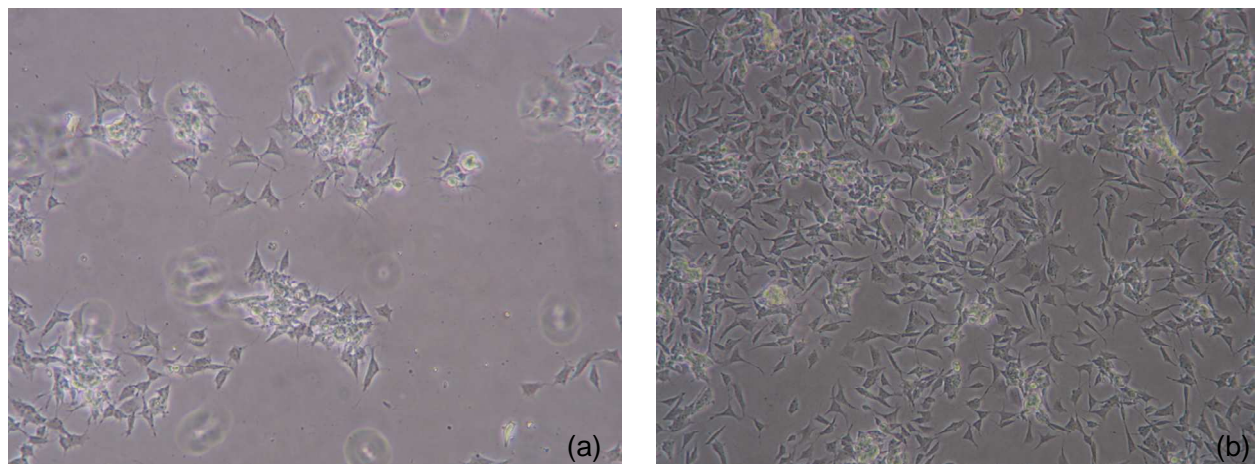


Figure III-25 : Photographies de cellules neuronales (SHSY5Y) : (a) en cours de multiplication et (b) arrivées à confluence.

Une fois arrivées à confluence, les cellules gliales ou neuronales sont récupérées et comptées sur cellule de Malassez. En fonction du nombre de cellules présentes dans la

solution, des dilutions sont effectuées pour obtenir la concentration de cellules à ensemercer sur les circuits.

Les puces découpées, comprenant chacune environ dix circuits, sont ensuite placées dans des plaques 6 puits. Le nombre de cellules à déposer dans les puits a été optimisé. En effet, la concentration de cellules présentes dans les micro-chambres de culture dépend d'une part du nombre de cellules initialement ensemençées sur les circuits et d'autre part du temps de culture. Cette étape a été délicate et a demandé beaucoup de tests avant d'être optimale. Ainsi, il est nécessaire pour obtenir une bonne adhésion des cellules de les laisser plus de 48h en culture, sinon lors de la phase de fixation des cellules (avant mesures), elles se décollent des circuits. De plus, il faut savoir qu'un plus grand temps de culture favorise un phénomène de migration des cellules très bénéfique dans notre cas. Nous avons en effet observé, qu'une fois adhérentes sur les circuits, les cellules ont une préférence pour le substrat de silice fondue. Elles sont alors capables d'émettre des prolongements pour migrer de la SU8 vers les micro-chambres de culture, au niveau des gaps entre les doigts inter-digités (Figure III-26).

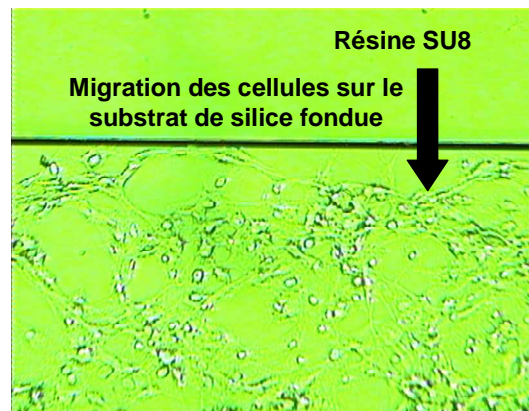


Figure III-26 : Phénomène de migration de cellules adhérentes gliales de la SU8 vers le substrat de silice fondue.

Ces endroits représentent alors des zones confinées dans lesquelles les cellules se développent très bien. A l'inverse, les lignes de métallisation sur lesquelles elles adhèrent très mal, leur servent de points d'accroche pour s'étendre entre les doigts capacitifs inter-digités. Nous vérifions ainsi que la géométrie du capteur est bien appropriée à un tel protocole. La Figure III.27 illustre une cellule confinée entre deux doigts inter-digités. Environ 36 heures sont nécessaires pour observer ce phénomène de migration qui n'intervient qu'une fois que les cellules ont bien adhéré à la surface du capteur.

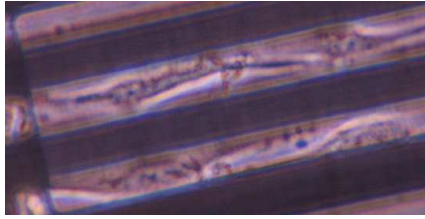


Figure III-27 : Photographie de cellules gliales ayant adhéré entre deux doigts d'or inter-digités.

Le nombre de cellules à ensemercer doit donc être réglé en fonction sachant que les cellules se multiplient de façon exponentielle. Par conséquent, si trop de cellules ont été mises en culture, il se peut qu'au bout de 24 heures, un grand nombre de cellules soient positionnées dans les gaps et qu'il faille arrêter la culture. Il a donc fallu déterminer un bon compromis entre ces deux paramètres. Une fois optimisée, la culture se trouve bien maîtrisée et reproductible d'une puce à une autre. Ainsi, il a été établi pour l'ensemble de nos expérimentations que 300 000 cellules ensemercées par puits et cultivées pendant 4 jours permettaient d'atteindre de bons résultats. A noter que les cellules sont durant leur culture observées au microscope inversé et le temps de culture peut être ajusté de façon à obtenir le nombre de cellules souhaitées sur le capteur.

IV.1.1.b Préparation des cellules

Les cellules sont ensuite fixées pour être mesurées. De façon à ne prendre en compte que l'effet des cellules, les mesures sont réalisées à l'air libre après le séchage des bio-capteurs. Cette étape étant assez agressive, il est nécessaire de fixer les cellules au PFA 4%. En suivant le même protocole que celui présenté avec le ficoll, le PFA 4% est préparé dans de l'eau désionisée.

Par la suite, le milieu de culture est enlevé des puits. Les circuits sur lesquels les cellules ont adhéré sont ensuite rincés au PBS1X pour éliminer toute trace du milieu de culture. Les bio-capteurs sont alors immergés dans la solution de PFA 4% pendant 10 minutes. Pour finir, la solution de PFA est remplacée par de l'eau désionisée. Plusieurs bains successifs sont réalisés de façon à éliminer toutes traces de PFA.

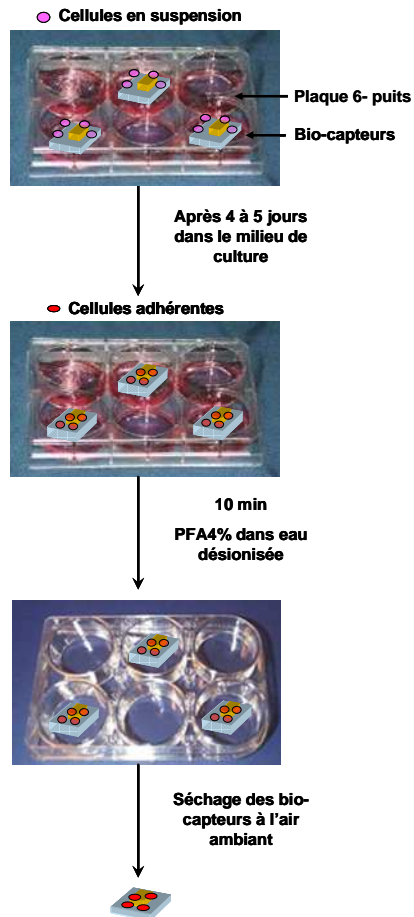


Figure III-28 : Protocole expérimental développé pour la culture cellulaire sur puce (échelle non respectée).

Les bio-capteurs sont alors prêts à être mesurés. Les cellules sont transportées dans l'eau désionisée puis les circuits sont séchés juste avant la mesure. Nous bénéficions alors d'environ 30 minutes pour réaliser des mesures fiables avant que les cellules ne commencent à se détériorer. La Figure III-28 résume le protocole expérimental.

IV.1.2 Protocole de mesure

Les mesures sont réalisées, comme avec le ficoll, à l'aide de pointes coplanaires GSG de Cascade et d'un analyseur de réseaux vectoriel HP 8722ES. Pour les mesures avec les résonateurs, les pointes sont calibrées sur la bande de fréquence 0,5 GHz -40 GHz avec 1601 points de mesure (limite de l'analyseur utilisé), grâce au kit de calibration fourni par Cascade. Une calibration sur une bande plus étroite autour de la fréquence de travail est réalisée pour améliorer la résolution de la mesure autour de la résonance des bio-capteurs. Pour les deux bio-capteurs, résonateurs et filtres, le même protocole de mesure est suivi. La Figure III-29 résume la procédure.

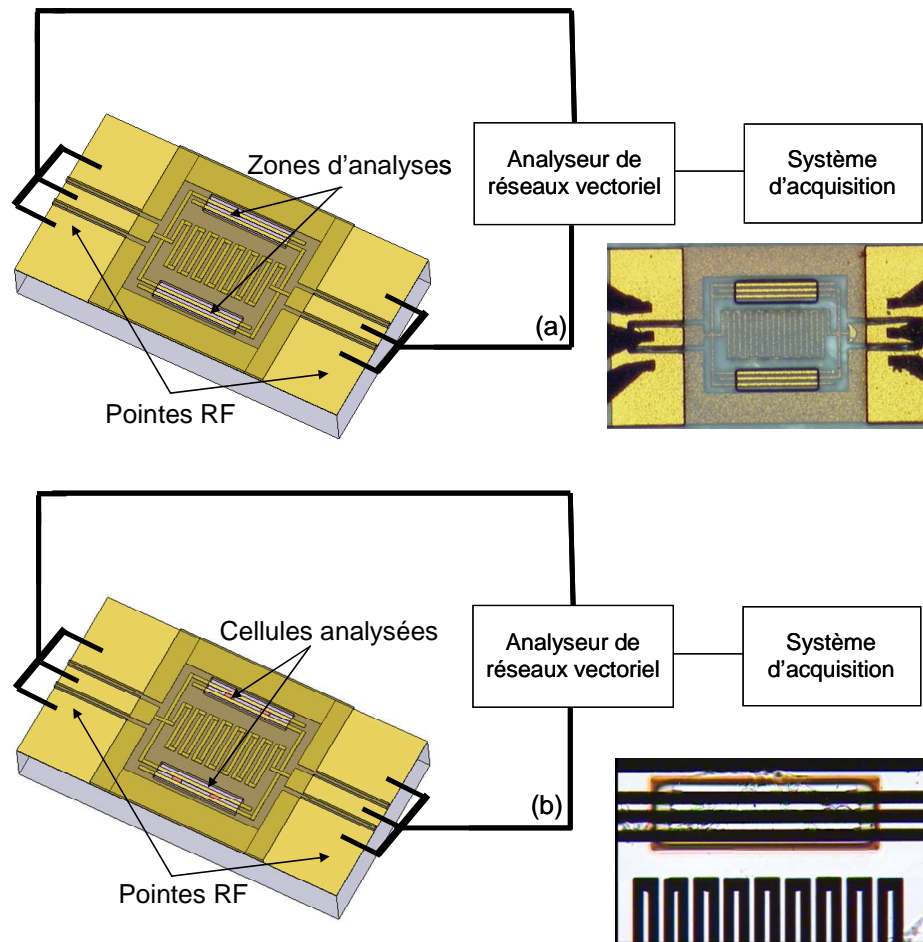


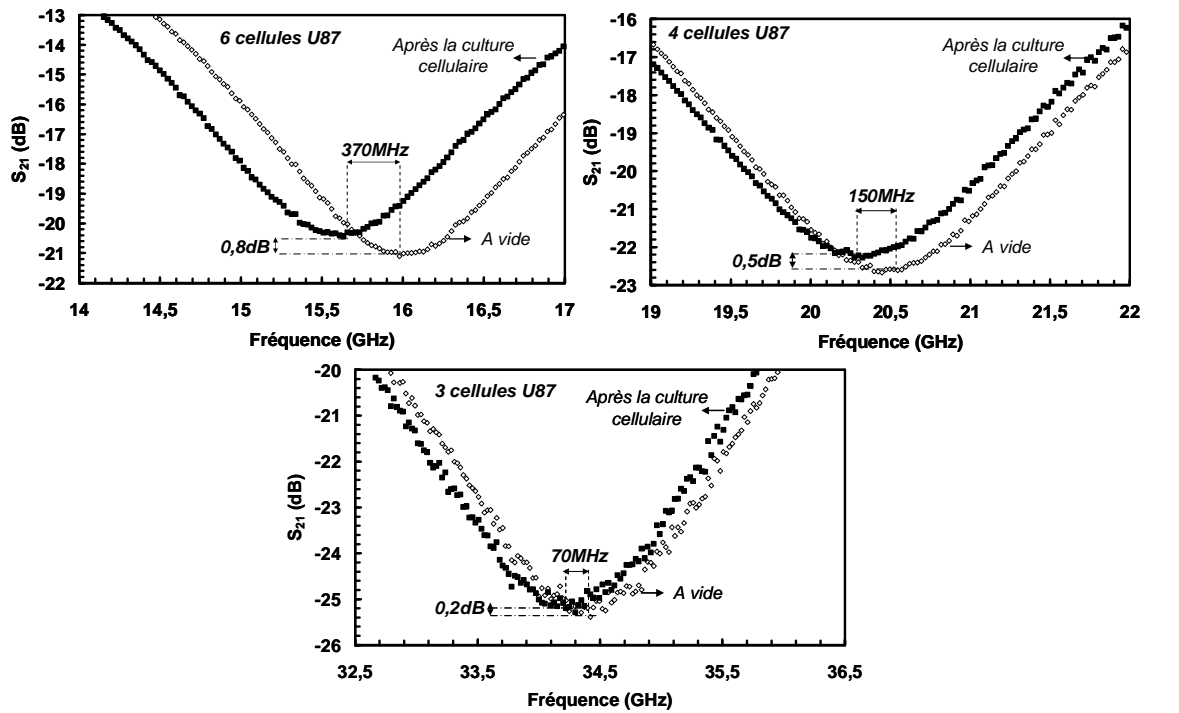
Figure III-29 : Protocole de mesure (a : système à vide et b : avec cellules).

Par rapport à l'utilisation du ficoll, ce protocole présente l'avantage de ne pas nécessiter un double étalonnage du dispositif (gain de temps), ce qui sous-entend la réduction à deux étapes : la mesure du dispositif à vide, avant la culture cellulaire et celle des capteurs après l'adhésion des cellules gliales ou neuronales. De plus, comme nous allons le voir, la précision des paramètres diélectriques extraits s'en trouve améliorée.

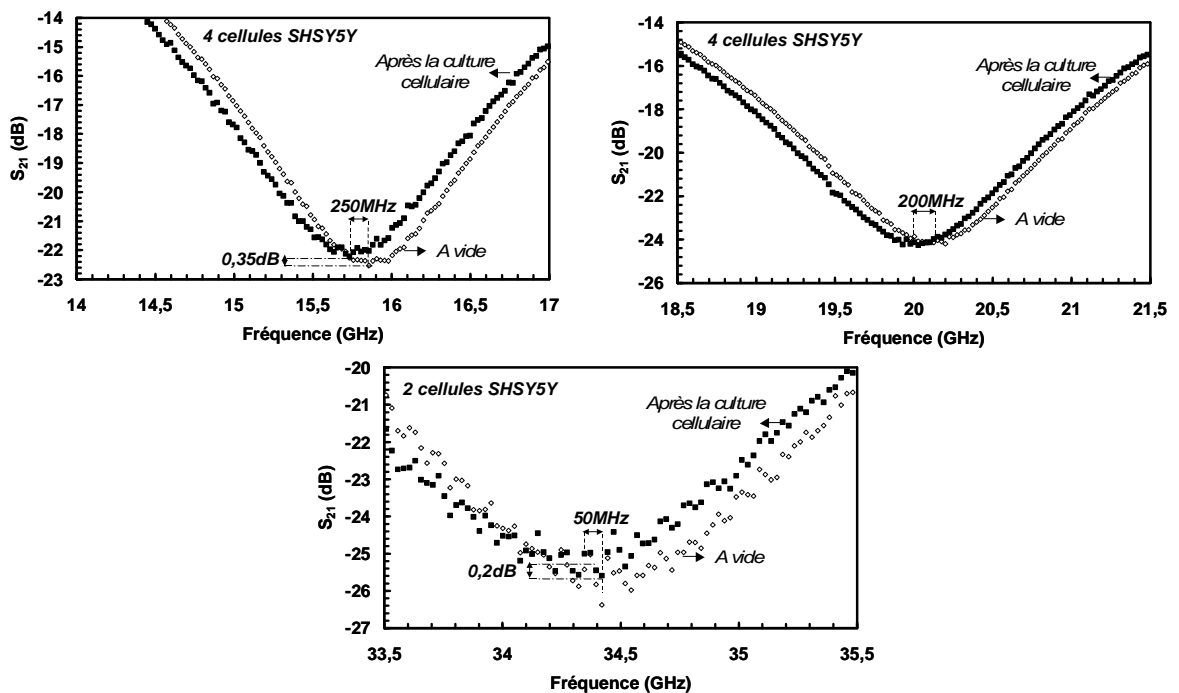
IV.1.3 Résultats expérimentaux

IV.1.3.a Bio-capteurs à base de résonateurs

Des mesures ont donc été réalisées avec des résonateurs de différentes fréquences de résonance et dont les gaps inter-digités correspondent à 10 μm pour les cellules gliales U87-MG et à 15 μm pour les cellules neuronales SH-SY5Y. La Figure III-30.a. résume les paramètres de transmission des capteurs mesurés à vide et chargés par les cellules gliales. La Figure III-30.b. montre les résultats obtenus avec les cellules neuronales.



a.



b.

Figure III-30 : Paramètres de transmission des bio-capteurs mesurés : a : pour les cellules gliales et b : pour les cellules neuronales (Un point de mesure tous les 25 MHz).

Des circuits témoins nous ont permis de vérifier qu’aucun milieu biologique ne pollueait les capteurs. En effet, des circuits ayant subi les mêmes traitements biologiques que les autres mais sur lesquels aucune cellule n’a poussé montre une réponse fréquentielle identique à celle obtenue avant les différents traitements, comme le montre la Figure III-31.

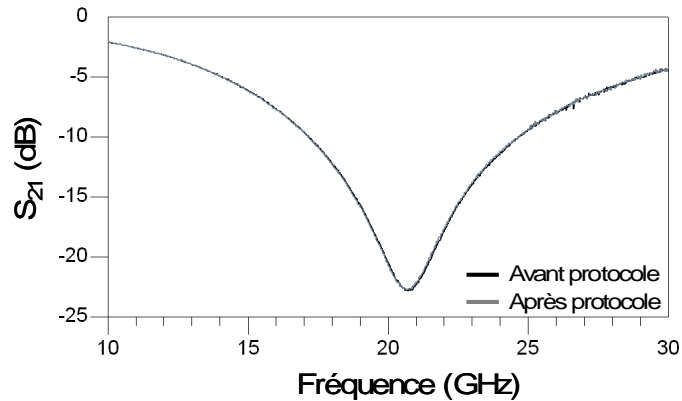


Figure III-31 : Comparaison des paramètres de transmission des bio-capteurs mesurés avant et après le protocole biologique (aucune cellule n’ayant adhéré sur le capteur).

Cette mesure nous permet aussi de nous assurer qu’il n’y a pas eu de dérive de la calibration lors des quelques jours qui se sont écoulés entre les deux mesures. Nous pouvons observer, pour les deux types cellulaires visés des décalages fréquentiels proportionnels au nombre de cellules interagissant avec le bio-capteur. On peut remarquer que les décalages de fréquence de résonance sont plus modérés (quelques centaines de MHz) que ceux observés dans le ficoll.

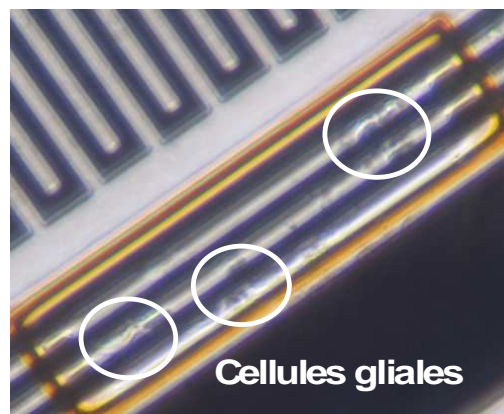


Figure III-32 : Photographie de cellules gliales développées sur le bio-capteur.

La raison principale vient du fait que les cellules qui adhèrent sur le capteur ont une forme plus allongée. Elles ont tendance à s’étaler dans les gaps des capacités inter digitées

(Figure III-32). Leur épaisseur est donc beaucoup plus faible et la zone d'interaction entre le champ électromagnétique et les cellules s'en trouve diminuée.

En suivant la démarche de rétro-simulation détaillée dans la partie III.1.4, les paramètres diélectriques des deux types cellulaires sont extraits. Les cellules sont dans ce cas modélisées par des éléments parallélépipédiques dont l'épaisseur est évaluée à 3 μm . La Figure III-33 montre un exemple de cellules modélisées.

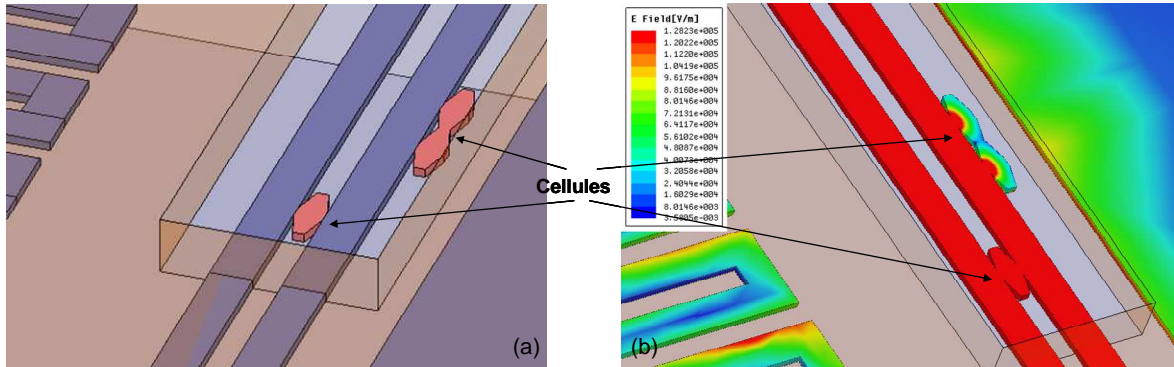


Figure III-33 : (a) Modélisation des cellules adhérentes en interaction avec le bio-capteur – (b) Répartition du champ électromagnétique.

Des exemples de rétro simulation, sur les cellules gliales, à 15,7 GHz et à 20,5 GHz sont donnés par la Figure III-34. Les courbes simulées et mesurées se superposent pour les paramètres diélectriques cellulaires indiqués dans l'insert des courbes.

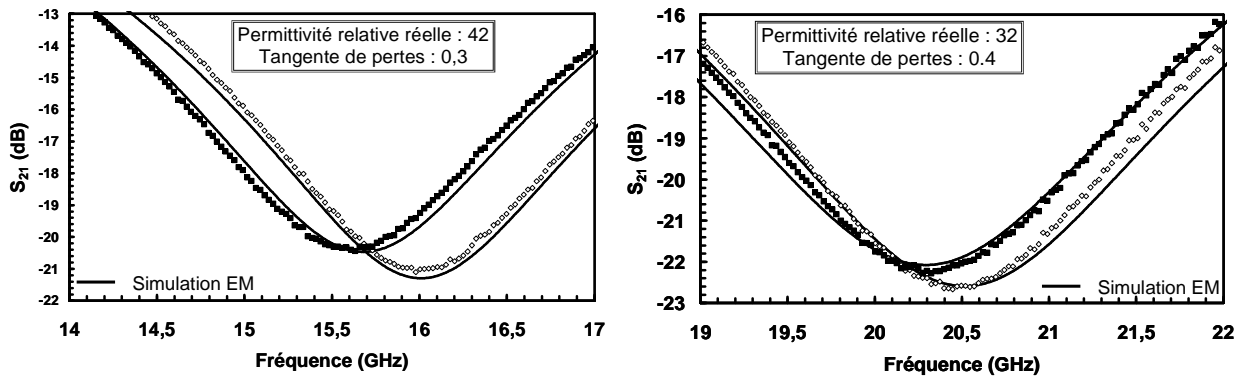


Figure III-34 : Comparaison des paramètres de transmission mesurés et simulés de bio-capteurs pour les cellules gliales.

Les résultats des deux types cellulaires étudiés sont résumés dans le Tableau III-2. Les résultats sont donnés en fonction de la fréquence et à 25°C.

Tableau III-2 : Paramètres diélectriques cellulaires extraits à 25°C sur les cellules gliales et neuronales en fonction de la fréquence.

	15,7 GHz		20,5 GHz		34,5 GHz	
	U87	SHSY5Y	U87	SHSY5Y	U87	SHSY5Y
Permittivité relative réelle	42 ± 2	48 ± 3	32 ± 2	40 ± 2	20 ± 1	20 ± 1
Tangente de pertes	0,30 ± 0,02	0,28 ± 0,02	0,40 ± 0,02	Difficile à évaluer avec une précision satisfaisante	Difficile à évaluer avec une précision satisfaisante	Difficile à évaluer avec une précision satisfaisante
Nombre de cellules en interaction avec le bio-capteur	6	4	4	4	3	2

La précision des résultats a été améliorée du fait que la position des cellules sur le capteur n'introduit plus une incertitude élevée. La principale source d'erreur dans ce cas réside dans la difficulté à évaluer précisément l'épaisseur des cellules. En effet, cette valeur qui influence le décalage fréquentiel et donc les paramètres diélectriques cellulaires extraits, est évaluée à 3 µm par comparaison, sous microscope, entre l'épaisseur des lignes de métallisations et celle des cellules. Des simulations électromagnétiques avec des cellules dont l'épaisseur varie de ± 0,5 µm nous ont permis d'évaluer une incertitude de quelques pourcents seulement. Afin de prendre en compte les sources d'erreur globales (liées à la modélisation mais aussi à la partie expérimentale), la barre d'imprécision a été positionnée à 5%.

Si l'on trace la partie réelle de la permittivité relative en fonction de la fréquence (Figure III-35), il apparaît clairement que les deux types cellulaires analysés (cellules gliales et neuronales) ont des caractéristiques qui diffèrent suffisamment pour les distinguer. Il est donc possible de détecter et d'analyser différents types cellulaires, même proches, en conservant une bonne sensibilité. L'analyse est réalisée ici avec moins de 10 cellules en interaction avec les bio-capteurs.

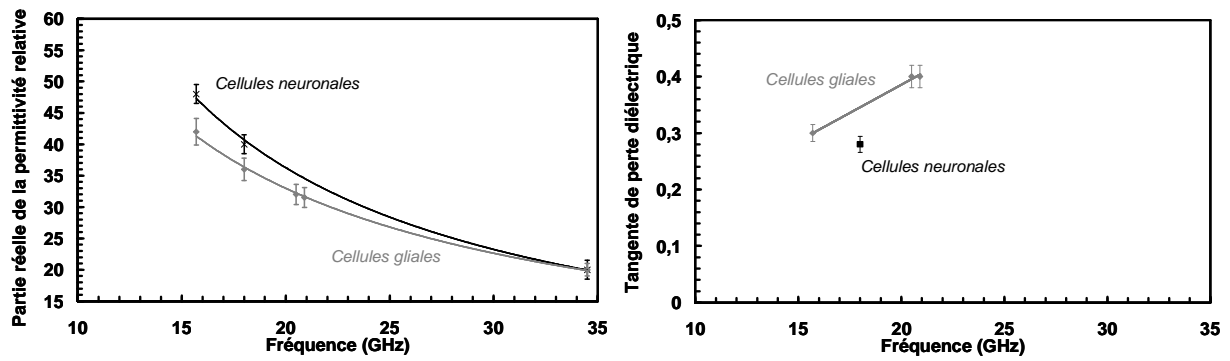


Figure III-35 : Evolution de la partie réelle de la permittivité relative des cellules gliales et neuronales en fonction de la fréquence.

Cependant, il semble qu'à partir de 35 GHz les permittivités des cellules gliales et neuronales soient confondues. Dans ce cas, il devient impossible de discriminer ces deux types cellulaires d'un point de vue diélectrique. Cela peut s'expliquer simplement par le fait qu'à partir de cette fréquence, nous travaillons en limite de la zone de dispersion γ et les capteurs ne sont alors plus assez sensibles pour détecter des petites différences dans les paramètres diélectriques.

A notre connaissance, peu d'études proposent des données diélectriques mesurées à l'échelle de cellules du système nerveux. Cependant, nous avons cherché à comparer nos résultats avec les données issues de la littérature. Bien entendu, les mesures ne portant pas sur les mêmes cellules et les conditions expérimentales étant différentes, seule une tendance pourra être trouvée. Cette comparaison porte sur des tissus de matière grise du cerveau, composés eux de plusieurs millions de cellules [III.8]. Ainsi, comme le montre la Figure III-36, il se dégage clairement une évolution similaire de la permittivité réelle en fonction de la fréquence pour les différents types cellulaires considérés. De plus, les valeurs de permittivités extraites semblent cohérentes par rapport à celles annoncées dans la littérature pour des tissus. Notons que la valeur de permittivité relative réelle extraite à 18 GHz sur les cellules gliales avec le protocole utilisant le ficoll a aussi été considérée. Un très bon accord entre les deux protocoles est observé.

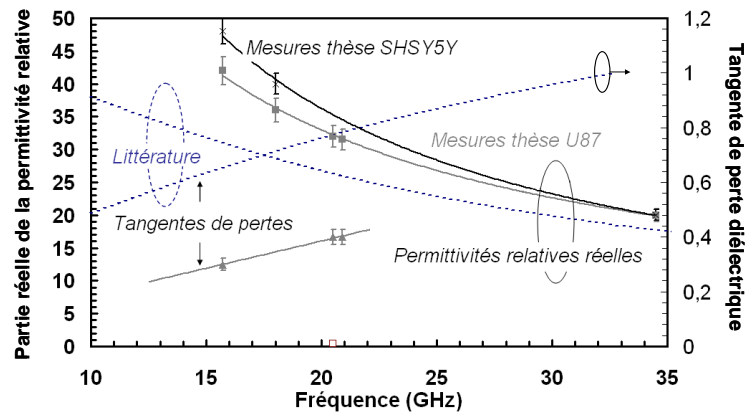


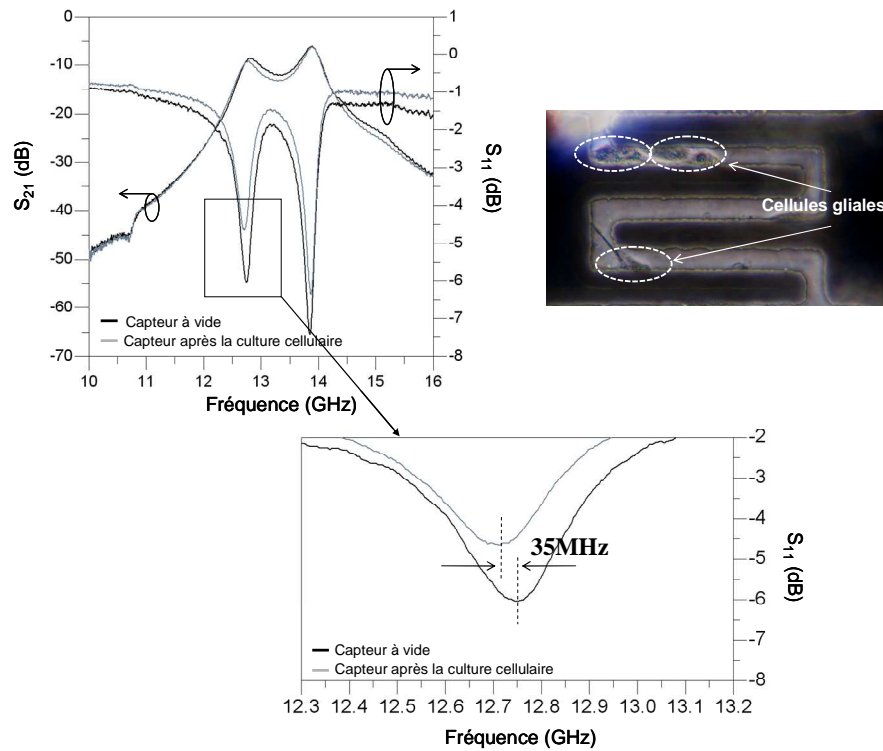
Figure III-36 : Comparaison des paramètres diélectriques cellulaires extraits dans ces travaux de thèse (cellules gliales et neuronales) avec des données issues de la littérature (tissus de matière grise du cerveau).

Pour conclure sur cette partie, la première génération de capteur nous a donc permis de prouver la faisabilité de la méthode de détection proposée. Les paramètres diélectriques des deux types cellulaires principaux constituant les tissus nerveux ont pu être extraits à l'aide de quelques cellules seulement en interaction avec le capteur. Cependant, ce type de résonateurs semble être aux limites de la caractérisation d'une cellule unique. De plus, sa sensibilité aux pertes introduites par les éléments biologiques reste limitée et il n'est pas toujours aisé d'extraire les tangentes de pertes associées avec une précision incontestable.

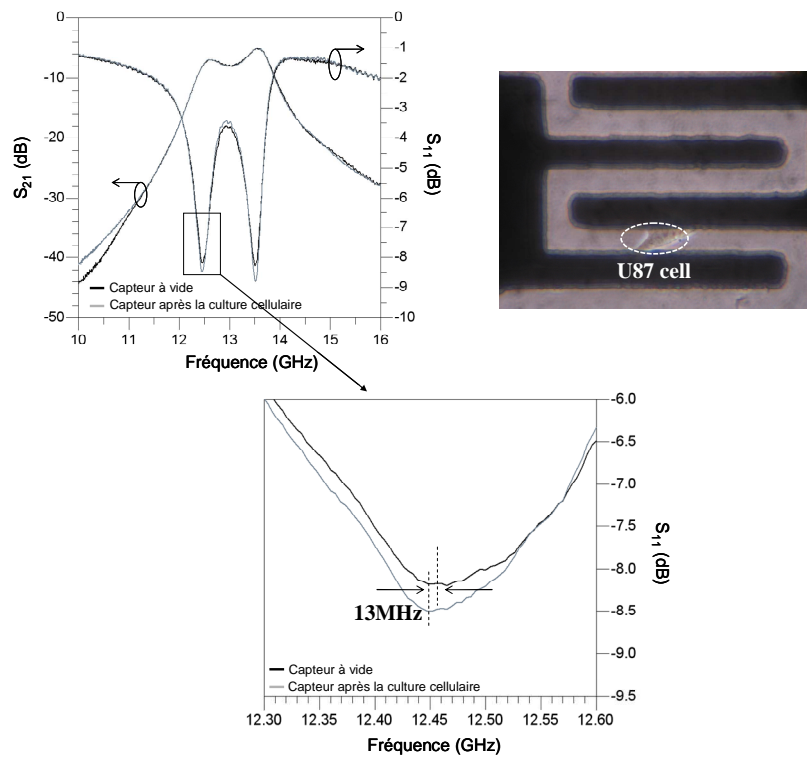
Afin de confirmer ces résultats et d'améliorer les performances de détection (dans l'objectif d'aboutir à l'analyse d'une cellule unique), une nouvelle campagne de mesure a été engagée avec des bio-capteurs basés sur une topologie de filtre.

IV.1.3.b Bio-capteurs à base de filtres

Les capteurs, utilisant les filtres comme détecteur, ayant les caractéristiques présentées dans le chapitre second et fonctionnant à 13 GHz, sont utilisés dans cette partie. Le protocole expérimental de mesure suivi pour les études avec les filtres est identique à celui utilisé lors des expériences précédentes portant sur les résonateurs, le tout réalisé dans les mêmes conditions. Les cellules sont cultivées directement sur la puce et les paramètres S des filtres sont mesurés avant et après l'adhésion des cellules. Etant donné que les variations attendues, sur une concentration très faible de cellules, doivent être relativement fines (quelques dizaines de MHz), une calibration sur une bande de fréquence plus étroite, bande autour de la fréquence de travail, 10-16 GHz, est réalisée. Pour s'assurer qu'il n'y a pas de dérive de calibration, un dispositif témoin, sans cellule est mesuré.



a.



b.

Figure III-37 : Comparaison des paramètres S des filtres avant et après l'adhésion de (a) 3 cellules gliales et (b) d'une seule cellule gliale (un point de mesure tous les 4,4 MHz).

La première campagne de mesure a été menée, pour raisons pratiques, avec des filtres dont les accès coplanaires d'entrée et de sortie n'étaient pas protégés. Ainsi, dans cette configuration, l'évolution du niveau de réflexion du paramètre S11 en dB n'est pas significative dans la mesure où l'adaptation à 50 ohms du filtre n'est pas assurée après la culture cellulaire. Néanmoins, le décalage fréquentiel observé sur le pic de résonance du mode impair du filtre ne peut pas être influencé par ce phénomène et sera bien représentatif de l'effet des cellules dans la zone de la capacité inter résonateur. Les résultats sont présentés sur la Figure III-37.

Ces premières mesures confirment que la sensibilité de détection de ce type de biocapteurs est suffisante pour détecter une seule et unique cellule gliale. En effet, la sélectivité du pic résonant (largeur du pic à 3dB de 400 MHz contre 1,7 GHz pour les résonateurs) permet de déceler de très faibles variations de l'ordre de 10 MHz.

De façon analogue aux études précédentes, des rétro simulations sont utilisées pour extraire les paramètres diélectriques cellulaires. Comme expliqué précédemment, seule la permittivité relative réelle des cellules gliales sera évaluée étant donné que les variations du niveau des paramètres S sont faussées dans le cas présent. La permittivité relative réelle extraite est de 50 ± 3 à la fréquence de 12,5 GHz, ce qui est en bon accord avec les résultats obtenus avec les résonateurs comme le montre la Figure III-38.

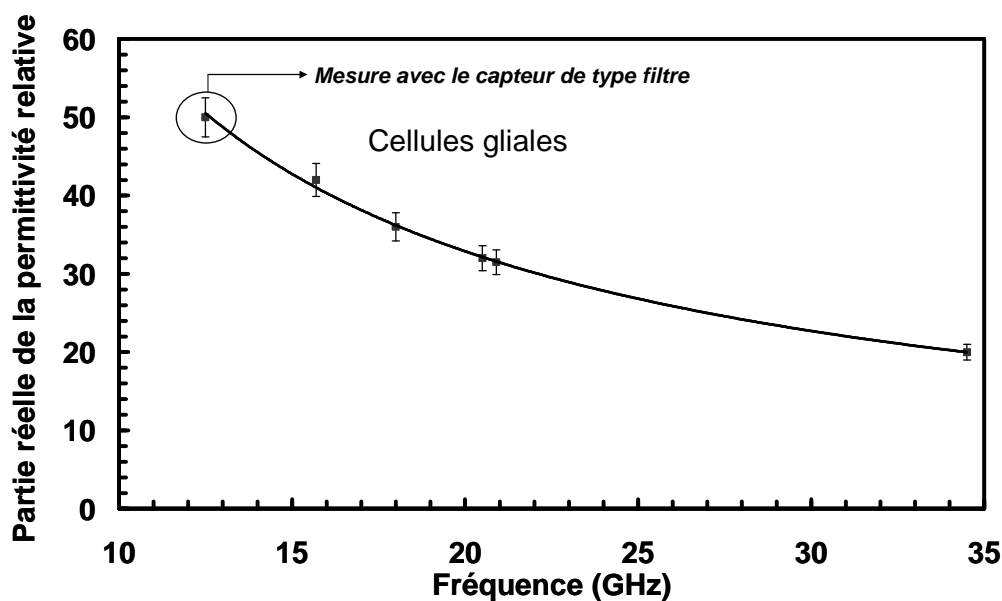


Figure III-38 : Spectre des permittivités réelles relatives de cellules gliales pour une température de 25 °C.

Ces toutes premières mesures reposant sur une nouvelle génération de bio-capteurs sont donc très encourageantes et mettent en évidence un potentiel fort pour la détection et l'analyse de cellule « unique », jusqu'à présent non envisageables.

Par la suite, pour palier aux problèmes de désadaptation des filtres qui rendent délicates l'extraction de la tangente de pertes du milieu intra-cellulaire, les accès coplanaires des systèmes devront être protégés. La résine SU8, utilisée pour former les chambres de culture est employée pour créer un anneau protecteur sur les parties sensibles des accès. Pour valider l'efficacité de cette solution, une mesure sur un tel dispositif a été réalisée. La Figure III-39 montre les résultats obtenus avec une seule cellule gliale sous test. Le décalage fréquentiel obtenu, du même ordre de grandeur que ceux observés précédemment, confirme les résultats sur la partie réelle de la permittivité du milieu cellulaire. Concernant les pertes associées, l'adaptation est dans ce cas constante et il est possible d'observer une remontée du pic d'absorption significative. Sur cette base, une étude va être débutée pour extraire les tangentes de pertes associées au milieu extra-cellulaire des entités biologiques analysées.

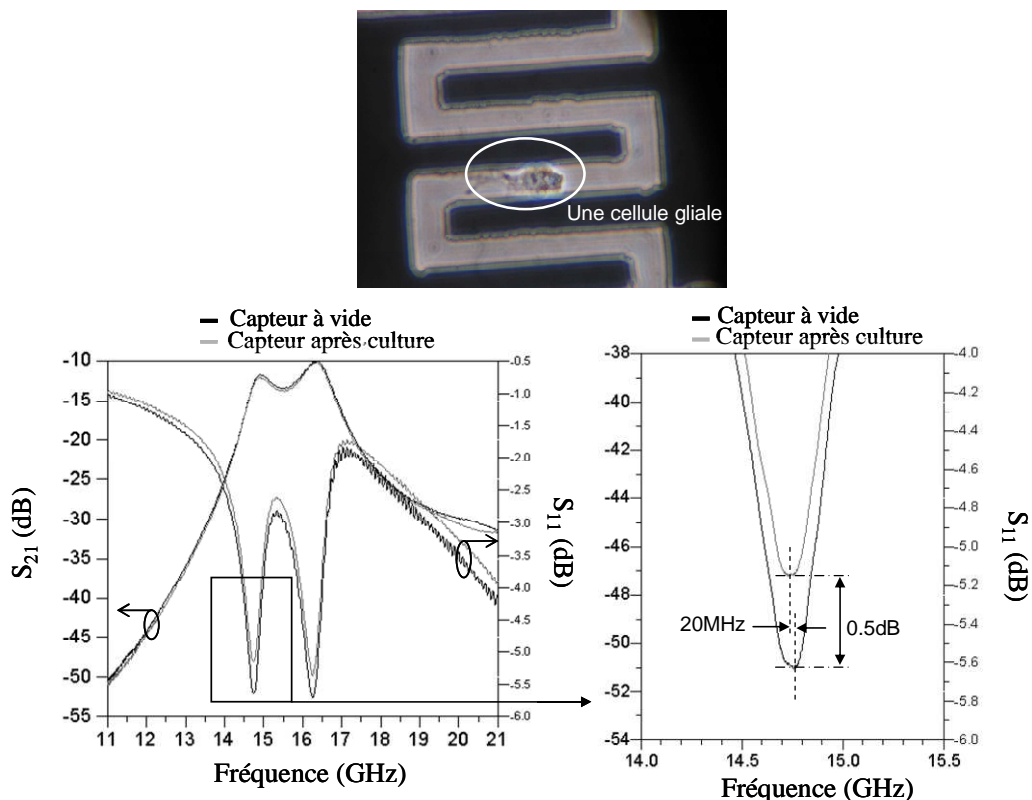


Figure III-39 : Comparaison des paramètres S des filtres, dont les accès coplanaires sont protégés, avant et après l'adhésion d'une seule cellule gliale (un point de mesure tous les 6,2 MHz).

Fort de ces résultats, dans une dernière partie, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des cellules souches tumorales dont le manque de connaissance actuel freine le développement de nouveaux traitements dans la lutte de la récurrence des cancers. Nous allons voir qu'il a été nécessaire d'adapter le protocole expérimental de mesure et nous présentons les premiers résultats expérimentaux.

V. Mesures préliminaires sur cellules souches

Les cellules utilisées pour cette partie sont issues d'un milieu enrichi en cellules souches. Les cellules originaires de la lignée U87-MG sont cultivées dans un milieu de culture particulier, le milieu défini, qui évite la différenciation des cellules. Elles se regroupent alors entre elles, pour former des neurosphères (Figure III-40).

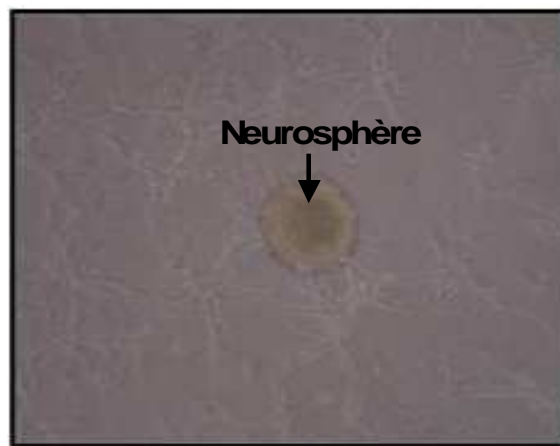


Figure III-40 : Cellules U87-MG cultivées en milieu défini.

Les biologistes ont montré que le centre de ces sphères est formé de cellules souches, c'est-à-dire indifférenciées. Les cellules périphériques, si elles ne sont pas toutes souches, sont à un stade de différenciation très faible par rapport aux cellules gliales analysées précédemment. L'enjeu est donc de voir si le capteur permet de distinguer des cellules gliales U87-MG à différents stades de différenciation.

V.1.1 Protocole biologique développé

Le problème principal posé dans notre cas par l'étude de ces cellules est le fait qu'elles sont flottantes. Elles ne peuvent donc pas adhérer au substrat car elles se développent en suspension dans leur milieu de culture. L'idée est donc d'adapter le protocole expérimental de façon à pouvoir mesurer les cellules déposées dans le plan du capteur et sans aucun milieu de

culture de façon similaire au protocole de culture sur puce développé pour des cellules adhérentes.

Nous allons maintenant détailler le protocole développé. Le dépôt des cellules sur les capteurs est réalisé au laboratoire d'Homéostasie Cellulaire et Pathologies. Les cellules sont issues de la même lignée U87-MG mais cultivées dans un milieu défini. Ce milieu est préparé à partir du milieu basal, mais le sérum de veau fœtal est remplacé par des facteurs de croissance. Cela permet d'enrichir le milieu en cellules souches. Une fois arrivées à confluence, les cellules sont récupérées et comptées sur cellule de Malassez. En fonction du nombre de cellules présentes dans la solution, des dilutions sont effectuées pour obtenir la concentration de cellules à ensemercer sur les circuits. Différentes solutions ont été envisagées et testées comme l'utilisation d'un cytopspin pour plaquer les cellules sur les substrats. La solution la plus efficace retenue consiste à déposer une goutte d'eau contenant des cellules fixées. La goutte est alors séchée au stérilisateur et les cellules se retrouvent bien plaquées à la surface du capteur.

La première étape consiste donc à évaluer la concentration de cellules idéale pour notre analyse (20000 cellules pour 10 μ L). Les cellules sont ensuite rincées dans plusieurs bains de PBS puis fixées au PFA dans l'eau distillée.

Pendant ce temps, les circuits sont eux aussi mis dans de l'eau distillée et placés dans un incubateur. Cette étape, indispensable, permet de remplir d'eau les micro-chambres de culture, de façon à ce que lorsque la goutte de liquide contenant les cellules sera déposée, elle y pénétrera aisément.

Les capteurs sont ensuite sortis de l'eau et une goutte d'eau désionisée contenant les cellules fixées est déposée sur la puce. Les circuits sont alors placés au stérilisateur à une température de 50°C. A noter que ce protocole est utilisé en biologie pour faire adhérer des cellules fixées sur des lamelles de verre pour analyse. Pendant l'évaporation de l'eau, les cellules sont plaquées contre le substrat de silice fondue. Lorsque la goutte d'eau est complètement sèche (cela pouvant prendre plusieurs minutes), les circuits sont sortis du stérilisateur. Le protocole est résumé par la Figure III-41.

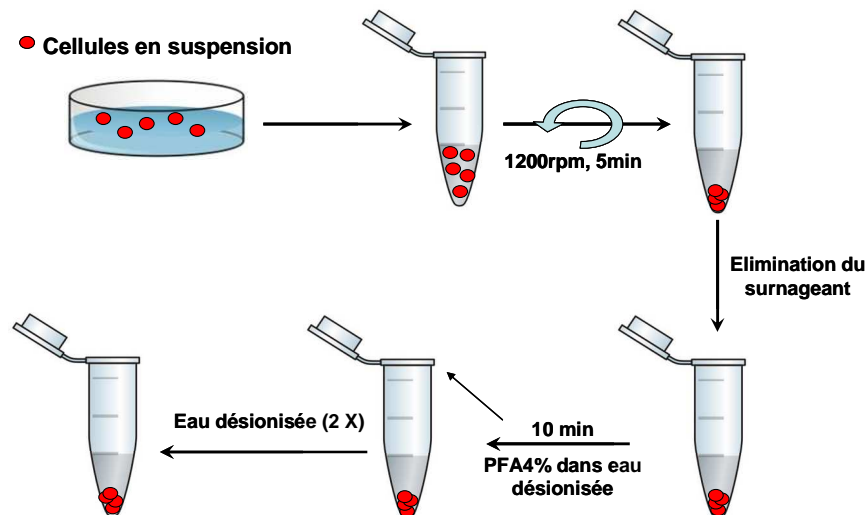


Figure III-41 : Cellules U87-MG cultivées en milieu défini.

Les cellules observées sous microscope montrent une très bonne adhésion au substrat. Leur nombre et leur position sont repérés avant la mesure et confirmés pendant la caractérisation. Les circuits sont alors transportés dans des chambres humides. Nous bénéficions d'environ 30 minutes pour faire les mesures dans des conditions optimales.

Comme précédemment, les circuits sont mesurés avant et après le dépôt des cellules. Il est à noter que les résonateurs mais aussi les filtres ont été utilisés.

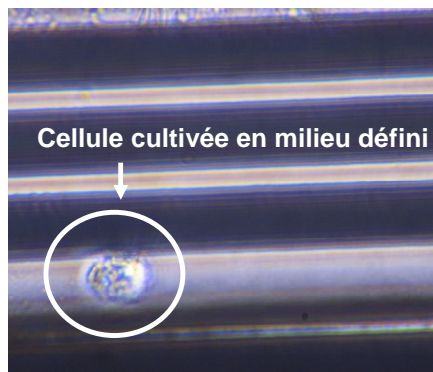


Figure III-42 : Cellules U87-MG cultivées en milieu défini.

Comme le montre la Figure III-42, les cellules ont dans cette configuration une forme arrondie, du fait de leur caractéristique flottante. Leur épaisseur semble très faible, de l'ordre du micromètre, très probablement liée aux pressions exercées durant le séchage de l'eau au stérilisateur. Ceci devra être pris en compte lors des rétro simulations.

V.1.2 Résultats expérimentaux

V.1.2.a Bio-capteurs basés sur les résonateurs

De façon à valider le protocole expérimental et vérifier qu'il n'ait aucune influence sur les paramètres diélectriques extraits, nous avons dans un premier temps, mesuré les cellules gliales U87 cultivées de façon classique dans le milieu basal dont nous connaissons le spectre diélectrique sur la bande fréquentielle de travail.

Le capteur est donc mesuré à vide et ses paramètres de transmission sont comparés à ceux obtenus après avoir déposé et fait adhérer les cellules sur le capteur. La Figure III-43 montre la réponse en fréquence du capteur lorsque 5 cellules gliales sont en interaction avec la zone sensible du capteur.

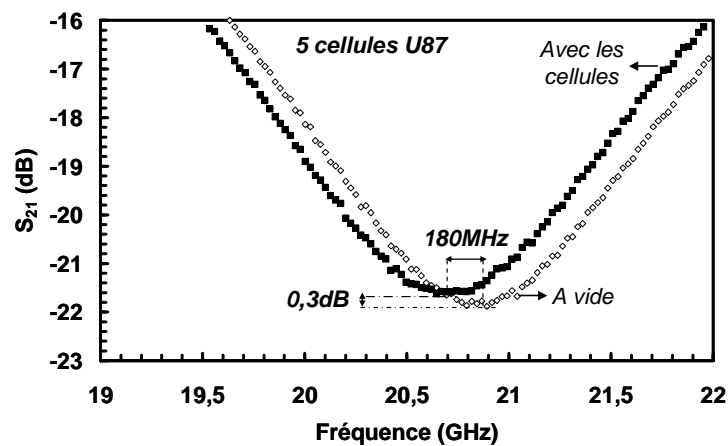


Figure III-43 : Comparaison des paramètres de transmission du bio-capteur à vide et chargé par 5 cellules gliales (un point de mesure tous les 25 MHz).

Les rétro simulations sont effectuées en respectant toujours la même méthodologie et en tenant compte au mieux de l'épaisseur et de la forme des cellules. La valeur de la permittivité relative réelle extraite, de 31,5 à la fréquence de 21GHz, est en bon accord avec les données obtenues avec le protocole de culture cellulaire sur puce. Par conséquent, le nouveau protocole s'en trouve validé et va de ce fait être appliqué sereinement à l'analyse des cellules souches. La Figure III-44 montre la modification des paramètres de transmission du bio-capteur engendré par la présence de deux cellules U87-MG à un stade de différenciation beaucoup moins avancé que les cellules gliales.

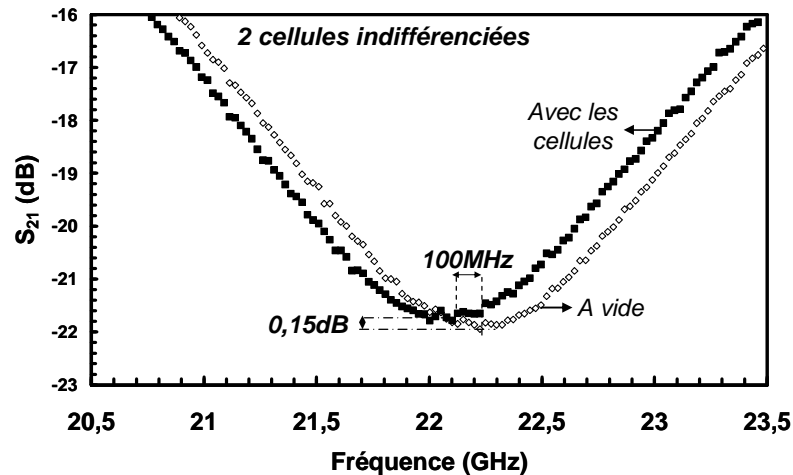


Figure III-44 : Comparaison des paramètres de transmission du bio-capteur à vide et chargé par des cellules issues du milieu défini (un point de mesure tous les 25 MHz).

La partie réelle de la permittivité des cellules indifférenciées a été évaluée à 37 ± 2 à 22 GHz et 25°C. La valeur de la tangente de pertes n'a pas pu être extraite précisément avec cette mesure. Toutefois, il semblerait, au vu de ces premiers résultats, que les cellules dites indifférenciées présentent une permittivité relative réelle plus grande (évaluée à 15%) que les mêmes cellules déjà différenciées : les cellules gliales.

Ces premiers résultats sont très encourageants car ils tendent à montrer la possibilité de trier des cellules souches sans l'utilisation de marqueur mais à l'aide uniquement de leurs propriétés diélectriques intrinsèques. Enfin, nous avons cherché à confirmer ces premiers résultats et à évaluer les pertes associées à ces cellules indifférenciées en utilisant le deuxième type de bio-capteur basé sur une topologie de filtre.

V.1.2.b Bio-capteurs à base de filtres

A partir du même protocole expérimental développé pour déposer les cellules dites souches et les faire adhérer sur le substrat, les filtres ont été mesurés avec et sans ce type cellulaire. De façon à étendre les fréquences d'analyse et comparer les résultats, des filtres dont la fréquence centrale se situe autour de 15,7 GHz ont été dimensionnés. Il est à noter qu'une couche de SU8 pour protéger les accès a été utilisée pour les résultats présentés sur la Figure III-45 qui montre l'influence de 4 cellules sur les paramètres S du filtre.

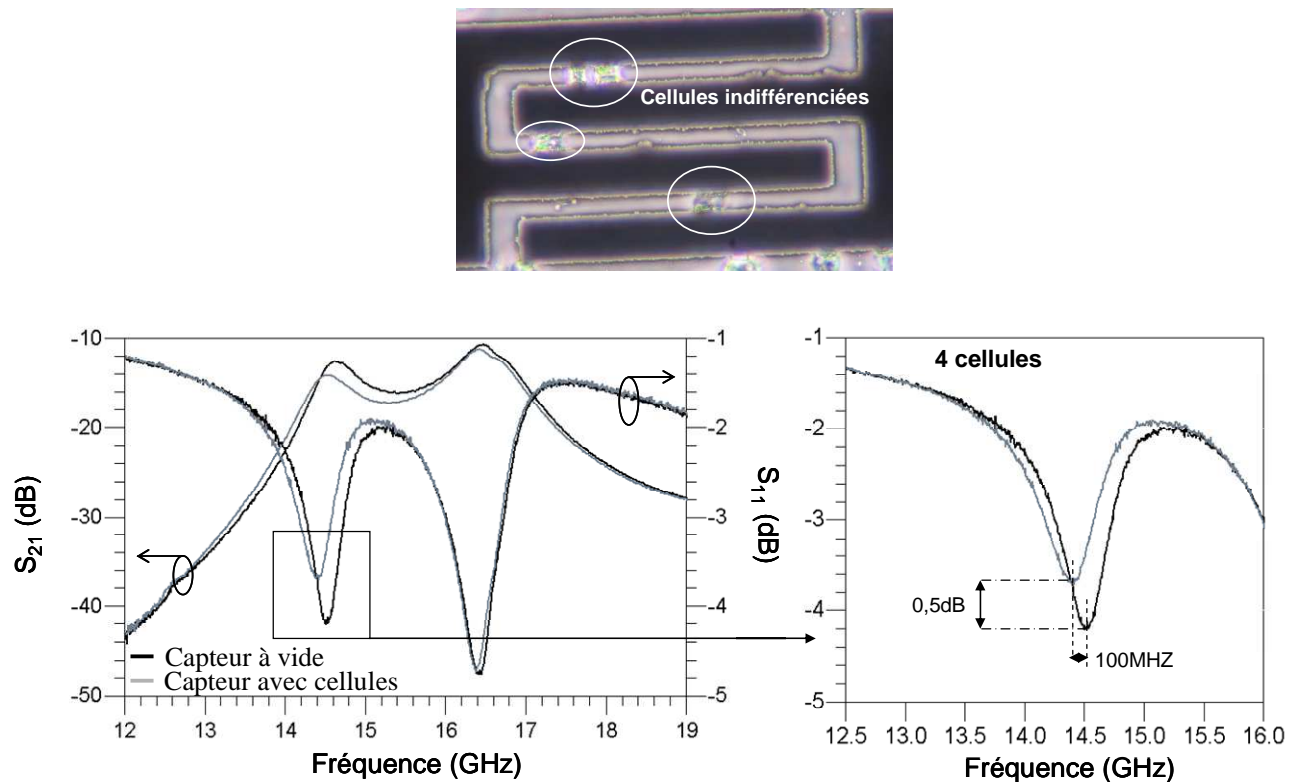


Figure III-45 : Comparaison des paramètres S du filtre à vide et chargé par des cellules issues du milieu défini.

Un décalage fréquentiel de 100 MHz et une remontée du pic d'absorption de 0,5 dB ont pu être mesurés à 14,4 GHz et à 25°C. Les premières mesures réalisées à cette fréquence sur ce type de cellules ont permis d'évaluer la partie réelle de leur permittivité relative à 55 ± 3 . La tangente de pertes du milieu intra cellulaire a, quand à elle, été estimée à $0,65 \pm 0,05$. Cette mesure confirme ainsi la tendance qu'ont les cellules dites indifférenciées à présenter une permittivité relative réelle plus élevée que les mêmes cellules déjà différenciées.

De plus, l'utilisation de la seconde génération de bio-capteurs confirme ici leur meilleure sensibilité à l'évaluation des pertes associées au milieu biologique sous test.

Des mesures complémentaires avec de tels dispositifs doivent être menées pour établir une cartographie précise des valeurs de tangente de pertes des cellules indifférenciées et gliales afin de les comparer.

La Figure III-46 résume les résultats extraits sur les cellules souches et les compare aux résultats précédents obtenus sur les cellules gliales et neuronales.

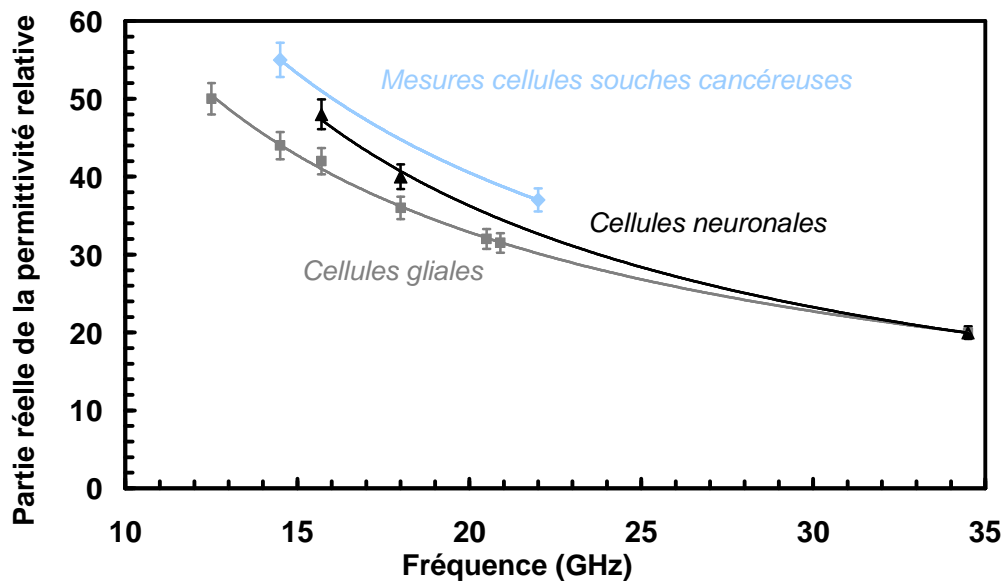


Figure III-46 : Comparaison des paramètres diélectriques des cellules dites souches au spectre diélectrique des cellules U87-MG et SHSY5Y.

En conclusion, la méthode proposée pour discriminer, analyser et trier les cellules souches semblent être très prometteuse. En effet, grâce aux bio-capteurs développés, nous avons démontré que des cellules souches et différenciées présentent des propriétés diélectriques différentes. Ces premières constatations ouvrent des voies nouvelles pour l'analyse de ces cellules ainsi que des solutions alternatives à l'utilisation, souvent trop compliquée, de marqueurs spécifiques.

Conclusion

Ainsi, au cours de ce dernier chapitre, nous avons vu comment nous avons mis en œuvre de façon expérimentale la réalisation et la mesure des bio-capteurs développés. Différents protocoles expérimentaux ont été mis au point pour à la fois tenir compte du type de cellules analysés mais aussi pour améliorer les conditions de mesure et la précision des paramètres diélectriques cellulaires extraits.

En résumé, la faisabilité de la méthode de détection a été prouvée. Différentes mesures confirment les résultats expérimentaux présentés dans ce chapitre. De plus, nous avons montré qu'il était possible de détecter et de discriminer une très petite quantité de cellules grâce à la détermination de leurs propriétés diélectriques. Des types cellulaires, issus d'un même tissu, ont été clairement identifiés jusqu'à la limite de la zone de dispersion γ . Les différents types de bio-capteurs ainsi que les protocoles expérimentaux développés permettent d'obtenir des résultats en bon accord.

Le développement d'une seconde génération de bio-capteurs basés sur des filtres hyper-fréquences nous a permis de mesurer une cellule unique. Nous avons aussi pu améliorer la sensibilité de détection notamment au niveau de la mesure des pertes diélectriques des cellules.

Enfin, pour la première fois, nous avons montré qu'il était possible, potentiellement, de discriminer un type cellulaire à différents stades de différenciation grâce à ses propriétés diélectriques.

Chapitre Troisième

[III.1] W. KERN, D. A. PUOTINEN : « **Cleaning Solution Based on Hydrogen Peroxide for use in semiconductor technology** », *RCA review*, June 1970, p. 187.

[III.2] Université de Rennes, <<http://www.microelectronique.univ-rennes1.fr/fr/chap8b.htm>>, Juillet 2009.

[III.3] Société MICROCHEM : « **NANOTM SU8-2000** », fiche technique.

[III.4] A. BOYUM : « **Separation of white blood cells** », *Nature*, Vol. 204, pp. 793-794, 1964.

[III.5] Amersham Biosciences : « **Ficoll PM 70, Ficoll PM 400** », fiche technique.

[III.6] S-C. YU, Y-F. PING, L.YI, Z-H. ZHOU, J-H. CHEN, X-H. YAO, L. GAO, J. MING WANG, X-W. BIAN , « **Isolation and characterization of cancer stem cells from a human glioblastoma cell line U87** », *Cancer Letters*, Vol. 265, pp. 124-134, 2008.

[III.7] Ansoft Corporation, “User’s guide – HFSS version.9”.

[III.8] S. GABRIEL, RW. LAU, C. GABRIEL : « **The dielectric properties of biological tissues : III. Parametric models for the dielectric spectrum of tissues** », *Phys. Med. Biol.*, Vol. 41, pp. 2271-2293, 1996.

Conclusions générales/Perspectives

Conclusions générales et Perspectives

Les bio-capteurs conçus lors de ces travaux de thèse ont été basés sur des dispositifs résonants fonctionnant aux fréquences micro ondes. Nous avons vu que ces fréquences sont très intéressantes pour l'analyse de cellules biologiques car elles permettent d'une part de pénétrer à l'intérieur de la cellule pour en sonder le contenu intra cellulaire et d'autre part, les longueurs d'ondes associées permettent de fabriquer des dispositifs miniaturisés pour une analyse proche de l'échelle cellulaire. Il est donc possible, de détecter et d'analyser une très faible concentration de cellules et d'observer les phénomènes biologiques à l'échelle des cellules et non plus des tissus. Ainsi, la première génération de bio-capteurs développée dans ces travaux à partir de résonateurs planaires micro ondes a permis de démontrer la faisabilité de la méthode de détection proposée. La mise au point et l'optimisation de plusieurs protocoles expérimentaux ont été nécessaires pour analyser, sans effet non contrôlable lié au milieu extracellulaire, l'influence des cellules sur la réponse en fréquence des bio-capteurs.

Les résultats expérimentaux présentés dans ce manuscrit montrent qu'il est possible d'extraire les paramètres diélectriques des cellules analysées. En particulier, les permittivités relatives réelles extraites sur deux types cellulaires issus d'un même tissu sont distinctes et permettent clairement de les discriminer aux fréquences correspondant à la zone de dispersion γ observée dans les matériaux biologiques. Ces premiers capteurs, dont le facteur de qualité reste encore modéré, a montré ses limites de détection notamment concernant la mesure des pertes diélectriques associées aux cellules à caractériser.

Nous avons donc travaillé sur la conception et le développement de nouveaux dispositifs hyper-fréquences, basés sur un filtre planaire, de façon à augmenter la sélectivité en fréquence du dispositif, au travers de l'amélioration du facteur de qualité, mais aussi pour accroître la sensibilité de détection associée aux pertes intrinsèques du milieu intra cellulaire. Les résultats expérimentaux montrent un bon accord entre les données obtenues avec les résonateurs et les filtres. De plus, ces nouvelles structures nous ont permis de détecter et d'analyser une cellule unique grâce à sa meilleure sélectivité en fréquence.

Fort de ces résultats les premières expérimentations concernant les cellules souches ont pu être initiées. Elles tendent à montrer que le stade de différenciation des cellules U87-MG est relié à leurs propriétés diélectriques. Ces résultats préliminaires restent à compléter par d'autres expérimentations mais pourraient ouvrir une voie importante pour le développement de traitements contre ces cellules spécifiques.

Ces travaux de thèse nous ont permis de nous confronter aux problématiques posées par l'étude d'éléments biologiques. Les protocoles biologiques développés et les nombreuses expérimentations réalisées nous ont permis de mieux appréhender la complexité d'étudier des cellules biologiques. Nous avons en effet consacré un temps important aux expérimentations qui, comme nous l'avons vu, ont été déterminantes dans les orientations prises pour la conception des bio-capteurs. Différentes solutions ont été proposées et expérimentées dans l'objectif d'obtenir une base pour le développement de cette thématique dans notre équipe de recherche. Différentes voies ont donc été ouvertes par ces travaux comme nous allons le voir.

Il serait intéressant à présent de réaliser des mesures sur des cellules non fixées. La distance entre le laboratoire de biologie où sont préparées les cellules et XLIM où sont réalisées les mesures ne nous ont pas permis de tester cela de façon optimale. De plus, il est nécessaire de travailler sur de nouveaux protocoles expérimentaux pour renforcer les études menées sur les cellules souches. Par exemple, un marquage, voir un tri préalable de ces cellules serait intéressant à faire avant l'analyse par nos capteurs. Dans ce cas, l'influence du marqueur sur la méthode de mesure reste à définir, mais cela permettrait un contrôle supplémentaire qui garantirait que les cellules sous test sont effectivement des cellules souches.

Un autre point important consiste également à formaliser le traitement des résultats pour avoir accès aux paramètres cellulaires rapidement. En effet, pour des applications de tri cellulaire par exemple, il est crucial de pouvoir orienter la cellule en fonction de ces paramètres en temps réel. Dans cette perspective, il est possible d'établir des bases de données répertoriant les caractéristiques électromagnétiques de différents types cellulaires. Elles peuvent par exemple se présenter sous forme d'abaques donnant la bio-impédance en fonction de la fréquence pour différents types cellulaires et différents états pathologiques. Cette étude pourrait se baser sur l'utilisation de modèles électriques équivalents du capteur et des cellules. Cette modélisation pourrait permettre par la simple connaissance d'une variation de capacité ou de résistance, de remonter aux paramètres diélectriques cellulaires par de simples simulations circuits plus rapides que des rétro simulations électromagnétiques.

Finalement, au niveau de la conception des bio-capteurs et toujours dans l'idée de rendre plus rapide les analyses, il serait intéressant de mettre au point un bio-capteur auto calibré qui permettrait de réaliser des mesures différentielles et éviterait les différentes étapes d'étalonnage des dispositifs.

D'un point de vue pratique, il est aujourd'hui nécessaire d'implémenter un réseau microfluidique sur les capteurs, dont la géométrie planaire rend cette étape tout à fait envisageable. La microfluidique est un outil indispensable aujourd'hui pour l'analyse de cellules vivantes et l'observation en temps réel de phénomènes biologiques en leur sein. La topologie des bio-capteurs sera à optimiser pour une utilisation en milieu liquide. Toutefois, la manipulation de très petits volumes de liquides et la maîtrise de la position des cellules sur le capteur sont des besoins primordiaux pour le développement de dispositifs de tri cellulaire précis qui est, à terme, une perspective conséquente de nos travaux de recherche. En effet, l'étude des cellules souches est une thématique très importante pour les biologistes avec qui nous collaborons. Comme nous l'avons vu, les premiers résultats obtenus sont très encourageants et de nouvelles expérimentations sont prévues pour compléter les résultats et développer un système de tri cellulaire précis. L'idée à plus long terme étant de coupler un dispositif de tri cellulaire utilisé en biologie avec les bio-capteurs développés.

Production scientifique

Publications dans des revues internationales à comité de lecture

- C. DALMAY, M. CHERAY, A. POTHIER, F. LALLOUE, M-O. JAUBERTEAU, P. BLONDY : « **Ultra Sensitive Biosensor Based on Impedance Spectroscopy at Microwave Frequencies for Single Cell Analysis** », *Sens. Actuators A : phys.*, doi:10.1016/j-sna.2010.04.023, 2010.
- C. DALMAY, A. POTHIER, M. CHERAY, F. LALLOUE, M-O. JAUBERTEAU, P. BLONDY : « **On-chip biosensors based on microwave detection for cell scale investigations** », *Communications in Computer and Information Science / Biomedical Engineering Systems and Technologies*, Springer Berlin Heidelberg, pp. 51-63, 2010.
- C. DALMAY, A. POTHIER, M. CHERAY, F. LALLOUE, M-O. JAUBERTEAU, P. BLONDY : « **Label Free RF Biosensors for Human Cell Dielectric Spectroscopy** », *Int. J. Microw. Wireless Technol.*, Vol. 1, pp. 497-504, Dec 2009.

Communications à des congrès internationaux à comité de lecture

- C. DALMAY, A. POTHIER, M. CHERAY, F. LALLOUE, M-O. JAUBERTEAU, P. BLONDY : « **Microwave sensors for stem cell identification and discrimination** », *IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest, IMS 2010*, Session orale WE2D-4, Anaheim, Californie, USA, 23-28 Mai 2010.
- C. DALMAY, M. CHERAY, A. POTHIER, F. LALLOUE, M-O. JAUBERTEAU, P. BLONDY : « **Ultra Sensitive Biosensor Based on Impedance Spectroscopy at Microwave Frequencies for Cell Scale Analysis** », *Eurosensors'09*, Session orale B2L-B, Lausanne, Suisse, 6-9 Septembre 2009.
- C. DALMAY, A. POTHIER, P. BLONDY, M. CHERAY, F. LALLOUE, M-O. JAUBERTEAU : « **RF Biosensor based on Microwave Filter for Biological Cell Characterisation** », *39th European Microwave Conference*, Session orale EuMC03-1, Rome, Italie, 28 septembre-2 octobre 2009.

- C. DALMAY, A. POTHIER, P. BLONDY, F. LALLOUE, M-O. JAUBERTEAU : « **Label free bio sensing method using radio frequencies spectroscopy for cell detection and discrimination** », *Biodevices 2009 : International Conference on Biomedical Electronics and Devices*, Session orale 3, Porto, Portugal, janvier 2009.
- 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 International Microwave Symposium Digest, IMS 2008*, Session orale TH3D-03, Atlanta, Georgie, USA, 15-20 juin 2008.

Communications à des congrès nationaux à comité de lecture

- C. DALMAY, A. POTHIER, P. BLONDY, F. LALLOUE, M-O. JAUBERTEAU : « **Méthode de Bio-détection basée sur la Spectroscopie Diélectrique Cellulaire aux Fréquences Radio et Micro-ondes** », *16èmes Journées Nationales Microondes*, Session Poster : 5F, Grenoble, 27-29 mai 2009.
- C. DALMAY, A. POTHIER, P. BLONDY, F. LALLOUE, M-O. JAUBERTEAU : « **Bio-capteurs pour l'analyse cellulaire aux fréquences radio et micro-ondes** », *10èmes Journées de Caractérisation Microondes et Matériaux*, Session Orale 3 : Capteurs et Bio-matériaux (03-2), Limoges, 2-4 avril 2008.
- C. DALMAY, A. POTHIER, P. BLONDY, F. LALLOUE, M-O. JAUBERTEAU : « **Bio-capteurs pour la caractérisation cellulaire aux fréquences micro-ondes** », *15èmes Journées Nationales Microondes*, Session Poster : 5E, Toulouse, 23-25 mai 2007.

Conception et réalisation de bio-capteurs électromagnétiques pour l'analyse cellulaire aux fréquences micro-ondes

Les récentes avancées en microélectronique ainsi que les importants besoins dans le domaine biomédical suscitent actuellement un vif intérêt pour l'étude de bio-capteurs dont la miniaturisation permet de travailler proche de l'échelle cellulaire. Une analyse rapide et précise de tels éléments biologiques devient alors possible avec une sensibilité accrue. Ainsi, ces travaux de thèse concernent la mise au point de micro bio-capteurs innovants basés sur une méthode de détection électrique, sans marquage, aux fréquences micro ondes. Entre autres, nous démontrons l'intérêt d'utiliser des résonateurs ou filtres micro-ondes planaires comme dispositifs d'étude de cellules uniques et nous développons une méthode de bio-détection originale permettant de discriminer différents types cellulaires en fonction de leur propriétés diélectriques. L'étude de cellules souches cancéreuses est aussi débutée et démontre le fort potentiel des capteurs développés pour les applications de tri cellulaire.

Mots clés : Bio-capteurs, bio-impédance, micro-électronique, spectroscopie diélectrique, résonateurs planaires micro-ondes, cellules biologiques.

Abstract

Conception and realisation of electromagnetic biosensors for cell scale analysis at microwave frequencies

Recent progress in micro technologies and important needs in biomedical field have risen up a great interest in the development of miniaturized biosensors for cell scale analysis. Sensibility of such devices is enhanced allowing one single cell analysis. This work deals with the development of new micro biosensors based on an electronic bio detection method, for label free cell scale analysis using microwave frequencies. The interest in using planar microwave resonators or filters for the analysis is demonstrated. An original bio detection method has been developed allowing analysis at one single cell scale and leading to discriminate different cell types thanks to their own dielectric parameters. Study on cancerous stem cells has been also begun proving the high potential of fabricated biosensors for accurate cell sorting.

Keywords : Biosensors, bioimpédance, microelectronic, dielectric spectroscopy, planar microwave resonators, biological cells.