Thèse de doctorat

Université de Limoges

École Doctorale Sciences et Ingénierie pour l'Information, Mathématiques (ED 521)

Faculté des Sciences et Techniques - XLIM Axe RF-ELITE

Thèse pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Electronique des Hautes Fréquences, Photonique et Systèmes

Présentée et soutenue par

Fatima HJEIJ

Le 5 septembre 2018

Caractérisation diélectrique de cellules biologiques par diélectrophorèse haute fréquence

Thèse dirigée par Annie BESSAUDOU, Claire DALMAY et Arnaud POTHIER

JURY :

Rapporteurs

M. Olivier Français, Professeur, ESYCOM, ESIEE PARIS
M. Philippe Ferrari, Professeur, TIMA, Université de Grenoble Alpes

Examinateurs

M. Dominique Rebière, Professeur, IMS, Université de Bordeaux
M.Cristiano Palego, Senior Lecturer, Université de Bangor
M. Philippe Lévèque, Directeur de Recherche CNRS HDR, XLIM, Université de Limoges
Mme. Annie Bessaudou, Professeur, XLIM, Université de Limoges
Mme. Claire Dalmay, Maitre de Conférence, XLIM, Université de Limoges
M. Arnaud Pothier, Chargé de Recherche CNRS, XLIM, Université de Limoges

Invités

M. Fabrice Lalloué, Professeur, CAPTUR, Université de Limoges
M. David Cordeau, Maitre de Conférence HDR, XLIM, Université de Poitiers

Remerciements

Ce travail de thèse a été effectué à l'Institut de Recherche XLIM, au sein de l'axe RF et Electronique Imprimée pour Télécom et Energie (RF-ELITE).

Je tiens tout d'abord à remercier Monsieur Dominique Baillargeat, directeur d'XLIM, pour m'avoir accueilli dans son laboratoire ainsi qu'au Professeur Pierre Blondy pour m'avoir permis de mener à bien cette thèse au sein de l'axe RF-ELITE.

J'exprime ma profonde gratitude à M. Arnaud Pothier, Chargé de Recherche CNRS, Mme. Claire Dalmay, Maitre de Conférence et Mme. Annie Bessaudou, Professeur, qui ont encadré cette thèse au sein de l'institut de recherche XLIM. J'ai eu un réel plaisir de travailler avec vous tout au long de cette thèse et je vous remercie fortement pour votre disponibilité, vos conseils précieux et avisés ainsi que pour le partage de votre culture scientifique.

J'adresse mes sincères remerciements à M. Olivier Français, Professeur à l'ESYCOM de l'ESIEE PARIS, et à M. Philippe Ferrari, Professeur au laboratoire TIMA de l'Université de Grenoble Alpes, d'avoir accepté de rapporter mes travaux et pour le temps qu'ils ont consacré à la lecture du manuscrit.

J'exprime également ma reconnaissance à M. Dominique Rebière, Professeur au laboratoire IMS de l'Université de Bordeaux, à M. Cristiano Palego, Senior Lecturer à l'Université de Bangor et à M. Philippe Lévèque, Directeur de Recherche CNRS HDR à l'institut de recherche XLIM de l'Université de Limoges, pour leur participation au jury en tant qu'examinateurs.

Je remercie M. Fabrice Lalloué, Professeur au laboratoire CAPTUR de l'Université de Limoges et M. David Cordeau, Maitre de Conférence HDR à l'institut de recherche XLIM de l'Université de Poitiers, qui ont bien voulu participer à ce jury.

Je tiens à remercier le laboratoire CAPTUR de l'Université de Limoges et plus particulièrement Mme. Barbara Bessette et Mme. Gaelle Begaud pour leur aide et leur disponibilité. Nos échanges fructueux nous ont permis de mener à bien ces travaux.

Je remercie également Marie-Laure Guillat, la secrétaire de notre équipe, qui contribue de façon importante au bon déroulement de notre vie au laboratoire.

Je tiens à remercier la Région Limousin pour le financement de cette thèse.

Je ne saurais oublier toute l'équipe du laboratoire ainsi que mes collègues et amis thésards Amine Brixi, Ahmad Hariri, Maxime, Naira, Amani et Thomas. Je vous souhaite un bon courage pour le reste de votre thèse !

Et je ne peux continuer mes remerciements sans parler de mes amis Malak, Hiba, Farah, Fatima, Zahraa, Hassan, Malika, Abed, Ahmad Haidar, Youssef, Mohammad Rammal, Houssam et Oussama.

A Karima, future maman, on a partagé des moments agréables à Limoges et qui seront inoubliables. Je souhaite que cette amitié nous accompagne tout au long de notre chemin.

Pour traverser des moments difficiles il faut qu'on soit bien entouré non pas par des amies mais plutôt par des sœurs. Un grand merci à Maha, Nesrine, Iman, Meissa, Nathalie et Nora. Je souhaite que cette amitié dure pour la vie.

Un merci qui tend vers l'infini à mes très chers parents. Merci papa et maman pour avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui, merci pour votre confiance en moi, merci pour vos encouragements, merci pour tous vos sacrifices pour moi et pour ma famille. Et bien sûr, je voudrais remercier du fond du cœur mes sœurs Nadine, Layal, Zaynab et Maya, et mes frères Ali et Hassan. Je vous souhaite un futur plein de succès et de bonheur. Cela sans oublier ma petite nièce Yara, tu nous as apporté toute joie à notre famille.

Pour finir, un remerciement chaleureux à mon fiancé Ahmad, malgré la distance qui nous sépare, tu n'as jamais cessé de me soutenir et de m'encourager. Ta confiance en moi reste toujours ma source d'espoir ♥ pour continuer !!

Table des matières

Introduction générale 21

Chapitre I. Techniques du tri cellulaire : diélectrophorèse et applications haute fréquence 29

I. Introduction 29

II. Méthodes de caractérisation et de tri cellulaire 30

II.1. Méthodes nécessitant un marquage des cellules 30

II.1.1. Cytométrie en flux 30

II.1.2. *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS) 32

II.2. Méthodes et techniques d'analyse sans marquage cellulaire 34

II.2.1. Techniques optiques : les pinces optiques 34

II.2.2. Méthode de séparation acoustique 35

II.2.3. Fractionnement par couplage flux-force (FFF) 36

II.2.4. Méthode de séparation électrique 37

II.2.4.1. Principe de l'électrorotation 37

III. Principe de la diélectrophorèse 40

III.1. Diélectrophorèse dans le cas d'une particule sphérique homogène 41

III.1.1. Phénomène de polarisation de la particule 41

III.1.2. Force diélectrophorétique 43

III.2. Principes d'électrocinétique appliqués aux cellules biologiques 49

III.2.1. La cellule du point de vue biologique 49

III.2.2. La cellule du point de vue physique 50

III.2.3. Etude de la réponse diélectrophorétique d'une cellule biologique 52

III.2.3.1. Détermination du facteur de Claussius-Mossotti d'une cellule en fonction de la fréquence 52

III.2.3.2. Influence des propriétés diélectriques sur la réponse DEP 59

III.3. Quelques exemples d'application de la diélectrophorèse basse fréquence 68

III.4. Quelques exemples de mise en oeuvre de la DEP en haute fréquence 76

IV. Conclusion 82

Chapitre II. Développement de microsystèmes pour la caractérisation cellulaire par diélectrophorèse Ultra Haute Fréquence 87

I. Introduction 87

II. Différentes géométries d'électrodes pour la caractérisation cellulaire par DEP 91

II.1. Bénéfices d'une implémentation microsystème 91

II.2. Choix de la géométrie des microélectrodes pour la caractérisation DEP-UHF 92

II.3. Etude de différentes géométries d'électrodes 93

III. Méthode de détermination de $fx02$ avec la structure quadripôle 102

IV. Conception du microsystème en technologie CMOS pour la caractérisation DEP haute fréquence d'une cellule individuelle 104

IV.1. Présentation du procédé BiCMOS standard d'IHP 104

IV.2. Développement et optimisation des microélectrodes 3D 106

IV.2.1. Etude de la variation de la distance inter-électrodes 109

IV.2.2. Etude de la variation de l'épaisseur des métallisations 113
IV.2.3. Influence de la fréquence du signal appliqué sur la configuration du champ électrique 118
IV.2.4. Simulations thermiques 119
V. Fabrication du dispositif de caractérisation cellulaire 120
V.1. Procédé de fabrication du dispositif microfluidique à microélectrodes en technologie BiCMOS 120
V.2. Procédé de fabrication du canal microfluidique en PDMS 123
V.2.1. Notions de mécanique des fluides 123
V.2.2. Réalisation de la pièce en PDMS 125
VI. Conclusion 131
Chapitre III. Mise en œuvre expérimentale de la DEP haute fréquence et caractérisation de cellules biologiques 137
I. Introduction 137
II. Banc expérimental pour la caractérisation cellulaire par DEP-UHF 139
II.1. Développement du banc expérimental pour l'application de signaux hautes fréquences sur des cellules en suspension 139
II.2. Protocole d'injection des cellules biologiques et de suivi de leur déplacement .. 141
II.3. Validation du banc expérimental DEP haute fréquence avec des billes de polystyrène 142
III. Caractérisation DEP haute fréquence de cellules biologiques 145
III.1. Protocole de préparation de la suspension cellulaire 148
III.1.1. Préparation du milieu DEP de suspension 148
III.1.2. Préparation des cellules 149
III.1.2.1. Culture des cellules cancéreuses du côlon 150
III.1.2.2. Culture des cellules cancéreuses du système lymphatique 151
III.2. Méthodologie de caractérisation de la seconde fréquence de transition d'une cellule 151
III.3. Résultats expérimentaux de caractérisation cellulaire en DEP haute fréquence 158
III.3.1. Potentiel de discrimination cellulaire par DEP-UHF 159
III.3.1.1. Caractérisation de cellules issues de la lignée BL-41 159
III.3.1.2. Caractérisation de cellules issues de la lignée SW620 162
III.3.2. Etude de la sensibilité de la méthode DEP-UHF 164
III.3.2.1. Caractérisation de cellules issues de la lignée SW480 164
III.3.2.2. Caractérisation de cellules issues de la lignée HCT 116 167
III.4. Analyse des résultats de caractérisations sur les cellules issues des lignées SW620, SW480, HCT 116 et BL-41 170
IV. Conclusion 176
Chapitre IV. Conclusion générale et perspectives des travaux de thèse : vers un premier prototype de cytomètre électromagnétique 181
I. Conception d'un premier prototype de cytomètre électromagnétique 184
I.1. Principe de fonctionnement 184
I.2. Simulations et optimisation du cytomètre électromagnétique 187

II. Validation du principe de fonctionnement du cytomètre électromagnétique 192
II.1. Modification de trajectoire 192
II.2. Séparation de cellules biologiques et de billes de polystyrène 195
Production scientifique 205
Références bibliographiques 209

Table des illustrations

Figure.1 Schéma décrivant la séparation des cellules par la méthode de FACS [8]. 31

Figure. 2 Principe de séparation des cellules par *Magnetic activated cell sorting* [10]. 32

Figure. 3 Principe de fonctionnement des pinces optiques : (a) les forces de diffusion (F_D) dominent les forces de gradient (F_G), la particule est déviée de la source de lumière, (b) F_G domine F_D, la cellule est optiquement piégée dans la zone d'intensité de lumière la plus forte [24]. 35

Figure. 4 Coupe transversale du canal où la séparation des globules rouges et des lipides a lieu sous l'action des forces de radiation acoustique [30]. 36

Figure. 5 Principe de séparation de particules ayant différentes tailles par le fractionnement par couplage flux-force (FFF) [31]. 36

Figure. 6 (a) Un champ électrique rotatif généré par un dispositif à quatre électrodes alimentées par des signaux alternatifs déphasés de 90°, (b) en fonction de l'angle de phase entre le moment dipolaire induit P et le champ, un couple impose à la particule un mouvement de rotation dans le même sens ou en sens inverse au champ [37]. 38

Figure. 7 Spectres de rotation typiques pour les lymphocytes T du sang périphérique humain (Δ), les lymphocytes B (▲), les monocytes (●) et les granulocytes (○) dans une suspension isotonique de saccharose de conductivité 56 mS/m [40]. 39

Figure. 8 Distribution asymétrique des charges électriques sur la surface d'une particule soumise à un champ électrique non uniforme [52]. 41

Figure. 9 (a) Particule plus polarisée que le milieu, le moment dipolaire est aligné avec le champ et les lignes de champ traversent (pénètrent) la particule, (b) particule moins polarisée que le milieu, le moment dipolaire est dans le sens opposé au champ électrique et les lignes de champ contournent la particule [45]..... 43

Figure. 10 (a) Cas d'un champ électrique uniforme : la particule ne subit aucune force, (b) cas d'un champ électrique non uniforme : la particule est soumise à une compétition de forces [56]. 44

Figure. 11. (a) Force de DEP classique créée par la non-uniformité spatiale de l'amplitude du champ électrique appliqué, (b) force de DEP à ondes progressives produite par la non-uniformité spatiale de la phase du champ électrique appliqué [57]. 45

Figure. 12 Les particules dans un champ électrique non uniforme sont soumises à : (a) des forces de DEP positive en se déplaçant vers la région de forte intensité de champ, ou (b) des forces de DEP négative en se déplaçant vers la région de faible intensité de champ [7]. 46

Figure. 13 (a) Schéma d'illustration du mouvement induit pour une particule sphérique dans le cas de la *tw-DEP* [58], (b) principe de séparation des cellules par la *tw-DEP* [59]. 47

Figure. 14 Principe de séparation du fractionnement flux-force diélectrophorétique (DEP-FFF) [64]. 48

Figure. 15 Schéma simplifié d'une cellule eucaryote [65]. 49

Figure. 16 Schéma de la structure de la membrane plasmique [68]..... 50

Figure. 17 Circuit électrique équivalent modélisant une cellule biologique [45]. 51

Figure. 18 Simplification progressive du modèle double couche à une sphère homogène équivalente [78]. 53

Figure. 19 Modélisation de deux sphères A et B consécutives par une simple sphère homogène équivalente. 54

Figure. 20 Réponse diélectrophorétique théorique d'une cellule de lymphocyte vivante avec les paramètres présentés dans le Tableau I-2, en suspension dans un milieu possédant une permittivité εm = 78ε0 F/m et une conductivité σm = 0,02 S/m..... 58

Figure. 21 Effet de la variation de propriétés diélectriques du milieu de suspension sur la réponse diélectrophorétique d'une cellule de lymphocyte vivante. 60

Figure. 22 Impact sur la valeur absolue de $ReK\omega$ de la variation de 10% des valeurs de paramètres diélectriques de la cellule de lymphocyte [77] ayant un rapport nucléocytoplasmique de l'ordre de 0,52, dans un milieu possédant une conductivité de l'ordre de 0,02 S/m..... 61

Figure. 23 Réponse diélectrophorétique théorique d'une cellule de lymphocyte vivante. Effet du changement de la conductivité du milieu de suspension sur les fréquences de transition $fxo1$ et $fxo2$. 62

Figure. 24 Réponse diélectrophorétique théorique d'une cellule de lymphocyte vivante : (a) effet de la variation du rayon de la cellule sur le spectre $ReK\omega$, (b) effet de la variation de la capacité membranaire par unité de surface sur le spectre $ReK\omega$. 63

Figure. 25 Dépendance de la réponse diélectrophorétique théorique d'une cellule de lymphocyte vivante en fonction de ces caractéristiques intracellulaires: (a) la conductivité du cytoplasme, (b) la permittivité du cytoplasme, (c) la conductivité du nucléoplasme, (d) la permittivité du nucléoplasme, (e) la capacité de l'enveloppe nucléaire et (f) le rapport de volume noyau-cytoplasme..... 65

Figure. 26 Réponses diélectrophorétiques théoriques de cellules de lymphocyte et d'ovaire de petits rongeurs, possédant des propriétés diélectriques et paramètres morphologiques différents [77], [86], mises en suspension dans un milieu de conductivité $\sigma m = 0{,}02$ S/m. 67

Figure. 27 (a) Vue de dessus de la capacité interdigitée, (b) séparation de cellules Listeria vivantes et mortes par diélectrophorèse [94]..... 69

Figure. 28 (a) Schéma de principe du dispositif du tri DEP. Mesures expérimentales de la déflexion DEP des cellules HCT116 : (b) en l'absence du champ électrique, les cellules HCT116, HEK293 et E. coli se déplacent en flux dans le canal principal, (c) en présence du champ, les cellules HCT116 ont été déviées vers le canal latéral et les HEK293 et E. coli continuent à se déplacer dans le canal principal [48]. 70

Figure. 29 (a) Vue de dessus du dispositif de caractérisation DEP, (b) cellules réagissant en DEP négative en se déplaçant vers la moitié inférieure du canal, (c) cellules réagissant en DEP

positive en se déplaçant vers la moitié supérieure du canal, (d) spectre de la fréquence de transition pour les quatre stades de cellules malignes MOSE (n=3), (e) spectre de la capacité membranaire spécifique pour les quatre stades de cellules malignes MOSE (n=3) [96]..... 71

Figure. 30 (a) Design du trieur DEP à flux continu. Trajectoires des cellules hMSCs (en rouge) et ostéoblastes (en vert) : (b) en absence du champ électrique, (c) en présence du champ de tension 7,2 V_{pp} à 3 MHz [98]. 73

Figure. 31 (a) Cytomètre DEP large bande, (b) exemples de signatures diélectrophorétiques de cellules d'ovaires d'hamster chinois (CHO) pour différentes fréquences de DEP, (c) spectre de la réponse de DEP des cellules CHO présentant les deux fréquences de transition autour de 400 kHz et 300 MHz [90]. 74

Figure. 32 Paire d'électrodes en configuration U et T pour la manipulation cellulaire par DEP [101]. 76

Figure. 33 Evolution des fréquences de transition $fxo1$ et $fxo2$ en fonction de la conductivité du milieu [101]. 77

Figure. 34 (a) Schéma du système électrique haute fréquence, (b) spectre de $fxo2$ pour les cellules de myélome (n=418) suspendues dans un milieu de DEP possédant une osmolarité 310 mOsm/L et une conductivité 33 mS/m, c) fréquence de transition $fxo2$ moyenne de cellules de myélome suspendues dans des milieux de DEP possédant différentes osmolarités [88]..... 78

Figure. 35 (a) Fréquence de transition de • cellules N^+ et ◦ cellules N^- en fonction du temps, dans un milieu de conductivité 106 ± 1 µS/cm, (b) séparation de cellules microalgues de faible et forte teneur de lipides par la diélectrophorèse haute fréquence [89]. 79

Figure. 36 (a) Schéma du banc expérimental haute fréquence, (b) séparation des cellules de microalgues de faible et forte teneur en lipides sous l'action d'un champ électrique appliqué à 50 MHz pour une tension 30 $V_{pk\text{-}pk}$ [102]..... 80

Figure. 37 (a) Dispositif du tri formé d'une série de plots, (b) comportement diélectrophorétique de cellules de levures à une fréquence 150 MHz [103]. 81

Figure. 38 (a) Schéma illustrant la réponse diélectrophorétique UHF de deux types cellulaires différents (A et B), (b) principe du fonctionnement du cytomètre..... 88

Figure. 39 Diversité de configurations de microélectrodes pour appliquer des signaux de DEP : (a) électrodes parallèles ou interdigitées, (b) électrodes interdigitées à créneaux, (c) électrodes obliques, (d) quadripôle [57]. 93

Figure. 40 (a) et (b) Géométrie de la capacité interdigitée, (c) structure de la capacité interdigitée à créneaux. Distribution du champ électrique, pour une tension 5 V_{pp} à une altitude z = 5 µm, pour les configurations : de capacité interdigitée avec un réseau d'électrodes d'espace interdigitaire (d) 40 µm, (e) 60 µm, et de (f) capacité interdigitée à créneaux. 96

Figure. 41 (a) Configuration des microélectrodes obliques, (b) distribution du champ électrique pour la structure oblique à une altitude z = 5 µm..... 97

Figure. 42 (a) Géométrie du quadripôle. Profil de l'intensité du champ électrique pour la structure à quatre électrodes à une altitude z = 5 µm : (b) dont deux électrodes adjacentes possèdent la même polarité, (c) dont les électrodes à 180° sont mises à la même polarité. 98

Figure. 43 (a) Cellule piégée en DEP négative au milieu des quatre électrodes à 20 kHz, (b) cellule piégée en DEP positive au bord de l'électrode à 10 MHz. 100

Figure. 44 (a) Structure à quatre électrodes fines permettant l'application du signal de DEP. Vue de dessus de la configuration du champ électrique généré aux altitudes : (b) z = 5 µm, (c) z = 13 µm. 101

Figure. 45 Schéma du mouvement de déplacement DEP haute fréquence d'une cellule vivante en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué. 103

Figure. 46 Vue en coupe transversale d'un wafer réalisé à partir du procédé BiCMOS IHP SG25H4 (pas à l'échelle). 104

Figure. 47 Vue en coupe transversale du BEOL du procédé BiCMOS IHP SG25H4 intégrant la partie microfluidique (pas à l'échelle). 106

Figure. 48 Schéma de la structure étudiée par simulation : *x* est la variable de l'espace inter-électrodes pour les deux paires d'électrodes et *y* est la variable de l'épaisseur des quatre électrodes. 107

Figure. 49 Profil de la distribution du champ électrique à une altitude z = 5 µm pour la structure à quatre électrodes de gap : (a) 20 µm, (b) 30 µm. 110

Figure. 50 Configuration du champ électrique généré pour x = 40 µm à une altitude z = 5 µm. 111

Figure. 51 (a) Dispositif de caractérisation cellulaire composé de quatre électrodes fines. Distribution du champ électrique généré par les électrodes aux altitudes : (b) z = 5 µm, (c) z = 15 µm, (d) z = 25 µm. 114

Figure. 52 (a) Dispositif de caractérisation cellulaire composé de quatre électrodes ayant une épaisseur y = 3 µm. Profil du champ électrique généré par la structure aux altitudes : (b) z = 5 µm, (c) z = 15 µm, (d) z = 25 µm. 115

Figure. 53 (a) Dispositif de caractérisation cellulaire composé de quatre électrodes ayant une épaisseur y_{max} = 9 µm. Distribution du champ électrique généré par la structure aux altitudes : (b) z = 5 µm, (c) z = 15 µm, (d) z = 25 µm. 116

Figure. 54 Structure à quatre électrodes épaisses disposées à un angle de 45° par rapport au canal microfluidique. 117

Figure. 55 (a) Structure du quadripôle combinant une paire d'électrodes épaisses et une paire d'électrodes fines. Distribution du champ électrique généré par la structure du quadripôle aux altitudes : (b) z = 5 µm, (c) z = 15 µm, (d) z = 25 µm. 117

Figure. 56 Configuration du champ électrique généré par la structure quadripôle pour différentes valeurs de fréquence du champ électrique appliqué : (a) 50 MHz, (b) 200 MHz, (c) 500 MHz à une altitude z = 5 µm. 119

Figure. 57 Elévation de la température du milieu DEP dans le canal microfluidique, pour différentes conductivités σm, sous l'application d'une tension de 1 V. 120

Figure. 58 Vue en coupe transversale du BEOL du procédé BiCMOS IHP intégrant la partie microfluidique (pas à l'échelle). 121

Figure. 59 Vue en coupe : (a) des électrodes épaisses, (b) des électrodes fines. 121

Figure. 60 (a) Présence de la démétallisation remplie de SiO_2 dans le plan de masse, (b) absence de l'évidement dans le plan de masse. 122

Figure. 61 Photo MEB du quadripôle DEP implémenté dans son canal microfluidique sur une puce BiCMOS d'IHP. 123

Figure. 62 Régime d'écoulement (a) laminaire, (b) turbulent [114]. 124

Figure. 63 Géométrie du canal microfluidique imprimé dans le PDMS. 126

Figure. 64 Etapes de photolithographie pour la définition de l'empreinte du canal. 127

Figure. 65 (a) Exemple du démoulage du PDMS, (b) perçage des trous au niveau des réservoirs [117]. 128

Figure. 66 Vue en coupe du capot en PDMS contenant la partie supérieure du canal microfluidique, aligné au-dessus du canal fabriqué par IHP, au niveau : (a) des électrodes épaisses, (b) des électrodes fines (pas à l'échelle). 129

Figure. 67 Puce d'IHP assemblée avec le PDMS et le support mécanique. 129

Figure. 68 Photo MEB de la structure à quatre électrodes implémentée dans l'empilement BEOL d'une puce BiCMOS d'IHP. 139

Figure. 69 Banc expérimental haute fréquence pour générer des signaux DEP-UHF à des tensions arrivant jusqu'à 18 V_{pp} dans le plan des pointes RF pour des fréquences supérieures à 50 MHz. 140

Figure. 70 Réponse diélectrophorétique théorique d'une bille de polystyrène de diamètre 12 µm, suspendue dans un milieu possédant une permittivité εm = 78ε0 F/m et une conductivité σm = 20 mS/m. 143

Figure. 71 Profil de la distribution du champ électrique généré par la structure à quatre électrodes pour une tension de 2 V_{pp}, à une altitude z = 5 µm dans le canal microfluidique. 144

Figure. 72 Piégeage d'une bille de polystyrène, soumise à un champ électrique non uniforme, au centre des quatre électrodes en DEP négative, pour des fréquences : (a) 100 MHz, (b) 200 MHz, (c) 500 MHz. 145

Figure. 73 Schéma des différents stades tumoraux du cancer colorectal [121]. 146

Figure. 74 Partie réelle de la permittivité relative pour les cellules cancéreuses colorectales de différents stades tumoraux [122]. 147

Figure. 75 Etapes de préparation des cellules cancéreuses du côlon (cellules adhérentes). . 150

Figure. 76 Schéma synoptique de la méthodologie de caractérisation DEP-UHF d'une cellule. 152

Figure. 77 (a) Distribution du champ électrique généré par la structure quadripôle à une altitude z = 15 µm pour une tension 2 V_{pp}, (b) Configuration des forces DEP positives générées par le quadripôle à une altitude z = 15 µm, dans le cas d'une cellule de diamètre 12 µm plus fortement polarisée que son milieu de suspension. 153

Figure. 78 Changement du comportement diélectrophorétique UHF théorique d'une cellule vivante (lymphocyte) en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué (les paramètres des cellules de lymphocytes ont été présentés dans le Tableau I-2). 154

Figure. 79 Piégeage de la cellule en : (a) DEP négative au centre des quatre électrodes à 500 MHz jusqu'à 300 MHz, (b) DEP positive au bord de l'électrode épaisse à 200 MHz. 155

Figure. 80 Basculement de la cellule de la : (a) DEP négative, cellule soumise à un signal RF à 240 MHz, (b) à la DEP positive en appliquant la fréquence 230 MHz. 156

Figure. 81 (a) à (d) Mouvement diélectrophorétique UHF de la cellule lorsque la fréquence du signal RF est balayée entre 240-230 MHz avec un pas de 1 MHz, (e) piégeage de la cellule à nouveau en DEP négative à 500 MHz. La seconde fréquence de transition déterminée vaut 236 MHz. 157

Figure. 82 Comportement diélectrophorétique UHF de la cellule BL-41, sous l'application d'un signal RF à des fréquences comprises entre 500 et 160 MHz. Sa seconde fréquence de transition mesurée se situe entre 161-162 MHz. 159

Figure. 83 Histogrammes représentant les secondes fréquences de transition déterminées pour 52 cellules BL-41. 161

Figure. 84 Transition DEP-UHF de la cellule SW620 de la DEP négative à 240 MHz à la DEP positive à 225 MHz, en passant par la deuxième fréquence de transition comprise entre 226-228 MHz. 162

Figure. 85 Histogrammes représentant les secondes fréquences de transition déterminées pour 50 cellules issues de la lignée SW620, caractérisées par la DEP UHF. 163

Figure. 86 Déplacement diélectrophorétique UHF d'une cellule SW480 basculant de la DEP négative à la DEP positive à travers la fréquence de transition fx02 située entre 189-190 MHz. 165

Figure. 87 Histogrammes des valeurs de secondes fréquences de transition pour différentes cellules SW480 (n = 51). 166

Figure. 88 Trajectoire DEP-UHF d'une cellule HCT 116 se déplaçant de la DEP négative à la DEP positive, en balayant le spectre de fréquence entre 500-94 MHz. La fréquence de transition mesurée est autour de 95 MHz. 168

Figure. 89 Histogrammes des valeurs de secondes fréquences de transition mesurées pour différentes cellules issues de la lignée HCT 116 (n = 8). 169

Figure. 90 Boîtes à moustaches de seconde fréquence de transition caractérisée pour les différentes lignées de cellules cancéreuses colorectales SW620, SW480 et HCT 116. *** significativité calculée par la méthode Mann-Whitney pairwise. 170

Figure. 91 Boîtes à moustaches des fréquences de transition fx02 mesurées pour 52 cellules cancéreuses humaines du système lymphatique issues de la lignée BL-41 et 50 cellules colorectales issues de la lignée SW620. 172

Figure. 92 Boîtes à moustaches des fréquences de transition fx02 mesurées pour 52 cellules BL-41 et 51 cellules SW480. 173

Figure. 93 Schéma du cycle cellulaire [124]. 175

Figure. 94 Schéma illustrant comment exploiter la différence de signatures diélectrophorétiques UHF de deux types cellulaires différents. 184

Figure. 95 Schéma illustrant le gradient de champ électrique à générer sur une section du canal microfluidique, puis à maintenir tout le long de celui-ci. 185

Figure. 96 Schéma illustrant le comportement diélectrophorétique attendu d'une cellule dans différentes positions dans le canal microfluidique ; cellule réagissant en DEP positive : (a) se déplace aux bords des électrodes, (b) subit une déviation progressive du centre du canal vers les bords des électrodes. Cellule réagissant en DEP négative : (c) se déplace au centre du canal, (d) dévie progressivement des bords des électrodes vers le centre du canal. 186

Figure. 97 Distribution du champ électrique à une altitude z = 5 µm, générée par le cytomètre pour des pénétrations des électrodes dans le canal de : (a) 5 µm, (b) 15 µm, (c) 25 µm, (d) 35 µm et (e) 45 µm. 188

Figure. 98 (a) Géométrie du cytomètre électromagnétique, (b) schéma de principe de fonctionnement du cytomètre pour une pénétration des électrodes dans le canal de l'ordre de 25 µm, avec f1 représentant la fréquence du fonctionnement. 190

Figure. 99 Photographie du cytomètre électromagnétique implémenté avec son canal microfluidique sur une puce BiCMOS d'IHP. 191

Figure. 100 (a) Distribution du champ électrique normalisé, généré par le cytomètre dont un seul réseau d'électrodes est polarisé avec un signal RF à 300 MHz pour une tension 4 V_{pp}, (b) superposition d'images montrant le changement progressif de la trajectoire d'une cellule individuelle en flux réagissant en DEP négative, du gradient de champ électrique. 193

Figure. 101 (a) Photographie de la position de cellules SW480 dans le canal réagissant en DEP positive, pénétrant dans le cytomètre au centre du canal. Répartition des cellules SW480 en flux dans le cytomètre : (b) en DEP positive, attirées par les bords des électrodes à 70 MHz inférieure à $fx02$ médiane, (c) en DEP négative, repoussées vers le centre du cytomètre à 290 MHz supérieure à $fx02$ médiane, (d) déplacement des cellules confinées dans la région de faible intensité de champ, avec le flux imposé dans le canal. 194

Figure. 102 (a) et (b) Séparation des cellules SW480 et des billes de polystyrène en flux sous l'action d'un signal RF à 70 MHz ; les cellules et les billes réagissent respectivement en DEP positive et DEP négative, (c) cellules SW480 et billes de polystyrènes soumises à des forces de

DEP négative à 290 MHz, se déplaçant au centre du cytomètre avec le flux imposé dans le canal. 196

Figure. 103 Superposions d'images illustrant le comportement des cellules LN18 en flux, lorsque le cytomètre est polarisé par un signal RF dont la fréquence f1 est de l'ordre de: (a) 300 MHz, (b) 50 MHz, (c) voisine de 116 MHz. (d) Séparation DEP-UHF de cellules LN18 de billes de polystyrène à une fréquence 50 MHz. 198

Figure. 104 Schéma de principe illustrant l'optimisation proposée pour le cytomètre électromagnétique. 200

Table des tableaux

Tableau I-1 Expressions de la partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti d'une cellule dans de différentes gammes de fréquences. 57

Tableau I-2 Paramètres du modèle double couche des cellules de lymphocytes de souris [77]. 58

Tableau II-1 Propriétés des matériaux utilisés pour la simulation électrique de la structure DEP-UHF. 108

Tableau II-2 Distribution du champ électrique à une altitude z = 5 µm pour différentes tensions appliquées, générée par des structures du quadripôle possédant différentes dimensions. 112

Tableau III-1 Caractéristiques des lignées cellulaires à caractériser. 149

Tableau III-2 Synthèse des mesures de seconde fréquence de transition (MHz) des cellules cancéreuses humaines issues de la lignée BL-41. 160

Tableau III-3 Synthèse des mesures de seconde fréquence de transition (MHz) pour la lignée cellulaire SW620. 164

Tableau III-4 Synthèse des mesures de seconde fréquence de transition (MHz) de la lignée de cellules cancéreuses colorectales SW480. 167

Tableau III-5 Synthèse des mesures de seconde fréquence de transition (MHz) de la lignée de cellules cancéreuses du côlon HCT 116. 169

Introduction générale

En biologie, la caractérisation et le tri cellulaire constituent des étapes fondamentales qui font encore actuellement l'objet de recherches scientifiques intenses. Ces thématiques trouvent de nombreuses applications dans le domaine médical aussi bien dans le développement d'outils de diagnostic que dans la mise au point de traitements thérapeutiques. Notamment, ces dernières décennies, des progrès remarquables ont été réalisés dans le domaine du tri cellulaire, aboutissant au développement de méthodes diverses et variées nécessitant ou non le recours à des marqueurs. Notamment, les méthodes de tri optiques, comme la cytométrie en flux, sont aujourd'hui matures et utilisées en routine dans les laboratoires de biologie. Cependant, elles nécessitent le recours à des marqueurs spécifiques se fixant sur les cellules cibles, ce qui peut présenter certains inconvénients comme notamment la modification ou l'altération des propriétés des cellules à analyser et les limitations associées pour des analyses ou des expérimentations ultérieures. De plus, ces méthodes présentent des limitations pour le tri de certains types cellulaires comme dans le cas des cellules souches par exemple, qui présentent un caractère indifférencié et qui sont par conséquent très difficiles à cibler efficacement de par les propriétés génériques des marqueurs actuellement utilisés/disponibles et l'absence de marqueurs spécifiques à ce type de cellules. Cette défaillance au niveau des marqueurs a encouragé le développement de méthodes de caractérisation et de tri alternatives ne nécessitant pas le marquage des cellules, mais investiguant d'autres types d'interaction avec la cellule. En particulier, elles se basent principalement sur les paramètres physiques des cellules, comme par exemple leurs propriétés mécaniques, diélectriques, leur taille, leur densité, leur déformabilité…

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons investigué une méthode de caractérisation et à terme une technique de tri cellulaire basée sur l'interaction des cellules avec des ondes électromagnétiques. Ainsi, l'analyse des propriétés physiques de la cellule est ciblée au travers de la mise en œuvre de la diélectrophorèse Ultra Hautes Fréquences également appelée DEP-UHF. Une telle méthode permet de caractériser et de trier différents types cellulaires, de manière non invasive et sans avoir recours à un marquage, en se basant essentiellement sur leurs propriétés diélectriques intrinsèques. En effet, des cellules en suspension sont des particules polarisables qui sont soumises à des forces de déplacement lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique alternatif non uniforme en amplitude. Le mouvement induit des particules est fortement lié à leurs propriétés diélectriques intrinsèques et notamment celles de leur contenu

cellulaire vis-à-vis des propriétés de leur milieu de suspension. En effet, dans la gamme de fréquence UHF (30 MHz->1 GHz), la membrane cellulaire se comporte comme un court-circuit et devient « transparente », le champ électrique peut alors pénétrer librement à l'intérieur de la cellule pour interagir avec le contenu intracellulaire. Ainsi la méthode de DEP-UHF apparaît très prometteuse, car les propriétés intracellulaires peuvent renseigner sur de nombreux mécanismes biologiques tels que l'apoptose cellulaire (mort cellulaire), la différenciation cellulaire, ou encore sur l'état pathologique d'une cellule (saine vs cancéreuse mais aussi le stade d'agressivité d'une cellule cancéreuse). L'objectif visé au travers de ces travaux de thèse va être de mettre au point un outil de caractérisation de cellules biologiques par DEP-UHF mais aussi d'études du comportement de différents types cellulaires dans la gamme de fréquences UHF pour répondre à la question suivante : peut-on identifier une signature diélectrophorétique UHF spécifique et propre à un type cellulaire donné ? Si oui, les signatures diélectrophorétiques sont-elles suffisamment discriminantes pour permettre d'envisager sur cette base le développement de solutions innovantes de tri cellulaire ?

Ces travaux ont été réalisés en collaboration avec des biologistes du laboratoire d'Homéostasie Cellulaire et Pathologies (EA 3842) de l'Université de Limoges et avec l'Institut *IHP Microelectronics* en Allemagne pour la fabrication des laboratoires sur puce en technologie CMOS que nous avons conçus et utilisés. Le manuscrit se décompose en quatre chapitres.

Le premier chapitre permet de définir le contexte de notre étude. Nous verrons, dans une première partie, les méthodes qui sont actuellement utilisées pour la caractérisation et le tri cellulaire, en présentant leurs avantages et inconvénients, afin de situer les techniques mettant à profit la diélectrophorèse qui fait l'objet de ces travaux de thèse. La seconde partie sera consacrée à détailler le principe de la DEP au travers du cas simple d'une sphère homogène et ensuite en étudiant le cas, plus complexe, d'une cellule biologique. Nous présenterons le modèle simplifié d'une cellule hétérogène à partir de son modèle double couche, qui permet d'accéder à sa réponse diélectrophorétique. Ensuite, l'étude de l'influence des paramètres diélectriques du milieu de suspension et de la cellule sur sa réponse DEP dans la gamme de fréquence 10 kHz-1 GHz sera abordée, pour montrer l'intérêt de travailler dans cette gamme UHF en donnant malgré toutes les contraintes que cela pourra imposer sur la conception du dispositif. Enfin, des applications illustrant la DEP seront présentées. Nous exposerons en particulier quelques travaux réalisés dans le cadre du tri cellulaire par DEP dans la gamme basse fréquence

et nous donnerons l'état de l'art actuel en matière de DEP-UHF afin de mettre en lumière l'originalité de ces travaux de thèse.

Le deuxième chapitre présentera la conception du dispositif de type laboratoire sur puce à microélectrodes dédié à la caractérisation cellulaire par DEP-UHF. Dans la première partie, nous comparerons le gradient de champ électrique généré par différentes géométries de microélectrodes et nous les testerons avec des cellules cancéreuses du côlon dans un premier temps en basse fréquence, pour identifier la structure qui sera adaptée à notre application. Dans la deuxième partie, nous optimiserons la structure à microélectrodes retenue afin de mener des mesures de DEP-UHF à l'échelle d'une cellule individuelle. Elle sera réalisée en technologie *Bipolar Complementary Oxide Semiconductor* (BiCMOS), implémentée sur le procédé BiCMOS d'IHP tout en y intégrant la partie microfluidique. Cette technologie permet la miniaturisation de la structure et nous permettra d'envisager à plus long terme l'intégration des fonctions électroniques et le traitement des données directement sur puce. Puis, nous présenterons la fabrication du microsystème réalisé en collaboration avec *IHP Microelectronics*.

Dans le troisième chapitre, nous présenterons le développement d'un banc expérimental permettant de caractériser les cellules par DEP-UHF. Nous mesurerons différentes lignées de cellules cancéreuses humaines du système lymphatique et du côlon. Nous verrons que les cellules cancéreuses colorectales de différents stades tumoraux présentent des propriétés diélectrophorétiques différentes et nous verrons qu'il existe des différences significatives entre leurs signatures DEP-UHF, permettant de potentiellement les discriminer ainsi.

Le quatrième et dernier chapitre sera dédié aux conclusions générales et perspectives sur les travaux présentés. Notamment sur la base des signatures DEP-UHF collectées, nous proposerons un premier prototype de cytomètre électromagnétique dédié au tri de cellules en flux. Nous présenterons une optimisation de son architecture et les premiers tests de son principe de fonctionnement à partir de mélanges de cellules et de billes de polystyrène en suspension.

Chapitre I

Techniques du tri cellulaire : diélectrophorèse et applications haute fréquence

I. Introduction

Les travaux de cette thèse s'inscrivent dans le cadre de la caractérisation et du tri de cellules biologiques par la méthode de diélectrophorèse aux Ultra Hautes Fréquences (UHF), visant à répondre aux besoins de biologie et certaines applications biomédicales.

Nous allons tout d'abord, à travers ce premier chapitre, présenter différentes méthodes de caractérisation et de tri cellulaire qui ont été développées ou sont actuellement utilisées, en abordant leurs avantages et inconvénients, pour mettre en évidence la méthode qui fera l'objet de nos travaux présentés dans les chapitres suivants.

Dans un second temps, pour bien appréhender le contexte de notre étude, nous détaillerons le principe de la méthode de diélectrophorèse (DEP) en considérant tout d'abord un cas simple d'une sphère homogène et ensuite nous étudierons le cas le plus complexe d'une cellule biologique. Après une présentation succincte des principales caractéristiques biologiques d'une cellule, nous nous intéresserons à la décrire d'un point de vue électrique pour identifier ses principales caractéristiques physiques en fonction de la fréquence. La partie qui suit, présentera le modèle simplifié de la cellule à partir de son modèle de la double couche, qui sera utilisé pour interpréter sa réponse diélectrophorétique. Nous étudierons les paramètres diélectriques qui peuvent influer sur son comportement DEP en basse et haute fréquence, en mettant en lumière l'avantage de travailler aux hautes fréquences et en présentant les contraintes qui confrontent l'utilisation de cette gamme. Finalement, nous donnerons des exemples de la littérature sur les applications de la DEP basse fréquence et nous présenterons les quelques études qui ont été menées jusqu'à aujourd'hui dans le domaine de la DEP haute fréquence, pour mettre en relief l'originalité du travail qui sera présenté dans ce manuscrit.

II. Méthodes de caractérisation et de tri cellulaire

Les méthodes de caractérisation et de tri cellulaire sont classées en deux catégories, en se basant sur la nécessité de marquer ou non les cellules biologiques.

II.1. Méthodes nécessitant un marquage des cellules

Le domaine de caractérisation et de tri cellulaire par marquage est dominé par deux principales méthodes : le FACS *(Fluorescence Activated Cell Sorting)* et le MACS *(Magnetic Activated Cell Sorting)* qui font intervenir respectivement, un marqueur fluorescent ou magnétique.

II.1.1. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique largement répandue dans les laboratoires de biologie pour analyser des cellules dans une population hétérogène en se basant sur le marquage des cellules d'intérêts par des anticorps couplés à des fluorochromes. Dans un cytomètre en flux (Figure.1), les différents types de cellules en suspension sont injectés dans un flux à grande vitesse et ont été au préalablement marqués avec des anticorps spécifiques aux cellules cibles. En utilisant un système de concentration hydrodynamique, les cellules s'alignent au centre du système et par la suite elles passent une par une devant un faisceau laser. Chaque fois qu'une cellule passe dans la zone où le laser est focalisé, elle provoque une diffusion de la lumière. De plus, dans le cas où la cellule irradiée par le laser possède sur sa surface des marqueurs fluorescents, un signal de fluorescence sera émis. La lumière diffusée et le signal de fluorescence sont détectés avec un système de couplage optique-électronique et enregistrés sur un ordinateur. L'intensité de la lumière diffusée fournit des informations sur la taille et la granularité (structure interne) de la cellule et le signal de fluorescence renseigne sur la présence ou non de marqueurs.

Les cytomètres en flux peuvent être équipés d'un module de tri afin de séparer et de dévier les particules analysées dans différents réservoirs de collecte. Cet équipement est connu sous le nom de *Fluorescence activated cell sorting* (FACS) (Figure.1). En effet au moment où la cellule coupe le faisceau laser, un système de vibration provoque le fractionnement du flux en gouttelettes. Ensuite selon le signal fluorescent émis, chaque gouttelette contenant une cellule individuelle est chargée électriquement. En fonction de leur charge, les gouttelettes sont déviées avec un système de déflexion électrostatique vers différents tubes de collecte. Les cellules cibles sont alors séparées des cellules non désirées [1]–[3].

Le FACS est une technique d'analyse et de tri cellulaire performante considérée comme méthode de référence par les biologistes. Elle est capable de séparer en même temps plus de six populations cellulaires différentes [1]. Le tri des cellules se fait avec une précision très élevée (analyse cellule par cellule), cela permet d'obtenir un taux de pureté très important (> 95%) [1], [2]. En plus, cette méthode permet de séparer plus de 70 000 cellules/seconde [4]. Néanmoins, le FACS reste une technique de tri relativement complexe qui comprend trois parties : le système fluidique, le système optique et la partie électronique. Le transport des cellules dans un flux à grande vitesse et la génération des gouttelettes peuvent endommager la viabilité des cellules séparées [5], [6]. De plus, le tri par FACS est une méthode relativement coûteuse en termes de coût à l'achat de l'équipement (typiquement autour de 280 000 euros) mais aussi en termes de coût d'utilisation lorsque l'on doit coupler plusieurs types de marqueurs fluorescents [7].

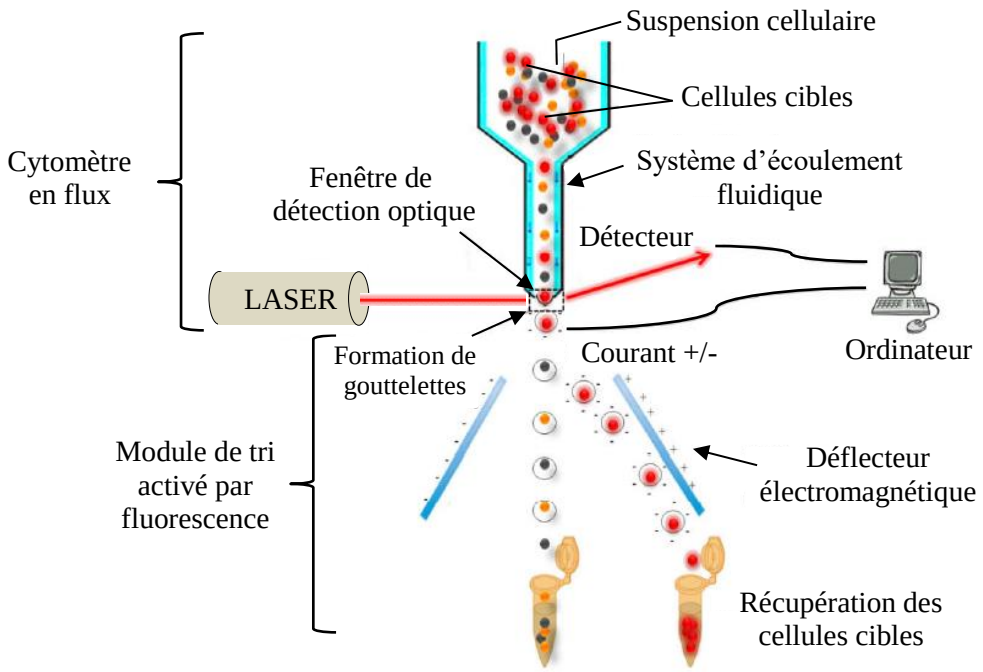


Figure.1 Schéma décrivant la séparation des cellules par la méthode de FACS [8].

Parmi les techniques de tri par marquage reconnues, les méthodes de tri magnétique (MACS) sont également très souvent utilisées. Les cellules sont dans ce cas marquées par des nanoparticules magnétiques comme nous allons le voir dans ce qui suit.

II.1.2. *Magnetic Activated Cell Sorting* (MACS)

La méthode de *Magnetic activated cell sorting* permet le tri et l'isolation des cellules d'une population biologique en utilisant des nanoparticules magnétiques couplées à des anticorps spécifiques. Elle a été développée par Miltenyi en 1989 qui a utilisé une colonne remplie par des particules ferromagnétiques pour accentuer l'efficacité de séparation des particules [9]. Le principe de séparation des cellules est décrit sur la Figure. 2.

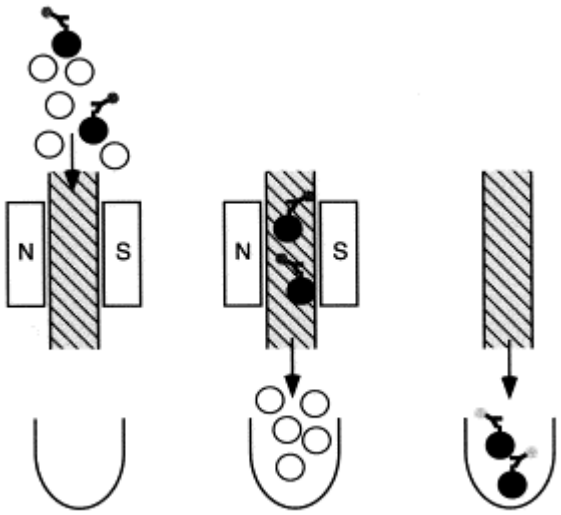


Figure. 2 Principe de séparation des cellules par *Magnetic activated cell sorting* [10].

La population cellulaire en suspension est incubée avec des particules magnétiques de taille nanométrique possédant sur leurs surfaces des anticorps spécifiques aux cellules cibles. Les cellules d'intérêt sont alors marquées par les nanoparticules alors que les autres cellules restent sans étiquette. Comme les nanoparticules possèdent un petit diamètre de l'ordre de 50 nm, il est nécessaire de générer un gradient de champ magnétique intense pour attirer les cellules marquées. Pour cela, une colonne remplie de billes de fer est placée dans un aimant ; les billes de fer concentrent fortement les lignes de champ magnétique de façon à générer une force magnétique importante qui sera appliquée aux particules. Ensuite, la suspension cellulaire est injectée dans la colonne, les cellules accrochées aux particules magnétiques sont retenues par la force magnétique et elles restent alors dans la colonne. Ainsi, les cellules non marquées (également appelées fraction négative) sont éliminées en rinçant la colonne avec une solution tampon. Ensuite en retirant la colonne du champ magnétique externe, les particules ferromagnétiques perdent leur aimantation et les cellules cibles (également appelées fraction positive) sont récupérées par élution en rinçant la colonne avec une solution tampon [11]–[13].

Ce tri magnétique permet de trier 10^{11} cellules/heure et il possède généralement un rendement de pureté d'environ 75% [14]. L'utilisation de cette méthode de tri dépasse aujourd'hui le cadre des laboratoires de recherche, elle est en effet commercialisée et utilisée couramment dans le domaine biomédical [15], [16]. De plus, elle est utilisée pour l'isolation de cellules rares du sang, en particulier dans le cas des *circulating tumor cells* (CTCs) [17], [18]. Néanmoins le système MACS présente l'inconvénient majeur d'avoir un coût non négligeable et il nécessite un certain temps pour la préparation de l'échantillon [5]. En outre l'attachement des particules nanométriques aux cellules peut entraîner la modification du comportement des cellules analysées. Et dans le cas où l'oxyde de fer peut s'échapper des particules magnétiques, une contamination de l'échantillon peut se produire [19].

Ces deux techniques de séparation, le FACS et le MACS, nécessitent toutes deux le recours à des marqueurs spécifiques qui se fixent aux récepteurs cibles de la membrane cellulaire. L'usage des marqueurs présente certains inconvénients notamment en termes de coût d'achat des anticorps marqués et de temps de préparation de l'échantillon, le comportement et les propriétés des cellules marquées peuvent être influencés par le marqueur et les cellules peuvent difficilement être réutilisées après analyse pour des investigations supplémentaires par exemple. En outre, les marqueurs que ce soit des anticorps fluorescent ou des nanoparticules magnétiques peuvent être considérés comme des contaminants qui peuvent interférer avec la prolifération et la différenciation cellulaire [20]–[22]. De plus, l'utilisation de marqueurs dans le cas de certains types cellulaires comme les cellules souches présente des limites. En effet, de par leur phénotype indifférencié, il est difficile de cibler des marqueurs spécifiques pour ces cellules. Par exemple, le CD133, l'un des marqueurs les plus utilisé pour caractériser les cellules souches cancéreuses, a été remis en cause par la communauté scientifique [23]. En effet il se trouve qu'il n'est pas exprimé uniquement par les cellules souches, mais également exprimé par des cellules différenciées. En effet, c'est le cas de nombreux autres marqueurs et notamment des marqueurs que l'on a cru un moment spécifiques et pour lesquels des doutes sont apparues par la suite.

Cette absence de marqueurs spécifiques a encouragé ces dernières années le développement de méthodes de caractérisations et de tri alternatives, où le recours à des marqueurs ne serait plus nécessaire.

Ces techniques dites « *label-free* » sont basées sur l'évaluation de critères physiques comme l'indice de réfraction ou les propriétés diélectriques de la cellule ou encore des critères taille/densité et taille. Nous allons présenter ces méthodes dans la partie suivante en nous focalisant en particulier sur la diélectrophorèse qui fait l'objet de ces travaux de thèse.

II.2. Méthodes et techniques d'analyse sans marquage cellulaire

Il existe une grande variété de méthodes de caractérisation et de tri sans marquage. Elles peuvent être basées sur les propriétés optiques, acoustiques, mécaniques, électriques particulières des cellules… Comme nous allons le voir, leur point commun réside dans le fait que ce sont des propriétés physiques intrinsèques de la cellule qui peuvent ainsi être mises à profit pour interagir sur celle-ci et pour par exemple la mettre en mouvement dans son milieu environnant.

II.2.1. Techniques optiques : les pinces optiques

Une première méthode alternative consiste à manipuler les cellules en utilisant des forces optiques générées par un faisceau laser focalisé. Ce principe bien connu sous le nom de pinces optiques, permet de piéger et de déplacer facilement un grand nombre de type de particules possédant une taille allant de quelques nanomètres à plusieurs micromètres. Il est ainsi possible d'agir et de déplacer des cellules tout comme des particules encore plus petites telles que des molécules et même des atomes [24]–[27]. Pour piéger une particule avec une ou plusieurs pinces optiques, il est nécessaire que l'indice de réfraction de la particule soit suffisamment supérieur à celui de son milieu environnant. Lorsqu'une particule neutre est soumise à un champ lumineux intense, elle subira deux types de forces optiques : une force de gradient et une force de diffusion. La force de gradient résulte de l'interaction entre le dipôle induit optiquement dans la particule et le gradient d'intensité lumineuse, permettant d'attirer les particules vers la région ayant l'intensité de lumière la plus élevée. Tandis que, la force de diffusion ayant la direction de propagation du faisceau, repousse les particules de la source de lumière. Donc pour piéger la particule d'intérêt, les forces de gradient doivent dominer les forces de diffusion pour entraîner un déplacement de la particule dans les 3 dimensions de l'espace au niveau du point focal du faisceau (Figure. 3). Ainsi, la génération de forces de gradient trop élevées nécessite un fort gradient d'intensité lumineuse obtenu par un objectif de microscope de grande ouverture numérique [26]. Cependant, cette technique entraîne le piégeage des cellules dans des zones de forte intensité de lumière ce qui présente l'inconvénient majeur de risquer un échauffement

thermique pouvant provoquer une élévation de température trop importante et aller dans certains cas jusqu'à la mort des cellules biologiques durant leur manipulation [26].

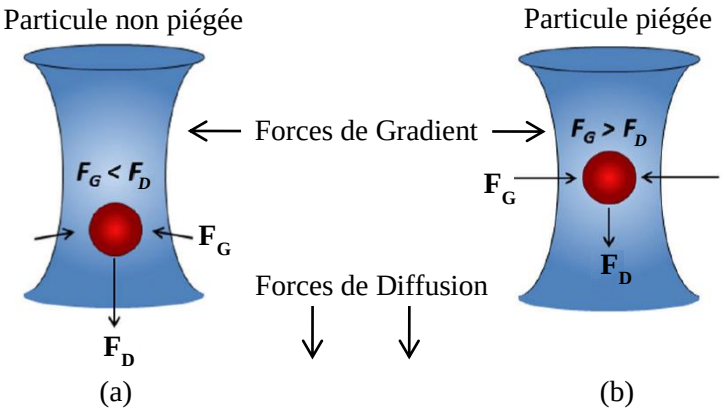


Figure. 3 Principe de fonctionnement des pinces optiques : (a) les forces de diffusion (F_D) dominent les forces de gradient (F_G), la particule est déviée de la source de lumière, (b) F_G domine F_D, la cellule est optiquement piégée dans la zone d'intensité de lumière la plus forte [24].

II.2.2. Méthode de séparation acoustique

La séparation acoustique est une technique non invasive qui utilise des forces de radiation acoustiques pour séparer différents types de particules ou cellules biologiques en se basant spécifiquement sur la taille, la densité et la compressibilité des particules. Dans un canal microfluidique, les particules en flux sont soumises à différentes pressions liées au profil d'écoulement laminaire du flux dans le canal microfluidique et lorsqu'elles sont excitées par des ondes ultrasonores, elles seront exposées à des forces de radiation acoustiques et une onde acoustique stationnaire sera générée dans le canal. A certaines fréquences et en fonction des paramètres physiques des particules en flux, la force acoustique ainsi générée peut alors déplacer les particules soit vers les nœuds de pression de l'onde stationnaire ou vers les antinoeuds de pression de l'onde. Par exemple, Petersson et al. ont réussi à séparer les globules rouges des lipides en utilisant des forces acoustiques qui agissent différemment sur les particules en fonction de leurs différences de densités. Ces forces déplacent ainsi les particules vers différentes régions du canal (Figure. 4). Les globules rouges sont piégés aux nœuds de l'onde stationnaire au centre du canal, alors que les lipides sont collectés aux antinoeuds de l'onde, sur les côtés des parois du canal [28].

Cette technique est par conséquent très attractive. Cependant, il faut savoir que la séparation acoustique possède une faible sensibilité. En effet elle n'est pas capable de séparer des particules ayant de petites différences de taille [29].

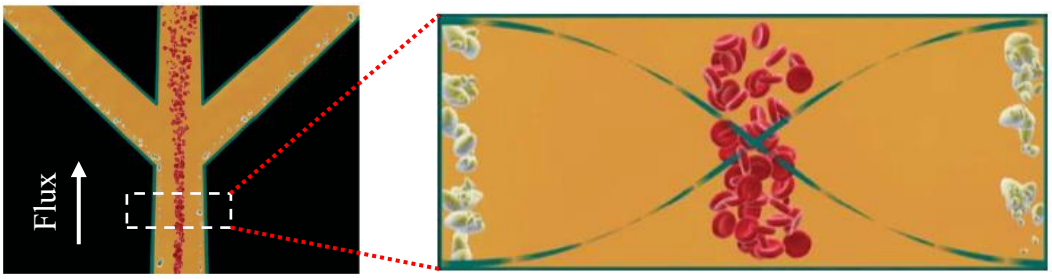


Figure. 4 Coupe transversale du canal où la séparation des globules rouges et des lipides a lieu sous l'action des forces de radiation acoustique [30].

II.2.3. Fractionnement par couplage flux-force (FFF)

Le tri par fractionnement par couplage flux-force (ou *Field Flow Fractionation* en anglais FFF) est une méthode qui permet de séparer des cellules à partir de leurs critères morphologiques : leur taille, leur forme et leur densité. La FFF consiste à combiner la non uniformité du profil d'écoulement du flux avec un champ de force extérieur appliqué perpendiculairement à la direction du flux (Figure. 5).

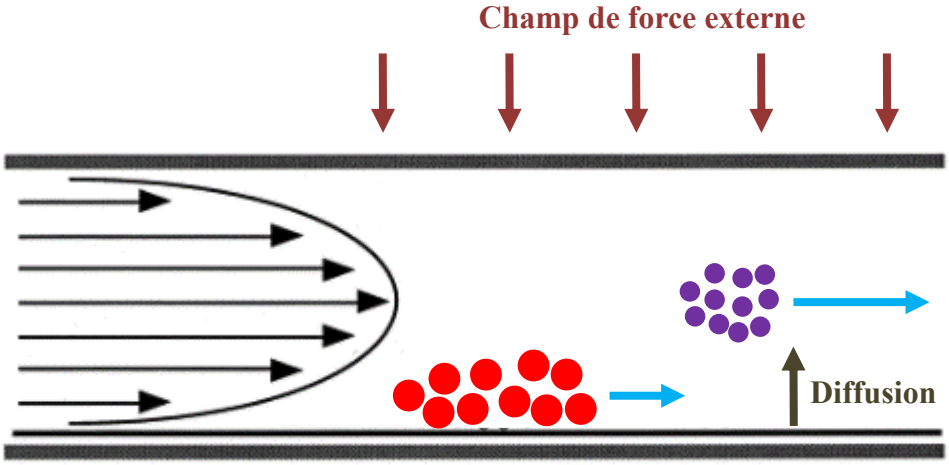


Figure. 5 Principe de séparation de particules ayant différentes tailles par le fractionnement par couplage flux-force (FFF) [31].

L'échantillon composé de la suspension de particules est introduit dans un canal étroit contenant un flux laminaire ayant un profil de vitesse parabolique. La vitesse d'écoulement du fluide est alors beaucoup plus grande au centre du canal qu'à proximité de ses parois supérieures et inférieures (où la vitesse du flux est quasi nulle). Ensuite, un champ de force externe est appliqué perpendiculairement à la direction du flux et il agit sur la position des particules dans le flux en les poussant vers la paroi d'accumulation. En raison d'accumulation des particules

au niveau de la paroi, une force de diffusion se développe et repousse les particules vers le centre du canal. En fonction des différentes caractéristiques des cellules (dans ce cas les particules se diffèrent par la taille), elles se trouvent à différentes altitudes dans le canal. Par conséquent, elles vont ainsi prendre différentes vitesses (Figure. 5). Les larges particules qui se trouvent près de la paroi vont se déplacer plus lentement que les petites particules qui se trouvent loin de la paroi. Ainsi à la sortie du canal, les particules les plus rapides seront les premières sorties, et ainsi de suite. Le tri des particules est donc réalisé en fonction du temps mis par les différentes particules pour parcourir la totalité du canal [32]–[34].

Le champ de force appliqué peut avoir des origines variées et donne naissance à différents types de FFF. Dans le cas où la FFF utilise un gradient thermique on parle alors de *thermal field flow fractionation* (Th-FFF). Si elle utilise un champ hydrodynamique, on parle alors de *flow field flow fractionation* (flow FFF). Si la force utilisée est la force de sédimentation, on parle alors de *sedimentation field flow fractionation* (Sd-FFF) [35]. Dans le cas où le champ est diélectrophorétique, elle est connue sous le nom de *dielectrophoretic field flow fractionation* (DEP-FFF) [36]. Cette dernière sera décrite dans le paragraphe discutant de la diélectrophorèse.

II.2.4. Méthode de séparation électrique

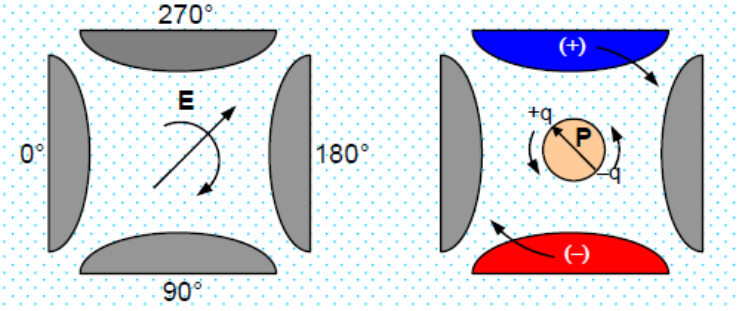
Parmi les méthodes électriques de caractérisation et de tri, on retrouve les techniques d'électrorotation et de diélectrophorèse, qui se basent toutes deux sur des propriétés similaires.

II.2.4.1. Principe de l'électrorotation

L'électrorotation est une méthode électrique, sans contact qui a été largement mise en œuvre pour caractériser des cellules biologiques de manière individuelle. Elle consiste à appliquer un champ électrique alternatif tournant à des particules diélectriques en suspension. Ce champ électrique est généralement produit par une structure à quatre électrodes chacune alimentée par des signaux alternatifs ayant la même amplitude mais déphasés de 90° les uns par rapport aux autres (Figure. 6.a).

Lorsqu'une particule est soumise à un champ tournant, elle se polarise et un moment dipolaire induit au niveau de la particule apparaît pour s'aligner avec le champ rotatif. Un déphasage entre le moment dipolaire et le champ s'établit et provoque la génération d'un couple tendant à aligner le moment sur le champ. Ce couple s'exerce alors sur la particule et entraîne

la rotation de la particule autour d'elle-même soit dans le même sens de rotation (co-champ) du champ ou dans le sens opposé (anti-champ) à celui du champ électrique (Figure. 6.b).



(a) (b)

Figure. 6 (a) Un champ électrique rotatif généré par un dispositif à quatre électrodes alimentées par des signaux alternatifs déphasés de 90°, (b) en fonction de l'angle de phase entre le moment dipolaire induit P et le champ, un couple impose à la particule un mouvement de rotation dans le même sens ou en sens inverse au champ [37].

Le sens de rotation de la particule dépend de plusieurs facteurs : propriétés diélectriques de la particule, propriétés diélectriques du milieu de suspension et de la fréquence du champ électrique appliqué. L'intérêt de cette approche réside dans le fait que les propriétés diélectriques intrinsèques de particules peuvent être extraites en mesurant la vitesse de rotation des particules en fonction de la fréquence du champ appliqué [38], [39].

A titre d'exemple, Yang et al. [40] ont mesuré le spectre de rotation de quatre sous-populations de leucocytes : les lymphocytes B et T, les monocytes et les granulocytes, pour déterminer leurs propriétés diélectriques (la capacité membranaire spécifique, la permittivité et la conductivité du milieu interne de la cellule). En fait, le spectre de rotation (ROT) se réfère à la vitesse de rotation de la cellule en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué. Pour chaque expérience d'électrorotation, 200 ml de suspension cellulaire ont été pipetées et déposées au centre d'un joint torique, et une lamelle a été pressée doucement sur son centre pour former une chambre pleine et bien scellée. Une fois que les cellules sont ainsi déposées dans la chambre d'analyse, une cellule sera sélectionnée pour l'étude, et ensuite elle est amenée au centre de la chambre en utilisant une pince laser. Le champ tournant appliqué à la cellule est généré par quatre électrodes alimentées avec des tensions sinusoïdales de 0,9 V_{rms} en quadrature de phase. Les mesures du spectre ROT pour chaque sous-population cellulaire ont été effectuées sur une plage de fréquence allant de 1 kHz à 120 MHz en

considérant quatre points par décade. La Figure. 7 montre les quatre spectres ROT des quatre sous-populations de leucocytes, où les cellules présentent une rotation anti-champ aux fréquences en-dessous de 6 MHz et une rotation co-champ au-dessus de cette fréquence. Par la suite, une méthode d'optimisation des paramètres de moindres carrés a été utilisée pour extraire des spectres ROT les propriétés diélectriques des cellules en considérant un modèle diélectrique monocouche [41].

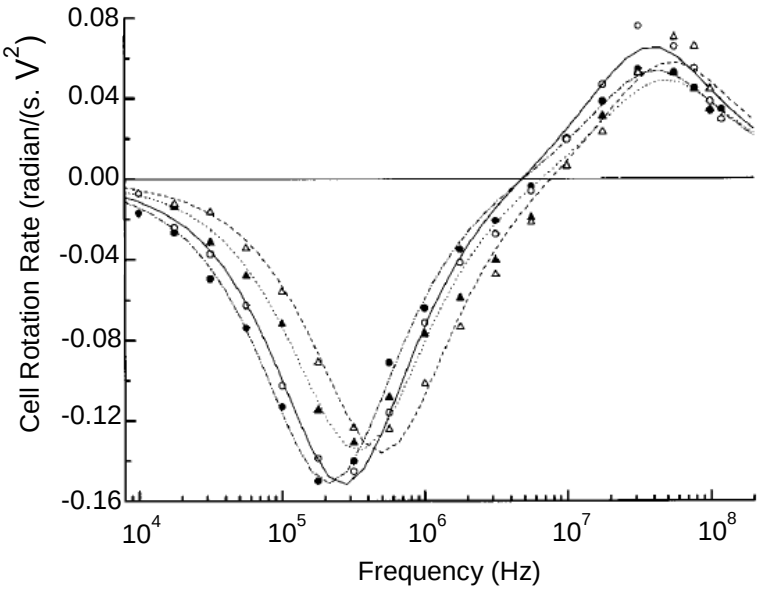


Figure. 7 Spectres de rotation typiques pour les lymphocytes T du sang périphérique humain (Δ), les lymphocytes B (▲), les monocytes (●) et les granulocytes (○) dans une suspension isotonique de saccharose de conductivité 56 mS/m [40].

Cette technique permet d'extraire les propriétés diélectriques internes aux particules et permet de travailler à l'échelle de la particule individuelle [42]. Par contre, elle nécessite des temps d'analyses relativement importants. En effet, les cellules ne peuvent être étudiées qu'une par une et une vitesse de rotation doit être mesurée à chaque pas de fréquence. En effet, Gasperis *et al.* ont utilisé l'électrorotation pour analyser des cellules humaines du leucémie promyélocytaire (HL-60), du cancer de côlon (HT-29) et du cancer de sein métastatique (MDA-MB-435). Ils expliquent que dans leur cas, le temps d'analyse est d'environ 10 min pour caractériser une seule cellule vivante [43]. La durée d'analyse est un facteur majeur et la principale limitation de cette technique. Ce qui explique qu'aujourd'hui elle ne soit pas largement utilisée comme outil de diagnostic.

En revanche, nous allons voir par la suite que la technique de diélectrophorèse (DEP) semble bien adaptée au développement de systèmes de tri cellulaire. C'est pourquoi cette

technique également basée sur une approche de caractérisation électrique de la cellule fait l'objet de ces travaux de thèse.

III. Principe de la diélectrophorèse

La diélectrophorèse **(DEP)** est une technique électrocinétique introduite par Herbert Pohl (1951), en décrivant le mouvement de déplacement de particules électriquement polarisées sous l'action d'un champ électrique non uniforme en amplitude [44]. Ce mouvement induit est relié aux propriétés diélectriques intrinsèques des particules, ce qui constitue un point fort de la technique de DEP pour la manipulation, l'analyse, la caractérisation, ou encore la séparation et le tri de différents types de particules. Et cela sans avoir recours à des marquages immunologiques quelconques ce qui évite les risques de modifier le comportement des particules ciblées [45]–[47]. La DEP permet ainsi de trier des cellules biologiques sans contact, en se basant sur des paramètres physiques de la cellule : sa taille, sa capacité membranaire ou encore ses propriétés diélectriques notamment.

C'est pourquoi, depuis les années 2000, la diélectrophorèse connaît un intérêt croissant et est largement mise à profit dans les domaines de la biologie et de la médecine. Elle est considérée comme une méthode facile à mettre en œuvre, flexible, rapide, et peu coûteuse. Elle permet d'étudier des particules très différentes ayant des tailles pouvant aller du µm au nm, on peut citer comme exemple les cellules humaines (20 µm), les levures (10 µm), les bactéries (1 µm), les virus (100 nm), ou encore l'ADN (2 nm). Ce qui implique que la DEP trouve des applications dans des domaines variés, elle a en effet démontré de fortes potentialités pour la découverte de nouveaux médicaments [45], la détection et la séparation de cellules cancéreuses [48], la séparation de brins d'ADN [49], le tri de globules rouges infectés [50] ou encore la séparation de cellules vivantes et non vivantes [51]. Nous détaillerons certaines de ces applications par la suite.

Dans la partie suivante, nous allons présenter le principe de la méthode de diélectrophorétique en considérant premièrement le cas simple d'une particule sphérique homogène et par la suite nous étudierons le cas d'une cellule biologique. Trois questions peuvent être posées pour la compréhension de cette technique : i) quel est l'impact d'un champ électrique sur une particule diélectrique ? ii) pourquoi utiliser un champ électrique non uniforme ? iii) comment les propriétés diélectriques des particules agissent sur leur comportement lorsqu'elles sont soumises à un gradient de champs électrique alternatif ?

III.1. Diélectrophorèse dans le cas d'une particule sphérique homogène

La diélectrophorèse est une méthode électrique non invasive et sans contact qui génère une force de déplacement des particules polarisables suspendues dans un milieu liquide lorsqu'un champ électrique alternatif non uniforme en amplitude leur est appliqué. Pour expliciter l'origine du mouvement induit, il est nécessaire de comprendre le phénomène de polarisation de la particule lorsqu'elle est soumise à un champ électrique.

III.1.1. Phénomène de polarisation de la particule

Lorsqu'une particule diélectrique en suspension est soumise à un champ électrique, une redistribution de charges intervient aux interfaces entre la particule et son milieu de suspension. La redistribution de charges asymétrique au niveau de la particule, conduit en fait à sa polarisation (Figure. 8).

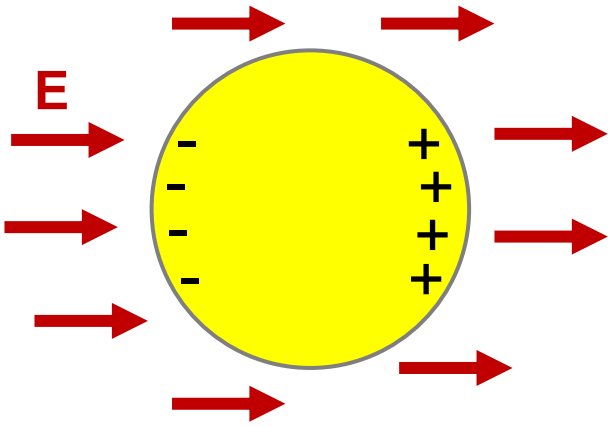


Figure. 8 Distribution asymétrique des charges électriques sur la surface d'une particule soumise à un champ électrique non uniforme [52].

Or cette polarisation peut varier en fonction des propriétés diélectriques de la particule. Ces propriétés sont en effet caractérisées par :

- la permittivité qui se définit par la polarisabilité du matériau en accumulant des charges en réponse au champ électrique appliqué.
- la conductivité qui se définit par la capacité de circulation des charges mobiles dans un matériau sous l'application d'un champ électrique.

De plus, cette distribution non uniforme de charges a pour conséquence l'apparition d'un moment dipolaire induit ayant la direction du champ électrique [53]–[55]. La particule se comporte alors comme un dipôle électrique.

Si l'on considère le cas d'une particule sphérique homogène exposée à un champ électrique $\vec{E}$, le moment dipolaire induit se définit par l'équation (I-1) :

$$\vec{m} = 4\pi\varepsilon_0\varepsilon_{r(m)}r^3\,K(\omega)\,\vec{E} \qquad \text{(I-1)}$$

où

$\varepsilon_0\varepsilon_{r(m)}$: permittivité diélectrique absolue du milieu de suspension.

ε_0 : permittivité du vide de valeur 8,854 × 10^{-12} F/m.

$\varepsilon_{r(m)}$: permittivité relative (constante diélectrique) du milieu de suspension.

r : rayon de la particule.

ω : fréquence angulaire du champ électrique appliqué ($\omega=2\pi f$).

$K(\omega)$: facteur de Claussius-Mossotti.

Le facteur de Claussius-Mossotti, qui décrit la polarisation de la particule par rapport à son milieu d'immersion, se définit par l'équation (I-2) :

$$K(\omega) = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \qquad \text{(I-2)}$$

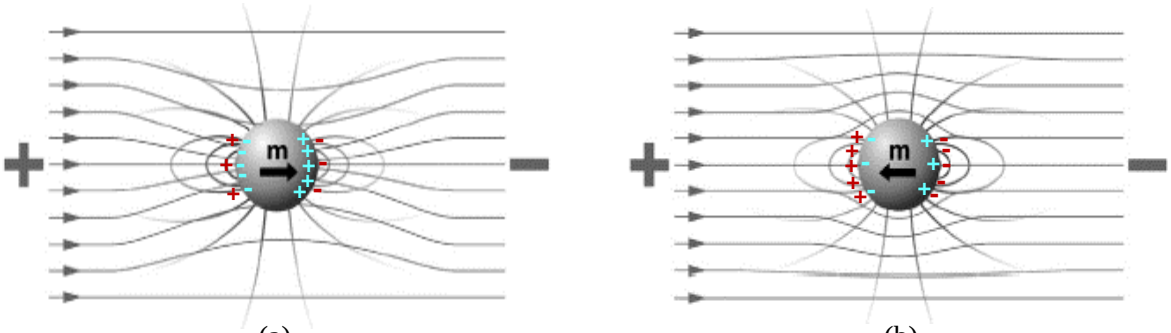
où ε_p^* et ε_m^* représentent respectivement les permittivités complexes de la particule et du milieu. Les permittivités complexes sont définies par l'équation (I-3), avec $\varepsilon_0\varepsilon_{r(x)}$ et σ_x les permittivités diélectriques absolues et les conductivités réelles de la particule et du milieu de suspension :

$$\varepsilon_x^* = \varepsilon_0\varepsilon_{r(x)} - j\frac{\sigma_x}{\omega} \qquad \text{(I-3)}$$

Ainsi le signe de $K(\omega)$ détermine le sens du moment dipolaire induit. Lorsque $K(\omega)$ est positif autrement dit la particule est plus polarisée que le milieu, le moment dipolaire $\vec{m}$ est aligné dans le même sens du champ électrique (équation (I-1)) (Figure. 9.a). Cependant pour

des valeurs négatives de $K(\omega)$, $\vec{m}$ est dans le sens opposé au champ électrique ($\varepsilon_p^* < \varepsilon_m^*$) (Figure. 9.b). Dans le cas où $K(\omega)$ est nul, les propriétés diélectriques de la particule sont égales à celles du milieu environnant, la particule en suspension ne sera pas affectée par le champ électrique et ne sera pas polarisée électriquement ($\vec{m} = \vec{0}$) [45].

Par conséquent, ce facteur permet de prédire la polarisabilité de la particule par rapport à son milieu d'immersion. Dans la mesure où il permet de prédire le comportement de la particule soumise au champ électrique, ce facteur a une importance primordiale et nous verrons par la suite qu'il permet d'établir la signature diélectrophorétique de la particule.



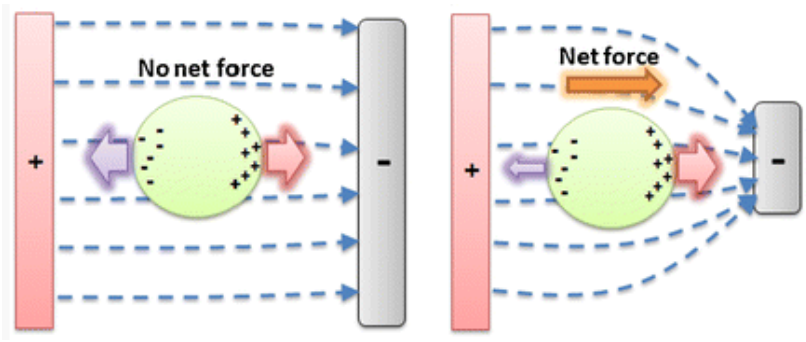
(a) (b)

Figure. 9 (a) Particule plus polarisée que le milieu, le moment dipolaire est aligné avec le champ et les lignes de champ traversent (pénètrent) la particule, (b) particule moins polarisée que le milieu, le moment dipolaire est dans le sens opposé au champ électrique et les lignes de champ contournent la particule [45].

III.1.2. Force diélectrophorétique

Avant d'introduire la force diélectrophorétique, nous allons présenter l'utilité de travailler avec un champ électrique non uniforme. En effet une particule polarisée par l'application d'un champ électrique uniforme, sera soumise à des forces opposées ayant la même intensité. Par suite la résultante de forces équivaut à zéro et la particule ne subit aucun déplacement (Figure. 10.a). Cependant sous l'action d'un champ électrique non uniforme, un mouvement de translation de la particule est induit car elle sera soumise à des forces déséquilibrées qui sont appliquées d'un côté ou de l'autre de la particule (Figure. 10.b).

Dans ce cadre, nous nous intéressons plus particulièrement à l'utilisation d'un champ électrique alternatif non uniforme pour générer ces forces de déplacement diélectrophorétiques [25], [55].



(a) (b)

Figure. 10 (a) Cas d'un champ électrique uniforme : la particule ne subit aucune force, (b) cas d'un champ électrique non uniforme : la particule est soumise à une compétition de forces [56].

L'interaction entre le moment dipolaire induit $\vec{m}$ et le champ électrique alternatif non uniforme $\vec{E}$ appliqué à la particule, se traduit par la création d'une force diélectrophorétique. La moyenne de la force de DEP est définie par l'équation (I-4) [57] :

$$< \vec{F} > = < \vec{F}_{DEP} >_{classique} + < \vec{F}_{DEP} >_{\text{à ondes progressives}} \qquad \text{(I-4)}$$

$$= 2\pi\varepsilon_0\varepsilon_{r(m)}r^3 Re[K(\omega)]\vec{\nabla}E_{rms}^2 + 4\pi\varepsilon_0\varepsilon_{r(m)}r^3 Im[K(\omega)]\sum_{x,y,z} E_{rms}^2\,\vec{\nabla}\varphi$$

avec

$Re[K(\omega)]$ et $Im[K(\omega)]$ sont respectivement la partie réelle et la partie imaginaire du facteur de Claussius-Mossotti complexe $K(\omega)$ (équation (I-2)).

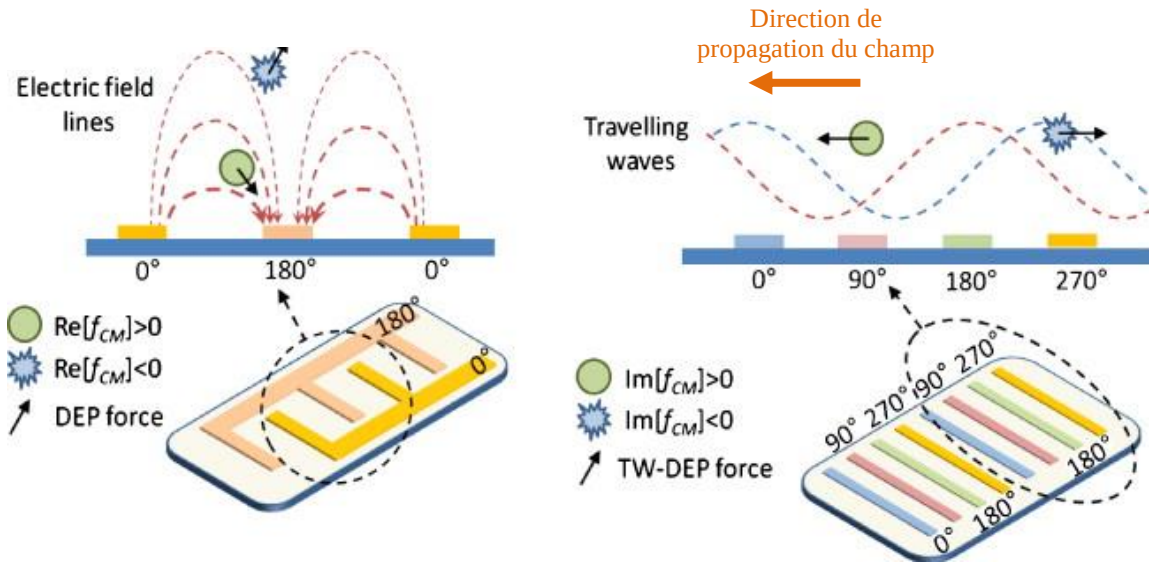
E_{rms} est la valeur efficace du champ électrique appliqué *(rms : root mean square)* et donc $\vec{\nabla}E_{rms}^2$ représente le gradient du carré du champ électrique appliqué.

φ est la phase du champ électrique appliqué.

L'équation (I-4) représentant la moyenne de la force diélectrophorétique est composée de de deux forces de DEP indépendantes :

- La force de DEP classique qui est proportionnelle uniquement à la partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti $Re[K(\omega)]$ et à la non-uniformité en amplitude du champ électrique appliqué $\vec{\nabla}E_{rms}^2$. Dans ce cas, le gradient de la phase du champ électrique est nul ($\vec{\nabla}\varphi = \vec{0}$). En fait, cette force de DEP classique permet de diriger les particules

respectivement vers les zones de maximum ou de minimum d'intensité de champ électrique, selon le signe de $Re[K(\omega)]$ qu'il soit positif ou négatif (Figure. 11.a) [55], [57].



(a) (b)

Figure. 11. (a) Force de DEP classique créée par la non-uniformité spatiale de l'amplitude du champ électrique appliqué, (b) force de DEP à ondes progressives produite par la non-uniformité spatiale de la phase du champ électrique appliqué [57].

- La force de DEP à ondes progressives (autrement dit *traveling wave dielectrophoresis tw-DEP*), dépend uniquement de $Im[K(\omega)]$ et de la non-uniformité spatiale de la phase du champ électrique $\vec{\nabla}\varphi$. Cette force permet de transporter les cellules dans la direction de propagation du champ ; soit dans le même sens du champ électrique propageant lorsque $Im[K(\omega)] > 0$ ou dans le sens opposé au champ $(Im[K(\omega)] < 0)$ (Figure. 11.b).

Dans ce contexte, comme l'objectif de notre étude est de trier différents types de cellules, il sera intéressant de séparer les cellules en les dirigeant vers différentes régions d'intensité de champ. Ainsi, pour notre étude, nous restreindrons la non-uniformité du champ à une variation d'amplitude uniquement. La force de DEP se résume dans ce cas à l'équation (I-5) :

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi\varepsilon_0\varepsilon_{r(m)}r^3 Re[K(\omega)]\vec{\nabla}E^2 \qquad \text{(I-5)}$$

L'équation (I-5) montre que la force de DEP dépend de quatre paramètres principaux et elle met en évidence les caractéristiques importantes du principe de DEP :

- F_{DEP} dépend fortement du volume de la particule (r^3).
- F_{DEP} est proportionnelle à l'intensité du gradient du carré de champ électrique. Cela implique que la force de DEP ne dépend pas de la polarité du champ et que l'action de la diélectrophorèse est associée uniquement aux champs électriques non uniformes (dans le cas où le champ est uniforme $\vec{\nabla}E = \vec{0}$ et par suite la force devient nulle).
- F_{DEP} dépend particulièrement des propriétés diélectriques de la particule et du milieu de suspension, à travers $Re[K(\omega)]$.
- F_{DEP} dépend de la fréquence du champ électrique appliqué. Cette dépendance fréquentielle sera détaillée dans la partie suivante.

Par conséquence, l'orientation de la force de DEP est imposée par le signe de la partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti. En fait, $Re[K(\omega)]$ est comprise entre -0.5 et +1. F_{DEP} peut donc entraîner le déplacement des particules dans deux sens opposés (Figure. 12) :

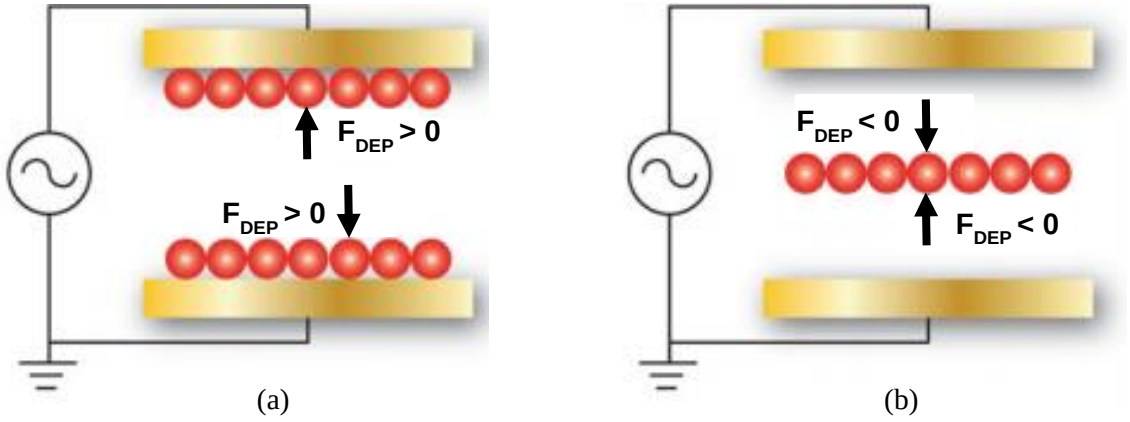


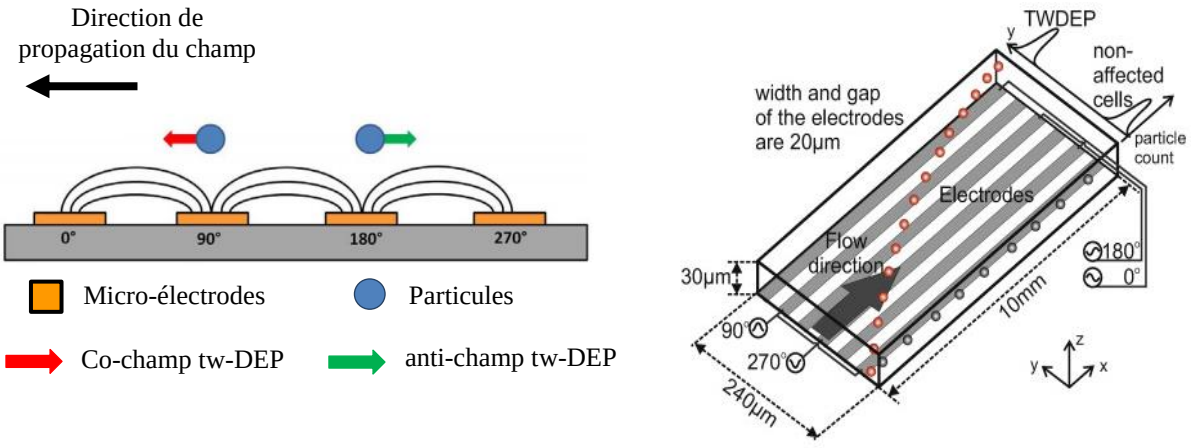
Figure. 12 Les particules dans un champ électrique non uniforme sont soumises à : (a) des forces de DEP positive en se déplaçant vers la région de forte intensité de champ, ou (b) des forces de DEP négative en se déplaçant vers la région de faible intensité de champ [7].

1. $Re[K(\omega)] > 0$, dans ce cas les forces de DEP sont nommées forces de DEP positive. Elles déplacent les particules vers les régions de forte intensité de champ. En d'autres termes, elles seront collectées aux bords des électrodes dans l'exemple donné par la Figure. 12.a.

2. $Re[K(\omega)] < 0$, les particules seront repoussées des électrodes vers les régions où l'intensité du gradient de champ est minimale. Dans ce cas, on parle de forces de DEP négative (Figure. 12.b) [53], [55].

En dehors des principes de DEP classique, il existe des méthodes qui en dérivent. On peut notamment citer la DEP à ondes progressives (ou *traveling wave dielectrophoresis tw-DEP*) comme nous l'avons déjà présenté, et la séparation par fractionnement flux-force diélectrophorétique (DEP-FFF).

- Le tri cellulaire par la DEP à ondes progressives se fait essentiellement sur la base de deux principaux critères : la taille des particules ou la différence entre les propriétés diélectriques des particules et du milieu d'immersion. La DEP à ondes progressives est basée sur le même principe que l'électrorotation c'est-à-dire sur l'application de signaux alternatifs déphasés de 90°. Mais dans le cas de la *tw-DEP*, les électrodes sont parallèles entre elles (Figure. 13.a). Cet arrangement combiné à la polarisation des électrodes permet de générer un champ électrique qui se propage le long des électrodes.



(a) (b)

Figure. 13 (a) Schéma d'illustration du mouvement induit pour une particule sphérique dans le cas de la *tw-DEP* [58], (b) principe de séparation des cellules par la *tw-DEP* [59].

Ainsi, au moment où une particule diélectrique est soumise à l'onde propageante, elle subira une force qui la transporte dans la direction de propagation de l'onde ou dans le sens opposé de celle-ci en fonction des propriétés diélectriques des particules par rapport à celles du milieu de suspension. Dans ce cas, des cellules différentes qui possèdent des propriétés diélectriques

différentes peuvent alors être séparées car elles ne réagiront pas de la même façon à l'onde propageante [59], [60]. La Figure. 13.b explique le principe de séparation des cellules différentes par la *tw-DEP*. Les particules oranges possèdent des propriétés diélectriques plus grandes que celles des particules grises. Ainsi, sous l'action d'un champ électrique non uniforme en phase, les particules oranges sont repoussées vers le côté gauche du canal par des forces de *tw-DEP*, par contre les particules grises restent dans le côté droit du canal car elles ne sont sujettes qu'à des forces faibles [59].

- Le fractionnement flux-force diélectrophorétique (DEP-FFF) consiste quant à lui à générer un gradient de champ électrique par des électrodes placées au fond d'un canal microfluidique. Les particules seront soumises à des forces de DEP négative qui rentrent en compétition avec les forces de sédimentation (Figure. 14). Elles seront repoussées alors à différentes altitudes dans le canal en fonction de leur densité et de leurs propriétés diélectriques. Comme le flux imposé dans le canal est laminaire avec un profil de vitesse parabolique (Figure. 14), les cellules qui se trouvent donc au centre du canal (position h_{eq2}) se déplacent plus rapidement que celles proches du bord du canal (position h_{eq1}) ($v_1 < v_2$) et par suite elles seront séparées [61]–[63].

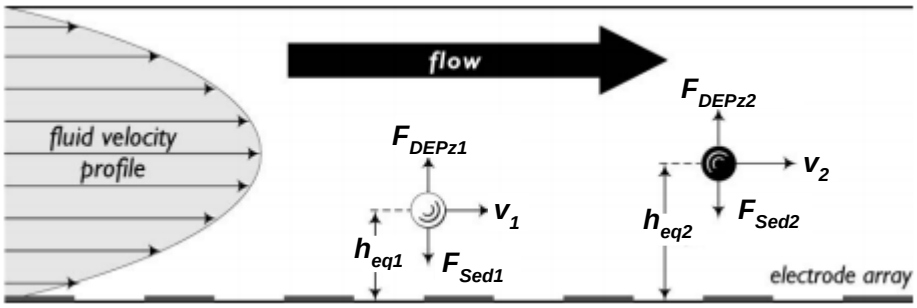


Figure. 14 Principe de séparation du fractionnement flux-force diélectrophorétique (DEP-FFF) [64].

Dans la suite, nous allons présenter le principe de la diélectrophorèse dans le cas d'une cellule biologique, tout en introduisant la cellule d'une manière biologique. Nous nous intéresserons après à décrire la cellule d'un point de vue physique pour identifier ses principales caractéristiques physiques en fonction de la fréquence du signal électrique appliqué.

III.2. Principes d'électrocinétique appliqués aux cellules biologiques

III.2.1. La cellule du point de vue biologique

La cellule, dérivée du mot latin *cellula* qui signifie « petite chambre », est l'unité structurale et fonctionnelle de base constituant toute partie d'un être vivant. Les cellules en général possèdent une taille et une morphologie variées, cependant la cellule présente une structure universelle définie par une membrane plasmique qui délimite l'intérieur de celle-ci, connu sous le nom du cytoplasme, du milieu extracellulaire. Les cellules sont classifiées en deux catégories : les cellules procaryotes et eucaryotes, et cela repose sur la présence ou l'absence d'un noyau au sein de celles-ci. En effet les cellules procaryotes sont dépourvues de noyau comme par exemple les bactéries. Elles sont composées d'une membrane plasmique et d'un cytoplasme dans lequel baigne l'ADN qui porte l'information génétique. Par contre, les cellules eucaryotes comportent un noyau contenant le nucléoplasme, dans lequel baigne le matériel génétique, entouré par une enveloppe nucléaire qui isole son contenu du cytoplasme. Dans notre étude, nous allons nous focaliser sur les cellules eucaryotes car ce sont les cellules que l'on retrouve chez l'être humain (Figure. 15). En effet, l'association de ces cellules donne naissance aux tissus qui à leur tour associés entre eux forment les différents organes du corps humain.

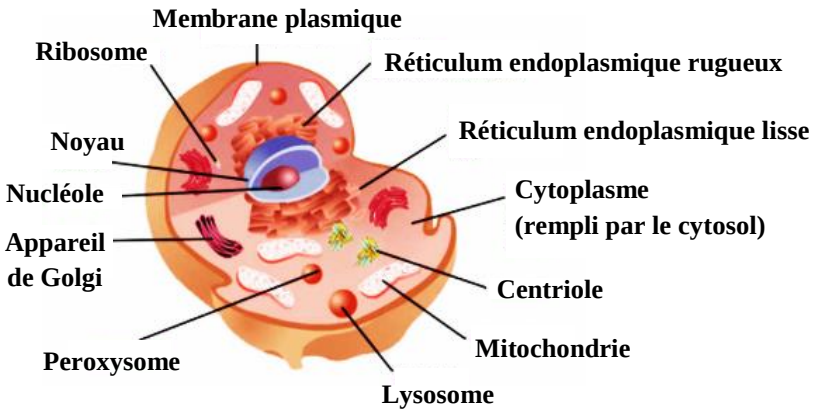


Figure. 15 Schéma simplifié d'une cellule eucaryote [65].

Les cellules eucaryotes possèdent un diamètre qui varie en moyenne entre 10 et 100 µm. Le cytoplasme est un milieu aqueux, composé de 85% d'eau. Il contient de nombreux organites en suspension tels que les mitochondries, les ribosomes, l'appareil de Golgi, le réticulum endoplasmique… Chaque compartiment possède une fonction biologique particulière qui assure le maintien et le bon fonctionnement de la cellule [66]. Le cytoplasme est délimité du

milieu extracellulaire par la membrane plasmique qui est composée d'une bicouche phospholipidique ayant une épaisseur de l'ordre de 5 à 7 nm, selon le type de la cellule.

Cette double couche renferme des protéines qui confèrent à la membrane des fonctions spécifiques (Figure. 16). Elles jouent le rôle de filtre sélectif en permettant un transport régulé des molécules spécifiques, du gaz et des ions entre le milieu extracellulaire et intracellulaire à travers des canaux dédiés, ce qui contribue à effectuer des échanges transmembranaires entre les deux milieux et ainsi assurer la survie de la cellule. D'autre part, les lipides constituant la bicouche agissent comme une barrière imperméable et isolante, ils empêchent le passage de la plupart des molécules hydrosolubles. Cette membrane a un rôle primordial dans la survie de la cellule et elle représente une protection de la cellule [67].

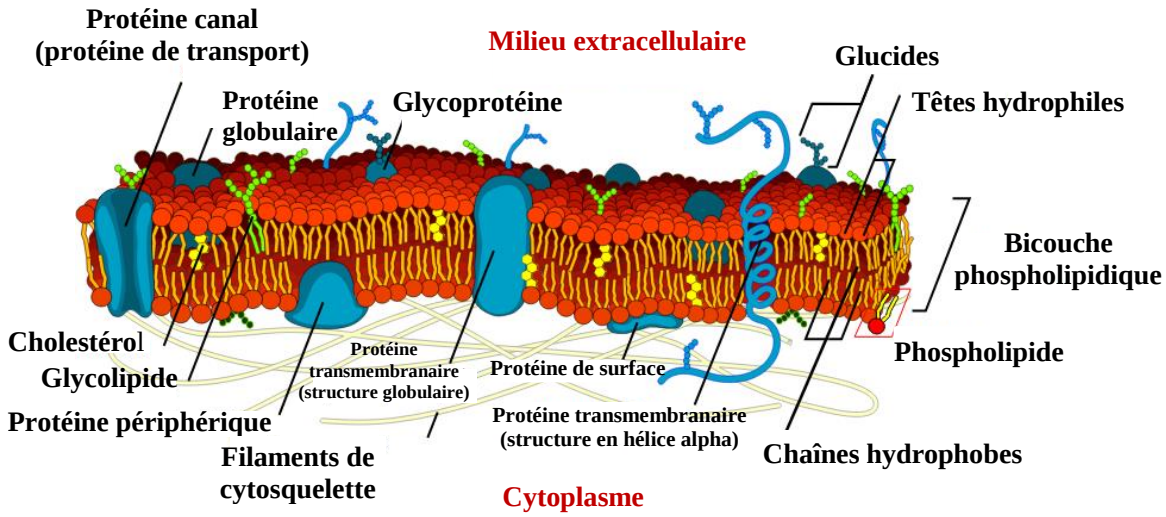


Figure. 16 Schéma de la structure de la membrane plasmique [68].

Pour bien appréhender l'influence du champ électrique sur la cellule et pour comprendre les phénomènes liés à l'interaction entre les deux, il est intéressant de modéliser la cellule d'un point de vue électrique et de définir les paramètres de ce modèle par ses paramètres diélectriques de façon à mieux appréhender ses propriétés électriques.

III.2.2. La cellule du point de vue physique

Dans l'objectif de prédire le comportement diélectrique des cellules biologiques lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique, il est important de modéliser électriquement les deux principaux compartiments de la cellule : la membrane plasmique et le milieu intracellulaire (le cytoplasme). En effet, la présence de la membrane cellulaire a été démontrée

pour la première fois par Höber entre 1910 et 1913, en étudiant la variation de la résistivité des érythrocytes (globules rouges) et des tissus de muscle aux basses et hautes fréquences. Il a prouvé qu'en basse fréquence ~ 150 Hz, la résistivité des érythrocytes et du tissu de muscle est plus élevée que celle mesurée en haute fréquence ~ 5 MHz. Cela a été justifié par le fait qu'en basse fréquence le courant circule autour de la cellule. Cependant en haute fréquence le courant pénètre dans la cellule où le milieu intracellulaire est conducteur. Ainsi, après une série d'expériences purement électriques, Höber a prouvé l'existence d'une membrane diélectrique résistive qui contourne un milieu conducteur interne [69]–[71]. D'autre part, comme la membrane est située entre deux milieux : le milieu extracellulaire et le milieu intracellulaire considérés comme des électrolytes, elle peut se comporter comme une capacité. Fricke a été le premier à déterminer la valeur de la capacité membranaire d'une cellule, dans le cas des cellules érythrocytes [72].

Ainsi, la cellule peut se modéliser par le circuit électrique équivalent illustré sur la Figure. 17.

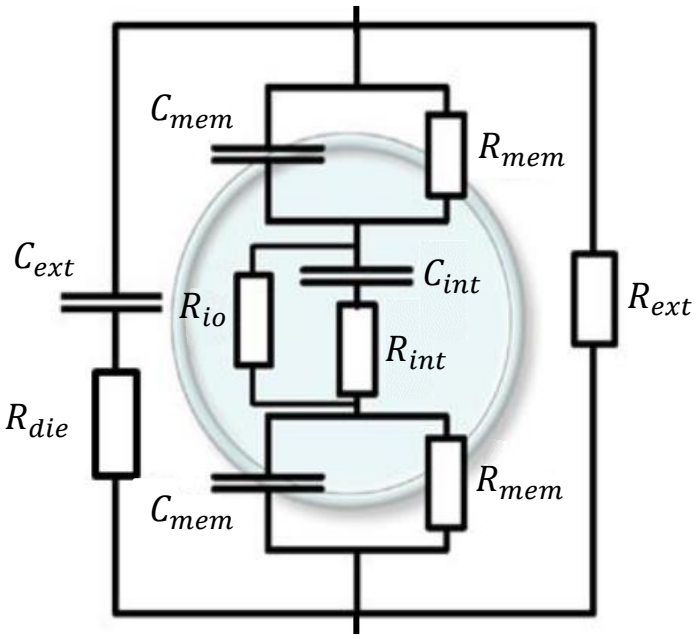


Figure. 17 Circuit électrique équivalent modélisant une cellule biologique [45].

Dans ce modèle, la membrane cellulaire est assimilée à une capacité C_{mem} combinée en parallèle avec une résistance R_{mem} qui est peu à peu court-circuitée par l'effet capacitif de C_{mem} lorsque la fréquence augmente. En revanche, en basse fréquence, cette capacité se comporte comme un circuit ouvert, et la résistance modélise le comportement résistif des canaux ioniques de la membrane permettant la circulation d'espèces ioniques du milieu

extracellulaire vers le milieu intracellulaire et inversement. D'autre part, l'association série de R_{int} et C_{int} reflète l'influence du milieu intracellulaire aux hautes fréquences, tandis qu'aux basses fréquences le milieu est dominé par la conductivité ionique du cytoplasme modélisée par R_{io}. Pour le milieu extérieur, il est ici représenté par une résistance R_{ext} associée en parallèle avec une capacité C_{ext} qui est associée en série avec une résistance R_{die}. Cette dernière représente les pertes diélectriques du milieu [73].

Ce modèle est particulièrement intéressant, car il prend en compte la dépendance des propriétés électriques de la cellule en fonction de la fréquence du signal auquel elle peut être exposée. Ainsi lorsque les fréquences de travail dépassent typiquement les 50 MHz, la membrane cellulaire est court-circuitée et devient transparente de sorte que le champ électrique peut interagir directement avec le contenu intracellulaire, où cette interaction fournit alors des informations liées aux spécificités physiques intracellulaires. L'utilisation des hautes fréquences apparaît très prometteuse car les propriétés intracellulaires sont corrélées à des propriétés biologiques ou à des mécanismes physiologiques comme l'apoptose cellulaire (mort cellulaire) [74], la différenciation cellulaire [75], ou encore l'état pathologique de la cellule [76]… Ainsi l'objectif principal de ces travaux de thèse va être d'exploiter cette gamme de fréquence pour démontrer la faisabilité d'analyser des cellules biologiques en utilisant des signaux de DEP Ultra Haute Fréquence (DEP-UHF) (50 MHz à 600 MHz).

III.2.3. Etude de la réponse diélectrophorétique d'une cellule biologique

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe précèdent sur le principe général de la DEP, le facteur de Claussius-Mossoti est très important car il permet de prédire le comportement de la particule soumise au champ électrique. Il sera donc intéressant de le déterminer dans le cas d'une cellule biologique.

III.2.3.1. Détermination du facteur de Claussius-Mossotti d'une cellule en fonction de la fréquence

Dans le cas d'une cellule biologique, le facteur $K(\omega)$ s'exprime par l'équation (I-6) :

$$K(\omega) = \frac{\varepsilon^*_{cell} - \varepsilon^*_m}{\varepsilon^*_{cell} + 2\varepsilon^*_m} \qquad \text{(I-6)}$$

avec ε^*_{cell} et ε^*_m représentent respectivement les permittivités complexes de la cellule et du milieu de suspension.

Comme nous l'avons présenté précédemment (partie III.2.1.), la cellule possède une structure complexe et hétérogène avec notamment la membrane plasmique, le cytoplasme, l'enveloppe nucléaire et le nucléoplasme, et chacun possède des propriétés diélectriques uniques et différentes. Ainsi, la permittivité complexe de la cellule dépend évidemment des propriétés diélectriques de ces quatre compartiments. Pour la déterminer, différents modèles plus ou moins complexes sont décrits dans la littérature pour modéliser les cellules biologiques. En effet, une approche consiste à utiliser un modèle double couche qui prend en compte les différents compartiments de la cellule (Figure. 18.a) [77]. Ce modèle est représenté sous forme de quatre sphères désignant spécifiquement le nucléoplasme (np), l'enveloppe nucléaire (en), le cytoplasme (cyt) et la membrane plasmique (mem).

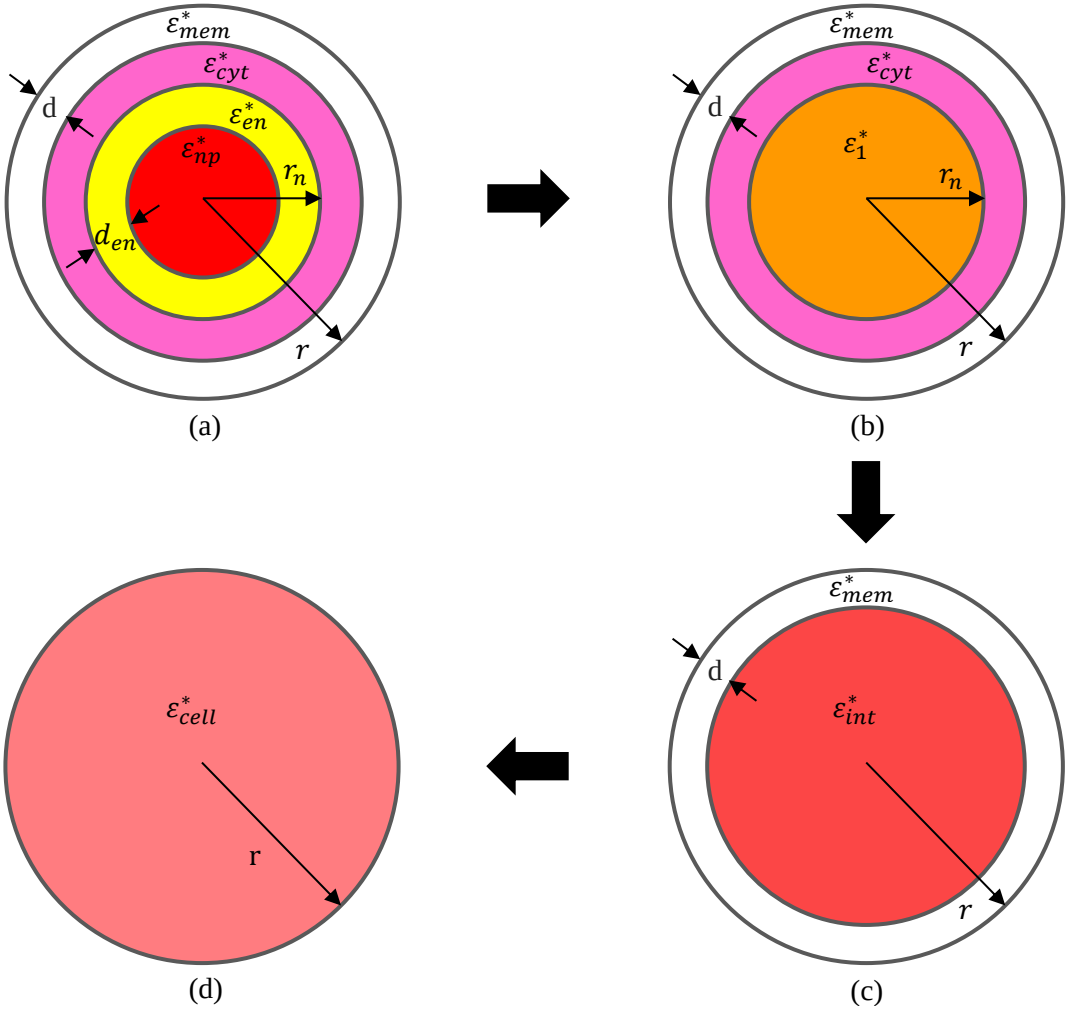


Figure. 18 Simplification progressive du modèle double couche à une sphère homogène équivalente [78].

Il a été décrit dans la littérature que la permittivité complexe effective d'une cellule peut être déterminée en ramenant par des séries de calcul le modèle double couche à une simple sphère homogène (Figure. 18) [55], [77], [78]. La simplification se fait par étapes, en considérant à la fois deux sphères consécutives, en commençant par le noyau jusqu'à obtenir une seule sphère homogène. A chaque fois, la permittivité complexe effective de deux sphères considérées est calculée. Nous prenons l'exemple de la modélisation de deux sphères consécutives A et B (Figure. 19.a), possédant respectivement des permittivités complexes ε_A^* et ε_B^*, et des rayons r_A et r_B, par une sphère homogène équivalente de permittivité complexe effective ε_{eff}^* (Figure. 19.b).

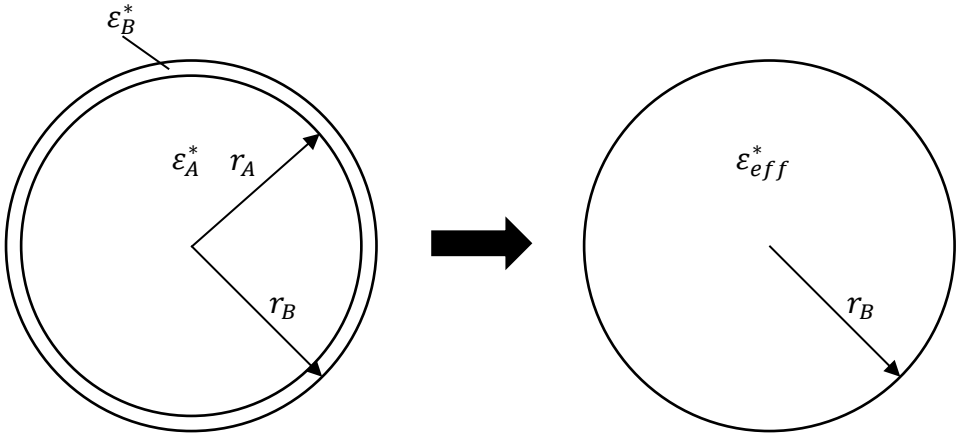


Figure. 19 Modélisation de deux sphères A et B consécutives par une simple sphère homogène équivalente.

En effet, la permittivité complexe effective ε_{eff}^* peut être déterminée à partir de l'équation (I-7) :

$$\varepsilon_{eff}^* = \varepsilon_B^* \left[\frac{\left(\frac{r_B}{r_A}\right)^3 + 2\left(\frac{\varepsilon_A^* - \varepsilon_B^*}{\varepsilon_A^* + 2\varepsilon_B^*}\right)}{\left(\frac{r_B}{r_A}\right)^3 - \left(\frac{\varepsilon_A^* - \varepsilon_B^*}{\varepsilon_A^* + 2\varepsilon_B^*}\right)} \right] \qquad \text{(I-7)}$$

Pour simplifier la cellule, premièrement, le nucléoplasme et l'enveloppe nucléaire présentés par le modèle double couche (Figure. 18.a), sont remplacés par une sphère homogène (Figure. 18.b) ayant une permittivité complexe effective ε_1^* définie par l'équation (I-8) :

$$\varepsilon_1^* = \varepsilon_{en}^* \left[\frac{\left(\frac{r_n}{r_n - d_{en}}\right)^3 + 2\left(\frac{\varepsilon_{np}^* - \varepsilon_{en}^*}{\varepsilon_{np}^* + 2\varepsilon_{en}^*}\right)}{\left(\frac{r_n}{r_n - d_{en}}\right)^3 - \left(\frac{\varepsilon_{np}^* - \varepsilon_{en}^*}{\varepsilon_{np}^* + 2\varepsilon_{en}^*}\right)} \right] \qquad \text{(I-8)}$$

avec

ε_{en}^* : permittivité complexe de l'enveloppe nucléaire.

ε_{np}^* : permittivité complexe du nucléoplasme.

r_n : rayon du noyau.

d_{en} : épaisseur de l'enveloppe nucléaire.

Deuxièmement, la sphère obtenue de permittivité ε_1^* (Figure. 18.b) forme avec le cytoplasme une sphère homogène représentant le contenu intracellulaire (Figure. 18.c) et possédant une permittivité complexe effective ε_{int}^* décrite par l'équation (I-9) :

$$\varepsilon_{int}^* = \varepsilon_{cyt}^* \left[\frac{\left(\frac{r - d}{r_n}\right)^3 + 2\left(\frac{\varepsilon_1^* - \varepsilon_{cyt}^*}{\varepsilon_1^* + 2\varepsilon_{cyt}^*}\right)}{\left(\frac{r - d}{r_n}\right)^3 - \left(\frac{\varepsilon_1^* - \varepsilon_{cyt}^*}{\varepsilon_1^* + 2\varepsilon_{cyt}^*}\right)} \right] \qquad \text{(I-9)}$$

avec

ε_{cyt}^* : permittivité complexe du cytoplasme.

r : rayon de la cellule.

d : épaisseur de la membrane plasmique.

Par suite le modèle obtenu et illustré sur la Figure. 18.c, représente le modèle monocouche d'une cellule biologique. Finalement, le contenu intracellulaire et la membrane plasmique (Figure. 18.c) sont modélisés par une sphère homogène équivalente possédant une permittivité complexe effective ε_{cell}^* (Figure. 18.d).

Ainsi, la permittivité complexe effective d'une cellule biologique s'exprime par l'équation (I-10) :

$$\varepsilon_{cell}^{*} = \varepsilon_{mem}^{*}\left[\frac{\left(\frac{r}{r-d}\right)^{3} + 2\left(\frac{\varepsilon_{int}^{*} - \varepsilon_{mem}^{*}}{\varepsilon_{int}^{*} + 2\varepsilon_{mem}^{*}}\right)}{\left(\frac{r}{r-d}\right)^{3} - \left(\frac{\varepsilon_{int}^{*} - \varepsilon_{mem}^{*}}{\varepsilon_{int}^{*} + 2\varepsilon_{mem}^{*}}\right)}\right] \quad \text{(I-10)}$$

avec

ε_{mem}^{*} : permittivité complexe de la membrane plasmique.

Par conséquent, la permittivité complexe effective de la cellule ε_{cell}^{*} est fonction des permittivités complexes de sa membrane plasmique (ε_{mem}^{*}), du cytoplasme (ε_{cyt}^{*}), de l'enveloppe nucléaire (ε_{en}^{*}) et du nucléoplasme (ε_{np}^{*}). Ainsi, d'après l'équation (I-6), on remarque que le facteur de Claussius-Mossotti $K(\omega)$ d'une cellule biologique, va dépendre fortement de ces quatre paramètres diélectriques ($\varepsilon_{mem}^{*}, \varepsilon_{cyt}^{*}, \varepsilon_{en}^{*}\ et\ \varepsilon_{np}^{*}$) au travers de ε_{cell}^{*}.

Or, la permittivité complexe ε_{x}^{*} se définit par l'équation (I-11) :

$$\varepsilon_{x}^{*} = \varepsilon_{x} - j\frac{\sigma_{x}}{\omega} \quad \text{(I-11)}$$

Elle est composée d'une partie réelle fonction de la permittivité diélectrique absolue ε_{x} ($\varepsilon_{x} = \varepsilon_{0}\varepsilon_{r(x)}$) et d'une partie imaginaire fonction de la conductivité σ_{x} (x se réfère soit à la cellule, soit au milieu de suspension, ou soit à la membrane plasmique…). De plus, elle est fonction de la fréquence du champ qui lui est appliqué ($\omega = 2\pi f$).

En combinant les équations (I-6) et (I-11), la partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti, décrivant le comportement diélectrophorétique d'une cellule, peut être donnée par l'équation (I-12) :

$$Re[K(\omega)] = \frac{(\varepsilon_{cell} - \varepsilon_{m})(\varepsilon_{cell} + 2\varepsilon_{m}) + \frac{1}{\omega^{2}}(\sigma_{cell} - \sigma_{m})(\sigma_{cell} + 2\sigma_{m})}{(\varepsilon_{cell} + 2\varepsilon_{m})^{2} + \frac{1}{\omega^{2}}(\sigma_{cell} + 2\sigma_{m})^{2}} \quad \text{(I-12)}$$

On voit donc clairement qu'il existe une dépendance de la partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué ($\omega = 2\pi f$) et

également des propriétés diélectriques de la cellule ($\varepsilon_{cell}\ et\ \sigma_{cell}$) et de son milieu d'immersion ($\varepsilon_m et\ \sigma_m$).

Dans un premier temps, nous allons étudier la dépendance fréquentielle de $Re[K(\omega)]$. En effet, en faisant des approximations aux très basses fréquences, aux très hautes fréquences et à des fréquences intermédiaires, la partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti peut révéler différentes expressions présentées dans le Tableau I-1.

Tableau I-1 Expressions de la partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti d'une cellule dans de différentes gammes de fréquences.

Fréquences	**Expressions de $Re[K(\omega)]$**	
200 kHz et moins	$\frac{\sigma_{cell}-\sigma_m}{\sigma_{cell}+2\sigma_m}$	(I-13)
300 kHz-600 MHz	$\frac{(\varepsilon_{cell}-\varepsilon_m)(\varepsilon_{cell}+2\varepsilon_m)+\frac{1}{\omega^2}(\sigma_{cell}-\sigma_m)(\sigma_{cell}+2\sigma_m)}{(\varepsilon_{cell}+2\varepsilon_m)^2+\frac{1}{\omega^2}(\sigma_{cell}+2\sigma_m)^2}$	(I-14)
700 MHz et plus	$\frac{\varepsilon_{cell}-\varepsilon_m}{\varepsilon_{cell}+2\varepsilon_m}$	(I-15)

On remarque, d'après le Tableau I-1, qu'aux très basses fréquences (200 kHz et moins), $Re[K(\omega)]$ dépend uniquement des conductivités de la cellule et de son milieu environnant. Alors qu'aux très hautes fréquences en allant de 700 MHz et plus, cette partie réelle dépend notamment des permittivités diélectriques absolues de la cellule et de son milieu. Et à des fréquences intermédiaires, entre 300 kHz et 600 MHz, l'expression de $Re[K(\omega)]$ est fonction à la fois des permittivités diélectriques absolues, des conductivités de la cellule et du milieu de suspension.

En regroupant ces différentes expressions de $Re[K(\omega)]$, l'évolution fréquentielle de la partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti d'une cellule peut être représentée. En effet, pour comprendre l'influence des différents paramètres sur ce facteur, nous avons, à partir du modèle que nous avons présenté, effectué des calculs numériques pour obtenir les expressions de la permittivité diélectrique absolue et la conductivité de la cellule, ε_{cell} et σ_{cell}. Cela a été fait en développant les équations (I-8), (I-9) et (I-10), et en remplaçant les permittivités complexes des propriétés diélectriques par l'équation (I-11).

En fait, nous allons ici considérer le cas d'une cellule de lymphocyte vivante à titre d'exemple, associée à un modèle double couche. Les propriétés diélectriques concernant les permittivités et les conductivités de la membrane, du cytoplasme, de l'enveloppe nucléaire et le nucléoplasme, et les paramètres morphologiques $(r, r_n, d\ et\ d_{en})$ de la cellule, seront remplacées dans les équations par les valeurs de celles de cellules de lymphocytes déterminées lors de travaux publiés dans la littérature [77] (Tableau I-2). Concernant les propriétés diélectriques du milieu de suspension, nous avons considéré celles du milieu que nous utilisons lors de nos expérimentations de DEP, qui seront présentées dans le troisième chapitre. Il possède une permittivité diélectrique absolue ε_m de l'ordre de $78\varepsilon_0$ F/m et une conductivité σ_m de l'ordre de 0,02 S/m.

Tableau I-2 Paramètres du modèle double couche des cellules de lymphocytes de souris [77].

ε_{mem} (F/m)	σ_{mem} (S/m)	ε_{cyt} (F/m)	σ_{cyt} (S/m)	ε_{en} (F/m)	σ_{en} (S/m)	ε_{np} (F/m)	σ_{np} (S/m)	r (µm)	r_n (µm)	d (nm)	d_{en} (nm)
$6{,}8\varepsilon_0$	3,2e-6	$60\varepsilon_0$	0,32	$28\varepsilon_0$	6e-3	$52\varepsilon_0$	1,35	2,9	1,5	7	40

Ainsi, la réponse diélectrophorétique typique d'une cellule de lymphocyte vivante en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué peut être décrite par la Figure. 20.

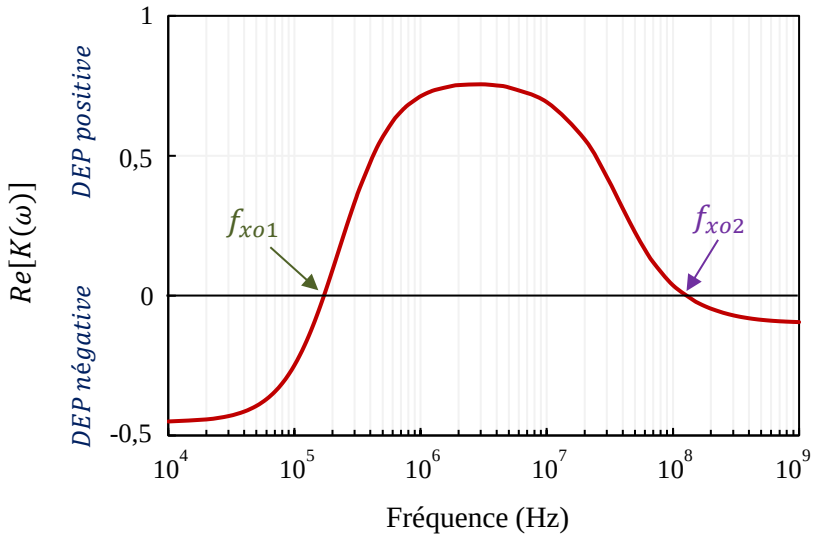


Figure. 20 Réponse diélectrophorétique théorique d'une cellule de lymphocyte vivante avec les paramètres présentés dans le Tableau I-2, en suspension dans un milieu possédant une permittivité ε_m = $78\varepsilon_0$ F/m et une conductivité σ_m = 0,02 S/m.

Pour une cellule morte ou en souffrance, de nombreuses études ont montré que la réponse DEP pouvait être très différente, en fonction de la présence des pores dans la membrane plasmique et de nombreux échanges entre les milieux intra et extracellulaires [79]. En effet, si le milieu intracellulaire s'échappe complètement et s'il est remplacé par le milieu extracellulaire, les différences entre les deux milieux disparaissent.

On a déjà montré que la force diélectrophorétique F_{DEP} est directement proportionnelle à $Re[K(\omega)]$ (équation (I-5)), il en résulte que cette force diélectrophorétique suit les mêmes dépendances en fréquence, ainsi qu'en permittivité et conductivité de la cellule et du milieu extracellulaire. La Figure. 20 montre l'existence de deux régions de DEP négative c.à.d lorsque $Re[K(\omega)]$ est négative et d'une région de DEP positive ($Re[K(\omega)] > 0$), et entre ces régions il existe une zone de transition où la force de DEP inverse sa polarité. La transition entre la DEP négative et positive (et inversement) se produit à une fréquence connue sous le nom de fréquence de transition. A cette fréquence, la partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti est nulle ($Re[K(\omega)]$) = 0) et par suite la force de DEP devient nulle et n'aura aucune influence sur la particule. Ainsi aux basses fréquences, une transition de la DEP négative à la DEP positive se produit à la fréquence de transition f_{xo1} (~ 170 kHz), où à cette fréquence la conductivité de la cellule est égale à celle de son milieu d'immersion ($\sigma_{cell} = \sigma_m$) (équation (I-13)). Tandis qu'aux hautes fréquences, une seconde transition de la DEP positive à la DEP négative se produit à la fréquence de transition f_{xo2} (~ 120 MHz), dans le cas où le facteur $(\varepsilon_{cell} - \varepsilon_m)(\varepsilon_{cell} + 2\varepsilon_m)$ sera l'opposé du facteur $\frac{1}{\omega^2}(\sigma_{cell} - \sigma_m)(\sigma_{cell} + 2\sigma_m)$ (équation (I-14)). Par conséquent, ces deux fréquences de transition dépendent fortement des propriétés diélectriques intrinsèques des cellules vis-à-vis de leurs milieux. Nous allons étudier et détailler ultérieurement cette dépendance.

III.2.3.2. Influence des propriétés diélectriques sur la réponse DEP

Dans un second temps, il est important de noter que la réponse diélectrophorétique d'une cellule vivante est fortement sensible aux propriétés diélectriques du milieu d'immersion. En comparant le spectre de $Re[K(\omega)]$ typique d'une cellule de lymphocyte (rouge) en suspension dans un milieu de caractéristiques σ_m = 0,02 S/m et ε_m = 78ε_0 F/m, et les spectres affectés par une variation de la conductivité (orange et vert) (Figure. 21), on observe que la région de DEP positive dépend d'une manière remarquable de la conductivité du milieu.

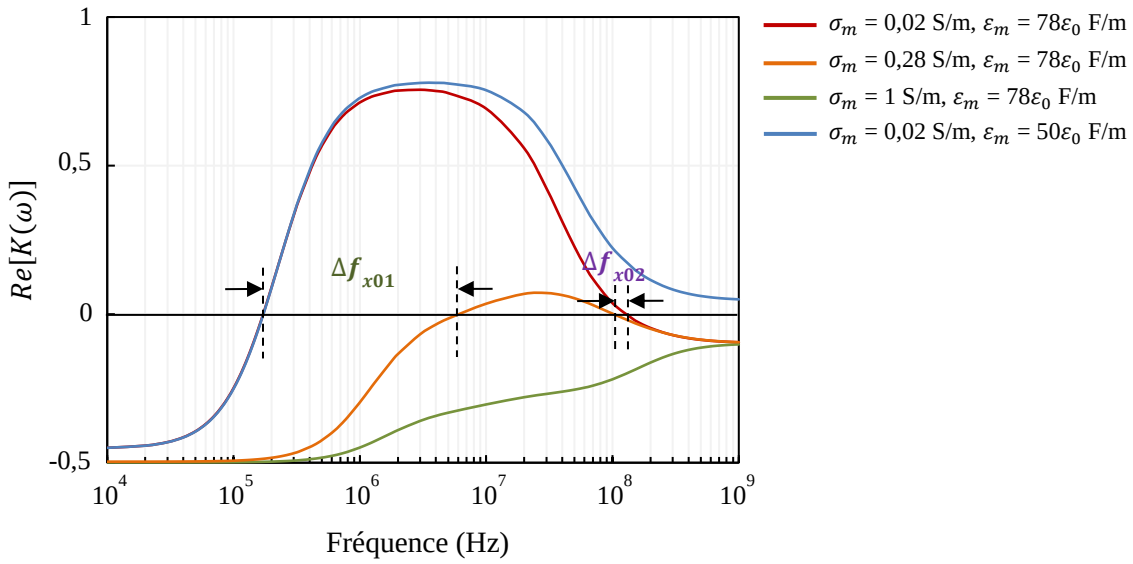


Figure. 21 Effet de la variation de propriétés diélectriques du milieu de suspension sur la réponse diélectrophorétique d'une cellule de lymphocyte vivante.

Pour une valeur de conductivité (σ_m = 0,28 S/m) supérieure d'environ 10 fois à σ_m originale (0,02 S/m), tout en restant inférieur à la conductivité du cytoplasme (σ_{cyt} = 0,32 S/m), nous remarquons que l'amplitude de la région de DEP positive diminue fortement et de plus le spectre de $Re[K(\omega)]$ dans cette région se rétrécit. Ainsi, la caractérisation cellulaire avec un tel spectre sera difficile à être réalisée. En effet, nous observons que cette forte valeur de σ_m influe fortement sur la première fréquence de transition f_{x01}, alors qu'elle a un très faible impact sur la deuxième fréquence de transition f_{x02}. D'autre part, si nous considérons un milieu de suspension type milieu de culture de biologie classique, dont la conductivité est très élevée de l'ordre de 1 S/m et supérieure à la conductivité du cytoplasme, la région de DEP positive disparaît. Ainsi les deux fréquences de transition n'existent plus.

En effet, cela démontre l'importance et la nécessité de travailler avec des milieux de suspensions de très faibles conductivités, comme cela sera le cas avec le milieu utilisé lors de nos expérimentations dont σ_m est de l'ordre de 0,02 S/m.

D'autre part, le spectre de $Re[K(\omega)]$ a une dépendance avec la permittivité du milieu de suspension. En effet dans le cas où la permittivité du milieu (ε_m = 50ε_0 F/m) est inférieure à celle du cytoplasme (ε_{cyt} = 60ε_0 F/m) (Figure. 21), la transition haute fréquence entre la DEP positive et la DEP négative disparaît. Notons que la permittivité du milieu varie en fonction de la température [80], mais cette dernière reste constante durant les expérimentations. Alors ce facteur ne sera pas pris en considération lors de l'étude.

Dans ce qui suit, nous allons aborder la dépendance de la partie réelle de $K(\omega)$ en propriétés diélectriques de la cellule dans la gamme de fréquence 10 kHz-1GHz. En fait, nous allons étudier l'impact de la variation de chaque paramètre diélectrique, incluant la permittivité diélectrique absolue et la conductivité de la membrane plasmique, du cytoplasme, de l'enveloppe nucléaire et du nucléoplasme de la cellule de lymphocyte, sur l'allure de $Re[K(\omega)]$. Pour cela, nous avons considéré pour chaque paramètre diélectrique de la cellule de lymphocyte présenté dans le Tableau I-2, une augmentation de 10% de sa valeur originale, tout en travaillant avec un milieu de suspension ayant une ε_m de l'ordre de $78\varepsilon_0$ et une σ_m de l'ordre de 0,02 S/m. La Figure. 22 montre l'influence de la variation des propriétés diélectriques sur la valeur absolue de $Re[K(\omega)]$. Cela permet d'apprécier la contribution de chaque paramètre sur $Re[K(\omega)]$ en fonction de la fréquence.

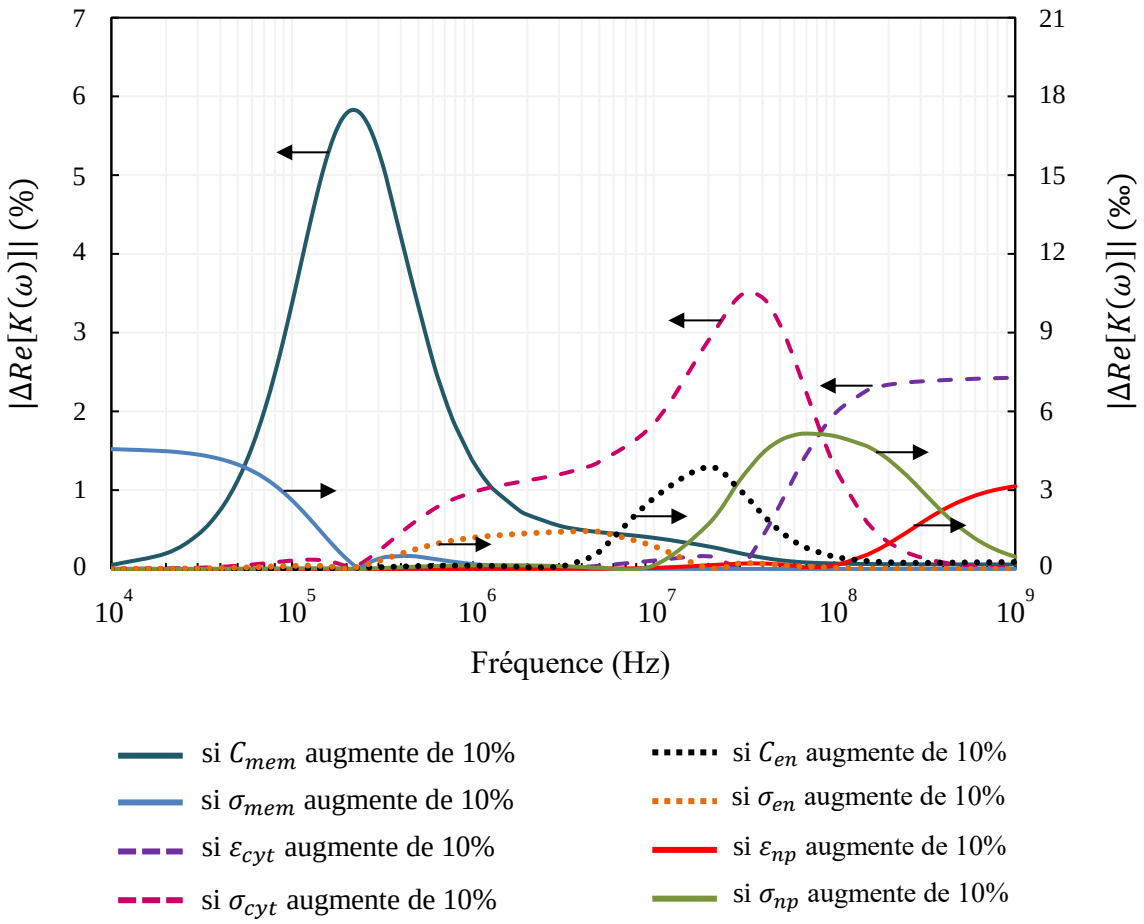


Figure. 22 Impact sur la valeur absolue de $Re[K(\omega)]$ de la variation de 10% des valeurs de paramètres diélectriques de la cellule de lymphocyte [77] ayant un rapport nucléocytoplasmique de l'ordre de 0,52, dans un milieu possédant une conductivité de l'ordre de 0,02 S/m.

On remarque que la partie réelle de $K(\omega)$ dans la gamme basse fréquence, inférieure à 1 MHz, est affectée principalement par la variation de la capacité membranaire par unité de surface C_{mem} ($C_{mem} = \varepsilon_{mem}/d$). La variation de la conductivité du cytoplasme a un effet maximal à 30 MHz.

Aux hautes fréquences, au-delà de 50 MHz, la conductivité et la permittivité du cytoplasme et la conductivité et la permittivité du nucléoplasme sont les paramètres qui peuvent avoir un impact sur le spectre de $Re[K(\omega)]$. En effet, la permittivité du cytoplasme prédomine la partie très haute fréquence de $Re[K(\omega)]$, située au-dessus de 100 MHz.

Ainsi, il en résulte que la réponse diélectrophorétique d'une cellule vivante dépend notamment des propriétés de la membrane plasmique dans la gamme basse fréquence. Cependant, à des fréquences supérieures à 50 MHz, les propriétés intracellulaires sont prédominantes et agissent sur le comportement diélectrophorétique de la cellule.

Dans ce cadre, d'après l'étude de l'influence de la variation de propriétés diélectriques, de la cellule et de son milieu de suspension, sur la réponse diélectrophorétique de la cellule vivante, il sera intéressant de démontrer l'influence du changement de ces diverses caractéristiques sur les deux fréquences de transition f_{xo1} et f_{xo2}.

Concernant premièrement la conductivité du milieu d'immersion, la Figure. 23 montre qu'une légère variation de ce paramètre a un impact majeur sur la première fréquence de transition f_{xo1}.

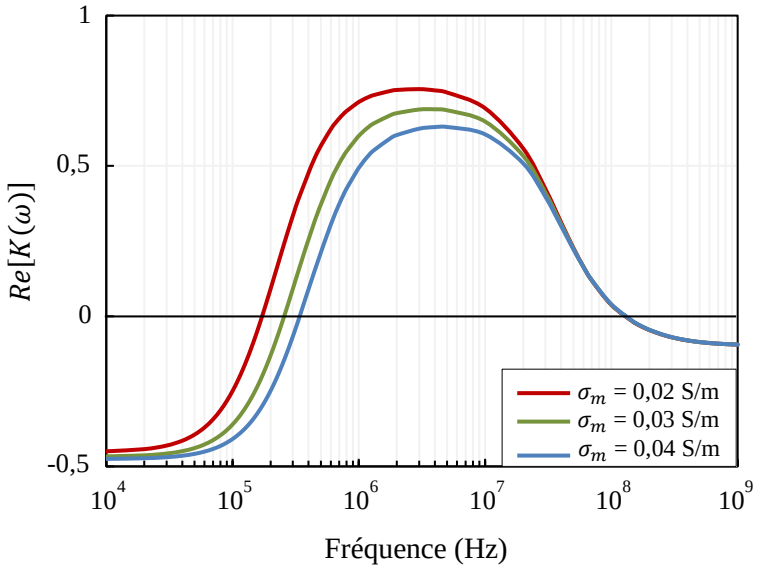


Figure. 23 Réponse diélectrophorétique théorique d'une cellule de lymphocyte vivante. Effet du changement de la conductivité du milieu de suspension sur les fréquences de transition f_{xo1} et f_{xo2}.

En effet, une augmentation de la conductivité du milieu conduit à une augmentation de f_{xo1}. Par conséquent, f_{xo1} varie d'une manière proportionnelle à σ_m (équation (I-16)). Cependant, la deuxième fréquence de transition f_{xo2} n'est pas affectée par les petites variations de la conductivité du milieu.

D'autre part, nous avons vu précédemment d'après le modèle électrique de la cellule (Figure. 17), que le champ électrique interroge principalement la membrane plasmique dans la gamme basse fréquence. En fait, la fréquence de transition f_{xo1} est affectée par différents paramètres. En particulier, la caractéristique prépondérante est la taille de la cellule. Pour l'illustrer, nous avons mené une étude dans laquelle le diamètre ($2 \times r$: le rayon de la cellule) d'une cellule de lymphocyte varie en considérant toutes les autres propriétés cellulaires identiques. Ainsi, la Figure. 24.a montre qu'une cellule à large diamètre présente une valeur de f_{xo1} inférieure à celle d'une cellule possédant une plus petite taille. Cela s'explique par le fait que la membrane d'une grosse cellule nécessite plus de temps que celle d'une petite cellule pour se polariser par l'accumulation de charges induites. La fréquence de transition f_{xo1} va être inversement proportionnelle au temps de polarisation de la membrane cellulaire et par conséquent, inversement proportionnelle à la taille de la cellule (cf. équation (I-16)).

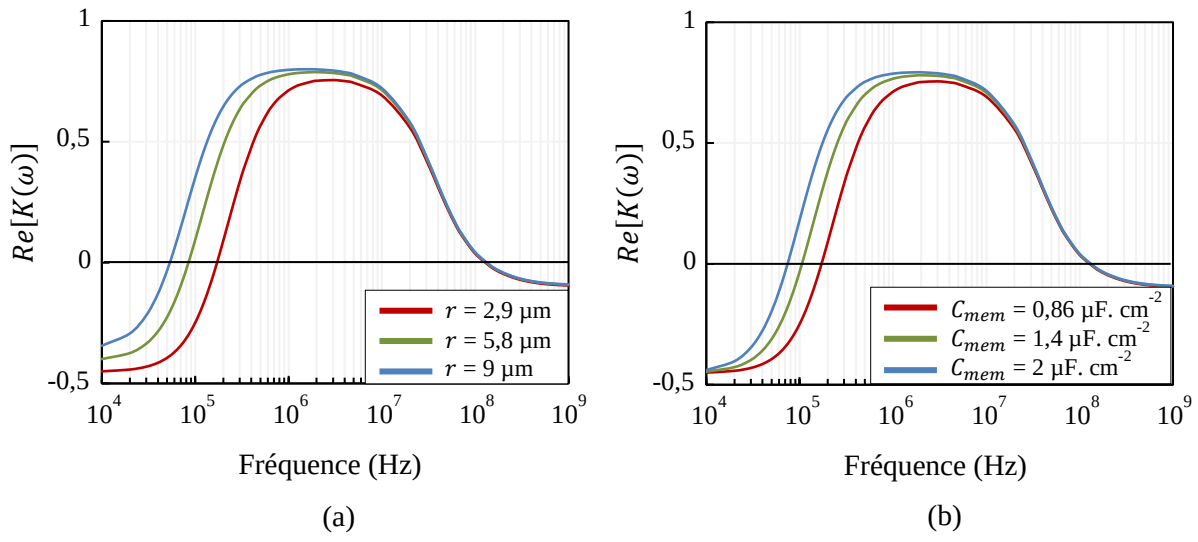


Figure. 24 Réponse diélectrophorétique théorique d'une cellule de lymphocyte vivante : (a) effet de la variation du rayon de la cellule sur le spectre $Re[K(\omega)]$, (b) effet de la variation de la capacité membranaire par unité de surface sur le spectre $Re[K(\omega)]$.

De plus, comme la membrane plasmique se comporte comme une capacité (Figure. 17), le temps de polarisation de celle-ci va également dépendre de la valeur effective de sa capacité. En effet, la Figure. 24.b montre qu'une variation de la capacité membranaire par unité de

surface C_{mem} ($C_{mem} = \varepsilon_{mem}/d$), dûe à la variation de la permittivité de la membrane ($\varepsilon_{mem} = 6{,}8\varepsilon_0$, $11\varepsilon_0$ et $15{,}8\varepsilon_0$ F/m) va provoquer un décalage de la première fréquence de transition f_{xo1}, comme l'ont montré des études théoriques menées par le groupe du Professeur Pethig [53] et de nombreuses autres études expérimentales [81]–[83]. Ainsi, f_{xo1} va varier de manière inversement proportionnelle avec C_{mem} (équation (I-16)).

Par conséquent, on peut considérer que la fréquence f_{xo1} peut s'exprimer à partir du rayon de la cellule r, de la capacité membranaire C_{mem} et de la conductivité de l'électrolyte environnant σ_m. En effet, il a été montré qu'en première approximation, il est possible de prédire f_{xo1} à partir de l'équation (I-16) [53] :

$$f_{x01} = \frac{\sqrt{2}}{2\pi\, r C_{mem}} \sigma_m \qquad \text{(I-16)}$$

D'autre part, comme le montre la Figure. 24, dans la partie haute fréquence (supérieure à plusieurs dizaines de MHz) la deuxième fréquence de transition f_{xo2} n'est quasiment pas sensible à des variations de taille de la cellule ni de ses propriétés diélectriques membranaires, elle reste inchangée. En fait, d'après le modèle électrique de la cellule (Figure. 17), nous avons vu que pour des fréquences supérieures à 50 MHz, la membrane cellulaire peut être vue comme court-circuitée. Il en résulte que ce sont principalement les caractéristiques intracellulaires qui dominent la valeur de f_{xo2} [53]. En effet pour démontrer cette dépendance, nous avons calculé le spectre de $Re[K(\omega)]$ d'une cellule de lymphocyte en faisant varier à chaque fois un paramètre des propriétés diélectriques intracellulaires et notamment la conductivité et la permittivité du cytoplasme (Figure. 25.a et b), la conductivité et la permittivité du nucléoplasme (Figure. 25.c et d) et la capacité de l'enveloppe nucléaire par unité de surface ($C_{en} = \varepsilon_{en}/d_{en}$ avec $\varepsilon_{en} = 28\varepsilon_0, 6\varepsilon_0\ et\ 3\varepsilon_0\ F/m$) (Figure. 25.e). Il apparaît clairement que la deuxième fréquence de transition f_{xo2} est fortement sensible aux propriétés intracellulaires. Ainsi des changements significatifs peuvent apparaître lors de la variation de ces propriétés.

De plus, le rapport du volume noyau sur cytoplasme (n/cyt) est l'un des paramètres qui influe fortement sur f_{xo2}. En effet, une variation de ce rapport nucléocytoplasmique (Figure. 25.f) peut induire un décalage conséquent de la deuxième fréquence de transition. En revanche, la fréquence f_{xo1} (basses fréquences) ne semblerait pas impactée par ce changement, ni par celui des propriétés intracellulaires.

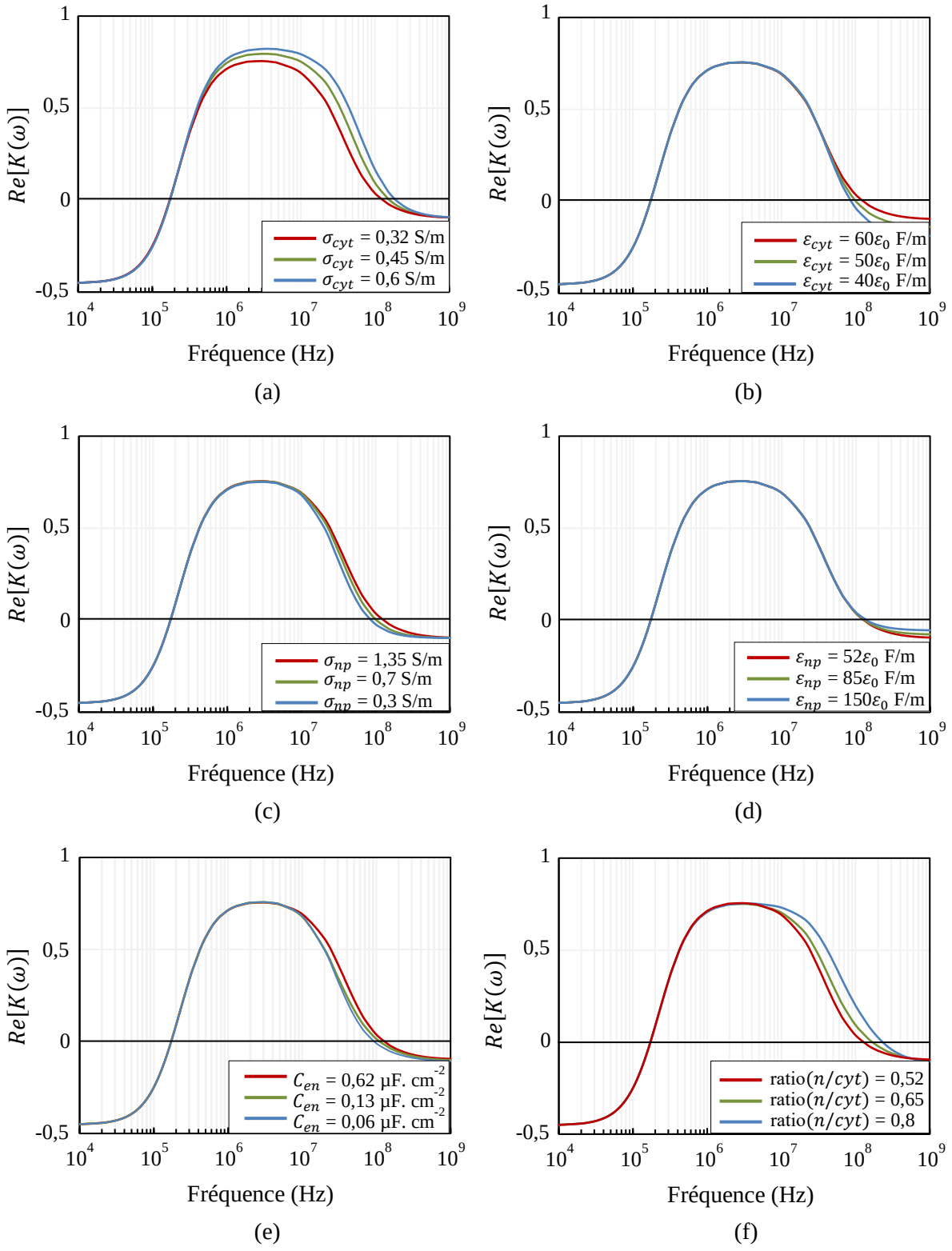


Figure. 25 Dépendance de la réponse diélectrophorétique théorique d'une cellule de lymphocyte vivante en fonction de ces caractéristiques intracellulaires: (a) la conductivité du cytoplasme, (b) la permittivité du cytoplasme, (c) la conductivité du nucléoplasme, (d) la permittivité du nucléoplasme, (e) la capacité de l'enveloppe nucléaire et (f) le rapport de volume noyau-cytoplasme.

Il en résulte que les fréquences de transition f_{xo2} sont fortement sensibles et dépendantes des propriétés constitutives de l'intérieur de la cellule. Il a été montré qu'en première approximation, il est possible de prédire f_{x02} à partir de l'équation (I-17) [84] :

$$f_{x02} = \frac{1}{2\pi}\sqrt{\frac{\sigma_{int}^2 - \sigma_{int}\sigma_m - 2\sigma_m^2}{2\varepsilon_m^2 - \varepsilon_{int}\varepsilon_m - \varepsilon_{int}^2}} \qquad \text{(I-17)}$$

avec

σ_{int} et ε_{int} représentent respectivement la conductivité effective et la permittivité effective du contenu intracellulaire.

σ_m et ε_m représentent respectivement la conductivité et la permittivité du milieu de suspension.

En effet, cette approximation est en accord avec l'étude que nous avons précédemment menée au sujet des conditions qui empêchent l'existence de f_{xo2} (Figure. 21), notamment dans les cas où $\sigma_m > \sigma_{int}$ ou $\varepsilon_m < \varepsilon_{int}$. En fait, si l'un de ces deux cas existe, la valeur de la racine devient négative, donc il n'existe pas de solutions réelles de l'équation (I-17), et par conséquent f_{xo2} ne peut pas exister.

Or dans notre cas, nous utilisons un milieu de suspension possédant une conductivité ($\sigma_m = 0{,}02$ S/m) inférieure d'environ 10 fois à la conductivité du contenu intracellulaire. Ainsi, en première approximation, f_{xo2} peut alors s'exprimer par l'équation (I-18) :

$$f_{x02} = \frac{1}{2\pi}\sigma_{int}\sqrt{\frac{1}{2\varepsilon_m^2 - \varepsilon_{int}\varepsilon_m - \varepsilon_{int}^2}} \qquad \text{(I-18)}$$

On voit alors que f_{xo2} dépend principalement de la variation des propriétés diélectriques intracellulaires. D'après [85], on voit qu'elle varie linéairement avec la conductivité du contenu intracellulaire, mais dépendant également de la permittivité intracellulaire, il reste difficile de décorréler l'effet de chacun de ces deux paramètres sur la fréquence f_{xo2}.

En effet, des propriétés diélectriques différentes contribuent à des fréquences de transition différentes et ainsi des réponses diélectrophorétiques distinctes. Si on prend alors un exemple de deux cellules différentes en suspension dans le même milieu ($\sigma_m = 0{,}02$ S/m) : une cellule de lymphocyte [77] et d'ovaire [86] de rongeur ; chacune possédant des caractéristiques

diélectriques membranaires et intracellulaires et des paramètres morphologiques différents. On remarque sur la Figure. 26 que chaque cellule présente alors une réponse diélectrophorétique vraiment distincte ; avec notamment des f_{xo1} et f_{xo2} spécifiques à chaque type cellulaire. Par conséquent, l'utilisation de cette différence de fréquences de transition pourra être utilisée comme facteur discriminant permettant de trier ces deux cellules l'une de l'autre.

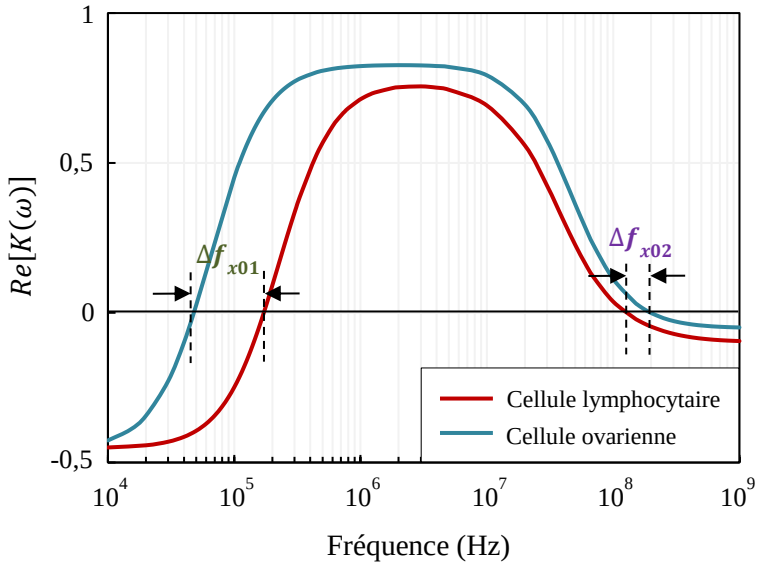


Figure. 26 Réponses diélectrophorétiques théoriques de cellules de lymphocyte et d'ovaire de petits rongeurs, possédant des propriétés diélectriques et paramètres morphologiques différents [77], [86], mises en suspension dans un milieu de conductivité $\sigma_m = 0{,}02$ S/m.

De plus, si l'on considère à présent deux cellules du même type mais présentant des stades d'évolution (différenciation, pathologie, niveau dans le cycle, rentrée en apoptose...), on pressent qu'il sera très certainement plus intéressant de mettre à profit les différences potentielles de f_{xo2}, puisque celle-ci dépend principalement des variations de propriétés intracellulaires et de plus ne dépend pas ou peu des propriétés morphologiques de la cellule (Figure. 24).

Cependant, malgré qu'il existe de nombreuses études théoriques qui se sont intéressées à l'étude de la deuxième fréquence de transition [53], [87], l'utilisation de f_{xo2} reste à ce jour très peu exploitée d'un point de vue expérimental et applicatif [88]–[90]. Cela peut s'expliquer par plusieurs raisons. Elle nécessite notamment des géométries d'électrodes appropriées pour appliquer le champ électrique de façon efficace et des moyens de mesures spécifiques adaptés aux problématiques de propagation de signaux en hautes fréquences [53]. Dans ce contexte, les

travaux menés dans le cadre de ma thèse se sont focalisés sur l'étude de la faisabilité de mesurer expérimentalement des fréquences de transition dans la gamme des hautes fréquences (> 50 MHz) pour différents types cellulaires. L'objectif est de pouvoir caractériser et à terme trier différents types de cellules biologiques en se basant sur leurs propriétés diélectriques intracellulaires.

Avant de présenter l'avancement actuel de ces travaux mettant à profit la DEP hautes fréquences, nous avons souhaité présenter quelques travaux parmi les plus marquants menés depuis plusieurs décennies dans la gamme de fréquences conventionnelles (10 kHz à 10 MHz) avec leurs applications potentielles aux problématiques de tri cellulaire.

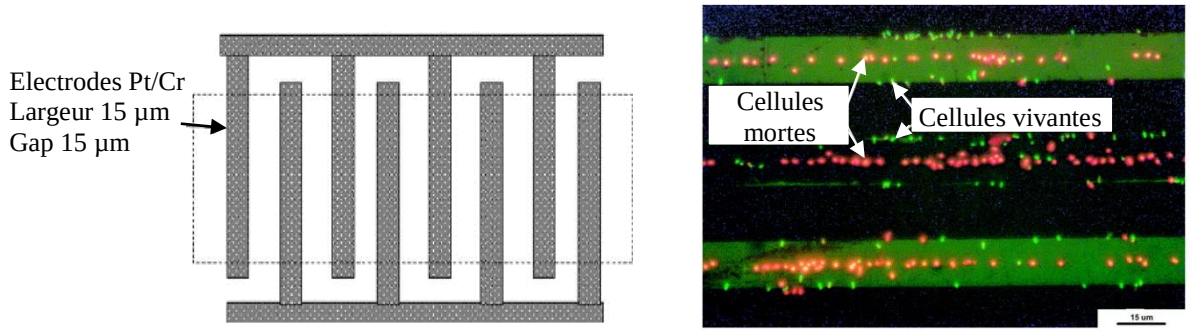
III.3. Quelques exemples d'application de la diélectrophorèse basse fréquence

A l'origine, les techniques de DEP basses fréquences ont été beaucoup utilisées pour manipuler simplement des cellules biologiques en statique ou en flux. En effet, lorsqu'elle est soumise à un champ électrique non uniforme en amplitude, la cellule biologique se déplace en réponse au champ électrique. Cette technique de manipulation permet d'orienter voire de piéger des cellules, vers des zones d'intérêt et a été de très nombreuses fois mise à profit au sein de canaux microfluidiques par exemple [91], [92].

Au-delà de la simple manipulation, comme nous l'avons vu dans la partie précédente, la réponse diélectrophorétique d'une cellule est liée à ses propriétés diélectriques intrinsèques. En particulier aux basses fréquences, la réponse diélectrophorétique dépend essentiellement de la taille et de la capacité membranaire de la cellule.

Dans ce contexte, la diélectrophorèse basse fréquence a montré ses potentialités pour le tri et l'isolation de cellules ou de molécules spécifiques. Par exemple une des premières démonstrations a été la séparation de cellules vivantes et mortes [51], [93], [94]. La Figure. 27.a montre un exemple de dispositif à capacité interdigitée permettant de séparer des cellules de Listeria innocua (bactéries) vivantes et mortes [94]. Les cellules mortes possèdent généralement une membrane altérée, elle devient alors perméable aux échanges entre le contenu de la cellule et son milieu extérieur. Par conséquent, il y aura un fort changement de propriétés diélectriques dans le cas de cellules mortes. Ainsi, les cellules vivantes et mortes présentent deux réponses diélectrophorétiques différentes. Dans cet exemple, sous l'application d'une fréquence du signal sinusoïdal 50 kHz, fréquence pour laquelle les cellules vivantes et mortes présentent deux

comportements diélectrophorétiques différents, et pour une tension de 1 V_{pp}, les cellules peuvent être efficacement séparées (Figure. 27.b). En effet, les cellules vivantes (en vert) réagissent en DEP positive et se positionnent au bord des électrodes là où le champ est maximal et les cellules mortes (en rouge) réagissent en DEP négative et se positionnent au centre des électrodes métalliques.



(a) (b)

Figure. 27 (a) Vue de dessus de la capacité interdigitée, (b) séparation de cellules Listeria vivantes et mortes par diélectrophorèse [94].

Il a été également montré la possibilité de séparer des cellules viables mais de types différents, dont des cellules cancéreuses d'autres cellules :

Yang et al. [48] ont montré qu'ils ont pu séparer par DEP basse fréquence, les cellules cancéreuses colorectales (HCT116), des cellules du rein embryonnaire humain (HEK293) et des bactéries Escherichia coli (E. coli). Les HCT116 et les HEK293 possèdent le même diamètre 20 µm, et les E. coli ont une taille très petite de l'ordre de 0,5 µm. Le système de tri utilisé pour la séparation diélectrophorétique est présenté sur la Figure. 28.a. Le dispositif de séparation est composé de deux électrodes en parallèles, placées au fond du canal avec un angle de 45° par rapport au flux dans le canal principal. Au niveau des électrodes, un canal latéral est placé sur le côté du canal principal dans le but de collecter les cellules cibles.

Le principe de tri est basé sur le fait que lorsque les cellules cibles en flux seront proches du gap des électrodes, elles subissent des forces de DEP négative plus grandes que celles d'autres cellules, qui les repoussent dans la direction du canal latéral.

Pour connaître la fréquence à laquelle les cellules HCT116 subissent une DEP négative maximale, leur spectre de DEP a été au préalablement mesuré : à 100 kHz la force de la DEP négative est la plus forte. Les trois suspensions cellulaires ont été injectées dans le canal microfluidique du système de tri. En absence du champ électrique, les cellules en flux passent

au-dessus des électrodes dans le canal principal (Figure. 28.b) et continuent leur chemin. Par contre, en appliquant aux deux électrodes deux signaux AC déphasés de 180°, de tension 16 V_{pp} à la fréquence 100 kHz, la Figure. 28.c montre que la plupart des cellules colorectales (sphères sombres) seront repoussées de la zone proche du gap (zone de forte intensité de champ) et elles migrent alors vers le canal latéral. Cependant les HEK293 (sphères blanches) et les E. coli (difficile à les voir ici de par leur petite taille) continuent leur mouvement dans la même direction du flux du canal principal, uniquement poussées par les forces hydrodynamiques.

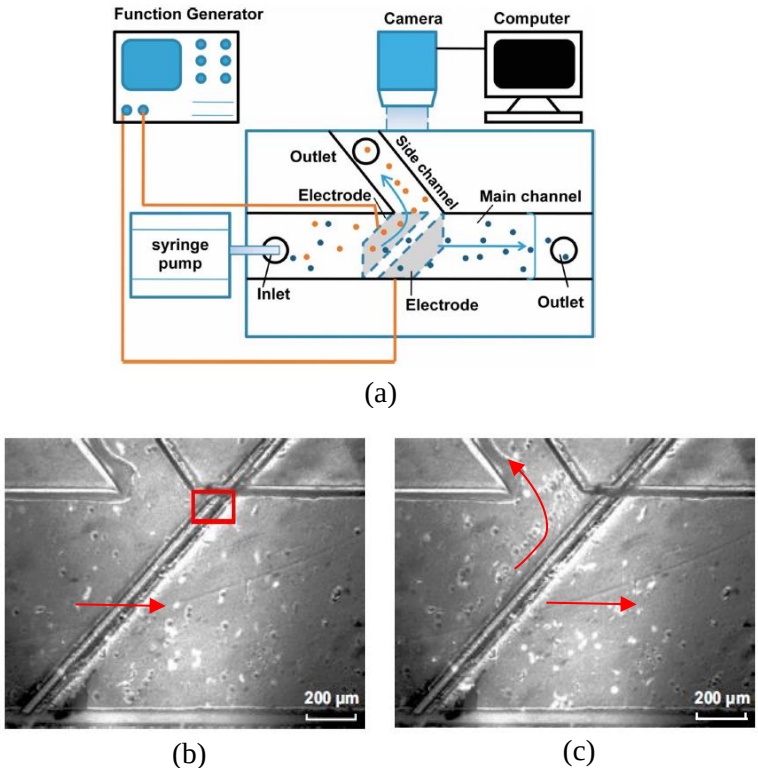


Figure. 28 (a) Schéma de principe du dispositif du tri DEP. Mesures expérimentales de la déflexion DEP des cellules HCT116 : (b) en l'absence du champ électrique, les cellules HCT116, HEK293 et E. coli se déplacent en flux dans le canal principal, (c) en présence du champ, les cellules HCT116 ont été déviées vers le canal latéral et les HEK293 et E. coli continuent à se déplacer dans le canal principal [48].

Les techniques de DEP basse fréquence ont été également mises en œuvre pour la détection et la caractérisation de cellules cancéreuses à différents stades de cancer [95], [96]. Salmanzadeh et al. [96] ont pu caractériser différents stades de cellules malignes de l'épithélium de surface ovarienne de souris (MOSE : *mouse ovarian surface epithelial*) en déterminant leur première fréquence de transition et leur capacité membranaire spécifique. Le dispositif qu'ils ont utilisé pour caractériser ces cellules est présenté par la Figure. 29.a.

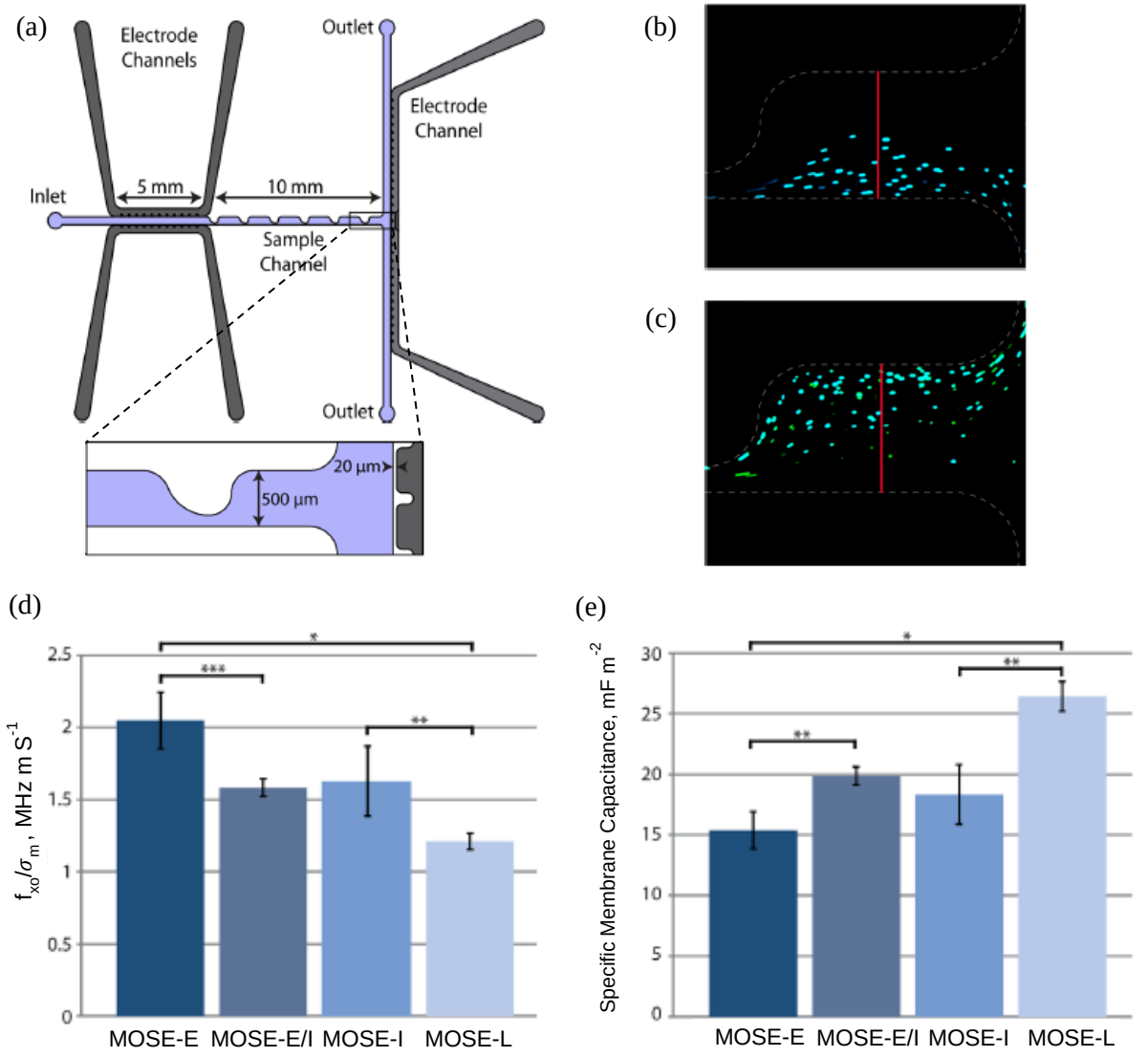


Figure. 29 (a) Vue de dessus du dispositif de caractérisation DEP, (b) cellules réagissant en DEP négative en se déplaçant vers la moitié inférieure du canal, (c) cellules réagissant en DEP positive en se déplaçant vers la moitié supérieure du canal, (d) spectre de la fréquence de transition pour les quatre stades de cellules malignes MOSE (n=3), (e) spectre de la capacité membranaire spécifique pour les quatre stades de cellules malignes MOSE (n=3) [96].

Il est composé de trois canaux d'électrodes liquides qui sont séparés du canal microfluidique par des barrières de 20 µm. Les trois canaux d'électrodes liquides sont remplis de solution tampon phosphate saline (PBS). Les deux canaux d'électrodes qui sont symétriques, fonctionnent comme une source et l'autre en tant que puits. En fait, dans la moitié supérieure du canal, les six caractéristiques de dent de scie arrondies sont utilisées pour créer le champ électrique non uniforme nécessaire pour induire la force de DEP. Au bout du canal microfluidique, une jonction en T est utilisée pour collecter les cellules dans l'une des deux sorties. L'ensemble des canaux ont ici une profondeur de 50 µm.

Ainsi, pour une tension 200 V_{RMS} appliquée dans une gamme de fréquence 5 à 10 kHz, les auteurs ont remarqué que les cellules en flux réagissent en DEP négative en se déviant vers la moitié inférieure du canal (Figure. 29.b). Par contre, pour des fréquences supérieures à 30 kHz, les cellules dévient vers la moitié supérieure du canal sous l'action de la force de DEP positive à 60 kHz (Figure. 29.c). La fréquence du signal appliquée à laquelle aucune déviation des cellules n'est produite, est alors considérée comme étant la fréquence de transition. La Figure. 29.d montre les différentes fréquences de transition obtenues pour les quatre stades de cellules malignes MOSE. A partir de la fréquence de transition, ils ont pu calculer la capacité membranaire spécifique pour les différents stades de cellules malignes MOSE (Figure. 29.e). Ainsi, ils ont pu montrer que plus le stade de malignité est avancé, plus la capacité membranaire de la cellule augmente.

La DEP basse fréquence peut être également mise à profit pour séparer des cellules souches de leurs descendants différenciés [75], [97], [98]. Nous présentons ici un exemple de cette séparation faite par Song et al. [98], où des cellules souches mésenchymateuses humaines (hMSC) ont pu être séparées de leurs descendants de différenciation (ostéoblastes). Le dispositif de tri DEP utilisé (Figure. 30.a), est formé d'un réseau d'électrodes interdigitées obliques qui s'étend sur l'ensemble du canal microfluidique avec un angle incliné de 45° par rapport à la direction du flux. Le canal microfluidique utilisé est composé de deux entrées et deux sorties. En fait, l'une des entrées est utilisée pour injecter la suspension cellulaire mixte et l'autre entrée pour injecter la solution tampon qui sert à concentrer toutes les cellules injectées vers la sortie supérieure. Le principe de séparation des cellules à partir de ce dispositif consiste à appliquer une fréquence de signal à laquelle les deux types cellulaires réagissent différemment. Pour cela le spectre de DEP des deux types cellulaires a été au préalable mesuré, et la fréquence optimale a été obtenue à 3 MHz où se produit une différence significative, dans le régime de DEP positive, entre les cellules souches et leurs descendants. En effet à 3 MHz, les cellules différenciées possèdent des forces de DEP positive plus intenses que celles des cellules souches, résultant alors en une plus large déviation latérale des cellules ostéoblastes que celle des cellules hMSC. Or de nombreuses cellules seront ralenties ou restent piégées aux bords des électrodes et cela entraîne une faible récupération cellulaire au final. Pour résoudre ce problème, un signal AC modulé tout ou rien a été utilisé. En appliquant un débit de flux total de 1,8 µl min^{-1}, et en absence du champ (Figure. 30.b), les cellules hMSCs et ostéoblastes migrent avec le flux dans la direction de son écoulement à travers le canal sans aucun déplacement latéral et elles sont récupérées par la sortie supérieure du canal en raison de l'écoulement laminaire existant entre

les deux fluides injectés aux deux entrées. Par contre, lorsque le champ est appliqué aux cellules (Figure. 30.c), pour une tension 7,2 V_{pp} à 3 MHz, la plupart des cellules différenciées ostéoblastes (en vert) sont soumises à des forces de DEP intenses d'où elles se dévient latéralement en formant des trajectoires en zigzag liées à la modulation temporelle de la force de DEP et elles se déplacent vers la sortie inférieure du canal. Cependant, les cellules souches hMSCs (en rouge) restent sur une trajectoire directe en raison de trop faibles forces de DEP agissant sur elles. Elles sortent donc par la sortie supérieure du canal.

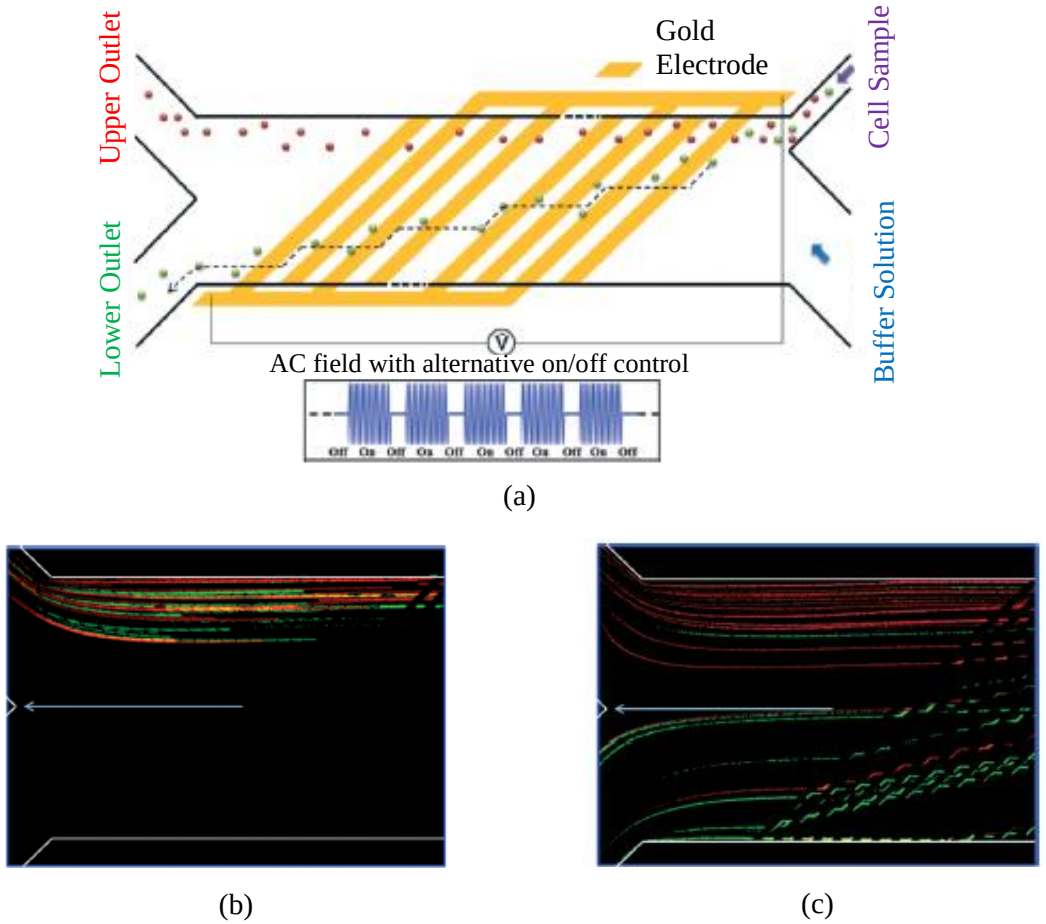


Figure. 30 (a) Design du trieur DEP à flux continu. Trajectoires des cellules hMSCs (en rouge) et ostéoblastes (en vert) : (b) en absence du champ électrique, (c) en présence du champ de tension 7,2 V_{pp} à 3 MHz [98].

Comme nous venons de le voir, la DEP basse fréquence trouve des applications dans la caractérisation et la séparation de cellules biologiques. Toutefois, le tri en basse fréquence est essentiellement basé sur les propriétés membranaires des cellules. Dans ce contexte, il sera intéressant d'interroger de plus le contenu intracellulaire, dans le cadre de la caractérisation et le tri de cellules, comme l'analyse de ses caractéristiques diélectriques qui peut donner des

informations relatives aux propriétés biologiques et aux mécanismes physiologiques de la cellule. La transposition des techniques de DEP aux hautes fréquences (supérieures à 50 MHz) apparaît donc une méthode très prometteuse, car comme nous l'avons déjà démontré à partir de la Figure. 25, la deuxième fréquence de transition f_{x02} dépend notamment des propriétés diélectriques intracellulaires [53]. Ainsi, il est possible d'envisager d'effectuer la caractérisation et le tri cellulaire à partir des propriétés intracellulaires en développant des méthodes de DEP hautes fréquences.

Dans cet objectif, Afshar et al. [90] ont récemment mesuré la réponse diélectrophorétique de cellules biologiques dans une gamme de fréquence allant de 100 kHz à 400 MHz. Le dispositif utilisé repose sur un interféromètre microonde couplé à des électrodes coplanaires (Figure. 31.a) qui a permis notamment de mesurer tout le spectre diélectrophorétique et donc de déterminer les fréquences de transition basses et hautes fréquences de cellules d'ovaires d'hamsters chinois.

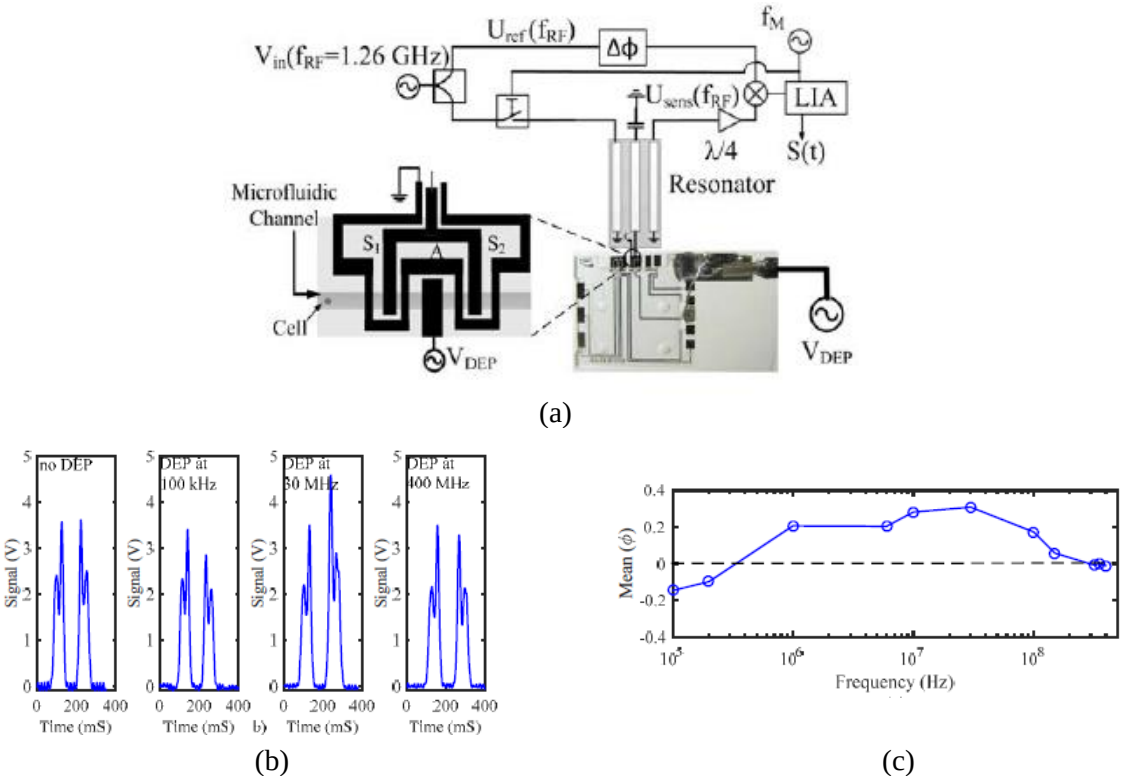


Figure. 31 (a) Cytomètre DEP large bande, (b) exemples de signatures diélectrophorétiques de cellules d'ovaires d'hamster chinois (CHO) pour différentes fréquences de DEP, (c) spectre de la réponse de DEP des cellules CHO présentant les deux fréquences de transition autour de 400 kHz et 300 MHz [90].

Le principe de fonctionnement de l'interféromètre est décrit précisément dans [99]. La Figure. 31.a montre une vue de dessus des électrodes coplanaires utilisées. Elles comprennent une paire d'électrodes d'actionnement (A) pour appliquer la force de DEP et deux paires

d'électrodes de détection (S_1 et S_2) utilisées pour mesurer la réponse diélectrophorétique des cellules.

En fait, l'interféromètre est utilisé pour détecter le changement d'altitude des cellules dans le canal passant au-dessus des électrodes. Ainsi le signal de détection est proportionnel à la variation de la capacité induite par le passage des cellules au niveau des électrodes de détection. Les signaux mesurés par l'interféromètre au niveau des zones de détection (S_1 et S_2) sont fonction de l'amplitude du champ électrique à la position de cellule et ainsi ils permettent de déterminer la modification d'altitude des cellules avant et après l'application de la DEP par la zone d'actionnement (A) à la fréquence d'actionnement. La Figure. 31.b montre qu'aux fréquences 100 kHz et 400 MHz, les cellules passant au-dessus de la zone d'actionnement A, subissent l'effet d'une DEP négative. En effet, dans le cas de la DEP négative, les cellules sont repoussées par les électrodes vers les régions de faible intensité de champ. Alors l'amplitude du signal S_2 diminue. En appliquant un signal RF à la fréquence 30 MHz, les cellules réagissent en DEP positive, elles sont attirées par la zone d'actionnement. Par conséquent l'amplitude du signal S_2 augmente. Dans le cas où la DEP n'est pas appliquée aux cellules, ces dernières restent à la même altitude dans le canal.

Un paramètre nommé indice de force ϕ, lié aux pics de signaux S_1 et S_2, et proportionnel à la partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti $Re[K(\omega)]$, a été mesuré. En effet, les indices négatifs et positifs correspondent respectivement aux comportements de DEP négatives et positives des cellules. La Figure. 31.c montre la transition entre les deux cas de la DEP. Et après une interpolation des données mesurées, les basses et les hautes fréquences de transition sont déterminées.

L'état de l'art des travaux décrits dans la littérature montre que jusqu'à présent, la majorité des signaux appliqués pour la DEP ont été limitées à une fréquence maximale d'environ 30 MHz. Par conséquent, peu d'études ont cherché à exploiter la deuxième fréquence de transition principalement liées au nombre très limité de générateurs de signaux disponibles dans le commerce capables de fournir des tensions supérieures à 12 $V_{pk\text{-}pk}$ pour des fréquences supérieures à 30 MHz [53], [88], [100], et la nécessité de concevoir des dispositifs miniaturisés capables d'appliquer aux cellules ce type de signaux hautes fréquences, requérant une compétence de designs particulière pour les électrodes.

Nous allons donc dans la dernière partie de ce premier chapitre présenter l'évolution actuelle des techniques de DEP-UHF et montrer leurs avancées afin de situer ces travaux de thèse dans leur contexte.

III.4. Quelques exemples de mise en oeuvre de la DEP en haute fréquence

L'une des premières démonstrations de caractérisation de la seconde fréquence de coupure a été réalisée sur des bactéries Escherichia coli au travers des travaux de Castellarnau et al. [101]. L'étude de deux types de bactéries Escherichia coli, normales versus mutantes (c.à.d ayant un allèle mutant), a permis de mettre en évidence la corrélation entre leur réponse diélectrophorétique et leurs propriétés diélectriques. Les mesures ont été réalisées en utilisant une paire d'électrodes en configuration U et T (Figure. 32), et deux générateurs basse et haute fréquence pour générer le signal AC ayant une amplitude 6-10 $V_{pk\text{-}pk}$ dans la bande de fréquence 10 kHz-200 MHz.

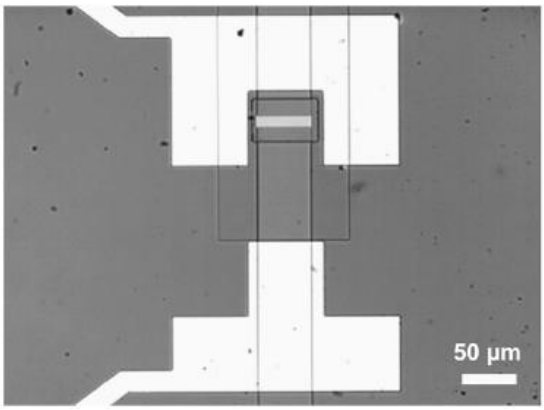


Figure. 32 Paire d'électrodes en configuration U et T pour la manipulation cellulaire par DEP [101].

La méthodologie de mesure consiste à balayer le spectre fréquentiel afin de trouver une transition entre la DEP positive et la DEP négative. A la fréquence de transition, la force de DEP est alors proche de zéro. La Figure. 33 montre qu'en basse fréquence les valeurs de fréquence de transition f_{xo1} des bactéries normales (E.coli 5K) et mutantes (Hha-3 hns, Hha-3 et 5K hns) sont différentes. Par contre, on remarque que les bactéries mutantes présentent à peu près la même fréquence de transition entre elles. Cela s'explique par le fait que les bactéries mutantes présentent des propriétés d'enveloppe membranaires similaires. Par contre en haute

fréquence une différence de la deuxième fréquence de transition f_{xo2} entre les bactéries mutantes, normales et mutantes elles-mêmes est liée à la conductivité du cytoplasme.

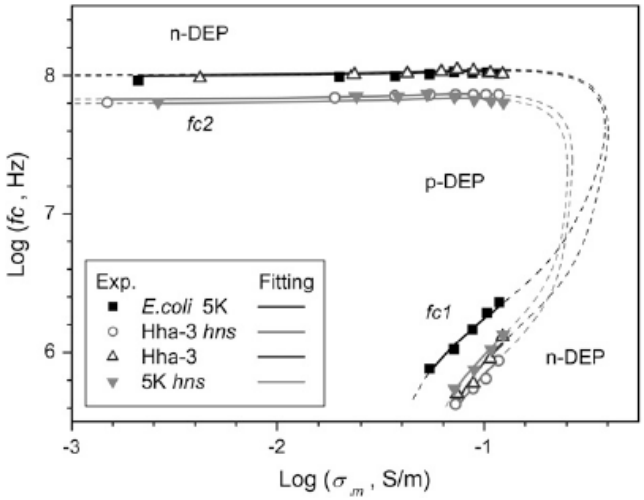


Figure. 33 Evolution des fréquences de transition f_{xo1} et f_{xo2} en fonction de la conductivité du milieu [101].

Une autre étude intéressante réalisée par Chung et al. [88] propose la caractérisation haute fréquence (détermination de la deuxième fréquence de transition f_{xo2}) de cellules de myélome (cellules cancéreuses du plasma sanguin). Pour effectuer les mesures de f_{xo2}, ils ont utilisé le système électrique présenté sur la Figure. 34.a. Ce dernier est composé d'un générateur qui fournit une onde sinusoïdale entre 2 MHz et 500 MHz avec une tension égale à 2 $V_{pk\text{-}pk}$. Le générateur est relié à un amplificateur de puissance avec un gain d'environ 17,5 dB lorsqu'il est relié à une charge de 50 Ω. C'est pour cette raison qu'une résistance de 50 Ω est associée en parallèle à la structure d'électrodes interdigitées utilisées pour générer le gradient de champ électrique et donc la force de diélectrophorèse. Pour déteminer f_{xo2}, les auteurs ont diminué progressivement la fréquence du signal à partir de 400 MHz, pour voir à partir de quelle fréquence les cellules excitées par le champ électrique subissent un mouvement de transition de la DEP négative (au-dessus des électrodes) à la DEP positive (aux bords des électrodes). La Figure. 34.b montre que la grande majorité des cellules subissent cette transition à la fréquence de 195 MHz qui est donc la valeur retenue de f_{xo2} pour ce type cellulaire.

En outre, ils ont étudié l'influence de l'osmolarité du milieu de suspension sur la valeur de la fréquence de transition f_{xo2}. La Figure. 34.c montre que les solutions possédant une osmolarité élevée ont tendance à entraîner des basses valeurs de f_{xo2}.

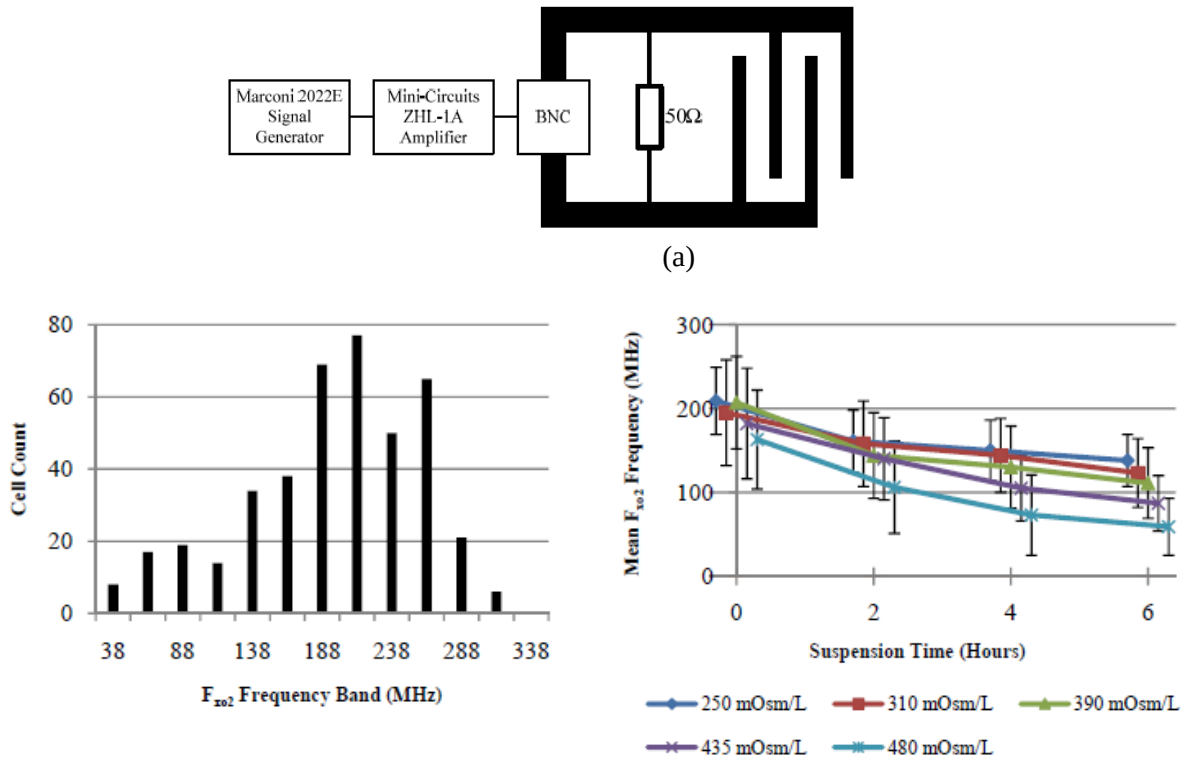
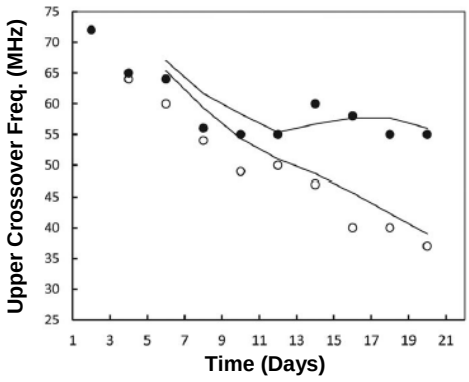


Figure. 34 (a) Schéma du système électrique haute fréquence, (b) spectre de f_{xo2} pour les cellules de myélome (n=418) suspendues dans un milieu de DEP possédant une osmolarité 310 mOsm/L et une conductivité 33 mS/m, c) fréquence de transition f_{xo2} moyenne de cellules de myélome suspendues dans des milieux de DEP possédant différentes osmolarités [88].

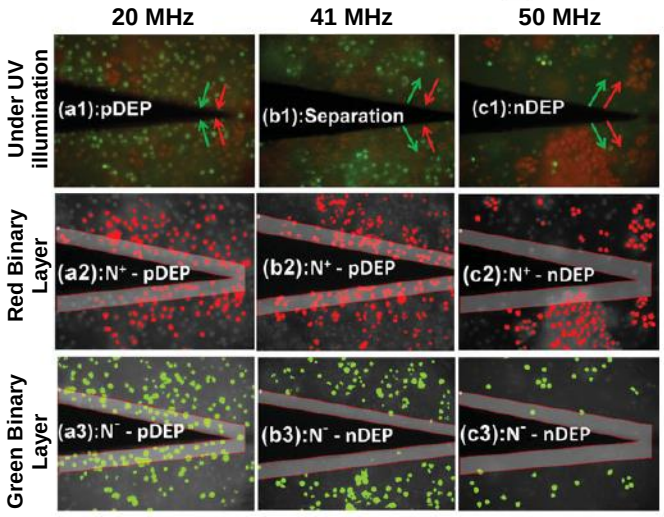
Hadady et al. [89] ont également utilisé des techniques de DEP haute fréquence pour étudier la réponse diélectrophorétique haute fréquence de cellules microalgues (*Chlamydomonas reinhardtii*) à différents teneurs en lipides.

Dans cette étude, les cellules de microalgues ont été cultivées dans deux milieux différents, N^+ (milieu riche en azote) et N^- (milieu pauvre an azote). Les mesures ont été réalisées en appliquant aux électrodes de forme d'aiguille ayant un gap 100 µm, un signal sinusoïdal amplifié dans la gamme 20-80 MHz avec une amplitude de 30 $V_{pk\text{-}pk}$. L'étude menée montre qu'en fonction du temps, dans le milieu N^-, la concentration en lipides augmente dans les cellules de microalgues, par contre dans le milieu N^+ la concentration en lipides reste à peu près constante. Sur la même période de culture, la Figure. 35.a montre que les hautes fréquences de transition des cellules N^- et N^+ diminuent. Cependant, la diminution de la haute fréquence de transition des cellules contenant plus de lipides est plus forte que celle des cellules contenant une teneur faible en lipides. Ainsi, comme la haute fréquence de transition est liée aux

propriétés diélectriques du cytoplasme, cela permet de suivre les modifications du cytoplasme des cellules en culture dans les deux milieux durant toute la période de culture.



(a)

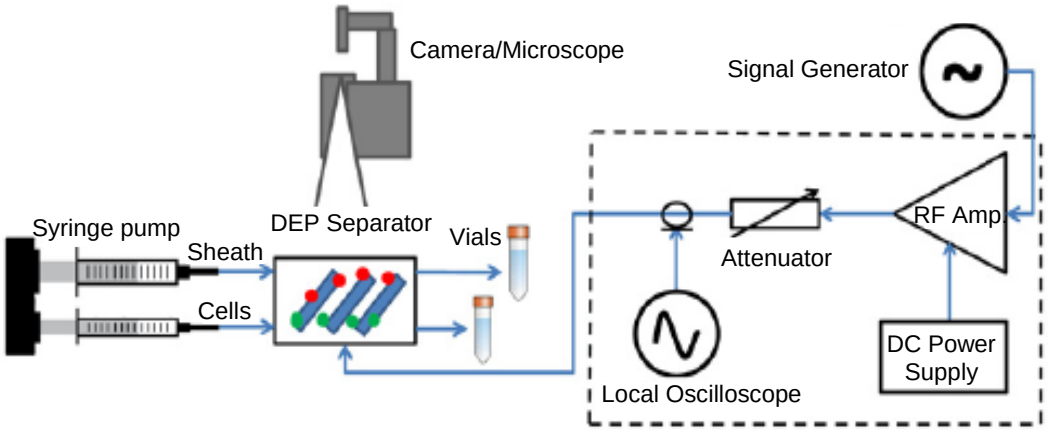


(b)

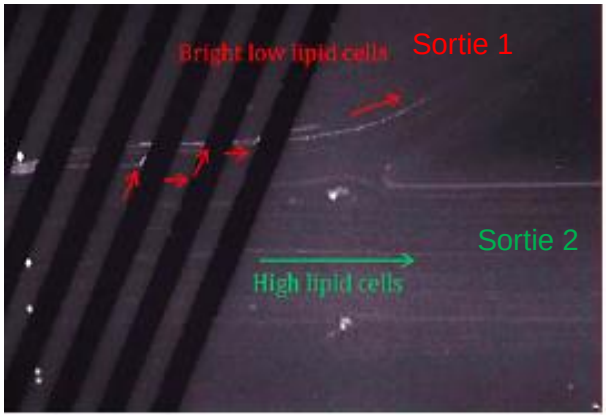
Figure. 35 (a) Fréquence de transition de • cellules N^+ et ◦ cellules N^- en fonction du temps, dans un milieu de conductivité 106 ± 1 µS/cm, (b) séparation de cellules microalgues de faible et forte teneur de lipides par la diélectrophorèse haute fréquence [89].

En effet à la fin de la période de culture, dans un milieu de suspension ayant une conductivité 106 ± 1 µS/cm, le décalage obtenu entre les deux fréquences de transition, des cellules N^- et N^+, est de l'ordre de 13 MHz. En utilisant ces conditions, la Figure. 35.b montre qu'il est possible de séparer assez simplement les cellules de microalgues en statique, de teneur en lipides différentes, en appliquant une fréquence intermédiaire de valeur 41 MHz. En effet, à cette fréquence, les cellules ayant une faible teneur en lipides vont réagir en DEP positive alors que les cellules ayant une forte teneur réagissent en DEP négative.

De plus Hadady et al. [102] ont essayé de trier des cellules microalgues à différentes teneurs en lipides en flux, en utilisant également la technique de DEP haute fréquence. Le signal amplifié est généré par le banc expérimental décrit sur la Figure. 36.a. Il a été appliqué à des électrodes interdigitées placées à 45° et espacées de 50 µm, à un signal de fréquence 50 MHz et d'amplitude 30 $V_{pk\text{-}pk}$ pour générer les forces de DEP qui agissent sur les cellules de microalgues.



(a)



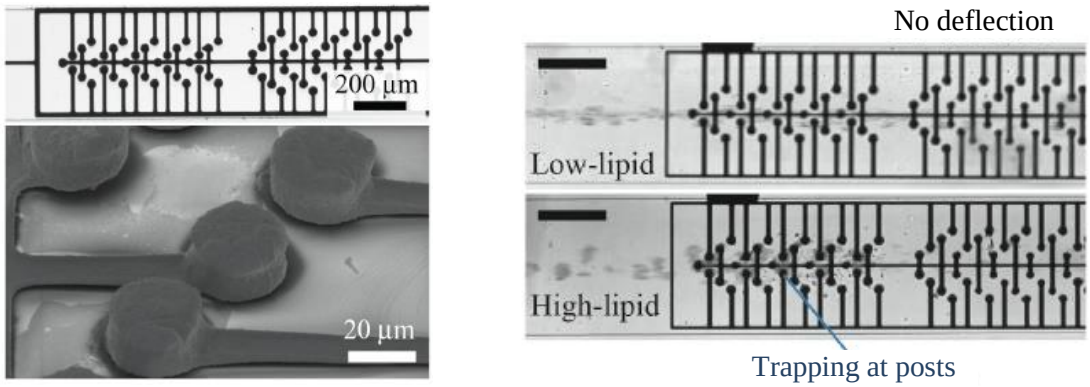
(b)

Figure. 36 (a) Schéma du banc expérimental haute fréquence, (b) séparation des cellules de microalgues de faible et forte teneur en lipides sous l'action d'un champ électrique appliqué à 50 MHz pour une tension 30 $V_{pk\text{-}pk}$ [102].

Pour séparer les cellules en flux, ils ont trouvé que la fréquence optimale qui permet de générer une différence significative de $Re[K(\omega)]$ entre les cellules de faibles et fortes teneurs en lipides, est située entre 40 et 60 MHz. Ainsi à la fréquence 50 MHz, les cellules de faible teneur de lipides réagissent en DEP positive et elles sont transférées dans une trajectoire zigzag

à la sortie 1. Par contre, les cellules de forte teneur de lipides sont soumises à des forces de DEP négative ou non et elles continuent sa trajectoire jusqu'à la sortie 2 (Figure. 36.b).

Sur le même principe, Schor et Buie [103] ont fabriqué un trieur sur la base de la diélectrophorèse pour séparer des microorganismes contenant des lipides, en utilisant des champs électriques alternatifs en haute fréquence. La Figure. 37.a montre le dispositif qui a été utilisé. Il est formé d'une série de plots conducteurs d'épaisseur 15 µm, qui s'étendent sur la hauteur du canal microfluidique ce qui permet de générer un champ électrique homogène dans le canal. Ce trieur a été testé avec des levures oléagineuses contenant différents teneurs en lipides. Ainsi à une fréquence 150 MHz (Figure. 37.b), les levures en flux, ayant une faible teneur en lipides ne réagissent pas en DEP ; par contre les levures ayant une forte teneur en lipides sont attirées et piégées sur les plots métalliques.



(a) (b)

Figure. 37 (a) Dispositif du tri formé d'une série de plots, (b) comportement diélectrophorétique de cellules de levures à une fréquence 150 MHz [103].

IV. Conclusion

Au cours de ce premier chapitre, en décrivant les différentes techniques de caractérisation et de tri cellulaire avec et sans marquage, nous avons introduit la technique de tri électrique par la diélectrophorèse, qui fera l'objet de nos travaux de thèse. Nous avons vu que cette technique peut efficacement séparer différents types de cellules en se basant sur leurs propriétés diélectriques intrinsèques. Nous avons présenté les fondements de cette technique qui permet également de pouvoir manipuler, caractériser et analyser des cellules. Nous avons mis en évidence que les spécificités de la réponse diélectrophorétique d'une cellule peuvent dépendre fortement des fréquences de transition étant principalement liées aux propriétés diélectriques propres des cellules. Ainsi, chaque type de cellule possède une signature diélectrophorétique unique, qui peut être utilisée pour la caractériser et également pour la séparer des autres cellules. Après avoir décrit la dépendance de la première fréquence de transition (basse fréquence) en fonction des propriétés membranaires et de celle de la deuxième fréquence de transition (haute fréquence) en fonction des propriétés intracellulaires, nous avons souligné l'intérêt de travailler en haute fréquence. Cependant, l'utilisation de la DEP haute fréquence est restée limitée jusqu'à présent en raison de la difficulté de la montée en fréquence. En effet, cela présente un certain nombre de challenges. Dans ce cadre, nos travaux de thèse ont pour but de caractériser différents types de cellules cancéreuses humaines par diélectrophorèse haute fréquence en déterminant leur deuxième fréquence de transition dans les perspectives de pouvoir les trier. Cela a nécessité une structure d'électrodes capable de générer un champ électrique non uniforme aux hautes fréquences qu'il nous a fallu choisir et optimiser (chapitre II) et un banc expérimental haute fréquence que nous avons développé pour réaliser les expérimentations à partir de tels signaux hautes fréquences (chapitre III).

Chapitre II

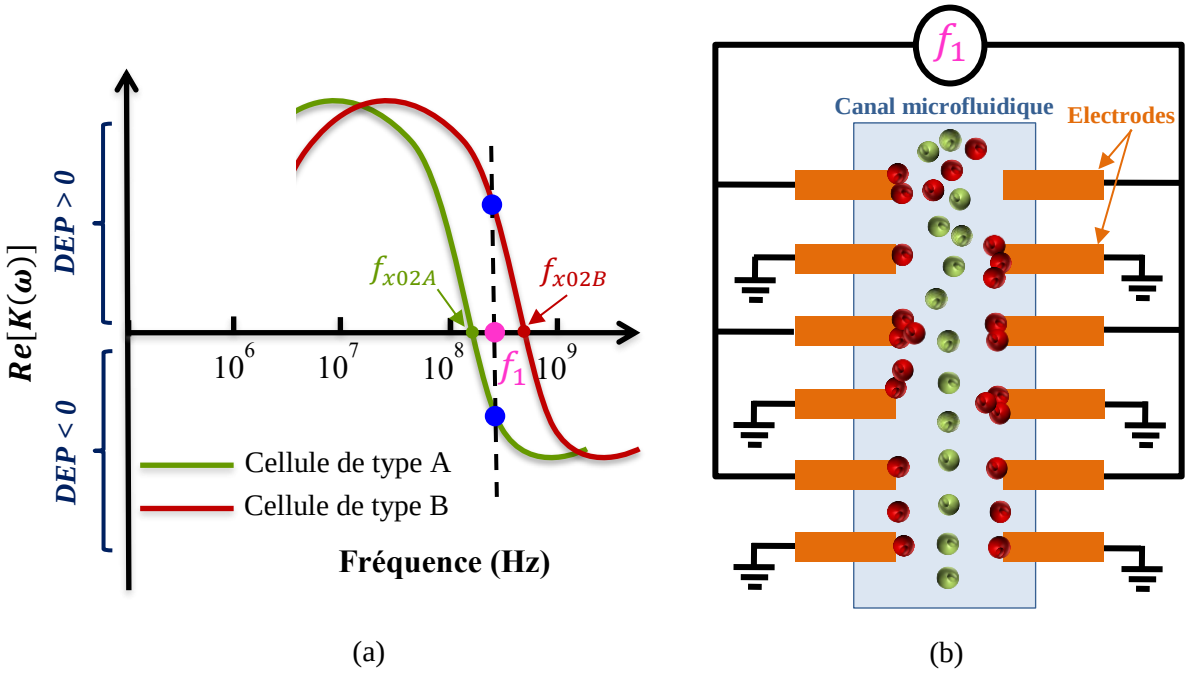
Développement de microsystèmes pour la caractérisation cellulaire par diélectrophorèse Ultra Haute Fréquence

I. Introduction

Au cours du premier chapitre, nous avons mis en évidence l'intérêt de développer des techniques de tri cellulaire basées sur la diélectrophorèse Ultra Haute Fréquence (ou DEP-UHF). En effet, dans ces gammes de fréquences, la membrane cellulaire devient transparente et le champ électrique peut ainsi sonder le contenu intracellulaire dont les propriétés diélectriques sont informatives sur la nature de la cellule ainsi que sur de nombreux paramètres biologiques comme par exemple son état pathologique ou encore son stade de différenciation. D'après l'étude bibliographique réalisée dans le premier chapitre, nous avons montré l'état actuel des travaux permettant de caractériser et/ou de trier des populations cellulaires par une approche de DEP-UHF. Ces études sont principalement basées sur la détermination de la seconde fréquence de transition des cellules qui correspond à la fréquence pour laquelle la force de diélectrophorèse s'annule. Elle est déterminée à partir de l'analyse de la transition de la cellule entre les deux cas de DEP, positive et négative, sous l'application d'un champ électrique non uniforme.

L'objectif principal de mon travail de thèse consiste à étudier la faisabilité de trier en flux, avec un microsystème, différents types de population de cellules humaines cancéreuses par la méthode de diélectrophorèse haute fréquence, notamment en se basant sur les différentes signatures diélectrophorétiques UHF des cellules. Le principe du tri cellulaire proposé est décrit sur la Figure. 38. Nous allons considérer deux populations cellulaires différentes (A et B) que l'on souhaite séparer. Comme nous l'avons vu précédemment, deux types cellulaires distincts, possédant des propriétés diélectriques différentes, présenteront des réponses diélectrophorétiques différentes. Autrement dit en balayant le spectre de fréquences, le passage, pour ces deux types cellulaires, de la DEP positive à la DEP négative se produit à deux fréquences de transition f_{xo2} différentes (Figure. 38.a). Par conséquent afin de trier les cellules de façon efficace, on comprend qu'il sera judicieux de travailler à une fréquence intermédiaire f_1, située entre les deux fréquences de transition f_{xo2}, de façon à ce qu'un type cellulaire réagisse en DEP positive et l'autre réagisse en DEP négative. Par la suite, en concevant un microsystème basé sur le principe d'un cytomètre à déviation progressive ou à rétention et dont la géométrie des électrodes et du canal microfluidique sera optimisé en conséquence, il sera possible de trier les deux types cellulaires A et B en appliquant la fréquence de travail f_1 qui

générera des forces répulsives vis-à-vis du type cellulaire A et des forces attractives vis-à-vis du type cellulaire B. La Figure. 38.b montre un schéma de principe du microsystème envisagé. En générant des maximums de champ à proximité des électrodes, les cellules du type B qui réagissent en DEP positive à f_1 seront attirées aux bords des électrodes alors que les cellules de type A qui réagissent en DEP négative seront repoussées vers le centre du canal microfluidique.



(a) (b)

Figure. 38 (a) Schéma illustrant la réponse diélectrophorétique UHF de deux types cellulaires différents (A et B), (b) principe du fonctionnement du cytomètre.

Pour mettre en œuvre de façon efficace cette méthode de tri, il est nécessaire d'évaluer de façon précise la fréquence intermédiaire f_1 à appliquer pour séparer les types cellulaires d'intérêts. Il faut donc au préalable déterminer la deuxième fréquence de transition f_{xo2} des cellules cibles. Cela nécessite alors le développement d'une technique de caractérisation électrique des populations cellulaires d'intérêt. Plus précisément, pour déterminer finement la valeur de f_{xo2} d'une cellule il est nécessaire de pouvoir mener des caractérisations à l'échelle d'une cellule individuelle. Cela nous a conduit à développer un microsystème spécifique pour la caractérisation des populations cellulaires d'intérêt. La méthode utilisée va s'appuyer sur la recherche de la fréquence pour laquelle la force de DEP s'annule. Ainsi en balayant le spectre de fréquences, la fréquence de transition f_{xo2} peut être déterminée au moment où le mouvement de déplacement de la cellule, soumise au champ électrique non uniforme, inverse son comportement en allant des régions de DEP positive vers les régions de DEP négative.

Ce chapitre sera donc consacré à la conception, l'optimisation et la fabrication de microsystèmes basés sur le principe de caractérisation cellulaire DEP-UHF. D'abord, nous présenterons différents types de géométries d'électrodes conventionnellement utilisées pour la DEP. Nous discuterons les différences qu'elles présentent ainsi que leurs avantages et inconvénients pour identifier le type de structure qui sera le mieux adapté à notre problématique. Ensuite, nous détaillerons la partie conception et optimisation électrique de la structure qui nous permettra de caractériser individuellement les cellules. Dans notre cas, la structure du microsystème sélectionnée va être implémentée en technologie *Bipolar Complementary Oxide Semiconductor* (BiCMOS). Cette technologie nous offre plusieurs avantages à terme :

- Miniaturisation complète du système :
    - qui conduit à réduire la taille des électrodes et les espaces inter-électrodes ce qui implique alors le recours à des tensions plus faibles pour générer des intensités de champ très intenses. Ce facteur paraît très intéressant dans la génération des tensions raisonnables et surtout en haute fréquence en faisant face à la problématique que nous avons discutée dans le premier chapitre vis-à-vis de la problématique de trouver facilement des générateurs qui peuvent générer des hautes tensions pour des signaux hautes fréquences [104].
    - qui permet de réduire le volume de l'échantillon à utiliser.
    - qui permet de réduire le temps de manipulation et de caractérisation [105].
    - qui permet de travailler à l'échelle d'une cellule individuelle.
- Intégration monolithique complète du dispositif de caractérisation DEP avec plusieurs fonctions, qui seront implémentées sur la même puce : la partie microfluidique (injection des cellules en suspension), la partie électronique (génération des signaux de DEP haute fréquence, électronique de commande, contre réaction…), et la partie manipulation et caractérisation cellulaire.

Nous pouvons donc voir que nous allons en fait travailler à partir d'une forme de laboratoire sur puce électronique. La partie fabrication du microsystème implémenté sur une puce BiCMOS sera également présentée. Cette fabrication a été menée dans le cadre d'une collaboration avec *IHP Microelectronics* en Allemagne.

Une première géométrie proposée pour le cytomètre sera présentée ultérieurement dans ce manuscrit (chapitre IV), ainsi que des simulations qui montrent son principe de fonctionnement.

II. Différentes géométries d'électrodes pour la caractérisation cellulaire par DEP

La caractérisation cellulaire par la technique de diélectrophorèse haute fréquence consiste à mesurer la fréquence de transition f_{xo2} lorsque la cellule bascule d'une position de DEP positive vers celle de DEP négative. Nous rappelons qu'en DEP positive, les cellules sont attirées vers les régions de forte intensité de champ électrique tandis qu'en DEP négative, les cellules sont repoussées vers les régions de faible intensité de champ. Alors dans ce cadre, il est nécessaire de générer un profil de champ électrique qui permettra de définir des positions privilégiées pour les cellules aussi bien en DEP négative que positive. Dans l'objectif de mettre au point des dispositifs qui permettent de générer des configurations de champs électriques intéressantes et qui sont bien adaptées à la mesure de la fréquence de transition, nous avons cherché quelle géométrie d'électrodes serait la plus appropriée. Nous présentons dans cette partie, les différentes géométries de microélectrodes les plus couramment utilisées et celle que nous avons sélectionnée.

II.1. Bénéfices d'une implémentation microsystème

Comme nous l'avons déjà vu dans le premier chapitre d'après l'équation (I-5), l'intensité de la force diélectrophorétique F_{DEP} dépend principalement du volume de la particule (r^3) et de l'intensité du gradient de champ électrique ($\vec{\nabla}E^2$). Dans notre étude, les cellules biologiques à caractériser possèdent des diamètres relativement faibles qui peuvent varier de 10 à 20 µm. Par conséquent, l'intensité de la force de DEP qui pourra être générée sur ces particules sera relativement faible également, et pourra ne pas être suffisante pour générer un déplacement efficace des cellules. Pour compenser cet effet, l'intensité du gradient de champ électrique doit être très intense afin d'amplifier l'effet de la force de DEP pour permettre le déplacement de la cellule à l'endroit désiré et surmonter l'effet du mouvement Brownien des cellules dans leur milieu (mouvement exercé sur les cellules par les molécules du milieu soumises à l'agitation thermique). Comme $\vec{\nabla}E^2 = \frac{tension^2}{distance^3}$, deux paramètres vont permettre de générer un fort gradient de champ électrique : l'augmentation de la différence de potentiel appliquée aux électrodes et la miniaturisation des électrodes avec la diminution de la distance inter-électrodes. L'augmentation trop importante du niveau de tension appliqué aux électrodes n'est pas souhaitable dans la mesure où nous souhaitons éviter les effets thermiques et d'électroporation délétères pour les cellules. Ainsi, la miniaturisation des électrodes s'impose comme la solution

à retenir. Ainsi l'apport majeur des microsystèmes pour la diélectrophorèse est de permettre de générer des forces diélectrophorétiques intenses avec de faibles tensions appliquées, grâce à des distances inter-électrodes micrométriques. De plus, les systèmes de tailles micrométriques permettent d'intégrer la microfluidique. La microfluidique est définie comme étant la science et la technologie des systèmes qui permet la manipulation de petits volumes de fluides (10^{-9} à 10^{-18} litres) dans des canaux ayant des dimensions allant de dizaines à des centaines de micromètres [106]. Elle permet alors de réduire les volumes d'échantillons du fluide d'analyse nécessaires et elle facilite ainsi grandement les conditions expérimentales lorsque l'on veut travailler à l'échelle de la cellule individuelle.

Dans ce qui suit, nous allons voir la grande variété de géométries de microélectrodes que l'on peut trouver dans la littérature et discuter les avantages et inconvénients des plus couramment utilisées.

II.2. Choix de la géométrie des microélectrodes pour la caractérisation DEP-UHF

Il existe une grande variété de structures de microélectrodes permettant de générer des gradients de champ électrique afin d'appliquer des forces de DEP. La configuration la plus adaptée dépend en grande partie de l'application visée. Notre objectif est de générer des forces de DEP capables de piéger les cellules en DEP positive et négative, et d'induire un déplacement bien visible de la particule entre les deux régions de fortes et de faibles intensités de champ. La Figure. 39 présente les structures de microélectrodes de DEP les plus couramment utilisées [56], [57], [107]. Parmi elles, on trouve les microélectrodes parallèles ou interdigitées (Figure. 39.a) [108], les électrodes interdigitées à créneaux (Figure. 39.b), les électrodes obliques (Figure. 39.c) et les structures à 4 électrodes ou quadripôle (Figure. 39.d) [109].

Afin d'identifier à partir de ces configurations d'électrodes laquelle serait la plus appropriée dans le cadre de nos travaux, nous avons réalisé une étude par simulation électromagnétique pour chacune des configurations d'électrodes de façon à quantifier l'intensité du profil du gradient de champ électrique généré. En effet, les simulations ont été menées avec le logiciel Comsol Multiphysics. Ce logiciel permet de modéliser et de simuler des phénomènes physiques par la méthode des éléments finis, dans des structures en 2D et 3D. Il comprend plusieurs modules (AC/DC : électromagnétisme, CFD : fluidique, transfert de chaleur, trajectoires de particules,…) et il permet de coupler entre les différentes physiques selon les conditions exigées de l'étude [110].

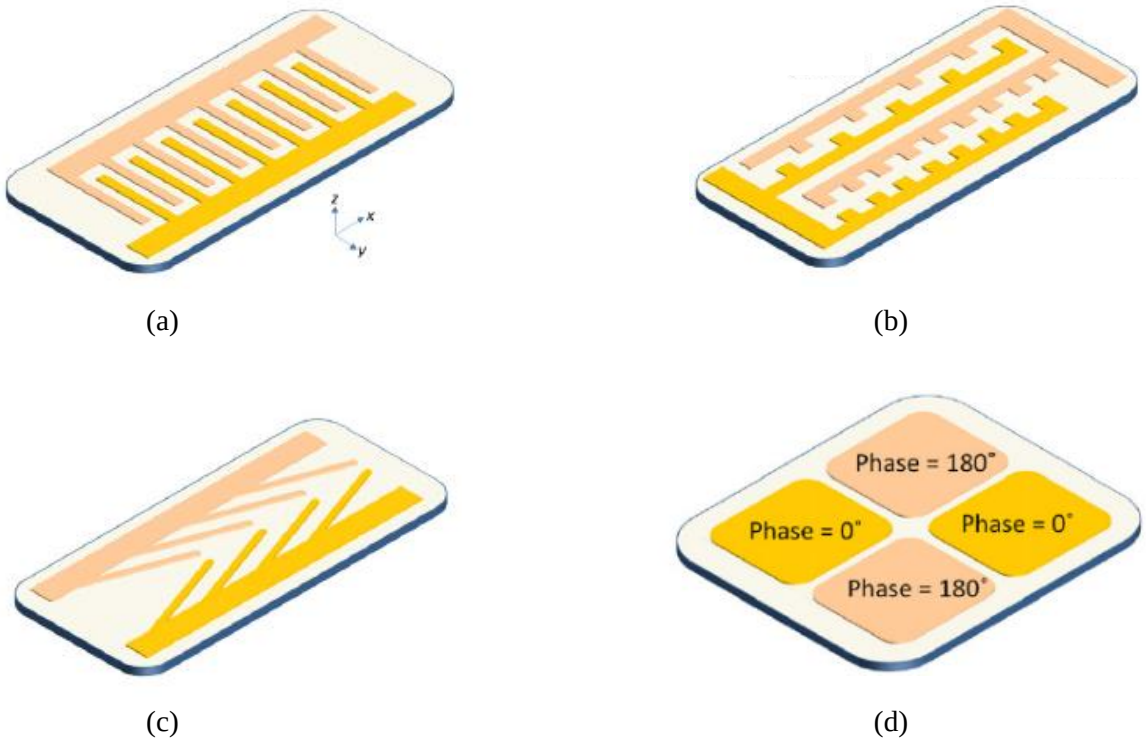


Figure. 39 Diversité de configurations de microélectrodes pour appliquer des signaux de DEP : (a) électrodes parallèles ou interdigitées, (b) électrodes interdigitées à créneaux, (c) électrodes obliques, (d) quadripôle [57].

II.3. Etude de différentes géométries d'électrodes

Dans cette partie, nous allons utiliser le type de simulation « Courant électrique » du module AC/DC pour simuler la distribution du champ électrique générée par chaque géométrie d'électrodes. En outre, le logiciel Comsol Multiphysics permet de coupler à l'étude des champs électromagnétiques, l'écoulement microfluidique dans le canal si nécessaire. Notons que les cellules à caractériser sont en suspension et elles sont injectées dans un canal microfluidique pour atteindre la zone de caractérisation, alors durant les simulations nous considérons que les électrodes sont disposées dans un canal microfluidique contenant le milieu de suspension, qui est modélisé par un milieu diélectrique homogène dont la vitesse d'écoulement est nulle (c.à.d. dans des conditions statiques). En effet, il nous faudra stopper la vitesse du flux dans le canal, car durant les expérimentations nous devrons à un moment arrêter le flux afin d'assurer que le fluide dans le canal n'exerce pas de forces sur la cellule entraînant son déplacement lors de son analyse. Ainsi, nous pouvons être sûrs que seule la force de DEP peut agir sur le déplacement de la cellule durant sa caractérisation.

Pour débuter l'étude et pouvoir confronter des données expérimentales aux différentes simulations, les microélectrodes simulées ont été fabriquées et testées expérimentalement. C'est pour cette raison que dans un premier temps, les simulations seront réalisées en basses fréquences. En effet, le banc de mesure BF nécessaire est très facile et rapide à mettre en place. C'est pour cela que les simulations électriques ont été tout d'abord effectuées à 500 kHz et pour une tension 5 V_{pp}. Le choix de la valeur de la tension appliquée aux géométries de microélectrodes est basé sur le fait de générer un gradient de champ bien marqué au niveau de la structure, de telle sorte que l'intensité du champ généré n'affecte pas la viabilité de la cellule. En effet il est important d'assurer la génération d'une intensité de champ dans les ordres de 10^4 V/m, pour éviter les risques de lyse électrique des cellules, et la formation des pores dans leur membrane [111]. En fait, si des pores sont amenées à se former dans la membrane cellulaire, des échanges auront lieu entre les milieux intra et extracellulaires, par la suite cela conduit au changement des propriétés membranaires et intracellulaires, et dans des cas extrêmes cela peut entraîner la mort des cellules. Ainsi, nous appliquons aux structures une tension de l'ordre de 5 V_{pp}, et nous présenterons le profil du gradient de champ simulé en échelle logarithmique, en le normalisant par rapport à une valeur d'intensité de champ maximale à ne pas dépasser de l'ordre de $1{,}5\times10^5$ V/m.

Les simulations des différentes géométries d'électrodes seront effectuées en 3D, comme ces électrodes peuvent avoir une épaisseur de l'ordre de 1 µm et le canal une épaisseur de 25 µm. Les électrodes sont en or dont la conductivité électrique considérée est de l'ordre de $4{,}1\times10^7$ S/m. Le milieu de suspension, dont nous détaillerons la composition dans le troisième chapitre, est majoritairement constitué d'eau déionisée et de sucrose, et il est modélisé par les propriétés diélectriques suivantes : une permittivité relative de 80 et une conductivité électrique de 20×10^{-3} S/m dans la gamme de fréquences visées. En fait, cette faible conductivité du milieu permet aux cellules de réagir durant leurs manipulations aussi bien avec des signaux DEP positifs que négatifs. Concernant les conditions aux limites, une différence de potentiel de 5 V_{pp} est créée afin de polariser les électrodes. Certaines électrodes prendront donc la valeur du potentiel électrique 0 V et d'autres la valeur 5 V_{pp}. Pour le milieu, une charge nulle est considérée sur toute sa frontière extérieure et des conditions de conservation de charges lui sont appliquées.

La taille moyenne des cellules que nous cherchons à caractériser sera comprise entre 10 et 20 µm. Nous avons donc dimensionné et optimisé les géométries des microélectrodes en conséquence. Ainsi, la taille de cellule impose une distance minimale entre les inter-électrodes

si l'on veut pouvoir déplacer les cellules des zones de faible champ aux zones de fort champ électrique. En effet, une distance inter-électrodes de trois à quatre fois la taille de la cellule semble ici plus appropriée.

La première structure que nous avons étudiée est celle de la capacité interdigitée avec un réseau d'électrodes distantes de 40 µm (Figure. 40.a). La distribution de champ électrique générée par la capacité est illustrée sur la Figure. 40.d. Elle présente des zones de faibles intensité de champ au-dessus des électrodes, cela signifie que les cellules pourront y être potentiellement piégées en DEP négative ; alors qu'il existe une concentration plus importante du champ électrique dans les espaces interdigitaires qui constituent donc à priori une zone de piégeage privilégiée en DEP positive. Comme cette structure est composée d'un réseau d'électrodes, alors beaucoup de cellules vont être soumises au champ électrique généré et par suite l'étude du comportement diélectrophorétique de nombreuses cellules peut se réaliser simultanément. C'est pourquoi, c'est la structure la plus utilisée généralement et la plus pratique. Cependant, comme nous nous intéressons à investiguer précisément la réponse d'une cellule en basculant entre la DEP positive et la DEP négative, cette structure apparaît assez contraignante. En fait, la distance définie entre le maximum et le minimum du champ électrique est très faible, en conséquence le déplacement de la cellule entre ces deux régions de DEP risque d'être difficile à observer et à suivre. Pour dépasser cette contrainte, nous avons essayé d'élargir le gap et les électrodes à une dimension de 60 µm (Figure. 40.b). Dans ce cas et pour la même tension appliquée 5 V_{pp} aux électrodes, nous remarquons que l'intensité du champ électrique générée dans le gap 60 µm (Figure. 40.e) est faible par rapport à celle générée dans le gap 40 µm (Figure. 40.d). Ainsi, les zones de fortes intensités de champs électriques deviennent moins efficaces à attirer les cellules en DEP positive.

D'autre part, pour faire évoluer la structure de la capacité interdigitée de 60 µm tout en générant des champs électriques intenses, une variante consiste à ajouter des petits créneaux sur chaque doigt de la capacité (Figure. 40.c). Cette configuration présente l'avantage d'accentuer l'effet du gradient de champ entre les doigts de cette capacité (Figure. 40.f). Nous observons un maximum de champ plus localisé se trouvant entre deux créneaux se faisant face, où la cellule pourra y être potentiellement piégée en DEP positive. Tandis qu'elle devrait en toute logique se déplacer en DEP négative vers les creux formés entre les créneaux consécutifs ou au-dessus des créneaux.

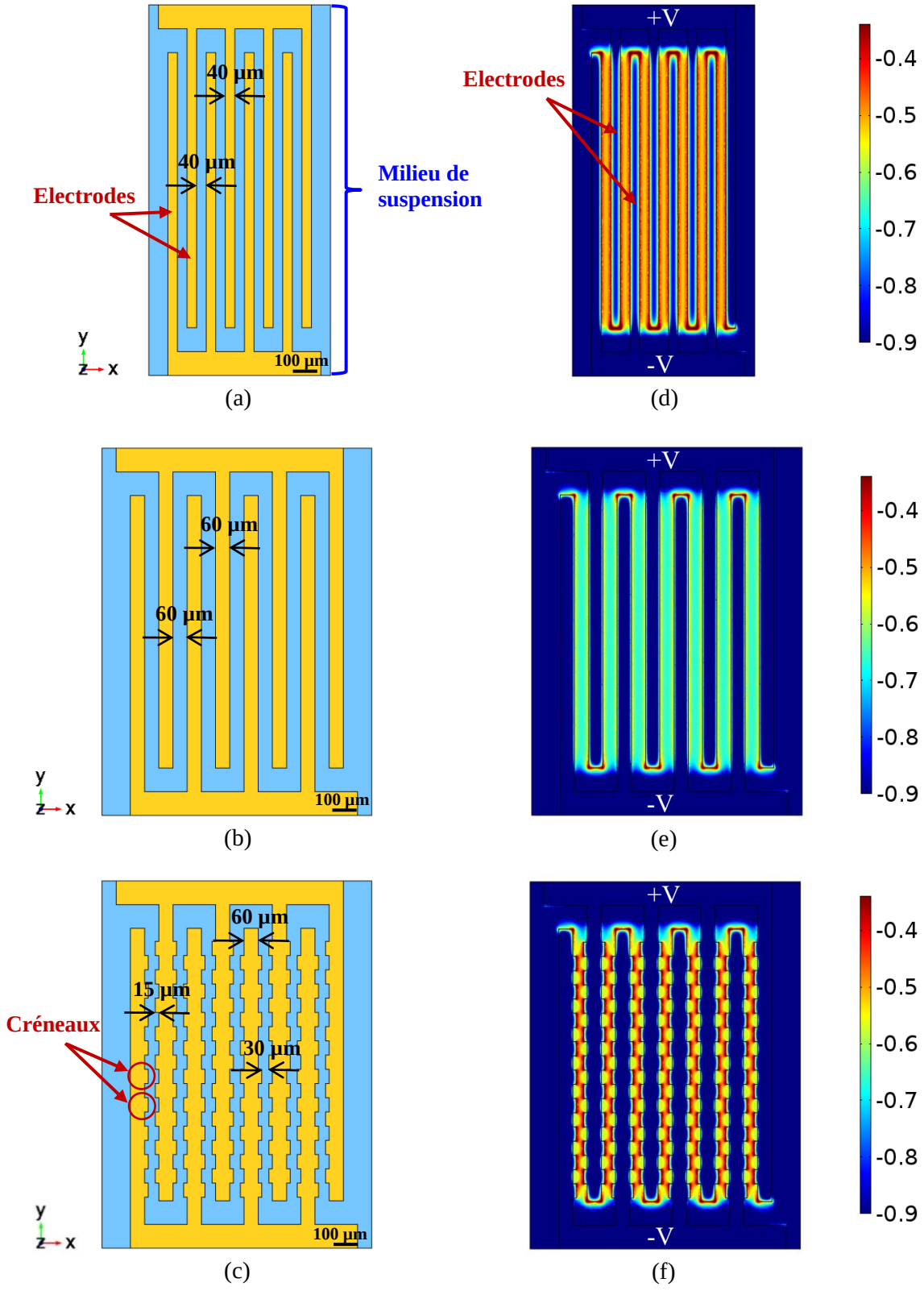
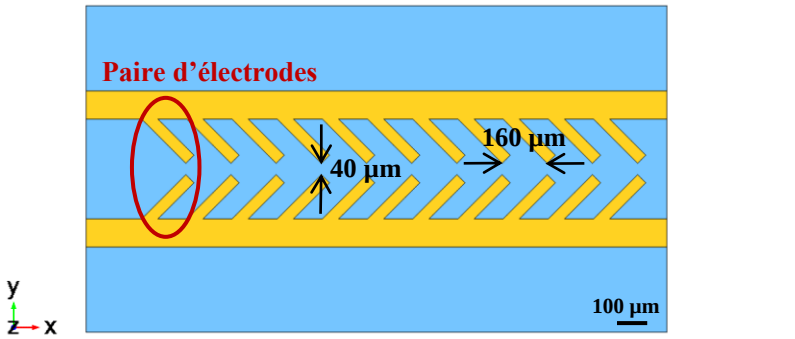


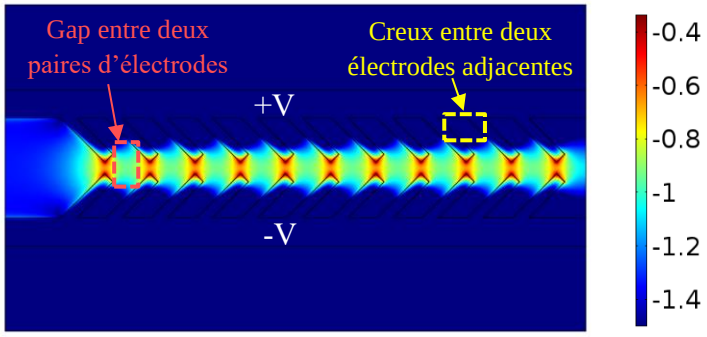
Figure. 40 (a) et (b) Géométrie de la capacité interdigitée, (c) structure de la capacité interdigitée à créneaux. Distribution du champ électrique, pour une tension 5 V_{pp} à une altitude z = 5 µm, pour les configurations : de capacité interdigitée avec un réseau d'électrodes d'espace interdigitaire (d) 40 µm, (e) 60 µm, et de (f) capacité interdigitée à créneaux.

En conséquence le déplacement de la cellule lors du basculement entre la DEP positive et négative ne sera pas droit et rectiligne, ce qui risque de rendre l'initiation de ce déplacement difficile à être bien identifié.

Dans un second temps, nous avons étudié la structure composée de deux réseaux d'électrodes obliques (Figure. 41.a). Concernant la répartition du champ électrique générée dans cette structure pour une tension de l'ordre de 5 V_{pp} (Figure. 41.b), nous observons qu'une forte intensité de champ est bien localisée dans le gap situé entre les électrodes qui se font face, où la cellule devrait être attirée en DEP positive. En revanche, nous trouvons que l'intensité du champ généré dans le gap existant entre deux paires d'électrodes adjacentes, n'est potentiellement pas suffisamment faible, pour que la cellule y soit piégée distinctement en DEP négative. Il y a donc un fort risque que la cellule soit repoussée vers le creux formé entre deux électrodes parallèles adjacentes, zones de plus faibles d'intensité de champ. Il sera donc potentiellement difficile de ramener la cellule vers les régions de DEP positive, et ainsi le basculement entre les deux régions de DEP ne sera pas réversible.



(a)



(b)

Figure. 41 (a) Configuration des microélectrodes obliques, (b) distribution du champ électrique pour la structure oblique à une altitude z = 5 µm.

Nous nous sommes également intéressés à la structure à quatre électrodes dite quadripôle. Les quatre électrodes sont disposées à 90° les unes des autres comme le montre la Figure. 42.a. Nous avons considéré deux types de polarisation des électrodes : polarisation au même potentiel de deux électrodes adjacentes (Figure. 42.b), dans ce cas le maximum de champ se trouve entre deux électrodes adjacentes ayant différentes polarités et le minimum se situe entre les électrodes de même polarité, et polarisation au même potentiel de deux électrodes opposées. Dans cette dernière configuration, illustrée par la Figure. 42.c, nous observons une distribution du champ électrique qui est maximale aux bords et entre les électrodes adjacentes (position potentielle des cellules en DEP positive), alors qu'un minimum de champ électrique bien localisé au centre des électrodes permettrait ainsi de piéger la cellule en DEP négative de manière efficace.

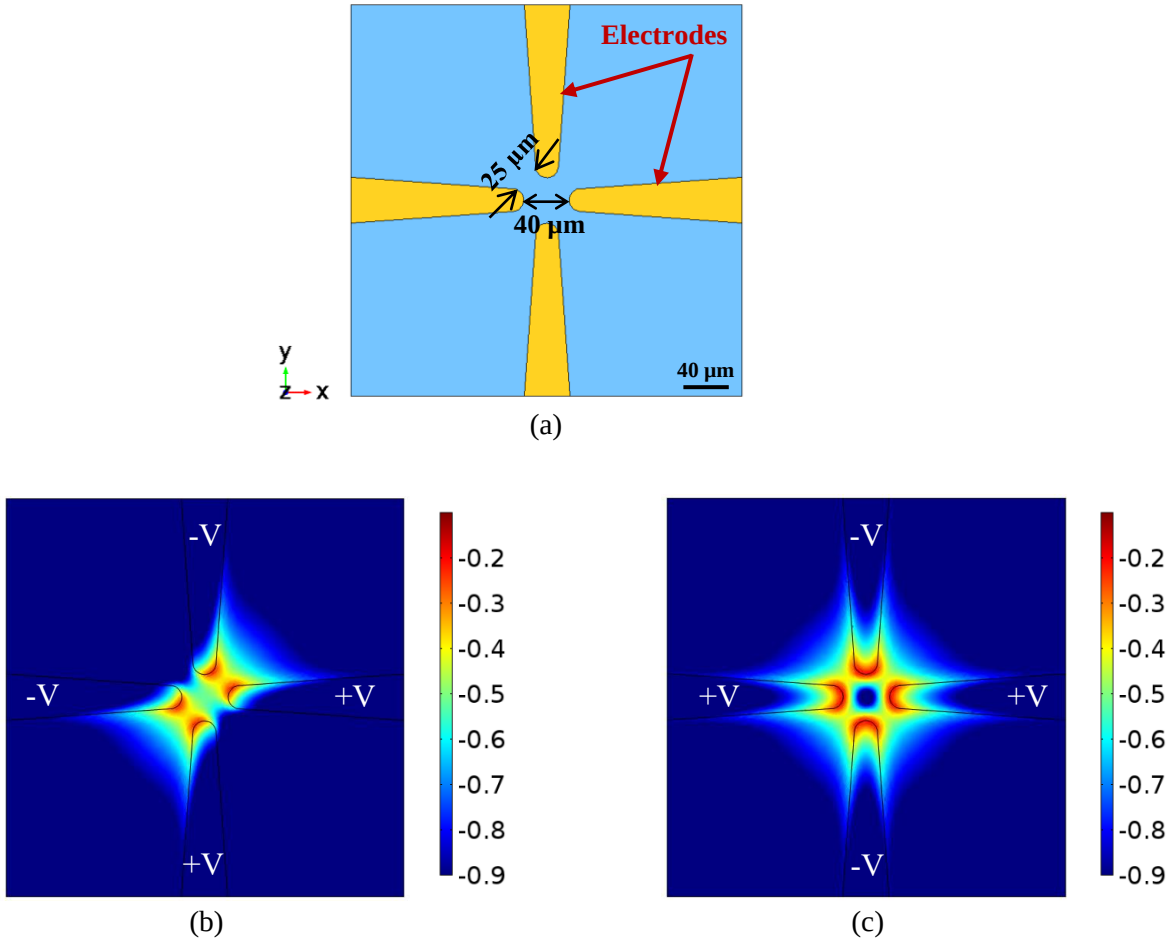


Figure. 42 (a) Géométrie du quadripôle. Profil de l'intensité du champ électrique pour la structure à quatre électrodes à une altitude z = 5 µm : (b) dont deux électrodes adjacentes possèdent la même polarité, (c) dont les électrodes à 180° sont mises à la même polarité.

Nous avons alors souhaité valider l'analyse par simulation par des tests expérimentaux. Dans cet objectif, les différentes configurations de microélectrodes étudiées par simulation ont

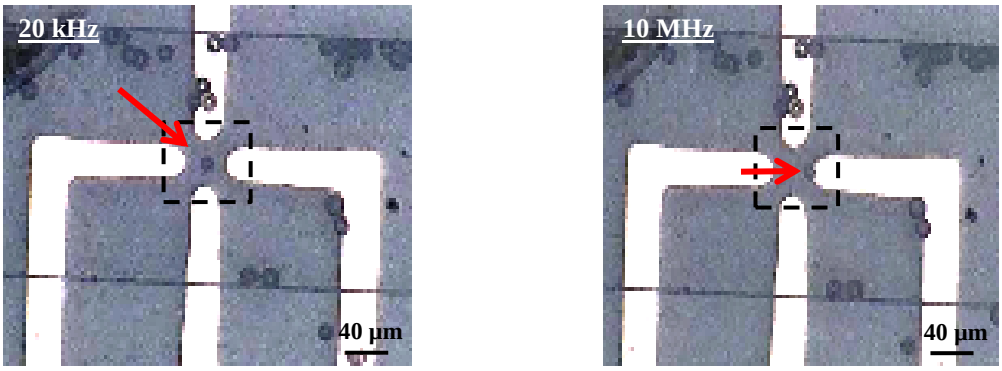
été réalisées dans la salle blanche du laboratoire XLIM, en utilisant des techniques de microélectronique standards (photolithographie UV et gravure chimique). Les microélectrodes réalisées sont formées d'une couche de cuivre ayant une épaisseur de 500 nm. Puis elles sont recouvertes d'une couche d'or électrolysée d'épaisseur 500 nm, de façon à travailler avec des électrodes biocompatibles et qui ne s'altèrent pas dans le temps. Ainsi les électrodes fabriquées possèdent une épaisseur finale de 1 µm. D'autre part, nous avons réalisé un canal microfluidique qui permet de guider les cellules vers les zones d'analyse. En effet, il est réalisé à l'aide de la résine SU8 2025, qui est un polymère couramment utilisé en microfluidique pour ses propriétés de transparence et de biocompatibilité. La profondeur du canal obtenue est de l'ordre de 25 µm.

Nous avons testé les différentes structures avec des cellules cancéreuses du côlon (lignée SW620), dans la gamme basse fréquence 10 kHz-10 MHz afin de choisir la structure qui sera la mieux adaptée à notre étude. Notons que lorsque nous avons démarré les mesures, nous avons remarqué que les cellules en flux dans le canal avaient du mal à interagir avec le champ électrique généré par les électrodes. Cela s'explique par le fait que les électrodes sont fines, elles ne peuvent pas par conséquent générer un champ intense sur toute la hauteur du canal dans lequel des cellules peuvent se trouver à des altitudes élevées, et où elles voient trop peu de champ. C'est pourquoi nous avons privilégié des mesures statiques, c'est à dire que les cellules ne seront pas mises en mouvement dans le canal microfluidique sous l'effet d'un flux. Nous avons ajouté une goutte de suspension cellulaire au niveau des électrodes que nous avons recouvertes par un capot pour que les cellules soient maintenues proches des électrodes.

Les premiers tests ont été menés sur les structures des microélectrodes interdigitées, interdigitées à créneaux, obliques et quadripôle ayant deux électrodes adjacentes de même polarité. En surveillant le comportement diélectrophorétique de la cellule tout en balayant la fréquence du signal appliqué aux électrodes de ces différentes structures, nous avons remarqué qu'elle ne peut pas accomplir un mouvement de translation bien défini entre la DEP négative et positive. Cependant ces structures ne permettent pas de visualiser finement le déplacement des cellules et la transition entre les deux modes de DEP ne peut pas être déterminée précisément. Cependant elles peuvent être un outil efficace pour piéger les cellules.

En revanche, le test de la structure à quatre électrodes polarisées de façon à ce que deux électrodes opposées possèdent la même polarité s'est révélé très prometteur. En effet, elle permet de piéger et de déplacer facilement les cellules entre les deux positions de DEP négative et positive (Figure. 43). Or, en appliquant aux électrodes un signal dont la fréquence est sensée

imposer un comportement de DEP négative à la cellule pour une tension de l'ordre de 5 V_{pp}, nous nous sommes rendu compte que la cellule n'était pas repoussée efficacement dans le piège au centre du quadripôle, notamment pour les cellules se situant proche du capot supérieur du canal. Nous avons donc essayé d'augmenter la tension à 20 V_{pp} pour pouvoir générer des forces diélectrophorétiques plus intenses dans la région présentant un minimum de champ.



(a) (b)

Figure. 43 (a) Cellule piégée en DEP négative au milieu des quatre électrodes à 20 kHz, (b) cellule piégée en DEP positive au bord de l'électrode à 10 MHz.

Après avoir piégé la cellule au centre de la structure, nous avons ramené l'amplitude de la tension à 5 V_{pp}, en faisant alors une étude systématique qui consiste à faire varier la fréquence du signal appliqué aux électrodes. Nous avons remarqué qu'il était possible d'observer les changements du comportement de la cellule durant son déplacement du centre de la structure où elle est piégée en DEP négative à 20 kHz (Figure. 43.a), vers le bord de l'électrode où elle sera piégée en DEP positive à 10 MHz (Figure. 43.b). En effet, nous avons après vérifié la viabilité de la cellule en la basculant plusieurs fois entre les deux positions de DEP, pour les mêmes fréquences sélectionnées.

Confortés par ces résultats expérimentaux, nous avons orienté rapidement notre choix vers cette structure afin de caractériser différents types cellulaires en haute fréquence. En revanche, ces premières expériences montrent clairement la limite d'utiliser des électrodes fines dans le cadre de notre étude. En effet, l'objectif de ces travaux de thèse étant de développer un outil de caractérisation et de tri cellulaire, il est nécessaire alors de pouvoir réaliser les mesures sur des cellules qui seront amenées en flux jusqu'à la zone de caractérisation. Or, le canal microfluidique possède une hauteur qui pourra être amenée à varier mais qui fera à minima 25 µm ; dans la mesure où les cellules à investiguer ont un diamètre moyen de 12 µm, la cellule

peut alors occuper différentes altitudes dans le canal notamment au niveau de la zone de caractérisation. Afin d'assurer un piégeage efficace et une analyse fine des cellules, il est important que la totalité du volume de la cellule interagisse avec le champ électrique, quelle que soit la position de la cellule dans le canal. Ainsi, l'intensité du gradient de champ électrique doit être intense sur la majeure partie de la hauteur du canal, ce qui n'est pas le cas avec des électrodes métalliques fines (Figure. 44). Prenons le cas du champ électrique généré par la structure à quatre électrodes d'épaisseur 1 µm (Figure. 44.a), pour une tension appliquée de 5 V_{pp}, à différentes altitudes dans le canal (Notons que les électrodes sont localisées en z = 0 µm). Les Figure. 44.b et c présentent respectivement la configuration du champ aux altitudes z = 5 µm et 13 µm.

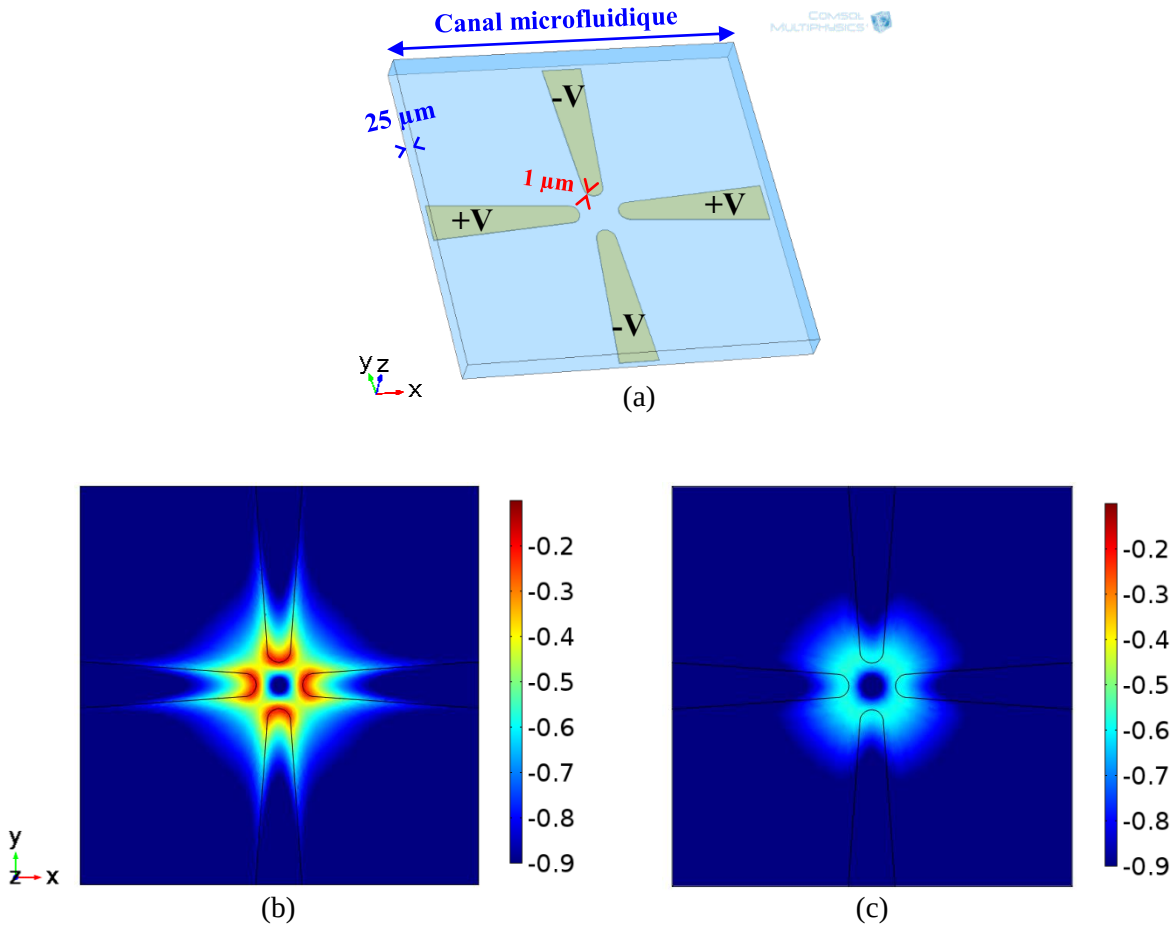


Figure. 44 (a) Structure à quatre électrodes fines permettant l'application du signal de DEP. Vue de dessus de la configuration du champ électrique généré aux altitudes : (b) z = 5 µm, (c) z = 13 µm.

Nous remarquons qu'à une altitude z = 5 µm (Figure. 44.b), les électrodes génèrent un gradient de champ intense dont le minimum et le maximum sont bien identifiés. Par contre lorsque z augmente, et plus précisément au milieu du canal z = 13 µm où la plupart des cellules

seront potentiellement localisées, l'intensité du champ électrique devient très faible (Figure. 44.c). Cela indique que les cellules qui ne sont pas proches du plan des électrodes, n'interagiront pas fortement avec le champ et par conséquent les forces appliquées sur les particules seront faibles et ne permettront pas un déplacement efficace de la cellule.

Dans ce contexte, il semble pertinent d'augmenter l'épaisseur de métallisations des électrodes pour générer un gradient de champ électrique qui soit suffisamment intense sur toute la hauteur du canal microfluidique. Nous nous sommes donc orientés vers la conception de microélectrodes épaisses 3D qui permettront de générer un champ électrique intense qui pourra interagir avec la cellule quel que soit son altitude dans le canal. Nous verrons dans les paragraphes suivants le développement et la conception de la structure à quatre électrodes 3D et l'étude de l'influence de l'épaisseur des métallisations sur le profil du champ.

Nous allons tout d'abord décrire la méthode de caractérisation cellulaire haute fréquence que nous utiliserons pour déterminer la deuxième fréquence de transition propre à la cellule.

III. Méthode de détermination de f_{x02} avec la structure quadripôle

Pour caractériser et analyser une cellule, il faut qu'elle soit amenée vers la zone de caractérisation où le champ électrique sera généré. Dans le cas de la structure quadripôle, cette zone est délimitée par les bords de quatre électrodes. Alors, pour amener une cellule en flux se déplaçant entre ou au-dessus des électrodes vers la zone de caractérisation, nous appliquons un signal dont la fréquence imposera à la cellule un phénomène de DEP négative. En effet comme nous l'avons vu, sous l'application de forces de DEP négative, la cellule sera piégée au centre des quatre électrodes là où l'intensité de champ électrique présente un minimum bien localisé. Par conséquent, nous serons assurés que la cellule piégée est bien localisée dans la zone d'étude, et qu'elle ne peut pas la quitter puisqu'elle est entourée par les zones de forte intensité de champ qui empêchent qu'elle s'échappe vers les zones de faible intensité de champ situées autour de la structure.

D'autre part, après que la cellule soit piégée au milieu de la structure, le flux imposé dans le canal sera stoppé pour être sûr qu'il n'y aura pas d'autres forces de déplacement que la force de DEP qui agissent sur la cellule.

Pour déterminer alors la deuxième fréquence de transition, nous pouvons bien prédire à partir de la Figure. 45 qu'en diminuant progressivement la fréquence du signal, les forces

répulsives appliquées à la cellule deviennent faibles et par conséquent la cellule peut voir sa position d'équilibre changer en s'éloignant du centre du piège. En effet, lorsque la fréquence du signal se rapproche fortement de f_{x02}, la cellule va être sous l'influence de forces de DEP très faibles (quasi nulles) qui justifient que le piège perde de son efficacité. Par la suite, lorsque la fréquence du signal passe en-dessous de f_{x02}, la cellule est soumise de nouveau à des forces de DEP plus fortes et notamment des forces de DEP positive qui vont l'attirer vers les bords d'une des deux électrodes adjacentes.

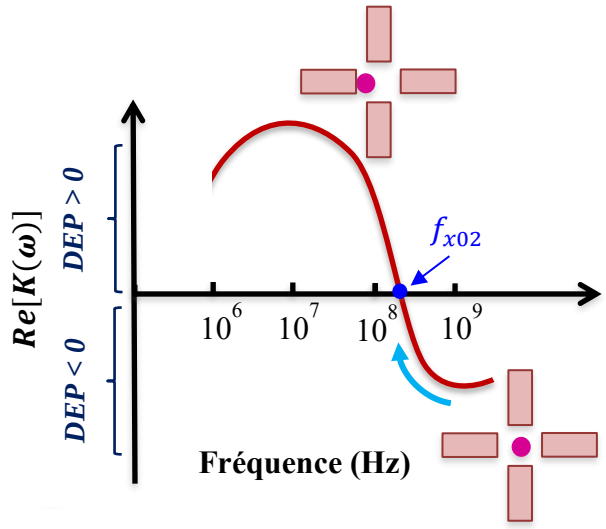


Figure. 45 Schéma du mouvement de déplacement DEP haute fréquence d'une cellule vivante en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué.

Ainsi en surveillant le moment où la cellule accomplit sa transition de la DEP négative à la DEP positive, nous pouvons déterminer la deuxième fréquence de transition de la cellule caractérisée. On voit bien alors la nécessité de générer un gradient de champ localisé bien marqué dans la zone de caractérisation, pour pouvoir déplacer progressivement la cellule entre ces deux positions de DEP et ainsi la caractériser finement.

Pour mener à bien la caractérisation des cellules en hautes fréquences, il sera nécessaire d'optimiser la structure quadripôle en termes de géométrie (optimisation des distances inter-électrodes…) et de compatibilité avec l'implémentation d'un réseau microfluidique (optimisation des écoulements et des trajectoires des cellules…), le tout en s'adaptant aux contraintes de technologie CMOS qui sera utilisée pour fabriquer le microsystème.

IV. Conception du microsystème en technologie CMOS pour la caractérisation DEP haute fréquence d'une cellule individuelle

Comme nous l'avons vu, la réalisation de la fonction de diélectrophorèse intégrée sur puce BiCMOS est très novatrice et présente de nombreux avantages comme l'intégration complète des fonctions électroniques, la miniaturisation du système… Cependant, il va être nécessaire de réaliser un certain nombre d'adaptations sur la structure à quatre électrodes précédemment développée pour qu'elle soit compatible avec la technologie développée par l'Institut allemand *IHP Microelectronics* (*Innovation for High Performance Microelectronics* [112]) qui nous réalisera les puces CMOS. IHP possède des procédés de fabrication standardisés, dans lequel des étapes supplémentaires peuvent être implémentées pour pouvoir intégrer le canal microfluidique sur la puce, ce qui représente une originalité par rapport aux puces standards qui peuvent être réalisées chez d'autres fondeurs.

IV.1. Présentation du procédé BiCMOS standard d'IHP

La technologie BiCMOS d'*IHP Microelectronics* que nous allons utiliser est basée sur le procédé BiCMOS SG25H4 présenté par la Figure. 46.

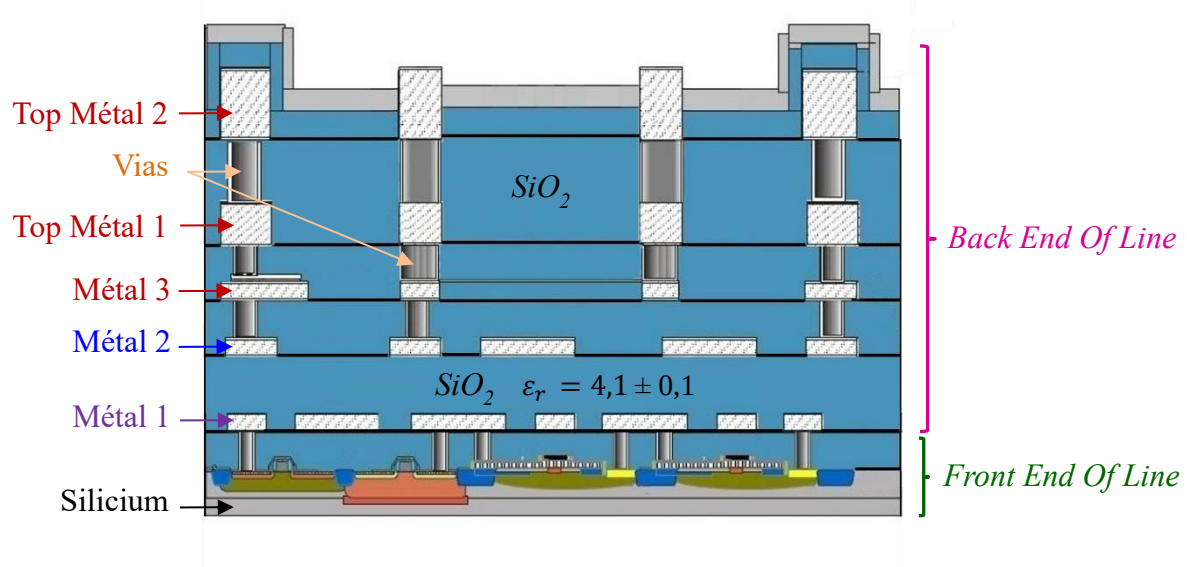


Figure. 46 Vue en coupe transversale d'un wafer réalisé à partir du procédé BiCMOS IHP SG25H4 (pas à l'échelle).

En premier lieu, il nous a fallu comprendre les règles et les contraintes de dessins de ce procédé technologique afin de réaliser la conception de la structure quadripôle DEP. En effet, IHP

impose dans leur design-kit, des règles de dessins bien définies à respecter lors de la conception du microsystème.

Comme le montre la Figure. 46, ce procédé est composé d'une partie passive appelée BEOL (*Back End Of Line*) et d'une partie active. Dans une première phase de conception et dans le cadre de ces travaux de thèse, nous n'allons nous intéresser et utiliser que la partie passive de l'empilement des couches BEOL du procédé. En effet, cette dernière intègre plusieurs couches de métaux en aluminium connectés par des vias à travers plusieurs couches de dioxyde de silicium (SiO_2) déposées alternativement entre les couches métalliques. Nous observons que ces couches de métallisations possèdent des différences d'épaisseurs entre elles propres à la technologie d'IHP. Les couches métalliques supérieures étant assez épaisses > 2 µm et celles enterrées plus fines < 0,5 µm.

Le Top Métal 2, le Top Métal 1 et le Métal 3 ont été utilisés pour former les électrodes du quadripôle. Les vias métalliques réalisés au travers de l'oxyde de silicium, qui relient les différents niveaux de métaux, peuvent être également utilisés afin de constituer des microélectrodes 3D. Ainsi, l'épaisseur des microélectrodes pourra varier dans notre cas entre 0,45 µm et 9 µm. Au final, nous verrons durant la phase d'optimisation de la structure et selon les contraintes de fabrication et de l'expérimentation, comment nous choisissons l'empilement des métaux pour former les électrodes. D'autre part, le Métal 1 sera utilisé pour former un plan de masse et il sera bien séparé du substrat en silicium de basse résistivité par une couche de SiO_2 (Figure. 46).

Dans le cadre de notre étude, nous réaliserons une fonction de microsystème DEP implémentée au fond d'un canal microfluidique. Pour réaliser ce canal, IHP permet d'apporter une modification à son procédé standard en réalisant une ouverture sélective localisée au travers de plusieurs couches de SiO_2 comme illustre la Figure. 47. Nous décrirons l'intégration de la partie microfluidique ultérieurement, dans la partie fabrication.

Après cette brève introduction sur le procédé technologique que nous pouvons mettre à profit, nous allons présenter la partie développement et optimisation de la structure quadripôle, qui a été réalisée en tenant compte des spécificités des différentes couches du BEOL, à partir des simulations faites sur Comsol Multiphysics. La partie fabrication du dispositif sera décrite et détaillée ultérieurement dans ce chapitre.

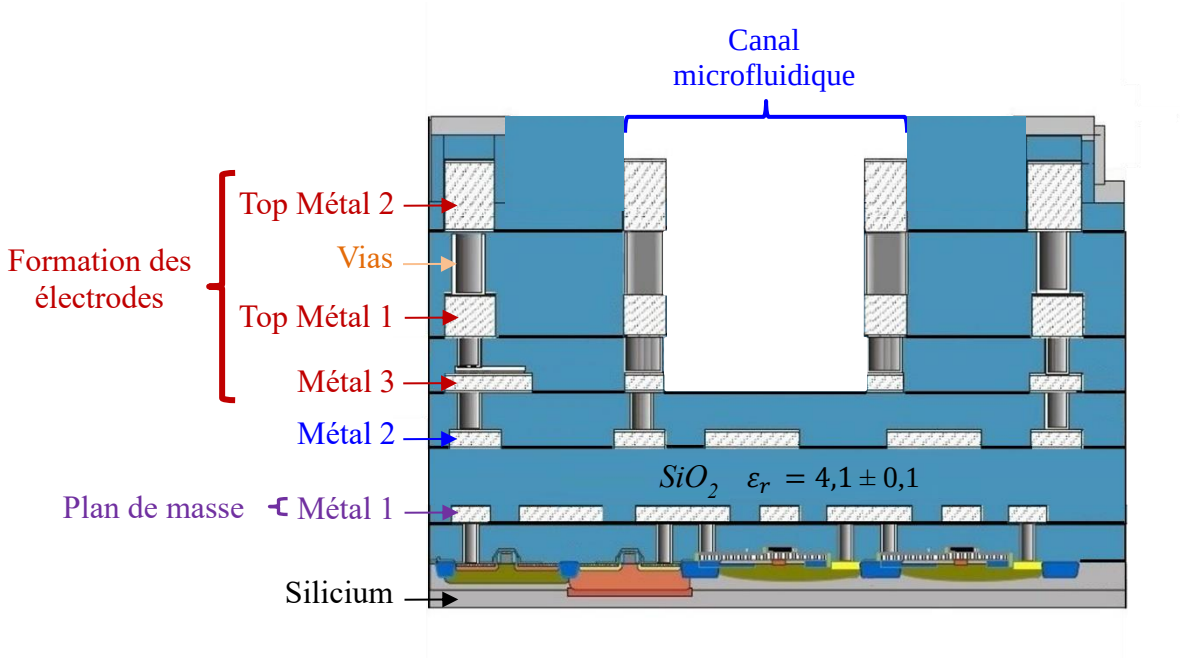


Figure. 47 Vue en coupe transversale du BEOL du procédé BiCMOS IHP SG25H4 intégrant la partie microfluidique (pas à l'échelle).

IV.2. Développement et optimisation des microélectrodes 3D

Dans l'objectif de générer un champ électrique d'intensité suffisamment importante dans la zone de caractérisation tout au long de l'altitude du canal microfluidique, nous avons effectué une étude par des simulations électromagnétiques à l'aide du logiciel Comsol Multiphysics. Cela nous a permis d'optimiser la géométrie des microélectrodes 3D. Ainsi de façon à ce que la structure proposée permette une caractérisation efficace par DEP-UHF de cellules, nous allons comparer dans cette étude, les différentes distributions de champs électriques générées par des structures ayant différents espaces inter-électrodes et des électrodes possédant différentes épaisseurs.

La microstructure utilisée pour les simulations est présentée par la Figure. 48.

Nous avons modélisé la structure quadripôle selon les règles de dessins imposées par le procédé IHP :

- Un substrat de silicium.
- Une couche fine de dioxyde de silicium.
- Un plan de masse en aluminium.

- Une couche à épaisseur variable de dioxyde de silicium entre le plan de masse et le premier niveau de métal utilisé pour réaliser l'électrode considérée.
- La structure à quatre électrodes en aluminium.
- Un canal microfluidique.
- Une couche de dioxyde de silicium couvrant tout ce qui est autour du canal, y compris les lignes connectées aux microélectrodes.

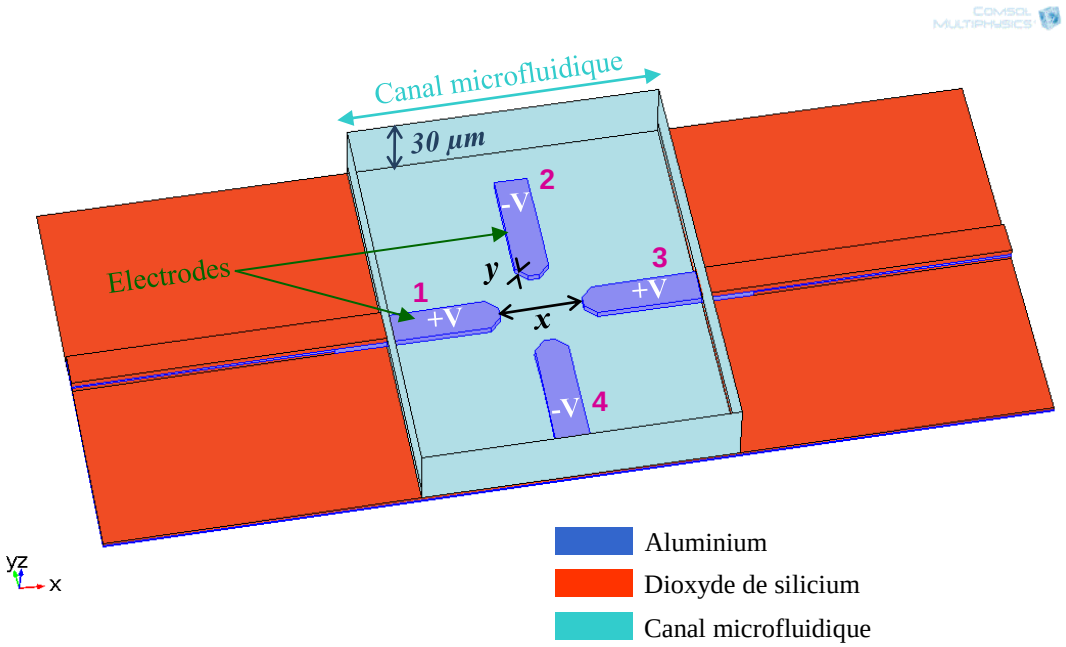


Figure. 48 Schéma de la structure étudiée par simulation : *x* est la variable de l'espace inter-électrodes pour les deux paires d'électrodes et *y* est la variable de l'épaisseur des quatre électrodes.

Tout d'abord, les microélectrodes métalliques sont simulées pour différentes valeurs de distance inter-électrodes (paramètre x) en fixant une épaisseur moyenne des électrodes selon le procédé d'IHP et ensuite pour différentes épaisseurs de métallisation (paramètre y) en fixant l'espace inter-électrode qui sera optimisé. Le canal microfluidique lui a une largeur de 150 µm et une épaisseur fixée également par rapport aux contraintes de fabrication. La hauteur du canal microfluidique sera donc de 30 µm incluant la partie de polydiméthylsiloxane (PDMS) qui viendra fermer le canal comme nous le verrons dans la partie fabrication. L'épaisseur totale de la pièce de PDMS sera de 3 mm. Concernant les matériaux utilisés, le Tableau II-1 résume leurs propriétés. A noter que le canal microfluidique est quant à lui défini à partir des propriétés du liquide qui le remplira et qui sera en effet utilisé dans nos expérimentations : un milieu aqueux essentiellement constitué de sucrose dont la conductivité électrique sera très faible (≈ 20 mS/m).

Tableau II-1 Propriétés des matériaux utilisés pour la simulation électrique de la structure DEP-UHF.

Propriétés / Matériaux	Conductivité électrique (S/m)	Permittivité relative
Silicium	0,252E-3	11,9
Dioxyde de silicium	-	4,2
Aluminium	38E6	-
Eau	20E-3	78
PDMS	-	2,6

Concernant la polarisation des électrodes, l'étude sur les différentes structures de la partie précédente II.3. nous a permis de sélectionner la configuration des électrodes opposées possédant la même polarité. C'est donc celle qui sera appliquée. Les électrodes 1 et 3 seront polarisées à V+ et les électrodes 2 et 4 seront reliées à la masse (Figure. 48). D'un point de vue pratique, les électrodes reliées à la masse seront celles qui seront disposées au milieu du canal. La mise à la masse se fera simplement grâce à des vias reliés à la couche de Métal 1. La paire d'électrodes disposées perpendiculairement au canal sera quant à elle polarisée avec la tension V+. Pour cela, chacune de ces électrodes sera reliée à une longue ligne RF micro-ruban connectée à des pads par des pointes coplanaires. Ces pads seront situés hors de la zone de PDMS délimitant le canal.

La valeur objective de la tension appliquée à la structure quadripôle, sera de l'ordre de 2 V_{pp}. Cette valeur a été choisie de façon à ce que l'intensité maximale du champ qui pourra être générée soit de l'ordre de 10^4 V/m. Ce qui devrait garantir donc, que la viabilité de la cellule étudiée ne sera pas affectée par l'intensité de champ appliquée [111]. En fait l'état de la cellule est un facteur très important, car si la cellule est soumise à un champ trop intense (de l'ordre de 10^5 V/m), des pores peuvent être amenées à se former dans sa membrane. Ainsi des échanges peuvent avoir lieu entre les milieux intra et extracellulaires, ce qui peut conduire au changement des propriétés intracellulaires et impacter la fréquence de transition UHF que nous cherchons à mesurer.

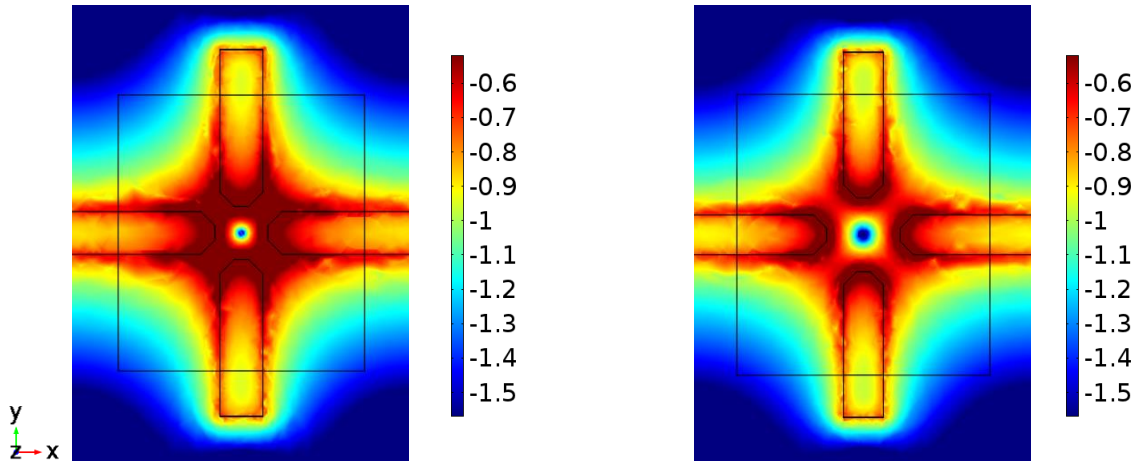
IV.2.1. Etude de la variation de la distance inter-électrodes

Dans cette partie nous allons étudier l'impact de la variation de l'espace inter-électrodes (x) sur le profil du champ électrique généré. L'épaisseur des métallisations y est constante et prise égale à 3 µm.

Les bornes de variation de x vont nous être imposées principalement par les besoins expérimentaux ; la technologie IHP présentant une résolution de 0,5 µm (distance entre deux vias), elle ne sera pas ici un facteur limitant. En revanche, de façon à être capable de suivre le déplacement de la cellule entre les zones de DEP négative et positive, il est nécessaire de disposer d'une distance inter-électrodes suffisamment importante pour visualiser correctement ce déplacement afin de déterminer la fréquence de transition au moment du basculement de la cellule entre les deux positions de DEP. Cette distance est donc étroitement liée à la taille de la cellule. Dans la mesure où les cellules étudiées auront au minimum un diamètre moyen de 10 µm, x_{min} sera fixé à 20 µm. D'autre part, il faut également prendre en compte la tension appliquée à la structure par rapport au gap étudié. En fait, la force de diélectrophorèse conformément à l'équation (I-5) est proportionnelle à la taille de la particule (imposée ici par le type cellulaire analysé) et l'amplitude de la tension appliquée, et elle est inversement proportionnelle à la distance inter-électrodes. Ainsi lorsque que la distance inter-électrode x va augmenter, il sera nécessaire d'augmenter la tension appliquée aux électrodes pour maintenir F_{DEP} constante. Une augmentation de la tension appliquée pourrait également conduire à des effets thermiques non désirables et fixera donc la valeur x_{max} à ne pas dépasser. Par conséquent, la distance inter-électrodes sera le bon compromis entre l'observation claire du mouvement diélectrophorétique de la cellule et l'utilisation de signaux haute fréquence dont les amplitudes seront appropriées.

Nous allons étudier et comparer différents cas d'espaces inter-électrodes. En effet pour réaliser la comparaison, nous allons fixer dans un premier temps la tension appliquée aux électrodes à 2 V_{pp} et la fréquence à 200 MHz. En fait, la distribution de champ électrique qui sera abordée pour les différents cas, sera représentée en échelle logarithmique et normalisée par rapport à l'intensité de champ de l'ordre de $1{,}5\times10^5$ V/m.

Nous commençons par étudier le cas du profil de champ électrique généré par la structure du quadripôle pour $x = x_{min} = 20$ µm (Figure. 49.a).



(a) (b)

Figure. 49 Profil de la distribution du champ électrique à une altitude z = 5 µm pour la structure à quatre électrodes de gap : (a) 20 µm, (b) 30 µm.

Il est clair pour cet espace inter-électrode, que la distance entre la région de faible intensité de champ localisée au centre des quatre électrodes et les régions de fortes intensités de champ électrique aux bords des électrodes, risque d'être trop faible pour pouvoir suivre le déplacement de la cellule entre ces deux pièges de DEP. Ainsi, il va être difficile de visualiser le basculement du mouvement diélectrophorétique de la cellule qui sera induit entre la DEP négative et positive. De plus, la zone de faible intensité de champ générée pour x = 20 µm est très petite, elle ne sera probablement pas suffisante pour piéger efficacement la cellule en DEP négative.

La Figure. 49.b montre le profil de champ obtenu pour x = 30 µm. De façon logique, tout en fixant la tension appliquée à la structure, lorsque x augmente, le diamètre de la zone de faible intensité de champ augmente. Il sera alors plus facile de piéger efficacement la cellule au centre des quatre électrodes en DEP négative. Cependant, l'espace inter-électrodes reste un peu trop limité pour bien visualiser la transition de la cellule entre la DEP négative et positive.

La Figure. 50 présente les résultats obtenus pour x = 40 µm, ce qui représente environ 3 à 4 fois la taille de la cellule. Cette distance paraît intéressante car il devient possible de visualiser aisément le déplacement de la cellule du centre des quatre électrodes au bord de l'une d'entre elles. Cette distance inter-électrode est d'autant plus intéressante qu'elle permet de travailler à l'échelle de la cellule individuelle. En effet, dans cette configuration une seule cellule aura la place dans le piège en DEP négative au centre des électrodes (Figure. 50). De plus, si on augmente x comme nous allons le voir dans ce qui suit, il sera nécessaire d'augmenter l'amplitude du signal appliqué pour générer une force de DEP du même ordre de grandeur.

L'augmentation à outrance de l'amplitude du signal n'est pas souhaitable pour les raisons évoquées précédemment.

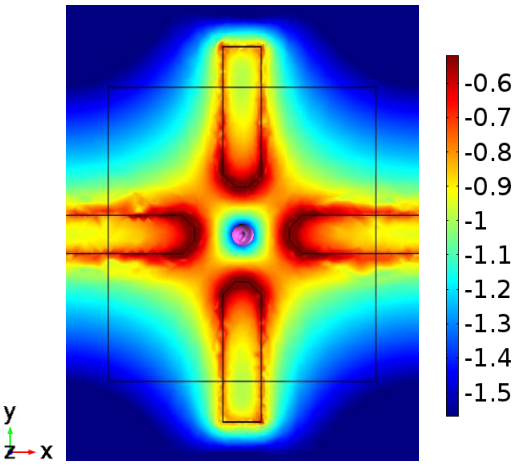
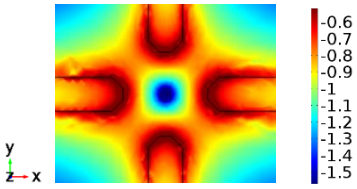
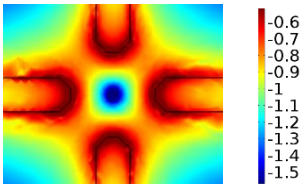
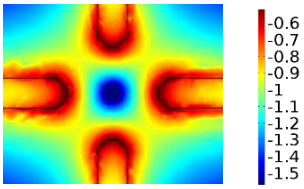
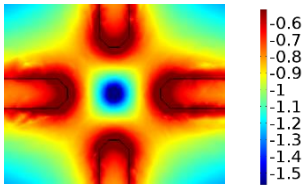
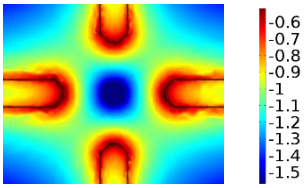
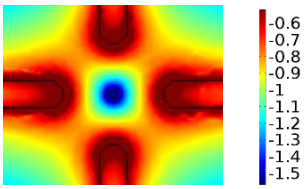
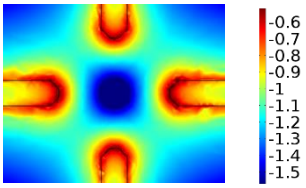
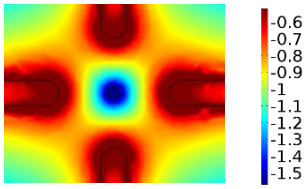
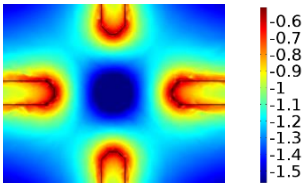
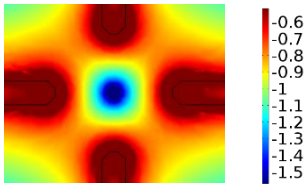
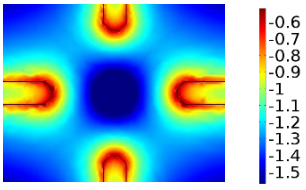
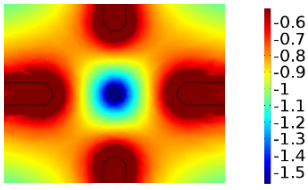


Figure. 50 Configuration du champ électrique généré pour x = 40 µm à une altitude z = 5 µm.

Nous avons étudié les cas pour x > 40 µm, même s'ils semblent plutôt défavorables (Tableau II-2). En effet, nous prenons toujours comme référence ici pour le calcul de la distribution du champ électrique générée pour z = 5 µm, une tension appliquée aux bornes des électrodes de 2 V_{pp} (1 V crête).

Nous remarquons que lorsque x augmente (Tableau II-2), l'intensité du champ électrique générée pour une tension de 1 V crête, devient de plus en plus faible. L'intensité de champ aux bords des électrodes devient plus faible et moins intense, et la région de faible intensité de champ devient plus large. De plus, pour des distances inter-électrodes importantes, la probabilité que plusieurs cellules puissent être piégées simultanément dans le gap devient plus forte et ce n'est pas ce que nous cherchons à obtenir, car il sera plus complexe de caractériser des amas cellulaires. Il est donc nécessaire d'augmenter l'amplitude de la tension appliquée comme le montre la seconde colonne du Tableau II-2. En effet, nous avons cherché la valeur de la tension qui doit être appliquée pour chaque espace inter-électrode x > 40 µm, de telle sorte que la structure soit capable de générer la même distribution de champ électrique que dans le cas où x = 40 µm à 1 V crête. Pour cela, nous observons que lorsque le gap augmente la tension à appliquer à la structure augmente fortement. D'autre part, nous remarquons que pour les structures ayant un large gap, et notamment pour x = 80 µm et x = 90 µm, l'intensité de champ générée aux bords des électrodes paraît fortement intense et étalée par rapport à celle générée par le gap 40 µm, ce qui n'est pas souhaitable et risque de faire adhérer la cellule à l'électrode et même d'altérer sa viabilité.

Tableau II-2 Distribution du champ électrique à une altitude z = 5 µm pour différentes tensions appliquées, générée par des structures du quadripôle possédant différentes dimensions.

Espace inter-électrodes	Profil du champ électrique généré pour une tension de 1 V crête	Tension à appliquer pour atteindre une distribution similaire du champ à celle générée par le gap 40 µm
40 µm		**1 V** 
50 µm		**1,3 V** 
60 µm		**1,7 V** 
70 µm		**2 V** 
80 µm		**2,5 V** 
90 µm		**2,8 V** 

D'autre part, une augmentation de la tension $V_{crête}$ à appliquer se traduit par l'augmentation de la puissance incidente du signal RF P_{dBm} à générer pour polariser les électrodes, d'après l'équation (II-1) :

$$V_{crête} = \sqrt{2 \times 10^{\left(\frac{P_{dBm}}{10} - 3\right)} \times Z} \qquad \text{(II-1)}$$

où Z est l'impédance caractéristique de la ligne qui amène le signal RF jusqu'à les électrodes.

Un besoin d'un niveau de puissance trop fort n'est pas favorable pour des raisons techniques intrinsèques au banc de caractérisation que nous présenterons plus loin, et aussi vis-à-vis de contraintes de la disponibilité de sources RF permettant de générer des tensions d'amplitude importante en haute fréquence.

IV.2.2. Etude de la variation de l'épaisseur des métallisations

A présent que la distance inter-électrode est fixée à x = 40 µm, nous allons nous intéresser à l'influence de l'épaisseur de métallisation. Les valeurs de y_{min} et y_{max} sont imposées par la technologie d'IHP. Dans le cas où une seule couche métallique fine de l'empilement est utilisée on aura y_{min} = 0,45 µm, alors que dans le cas où les trois dernières couches seront utilisées, il sera possible d'atteindre y_{max} = 9 µm.

Considérons dans un premier temps le cas où y = y_{min} = 0,45 µm (Figure. 51.a) (autrement dit les électrodes sont réalisées uniquement à partir du niveau de Métal 3).

La Figure. 51.b montre que cette structure de microélectrodes permet de générer une distribution de champ électrique intense et exploitable à une altitude z = 5 µm dans le canal, position proche du substrat. Par contre, cette intensité de champ diminue fortement au niveau du milieu du canal en z = 15 µm (Figure. 51.c), et notamment le champ devient très faible dans les régions aux bords des électrodes où la cellule se piège en DEP positive et le piège électrique au milieu de la structure ne sera plus marqué. Cette intensité s'affaiblie à mesure que l'on s'éloigne du substrat pour devenir quasi nulle en z = 25 µm (Figure. 51.d). Or lors des expérimentations, une grande partie des cellules se trouveront à une altitude supérieure à z = 5 µm, il est donc indispensable de générer un champ électrique suffisamment intense sur la majeure altitude du canal.

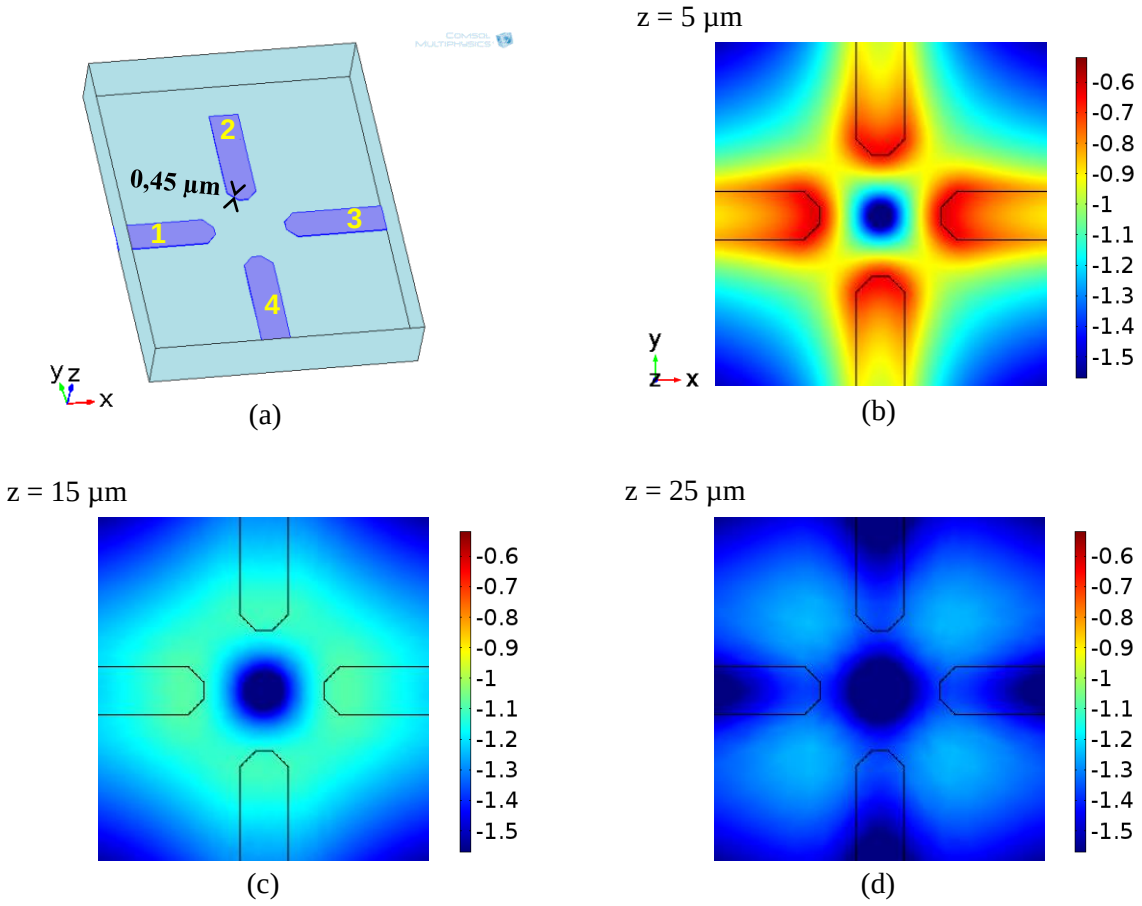


Figure. 51 (a) Dispositif de caractérisation cellulaire composé de quatre électrodes fines. Distribution du champ électrique généré par les électrodes aux altitudes : (b) z = 5 µm, (c) z = 15 µm, (d) z = 25 µm.

En utilisant le dernier niveau de métal (Top Métal 2) ou en associant les deux couches métalliques Métal 3 et Top Métal 1 reliés avec des vias à travers les couches de SiO_2, il est possible d'épaissir les électrodes à y = 3 µm (Figure. 52.a).

Les simulations du profil de champ électrique montrent alors que l'intensité du champ généré par ces électrodes au milieu du canal (Figure. 52.c) est plus intense que celle générée par les électrodes fines (Figure. 51.c). Les zones de fortes intensités de champ aux bords des électrodes sont bien identifiées et le piège au milieu des quatre électrodes est bien défini. De plus à une hauteur plus élevée z = 25 µm dans le canal (Figure. 52.d), la distribution du champ devient un peu plus intense que celle présentée par les électrodes fines (Figure. 51.d). Mais cette élévation d'intensité du champ reste faible et ne permet pas de générer les forces de DEP souhaitées. Par contre, il est clair que l'augmentation de l'épaisseur des électrodes conduit à la génération de champs électriques plus intenses.

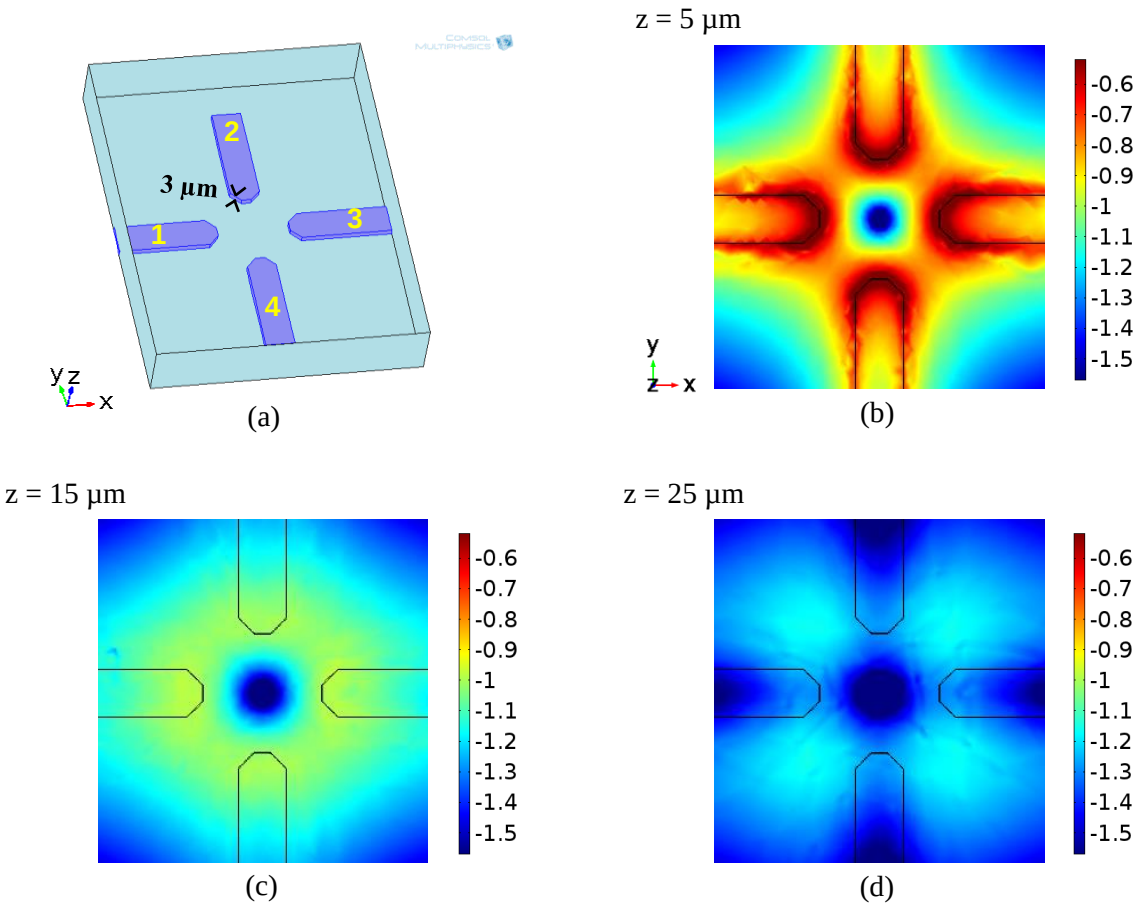


Figure. 52 (a) Dispositif de caractérisation cellulaire composé de quatre électrodes ayant une épaisseur y = 3 µm. Profil du champ électrique généré par la structure aux altitudes : (b) z = 5 µm, (c) z = 15 µm, (d) z = 25 µm.

Nous avons alors augmenté l'épaisseur des électrodes à y_{max} = 9 µm (Figure. 53.a) qui sera la limite imposée par le procédé BiCMOS d'IHP et qui résulte de l'association du Métal 3, Top Métal 1 et Top Métal 2, connectés entre eux avec des vias à travers les couches de SiO_2. La Figure. 53 présente les résultats obtenus dans cette configuration. Il apparaît clairement que cette épaisseur de métallisation est suffisante quelle que soit l'altitude de la cellule dans le canal : le champ électrique reste suffisamment intense et peut donc assurer un piégeage et une caractérisation cellulaire efficace (Figure. 53.c et Figure. 53.d). Cette configuration est donc intéressante mais d'un point de vue pratique des contraintes en termes de manipulation des cellules durant les expériences s'imposent. En fait, les deux électrodes épaisses 2 et 4, disposées parallèlement au sens de la circulation des cellules dans le canal et au flux, risquent d'avoir un effet très néfaste sur l'écoulement au sein du canal. En effet, les cellules en flux à leur passage au niveau des électrodes épaisses risquent de changer leur direction mais surtout d'adhérer aux électrodes et de potentiellement obstruer le canal microfluidique.

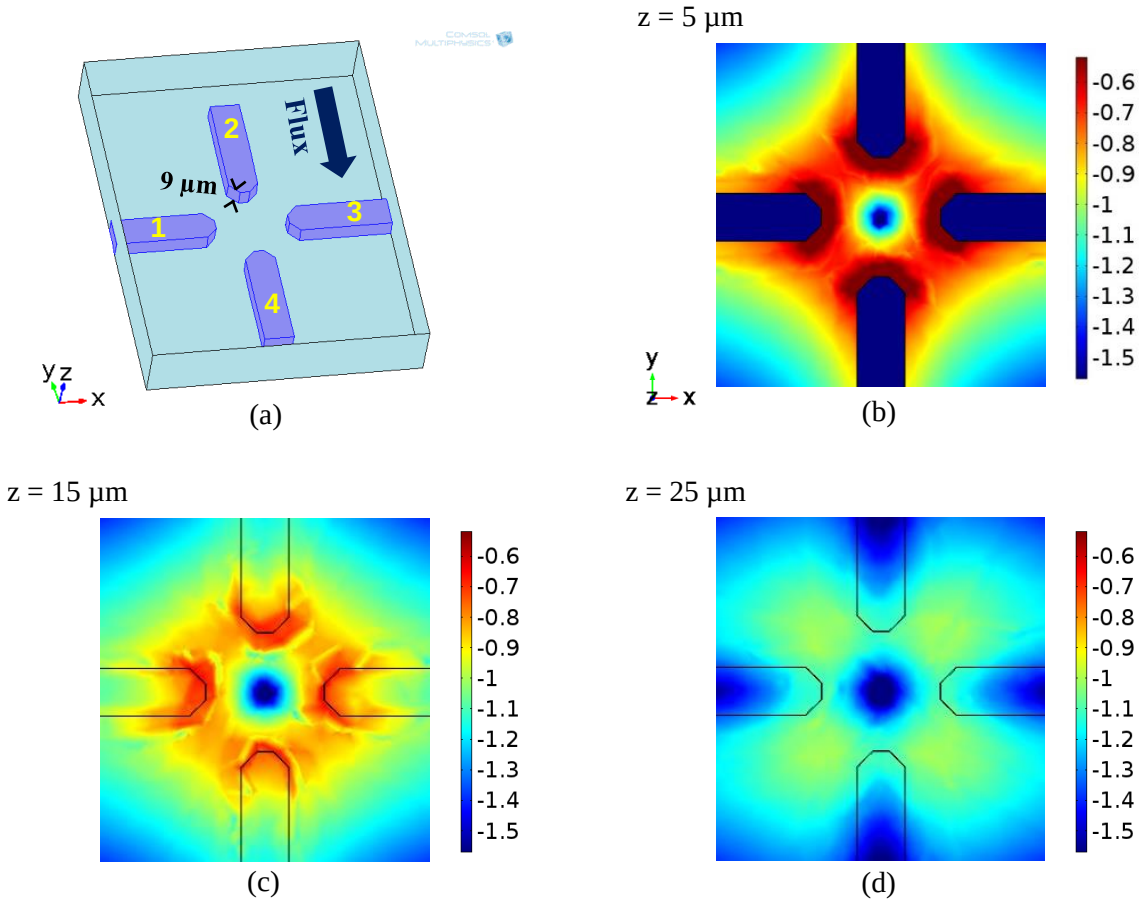


Figure. 53 (a) Dispositif de caractérisation cellulaire composé de quatre électrodes ayant une épaisseur y_{max} = 9 µm. Distribution du champ électrique généré par la structure aux altitudes : (b) z = 5 µm, (c) z = 15 µm, (d) z = 25 µm.

Pour éviter ce problème, une première possibilité serait de disposer les quatre électrodes avec un angle 45° par rapport au canal (Figure. 54). Mais il s'avère que cette configuration n'est pas réalisable, car elle est non conforme aux règles de dessins de la technologie IHP.

Alors, nous nous sommes orientés vers une solution alternative qui est de laisser fines (y = 0,45 µm) la paire d'électrodes 2 et 4, disposées parallèlement au canal. Ainsi, de par leur faible épaisseur, elles perturberont très peu le flux des cellules. Et la conservation de la paire d'électrodes épaisses 1 et 3, disposées perpendiculairement au canal devrait suffir à garantir un champ restant suffisamment intense sur la hauteur du canal.

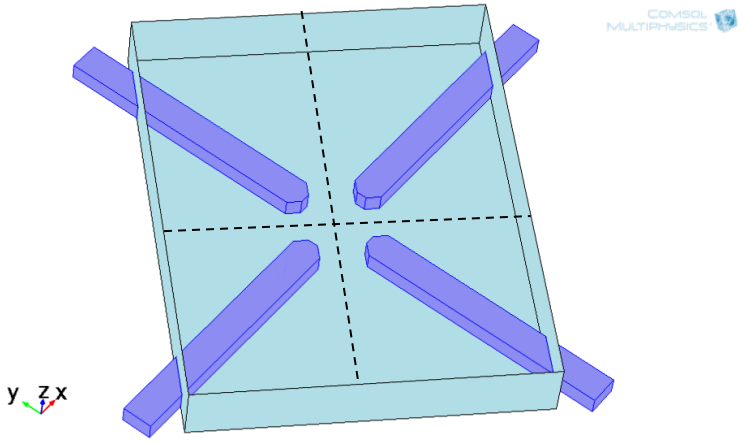


Figure. 54 Structure à quatre électrodes épaisses disposées à un angle de 45° par rapport au canal microfluidique.

Pour le vérifier, nous avons donc simulé les microélectrodes 3D pour y = 0,45 µm pour les électrodes 2 et 4 et y = y_{max} = 9 µm pour les électrodes 1 et 3 (Figure. 55.a).

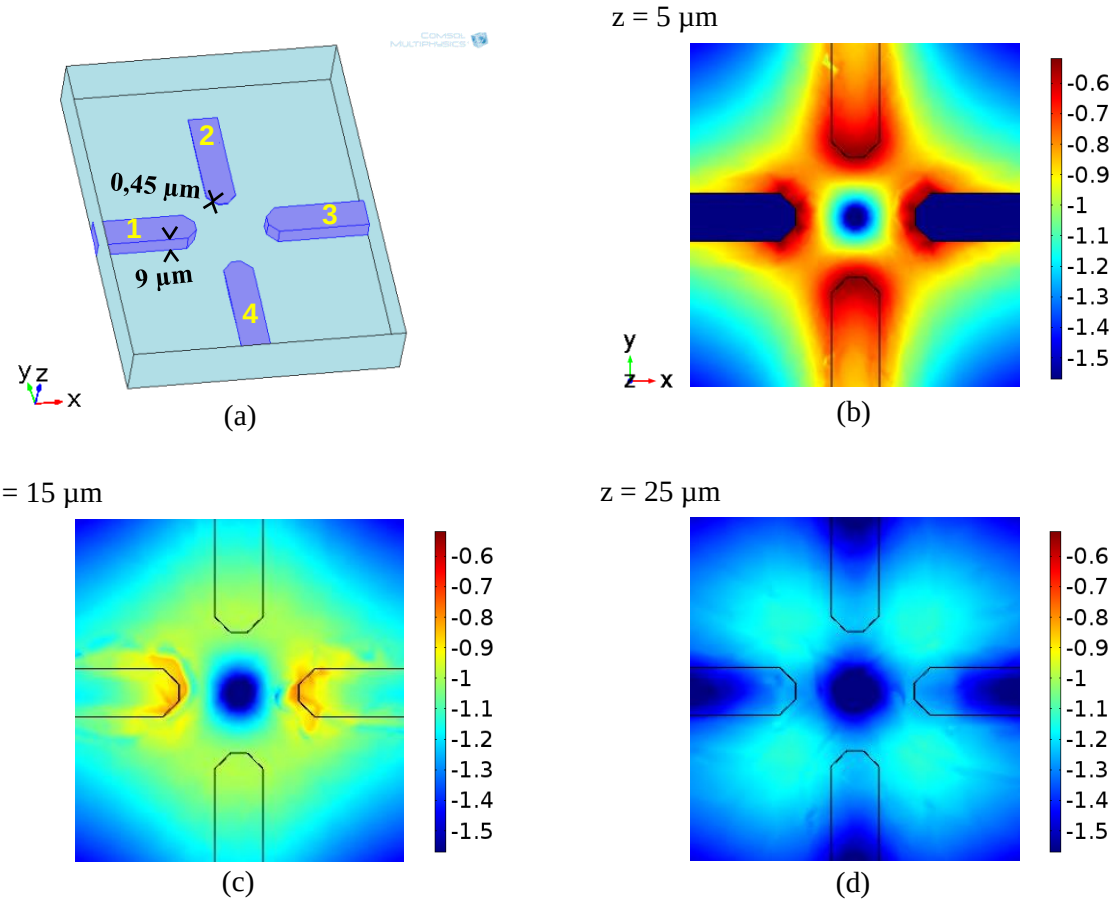


Figure. 55 (a) Structure du quadripôle combinant une paire d'électrodes épaisses et une paire d'électrodes fines. Distribution du champ électrique généré par la structure du quadripôle aux altitudes : (b) z = 5 µm, (c) z = 15 µm, (d) z = 25 µm.

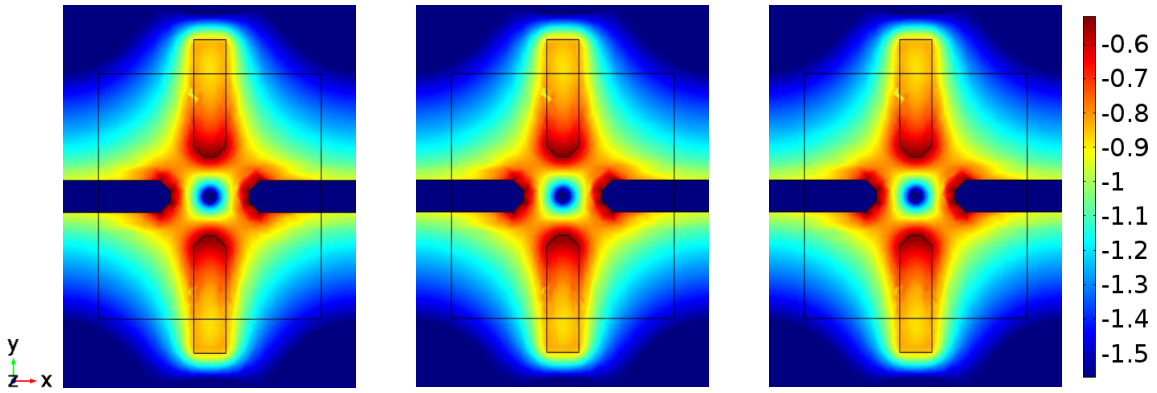
En effet, les profils de champ électrique générés à des altitudes z =15 µm (Figure. 55.c) et z = 25 µm (Figure. 55.d) montrent que le champ électrique reste suffisamment intense et que les électrodes fines implémentées au milieu du canal (2 et 4 reliées à la masse) permettent tout de même de générer un piège électrique efficace au milieu de la structure.

Ainsi, le fait que les électrodes 2 et 4 soient fines n'a pas un impact si important sur le profil du champ quelle que soit l'altitude dans le canal microfluidique, c'est donc cette configuration qui sera retenue. Toutes les cellules et spécifiquement la totalité du volume de ces cellules devraient pouvoir interagir avec le champ électrique, même pour celles qui seront situées à des altitudes élevées.

Dans la suite de notre étude, la structure qui sera utilisée pour réaliser la caractérisation DEP haute fréquence d'une cellule individuelle sera cette structure à quatre électrodes (Figure. 55) qui possède un espace inter-électrodes de l'ordre de 40 µm et qui est composée de deux électrodes fines (0,45 µm) disposées parallèlement au canal microfluidique et de deux électrodes épaisses (9 µm) disposées perpendiculairement au canal.

IV.2.3. Influence de la fréquence du signal appliqué sur la configuration du champ électrique

Dans toutes les études menées jusqu'à présent, la fréquence du champ appliquée est restée constante (égale à 200 MHz) de façon à pouvoir étudier l'impact des paramètres géométriques de la structure sur le profil de champ. Maintenant que la géométrie est choisie, pour que la caractérisation cellulaire et la valeur des fréquences de transition déterminées soient précises et exactes, il serait nécessaire qu'elles soient réalisées dans la même configuration de champ électrique. En fait, la transition entre les deux cas de la DEP s'observera en faisant varier la fréquence. Typiquement lors des expériences, nous travaillerons dans la gamme de fréquence allant d'environ 50 MHz à 500 MHz. Pour vérifier que la fréquence du signal appliqué n'a pas d'influence sur le profil de champ électrique généré, nous avons réalisé des simulations électromagnétiques en faisant varier la fréquence du signal appliqué entre 50 et 500 MHz, pour une tension appliquée de 2 V_{pp}. Les résultats sont présentés par la Figure. 56 et montrent que la configuration du champ électrique généré a le même profil quelle que soit la fréquence, démontrant bien que le profil du champ électrique ne devrait pas avoir une dépendance en fréquence dans le spectre visé pour nos expérimentations.



(a) (b) (c)

Figure. 56 Configuration du champ électrique généré par la structure quadripôle pour différentes valeurs de fréquence du champ électrique appliqué : (a) 50 MHz, (b) 200 MHz, (c) 500 MHz à une altitude z = 5 µm.

IV.2.4. Simulations thermiques

Pour vérifier que dans les conditions d'utilisation établies précédemment à la géométrie retenue pour les microélectrodes 3D, nous n'aurons pas d'effet thermique qui viendrait perturber les expériences, voire endommager les cellules, nous avons réalisé une étude thermique en calculant l'élévation de la température du milieu DEP dans le canal microfluidique pour une tension appliquée de 1 V. Dans ce cadre, nous avons utilisé le logiciel de simulation Comsol Multiphysics. Pour notre étude, nous nous sommes servi du couplage entre le module « AC/DC » en choisissant le type de simulation courant électrique et le module « transfert de chaleur » et précisément le type transfert de chaleur dans un fluide, tout en prenant en considération les pertes électromagnétiques. Pour considérer le cas le plus défavorable, le fluide est considéré statique. La température du fluide à l'entrée et à la sortie du canal est fixée à la température ambiante soit 20°C. Nous considérons la valeur de la conductivité électrique du milieu (σ_m) égale à 20 mS/m : cela représente la conductivité mesurée du milieu qui sera utilisée pour les expériences et dont la composition sera donnée ultérieurement. La Figure. 57 montre que pour un signal de 1 V appliqué, l'élévation de la température du milieu DEP dans le canal atteint juste 0,0006°C ce qui montre que le processus est athermique.

D'autre part, si nous souhaitons travailler dans des milieux de suspension possédant des conductivités électriques un peu élevées (σ_m = 100, 300 et 500 mS/m), nous remarquons que l'élévation de la température des différents milieux reste très faible, puisqu'elle ne dépasse pas 0,02°C (Figure. 57).

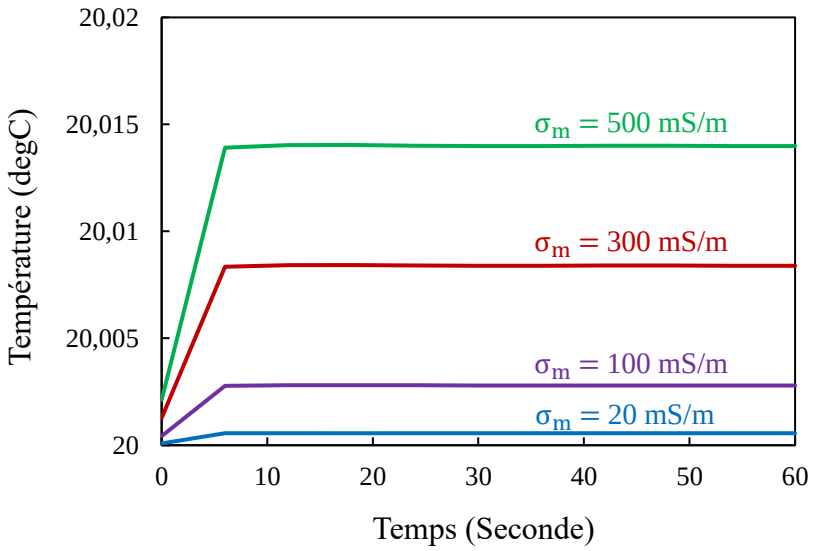


Figure. 57 Elévation de la température du milieu DEP dans le canal microfluidique, pour différentes conductivités σ_m, sous l'application d'une tension de 1 V.

V. Fabrication du dispositif de caractérisation cellulaire

Nous allons décrire au cours de ce paragraphe le procédé standard BiCMOS de fabrication d'IHP et voir comment nous l'avons utilisé pour la réalisation du dispositif microfluidique à microélectrodes.

V.1. Procédé de fabrication du dispositif microfluidique à microélectrodes en technologie BiCMOS

La microstructure 3D retenue suite à l'étude a été fabriquée chez *IHP Microelectronics* en Allemagne, en utilisant leur procédé BiCMOS SG25H4 standard (0,25 µm) qui a été modifié pour intégrer la partie microfluidique (Figure. 58).

Ce procédé comprend cinq couches de métallisations en aluminium ; dont trois couches (Top Métal 2, Top Métal 1 et Métal 3) sont liées par des vias dans le BEOL au niveau des électrodes du dispositif de caractérisation DEP, qui seront utilisées pour former les microélectrodes, une couche représentée par le Métal 1 qui sert à définir le plan de masse et une couche intermédiaire (Métal 2) que nous n'utiliserons pas.

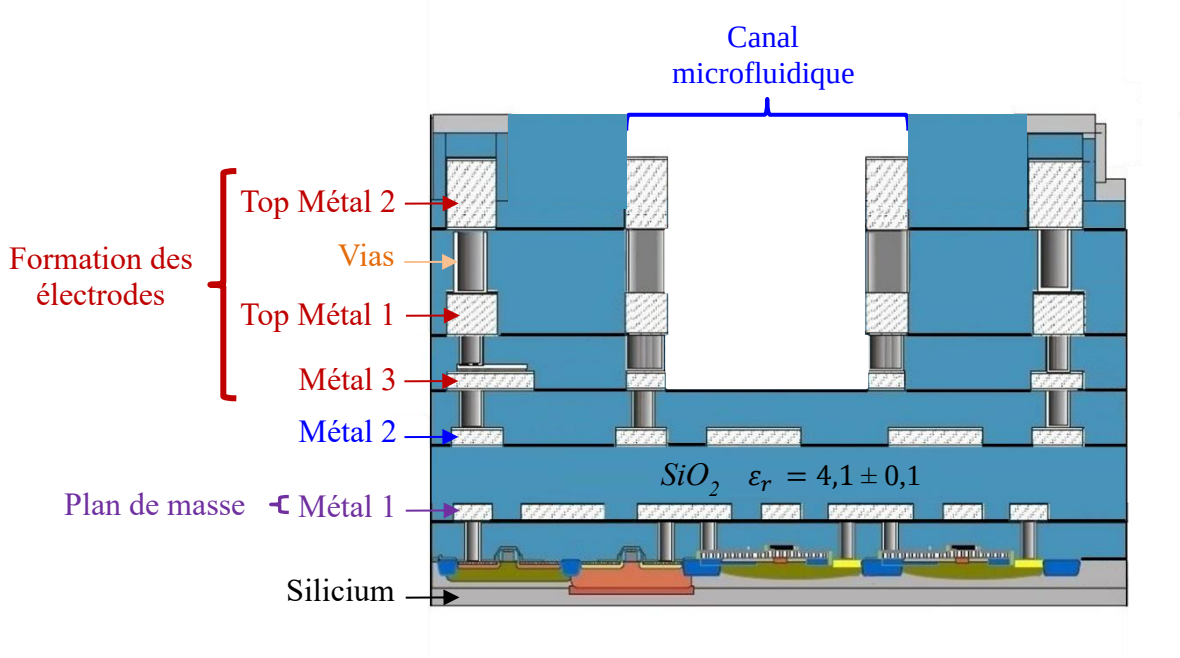


Figure. 58 Vue en coupe transversale du BEOL du procédé BiCMOS IHP intégrant la partie microfluidique (pas à l'échelle).

En effet, l'empilement de couches de métallisations a été utilisé pour former les microélectrodes épaisses 3D. La paire d'électrodes épaisses (électrodes n°1 et 3) est formée par un empilement des trois derniers niveaux de métaux : Top Métal 2, Top Métal 1 et Métal 3 qui sont interconnectés par des réseaux de vias métalliques denses au travers les couches de SiO_2 (Figure. 59.a). Ainsi cet empilement permet d'obtenir les microélectrodes 3D de 9 µm d'épaisseur. D'autre part, la paire d'électrodes fines n'est formée uniquement que par la couche de Métal 3 d'épaisseur 0,45 µm. Elle est reliée à la masse en connectant le Métal 3 au Métal 1 avec également un réseau de vias (Figure. 59.b).

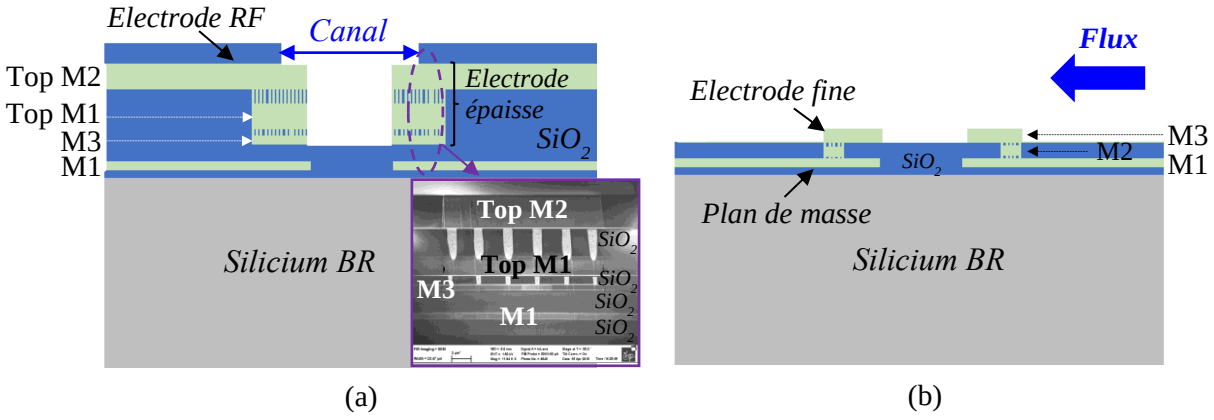


Figure. 59 Vue en coupe : (a) des électrodes épaisses, (b) des électrodes fines.

Notons qu'un évidement rempli de SiO_2 a été introduit dans une zone du plan de masse (Métal 1) située au-dessous des électrodes, dans le but d'assurer que le champ électrique reboucle fortement entre les électrodes (Figure. 60.a). Sinon en absence de l'ouverture en SiO_2 (Figure. 60.b), le champ électrique boucle plus entre les électrodes et le plan de masse qu'entre les électrodes elles-mêmes détériorant ainsi l'efficacité du piège.

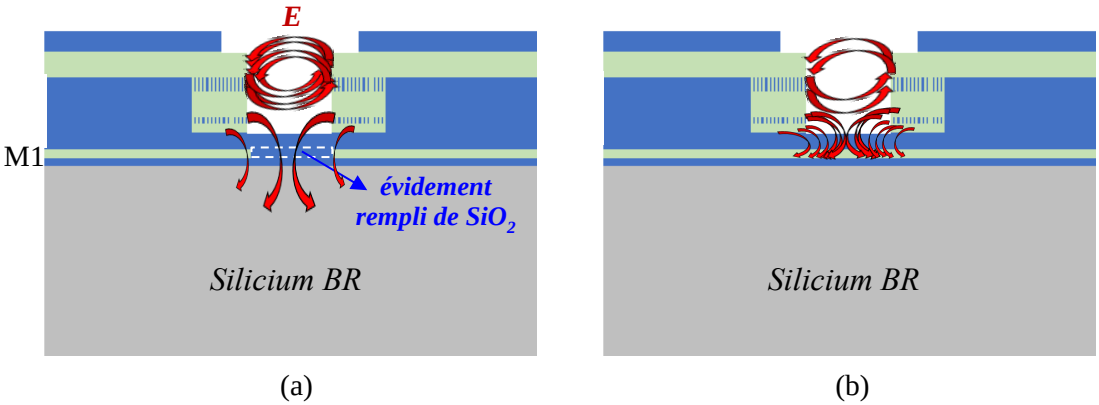


Figure. 60 (a) Présence de la démétallisation remplie de SiO_2 dans le plan de masse, (b) absence de l'évidement dans le plan de masse.

L'étape finale de la fabrication de la puce consiste à former le canal microfluidique. Cette étape a demandé le rajout d'une étape au procédé IHP. En effet, le canal est obtenu par une gravure ionique réactive profonde de dioxyde de silicium dans le BEOL. Sa profondeur est de l'ordre de 10,5 µm et sa largeur 150 µm. La Figure. 61 montre la structure quadripôle fabriquée avec le canal microfluidique implémenté.

Notons que le canal réalisé par gravure de l'oxyde de silicium devra être par la suite capoté et les connectiques fluidiques intégrées pour être fonctionnelles. Plusieurs options étaient envisageables mais nous avons opté pour une solution simple qui ne nécessite pas d'étapes post-process supplémentaires sur les puces IHP. Le plus simple est donc de mouler une pièce de PDMS qui sera positionnée et collée sur la puce (de façon réversible ou non) pour effectuer les mesures. La pièce de PDMS intégrera également les connections et les réservoirs d'entrée et de sortie du canal microfluidique. L'avantage de cette méthode est qu'elle nous permet d'agrandir simplement la profondeur du canal microfluidique. En effet la gravure de l'oxyde de silicium réalisée par IHP laisse un canal de 10,5 µm de profondeur à la surface de la puce. Or, pour que la cellule puisse se déplacer facilement sans être écrasée dans le canal microfluidique, la hauteur du canal doit être deux ou trois fois supérieure à la taille de la cellule (dans notre cas la taille maximale des cellules sera de l'ordre de 20 µm). C'est pourquoi pour

obtenir la profondeur du canal souhaitée, nous avons imprimé dans la pièce de PDMS, une hauteur de canal complémentaire. Ces pièces de PDMS ont été fabriquées par nos soins dans la salle blanche du laboratoire XLIM.

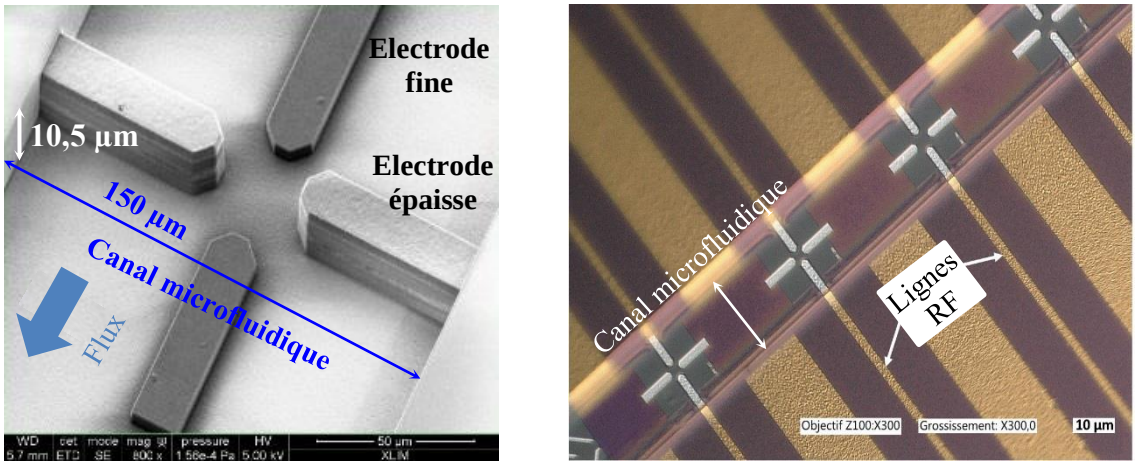


Figure. 61 Photo MEB du quadripôle DEP implémenté dans son canal microfluidique sur une puce BiCMOS d'IHP.

V.2. Procédé de fabrication du canal microfluidique en PDMS

Avant de détailler les étapes de fabrication du canal en PDMS, nous allons tout d'abord présenter quelques notions de mécanique des fluides pour des canaux de tailles micrométriques qu'il nous faudra prendre en considération pour optimiser le canal microfluidique que nous utiliserons.

V.2.1. Notions de mécanique des fluides

Le comportement d'un fluide circulant dans des canaux micrométriques, autrement dit le type d'écoulement laminaire ou turbulent peut être prédit à partir du nombre de Reynolds [113], défini par l'équation (II-2) :

$$Re = \frac{\rho U D}{\eta} \qquad \text{(II-2)}$$

où ρ est la masse volumique du fluide, U est la vitesse caractéristique de l'écoulement, D désigne le diamètre caractéristique du canal et η représente la viscosité du fluide.

Comme ce nombre exprime le rapport entre les forces d'inertie et visqueuses, c'est alors un nombre sans dimension. Les valeurs du nombre de Reynolds déterminent la nature du régime d'écoulement de fluide dans le canal :

- pour Re < 2000, le régime d'écoulement est considéré laminaire (Figure. 62.a). Les lignes d'écoulement du fluide sont parallèles aux parois du canal.
- Pour 2000 < Re < 3000, le régime est transitoire.
- pour Re > 3000, le régime d'écoulement est considéré turbulent (Figure. 62.b). Les lignes d'écoulement du fluide ne sont plus parallèles aux parois du canal et il existe des turbulences.



(a) (b)

Figure. 62 Régime d'écoulement (a) laminaire, (b) turbulent [114].

Or dans notre configuration, nous allons privilégier un écoulement de type laminaire, car il permet aux cellules de suivre une trajectoire rectiligne dans le canal microfluidique sans aucune perturbation et d'être localisées majoritairement au centre du canal.

En effet, les valeurs typiques du diamètre du canal sont de l'ordre de 100 µm et la vitesse d'écoulement du fluide varie de 100 µm/s à 1cm/s; le nombre de Reynolds obtenu alors est très faible << 1. En effet, les forces visqueuses dominent les forces d'inertie. Le régime d'écoulement dans le canal microfluidique est bien laminaire ayant un profil parabolique (Figure. 62.a) : la vitesse d'écoulement du fluide est maximale au centre du canal et elle est quasi nulle sur les parois.

De plus, pour maîtriser un écoulement laminaire dans un canal microfluidique, il est nécessaire de prendre en considération un facteur nommé la résistance hydraulique du canal. La résistance hydraulique est définie par la résistance à l'écoulement d'un fluide dans un canal. Par analogie avec la loi d'Ohm dont la résistance électrique s'oppose au courant électrique, la résistance hydraulique se définit par l'équation (II-3), comme un rapport entre la différence de pression ΔP et le débit du fluide Q :

$$R = \frac{\Delta P}{Q} \qquad \text{(II-3)}$$

La pression peut s'associer à une tension et le débit est équivalent au courant [115].

Dans notre cas, il est plus facile d'appliquer une pression élevée contrôlable pour injecter les cellules à l'aide d'un contrôleur de flux, tout en cherchant à avoir un écoulement lent dans le canal pour que nous puissions bien maîtriser le mouvement des particules. Donc il est nécessaire d'avoir une grande résistance hydraulique, car si le fluide voit une petite résistance il sera plus difficile de maîtriser précisément et d'ajuster sa vitesse dans des petites gammes. Cette résistance peut être calculée pour différentes formes de canaux, rectangulaires ou circulaires. Cependant les canaux avec des sections circulaires étant complexes à réaliser du point de vue micro-technologique, nous privilégions donc des sections rectangulaires.

La résistance hydraulique R pour un canal de section rectangulaire s'exprime par l'équation (II-4) [116] :

$$R = \frac{12\eta L}{h^3 w} \qquad \text{(II-4)}$$

où L désigne la longueur du canal, h est la hauteur du canal et w représente la largeur du canal.

En fait, si nous considérons l'eau circulant dans le canal réalisé par IHP, possédant les dimensions L = 15,4 mm, w = 150 µm et dont h = 30 µm considérée la hauteur totale du canal estimée obtenue durant nos expérimentations, la résistance hydraulique obtenue est de l'ordre de $4{,}5\times10^{13}$ Pa.s.m^{-3}. Cette valeur de résistance paraît convenable pour atteindre un bon compromis entre la pression à appliquer pour injecter des cellules en suspension dans le canal et la vitesse de l'écoulement.

V.2.2. Réalisation de la pièce en PDMS

Le haut du canal microfluidique que nous allons utiliser sera moulé dans la pièce de PDMS et servira à capoter la puce IHP (Figure. 63). Il sera de section rectangulaire et il est un peu plus large (190 µm) que le canal intégré sur la puce, afin d'avoir une marge d'alignement avec le canal d'IHP lorsque nous devrons reporter le capot en PDMS sur la puce. D'autre part, nous avons ajouté quelques optimisations sur la forme du canal de façon à augmenter sa résistance fluidique et pouvoir manipuler plus facilement les cellules en flux. En effet l'augmentation de la résistance fluidique est faite grâce à l'ajout, à l'entrée et à la sortie du canal, de méandres qui

permettront de ralentir le flux de cellules lors de l'injection (Figure. 63). La longueur du canal déplié est de l'ordre de 50,6 mm. Ainsi, la résistance fluidique du canal obtenue sera de l'ordre de $1{,}18\times10^{14}$ Pa.s.m^{-3}.

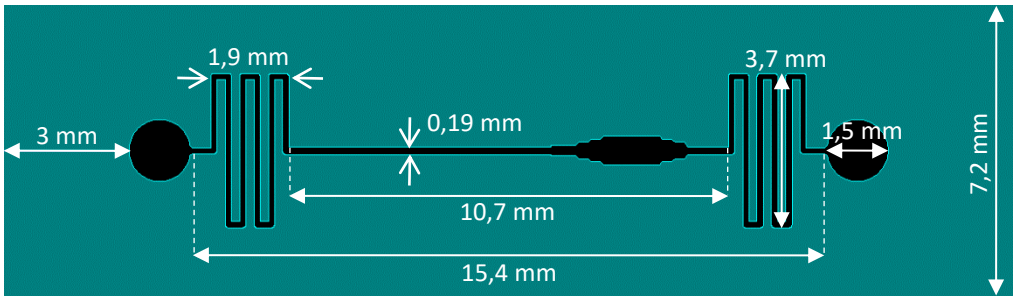


Figure. 63 Géométrie du canal microfluidique imprimé dans le PDMS.

Le PDMS est un polymère couramment utilisé en microfluidique pour ses propriétés de transparence, de biocompatibilité et sa simplicité de mise en œuvre. Les étapes de réalisation consistent à :

- Fabriquer une empreinte à partir d'une résine photosensible SU8 sur un substrat de silicium par exemple.
- Préparer le PDMS qui se présente sous la forme de deux composés à mélanger.
- Verser le PDMS sur l'empreinte en SU8 et le faire réticuler.
- Après démoulage nous obtenons une pièce de PDMS post formée du canal souhaité.

- <u>Fabrication du moule de canal microfluidique</u>

Avant de commencer les étapes de réalisation, il est nécessaire de nettoyer la surface du substrat en silicium pour éliminer toutes les impuretés et obtenir une surface propre qui offrira les meilleurs conditions d'adhésion à la couche de SU8 que nous allons utiliser pour former l'empreinte du canal. Pour cela, le substrat est plongé dans un bain d'acétone pendant 5 minutes, ensuite nous le rinçons avec de l'eau déionisée. Après avoir séché le substrat à l'air sec, nous le passons sur une plaque chauffante à 150°C pendant 5 minutes pour le faire désorber.

L'étape suivante consiste à définir le canal microfluidique par photolithographie UV. Cette démarche est décrite sur la Figure. 64.

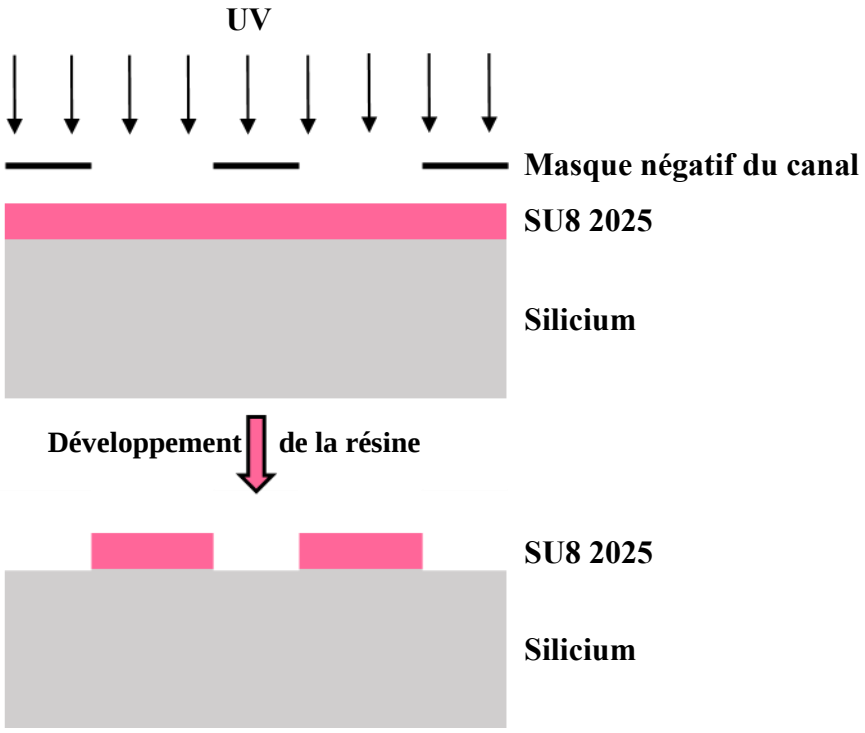


Figure. 64 Etapes de photolithographie pour la définition de l'empreinte du canal.

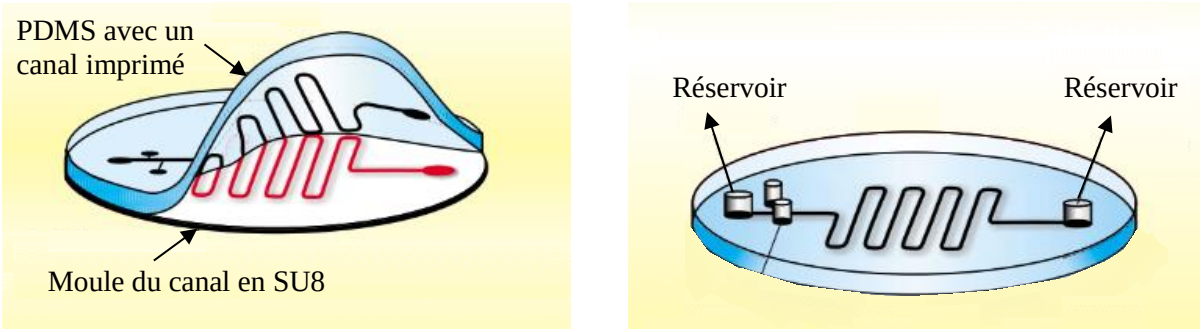
Dans un premier temps, une couche de résine photosensible négative SU8-2025 est déposée et étalée à l'aide d'une tournette sur toute la surface du substrat. La vitesse de rotation de la tournette est contrôlée pour obtenir l'épaisseur de SU8 désirée (environ 40 µm). Un premier double recuit de la résine est réalisé ; le premier recuit se fait à 65°C pendant 3 minutes pour évaporer les solvants et le second recuit se fait à 95°C pendant 7 minutes pour polymériser la résine. Une fois que la résine polymérisée revient à la température ambiante, elle est exposée aux rayonnements UV au travers d'un masque négatif qui va permettre de définir la forme du canal (Figure. 64). Notons que cette résine est négative, seules les parties de la résine exposées aux UV seront conservées lors du développement et celles non insolées vont être éliminées. Un second double recuit est réalisé afin de bien tenir la résine dans le canal ; il se fait à 65°C pendant 2 minutes et après à 95°C pendant 8 minutes. En effet les zones de résine non insolées sont éliminées par voie chimique avec une solution de développeur SU8, laissant uniquement la géométrie du canal. Le substrat est ensuite rincé avec l'isopropanol (IPA). Un recuit est fait à 120°C pendant 10 min et l'empreinte du canal en SU8 est prête à être utilisée pour y mouler plusieurs capots en PDMS. D'après les mesures effectuées au profilomètre, l'épaisseur de la SU8 dans le canal obtenue est de l'ordre de 40 µm.

- Préparation du capot en PDMS

Tout d'abord, le moule en SU8 est exposé à des vapeurs d'hexaméthyl-disilazane (HMDS) durant la période de préparation du PDMS, pendant environ 45 min. Le HMDS est une solution utilisée pour effectuer un traitement de surface du substrat dans le but de faciliter le démoulage du PDMS. Nous préparons le PDMS, à l'aide du kit SYLGARD® 184, en mélangeant un élastomère à forte viscosité avec un agent réticulant en proportion de 10 ml d'élastomère pour 1 ml de réticulant. L'agent réticulant permet de durcir le PDMS durant sa cuisson. Après un mélange manuel des composants, nous plaçons le bécher contenant le PDMS, recouvert d'un film plastique dans une cuve à ultrasons pendant 5 minutes pour favoriser le mélange entre les deux composants. Ensuite, le mélange est placé dans une cloche à vide pendant environ 30 min pour éliminer toutes les bulles d'air emprisonnées.

- Impression du canal dans le PDMS

Une fois dégazé, nous versons 3 mm de PDMS sur l'empreinte du canal placée dans une capsule en plastique, le tout est après placé dans une étuve à 75°C pendant 2 h. Une fois que le PDMS est réticulé et polymérisé, nous le décollons délicatement du substrat (Figure. 65.a). L'empreinte du canal est ainsi transférée dans le PDMS. A la fin, nous séparons les capots PDMS et nous perçons des trous aux niveaux des réservoirs à l'aide d'un puncheur (Figure. 65.b) pour que les tuyaux d'injection du fluide puissent être connectés au canal. L'épaisseur du PDMS obtenue est d'environ 3 mm et la hauteur du canal 40 µm.



(a) (b)

Figure. 65 (a) Exemple du démoulage du PDMS, (b) perçage des trous au niveau des réservoirs [117].

Le capot ainsi fabriqué en PDMS contenant la partie supérieure du canal microfluidique doit être reporté sur la puce CMOS, et aligné au-dessus du canal fabriqué par IHP (Figure. 66).

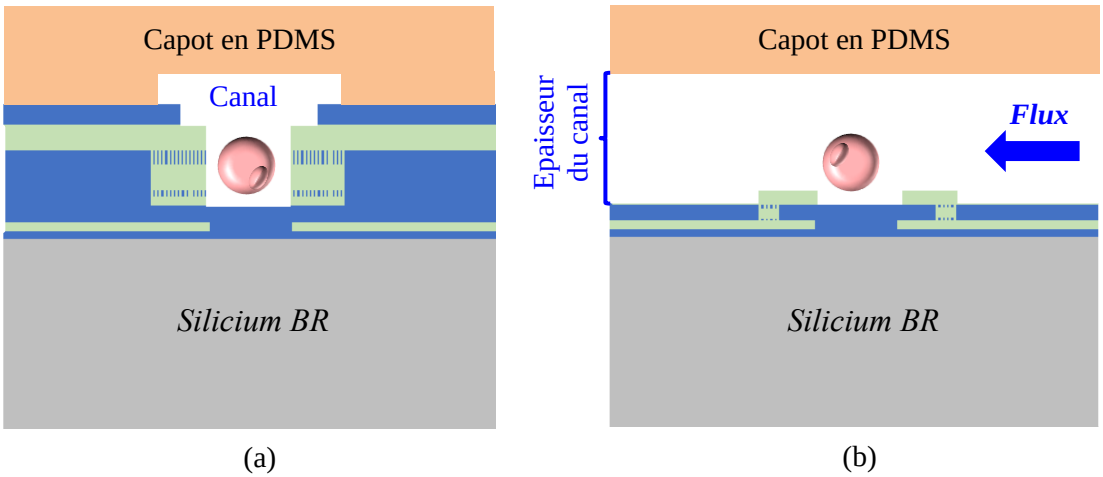


Figure. 66 Vue en coupe du capot en PDMS contenant la partie supérieure du canal microfluidique, aligné au-dessus du canal fabriqué par IHP, au niveau : (a) des électrodes épaisses, (b) des électrodes fines (pas à l'échelle).

Il peut être scellé à la puce en utilisant un traitement de surface approprié couplé à un plasma d'oxygène, et sera collé de manière irréversible sur le circuit. En revanche cette méthode implique un certain nombre de contraintes, notamment si durant les expériences nous avons besoin de nettoyer le canal dans le cas d'adhérence des cellules par exemple ou lorsque le canal est bouché par des amas cellulaires. Nous avons donc privilégié une solution permettant un packaging amovible de la puce : la pièce en PDMS est maintenue mécaniquement à l'aide d'un support de pressage manuel ajustable donnant une grande souplesse de manipulation. Nous avons dimensionné le support selon la taille des puces (Figure. 67). Ainsi, les circuits peuvent être nettoyés si besoin, et réutilisés plusieurs fois toujours dans des conditions optimales et permettant d'obtenir des résultats reproductibles.

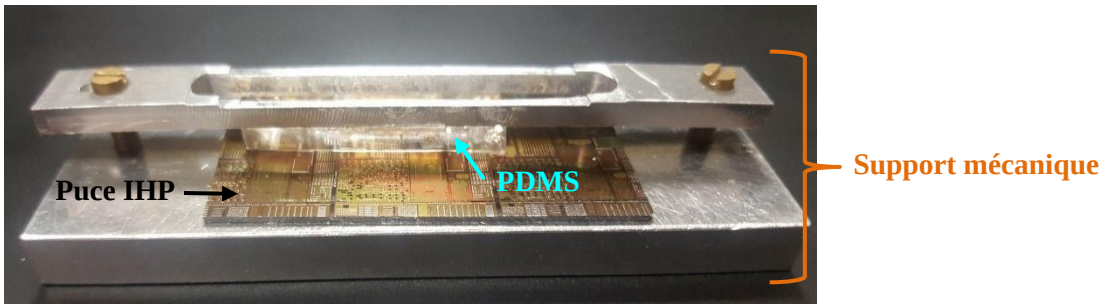


Figure. 67 Puce d'IHP assemblée avec le PDMS et le support mécanique.

D'autre part comme le PDMS est pressé mécaniquement contre le circuit CMOS, la profondeur du canal imprimé dans le PDMS va diminuer légèrement en fonction de la pression

de pressage. Nous ne maîtrisons pas précisément la profondeur obtenue au final, mais comme nous le verrons après dans les expérimentations réalisées, les cellules en flux dans le canal réagissent toujours avec le champ électrique d'une manière efficace. Elles ne se situent pas à des altitudes élevées si l'on se réfère au point de focalisation de l'objectif de microscope réglé par rapport aux électrodes. Au final nous pouvons estimer que la hauteur totale du canal, incluant la profondeur gravée sur la puce IHP, est de l'ordre de 30 µm.

VI. Conclusion

Au travers de ce second chapitre, nous avons présenté plusieurs géométries de microélectrodes qui permettent de générer un champ électrique non uniforme et donc potentiellement une force de diélectrophorèse capable de déplacer les cellules vers des zones privilégiées, comme l'illustrent les simulations du champ électrique que nous avons réalisées. Nous avons testé certaines de ces structures avec des cellules cancéreuses de côlon (lignée SW620), pour des fréquences basses du spectre, ce qui nous a permis d'identifier la structure qui est la plus adaptée avec la caractérisation individuelle de cellules que nous visons. La structure quadripôle dont deux électrodes opposées possédant la même polarité nous a semblé la plus intéressante pour observer le comportement diélectrophorétique des cellules. Cette structure a été ensuite implémentée sur une puce microfluidique en utilisant le procédé SG25H4 BiCMOS d'IHP dans l'objectif de réaliser des microsystèmes DEP-UHF capables de générer un champ électrique de forte intensité quel que soit l'altitude des cellules dans le canal. Nous avons présenté comment nous avons développé la géométrie de la structure quadripôle en optimisant les espaces inter-électrodes et les épaisseurs des électrodes. Les principales étapes de fabrication de la structure quadripôle et de son canal microfluidique ont été également présentées.

Dans le troisième chapitre de ce manuscrit, nous allons présenter le banc de mesure haute fréquence qui sera utilisé pour la partie expérimentale. Nous décrirons comment nous avons caractérisé individuellement chaque cellule et nous présenterons une analyse statistique des résultats obtenus avec différentes lignées de cellules cancéreuses humaines.

Nous présenterons dans un quatrième chapitre, le design du premier prototype de cytomètre apte à séparer par DEP haute fréquence, des cellules biologiques les unes des autres en se basant sur leurs différences de propriétés diélectriques intracellulaires, en l'optimisant à partir des simulations électromagnétiques. Nous présenterons également des premiers résultats expérimentaux de tri cellulaire réalisé à partir du cytomètre, en cherchant dans un premier temps à séparer des cellules de billes de polystyrène.

Chapitre III

Mise en œuvre expérimentale de la DEP haute fréquence et caractérisation de cellules biologiques

I. Introduction

Dans le chapitre précèdent, nous avons présenté le développement et l'optimisation de la structure à quatre électrodes, implémentée sur une puce BiCMOS, dédiée à la caractérisation une par une de cellules biologiques par la méthode de DEP haute fréquence (DEP-UHF).

Nous allons au travers de ce chapitre, présenter la mise en œuvre expérimentale en détaillant dans un premier temps, le banc expérimental haute fréquence qui a été développé et qui sera utilisé pour effectuer les mesures de caractérisation cellulaire DEP-UHF. Pour valider l'efficacité de la structure à quatre électrodes, nous avons réalisé des mesures à partir de billes de polystyrène calibrées en taille et dont les propriétés diélectriques sont uniformes et connues. Cette étape nous permettra également de mettre au point le protocole d'injection et de manipulation des cellules permettant une caractérisation cellule par cellule.

Nous étudierons par la suite les propriétés DEP haute fréquence de cellules biologiques vivantes. Dans le cadre de ces travaux, nous avons dans un premier temps caractérisé deux types cellulaires humains différents : des cellules cancéreuses du système lymphatique issues de la lignée cellulaire BL-41 et des cellules cancéreuses colorectales issues de la lignée cellulaire SW620. L'objectif était de mener des caractérisations électriques sur des cellules possédant différentes caractéristiques biologiques pour explorer le potentiel de la DEP-UHF à discriminer différents types cellulaires. Dans un second temps, nous nous sommes intéressés à caractériser différents types de lignées cellulaires de cellules cancéreuses toutes issues d'un même type de tissu le côlon : les lignées SW620 (stade III), SW480 (stade II) et HCT 116 (stade II). Ces lignées diffèrent notamment par leur grade tumoral représentatif de leur degré d'agressivité. L'intérêt d'utiliser ces types cellulaires est double : ils ont déjà fait l'objet de caractérisation aux fréquences microondes au sein de notre équipe et ces cellules dérivées du même type de tissu seront particulièrement adaptées pour nous permettre d'évaluer la sensibilité de la technique de DEP-UHF mise en œuvre ici. Toutes les cellules biologiques utilisées lors de nos expériences ont été cultivées et préparées par le laboratoire d'Homéostasie Cellulaire et Pathologies, et en particulier par les Dr Barbara Bessette et Gaëlle Begaud que nous remercions pour leur aide et leur disponibilité.

Nous présenterons les résultats expérimentaux de caractérisation obtenus pour les différentes cellules en cherchant à déterminer leur seconde fréquence de transition qui est

fortement liée à leurs propriétés intracellulaires intrinsèques. Nous verrons en comparant les résultats qu'il s'est avéré que chaque type cellulaire investigué possède une seconde fréquence de transition spécifique, en d'autres termes qu'il possède chacun une réponse DEP-UHF qui leur est propre.

Nous verrons ensuite dans le dernier chapitre de ce manuscrit, que ces résultats sont prometteurs et permettent d'envisager d'utiliser la DEP-UHF pour développer de nouvelles méthodes électriques de tri cellulaire.

II. Banc expérimental pour la caractérisation cellulaire par DEP-UHF

II.1. Développement du banc expérimental pour l'application de signaux hautes fréquences sur des cellules en suspension

Comme nous l'avons déjà montré dans le chapitre précédent, la structure à quatre électrodes permet de générer un champ électrique non uniforme, qui sera appliqué aux cellules à caractériser. En fait, la paire d'électrodes épaisses (électrodes n°1 et 3) est ici alimentée par le même signal alternatif RF alors que les électrodes fines (n°2 et 4) sont reliées à la masse (Figure. 68).

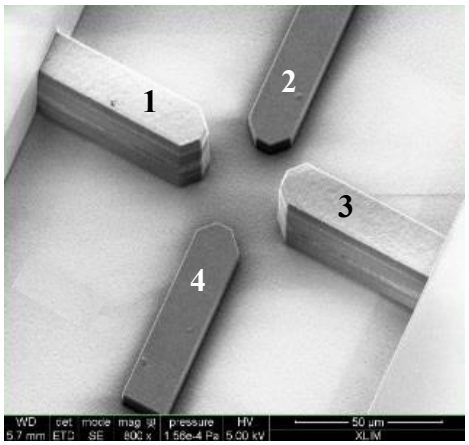
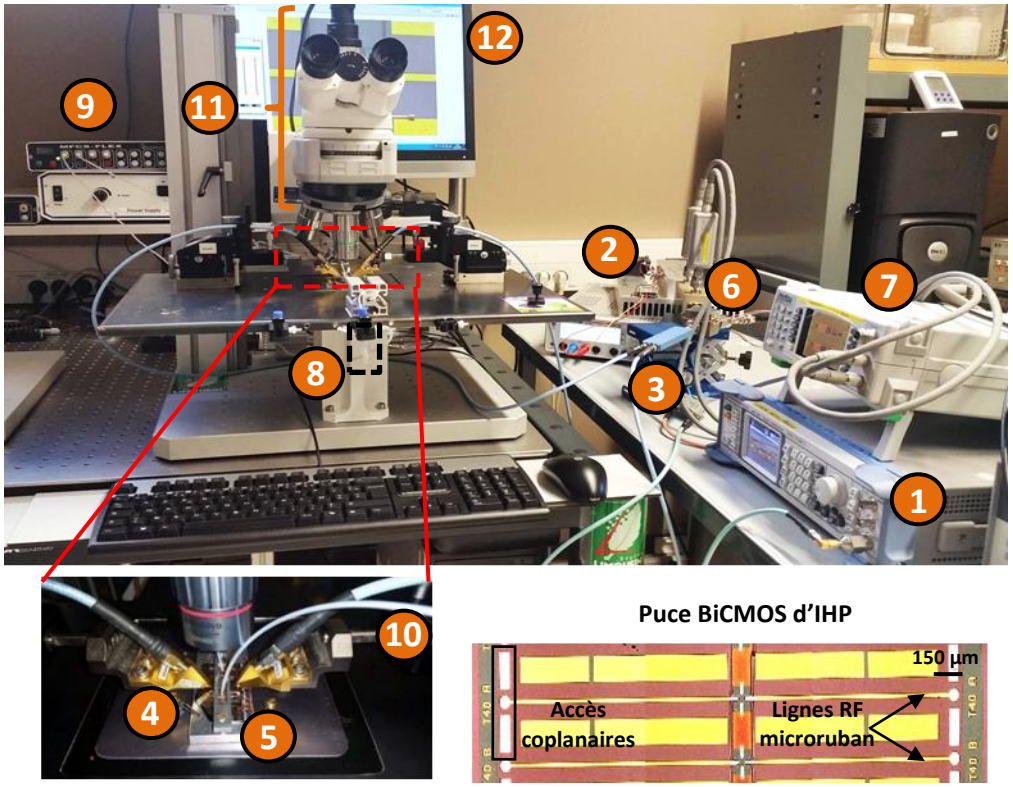


Figure. 68 Photo MEB de la structure à quatre électrodes implémentée dans l'empilement BEOL d'une puce BiCMOS d'IHP.

Dans notre étude, l'objectif est de générer des signaux DEP haute fréquence dont les niveaux d'amplitude sont suffisants pour induire le déplacement et le piégeage de la cellule entre les électrodes du quadripôle. Dans ce cadre, nous avons développé le banc expérimental haute fréquence illustré sur la Figure. 69, qui est capable de générer des signaux d'amplitude pouvant aller jusqu'à 18 V_{pp} dans le plan des pointes RF pour des fréquences de 50 MHz à 1 GHz.

Le banc comporte un générateur (1), un amplificateur de puissance (2), un diviseur de puissance (3), des sondes RF (4), un pont-réflectométrique (6), un puissance-mètre (7), un contrôleur de flux microfluidique (9), une table de déplacement XY avec micromanipulateurs pour sonde RF (5), un microscope et une caméra (11).



1. Générateur Signal RF
2. Amplificateur de puissance
3. Diviseur de puissance
4. Sonde RF
5. Table de déplacement XY avec micromanipulateurs pour sondes RF
6. Coupleur 40 dB
7. Puissance-mètre
8. Suspension de cellules injectées
9. Contrôleur de flux microfluidique
10. Connectique microfluidique
11. Microscope et caméra
12. Ordinateur

Figure. 69 Banc expérimental haute fréquence pour générer des signaux DEP-UHF à des tensions arrivant jusqu'à 18 V_{pp} dans le plan des pointes RF pour des fréquences supérieures à 50 MHz.

En effet, le générateur SMB 100A (société Rohde & Schwarz), synthétiseur de fréquence, permet ici de délivrer un signal CW RF à faible bruit dont la fréquence peut être ajustée de quelques MHz jusqu'à 1 GHz. Afin d'atteindre une amplitude crête-crête de champ électrique d'environ 6 V_{pp}, le signal généré sera amplifié à travers un amplificateur de puissance (Bone BLWA 110-5M) ayant un gain de 40 dB, tout en gardant un niveau d'harmonique très faible. Ensuite, le signal amplifié est dirigé vers un diviseur de puissance afin d'appliquer simultanément la même onde aux deux électrodes épaisses de la structure, tout en assurant un déphasage quasi nul entre les deux ondes. Les signaux hautes fréquences sont appliqués à la puce via deux sondes RF (|Z| probe GSG) et ils se propagent le long de lignes RF microruban jusqu'à atteindre le quadripôle dans le canal microfluidique, où il génère le gradient de champ électrique et la force de DEP résultante sur les cellules.

L'intensité de cette force de DEP peut être réglée en ajustant la puissance du signal CW RF. En effet, la puissance RF incidente et réfléchie sur la puce est mesurée au moyen d'un pont réflectométrique (Werlatone : 100 Watts, -40 dB de couplage) associé à un puissance-mètre (Anritsu ML2496A). Nous avons calibré le puissance-mètre pour visualiser directement le niveau de puissance appliqué dans le plan des deux sondes RF lors des expérimentations. En considérant à la fois les pertes moyennes de la ligne microruban dans laquelle les signaux se propagent et la variation d'impédance, lors du passage du signal de la ligne microruban fine (épaisseur 3 µm) vers l'électrode épaisse (9 µm), nous avons pu estimer la tension RF moyenne dans le plan des électrodes avec une bonne précision. Dans le cas de nos expériences, le signal DEP haute fréquence appliqué dans le plan des électrodes peut être ajusté jusqu'à 2-6 V_{pp}.

II.2. Protocole d'injection des cellules biologiques et de suivi de leur déplacement

Pour réaliser l'injection des cellules en suspension dans le canal microfluidique, nous utilisons un contrôleur de flux microfluidique de la société Fluigent (MFCS-FLEX-4C), piloté par un ordinateur. Ce contrôleur permet de gérer le flux de cellules en réglant précisément la différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal. En effet, l'entrée du canal est reliée à la suspension de cellules à injecter contenue dans un tube de 1,5 ml, à travers un tube en PTFE (1/16" × 0,25 mm). D'autre part, la sortie du canal est reliée au milieu de suspension contenu dans un tube de 1,5 ml, à travers un second tube en PTFE.

L'observation du mouvement de déplacement des cellules a été effectuée à travers un microscope associé à une caméra Axiocam (Carl Zeiss). Cette dernière est reliée à un ordinateur pour visualiser le déplacement de la cellule et faire l'acquisition des images et des vidéos. D'autre part, nous avons utilisé un programme codé en « Python », permettant de récupérer les différentes informations de configuration du générateur, telles que la fréquence et la puissance du signal appliqué au dispositif et l'état du générateur on/off, et de les afficher ainsi sur l'écran de l'ordinateur. En effet, cela permet de suivre avec précision et en temps réel le comportement de la cellule induit en fonction des données que nous appliquons durant les expérimentations. Pour faciliter après le traitement des résultats, nous avons utilisé un logiciel de capture d'écran « Auto Screen Capture » qui nous a permis de sauvegarder automatiquement des captures d'écran, toutes les 250 ms, incluant l'image de la caméra où apparaît le déplacement de la cellule et les informations affichées par le programme Python. Ainsi, pour chaque image, la

position de la cellule peut être reliée aux caractéristiques des signaux DEP avec lesquelles elle interagit.

Dans la partie suivante, nous allons présenter des mesures préliminaires DEP-UHF réalisées avec des billes de polystyrène dans l'objectif à la fois de valider le fonctionnement et le paramétrage du banc expérimental UHF mais aussi de tester le fonctionnement de la structure quadripôle.

II.3. Validation du banc expérimental DEP haute fréquence avec des billes de polystyrène

Dans un premier temps, pour valider notre banc expérimental, nous avons choisi de réaliser des expérimentations sur des billes de polystyrène suspendues dans un milieu de suspension aqueux qui sera utilisé dans nos expérimentations et dont sa composition sera détaillée dans la partie suivante. L'intérêt d'utiliser ces particules est multiple : (i) leur propriétés diélectriques sont uniformes et parfaitement connues, (ii) elles sont très bien calibrées en taille, (iii) et la mise en œuvre de l'expérimentation est simplifiée par rapport à la mesure de cellules biologiques.

Nous avons choisi de travailler avec des billes de polystyrène (société Duke Standards) présentant un diamètre de 12 µm ce qui est comparable à la taille des cellules biologiques que nous étudierons par la suite. Les billes possèdent une permittivité ε_{bille} comprise entre $2{,}4\varepsilon_0$ et $2{,}7\varepsilon_0$ F/m et une conductivité σ_{bille}. Or pour une particule sphérique homogène, comme pour une bille de polystyrène, la conductivité globale de la particule σ_p est exprimée par la somme de la conductivité volumique ($\sigma_{pvolume}$) et la conductivité surfacique (K_s/a) de la particule. σ_p est donnée par l'équation (III-1) [118] :

$$\sigma_p = \sigma_{pvolume} + \frac{2K_s}{a} \qquad \text{(III-1)}$$

avec K_s est la conductance surfacique de la particule et a représente le rayon de la particule.

Cependant, dans le cas des billes de polystyrène, $\sigma_{pvolume} \approx 0$ comme ce matériau est un très bon isolant et K_s est typiquement de l'ordre de 1 nS [119]. Ainsi, la conductivité de la bille peut se réduire à l'équation (III-2) :

$$\sigma_{bille} = \frac{2K_s}{a} \approx 0{,}3\ mS/m \qquad \text{(III-2)}$$

En ce qui concerne le milieu de suspension ; il possède des propriétés diélectriques telles que ε_m est de l'ordre de $78\varepsilon_0$ F/m pour une fréquence de 200 MHz et σ_m est égale à 20 mS/m dans notre cas.

Ainsi à partir de ces données, nous pouvons déjà prédire la réponse diélectrophorétique de la bille de polystyrène en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué, en représentant son spectre de $Re[K(\omega)]$ (combinaison des équations (I-2) et (I-3) du premier chapitre) (Figure. 70).

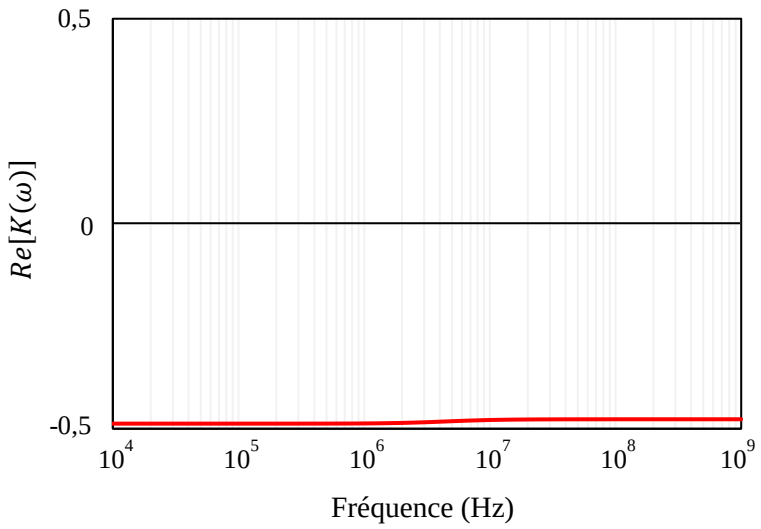


Figure. 70 Réponse diélectrophorétique théorique d'une bille de polystyrène de diamètre 12 µm, suspendue dans un milieu possédant une permittivité $\varepsilon_m = 78\varepsilon_0$ F/m et une conductivité σ_m = 20 mS/m.

La Figure. 70 montre que les billes en suspension dans le milieu d'immersion présentent une partie réelle du facteur de Claussius-Mossotti qui restera négative quelle que soit la fréquence du signal appliqué à la structure, comme les propriétés diélectriques de la bille sont très inférieures à celles du milieu de suspension. Cela signifie alors que les billes de polystyrène ne pourront subir que des forces de DEP négatives. Elles seront donc repoussées par les régions de forte intensité de champ et seront piégées dans les régions de faible intensité de champ, c'est-à-dire dans notre cas au centre des quatre électrodes comme nous l'avons montré dans le deuxième chapitre (Figure. 71).

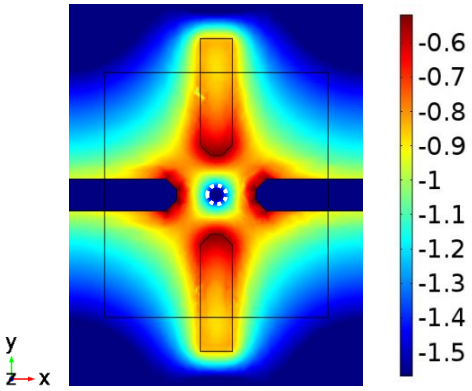
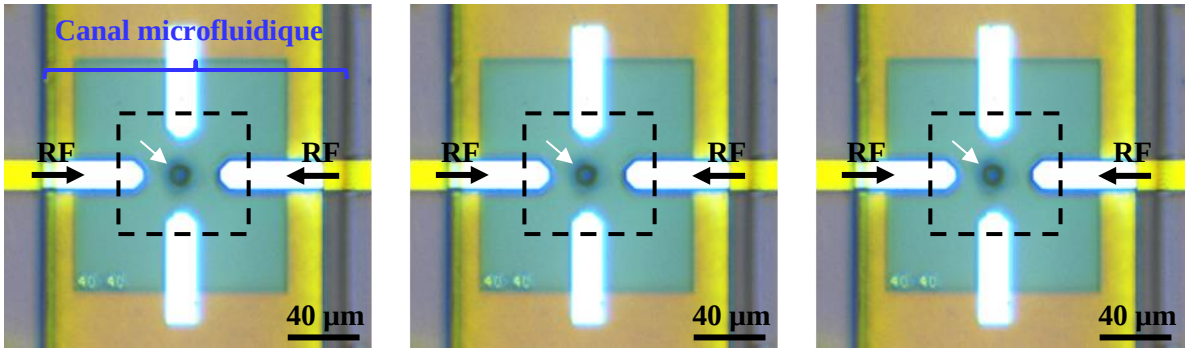


Figure. 71 Profil de la distribution du champ électrique généré par la structure à quatre électrodes pour une tension de 2 V_{pp}, à une altitude z = 5 µm dans le canal microfluidique.

Avant de commencer les expérimentations, nous avons dilué 1 volume de la solution commerciale de billes pour 2 volumes du milieu de suspension. En effet, la faible conductivité du milieu de suspension utilisé (σ_m = 20 mS/m) qui se traduit par une eau appauvrit en ions, permet d'assurer que nous n'aurons pas de problème d'hydrolyse de l'eau lors de l'application du champ électrique dans le canal microfluidique.

Le protocole d'injection des particules est le suivant : le canal microfluidique est d'abord rempli du milieu de suspension injecté via le réservoir de sortie du canal à l'aide du contrôleur de flux. La totalité du volume du canal est rempli en évitant la formation de bulles d'air qui pourraient perturber la circulation des particules. Une fois que le canal est rempli, nous injectons la suspension de billes dans le canal via le réservoir d'entrée, tout en imposant une différence de pression Δp entre l'entrée et la sortie du canal de l'ordre de 35 mbar. La première étape consiste à réduire la vitesse des particules en flux au niveau de la zone d'étude en équilibrant les pressions d'entrée et de sortie du canal. Pour ce faire, une différence de pression Δp autour de 0,5 mbar, est imposée. De cette façon, la force de DEP générée qui est en compétition avec les forces d'entrainement du flux, pourra agir plus efficacement sur les billes pour les repousser des régions de forte intensité de champ et les piéger au niveau du minimum de champ présent au centre des quatre électrodes. En effet, lorsque les billes passent au ralenti au niveau de la zone d'analyse, les deux électrodes épaisses sont polarisées avec un signal RF à 100 MHz. Nous avons appliqué une tension de l'ordre de 6 V_{pp} pour générer des forces de DEP répulsives suffisamment intenses pour piéger une des billes au centre de la structure (Figure. 72.a). Ce comportement de DEP négatif de la bille est obtenu également pour des signaux RF dont la fréquence varie entre 200 MHz et 500 MHz (Figure. 72.b et c), comme les propriétés diélectriques de la bille sont toujours inférieures à celles de son milieu d'immersion.



(a) (b) (c)

Figure. 72 Piégeage d'une bille de polystyrène, soumise à un champ électrique non uniforme, au centre des quatre électrodes en DEP négative, pour des fréquences : (a) 100 MHz, (b) 200 MHz, (c) 500 MHz.

Cette première étape de caractérisation DEP-UHF sur des billes de polystyrène a permis de mettre au point la méthodologie d'injection des particules mais aussi de valider l'efficacité de piégeage des particules en DEP négative par la structure quadripôle et donc de valider expérimentalement l'efficacité du banc expérimental UHF. L'étape suivante va consister à mettre au point le suivi de la trajectoire de la particule lorsqu'elle bascule de la DEP négative à la DEP positive afin de déterminer sa deuxième fréquence de transition f_{x02}. Pour ce faire, il est nécessaire d'utiliser des particules dont la réponse diélectrophorétique présente des zones de DEP positive ainsi que de DEP négative.

III. Caractérisation DEP haute fréquence de cellules biologiques

Nous allons voir dans ce qui suit, l'implémentation de la méthode DEP-UHF qui nous a permis de caractériser les propriétés diélectriques intracellulaires des cellules cancéreuses humaines issues de différentes lignées cellulaires.

L'objectif est ici d'identifier le potentiel de cette méthode de caractérisation pour des applications de tri cellulaire. Nous souhaitons voir s'il est possible d'enregistrer des différences significatives entre les signatures diélectrophorétiques UHF de différentes cellules pour pouvoir à terme les trier.

Dans ce cadre, nous avons cherché à caractériser différents types cellulaires. La première étude a donc consisté à mesurer deux types de lignées de cellules humaines dont les propriétés biologiques et le rôle dans l'organisme sont très différents : la lignée BL-41, cellules

cancéreuses du système lymphatique et la lignée SW620, cellules cancéreuses du côlon. En effet, nous allons comparer les secondes fréquences de transition f_{x02} de ces deux lignées pour voir si elles peuvent présenter des signatures DEP-UHF différentes.

Pour aller plus loin et quantifier la sensibilité de la technique, la seconde étape a consisté à caractériser d'autres types cellulaires et notamment des types cellulaires beaucoup plus proches en termes de provenance dans l'organisme et de propriétés biologiques. Dans ce contexte, nous avons cherché à caractériser des cellules de cancer colorectal provenant de différentes lignées et possédant différents stades tumoraux : les lignées SW480 (stade II), HCT 116 (stade II) et SW620 (stade III). Nous allons voir s'il est possible de discriminer ces trois lignées cellulaires provenant du même type de tissu, en comparant leurs signatures DEP-UHF.

En effet, un stade tumoral est défini par des anomalies au niveau des tissus et la capacité d'invasion des cellules suspectes à l'intérieur d'un tissu sain. Généralement les cellules malignes impliquées dans les tissus tumoraux, présentent différents niveaux d'agressivité. En fait, la forte agressivité de certaines cellules se traduit par la capacité de proliférer très rapidement, de régénérer une tumeur entière et même de produire des métastases en envahissant des tissus voisins en migrant vers des organes pouvant être éloignés dans l'organisme. En fait, l'agressivité des cellules tumorales peut être corrélée au stade de la tumeur. Par conséquent, le cancer de stade IV implique des cellules très agressives (Figure. 73) [120].

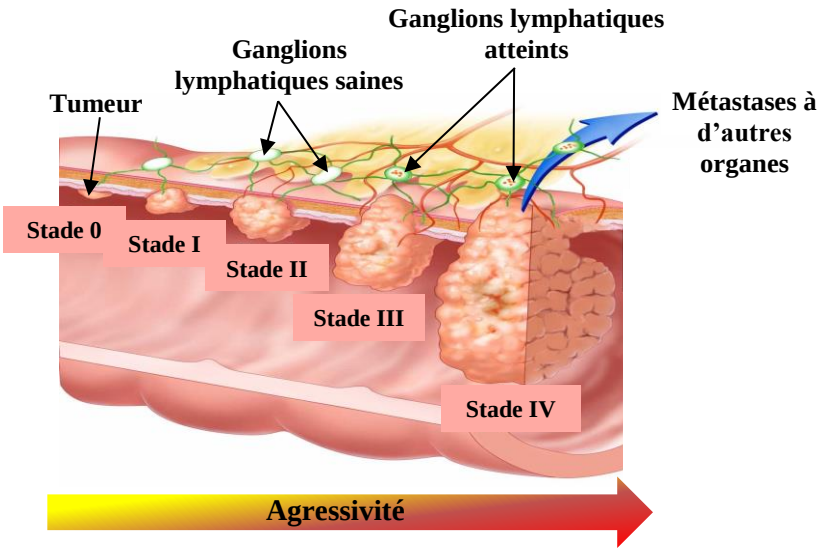


Figure. 73 Schéma des différents stades tumoraux du cancer colorectal [121].

Ainsi d'après la Figure. 73, on peut noter que la lignée SW620 de stade III possède un stade tumoral plus agressif que celui des lignées SW480 et HCT 116 (stade II). En effet, la lignée

SW620 est dérivée d'un tissu tumoral très développé ayant présenté un envahissement des ganglions lymphatiques, à la différence des deux autres lignées où l'envahissement s'est limité à la paroi endothéliale.

Notre équipe de recherche, au sein du laboratoire XLIM, a montré précédemment [122] qu'il était possible de discriminer le stade tumoral de différentes lignées cellulaires du cancer colorectal : lignées WiDr (stade II), SW480 (stade II), SW620 (stade III) et Colo205 (stade IV), en déterminant leur permittivité à hautes fréquences (5-20 GHz). Les mesures ont été réalisées avec un biocapteur résonnant qui permet de détecter la présence des cellules en induisant un décalage fréquentiel de sa réponse en présence de cellules à sa surface. Des décalages fréquentiels distincts ont été obtenus pour les cellules de différentes lignées. Par conséquent, la Figure. 74 montre qu'il existe des différences significatives entre les permittivités des cellules de différents stades tumoraux, en particulier de différences entre les lignées SW620 et SW480 issues du même patient.

Ainsi, les cellules malignes de différents stades tumoraux peuvent présenter des propriétés diélectriques différentes de part leur spécificité. Ces résultats permettent d'envisager la possibilité que ces cellules présentent une réponse DEP-UHF distincte en fonction de leur stade tumoral.

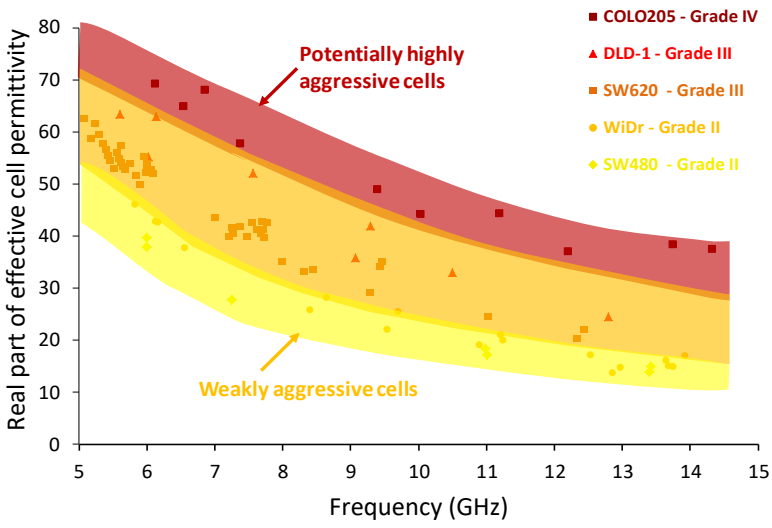


Figure. 74 Partie réelle de la permittivité relative pour les cellules cancéreuses colorectales de différents stades tumoraux [122].

Ces résultats ont donc en particulier motivé le choix des lignées de cellules cancéreuses colorectales.

Avant de détailler la méthodologie de mesure de secondes fréquences de transition de cellules et les résultats, nous allons décrire les protocoles de préparation des suspensions cellulaires que nous avons utilisées lors nos expérimentations.

III.1. Protocole de préparation de la suspension cellulaire

Avant de décrire la procédure de préparation des cellules biologiques que nous avons utilisées lors de notre étude, nous présentons tout d'abord le milieu de suspension que nous appellerons par la suite « milieu DEP », et qui sera utilisé pour manipuler et analyser toutes les cellules en suspension.

III.1.1. Préparation du milieu DEP de suspension

Comme nous l'avons montré précédemment, notre méthodologie de caractérisation cellulaire nécessite que la cellule réagisse dans les deux états de DEP, positif et négatif. Or, comme nous l'avons introduit dans le premier chapitre (Figure. 21), le comportement diélectrophorétique positif de la cellule dépend fortement de la conductivité du milieu de suspension. Donc, de façon à ce que les cellules puissent réagir en DEP positive, il est nécessaire que la conductivité du milieu soit inférieure à la conductivité du cytoplasme (σ_{cyt}) qui est de l'ordre de 0,5 S/m. Nous allons la considérer au moins 10 fois inférieure à σ_{cyt} afin d'obtenir une réponse de DEP positive sur une gamme de fréquences assez large permettant ainsi de pouvoir caractériser la cellule finement.

Pour se faire, nous allons travailler dans un milieu de survie : un milieu osmotique appauvri en ions qui permettra de conserver les cellules et de maintenir leur viabilité durant les caractérisations. Un milieu osmotique est un milieu aqueux dont l'osmolarité est contrôlée pour éviter le phénomène d'osmose qui se traduit par la diffusion des molécules, des ions et/ou solvants entre le milieu extracellulaire et intracellulaire de concentrations différentes. Ce qui peut avoir pour conséquence d'entraîner une variation de taille de la cellule, de son contenu cellulaire et donc de ses propriétés diélectriques et même cela peut entraîner la mort cellulaire : l'exemple bien connu est celui des globules rouges qui éclatent dans l'eau.

Nous préparons ce milieu dans la salle blanche du laboratoire XLIM. Il est majoritairement composé d'eau déionisée produite en salle blanche et de sucrose (Sigma) pour assurer une osmolarité optimale autour de 300 mOsm/L. Son pH est mesuré à l'aide d'un pH-mètre étalonné (Mettler Toledo), et il est ajusté avec du HCl dilué pour atteindre une valeur autour de 7,4.

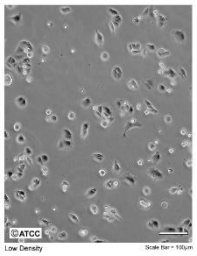
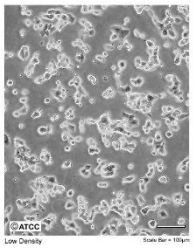
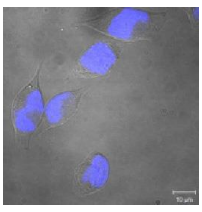
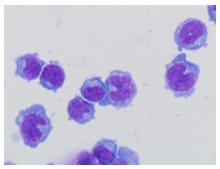
Ensuite la conductivité du milieu osmotique est mesurée en utilisant un conductimètre étalonné (VWR pHenomenal CO 3100 L). Elle possède une valeur autour de 20 mS/m.

Ainsi ce milieu DEP, osmotique et de faible conductivité, permet de maintenir une très bonne viabilité de cellules (évaluée au bleu de trypan) sur des périodes > 6 heures durant la manipulation tout en leur permettant de réagir aussi bien en DEP positive que négative (Figure. 21). Il est conservé à 4°C. Il est utilisé au maximum un mois, au-delà il y a des risques que l'eau s'ionise naturellement au contact de l'air et que les propriétés du milieu changent de manière trop forte risquant d'induire des biais dans la mesure des signatures DEP des cellules.

III.1.2. Préparation des cellules

Les cellules à caractériser dans le cadre de notre étude sont des cellules cancéreuses colorectales humaines issues des lignées SW620, SW480 et HCT 116 et des cellules cancéreuses humaines du système lymphatique issues de la lignée BL-41. Le Tableau III-1 présente les principales caractéristiques de ces quatre lignées cellulaires.

Tableau III-1 Caractéristiques des lignées cellulaires à caractériser.

Types de cellules cancéreuses	Colorectales			Système lymphatique
Lignées cellulaires	SW480	HCT 116	SW620	BL-41
Stade tumoral du cancer	II	II	III	-
Propriétés de culture	adhérentes	adhérentes	adhérentes	flottantes
Diamètre moyen	13-20 µm	12 µm	10-11 µm	8-10 µm
Morphologie cellulaire				

Les différentes lignées cellulaires du cancer colorectal sur lesquelles nous allons travailler sont dérivées du tissu de l'épithélium du côlon et proviennent de la source *American Type*

Culture Collection (ATCC) qui fournit des lignées cellulaires immortalisées issues de patients. En effet, par exemple les deux lignées cellulaires SW620 et SW480 ont été prélevées sur le même patient adulte à deux périodes différentes du développement de son cancer, et la lignée HCT 116 provient d'un autre patient également d'âge adulte. Les lignées cellulaires BL-41 proviennent de *Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures* et elles sont issues d'un patient enfant.

Toutes les cellules utilisées lors de l'expérimentation ont été préparées par le laboratoire d'Homéostasie Cellulaire et Pathologies : EA 3842 de l'Université de Limoges.

III.1.2.1. Culture des cellules cancéreuses du côlon

Les cellules cancéreuses colorectales sont cultivées en milieu complet c'est-à-dire un milieu DMEM enrichi de 10% de sérum de veau fœtal, de 500 U/ml de péniciline et de 500 µg/ml de streptomycine (Invitrogen), sous atmosphère humide enrichie avec 5% de dioxyde de carbone (CO_2) à 37°C (Figure. 75).

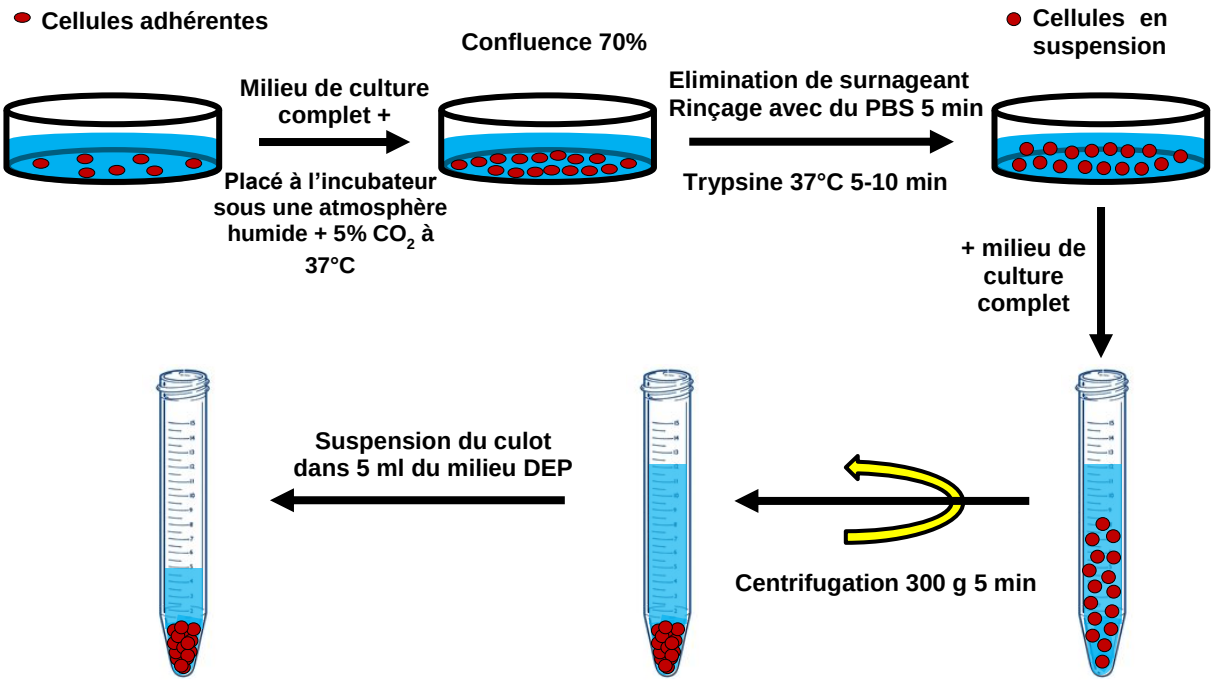


Figure. 75 Etapes de préparation des cellules cancéreuses du côlon (cellules adhérentes).

Lorsque la culture atteint 70% de confluence, le surnageant est éliminé et les cellules sont rincées au PBS (*Phosphate Buffered Saline*) pendant 5 min. Après avoir retiré le PBS, une solution de trypsine est ajoutée aux cellules adhérentes pendant 5 à 10 minutes (en incubateur) pour les décoller du support plastique de culture. Puis les cellules sont reprises dans le milieu

de culture complet, qui sert à arrêter l'action de la trypsine, et elles sont centrifugées à 300 g (unité de gravité) pendant 5 minutes. Le culot cellulaire obtenu sera repris dans 1 ml de milieu DEP et les cellules sont comptées sur lame de Malassez au microscope en présence du bleu de trypan (colorant d'exclusion vital). La concentration optimale de la suspension cellulaire obtenue est de l'ordre de 2×10^6 cellules/ml. En se basant sur le comptage, nous diluons la suspension cellulaire avec du milieu DEP pour obtenir la concentration cellulaire souhaitée pour les expériences (8×10^5 cellules/ml).

Les cellules restantes sont remises en culture pour les expériences futures.

III.1.2.2. Culture des cellules cancéreuses du système lymphatique

Les cellules BL-41 sont cultivées dans un milieu RPMI 1640 enrichi et complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 500 U/ml de péniciline et 500 µg/ml de streptomycine (Invitrogen). Les cellules sont maintenues sous atmosphère humide enrichie avec 5% de CO_2 à 37°C. Les cellules BL-41 étant des cellules flottantes, elles n'ont pas besoin de subir le traitement à la trypsine comme précédemment. Les cellules en suspension dans le milieu de culture sont donc directement centrifugées à 300 g pendant 5 minutes. Le culot cellulaire obtenu est repris dans 1 ml de milieu DEP et les cellules sont comptées avec le bleu de trypan sur lame de Malassez au microscope. Nous diluons ensuite la suspension cellulaire en fonction de la concentration cellulaire souhaitée.

L'ensemble des cellules, une fois préparées, sont conservées dans la glace à 4°C pendant le temps du transport jusqu'au laboratoire XLIM. Dans ces conditions, nous bénéficions d'environ 4 heures pour réaliser sereinement les caractérisations cellulaires. Nous sortons la suspension cellulaire à caractériser de la glace 15 minutes avant les mesures afin qu'elles soient à la température ambiante au moment de la caractérisation.

Nous allons décrire à présent le protocole de caractérisation établi pour déterminer la seconde fréquence de transition (f_{x02}) des cellules investiguées.

III.2. Méthodologie de caractérisation de la seconde fréquence de transition d'une cellule

La Figure. 76 décrit précisément et de manière chronologique la méthodologie que nous avons suivie pour caractériser chaque cellule.

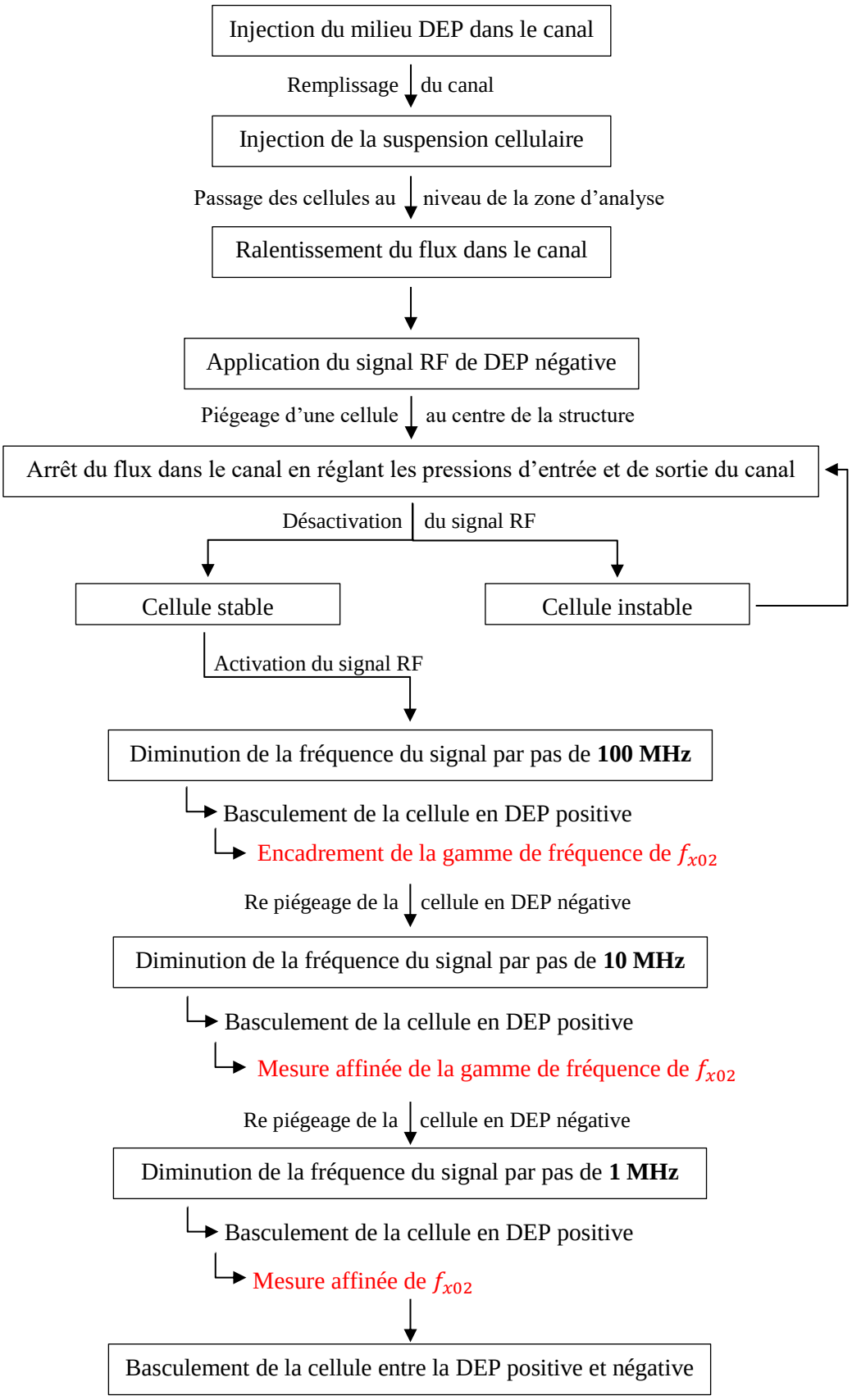
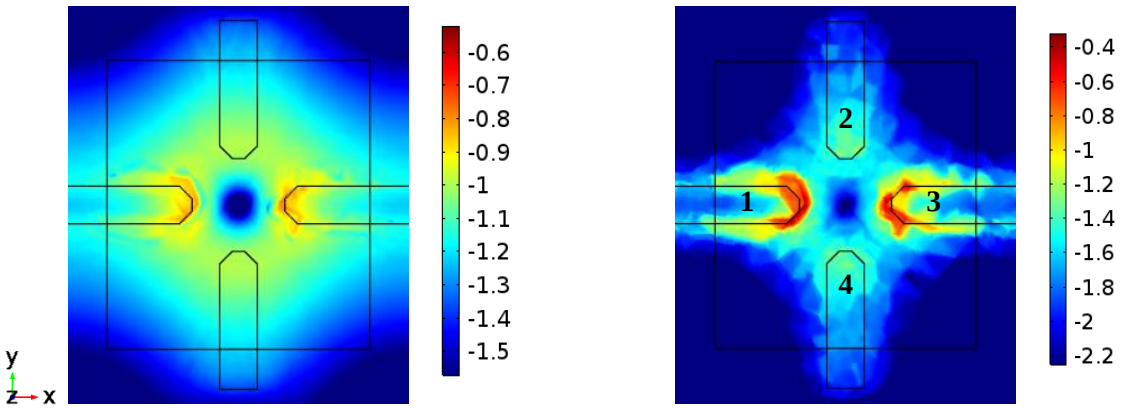


Figure. 76 Schéma synoptique de la méthodologie de caractérisation DEP-UHF d'une cellule.

Nous présenterons ici un exemple de caractérisation d'une cellule vivante (issue de la lignée SW620), suspendue dans un milieu DEP possédant un pH = 7,42 et une conductivité égale à 21,4 mS/m, en suivant et explicitant cette méthodologie.

La première étape consiste à pré remplir le canal microfluidique avec du milieu DEP pur en utilisant le contrôleur de flux. Cette étape se fait en s'assurant que toutes les bulles d'air qui peuvent exister dans le canal et qui peuvent perturber la manipulation des cellules, voir même boucher le canal, sont bien éliminées. Dans un second temps, 500 µL de la suspension cellulaire diluée à la concentration optimale est progressivement injectée à l'entrée du canal avec une pression d'environ 40 mbar. La sortie du canal reste connectée à un réservoir rempli de milieu DEP. Lors de l'injection de la suspension cellulaire, la pression sur la voie de sortie est négligeable. Cela permet de remplacer efficacement le milieu DEP pur par du milieu avec des cellules en suspension. Une fois que nous voyons les cellules passer au niveau de la zone de caractérisation, entre les quatre électrodes de la structure quadripolaire, le flux de cellules est ralenti, en ajustant la différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal. Par la suite, nous appliquons un signal RF aux deux électrodes épaisses disposées perpendiculairement au canal. Pour s'assurer que la cellule à caractériser soit bien localisée dans la zone d'étude, la fréquence du signal est choisie de façon à imposer un comportement de DEP négative à la cellule dans le but de la piéger au centre des quatre électrodes où l'intensité du champ électrique présente un minimum bien localisé (Figure. 77.a).



(a) (b)

Figure. 77 (a) Distribution du champ électrique généré par la structure quadripôle à une altitude z = 15 µm pour une tension 2 V_{pp}, (b) Configuration des forces DEP positives générées par le quadripôle à une altitude z = 15 µm, dans le cas d'une cellule de diamètre 12 µm plus fortement polarisée que son milieu de suspension.

Lorsque la cellule est piégée en DEP négative, le flux imposé dans le canal est stoppé en réglant les pressions d'entrée et de sortie du canal. Pour s'assurer que le flux est arrêté, le signal RF est désactivé. Si la cellule reste stable et bien centrée entre les électrodes pendant plusieurs dizaines de secondes, cela signifie que le flux est arrêté et donc que la cellule sous test ne subit pas de force de déplacement liée au flux. Le signal RF est à nouveau appliqué aux électrodes.

Pour déterminer la fréquence pour laquelle la cellule bascule de la DEP négative à la DEP positive, fréquence représentant la deuxième fréquence de transition f_{x02} de la cellule pour des signaux supérieurs à 50 MHz (Figure. 78), la fréquence du signal appliqué est progressivement diminuée.

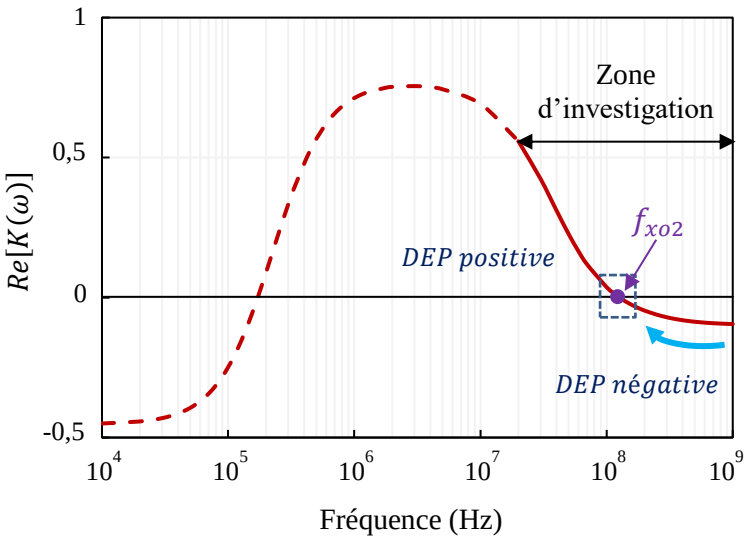


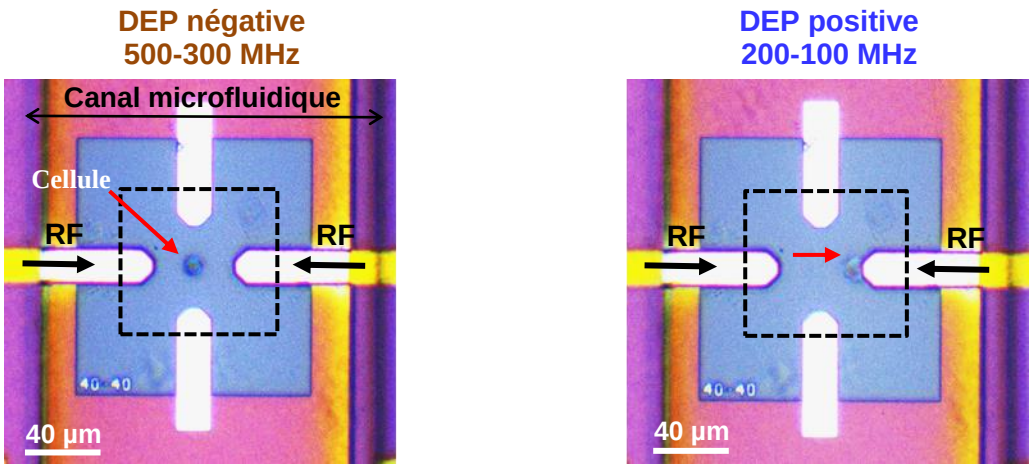
Figure. 78 Changement du comportement diélectrophorétique UHF théorique d'une cellule vivante (lymphocyte) en fonction de la fréquence du champ électrique appliqué (les paramètres des cellules de lymphocytes ont été présentés dans le Tableau I-2).

Tout d'abord, cette fréquence est réduite par pas de 100 MHz pour encadrer grossièrement la gamme de fréquence dans laquelle se situe f_{x02}. En effet, cette gamme de fréquence est déterminée lorsque le comportement DEP de la cellule change et qu'elle se déplace vers une des électrodes, régions de forte intensité de champ (Figure. 77.a), signe que son comportement DEP devient positif.

La Figure. 77.b illustre le profil des forces de DEP positives générées dans le canal à mi-hauteur, à une altitude z = 15 µm, où la plupart des cellules en flux seront localisées, présentées en échelle logarithmique et normalisées par rapport à une intensité de force DEP de l'ordre de 5×10^{-11} N. Elle montre que les forces de DEP positives sont plus intenses aux bords

des électrodes épaisses (n° 1 et 3) disposées perpendiculairement au canal qu'au niveau des électrodes fines (n° 2 et 4) implémentées au milieu du canal. D'après ce que nous avons déjà montré dans le deuxième chapitre (partie IV.2.2.), ce phénomène est logique puisque les électrodes épaisses permettent de générer un champ électrique intense à une altitude plus élevée dans le canal par rapport aux électrodes fines (Figure. 77.a). Ainsi, lors du balayage en fréquence, les cellules auront tendance à basculer préférentiellement en DEP positive vers l'un des deux bords des électrodes épaisses disposées perpendiculairement au canal microfluidique.

Ainsi, pour la cellule caractérisée qui a été piégée en DEP négative au centre du quadripôle, sous l'action d'un signal RF de fréquence 500 MHz et d'amplitude 2 V_{pp} (Figure. 79.a), nous avons observé qu'en diminuant la fréquence du signal par pas de 100 MHz, les forces de DEP répulsives commencent à devenir un peu plus faibles en dessous de 500 MHz jusqu'à 300 MHz, jusqu'à que la cellule change son comportement DEP à 200 MHz (Figure. 79.b). En effet, comme attendu, elle est attirée en DEP positive par l'un des deux bords des électrodes épaisses.



(a) (b)

Figure. 79 Piégeage de la cellule en : (a) DEP négative au centre des quatre électrodes à 500 MHz jusqu'à 300 MHz, (b) DEP positive au bord de l'électrode épaisse à 200 MHz.

Par conséquent, nous pouvons déduire que la seconde fréquence de transition f_{x02} de la cellule est située entre 200 et 300 MHz.

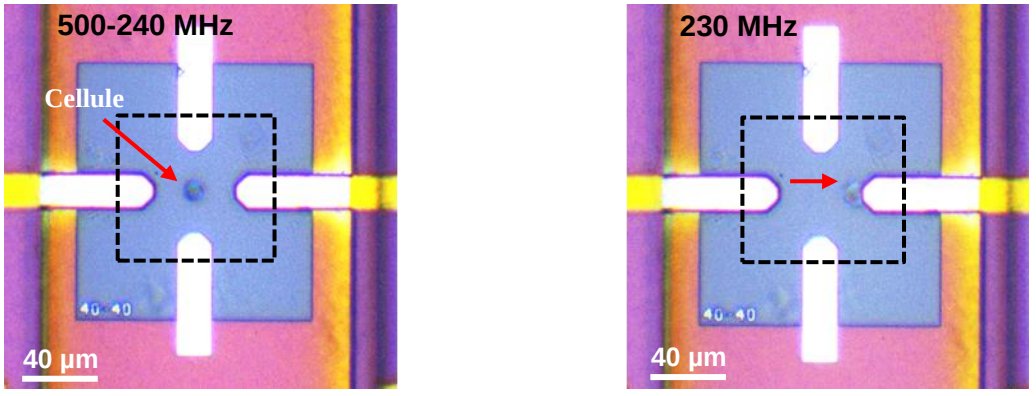
On vérifie également que les forces de DEP positive appliquées à la cellule à 200 MHz restent faibles (déplacement lent) comme cette fréquence est proche de f_{x02}, et par la suite elles deviennent plus intenses à 100 MHz.

L'intérêt d'utiliser ce pas très grand de 100 MHz, est qu'il nous permet d'éliminer rapidement les cellules qui auraient pu être endommagées durant la resuspension dans le milieu DEP. En effet, les cellules mortes ou en grande souffrance peuvent ne pas présenter de DEP positive.

Dans un second temps, pour affiner l'encadrement de mesure de la deuxième fréquence de transition de la cellule, la seconde étape consiste à affiner le pas de mesure dans la gamme de fréquence identifiée, soit entre 200-300 MHz. Nous avons donc réduit le pas fréquentiel de mesure à 10 MHz.

La cellule est de nouveau caractérisée. En effet, elle est à nouveau piégée tout d'abord en DEP négative en appliquant le signal DEP à 500 MHz. Nous commençons la caractérisation à partir de cette fréquence, pour que la cellule soit bien centrée au milieu du quadripôle une fois revenu à 300 MHz. En diminuant alors la fréquence du signal progressivement avec un pas de 10 MHz, nous remarquons que la cellule soumise au champ électrique réagit en DEP négative jusqu'à la fréquence de 240 MHz (Figure. 80.a). Par contre, en appliquant à la structure un signal RF à 230 MHz, nous observons que la cellule bascule de la DEP négative à la DEP positive, en se piégeant à présent dans la zone de forte intensité de champ (Figure. 80.b).

Nous pouvons donc affiner l'encadrement de f_{x02} de la cellule, fréquence comprise entre 230 et 240 MHz.



(a) (b)

Figure. 80 Basculement de la cellule de la : (a) DEP négative, cellule soumise à un signal RF à 240 MHz, (b) à la DEP positive en appliquant la fréquence 230 MHz.

Pour affiner la mesure de f_{x02}, le pas de mesure est maintenant abaissé à 1 MHz dans la gamme de fréquence 230-240 MHz. De même que précédemment, la cellule est à nouveau piégée au centre des quatre électrodes grâce à un signal à 500 MHz. Nous diminuons la

fréquence du signal appliqué tout en surveillant le mouvement diélectrophorétique induit de la cellule. Lorsque la cellule est soumise au champ électrique à la fréquence de 240 MHz jusqu'à 238 MHz, elle reste piégée en DEP négative (Figure. 81.a). Or, sous l'action du signal RF à 237 MHz, la position d'équilibre de la cellule change et elle commence à s'éloigner du centre du piège (Figure. 81.b). Cela signifie que le piège commence à perdre son efficacité et la cellule est soumise à des forces de DEP faibles, lui permettant de quitter le piège.

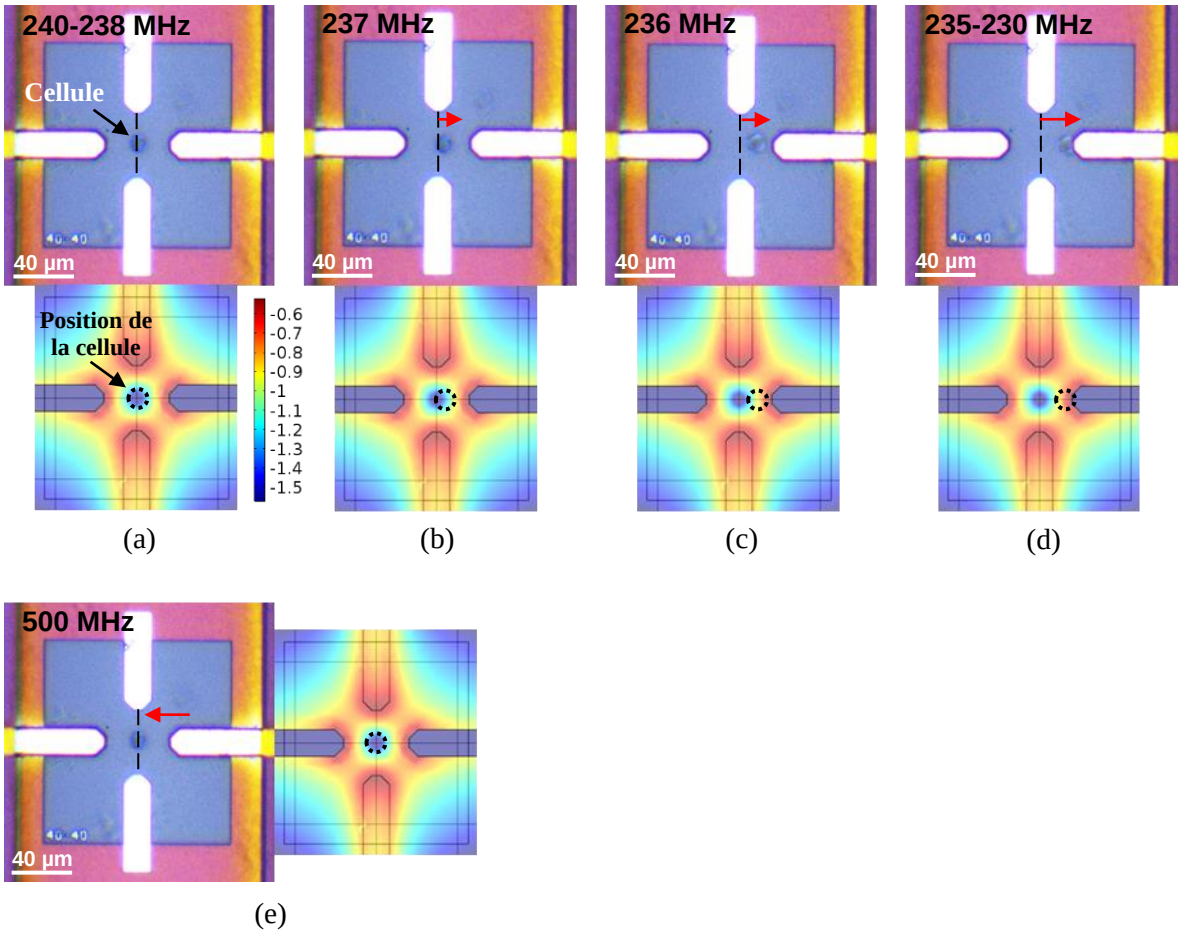


Figure. 81 (a) à (d) Mouvement diélectrophorétique UHF de la cellule lorsque la fréquence du signal RF est balayée entre 240-230 MHz avec un pas de 1 MHz, (e) piégeage de la cellule à nouveau en DEP négative à 500 MHz. La seconde fréquence de transition déterminée vaut 236 MHz.

Ensuite, en continuant à baisser la fréquence du signal, nous remarquons qu'à 236 MHz la cellule se trouve dans une position intermédiaire entre la région de DEP négative et DEP positive (Figure. 81.c). La cellule n'est ni attirée ni repoussée par le bord de l'électrode. Nous pouvons également observer une légère oscillation de la cellule. En effet, cette agitation ne devrait pas être liée aux effets thermiques, en raison de la faible conductivité du milieu que nous utilisons. Les simulations thermiques que nous avons déjà réalisées (Figure. 57), ont montré que l'élévation de température est négligeable pour un tel milieu exposé à un champ

électrique, pour une tension de 2 V_{pp}. En effet, ce mouvement peut s'expliquer par le fait que la fréquence du signal appliqué (236 MHz) est très proche de la seconde fréquence de transition, où la cellule n'est soumise à aucune force de DEP et donc particulièrement sensible au bruit brownien environnant. Par la suite, lorsque la fréquence du signal passe à 235 MHz (Figure. 81.d), la cellule est soumise de nouveau à des forces de DEP mais cette fois ci positives. Elle est alors attirée vers le bord de l'électrode épaisse, zone de forte intensité de champ.

Par conséquent, la caractérisation DEP haute fréquence de cette cellule s'achève par la détermination de sa seconde fréquence de transition qui se situe autour de 236 MHz.

A la fin de cette caractérisation, pour s'assurer que la mesure réalisée n'a pas affecté la viabilité de la cellule, nous avons à nouveau appliqué à la cellule piégée en DEP positive un signal de DEP négative à 500 MHz (Figure. 81.e). Nous observons qu'elle est immédiatement repoussée vers le centre des quatre électrodes. Il est possible de balayer la fréquence du signal autour de f_{x02} déterminée, en observant la cellule qui passe alternativement du centre du quadripôle au bord de l'électrode et inversement à chaque balayage, tout en confirmant la valeur de f_{x02} mesurée.

La procédure de caractérisation cellulaire DEP-UHF que nous venons de décrire, résumée par une description schématique sur la Figure. 76, sera suivie pour l'ensemble des caractérisations menées sur les quatre lignées cellulaires.

Dans la suite de ce chapitre, nous allons présenter et comparer les principaux résultats des caractérisations DEP-UHF que nous avons menées sur les différentes cellules cancéreuses humaines du système lymphatique et colorectales.

III.3. Résultats expérimentaux de caractérisation cellulaire en DEP haute fréquence

Dans un premier temps, dans l'objectif d'identifier l'aptitude de la méthode de caractérisation DEP-UHF à distinguer des différences significatives de signature diélectrophorétique UHF entre des cellules sensées être vraiment différentes, nous avons mené des mesures de secondes fréquences de transition sur deux lignées cellulaires humaines possédant des propriétés biologiques distinctes : la lignée BL-41 du cancer du système lymphatique et la lignée SW620 du cancer colorectal. Nous allons présenter l'ensemble des résultats expérimentaux obtenus pour chaque lignée cellulaire, avant de les interpréter et de les

comparer afin de voir si ces deux lignées peuvent être potentiellement discriminées par leurs signatures DEP-UHF.

III.3.1. Potentiel de discrimination cellulaire par DEP-UHF

III.3.1.1. Caractérisation de cellules issues de la lignée BL-41

Nos premières expérimentations ont été menées sur des cellules cancéreuses humaines du système lymphatique issues de la lignée BL-41. Ce sont des cellules non adhérentes et elles possèdent un diamètre moyen de l'ordre de 8 à 10 µm. Elles ont été suspendues dans du milieu DEP pour le besoin de notre étude.

Les mesures des secondes fréquences de transition réalisées sur ces cellules ont été effectuées en suivant la méthodologie de caractérisation cellulaire décrite sur la Figure. 76.

La Figure. 82 montre un exemple de caractérisation d'une cellule BL-41, suspendue dans un milieu DEP possédant un pH = 7,39 et une conductivité σ = 21 mS/m.

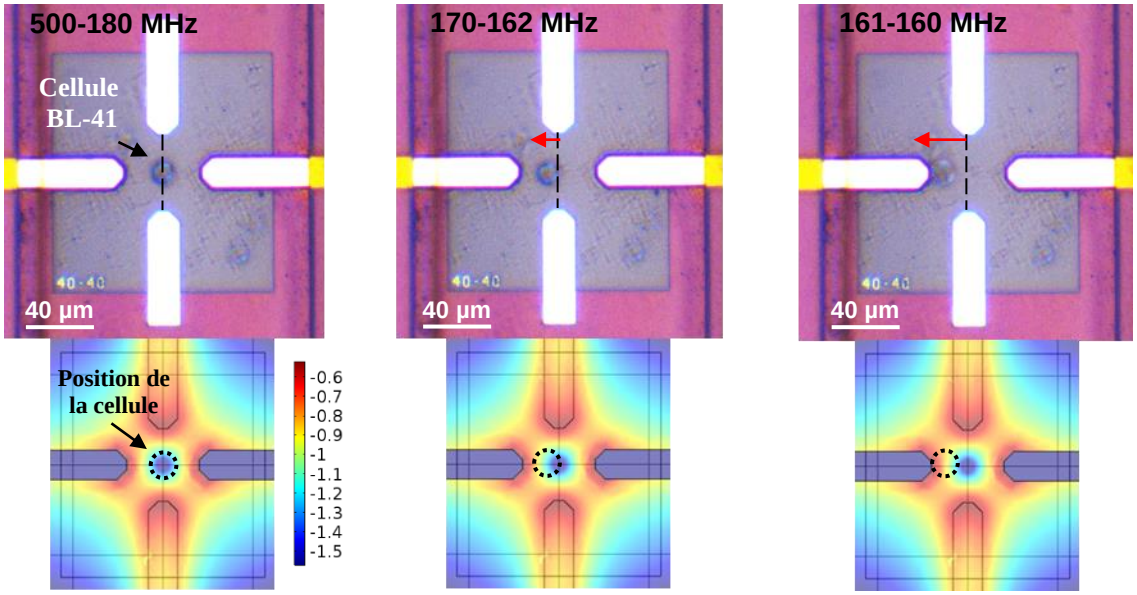


Figure. 82 Comportement diélectrophorétique UHF de la cellule BL-41, sous l'application d'un signal RF à des fréquences comprises entre 500 et 160 MHz. Sa seconde fréquence de transition mesurée se situe entre 161-162 MHz.

En effet, sous l'application d'un signal RF pour une tension de 2 V_{pp} à la structure quadripôle, nous avons observé qu'en diminuant la fréquence du signal de 162 MHz à 161 MHz, la cellule BL-41 soumise au champ électrique bascule respectivement de la DEP négative à la

DEP positive (Figure. 82.b et c). Ainsi, la seconde fréquence de transition mesurée pour la cellule BL-41 se situe entre 161-162 MHz.

Pour déterminer la seconde fréquence de transition f_{x02} caractéristique à une lignée cellulaire, il a été nécessaire de réaliser plusieurs campagnes de mesures sur un nombre représentatif de cellules pour acquérir des données statistiquement exploitables. Dans ce cadre, nous avons mené six campagnes de mesures sur 52 cellules de six suspensions cellulaires différentes préparées à partir de la lignée BL-41, et cela sur une période de 3 semaines (Figure. 83).

Les résultats de caractérisation obtenus pour la lignée BL-41 sont résumés sur la Figure. 83. Pour chaque campagne de mesure, nous précisons le nombre de cellules caractérisées (n) et les propriétés du milieu DEP utilisé (pH et conductivité). Toutes les mesures ont été réalisées à température ambiante.

Sur l'ensemble des campagnes de mesures, nous remarquons qu'il existe une dispersion plus ou moins importante des valeurs de f_{x02}. En effet, cela s'explique par le fait qu'au sein de toute culture cellulaire, il existe une hétérogénéité naturelle que ce soit au niveau de la taille et de la forme des cellules, mais aussi de leur contenu cellulaire, fonction de nombreux paramètres physiologiques.

D'autre part, nous avons fait une étude statistique des valeurs de f_{x02} mesurées pour les différentes cellules BL-41, pour déterminer notamment la médiane de la seconde fréquence de transition propre à ces cellules ainsi que l'écart type donnant une idée de la précision avec laquelle la signature DEP haute fréquence peut être déterminée (Tableau III-2). On peut donc considérer que la réponse diélectrophorétique UHF des cellules cancéreuses du système lymphatique issues de la lignée BL-41, possède une seconde fréquence de transition de l'ordre de 170 MHz.

Tableau III-2 Synthèse des mesures de seconde fréquence de transition (MHz) des cellules cancéreuses humaines issues de la lignée BL-41.

Lignée cellulaire	Nombre de cellules	Moyenne	Médiane	Ecart type	Erreur Std	Min	Max
BL-41	52	176	170	39,3	5,4	120	250

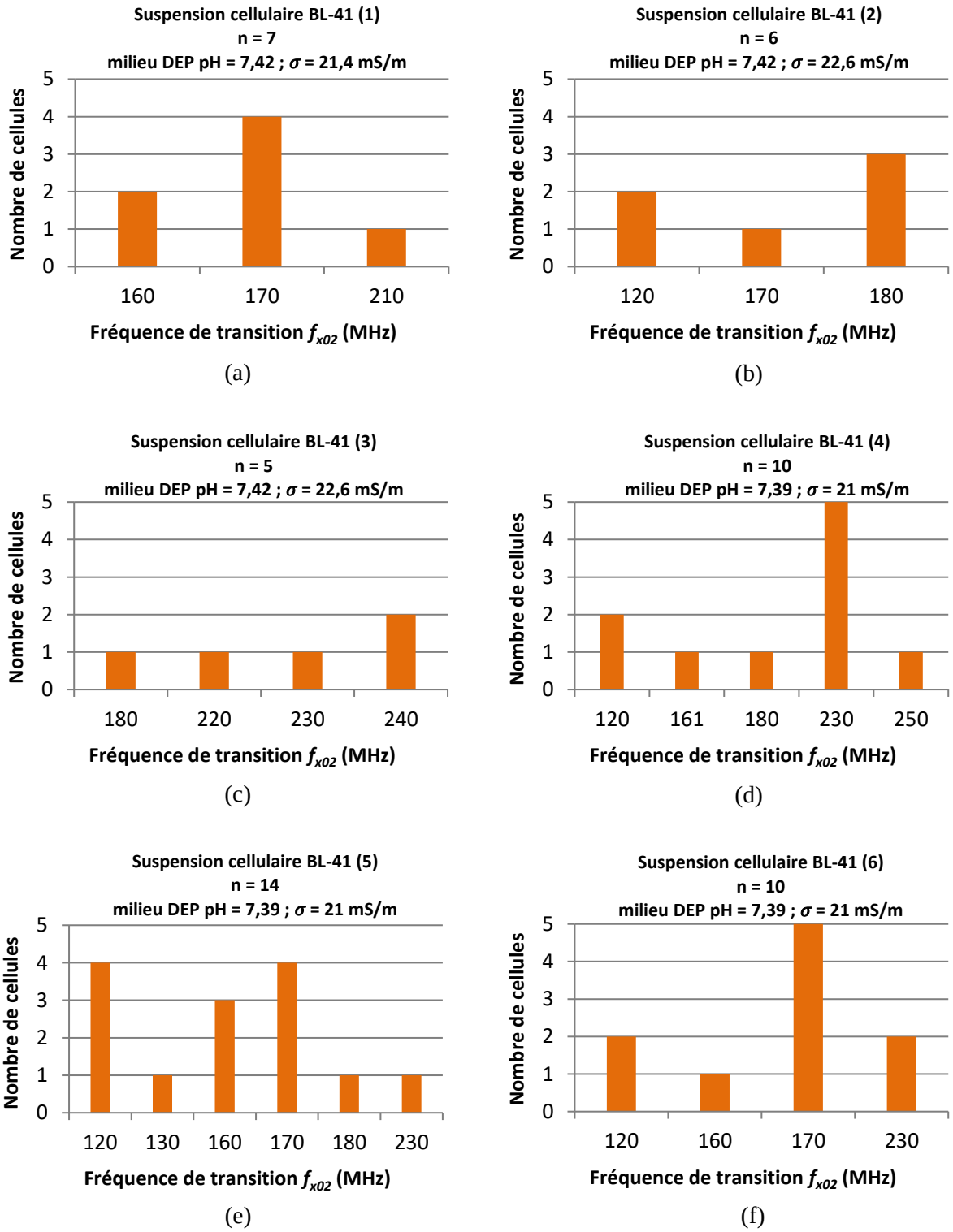


Figure. 83 Histogrammes représentant les secondes fréquences de transition déterminées pour 52 cellules BL-41.

Nous allons voir dans la partie suivante, les résultats de caractérisation menées sur un type cellulaire différent ; lignée cellulaire SW620, que nous pourrons comparer à ceux obtenus de la lignée BL-41.

III.3.1.2. Caractérisation de cellules issues de la lignée SW620

Nous allons présenter la caractérisation DEP-UHF de cellules cancéreuses du côlon humaines issues de la lignée SW620, des cellules adhérentes possédant un diamètre moyen de l'ordre de 10 à 11 µm, suspendues dans du milieu DEP. Ces cellules ont fait l'objet des premières caractérisations de cellules cancéreuses colorectales car elles étaient disponibles en routine chez nos collègues biologistes et avaient déjà fait l'objet de caractérisations par des techniques de spectroscopie diélectrique microonde dans notre équipe [122].

Les mesures de fréquence de transition menées sur les cellules SW620 ont été réalisées en suivant la même procédure de caractérisation décrite sur la Figure. 76.

Nous présentons sur la Figure. 84 une mesure de la deuxième fréquence de transition d'une cellule SW620 suspendue dans un milieu DEP possédant les propriétés suivantes : un pH = 7,42 et une conductivité = 21,4 mS/m.

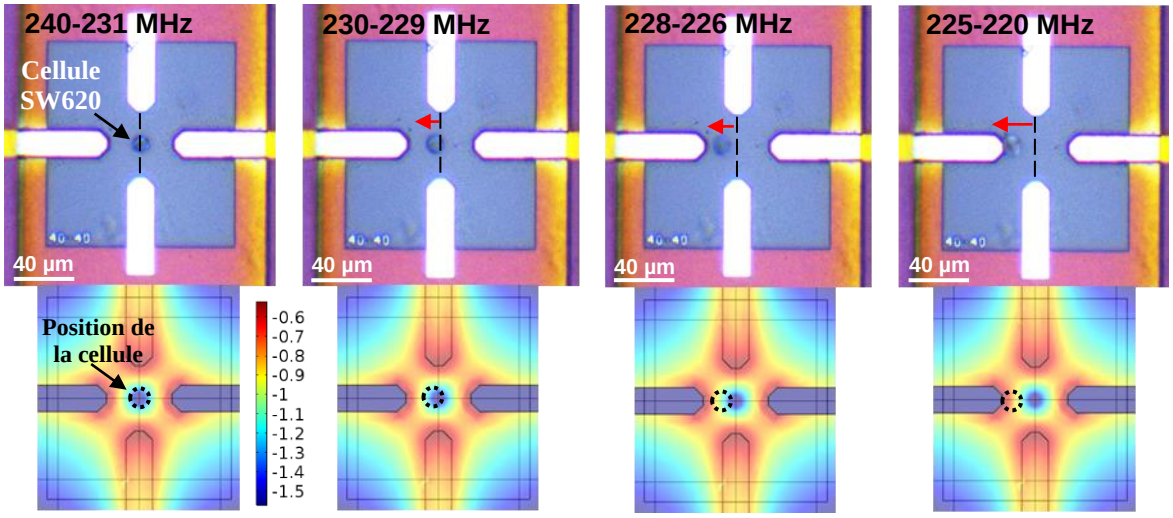


Figure. 84 Transition DEP-UHF de la cellule SW620 de la DEP négative à 240 MHz à la DEP positive à 225 MHz, en passant par la deuxième fréquence de transition comprise entre 226-228 MHz.

En balayant le spectre de fréquence entre 240-220 MHz, nous pouvons suivre progressivement la trajectoire de la cellule, qui se déplace respectivement du centre des quatre électrodes vers le bord de l'électrode épaisse. Elle change de comportement diélectrophorétique au moment où la

fréquence du signal atteint la seconde fréquence de transition qui est comprise pour cette cellule entre 226- 228 MHz.

Ainsi, pour déterminer les deuxièmes fréquences de transition f_{x02} caractéristiques à la lignée cellulaire SW620, nous avons mené six campagnes de mesures sur 50 cellules SW620 appartenant à six suspensions cellulaires SW620 différentes (Figure. 85).

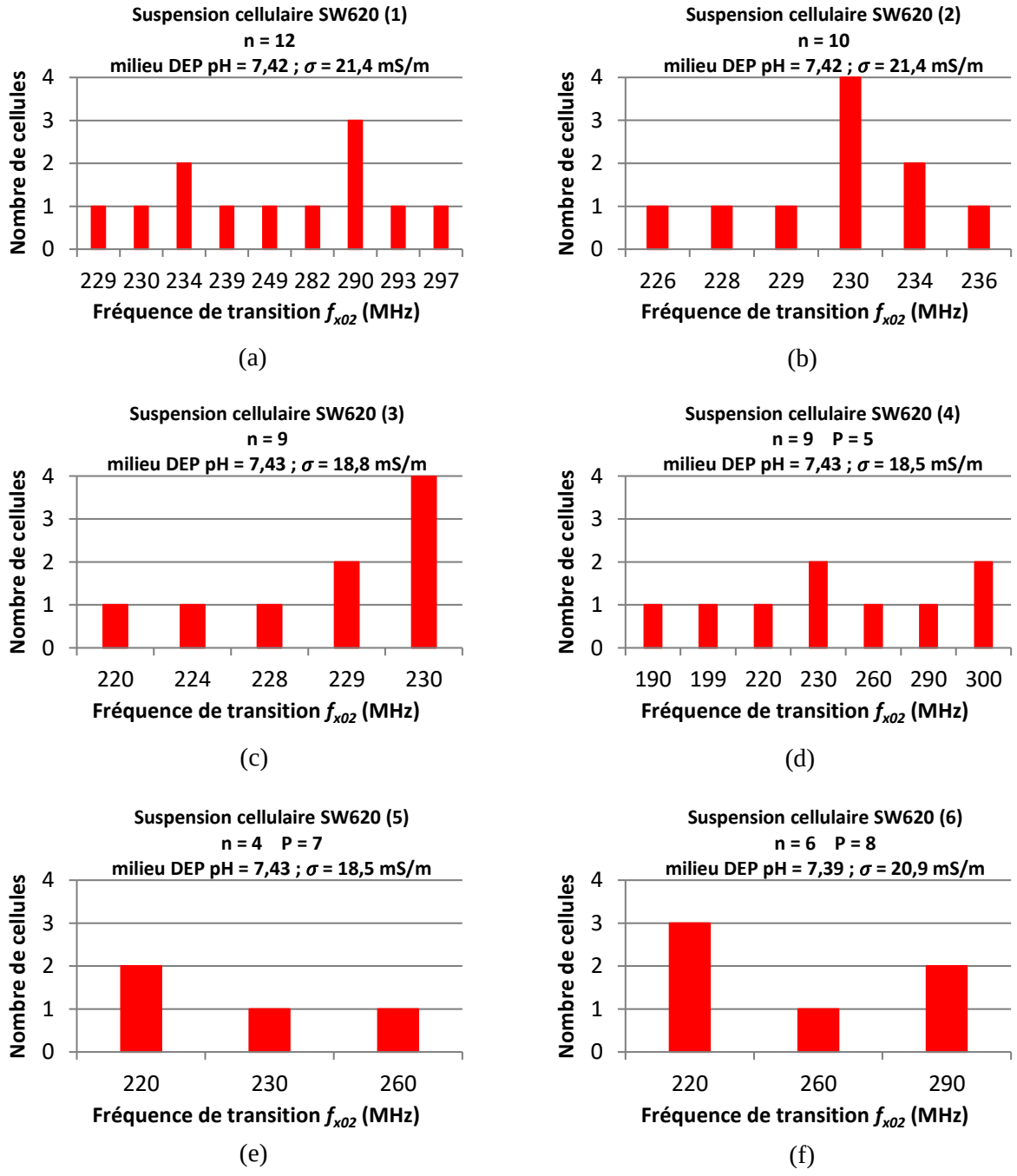


Figure. 85 Histogrammes représentant les secondes fréquences de transition déterminées pour 50 cellules issues de la lignée SW620, caractérisées par la DEP UHF.

La Figure. 85 résume les résultats obtenus des f_{x02} pour la lignée SW620. Pour chaque campagne de mesure de cellules colorectales SW620, nous indiquons le nombre de passages (P) de la lignée considérée (hormis sur les trois premières campagnes de mesure pour des raisons techniques).

Sur l'ensemble des campagnes de mesures réalisées, nous remarquons une légère dispersion des valeurs de f_{x02} mesurées qui peut essentiellement être attribuée à l'hétérogénéité cellulaire. Néanmoins nous remarquons que les 50 cellules de six suspensions SW620 étudiées présentent des valeurs de f_{x02} relativement reproductibles dans l'ensemble. Il y a quelques cellules dans le lot présentant des f_{x02} un peu plus éloignées, mais l'écart type reste relativement limité et inférieur à 30 MHz. Nous pouvons bien observer que la majorité des valeurs de secondes fréquences de transition déterminées, se trouvent dans l'intervalle 220-240 MHz (Figure. 85).

D'autre part, l'analyse statistique des résultats de mesures des valeurs de f_{x02} pour les différentes cellules SW620, montre que la lignée cellulaire SW620 possède une médiane de seconde fréquence de transition de l'ordre de 230 MHz (Tableau III-3).

Tableau III-3 Synthèse des mesures de seconde fréquence de transition (MHz) pour la lignée cellulaire SW620.

Lignée cellulaire	Nombre de cellules	Moyenne	Médiane	Ecart type	Erreur Std	Min	Max
SW620	50	243	230	28,7	4,0	190	300

III.3.2. Etude de la sensibilité de la méthode DEP-UHF

Pour quantifier la sensibilité de la méthode DEP-UHF, nous allons présenter les mesures de seconde fréquence de transition de cellules cancéreuses colorectales possédant un stade tumoral différent de celui de la lignée cellulaire colorectale SW620, afin de pouvoir montrer dans la suite s'il est possible d'enregistrer des différences significatives entre les signatures diélectrophorétiques UHF de différentes cellules provenant du même tissu.

III.3.2.1. Caractérisation de cellules issues de la lignée SW480

Les cellules cancéreuses colorectales issues de la lignée SW480 possèdent un diamètre moyen pouvant varier entre 13 et 20 µm. Elles sont isolées à partir de l'adénocarcinome primaire survenant dans le côlon. Elles possèdent un stade tumoral II qui est censé être moins agressif que celui de la lignée SW620 (stade III). Nous nous sommes intéressés à étudier ces

cellules car les deux lignées cellulaires SW480 et SW620 ont été isolées à partir du même patient à deux niveaux différents du développement et du traitement de sa tumeur, d'où l'intérêt de les comparer.

En suivant la même méthodologie de mesure de f_{x02} décrite précédemment (Figure. 76), nous allons présenter les résultats de caractérisation DEP-UHF des cellules issues de la lignée SW480. La Figure. 86 décrit la réponse diélectrophorétique UHF d'une cellule SW480, en suspension dans du milieu DEP possédant un pH = 7,41 et une conductivité = 20,3 mS/m.

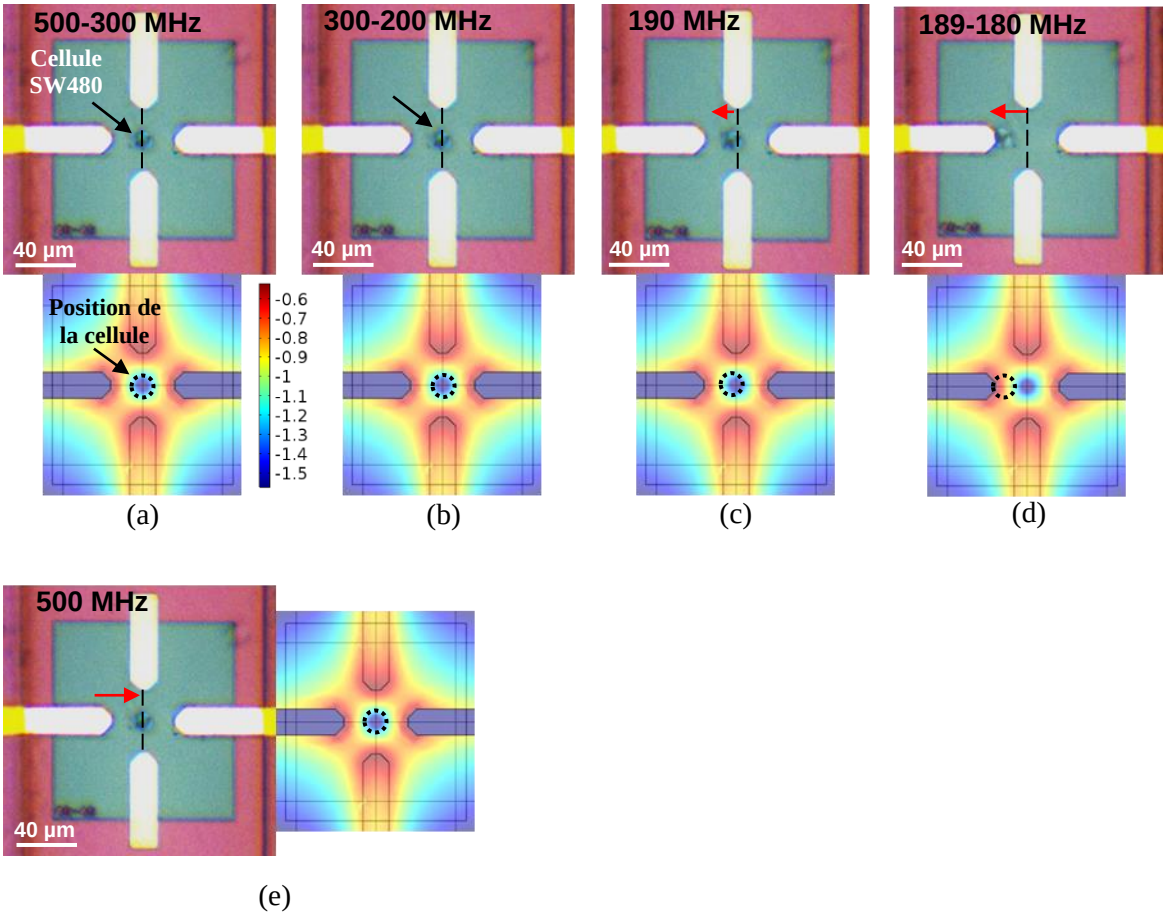


Figure. 86 Déplacement diélectrophorétique UHF d'une cellule SW480 basculant de la DEP négative à la DEP positive à travers la fréquence de transition f_{x02} située entre 189-190 MHz.

Les propriétés DEP-UHF de la lignée cellulaire SW480 ont été établies à partir de plusieurs campagnes de caractérisation menées sur 51 cellules au total, provenant de différentes suspensions cellulaires (Figure. 87).

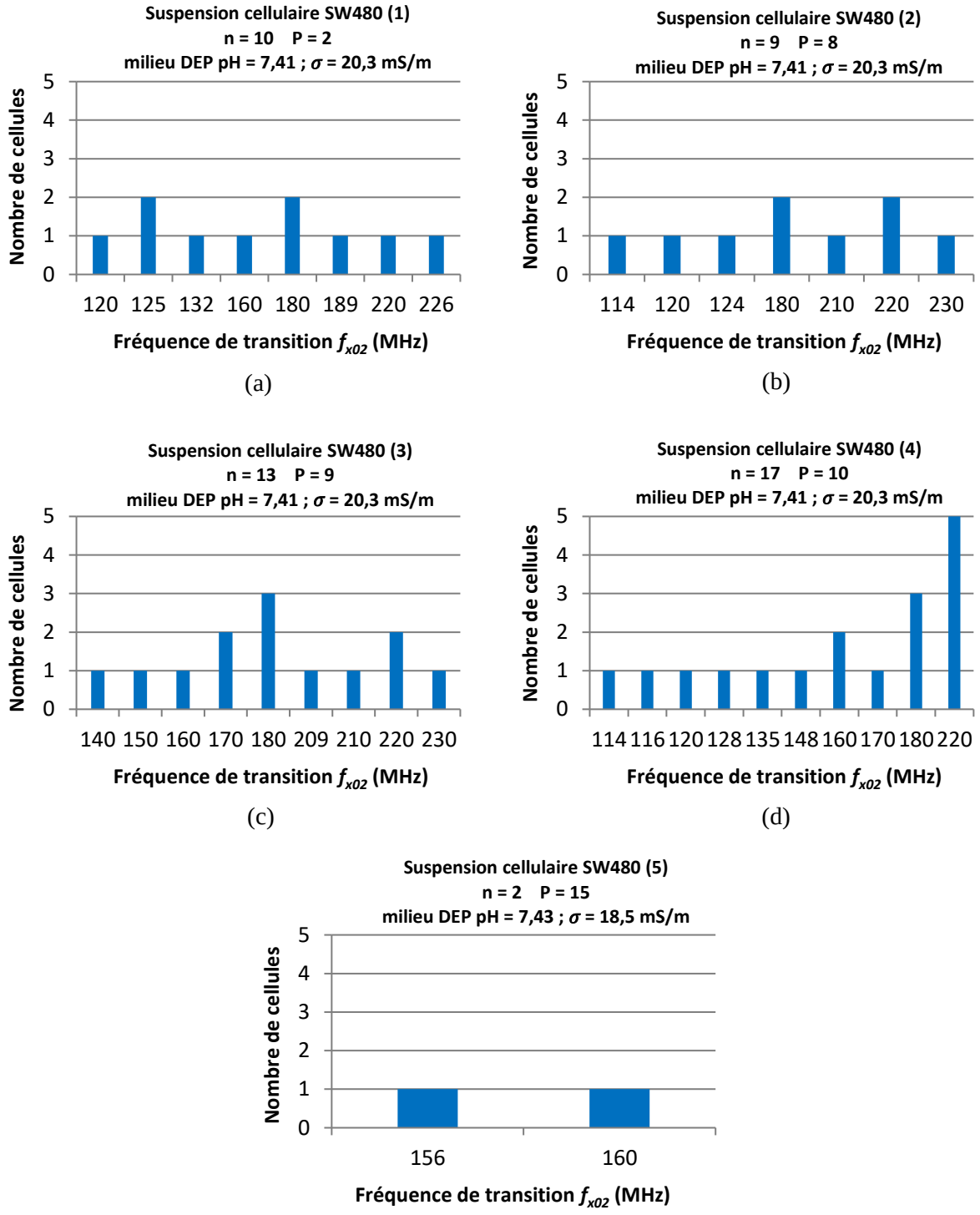


Figure. 87 Histogrammes des valeurs de secondes fréquences de transition pour différentes cellules SW480 (n = 51).

On peut noter que sur l'ensemble des campagnes de mesures réalisées (Figure. 87), il existe également une dispersion entre les valeurs de f_{x02}. Néanmoins, nous remarquons qu'il existe une reproductibilité de certaines valeurs de f_{x02} caractérisées, notamment autour de 120 et 170 MHz.

En exploitant statistiquement les caractérisations réalisées sur ces cellules SW480 (Tableau III-4), on peut considérer que la médiane de la seconde fréquence de transition propre aux cellules cancéreuses colorectales issues de la lignée SW480 est de l'ordre de 180 MHz bien inférieure à celle des cellules SW620.

Tableau III-4 Synthèse des mesures de seconde fréquence de transition (MHz) de la lignée de cellules cancéreuses colorectales SW480.

Lignée cellulaire	Nombre de cellules	Moyenne	Médiane	Ecart type	Erreur Std	Min	Max
SW480	51	174	180	37,5	5,2	114	230

Afin de confirmer ces résultats, nous allons présenter les premières données de caractérisations (encore préliminaires) réalisées sur des cellules cancéreuses colorectales issues de la lignée HCT 116, aussi de stade tumoral II, pour les comparer par la suite à ceux obtenus pour les deux autres lignées.

III.3.2.2. Caractérisation de cellules issues de la lignée HCT 116

Les cellules cancéreuses du côlon issues de la lignée HCT 116 possèdent un diamètre moyen de l'ordre de 12 µm. Elles présentent un stade tumoral (stade II) moins agressif que celui de la lignée SW620 (stade III) et elles sont considérées au même stade tumoral que la lignée SW480. Elles proviennent d'un patient différent de celui à partir duquel les lignées SW620 et SW480 ont été isolées.

Le comportement diélectrophorétique UHF d'une cellule HCT 116 en suspension dans un milieu DEP (pH = 7,42 et σ = 22,6 mS/m) est illustré sur la Figure. 88. Il a été mesuré en suivant la même procédure de caractérisation décrite sur la Figure. 76.

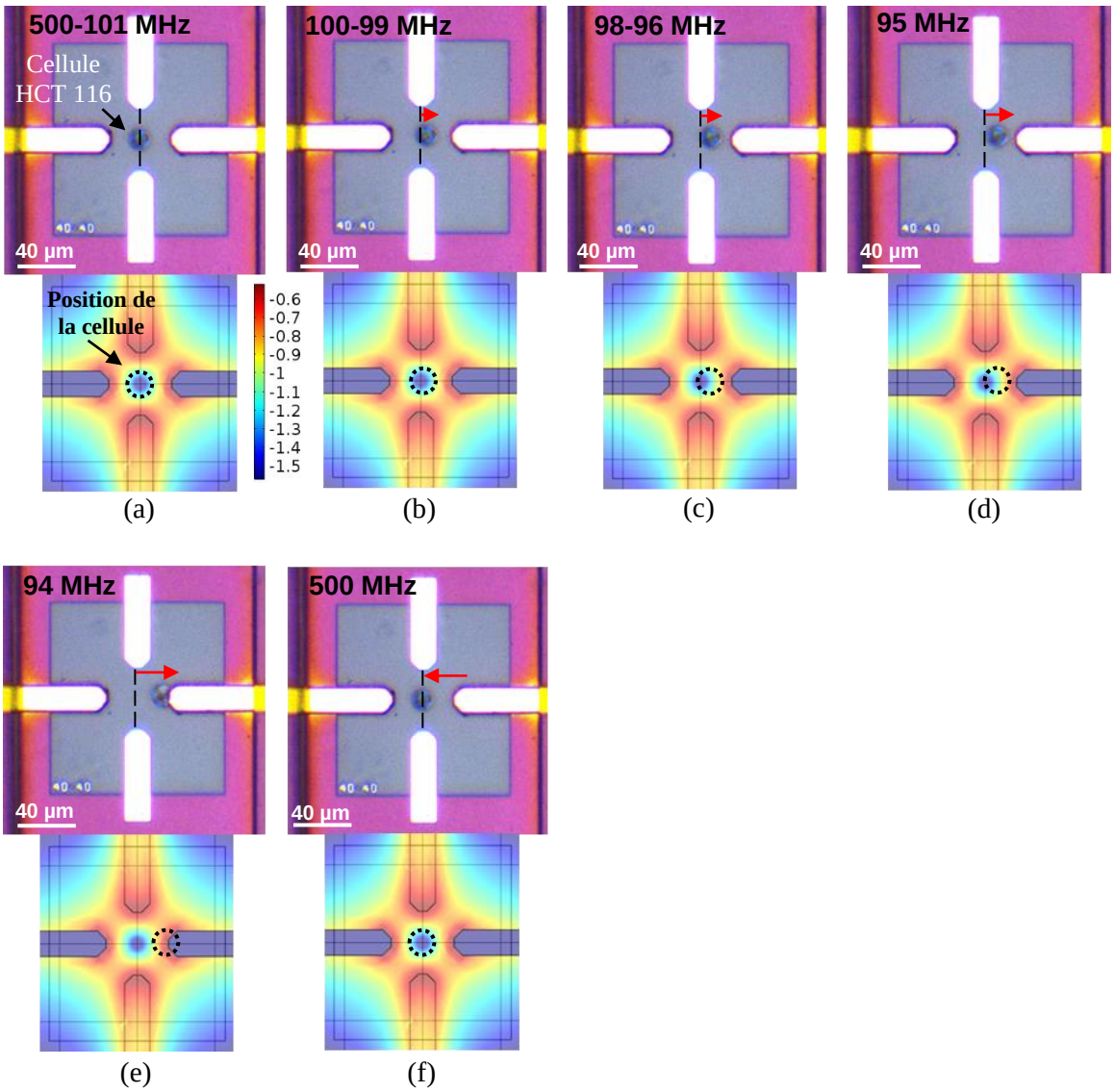


Figure. 88 Trajectoire DEP-UHF d'une cellule HCT 116 se déplaçant de la DEP négative à la DEP positive, en balayant le spectre de fréquence entre 500-94 MHz. La fréquence de transition mesurée est autour de 95 MHz.

Pour déterminer la seconde fréquence de transition propre de la lignée cellulaire HCT 116, nous avons mené quelques mesures préliminaires sur différentes cellules provenant de différentes suspensions cellulaires HCT 116 (Figure. 89). Le nombre de cellules mesurées ici est assez limité suite à des problèmes techniques sur le banc de mesure lors de la période de caractérisation et par la suite par l'indisponibilité de cette lignée chez nos partenaires biologistes.

La Figure. 89 montre que les valeurs de f_{x02} mesurées pour les différentes cellules HCT 116 sont également assez dispersives, mais dans le même ordre de grandeur que la dispersion observée pour les deux autres lignées.

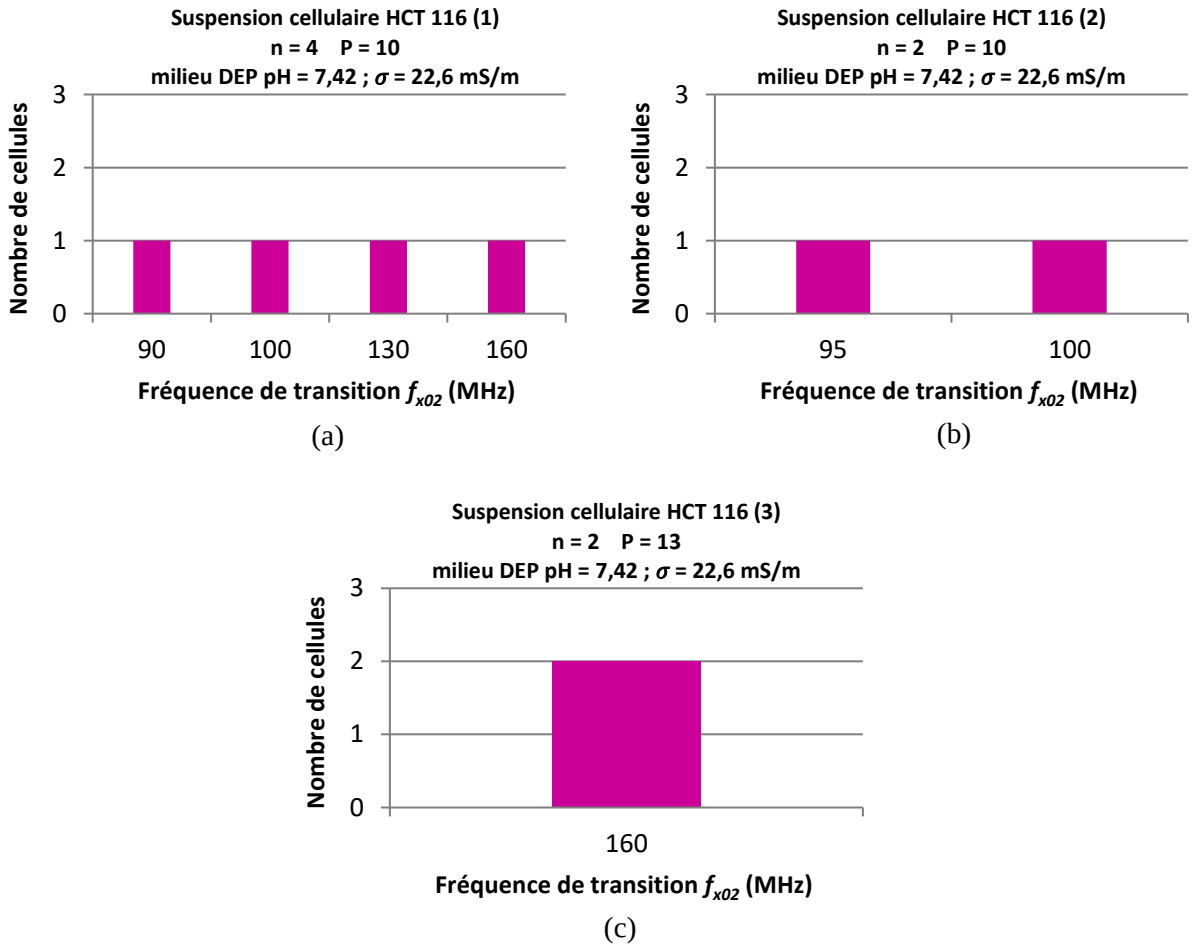


Figure. 89 Histogrammes des valeurs de secondes fréquences de transition mesurées pour différentes cellules issues de la lignée HCT 116 (n = 8).

De ces premières mesures, il semblerait que la médiane de f_{x02} de la lignée HCT 116 soit de l'ordre de 115 MHz (Tableau III-5).

Tableau III-5 Synthèse des mesures de seconde fréquence de transition (MHz) de la lignée de cellules cancéreuses du côlon HCT 116.

Lignée cellulaire	Nombre de cellules	Moyenne	Médiane	Ecart type	Erreur Std	Min	Max
HCT 116	8	124	115	31,9	11,2	90	160

III.4. Analyse des résultats de caractérisations sur les cellules issues des lignées SW620, SW480, HCT 116 et BL-41

Dans un premier temps, nous allons comparer les résultats de caractérisations DEP-UHF effectuées sur les trois lignées de cellules cancéreuses colorectales de différents stades tumoraux : SW620, SW480 et HCT 116 (Figure. 90).

La Figure. 90 représentant les résultats des secondes fréquences de transition mesurées pour chaque lignée sous la forme de boîtes à moustaches, met en évidence qu'il existe une différence significative entre les valeurs de médiane de f_{x02} mesurées pour les trois lignées cellulaires, en présentant une significativité $p < 0{,}001$. En effet, plus le p est petit plus la significativité est importante. En fait, il est fort probable que cette différence de médiane de f_{x02} entre les différentes lignées colorectales soit liée à une différence de propriétés diélectriques intracellulaires ou de rapport nucléocytoplasmique entre chaque lignée, car comme nous avons montré précédemment dans le premier chapitre, une variation de l'un de ces facteurs peut induire fortement une variation de f_{x02} (Figure. 25).

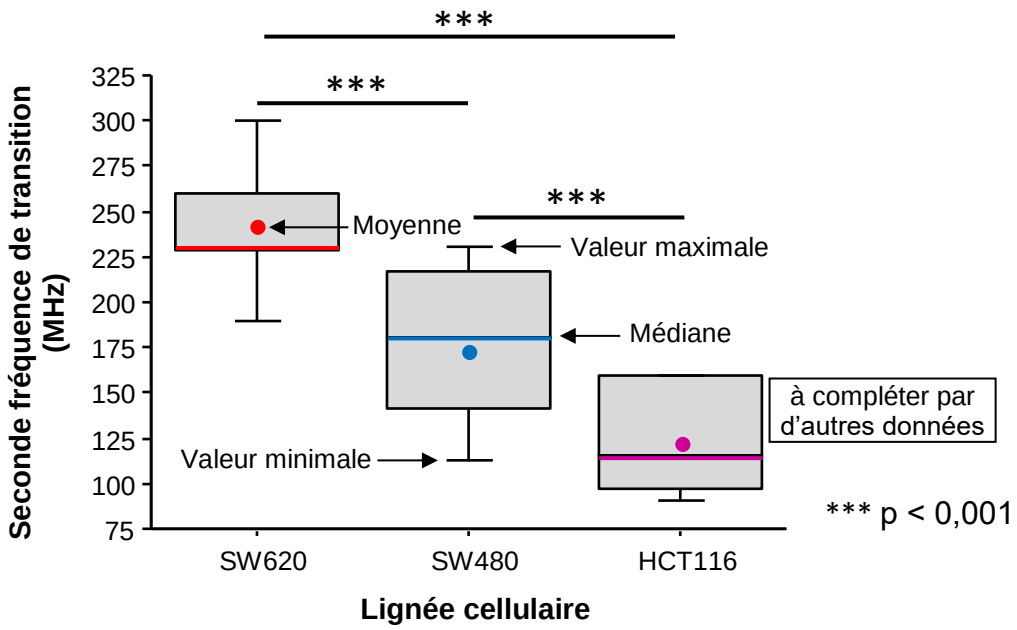


Figure. 90 Boîtes à moustaches de seconde fréquence de transition caractérisée pour les différentes lignées de cellules cancéreuses colorectales SW620, SW480 et HCT 116. *** significativité calculée par la méthode Mann-Whitney pairwise.

Nous remarquons particulièrement que les valeurs de médiane de f_{x02} mesurées pour les deux lignées cellulaires SW480 et HCT 116 possédant un stade tumoral II, diffèrent très nettement de celle de la lignée SW620 de stade III.

En comparant tout d'abord les résultats de mesures pour les lignées cellulaires SW480 et SW620, nous observons que la médiane de la seconde fréquence de transition pour la lignée cellulaire SW480 présentant une valeur de 180 MHz, diffère de façon très significative ($p < 0{,}001$) de celle de la lignée cellulaire SW620 (230 MHz) (Figure. 90). En effet, il est intéressant de se rappeler que les cellules SW480 possédant un stade tumoral moins développé et qui ont été isolées à l'origine d'un tissu tumoral appartenant au même patient que les cellules SW620, présentent des f_{x02} différentes et nettement inférieures à celles de cellules SW620.

L'écart de fréquence entre les deux fréquences de transition f_{x02} de ces deux lignées cellulaires de différents stades tumoraux, est d'environ 50 MHz, et semble suffisant pour être exploité pour trier ces deux types cellulaires selon le principe décrit sur la Figure. 38 (chapitre II).

Nous pouvons comparer les médianes de f_{x02} mesurées de la lignée cellulaire HCT 116 (stade tumoral II) à celles de la lignée SW620 (stade III). Nous observons d'après la Figure. 90, que la différence de médiane de f_{x02} entre les lignées HCT 116 (115 MHz) et SW620 (230 MHz) isolées de différents patients, est importante et peut être également considérée comme fortement significative ($p < 0{,}001$). Ainsi, la réponse DEP-UHF de la lignée HCT 116 peut être aussi clairement distinguée de celle de la lignée SW620 avec un $\Delta f_{x02\ (SW620\text{-}HCT\ 116)}$ = 115 MHz.

D'autre part, nous observons que les lignées cellulaires HCT 116 et SW480 qui possèdent le même stade tumoral et isolées de différents patients, présentent quelques valeurs de f_{x02} en commun notamment autour de 150 MHz. Néanmoins, il existe une différence significative entre la médiane de f_{x02} de la lignée HCT 116 (115 MHz) et celle de la lignée SW480 (180 MHz), comme le montre la Figure. 90. Ainsi, les cellules SW480 et HCT 116 possèdent deux signatures DEP-UHF distinctes en présentant un écart de fréquence de l'ordre de 65 MHz.

Ainsi, nous remarquons que la fréquence de transition f_{x02} des cellules cancéreuses colorectales ayant un stade tumoral moins agressif (cellules HCT 116 et SW480), est inférieure à celle des cellules (SW620) possédant un stade élevé. Ceci semblerait confirmer l'hypothèse qu'il existe bien une corrélation entre les signatures DEP-UHF de cellules tumorales et l'agressivité du grade de cancer. En effet, des travaux antérieurs de notre équipe de

recherche [122] a montré en caractérisant des lignées de cellules cancéreuses colorectales de différents stades tumoraux par spectroscopie diélectrique microonde, qu'il existe également une corrélation entre les signatures électromagnétiques dans la gamme 5-20 GHz des cellules malignes et leur degré d'agressivité (Figure. 74).

Par conséquent, ces lignées cellulaires du cancer colorectal SW620, SW480 et HCT 116 de différents stades tumoraux pourraient bien être discriminées entre elles par diélectrophorèse dans la gamme 50 MHz-350 MHz, tout en présentant des écarts fréquentiels importants entre leur fréquence de transition, ce qui permettrait ainsi à terme de les trier.

Dans un second temps, nous pouvons également comparer les résultats de mesures réalisées sur les deux différents types cellulaires : les cellules cancéreuses colorectales SW620 et les cellules cancéreuses du système lymphatique BL-41 (Figure. 91).

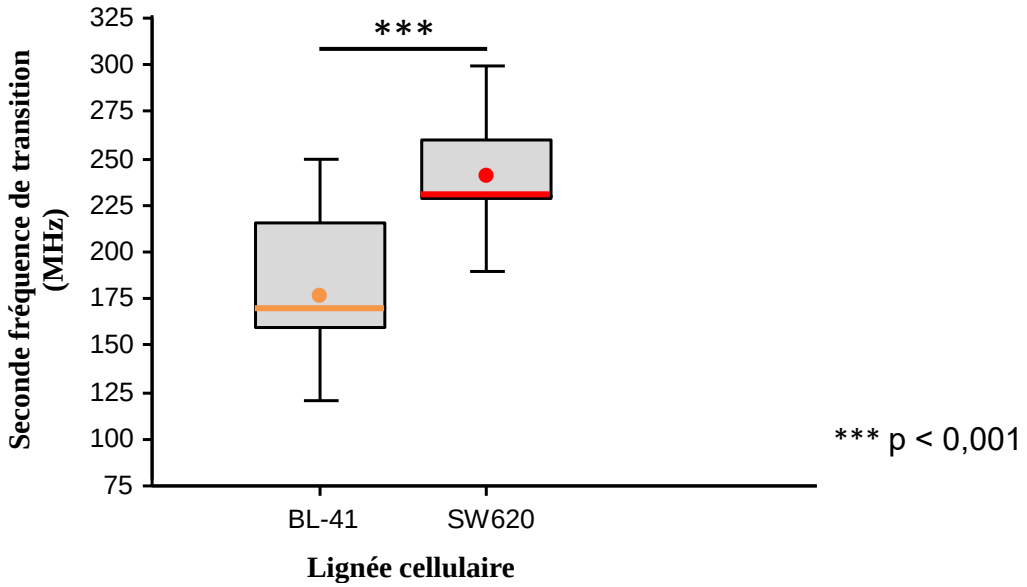


Figure. 91 Boîtes à moustaches des fréquences de transition f_{x02} mesurées pour 52 cellules cancéreuses humaines du système lymphatique issues de la lignée BL-41 et 50 cellules colorectales issues de la lignée SW620.

Nous observons que la médiane de la deuxième fréquence de transition de la lignée BL-41 (170 MHz), diffère de manière significative de celle de la lignée SW620 (230 MHz) (Figure. 91), d'où il est fortement probable qu'elles présentent des propriétés intracellulaires distinctes et/ou un rapport nucléocytoplasmique différent. L'écart de fréquence entre les deux f_{x02} de ces deux types cellulaires est d'environ 60 MHz. Cela peut être considéré comme clairement discriminant et montre que les cellules BL-41 et SW620 possèdent des signatures

DEP-UHF potentiellement suffisamment distinctes en moyenne, pour envisager un tri par DEP dans la gamme de fréquences UHF.

Cependant, si nous considérons à présent les cellules BL-41 et SW480 (Figure. 92), nous observons que la différence entre leurs médianes de f_{x02} n'est pas vraiment significative. Ceci peut être expliqué par le fait que ces deux lignées pourraient présenter des propriétés intracellulaires probablement assez similaires. Ces deux lignées cellulaires présentent statistiquement un écart de fréquence faible entre leurs médianes de f_{x02} de l'ordre de 10 MHz, qui n'est pas suffisant pour pouvoir discriminer et envisager un tri de ces cellules sur leurs propriétés diélectrophorétiques.

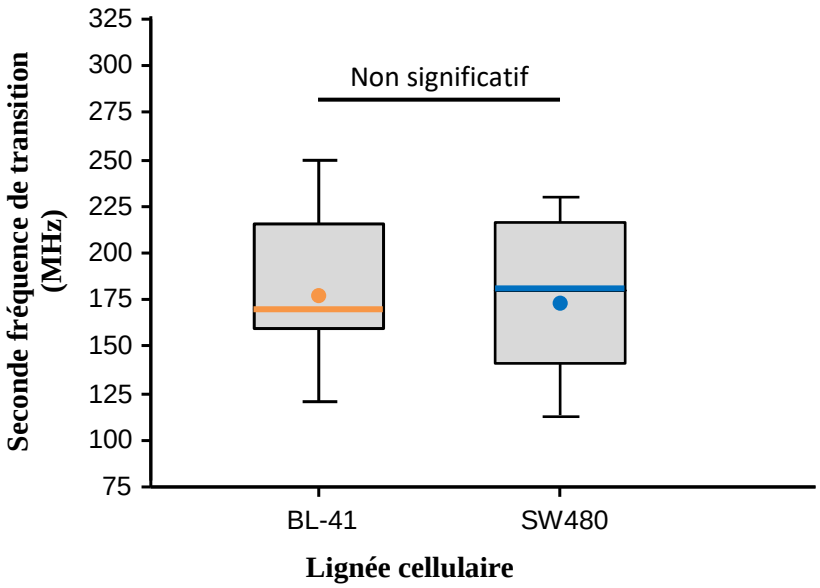


Figure. 92 Boîtes à moustaches des fréquences de transition f_{x02} mesurées pour 52 cellules BL-41 et 51 cellules SW480.

On voit ici qu'il est possible aussi que différents types cellulaires possédant différentes fonctionnalités dans l'organisme possèdent des signatures DEP-UHF assez semblables.

On voit donc ici que la diélectrophorèse haute fréquence ne permettra pas de discriminer et de trier tous les types cellulaires à coup sûr. C'est pourquoi, il sera nécessaire de déterminer au préalable les fréquences de transition caractéristiques en mesurant leurs signatures DEP, et savoir s'il existe bien une gamme de fréquence suffisamment discriminante entre ces deux populations cellulaires à trier.

D’autre part, nous observons sur la Figure. 90 qu’il existe une dispersion des valeurs de f_{x02} au niveau de chaque lignée cellulaire cancéreuse colorectale caractérisée, mais celle-ci est assez contenue.

Pour que nous puissions expliquer cette dispersion observée pour chaque lignée cellulaire, il sera intéressant de comparer les différentes campagnes de mesures entre elles pour voir les différences de mesure d’une suspension cellulaire à une autre au niveau de chaque lignée (Figure. 85, Figure. 87 et Figure. 89). En fait, nous ne prenons pas en compte les petites variations de conductivité du milieu DEP existant entre les différentes suspensions cellulaires, car nous avons déjà montré dans le premier chapitre que f_{x02} n’est pas censée être sensible à ces légères variations (Figure. 23).

Cette dispersion pourrait être liée à deux facteurs biologiques qui pourraient influer sur la variation de f_{x02} : le nombre de passages et la phase du cycle cellulaire dans laquelle est la cellule au moment de la mesure.

Tout d’abord le nombre de passages, qui correspond au nombre de fois où les cellules ont été repiquées et remises en culture depuis leur décongélation. Il est fréquent d’observer des dérives légères des cellules au fil des passages, qui pourraient donc aboutir à de légères modifications de leurs propriétés biologiques et par voie de conséquence également de leurs propriétés diélectriques intracellulaires et ainsi aboutir à des valeurs de f_{x02} un peu dispersées (Figure. 25). Cependant, à partir des résultats de mesures obtenus pour des cellules à différents passages (raisonnablement ceux-ci dont limités à P = 15), on ne décèle pas de preuve évidente d’une corrélation entre passage et modification des signatures DEP.

Un second facteur qui pourrait jouer sur la différence de f_{x02} obtenue, est la phase du cycle cellulaire dans laquelle la cellule se trouve au moment de la caractérisation. En effet, la cellule passe par un cycle cellulaire composé de l’interphase (phases G1, S et G2) et la phase de mitose (M) (Figure. 93). L’interphase constituée des phases G1, S et G2, comprend notamment la croissance de la cellule et la duplication de son matériel génétique ADN, avant de se diviser en deux cellules identiques dans la phase de mitose (M) [123], [124]. En fait, les nouvelles cellules obtenues reproduisent le cycle et ainsi de suite. Ainsi dans la progression du cycle cellulaire, la forme de la cellule, le volume et l'arrangement interne changent temporellement. Par conséquent, les propriétés diélectriques intracellulaires peuvent donc également évoluer légèrement.

Au sein d'une population cellulaire, comme celle de lignées, cultivée in vitro dans des boîtes de flasques, il est statistiquement quasi impossible d'avoir naturellement l'ensemble des cellules synchronisées dans la même phase de leur cycle. Elles évoluent selon leur "bon vouloir".

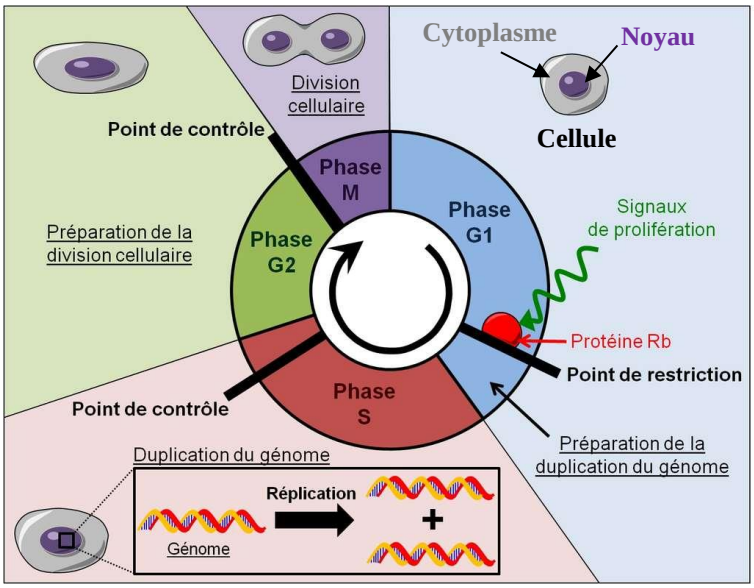


Figure. 93 Schéma du cycle cellulaire [124].

Ainsi, pour obtenir une homogénéité de valeurs de f_{x02} mesurées au sein de chaque lignée cellulaire, il pourrait être intéressant de réaliser les caractérisations sur des cellules se trouvant dans une phase du cycle commune au moment de leurs mesures (synchronisation sous l'effet de stress approprié), d'ensemencer les cellules à la même densité et de les mesurer après la même période de culture.

L'étude des propriétés DEP dans la gamme de fréquence UHF que nous avons menée sur les différentes lignées cellulaires est donc une étape importante et nécessaire pour identifier en amont les fréquences des signaux DEP pertinentes qui seront à utiliser pour trier efficacement ces différentes populations cellulaires. Nous verrons des pistes sur le développement d'un cytomètre électromagnétique dans le dernier chapitre dédié aux conclusions et perspectives de ce manuscrit.

IV. Conclusion

Au cours de ce chapitre, nous avons présenté le banc expérimental haute fréquence capable de générer des tensions jusqu'à 18 V_{pp} dans le plan des pointes RF pour des fréquences supérieures à 50 MHz, qui nous a permis d'exploiter la méthode de DEP Ultra Haute Fréquence pour étudier et analyser les caractéristiques diélectriques intrinsèques de cellules biologiques. Nous avons montré qu'il est possible de manipuler individuellement et de manière sélective à partir de la structure quadripôle que nous avons développée, des cellules biologiques en suspension grâce à des signaux dans la gamme de fréquence UHF. Ainsi, nous avons pu prouver la faisabilité et la pertinence de cette méthode de caractérisation cellulaire aux hautes fréquences. Dans ce cadre, nous avons présenté dans un premier temps les résultats de caractérisation de deux types cellulaires humains différents : des cellules cancéreuses du système lymphatique et des cellules cancéreuses du côlon. Au travers de cette étude, nous avons pu mettre en évidence le potentiel de la méthode DEP-UHF capable de discriminer ces deux types cellulaires à partir de la mesure de leurs secondes fréquences de transition. Ces dernières s'avèrent fortement liées à leurs propriétés intracellulaires intrinsèques. Dans un second temps, nous avons évalué la sensibilité de cette méthode en caractérisant différentes lignées cellulaires dérivées du même type d'organe, mais à différents stades tumoraux. Des fréquences de transition différentes ont été obtenues pour chaque lignée cellulaire. Les différentes caractérisations réalisées sur chaque lignée cellulaire confirment la pertinence de ce mode de caractérisation par l'obtention de signatures reproductibles. Ces résultats ont montré qu'il existe des différences significatives entre les secondes fréquences de transition de lignées cellulaires caractérisées illustrant que chaque lignée semble bien posséder une réponse DEP-UHF propre. Ces résultats sont prometteurs et encouragent à mettre à profit ces différences de signatures pour des applications de tri cellulaire par la méthode DEP-UHF.

Dans ce contexte, nous présenterons dans le dernier chapitre de perspectives, un premier prototype de cytomètre permettant de trier par diélectrophorèse haute fréquence, des cellules biologiques en se basant sur leurs différences de propriétés diélectriques intracellulaires. Nous allons voir comment nous avons conçu le cytomètre à partir des simulations électromagnétiques, et finalement nous présenterons des premiers résultats expérimentaux de tri, à partir de mélanges de cellules et de billes de polystyrène en suspension.

Chapitre IV

Conclusion générale et perspectives des travaux de thèse : vers un premier prototype de cytomètre électromagnétique

Ces travaux de thèse ont porté sur le développement d'une méthode de caractérisation de cellules biologiques qui se base sur la méthode de diélectrophorèse transposée aux hautes fréquences (> 50 MHz). L'objectif était de montrer la faisabilité de mesurer expérimentalement les propriétés diélectrophorétiques internes de cellules dans la gamme Ultra Haute Fréquence et d'évaluer le potentiel de cette méthode à discriminer différents types de lignées cellulaires, dans les perspectives de pouvoir les trier.

L'intérêt de cette méthode de caractérisation électrique est qu'elle n'exige pas le recours à des étapes de pré marquage classiquement utilisés comme facteur de discrimination. En effet, elle permet d'étudier le comportement de cellules en fonction de leurs propriétés diélectriques intracellulaires vis-à-vis de celles du milieu extracellulaire. Une des principales caractéristiques de la signature diélectrophorétique d'une cellule dans la gamme de fréquence 10 kHz-1 GHz est représentée respectivement par ses fréquences de transition basse et haute fréquence, f_{x01} et f_{x02}. Nous avons vu que la seconde fréquence de transition f_{x02} généralement située à des fréquences supérieures à 50 MHz, est fortement liée aux propriétés intracellulaires intrinsèques qui sont fortement corrélées aux propriétés biologiques propres à la cellule ou à des mécanismes physiologiques au sein de son cytoplasme. C'est pour cela que nous nous sommes intéressés principalement à caractériser des cellules en déterminant leur f_{x02}.

Pour développer un dispositif de caractérisation cellulaire DEP efficace, nous avons calculé le gradient de champ électrique généré pour différentes géométries de microélectrodes que nous avons testé sur des cellules cancéreuses du côlon à partir de signaux DEP basse fréquence. La structure quadripôle, polarisée de manière symétrique, nous a semblé la plus intéressante et a été retenue pour réaliser les campagnes de mesures en hautes fréquences. Elle permet en effet de suivre finement le comportement diélectrophorétique d'une seule cellule.

Nous avons optimisé cette structure quadripôle DEP-UHF en augmentant l'épaisseur des métallisations des électrodes de façon à générer un gradient de champ électrique suffisamment intense sur toute la hauteur du canal. Cette structure a été implémentée et réalisée sur le procédé BiCMOS SG25H4 d'IHP, ce qui nous a permis de réaliser des puces intégrant la microfluidique dans un environnement CMOS.

Nous avons également développé un banc expérimental spécifiquement dédié aux caractérisations cellulaires à partir de ces puces quadripôles microfluidiques et capable de générer des signaux UHF avec des tensions allant jusqu'à 18 V_{pp} d'amplitude dans le plan des pointes RF. Nous avons montré qu'il était possible de manipuler et de caractériser individuellement de manière précise et efficace, des cellules à partir de signaux d'amplitude de 2 V_{pp} dans le plan des microélectrodes. Ainsi, nous avons proposé et mis en œuvre une méthodologie de caractérisation pour laquelle les cellules mesurées ne sont soumises qu'aux forces diélectrophorétiques, ce qui permet de mesurer assez précisément la seconde fréquence de transition de chaque cellule.

Les résultats de caractérisation obtenus ont mis en évidence le potentiel de discrimination de cette méthode d'analyse des propriétés diélectrophorétiques entre différentes lignées cellulaires dont certaines provenant du même type de tissu mais possédant des stades d'agressivité tumoraux différents. Les différences fortement significatives entre les secondes fréquences de transition de ces lignées ont pu être établies, ce qui montre que les signatures diélectrophorétiques haute fréquence de cellules cancéreuses pourraient être corrélées à leurs stades tumoraux.

En revanche, nous avons pu observer qu'il était possible que deux types de lignées cellulaires possédant pourtant des propriétés biologiques et fonctionnalités dans l'organisme différentes, puissent parfois présenter des signatures DEP-UHF assez proches pour ne pas être suffisamment discriminantes en elles-mêmes.

Néanmoins, les différentes cellules investiguées ont présenté des signatures diélectrophorétiques UHF qui leur sont propres et qui peuvent être mises à profit lorsque des différences significatives de signatures existent pour trier ces cellules les unes des autres.

Au travers de ce dernier chapitre de perspectives, nous allons voir comment exploiter cette différence de signatures DEP-UHF, en cherchant à les trier, à la manière d'un cytomètre en flux. Ainsi, nous allons introduire les bases d'une première architecture de cytomètre électromagnétique. Nous aborderons l'optimisation de sa géométrie menée à partir des simulations électromagnétiques, dans l'objectif d'améliorer l'efficacité du tri cellulaire. Nous illustrerons à partir des tous premiers tests réalisés avec ce cytomètre sur des cellules cancéreuses colorectales SW480, son principe de fonctionnement. De plus, nous présenterons des premiers résultats expérimentaux de tri, réalisés à partir d'une suspension mixte de cellules

biologiques et de billes de polystyrène qui nous ont permis d'évaluer également sa capacité à trier différents types de particules en flux.

A partir des premiers tests réalisés sur le cytomètre électromagnétique, nous proposerons en perspectives de ces travaux de thèse des pistes d'améliorations afin d'accroitre ses performances.

I. Conception d'un premier prototype de cytomètre électromagnétique

I.1. Principe de fonctionnement

La fonction de trieur que nous cherchons à mettre au point vise à séparer différents types de cellules circulant en flux dans un canal microfluidique. Comme nous l'avons présenté au début du chapitre II, son principe de fonctionnement sera basé sur le fait que sous l'action d'un champ électrique haute fréquence non uniforme, les différents types cellulaires vont être amenés à subir des intensités de forces diélectrophorétiques proportionnelles à la partie réelle de leur facteur de Claussius-Mossotti. Cette grandeur Re[K(ω)] pouvant présenter d'un type cellulaire à l'autre des signes différents lorsque la fréquence du signal DEP appliqué se situe entre leurs fréquences de transition f_{x02} respectives (Figure. 94). Ainsi un type de cellules réagira en DEP positive tandis que l'autre réagira en DEP négative. En couplant les forces hydrodynamiques imposées par le flux dans le canal aux forces diélectrophorétiques, on peut espérer obtenir des conditions optimales pour réaliser un tri efficace et ainsi séparer les cellules.

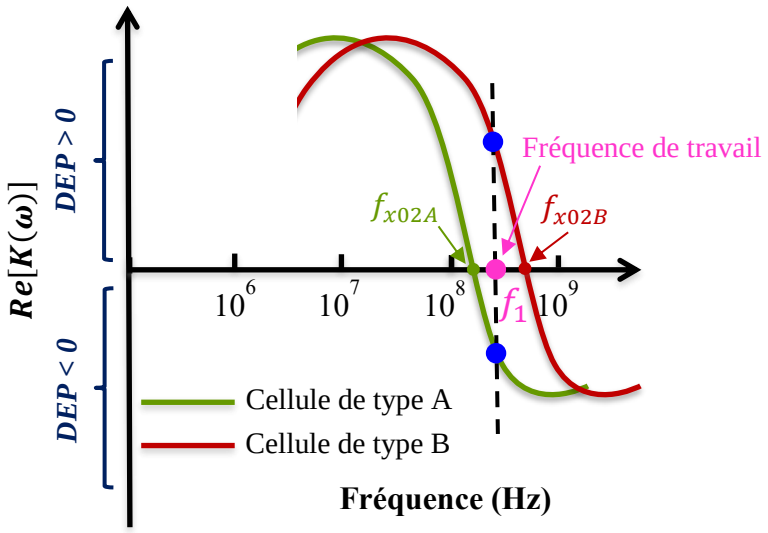


Figure. 94 Schéma illustrant comment exploiter la différence de signatures diélectrophorétiques UHF de deux types cellulaires différents.

L'approche que nous allons considérer va être de créer un gradient de champ électrique capable de générer des forces diélectrophorétiques sur la section du canal, s'étendant tout au long de ce dernier. Pour cela nous allons chercher à ce que les cellules réagissant en DEP positive, puissent être attirées vers les bords du canal, là où l'intensité de champ sera maximale.

Et au contraire à ce que les cellules réagissant en DEP négative, puissent être repoussées vers le centre du canal en y imposant une faible intensité de champ électrique (Figure. 95).

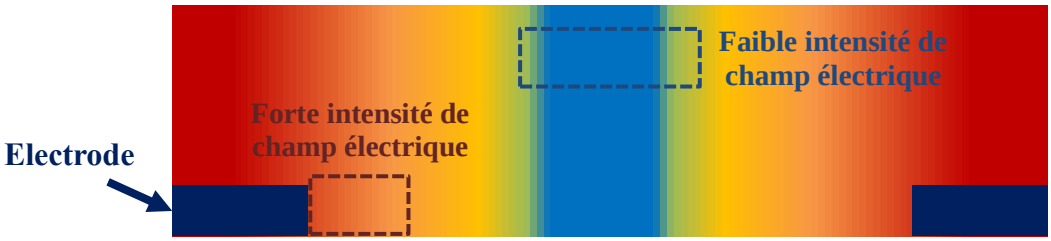


Figure. 95 Schéma illustrant le gradient de champ électrique à générer sur une section du canal microfluidique, puis à maintenir tout le long de celui-ci.

D'autre part, un autre point important réside dans le fait que les cellules à séparer seront en mouvement dans le canal, à la différence de la caractérisation cellulaire en statique réalisée avec le quadripôle DEP-UHF. Par conséquent, si la surface du canal dans laquelle le champ électrique généré est trop petite, la déviation engendrée sur une cellule la traversant trop rapidement pourra être peu efficace. Il faudra donc chercher à obtenir un effet cumulé en distribuant le champ électrique sur un tronçon de canal de longueur suffisante. On comprend bien ainsi l'importance d'avoir un gradient de champ qui s'étale sur une longueur conséquente de canal pour pouvoir générer des forces de déviation progressive et réaliser une séparation des cellules à la sortie du canal. C'est pourquoi, une série d'électrodes distribuées le long du canal semble pour notre application particulièrement appropriée.

La distribution cellulaire au sein du canal et les principales fonctions du cytomètre lui imposent une géométrie spécifique. Nous proposons un premier prototype qui pourrait répondre à notre application, basé sur un principe similaire à celui mis en œuvre dans [125]. Il sera alors composé de deux réseaux d'électrodes parallèles, placés de part et d'autre des bords du canal microfluidique.

Les cellules circulant en flux dans le canal qui seront soumises au champ électrique non uniforme généré par ces réseaux d'électrodes, pourront suivre différentes trajectoires dans le canal qui vont dépendre de leurs réponses diélectrophorétiques propres et de leurs positions dans le canal (Figure. 96).

Ainsi, si l'on considère le cas d'une cellule en flux réagissant en DEP positive à la fréquence imposée au niveau des électrodes et qui se déplace dans le flux au niveau des bords des électrodes, zone de forte intensité de champ, elle sera donc maintenue dans cette région et

continuera à se déplacer sur sa trajectoire de manière rectiligne (Figure. 96.a). Par contre, si elle se trouve au centre du canal, zone de faible intensité de champ (cas surement le plus défavorable), elle devrait être progressivement attirée vers les régions de forte intensité de champ en modifiant sa trajectoire du centre du canal vers les bords des électrodes, grâce à la combinaison des forces diélectrophorétiques et hydrodynamiques (Figure. 96.b).

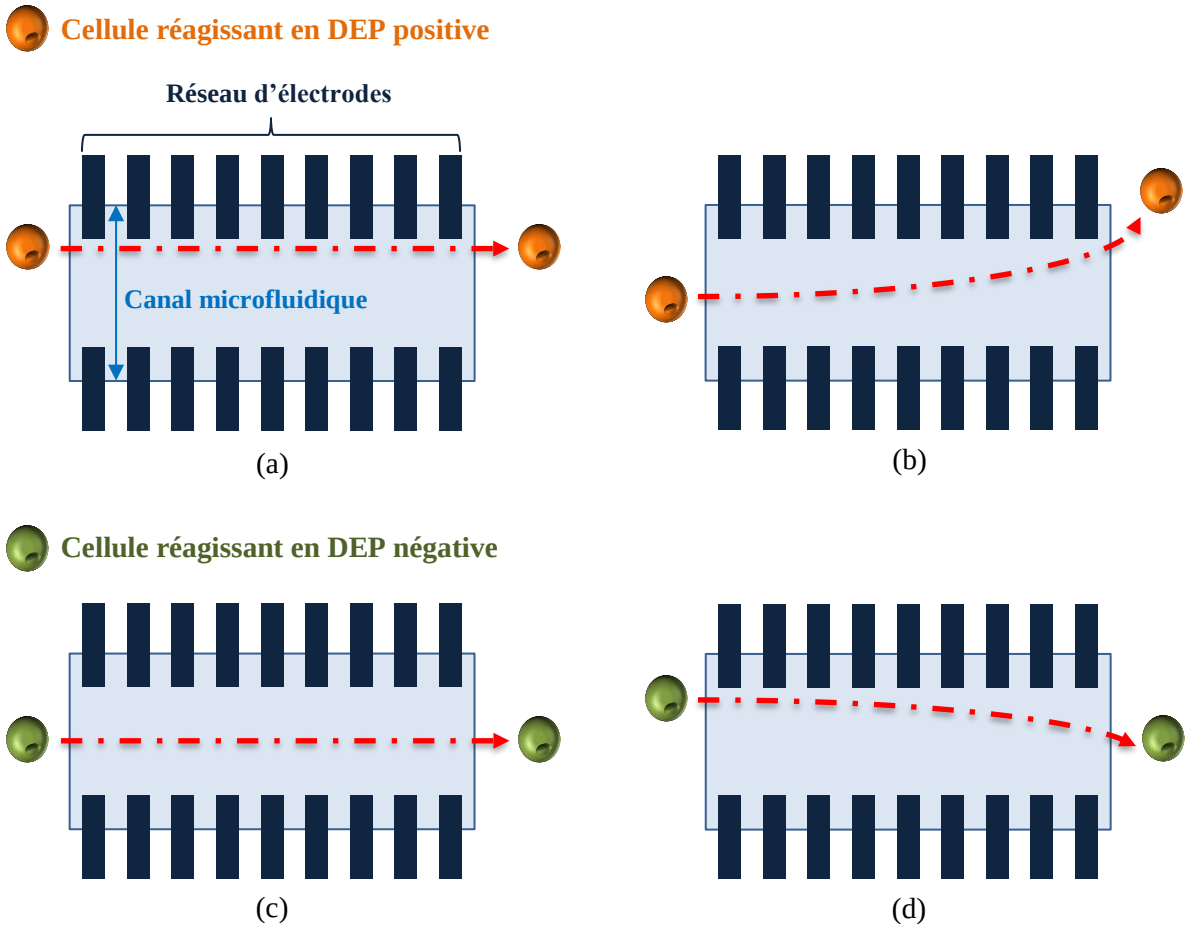


Figure. 96 Schéma illustrant le comportement diélectrophorétique attendu d'une cellule dans différentes positions dans le canal microfluidique ; cellule réagissant en DEP positive : (a) se déplace aux bords des électrodes, (b) subit une déviation progressive du centre du canal vers les bords des électrodes. Cellule réagissant en DEP négative : (c) se déplace au centre du canal, (d) dévie progressivement des bords des électrodes vers le centre du canal.

D'autre part, si l'on considère une cellule réagissant en DEP négative et se déplaçant au centre du canal, celle-ci ne devrait subir aucun changement dans sa trajectoire (Figure. 96.c) et continuera à se déplacer en ligne droite. En revanche, si elle se trouve aux bords des électrodes, elle sera repoussée progressivement vers le centre du canal (Figure. 96.d).

Afin d'obtenir une configuration de gradient de champ électrique dans le canal, adaptée et capable de réaliser un tri cellulaire efficace, nous allons voir dans ce qui suit comment nous

avons optimisé la position des électrodes dans le canal, paramètre qui semble en effet avoir le plus d'incidence sur le profil de champ généré, à partir de simulations électromagnétiques réalisées avec Comsol Multiphysics.

I.2. Simulations et optimisation du cytomètre électromagnétique

Pour réaliser la fonction de tri cellulaire désirée, nous allons optimiser le cytomètre en étudiant particulièrement l'impact de la variation de la pénétration des électrodes (t) dans le canal de largeur 150 µm, sur le profil du gradient de champ généré dans le canal.

Pour cette étude, les électrodes métalliques du cytomètre sont considérées en aluminium et le canal est défini à partir des propriétés diélectriques du milieu de suspension qui le remplira ; typiquement du milieu DEP de permittivité relative = 78 et présentant une conductivité ionique égale à 20 mS/m.

Nous avons fixé la tension appliquée au cytomètre à 4 V_{pp} et la fréquence pour laquelle le gradient de champ est simulé à 200 MHz. Pour polariser le cytomètre, nous avons appliqué aux électrodes se faisant face le même potentiel, alors que deux électrodes adjacentes seront portées à une différence de potentiel de 4 V_{pp} (Figure. 97.a). Notons que le gradient de champ électrique simulé est représenté en échelle logarithmique et il est normalisé par rapport à la valeur maximum de l'intensité de champ électrique $1{,}5\times10^{5}$ V/m.

Lorsque nous considérons une pénétration des électrodes dans le canal de l'ordre t = 5 µm (Figure. 97.a), nous observons que l'intensité du champ électrique maximale générée par le cytomètre, se situe bien aux bords du canal là où sont disposées les électrodes, correspondant aux régions qui devraient attirer les cellules réagissant en DEP positive. A l'inverse, les cellules réagissant en DEP négative seront repoussées des bords des électrodes et seront confinées au centre du canal, où l'intensité du champ y est minimale. Cependant, il faut remarquer ici que la région de faible intensité de champ est assez large. Cela risque d'être un problème pour les cellules réagissant en DEP positive qui pourraient se déplacer au centre du canal (Figure. 96.b). Elles ne pourront probablement être influencées que très difficilement par les régions de forte intensité de champ pour être déviées et attirées par les bords des électrodes.

La Figure. 97.b montre le profil du gradient de champ généré pour t = 15 µm. De façon logique, lorsque la pénétration des électrodes placées de part et d'autre des bords du canal augmente, la distance séparant les électrodes en vis à vis diminue. Ainsi, la largeur de la région de faible intensité de champ se réduit. Mais pour cette valeur de t, la zone de faible intensité de

champ reste encore un peu trop large à notre sens, ce qui risque de ne pas suffire aux cellules soumises à des forces de DEP positives pour être déviées efficacement du centre vers les bords du canal.

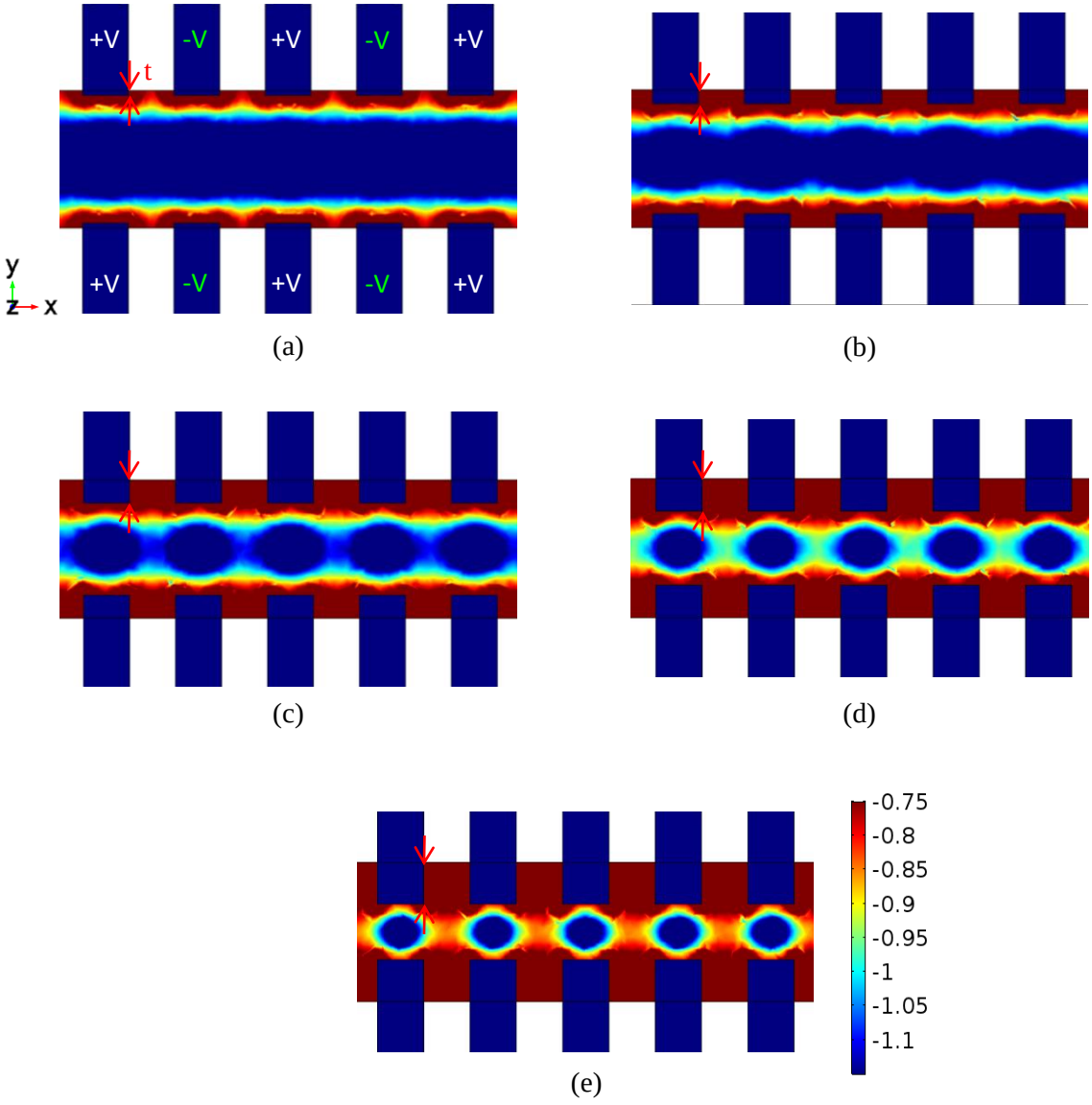


Figure. 97 Distribution du champ électrique à une altitude z = 5 µm, générée par le cytomètre pour des pénétrations des électrodes dans le canal de : (a) 5 µm, (b) 15 µm, (c) 25 µm, (d) 35 µm et (e) 45 µm.

La Figure. 97.c présente la distribution du gradient de champ électrique généré pour t = 25 µm, autrement dit pour une distance entre les électrodes en vis à vis de l'ordre de 100 µm. Il apparaît clairement que la région de la faible intensité de champ reste suffisamment large pour confiner au centre du canal les cellules réagissant en DEP négative. Mais cette fois ci quelle que soit la position des cellules réagissant en DEP positive dans le canal microfluidique, elles devraient pouvoir être attirées par les régions de forte intensité de champ

qui présente une distribution encore homogène sur la longueur du canal (suivant l'axe x) et de plus en plus intense au fur et à mesure que l'on se rapproche des bords des électrodes (suivant l'axe y). En effet, cette configuration paraît bien plus favorable pour réaliser la fonction de déviation progressive et de tri des cellules à la sortie du cytomètre que nous recherchons.

Nous avons étudié également les cas supérieurs pour lesquels t = 35 µm et 45 µm qui semblent plutôt défavorables (Figure. 97.d et e). En effet, nous remarquons qu'en augmentant la pénétration des électrodes dans le canal, il y a un risque que le cytomètre commence plus à piéger qu'à dévier les cellules qui réagissent en DEP négative. En effet les zones de faibles intensités de champs prennent ici la forme de taches de champs. Ainsi, cette configuration risque de ralentir le déplacement des cellules dans le canal et induire des changements de trajectoires inappropriés, voire les immobiliser au milieu du canal. De plus, comme nous l'observons pour t = 45 µm (Figure. 97.e), les cellules réagissant en DEP positive peuvent également se retrouver piégées entre deux électrodes adjacentes au niveau de la paroi du canal, zone où la vitesse des cellules est très faible de par le profil laminaire du flux. En effet entre les électrodes apparaît une région de forte intensité de champ, plus intense que celle présentée aux bords des électrodes plongeant dans le canal. Ainsi, leur trajectoire risque d'être fortement perturbée. En outre, nous pouvons aussi remarquer que si le gradient de champ ne semble plus aussi efficacement marqué, la fonction de tri risque d'en être fortement impactée.

Par conséquent, une géométrie de réseaux d'électrodes possédant une pénétration des électrodes de 25 µm dans le canal a été retenue pour mettre au point un premier prototype de cytomètre électromagnétique (Figure. 98.a). En effet, les électrodes ont une épaisseur de 9 µm, pour pouvoir générer un champ électrique qui reste suffisamment intense en fonction de l'altitude de la cellule dans le canal (suivant l'axe z), en particulier au milieu du canal, où la plupart des cellules pourront être localisées. La largeur des électrodes est de l'ordre de 50 µm (environ quatre fois la taille des cellules), la distance entre deux électrodes adjacentes équivaut à 50 µm ; toutes deux permettant de générer un champ électrique suffisamment intense aux bords du canal (Figure. 97.c) qui devrait permettre d'attirer efficacement les cellules réagissant en DEP positive et toutes en évitant de les piéger et de les bloquer aux niveaux des électrodes.

En ce qui concerne la longueur du cytomètre (égale à 1600 µm), comme nous l'avons déjà mentionné, il faut disposer d'un certain nombre d'électrodes pour générer un gradient de champ s'étalant sur une longueur suffisante du canal pour pouvoir dévier efficacement des cellules qui pourront se déplacer à des vitesses voisines de 1 mm/s dans un premier temps.

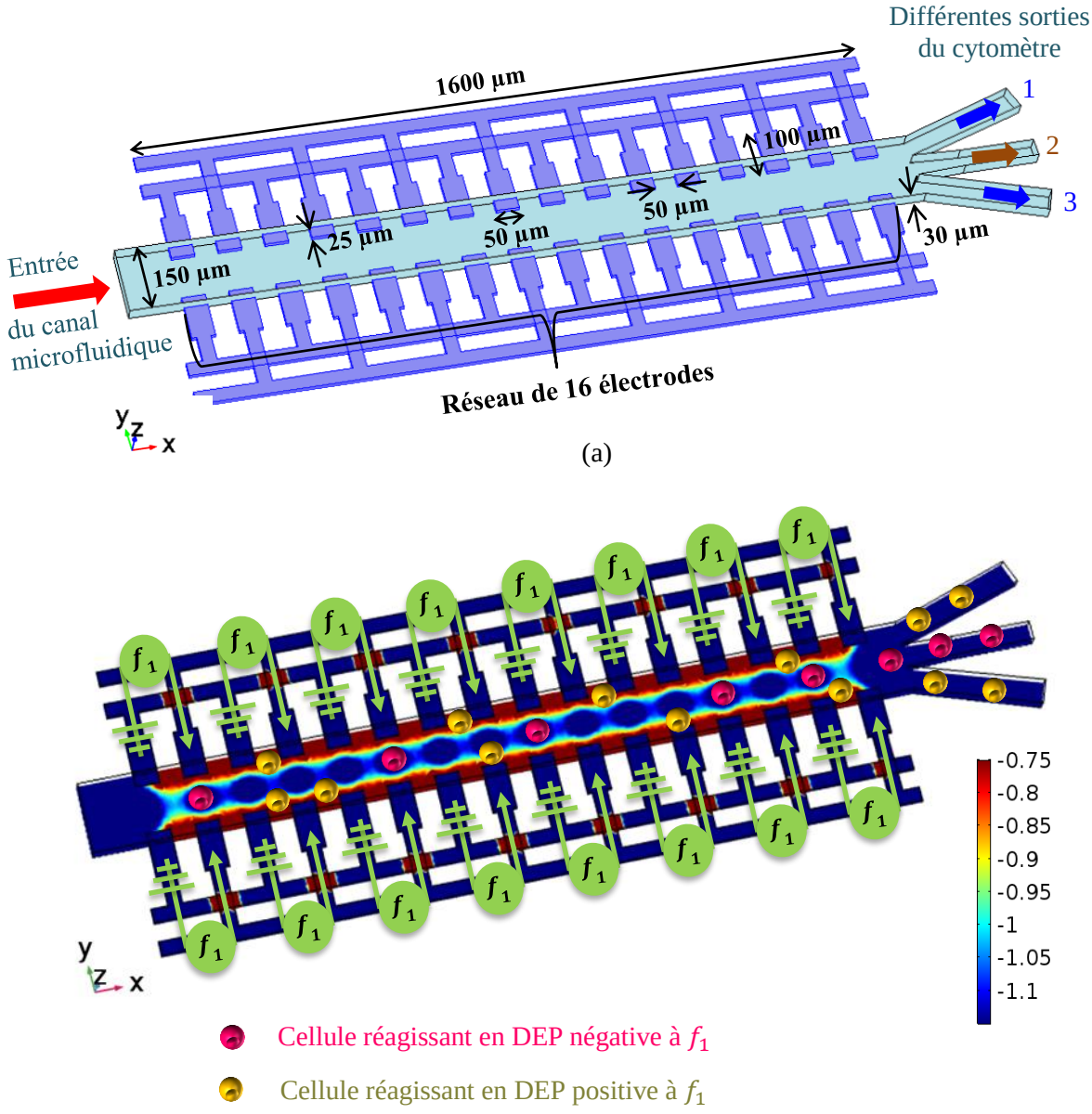


Figure. 98 (a) Géométrie du cytomètre électromagnétique, (b) schéma de principe de fonctionnement du cytomètre pour une pénétration des électrodes dans le canal de l'ordre de 25 µm, avec f_1 représentant la fréquence du fonctionnement.

De plus, si le nombre d'électrodes n'est pas suffisant et donc la longueur sur laquelle s'effectue le tri est trop courte, une autre possibilité consiste à augmenter l'amplitude de la tension appliquée au cytomètre. Cependant, comme nous l'avons déjà vu, il en résultera une augmentation de l'intensité du champ électrique sur les points chauds qui pourra altérer la viabilité des cellules s'y retrouvant à proximité. Ainsi, pour une largeur de canal de 150 µm, nous estimons que 2×16 électrodes (8 paires) permettront d'accomplir la fonction de déviation

progressive visée et cela de manière efficace pour un débit de cellules correct (1 mm/s) et un niveau de champ raisonnable (4 V_{pp}).

Le canal microfluidique (Figure. 98) est composé d'une entrée pour injecter la suspension mixte de cellules à séparer, et de trois sorties pour collecter les cellules ainsi triées. En effet, les sorties 1 et 3 devraient collecter en principe les cellules qui seront attirées par les bords des électrodes, et la sortie 2 devrait collecter les cellules repoussées au centre du canal.

Comme l'illustre la Figure. 98.b, le profil de champ électrique généré sur la structure globale est bien conforme à celui que nous recherchons.

La géométrie de cytomètre retenue a été fabriquée à partir du procédé BiCMOS SG25H4 standard d'IHP (Figure. 58), sur la même base de procédé de fabrication et d'assemblage que nous avons décrite précédemment pour la structure quadripôle 3D (partie V du chapitre II).

En effet, les électrodes du cytomètre présentant une épaisseur de 9 µm sont formées par un empilement des trois niveaux de métal : Top Métal 2, Top Métal 1 et Métal 3, qui sont interconnectés par des réseaux de vias métalliques denses au travers des différentes couches de SiO_2.

La Figure. 99 illustre le cytomètre électromagnétique ainsi réalisé en collaboration avec *IHP Microelectronics*.

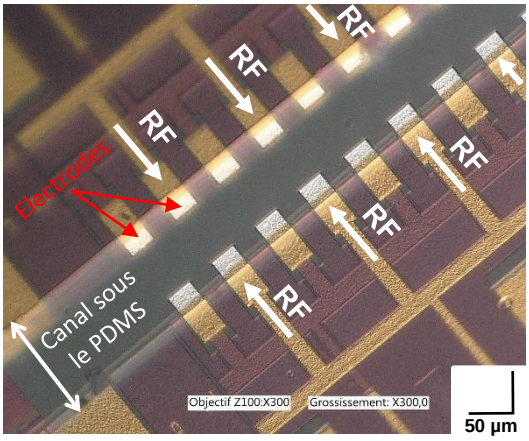


Figure. 99 Photographie du cytomètre électromagnétique implémenté avec son canal microfluidique sur une puce BiCMOS d'IHP.

II. Validation du principe de fonctionnement du cytomètre électromagnétique

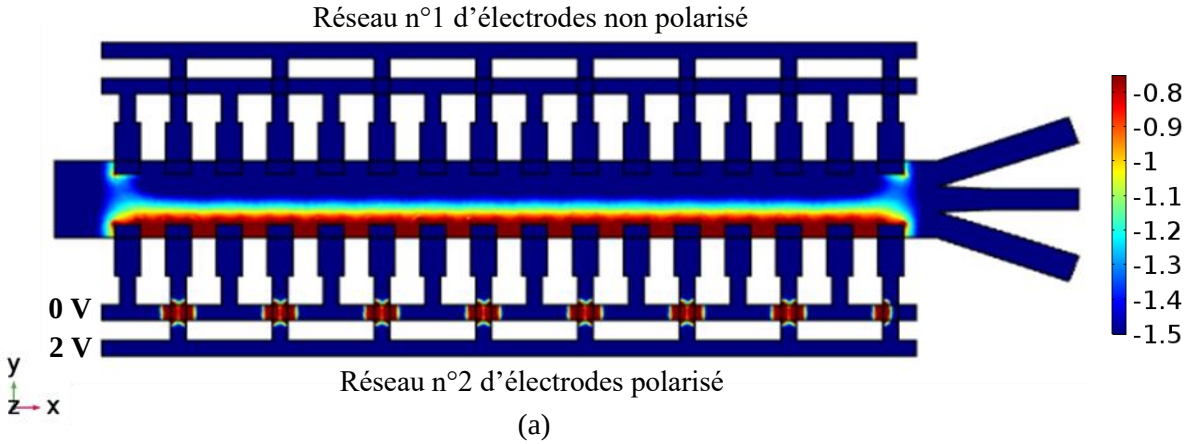
Pour tester le bon fonctionnement du cytomètre réalisé et valider sa capacité à dévier de leur trajectoire des cellules en fonction de leur comportement diélectrophorétique et de leur position initiale dans le canal microfluidique, nous avons mené tout d'abord des expérimentations à partir d'un seul type cellulaire injecté dans le canal microfluidique et en faisant varier la fréquence du signal DEP appliqué aux réseaux d'électrodes. Ces premiers tests sur le cytomètre ont été réalisés avec des cellules cancéreuses SW480 de côlon.

II.1. Modification de trajectoire

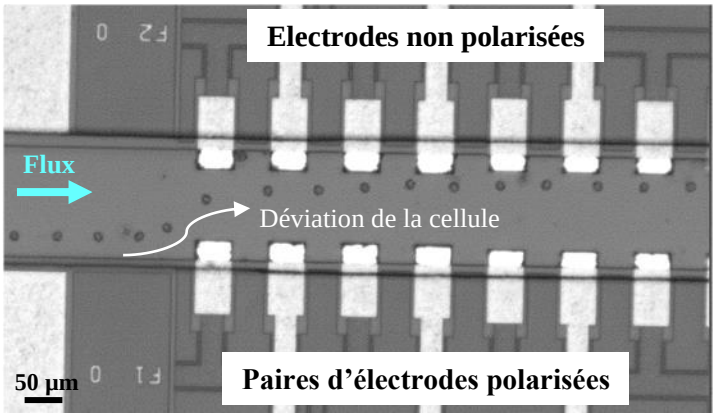
Pour valider la fonction de déviation progressive des cellules que le cytomètre pourra accomplir, nous avons cherché à visualiser la trajectoire d'une cellule individuelle en flux réagissant en DEP négative et pénétrant dans le cytomètre au niveau des électrodes polarisées, régions de forte intensité de champ (Figure. 100).

Pour visualiser de manière plus évidente l'effet du champ électrique sur les particules en mouvement (en utilisant toute la largeur disponible du canal pour dévier les particules), un seul réseau d'électrodes du cytomètre a été polarisé avec un signal RF à 300 MHz, fréquence située au-dessus de la seconde fréquence de transition f_{x02} médiane de la lignée SW480, d'amplitude 4 V_{pp}. L'autre réseau a été mis ici à la masse. La Figure. 100.a montre que l'intensité maximale du champ électrique généré dans cette configuration, est toujours située aux bords des électrodes polarisées. Par contre, la zone d'intensité de champ la plus faible se situe à présent au niveau du réseau d'électrodes non polarisé.

Après avoir rempli le canal microfluidique avec du milieu DEP et évacué toutes les bulles d'air qui peuvent exister, nous avons injecté la suspension cellulaire SW480 dans le canal via le réservoir d'entrée du cytomètre. Les cellules SW480 y circulant en flux sont suspendues dans un milieu DEP possédant un pH = 7,39 et une conductivité = 20,9 mS/m. Pour visualiser de manière appropriée le déplacement des cellules dans le canal notamment lorsqu'elles arrivent à l'entrée du cytomètre, nous contrôlons la vitesse du flux à l'aide du contrôleur de flux microfluidique, en réglant la différence de pression entre l'entrée et la sortie du canal, afin d'obtenir une vitesse de déplacement moyenne des cellules de l'ordre de 0,1-0,5 mm/s.



(a)



(b)

Figure. 100 (a) Distribution du champ électrique normalisé, généré par le cytomètre dont un seul réseau d'électrodes est polarisé avec un signal RF à 300 MHz pour une tension 4 V_{pp}, (b) superposition d'images montrant le changement progressif de la trajectoire d'une cellule individuelle en flux réagissant en DEP négative, du gradient de champ électrique.

La Figure. 100.b représente une superposition d'images prises sur un temps d'acquisition de 10 secondes, durant lesquelles on y voit une cellule que l'on a contrainte par la technique de flow focusing à arriver près d'un bord du canal là où le champ est maximal. Comme la vitesse volontairement imposée à la cellule est relativement faible (inférieure à 0,1 mm/s), l'influence du champ va être plus efficiente, et sa déviation plus efficace et visible. Ainsi, on voit bien que dès qu'elle entre dans la zone des électrodes, elle est déviée quasi instantanément du bord des électrodes vers les zones de faible intensité de champ. Une fois cette zone atteinte, elle ne subit plus de forces DEP et le flux impose une trajectoire rectiligne.

D'autre part, pour observer les différentes trajectoires que pourront suivre les cellules SW480 circulant en flux dans le canal, lorsqu'elles réagissent en DEP positive et DEP négative,

nous avons appliqué au cytomètre des signaux mono fréquence (pur sinus) à des fréquences qui se situent respectivement au-dessous et au-dessus de la seconde fréquence de transition f_{x02} médiane identifiée au préalable pour ce type cellulaire (Figure. 101). Cette fréquence médiane f_{x02} est de l'ordre de 180 MHz (Tableau III-4).

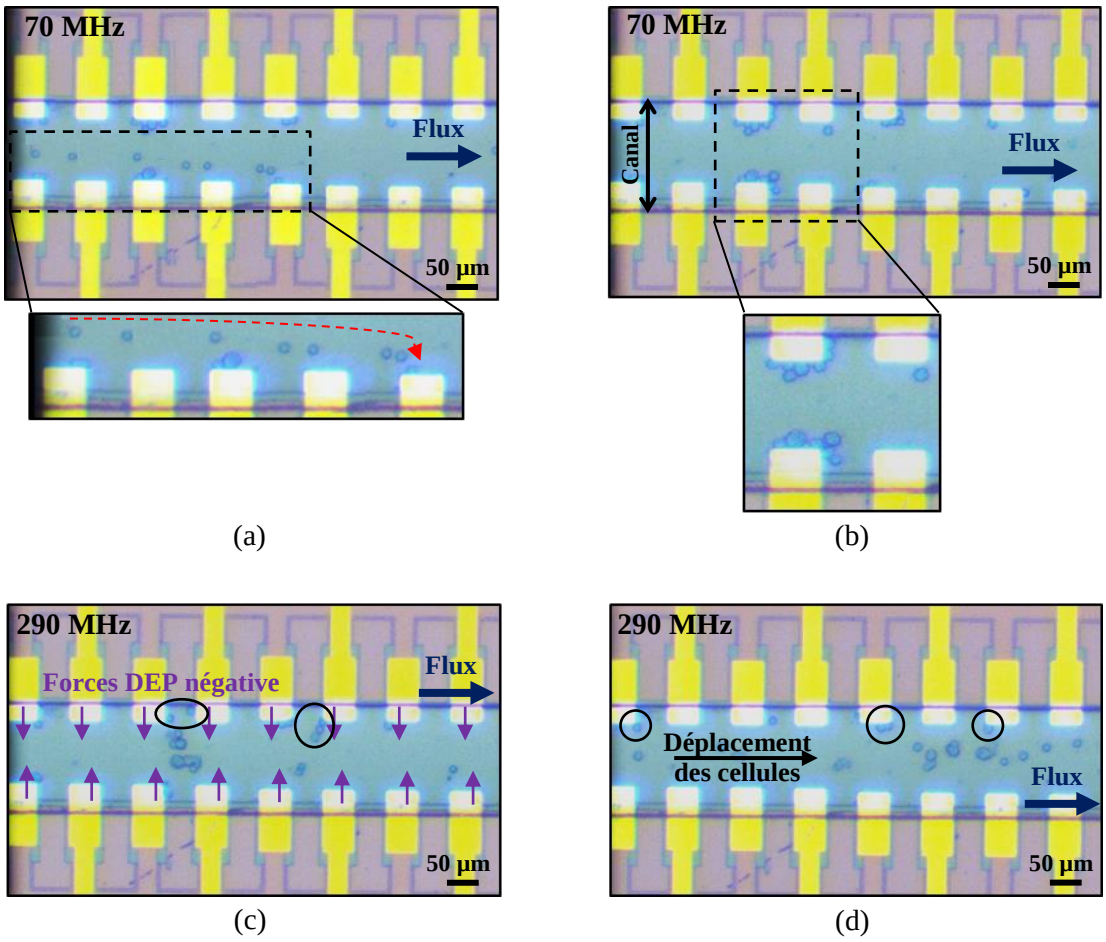


Figure. 101 (a) Photographie de la position de cellules SW480 dans le canal réagissant en DEP positive, pénétrant dans le cytomètre au centre du canal. Répartition des cellules SW480 en flux dans le cytomètre : (b) en DEP positive, attirées par les bords des électrodes à 70 MHz inférieure à f_{x02} médiane, (c) en DEP négative, repoussées vers le centre du cytomètre à 290 MHz supérieure à f_{x02} médiane, (d) déplacement des cellules confinées dans la région de faible intensité de champ, avec le flux imposé dans le canal.

Ainsi, en appliquant tout d'abord aux deux réseaux d'électrodes du cytomètre un signal RF d'amplitude 4 V_{pp} et en balayant le spectre de fréquence au-dessous de 180 MHz, nous avons observé que la majorité des cellules SW480 en flux réagissent bien en DEP positive à 70 MHz (Figure. 101.a et b). En effet, comme attendu, la Figure. 101.a montre que les cellules SW480 réagissant en DEP positive, et qui arrivent à l'entrée du cytomètre tout en se trouvant au centre

du canal, région de faible intensité de champ, sont bien attirées et déviées progressivement vers les régions de forte intensité de champ. La Figure. 101.b montre que les cellules SW480 soumises au champ électrique généré à 70 MHz, sont attirées et collectées par les bords des électrodes en DEP positive. Ce phénomène s'explique principalement par les différences au niveau de la vitesse du flux au sein du canal qui suit une distribution parabolique. En effet, le flux imposé dans le canal est laminaire, donc sa vitesse d'écoulement est très faible aux bords du canal (Figure. 62.a). Par conséquent, les forces hydrodynamiques y sont bien plus faibles pour contrebalancer les forces diélectrophorétiques qui empêchent le déplacement des cellules et les immobilisent aux bords des électrodes.

D'autre part, en appliquant au cytomètre un signal RF à 290 MHz : un signal dont la fréquence est supérieure à f_{x02} médiane, la majorité des cellules SW480 sont repoussées des bords des électrodes en DEP négative (Figure. 101.c) et sont alors confinées au centre du cytomètre (Figure. 101.d), dans la zone de faible intensité de champ. Elles se déplacent avec le flux imposé dans le canal. Cependant, nous remarquons sur ces prises d'images que certaines cellules restent aux bords des électrodes. Cela pourrait être expliqué par le fait que soit les cellules ont adhéré lors des expériences en DEP positive, soit que le champ électrique généré n'est pas assez efficace ou suffisamment intense pour ces cellules.

Les cellules réagissant en DEP négative et pénétrant dans le cytomètre et se déplaçant au centre du canal, continuent bien pour leur part, à se déplacer en trajectoire rectiligne.

Cette première étude réalisée avec le cytomètre électromagnétique avec les cellules SW480 a permis de valider son principe de fonctionnement et sa capacité d'agir sur la trajectoire des cellules. En effet, les cellules circulant en flux au travers du cytomètre, ont pu réagir dans les deux états de DEP, positif et négatif.

A présent, dans l'objectif d'évaluer l'efficacité de la fonction de tri, nous avons mené des tests préliminaires de séparation à partir de mélanges de cellules biologiques et de billes de polystyrène en suspension.

II.2. Séparation de cellules biologiques et de billes de polystyrène

Lors de nos premières expériences de séparation, nous avons essayé de trier un mélange de cellules SW480 et de billes de polystyrène avec le cytomètre réalisé à partir du procédé SG25H4 d'IHP. Pour distinguer très facilement les cellules des billes, nous avons utilisé des billes

possédant un diamètre de 7 µm, plus petites que les cellules SW480 dont la taille varie plutôt entre 13 et 20 µm. De plus, ces billes possèdent une forme ronde parfaite et une couleur foncée sous l'objectif du microscope, alors que la forme des cellules n'est pas régulière et elles possèdent un aspect plus réfringent (Figure. 102). Les particules ont été mises en suspension dans le même milieu DEP possédant un pH = 7,39 et une conductivité σ = 20,9 mS/m.

Comme nous l'avons vu, pour séparer efficacement les cellules des billes, il faut faire fonctionner le cytomètre à une fréquence pour laquelle les deux particules présentent deux comportements diélectrophorétiques différents. D'après le modèle de $Re[K(\omega)]$ pour les billes, présenté précédemment dans la partie II.3. du chapitre III, les billes que nous utilisons, devraient réagir en DEP négative quelle que soit la fréquence du signal RF appliqué. Ainsi, nous aurons juste à travailler à une fréquence pour laquelle les cellules SW480 réagiront en DEP positive. Comme nous l'avons déjà observé, la grande majorité de ces cellules sont attirées par les électrodes du cytomètre lorsque ces dernières sont polarisées à 70 MHz.

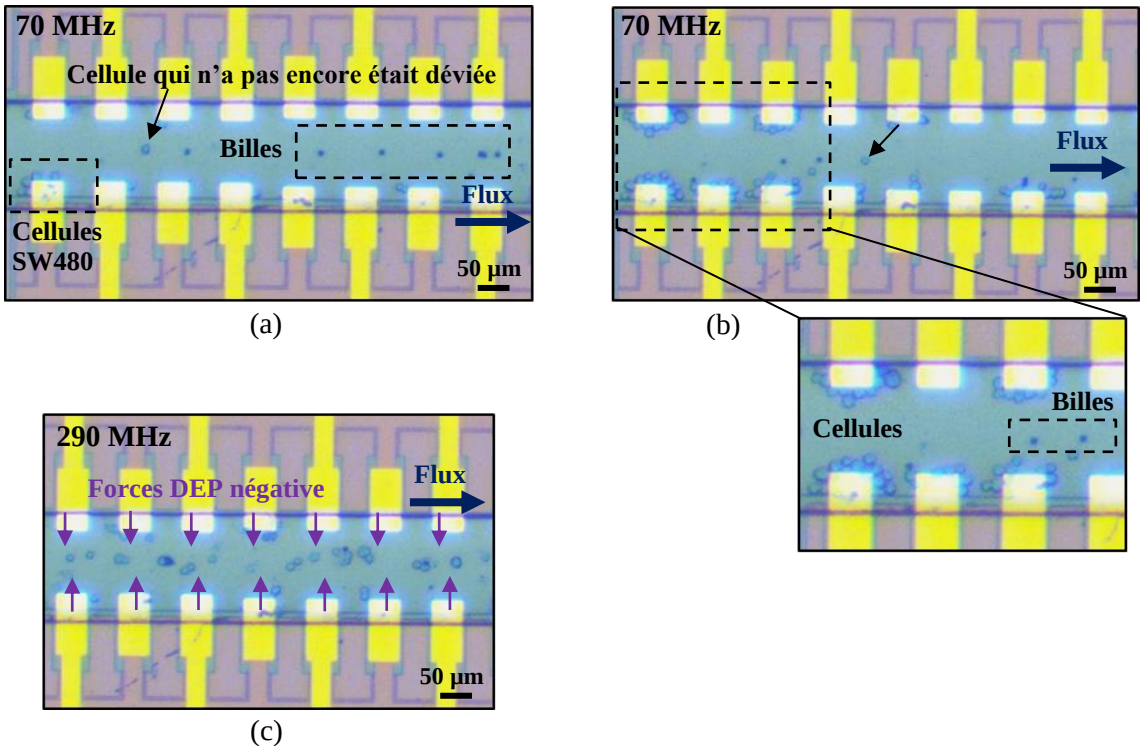


Figure. 102 (a) et (b) Séparation des cellules SW480 et des billes de polystyrène en flux sous l'action d'un signal RF à 70 MHz ; les cellules et les billes réagissent respectivement en DEP positive et DEP négative, (c) cellules SW480 et billes de polystyrènes soumises à des forces de DEP négative à 290 MHz, se déplaçant au centre du cytomètre avec le flux imposé dans le canal.

Nous avons donc injecté le mélange cellules et billes dans le canal et appliqué un signal RF de 70 MHz d'amplitude 4 V_{pp} aux réseaux d'électrodes. Une fois que les particules en flux sont arrivées à l'entrée du cytomètre, les cellules SW480 réagissent en DEP positive et les billes en DEP négative, comme attendu. En effet, nous observons que la majorité des cellules sont bien attirées vers les bords des électrodes (Figure. 102.a et b), et que quelques cellules ne sont pas suffisamment déviées en DEP positive. Cela pourrait être lié au fait que les cellules en question soient mortes ou que le champ électrique généré ne soit pas suffisamment efficient sur elles.
A l'inverse, un grand nombre de billes sont concentrées au centre du canal (Figure. 102.a et b), région de faible intensité de champ.

D'autre part, si nous changeons la fréquence du signal appliqué à une valeur de 290 MHz, les cellules réparties aux bords du canal seront soumises à des forces de DEP négative et la majorité seront repoussées vers le centre du canal (Figure. 102.c). Elles se déplacent alors avec les billes au milieu du trieur, sous l'action du flux imposé dans le canal.

Par conséquent, la géométrie du cytomètre semble bien démontrer sa capacité à séparer deux types différents de particules possédant différentes réponses diélectrophorétiques. Cependant, comme le montre la Figure. 102.a et b, nous remarquons que les billes repoussées au centre du canal, se déplacent avec le flux imposé et pourront ainsi être collectées à la sortie du canal. En revanche, les cellules réagissant en DEP positive sont presque toutes immobilisées et collectées aux bords des électrodes.

Pour résoudre ce problème et pour que nous puissions collecter de manière continue à la sortie du canal les particules qui seront attirées par les bords des électrodes, nous allons voir qu'une solution peut consister à utiliser un signal DEP modulé en amplitude et ainsi limiter le piégeage permanent des cellules sur les électrodes.

Cette approche a été testée dans le cadre des travaux en lien avec le projet Européen SUMCASTEC, sur des cellules de glioblastomes (lignée LN18). Un mélange de cet autre type cellulaire avec des billes de polystyrène de 7 µm suspendues dans du milieu DEP dont le pH = 7,41 et la σ = 22 mS/m, a été utilisé.

Ces cellules ont été préalablement caractérisées en suivant la même méthodologie de caractérisation DEP-UHF (Figure. 76). La lignée cellulaire LN18 présente une seconde fréquence de transition médiane de l'ordre de 116 MHz.

Ainsi, comme le montre la Figure. 103.a, en appliquant au cytomètre un signal RF modulé en amplitude (par une fonction sinus à 1 ou 2 Hz) à une fréquence 300 MHz supérieure à la f_{x02} médiane des cellules LN18, la plupart des cellules se retrouvent toujours localisées au centre du canal. Par contre, lorsque la fréquence du signal est prise au-dessous de f_{x02} (50 MHz), la majorité des cellules sont attirées par les électrodes mais continues à se déplacer le long du canal (Figure. 103.b). A présent dans le cas où la fréquence du signal RF se trouve voisine de f_{x02} médiane (Figure. 103.c), nous observons que la distribution cellulaire reste très dispersée, avec des cellules qui sont plus ou moins repoussées vers le centre du canal et d'autres cellules qui sont attirées par le bord des électrodes. En effet, cela s'explique par l'hétérogénéité que l'on observe dans les signatures DEP au sein d'une même population de par les différences de propriétés diélectriques intracellulaires d'une cellule à l'autre. C'est pourquoi il y aura toujours certaines cellules qui réagiront en DEP positive, d'autres en DEP négative et d'autres qui ne réagiront pas franchement lorsque le cytomètre sera polarisé à une fréquence proche de la f_{x02} médiane.

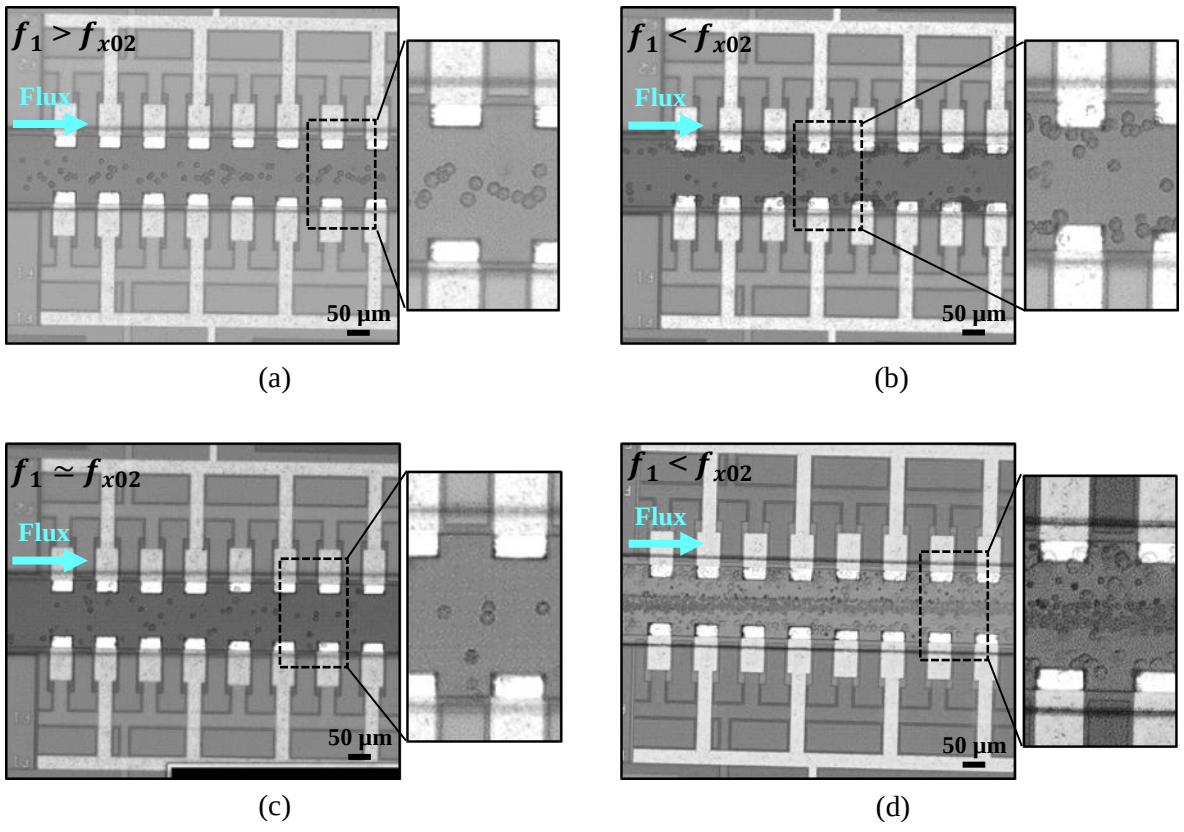


Figure. 103 Superposions d'images illustrant le comportement des cellules LN18 en flux, lorsque le cytomètre est polarisé par un signal RF dont la fréquence f_1 est de l'ordre de: (a) 300 MHz, (b) 50 MHz, (c) voisine de 116 MHz. (d) Séparation DEP-UHF de cellules LN18 de billes de polystyrène à une fréquence 50 MHz.

Pour trier les cellules LN18 des billes de polystyrène, un signal de fréquence égale à 50 MHz est appliqué aux électrodes du cytomètre, en modulant lentement l'amplitude de champ électrique. Le flux hydrodynamique arrive ainsi à pousser les cellules lorsque la force diélectrophorétique faiblit. En effet, lorsque le mélange de particules est soumis au champ électrique, la Figure. 103.d montre que les billes de polystyrène réagissent bien en DEP négative, donc se concentrent bien au centre du canal et sont séparées des cellules LN18 qui quant à elles sont attirées en DEP positive aux bords des électrodes. Les particules séparées se déplacent avec le flux.

Ces deux expérimentations de séparation par cytométrie électromagnétique de cellules biologiques et de billes de polystyrène nous permettent bien de valider le principe de fonctionnement du cytomètre développé.

Bien que le cytomètre arrive à séparer des particules en flux possédant des réponses diélectrophorétiques UHF vraiment différentes, on voit que la séparation de particules aux signatures très proches risque de ne pas être si évidente dans la mesure où la géométrie du canal relativement étroite ne facilite pas un éloignement franc des particules soumises aux forces de DEP modérées.

Dans ce cadre, nous pensons qu'il serait intéressant de faire évoluer la géométrie du canal microfluidique en lui donnant une forme évasée (Figure. 104). Ce qui permettrait d'accroître l'efficacité de la séparation en amenant les cellules réagissant en DEP positive à s'écarter plus nettement de la trajectoire de celles réagissant en DEP négative.

L'injection des cellules pourrait être également optimisée, en cherchant à les focaliser dans les zones de forte intensité de champ dès l'entrée du cytomètre.

A l'entrée du cytomètre, 3 paires d'électrodes en vis-à-vis, pourraient être utilisées pour mettre en forme le flux de cellules entrant et réaliser la fonction de déviation efficace des cellules comme le montre la Figure. 101.a. En effet, il s'agit d'attirer et de dévier efficacement les cellules réagissant en DEP positive et de repousser celles réagissant en DEP négative au centre du canal. Ensuite, deux réseaux d'électrodes de forme évasée sont placés de part et d'autre des bords du canal, pour permettre de dévier progressivement les cellules réagissant en DEP positive, de les séparer de celles ne réagissant que peu au champ et de les écarter vers les sorties 1 et 3 du canal.

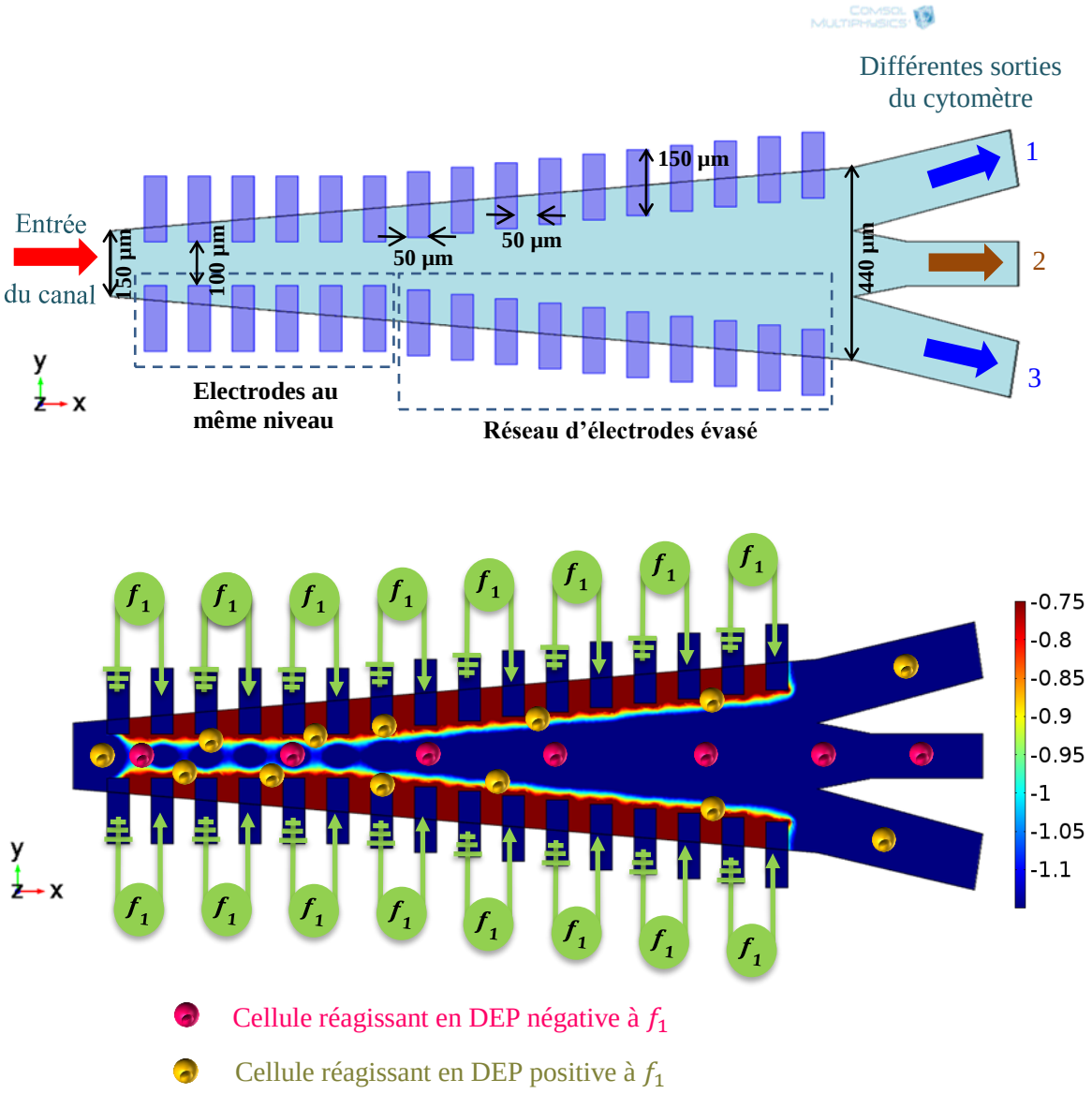


Figure. 104 Schéma de principe illustrant l'optimisation proposée pour le cytomètre électromagnétique.

Nous pensons qu'avec cette nouvelle géométrie (Figure. 104), les cellules arrivant au centre du cytomètre et réagissant en DEP positive, seront toujours déviées progressivement vers les bords du canal en suivant la région de forte intensité de champ, pour qu'elles soient finalement collectées aux sorties 1 et 3 du canal. Celles se trouvant dès l'entrée du cytomètre aux bords des électrodes, verront leur trajectoire suivre la forme évasée des électrodes du cytomètre et du canal. Finalement, pour les cellules réagissant en DEP négative, elles seront repoussées au centre du canal et se déplaceront en trajectoire rectiligne pour qu'elles soient collectées à la sortie 2 du canal.

Production scientifique

Publication dans revue internationale à comité de lecture

- J. Leroy, C. Dalmay, A. Landoulsi, **F. Hjeij**, C. Mélin, B. Bessette, C. Bounaix Morand du Puch, S. Giraud, C. Lautrette, S. Battu, F. Lalloué, M.O. Jauberteau, A. Bessaudou, P. Blondy, A. Pothier, "Microfluidic biosensors for microwave dielectric spectroscopy", Sensors and Actuators A: Physical, Vol. 229, pp. 172-181, 9 April 2015.

Communications internationales à comité de lecture

- R. Manczak, **F. Hjeij**, T. Provent, S. Saada, C. Dalmay, B. Bessette, G. Begaud, S. Battu, P. Blondy, M.O. Jauberteau, F. Lalloue, M. Inac, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, A. Pothier, "Tracking Cancer Cells with Microfluidic High Frequency DEP Cytometer Implemented on BiCMOS Lab-on-Chip Platform", Présentation Orale, IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest (IMS 2018), Philadelphia, PA, USA, 10-15 June 2018.
- **F. Hjeij**, C. Dalmay, B. Bessette, G. Begaud, A. Bessaudou, P. Blondy, M.O. Jauberteau, F. Lalloue, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, W. Gamal, C. Palego, A. Pothier, "Biological Cell Discrimination Based on Their High Frequency Dielectropheretic Signatures at UHF Frequencies", Présentation Poster, IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest (IMS 2017), Honolulu, HI, USA, pp. 533-536, 4-9 June 2017.
- A. Pothier, **F. Hjeij**, C. Dalmay, B. Bessette, F. Lalloue, M. Kaynak, C. Palego, "Dielectric Spectroscopy and RF and Microwave Passive Microsystems for Biological Application and Discrimination of Cells", Présentation Invitée, Passive Integrated Circuits workshop, IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest (IMS 2017), Honolulu, HI, USA, 4-9 June 2017.
- **F. Hjeij**, C. Dalmay, A. Bessaudou, P. Blondy, A. Pothier, B. Bessette, G. Begaud, M.O. Jauberteau, F. Lalloué, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, "UHF Dielectrophoretic Handling of Individual Biological Cells Using BiCMOS Microfluidic RF-Sensors", Présentation Orale, 46th European Microwave Conference (EuMC 2016), London, UK, 4-6 Oct. 2016.

- C. Palego, G. Perry, C. Hancock, **F. Hjeij**, C. Dalmay, A. Bessaudou, P. Blondy, A. Pothier, F. Lalloue, B. Bessette, G. Begaud, M-O. Jauberteau, C.B. Kaynak, M. Wietstruck, M. Kaynak, M. Casbon, J. Benedikt, D. Barrow, A. Porch, "BiCMOS Microfluidic Sensor for Single Cell Label-Free Monitoring Through Microwave Intermodulation", Présentation Orale, IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest (IMS 2016), San Francisco, CA, USA, 22-27 May 2016.
- C. Baristiran Kaynak, A. Goritz, M. Fraschke, M. Wietstruck, M. Kaynak, **F. Hjeij**, C. Dalmay, P. Blondy, A. Pothier, C. Palego, "Microfluidic Embedded BiCMOS Process for DEP Trapping of Single Cell", Présentation Orale, 11th Annual IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems (NEMS 2016), Matsushima Bay and Sendai MEMS City, Japan, 17-20 April 2016.
- **F. Hjeij** , C. Dalmay, B. Bessette, F. Lalloué, A. Bessaudou, P. Blondy, A. Pothier, "Non-Invasive Analysis of Intracellular Properties of Individual Biological Cells Using Label-Free High Frequency Microfluidic Biosensor", Présentation Orale, 16th International Symposium on RF-MEMS and RF-MICROSYSTEMS (MEMSWAVE 2015)**,** Barcelona, Catalonia, Spain, 29 June-1 July 2015.
- J. Leroy, **F. Hjeij**, C. Dalmay, C. Mélin, F. Lalloué, S. Battu, M.O Jauberteau, C. Lautrette, A. Bessaudou, P. Blondy, A. Pothier, "High Frequency Microfluidic Biosensors for Intracellular Dielectric Spectroscopy", Présentation Orale, IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest (IMS 2015), Phoenix, AZ, USA, 17-22 May 2015.

Communications nationales à comité de lecture

- **F. Hjeij**, C. Dalmay, A. Bessaudou, P. Blondy, A. Pothier, B.Bessette, G. Begaud, M.O. Jauberteau, F. Lalloué, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, "Caractérisation de cellules individuelles par méthode diélectrophorétique ultra-haute-fréquence", Présentation Orale, 20èmes Journées Nationales Microondes (JNM 2017), Saint-Malo, 16-19 Mai 2017.
- **F. Hjeij**, C. Dalmay, F. Lalloué, A. Bessaudou, P. Blondy, A. Pothier, "Conception Et Test De Microsystèmes Pour La Caractérisation Cellulaire Par Diélectrophorèse", Présentation Poster, Quatrième colloque francophone PLUridisciplinaire sur les

Matériaux, l'Environnement et l'Electronique (PLUMEE 2015), Limoges, 12-15 Juin 2015.

- **F. Hjeij**, J. Leroy, C. Mélin, C. Dalmay, F. Lalloué, P. Blondy, A. Pothier, "Capteurs microfluidiques hyperfréquences pour l'analyse cellulaire", Présentation Orale, 19èmes Journées Nationales Microondes (JNM 2015), Bordeaux, 3-5 Juin 2015.
- A. Landoulsi, **F. Hjeij**, C. Dalmay, A. Bessaudou, P. Blondy, A. Pothier, "Microcapteurs RF dédiés à la spectroscopie diélectrique de liquides et de particules micrométriques en suspension", Présentation Poster, 19èmes Journées Nationales Microondes (JNM 2015), Bordeaux, 3-5 Juin 2015.

Références bibliographiques

[1] J. Picot, C. L. Guerin, C. L. V. Kim, and C. M. Boulanger, "Flow cytometry: retrospective, fundamentals and recent instrumentation," *Cytotechnology*, vol. 64, no. 2, pp. 109–130, Mar. 2012.

[2] S. Basu, H. M. Campbell, B. N. Dittel, and A. Ray, "Purification of Specific Cell Population by Fluorescence Activated Cell Sorting (FACS)," *J. Vis. Exp. JoVE*, no. 41, 2010.

[3] S. F. Ibrahim and G. van den Engh, "High-speed chromosome sorting," *Chromosome Res.*, vol. 12, no. 1, pp. 5–14, Jan. 2004.

[4] A. Gross, J. Schoendube, S. Zimmermann, M. Steeb, R. Zengerle, and P. Koltay, "Technologies for Single-Cell Isolation," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 8, pp. 16897–16919, Jul. 2015.

[5] P. Hu, W. Zhang, H. Xin, and G. Deng, "Single Cell Isolation and Analysis," *Front. Cell Dev. Biol.*, vol. 4, Oct. 2016.

[6] M. Antfolk and T. Laurell, "Continuous flow microfluidic separation and processing of rare cells and bioparticles found in blood – A review," *Anal. Chim. Acta*, vol. 965, pp. 9–35, mai 2017.

[7] D. R. Gossett *et al.*, "Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 397, no. 8, pp. 3249–3267, Aug. 2010.

[8] J. Pivetal, *Développement et premières applications d'une méthode de tri de cellules bactériennes par marquage de l'ADN avec des nanoparticules magnétiques pour l'étude de la diversité bactérienne environnementale et des transferts horizontaux de gènes in situ*. Ecully, Ecole centrale de Lyon, 2013.

[9] S. Miltenyi, W. Müller, W. Weichel, and A. Radbruch, "High gradient magnetic cell separation with MACS," *Cytometry*, vol. 11, no. 2, pp. 231–238, Jan. 1990.

[10] A. Thiel, A. Scheffold, and A. Radbruch, "Immunomagnetic cell sorting—pushing the limits," *Immunotechnology*, vol. 4, no. 2, pp. 89–96, Oct. 1998.

[11] K. Makker, A. Agarwal, and R. K. Sharma, "Magnetic activated cell sorting (MACS): utility in assisted reproduction," *Indian J. Exp. Biol.*, vol. 46, no. 7, pp. 491–497, Jul. 2008.

[12] M. Almeida, A. C. Garcia-Montero, and A. Orfao, "Cell Purification: A New Challenge for Biobanks," *Pathobiology*, vol. 81, no. 5–6, pp. 261–275, Mar. 2015.

[13] A. Grützkau and A. Radbruch, "Small but mighty: How the MACS®-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years," *Cytometry A*, vol. 77A, no. 7, pp. 643–647, May 2010.

[14] B. Zhu and S. K. Murthy, "Stem cell separation technologies," *Curr. Opin. Chem. Eng.*, vol. 2, no. 1, pp. 3–7, Feb. 2013.

[15] L. Borlido, A. M. Azevedo, A. C. A. Roque, and M. R. Aires-Barros, "Magnetic separations in biotechnology," *Biotechnol. Adv.*, vol. 31, no. 8, pp. 1374–1385, Dec. 2013.

[16] H. Valli *et al.*, “Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells,” *Fertil. Steril.*, vol. 102, no. 2, p. 566–580.e7, Aug. 2014.

[17] A. Ulmer, “Immunomagnetic Enrichment, Genomic Characterization, and Prognostic Impact of Circulating Melanoma Cells,” *Clin. Cancer Res.*, vol. 10, no. 2, pp. 531–537, Jan. 2004.

[18] K. Bluemke *et al.*, “Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood of Patients with Renal Cell Carcinoma Correlates with Prognosis,” *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.*, vol. 18, no. 8, pp. 2190–2194, Aug. 2009.

[19] D. M. Kavanagh, M. Kersaudy-Kerhoas, R. S. Dhariwal, and M. P. Y. Desmulliez, “Current and emerging techniques of fetal cell separation from maternal blood,” *J. Chromatogr. B*, vol. 878, no. 22, pp. 1905–1911, juillet 2010.

[20] A. Menachery, N. Kumawat, and M. Qasaimeh, “Label-free microfluidic stem cell isolation technologies,” *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 89, pp. 1–12, avril 2017.

[21] M. R. Chapman *et al.*, “Sorting single satellite cells from individual myofibers reveals heterogeneity in cell-surface markers and myogenic capacity,” *Integr. Biol.*, vol. 5, no. 4, p. 692, 2013.

[22] B. Roda *et al.*, “Field-flow fractionation in bioanalysis: A review of recent trends,” *Anal. Chim. Acta*, vol. 635, no. 2, pp. 132–143, Mar. 2009.

[23] S. Bidlingmaier, X. Zhu, and B. Liu, “The utility and limitations of glycosylated human CD133 epitopes in defining cancer stem cells,” *J. Mol. Med.*, vol. 86, no. 9, p. 1025, Sep. 2008.

[24] C. W. Shields, C. D. Reyes, and G. P. López, “Microfluidic Cell Sorting: A Review of the Advances in the Separation of Cells from Debulking to Rare Cell Isolation,” *Lab. Chip*, vol. 15, no. 5, pp. 1230–1249, Feb. 2015.

[25] A. Jonáš and P. Zemánek, “Light at work: The use of optical forces for particle manipulation, sorting, and analysis,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 29, no. 24, pp. 4813–4851, Dec. 2008.

[26] K. C. Neuman and A. Nagy, “Single-molecule force spectroscopy: optical tweezers, magnetic tweezers and atomic force microscopy,” *Nat. Methods*, vol. 5, no. 6, pp. 491–505, Jun. 2008.

[27] J. R. Moffitt, Y. R. Chemla, S. B. Smith, and C. Bustamante, “Recent Advances in Optical Tweezers,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 205–228, Jun. 2008.

[28] F. Petersson, A. Nilsson, C. Holm, H. Jönsson, and T. Laurell, “Separation of lipids from blood utilizing ultrasonic standing waves in microfluidic channels,” *The Analyst*, vol. 129, no. 10, pp. 938–943, 2004.

[29] X. Ding *et al.*, “Cell separation using tilted-angle standing surface acoustic waves,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 36, pp. 12992–12997, Sep. 2014.

[30] F. Petersson, A. Nilsson, C. Holm, H. Jönsson, and T. Laurell, “Continuous separation of lipid particles from erythrocytes by means of laminar flow and acoustic standing wave forces,” *Lab Chip*, vol. 5, no. 1, pp. 20–22, 2005.

[31] F. v. d. Kammer, M. Baborowski, and K. Friese, “Field-flow fractionation coupled to multi-angle laser light scattering detectors: Applicability and analytical benefits for the

analysis of environmental colloids," *Anal. Chim. Acta*, vol. 552, no. 1, pp. 166–174, Nov. 2005.

[32] F. A. Messaud, R. D. Sanderson, J. R. Runyon, T. Otte, H. Pasch, and S. K. R. Williams, "An overview on field-flow fractionation techniques and their applications in the separation and characterization of polymers," *Prog. Polym. Sci.*, vol. 34, no. 4, pp. 351–368, Apr. 2009.

[33] U. B. Kavurt, M. Marioli, W. T. Kok, and D. Stamatialis, "Membranes for separation of biomacromolecules and bioparticles via flow field-flow fractionation: Membranes for separation of biomacromolecules and bioparticles via FlFFF," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 90, no. 1, pp. 11–18, Jan. 2015.

[34] G. Yohannes, M. Jussila, K. Hartonen, and M.-L. Riekkola, "Asymmetrical flow field-flow fractionation technique for separation and characterization of biopolymers and bioparticles," *J. Chromatogr. A*, vol. 1218, no. 27, pp. 4104–4116, juillet 2011.

[35] C. Mélin *et al.*, "Improved sedimentation field-flow fractionation separation channel for concentrated cellular elution," *J. Chromatogr. A*, vol. 1302, pp. 118–124, Aug. 2013.

[36] D. Gothard, R. S. Tare, P. D. Mitchell, J. I. Dawson, and R. O. C. Oreffo, "In search of the skeletal stem cell: isolation and separation strategies at the macro/micro scale for skeletal regeneration," *Lab. Chip*, vol. 11, no. 7, p. 1206, 2011.

[37] J. Laforet-Ast, *Caractérisation de microparticules par méthodes diélectrophorétiques : applications aux cellules biologiques*. Ecully, Ecole centrale de Lyon, 2010.

[38] M. A. Mansor and M. R. Ahmad, "Single Cell Electrical Characterization Techniques," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 16, no. 6, pp. 12686–12712, Jun. 2015.

[39] S.-I. Han, Y.-D. Joo, and K.-H. Han, "An electrorotation technique for measuring the dielectric properties of cells with simultaneous use of negative quadrupolar dielectrophoresis and electrorotation," *The Analyst*, vol. 138, no. 5, p. 1529, 2013.

[40] J. Yang, Y. Huang, X. Wang, X. B. Wang, F. F. Becker, and P. R. Gascoyne, "Dielectric properties of human leukocyte subpopulations determined by electrorotation as a cell separation criterion.," *Biophys. J.*, vol. 76, no. 6, pp. 3307–3314, Jun. 1999.

[41] X.-B. Wang, Y. Huang, P. R. C. Gascoyne, F. F. Becker, R. Hölzel, and R. Pethig, "Changes in Friend murine erythroleukaemia cell membranes during induced differentiation determined by electrorotation," *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr.*, vol. 1193, no. 2, pp. 330–344, Aug. 1994.

[42] W. M. Arnold and U. Zimmermann, "Rotating-Field-Induced Rotation and Measurement of the Membrane Capacitance of Single Mesophyll Cells of Avena sativa," *Z. Für Naturforschung C*, vol. 37, no. 10, pp. 908–915, 1982.

[43] G. D. Gasperis, X. Wang, J. Yang, F. F. Becker, and P. R. C. Gascoyne, "Automated electrorotation: dielectric characterization of living cells by real-time motion estimation," *Meas. Sci. Technol.*, vol. 9, no. 3, p. 518, 1998.

[44] H. A. Pohl, "The Motion and Precipitation of Suspensoids in Divergent Electric Fields," *J. Appl. Phys.*, vol. 22, no. 7, pp. 869–871, Jul. 1951.

[45] R. Pethig, "Dielectrophoresis: An assessment of its potential to aid the research and practice of drug discovery and delivery," *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, no. 11–12, pp. 1589–1599, Nov. 2013.

[46] K. Park, S. Kabiri, and S. Sonkusale, “Design of electrodes and circuits for cell trapping on CMOS,” in *2015 IEEE Biomedical Circuits and Systems Conference (BioCAS)*, 2015, pp. 1–4.

[47] K. Tatsumi, K. Kawano, H. Okui, H. Shintani, and K. Nakabe, “Analysis and measurement of dielectrophoretic manipulation of particles and lymphocytes using rail-type electrodes,” *Med. Eng. Phys.*, vol. 38, no. 1, pp. 24–32, Jan. 2016.

[48] F. Yang *et al.*, “Dielectrophoretic separation of colorectal cancer cells,” *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 1, p. 013204, Jan. 2010.

[49] Y. Song, A. Sonnenberg, Y. Heaney, and M. J. Heller, “Device for dielectrophoretic separation and collection of nanoparticles and DNA under high conductance conditions,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 36, no. 9–10, pp. 1107–1114, May 2015.

[50] T. Braschler, N. Demierre, E. Nascimento, T. Silva, A. G. Oliva, and P. Renaud, “Continuous separation of cells by balanced dielectrophoretic forces at multiple frequencies,” *Lab Chip*, vol. 8, no. 2, pp. 280–286, 2008.

[51] G. Mernier, N. Piacentini, R. Tornay, N. Buffi, and P. Renaud, “Cell viability assessment by flow cytometry using yeast as cell model,” *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 154, no. 2, pp. 160–163, Jun. 2011.

[52] Y. Kang and D. Li, “Electrokinetic Motion of Cells and Nonpolarizable Particles,” in *Encyclopedia of Microfluidics and Nanofluidics*, D. Li, Ed. Boston, MA: Springer US, 2011, pp. 1–3.

[53] R. Pethig, A. Menachery, S. Pells, and P. De Sousa, “Dielectrophoresis: A Review of Applications for Stem Cell Research,” *BioMed Res. Int.*, vol. 2010, p. e182581, May 2010.

[54] B. Çetin and D. Li, “Dielectrophoresis in microfluidics technology,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 32, no. 18, pp. 2410–2427, Sep. 2011.

[55] S. Dash and S. Mohanty, “Dielectrophoretic separation of micron and submicron particles: A review,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 35, no. 18, pp. 2656–2672, Sep. 2014.

[56] C. Zhang, K. Khoshmanesh, A. Mitchell, and K. Kalantar-zadeh, “Dielectrophoresis for manipulation of micro/nano particles in microfluidic systems,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 396, no. 1, pp. 401–420, Jan. 2010.

[57] K. Khoshmanesh, S. Nahavandi, S. Baratchi, A. Mitchell, and K. Kalantar-zadeh, “Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, no. 5, pp. 1800–1814, Jan. 2011.

[58] M. Li, W. H. Li, J. Zhang, G. Alici, and W. Wen, “A review of microfabrication techniques and dielectrophoretic microdevices for particle manipulation and separation,” *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 47, no. 6, p. 063001, Feb. 2014.

[59] S. van den Driesche, V. Rao, D. Puchberger-Enengl, W. Witarski, and M. J. Vellekoop, “Continuous cell from cell separation by traveling wave dielectrophoresis,” *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 170, pp. 207–214, Jul. 2012.

[60] U. Lei *et al.*, “A travelling wave dielectrophoretic pump for blood delivery,” *Lab. Chip*, vol. 9, no. 10, pp. 1349–1356, May 2009.

[61] M. Camarda, S. Scalese, and A. La Magna, “Analysis of the role of the particle–wall interaction on the separation efficiencies of field flow fractionation dielectrophoretic devices,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 36, no. 13, pp. 1396–1404, Jul. 2015.

[62] P. R. C. Gascoyne, S. Shim, J. Noshari, F. F. Becker, and K. Stemke-Hale, “Correlations between the dielectric properties and exterior morphology of cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 34, no. 7, pp. 1042–1050, Apr. 2013.

[63] J. Čemažar and T. Kotnik, “Dielectrophoretic field-flow fractionation of electroporated cells,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 33, no. 18, pp. 2867–2874, Sep. 2012.

[64] J. Vykoukal, D. M. Vykoukal, S. Freyberg, E. U. Alt, and P. R. C. Gascoyne, “Enrichment of putative stem cells from adipose tissue using dielectrophoretic field-flow fractionation,” *Lab. Chip*, vol. 8, no. 8, pp. 1386–1393, Jul. 2008.

[65] elizeos, “Cours ifsi - Biologie fondamentale - préambule,” *Infirmiers.com*, 13-Jun-2012. [Online]. Available: http://www.infirmiers.com/etudiants-en-ifsi/cours/cours-ifsi-biologie-fondamentale-preambule.html. [Accessed: 03-Jun-2017].

[66] elizeos, “Tout savoir sur la structure des cellules et leurs modes de communication,” *Infirmiers.com*, 14-Oct-2016. [Online]. Available: http://www.infirmiers.com/etudiants-en-ifsi/cours/cours-ifsi-biologie-fondamentale-la-cellule-partie-1.html. [Accessed: 29-May-2017].

[67] L. Salomé, P.-F. Lenne, and N. Destainville, “Membrane_biologique_ImPhys2006.pdf.” [Online]. Available: http://www.fresnel.fr/mosaic/publications/pdf_files/Membrane_biologique_ImPhys2006.pdf. [Accessed: 29-May-2017].

[68] “Membrane (biologie),” *Wikipédia*. 14-Mar-2017.

[69] R. Höber, “Eine Methode, die elektrische Leitfähigkeit im Innern von Zellen zu messen,” *Pflüg. Arch. Für Gesammte Physiol. Menschen Tiere*, vol. 133, no. 4–6, pp. 237–253, Jul. 1910.

[70] R. Höber, “Messungen der inneren Leitfähigkeit von Zellen: III. Mitteilung,” *Pflüg. Arch. Für Gesamte Physiol. Menschen Tiere*, vol. 150, no. 1–2, pp. 15–45, Feb. 1913.

[71] R. Pethig and I. Schmueser, “Marking 100 years since Rudolf Höber’s discovery of the insulating envelope surrounding cells and of the beta-dispersion exhibited by tissue,” *J. Electr. Bioimpedance*, vol. 3, no. 1, Nov. 2012.

[72] H. Fricke, “THE ELECTRIC CAPACITY OF SUSPENSIONS WITH SPECIAL REFERENCE TO BLOOD,” *J. Gen. Physiol.*, vol. 9, no. 2, pp. 137–152, Nov. 1925.

[73] T. Sun and H. Morgan, “Single-cell microfluidic impedance cytometry: a review,” *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 8, no. 4, pp. 423–443, Apr. 2010.

[74] S. Chin, M. P. Hughes, H. M. Coley, and F. H. Labeed, “Rapid assessment of early biophysical changes in K562 cells during apoptosis determined using dielectrophoresis,” *Int. J. Nanomedicine*, vol. 1, no. 3, pp. 333–337, Sep. 2006.

[75] L. A. Flanagan *et al.*, “Unique Dielectric Properties Distinguish Stem Cells and Their Differentiated Progeny,” *Stem Cells*, vol. 26, no. 3, pp. 656–665, Mar. 2008.

[76] T.-C. Chao and A. Ros, “Microfluidic single-cell analysis of intracellular compounds,” *J. R. Soc. Interface*, vol. 5, no. Suppl_2, pp. S139–S150, Oct. 2008.

[77] K. Asami, Y. Takahashi, and S. Takashima, “Dielectric properties of mouse lymphocytes and erythrocytes,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Cell Res.*, vol. 1010, no. 1, pp. 49–55, Jan. 1989.

[78] Y. Huang, R. Holzel, R. Pethig, and X.-B. Wang, “Differences in the AC electrodynamics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 37, no. 7, p. 1499, 1992.

[79] R. Pethig and G. H. Markx, “Applications of dielectrophoresis in biotechnology,” *Trends Biotechnol.*, vol. 15, no. 10, pp. 426–432, Oct. 1997.

[80] A. Catenaccio, Y. Daruich, and C. Magallanes, “Temperature dependence of the permittivity of water,” *Chem. Phys. Lett.*, vol. 367, no. 5, pp. 669–671, Jan. 2003.

[81] X. Wang, F. F. Becker, and P. R. C. Gascoyne, “Membrane dielectric changes indicate induced apoptosis in HL-60 cells more sensitively than surface phosphatidylserine expression or DNA fragmentation,” *Biochim. Biophys. Acta*, vol. 1564, no. 2, pp. 412–420, Aug. 2002.

[82] R. Pethig *et al.*, “Dielectrophoretic studies of the activation of human T lymphocytes using a newly developed cell profiling system,” *Electrophoresis*, vol. 23, no. 13, pp. 2057–2063, Jul. 2002.

[83] R. Pethig and M. S. Talary, “Dielectrophoretic detection of membrane morphology changes in Jurkat T-cells undergoing etoposide-induced apoptosis,” *IET Nanobiotechnol.*, vol. 1, no. 1, pp. 2–9, Feb. 2007.

[84] L. M. Broche, F. H. Labeed, and M. P. Hughes, “Extraction of dielectric properties of multiple populations from dielectrophoretic collection spectrum data,” *Phys. Med. Biol.*, vol. 50, no. 10, p. 2267, 2005.

[85] H. Hadady, C. Montiel, D. Wetta, and E. J. Geiger, “Liposomes as a model for the study of high frequency dielectrophoresis,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 36, no. 13, pp. 1423–1428, Jul. 2015.

[86] E. Salimi, K. Braasch, M. Butler, D. J. Thomson, and G. E. Bridges, “Dielectric model for Chinese hamster ovary cells obtained by dielectrophoresis cytometry,” *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 1, p. 014111, Jan. 2016.

[87] S. Afshar, E. Salimi, K. Braasch, M. Butler, D. J. Thomson, and G. E. Bridges, “Multi-Frequency DEP Cytometer Employing a Microwave Sensor for Dielectric Analysis of Single Cells,” *IEEE Trans. Microw. Theory Tech.*, vol. 64, no. 3, pp. 991–998, Mar. 2016.

[88] C. Chung, M. Waterfall, S. Pells, and A. Menachery, “Dielectrophoretic Characterisation of Mammalian Cells above 100 MHz,” *J. Electr. Bioimpedance*, vol. 2, no. 1, pp. 64–71, Sep. 2011.

[89] H. Hadady, J. J. Wong, S. R. Hiibel, D. Redelman, and E. J. Geiger, “High frequency dielectrophoretic response of microalgae over time,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 35, no. 24, pp. 3533–3540, Dec. 2014.

[90] S. Afshar, E. Salimi, K. Braasch, M. Butler, D. Thomson, and G. Bridges, “In-flow dielectric characterization of single biological cells using a wideband DEP cytometer,” in *2016 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS)*, 2016, pp. 1–4.

[91] N. G. Green, H. Morgan, and J. J. Milner, “Manipulation and trapping of sub-micron bioparticles using dielectrophoresis,” *J. Biochem. Biophys. Methods*, vol. 35, no. 2, pp. 89–102, Sep. 1997.

[92] M. P. Hughes, H. Morgan, F. J. Rixon, J. P. H. Burt, and R. Pethig, “Manipulation of herpes simplex virus type 1 by dielectrophoresis,” *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 1425, no. 1, pp. 119–126, Sep. 1998.

[93] I. Doh and Y.-H. Cho, “A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process,” *Sens. Actuators Phys.*, vol. 121, no. 1, pp. 59–65, May 2005.

[94] H. Li and R. Bashir, “Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of Listeria on microfabricated devices with interdigitated electrodes,” *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 86, no. 2, pp. 215–221, Sep. 2002.

[95] H. J. Mulhall, F. H. Labeed, B. Kazmi, D. E. Costea, M. P. Hughes, and M. P. Lewis, “Cancer, pre-cancer and normal oral cells distinguished by dielectrophoresis,” *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 401, no. 8, pp. 2455–2463, Nov. 2011.

[96] A. Salmanzadeh, M. B. Sano, R. C. Gallo-Villanueva, P. C. Roberts, E. M. Schmelz, and R. V. Davalos, “Investigating dielectric properties of different stages of syngeneic murine ovarian cancer cells,” *Biomicrofluidics*, vol. 7, no. 1, p. 011809, Jan. 2013.

[97] M. G. Simon *et al.*, “Increasing label-free stem cell sorting capacity to reach transplantation-scale throughput,” *Biomicrofluidics*, vol. 8, no. 6, p. 064106, Nov. 2014.

[98] H. Song *et al.*, “Continuous-flow sorting of stem cells and differentiation products based on dielectrophoresis,” *Lab Chip*, vol. 15, no. 5, pp. 1320–1328, 2015.

[99] G. A. Ferrier, S. F. Romanuik, D. J. Thomson, G. E. Bridges, and M. R. Freeman, “A microwave interferometric system for simultaneous actuation and detection of single biological cells,” *Lab. Chip*, vol. 9, no. 23, p. 3406, 2009.

[100] Z. Gagnon, J. Gordon, S. Sengupta, and H.-C. Chang, “Bovine red blood cell starvation age discrimination through a glutaraldehyde-amplified dielectrophoretic approach with buffer selection and membrane cross-linking,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 29, no. 11, pp. 2272–2279, Jun. 2008.

[101] M. Castellarnau, A. Errachid, C. Madrid, A. Juárez, and J. Samitier, “Dielectrophoresis as a Tool to Characterize and Differentiate Isogenic Mutants of Escherichia coli,” *Biophys. J.*, vol. 91, no. 10, pp. 3937–3945, Nov. 2006.

[102] H. Hadady, D. Redelman, S. R. Hiibel, and E. J. Geiger, “Continuous-flow sorting of microalgae cells based on lipid content by high frequency dielectrophoresis,” *Biophys. 2016 Vol 3 Pages 398-414*, Aug. 2016.

[103] A. R. Schor and C. R. Buie, “Dielectrophoretic sorting of lipid-containing microorganisms using high frequency electric fields produced by conducting post arrays,” in *2015 Transducers - 2015 18th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS)*, 2015, pp. 1617–1620.

[104] M. A. Miled and M. Sawan, “A new CMOS/microfluidic interface for cells manipulation and separation in LoC devices,” in *2nd Asia Symposium on Quality Electronic Design (ASQED)*, 2010, pp. 194–197.

[105] M. A. Miled and M. Sawan, “Dielectrophoresis-Based Integrated Lab-on-Chip for Nano and Micro-Particles Manipulation and Capacitive Detection,” *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 6, no. 2, pp. 120–132, Apr. 2012.

[106] G. M. Whitesides, “The origins and the future of microfluidics,” *Nature*, vol. 442, no. 7101, pp. 368–373, Jul. 2006.

[107] Y. Demircan, E. Özgür, and H. Külah, “Dielectrophoresis: Applications and future outlook in point of care,” *ELECTROPHORESIS*, vol. 34, no. 7, pp. 1008–1027, Apr. 2013.

[108] L. Rozitsky, A. Fine, D. Dado, S. Nussbaum-Ben-Shaul, S. Levenberg, and G. Yossifon, “Quantifying continuous-flow dielectrophoretic trapping of cells and micro-particles on micro-electrode array,” *Biomed. Microdevices*, vol. 15, no. 5, pp. 859–865, Oct. 2013.

[109] T. Zhou, Y. Ming, S. F. Perry, and S. Tatic-Lucic, “Estimation of the physical properties of neurons and glial cells using dielectrophoresis crossover frequency,” *J. Biol. Phys.*, vol. 42, no. 4, pp. 571–586, Oct. 2016.

[110] “Logiciel de Simulation Multiphysique - Plateforme pour la Modélisation de Phénomènes Physiques.” [Online]. Available: https://www.comsol.fr/comsol-multiphysics. [Accessed: 16-Jul-2017].

[111] H.-Y. Wang, A. K. Bhunia, and C. Lu, “A microfluidic flow-through device for high throughput electrical lysis of bacterial cells based on continuous dc voltage,” *Biosens. Bioelectron.*, vol. 22, no. 5, pp. 582–588, Dec. 2006.

[112] “IHP - Start.” [Online]. Available: https://www.ihp-microelectronics.com/en/start.html. [Accessed: 23-Oct-2017].

[113] T. M. Squires and S. R. Quake, “Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale,” *Rev. Mod. Phys.*, vol. 77, no. 3, pp. 977–1026, Oct. 2005.

[114] “1.4 Flow regimes - SWEP.” [Online]. Available: https://www.swep.net/refrigerant-handbook/1.-basic-heat-transfer/as4/. [Accessed: 26-Aug-2017].

[115] A. Ajdari, “Steady flows in networks of microfluidic channels: building on the analogy with electrical circuits,” *Comptes Rendus Phys.*, vol. 5, no. 5, pp. 539–546, Jun. 2004.

[116] “Microfluidic Resistance Defintion,” *Fluigent*. [Online]. Available: https://www.fluigent.com/expertises/microfluidic-resistance/. [Accessed: 19-Aug-2017].

[117] G. M. Whitesides and A. D. Stroock, “Flexible Methods for Microfluidics,” *Phys. Today*, vol. 54, no. 6, pp. 42–48, Jun. 2001.

[118] N. G. Green and H. Morgan, “Dielectrophoretic investigations of sub-micrometre latex spheres,” *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 30, no. 18, p. 2626, 1997.

[119] I. Ermolina and H. Morgan, “The electrokinetic properties of latex particles: comparison of electrophoresis and dielectrophoresis,” *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 285, no. 1, pp. 419–428, May 2005.

[120] D. L. Trainer *et al.*, “Biological characterization and oncogene expression in human colorectal carcinoma cell lines,” *Int. J. Cancer*, vol. 41, no. 2, pp. 287–296, Feb. 1988.

[121] “Prévisions pour l’étape 4 Cancer du côlon | Docteur.” .

[122] L. Y. Zhang *et al.*, “Discrimination of colorectal cancer cell lines using microwave biosensors,” *Sens. Actuators Phys.*, vol. 216, pp. 405–416, Sep. 2014.

[123] “Comprendre le cycle cellulaire et le rôle du matériel génétique (ADN),” *Infirmiers.com*, 21-Oct-2016. [Online]. Available: http://www.infirmiers.com/etudiants-en-ifsi/cours/cours-ifsi-biologie-fondamentale-la-cellule-partie-2.html. [Accessed: 05-Apr-2018].

[124] Futura, “Cycle cellulaire : prolifération des cellules saines,” *Futura*. [Online]. Available: https://www.futura-sciences.com/sante/dossiers/medecine-cancer-mecanismes-biologiques-1453/page/6/. [Accessed: 05-Apr-2018].

[125] N. Demierre, T. Braschler, R. Muller, and P. Renaud, “Focusing and continuous separation of cells in a microfluidic device using lateral dielectrophoresis,” *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 132, no. 2, pp. 388–396, Jun. 2008.

Caractérisation diélectrique de cellules biologiques par diélectrophorèse haute fréquence

Résumé : Les travaux présentés dans ce manuscrit de thèse concernent le développement d'une méthode de caractérisation électrique de cellules biologiques, sans marquage, basée sur la diélectrophorèse Ultra Haute Fréquence (DEP-UHF). Sous l'action d'un champ électrique alternatif non uniforme, les cellules biologiques sont soumises à des forces de déplacement essentiellement liées à leurs propriétés diélectriques. En particulier, aux hautes fréquences, le champ électrique pénètre à l'intérieur de la cellule et interagit donc avec son contenu intracellulaire. Il est donc possible d'accéder à une «signature diélectrophorétique» de la cellule représentative de ses propriétés biologiques internes mais aussi de mécanismes physiologiques tels que l'apoptose ou encore la différenciation. Ce manuscrit présente le développement d'un microsystème innovant, implémenté à partir des couches passives d'une puce BiCMOS et couplé à un réseau microfluidique, pour la caractérisation, à l'échelle cellulaire, par DEP-UHF. Le microsystème développé permet une analyse fine et précise du comportement DEP haute fréquence d'une cellule. Un banc expérimental dédié aux caractérisations cellulaires, capable de générer des signaux hautes fréquences dans la gamme 10 MHz – 1 GHz pour des amplitudes allant jusqu'à 18 V_{pp}, a été développé. Ces travaux exploratoires ont pour but de démontrer le potentiel de discrimination de cette méthode entre différentes lignées cellulaires cancéreuses humaines à des stades tumoraux différents, dans l'objectif de développer de nouveaux outils d'aide au diagnostic. L'existence de différences significatives entre les signatures de certains types cellulaires ouvre des perspectives très intéressantes notamment pour le développement d'outils de tri cellulaire originaux basés uniquement sur les propriétés diélectriques intracellulaires.

Mots-clés : diélectrophorèse haute fréquence, microsystèmes BiCMOS microfluidique, caractérisation de cellules biologiques, propriétés intracellulaires, signature diélectrophorétique haute fréquence.

Dielectric characterization of biological cells using high frequency dielectrophoresis

Abstract : The work presented in this dissertation concerns the development of an original label-free electrical characterization method dedicated to biological cells based on Ultra High Frequency dielectrophoresis (DEP-UHF). Under the action of a non-uniform alternative electric field, the biological cells are subjected to displacement forces related to their own dielectric properties. In particular, at high frequencies, the electric field penetrates inside the cell and thus interacts with its intracellular content. Therefore, it is possible to access to a «dielectrophoretic signature» of the cell that it is representative of its internal biological properties but also of physiological mechanisms such as apoptosis or differentiation. This dissertation presents the development of an innovative microsystem, implemented in the passive layer stack of a BiCMOS chip and associated with microfluidic, dedicated to biological characterization, at the cellular level. The developed microsystem allows an accurate analysis of a single cell DEP-UHF behaviour. An experimental bench, dedicated to cell characterization, and able to generate high frequency signals from 10 MHz to 1 GHz up to 18 V_{pp} magnitude, has been also developed accordingly. Actually, the led exploratory work achieved was focused on evaluating the discrimination potential of this method between different human cancer cells at different tumor stages with the objective to envision new kind of diagnostic tools. Finally, the existence of significant differences between the signatures of different cell types leads to very interesting perspectives, particularly for the development of new cell sorting tools based especially on the intracellular dielectric properties.

Keywords : high frequency dielectrophoresis, microfluidic BiCMOS microsystems, biological cells characterization, intracellular properties, high frequency dielectrophoretic signature.

