



HAL
open science

PIEGEAGE ET MANIPULATION D'OBJETS BIOLOGIQUES PAR GUIDES D'ONDES OPTIQUES

Guillaume Colas

► **To cite this version:**

Guillaume Colas. PIEGEAGE ET MANIPULATION D'OBJETS BIOLOGIQUES PAR GUIDES D'ONDES OPTIQUES. Ingénierie biomédicale. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2006. Français. NNT: . tel-00125091

HAL Id: tel-00125091

<https://theses.hal.science/tel-00125091v1>

Submitted on 17 Jan 2007

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Sciences, Technologie, Médecine

N° attribué par la bibliothèque

--	--	--	--	--	--	--	--	--	--

THESE

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE JOSEPH FOURIER

Spécialité : *Biotechnologie, Santé, et Management*

préparée au CEA-Grenoble/Direction des Sciences du Vivant

Département Réponse et Dynamique Cellulaire, Laboratoire Biopuces

17, rue des martyrs 38054 Grenoble Cedex 9

dans le cadre de l'Ecole Doctorale Ingénierie pour la Santé, la Cognition et l'Environnement

présentée et soutenue publiquement

par

Guillaume COLAS

le 25 Octobre 2006

**PIÉGEAGE ET MANIPULATION
D'OBJETS BIOLOGIQUES PAR
GUIDES D'ONDES OPTIQUES**

JURY

Pr. Marc Block	Président du Jury
Pr. Franz Bruckert	Rapporteur
Pr. Yong Chen	Rapporteur
Pr. René Paul Salathé	Examineur
Dr. Alexandra Fuchs	Directeur de thèse

Remerciements

Cette section est dédiée aux personnes qui m'ont accompagné, aidé et soutenu pendant tout le temps qu'a duré cette thèse. Vous avez, tous à votre façon, contribué à faire de cette expérience un moment inoubliable pour moi.

Je tiens tout d'abord à exprimer toute ma reconnaissance à Alexandra Fuchs et François Chatelain pour leur encadrement, leurs nombreux conseils et leur soutien constant tout au long de ma thèse. Je les remercie pour la confiance qu'il m'ont témoigné en m'offrant la possibilité de travailler sur ce sujet pluridisciplinaire tellement passionnant. Qu'ils trouvent ici l'expression de ma sincère gratitude.

Marc Block m'a fait l'honneur d'accepter d'être président de mon jury de thèse et je tiens à le remercier pour le vif intérêt qu'il a manifesté pour mes travaux.

Je remercie également Yong Chen d'avoir été disponible pour participer à mon jury de thèse. Pour cela, ainsi que pour ses précieux commentaires sur mon mémoire, je lui exprime ma profonde gratitude.

Je tiens à remercier également Franz Bruckert d'avoir accepté d'être rapporteur de ma thèse, ainsi que pour ses jugements très pertinents sur mon manuscrit, tant sur le fond que sur la forme.

Que René-Paul Salathe trouve également dans ces quelques mots la reconnaissance de son investissement dans l'examen de mes travaux. Son expertise et sa curiosité m'ont permis d'avoir de passionnantes mais trop courtes discussions.

Je remercie enfin Philippe Renaud pour la simplicité de ses contacts avec moi, les encouragements qu'il m'a témoigné lors de ma participation au congrès NanoBio Europe 2006 et pour m'avoir orienté vers son collègue M. Salathe.

Les résultats présentés dans ma thèse sont évidemment le fruit d'un travail d'équipe et je voudrais notamment adresser mes remerciements à Stéphanie Gaugiran qui a participé à l'obtention de certains résultats présentés dans cette thèse. Je voulais également sincèrement saluer Stéphane Gétin du DOpt au CEA Grenoble. Il a su se montrer présent pour me dispenser de précieux conseils d'optique et des encouragements bienvenus dans les moments difficiles.

J'exprime ma gratitude à toutes celles et ceux sans qui cette thèse ne serait pas ce qu'elle est. Mes plus sincères remerciements vont donc à tous les chercheurs et membres du laboratoire Biopuces qui ont fait de ces années bien plus qu'un simple travail. En effet, j'ai eu véritablement la chance de pouvoir côtoyer des personnes qui m'ont démontré que les mots "collègues" et "amis"

ne sont pas forcément antinomiques. Je leur suis donc très reconnaissant pour leur amitié, les discussions que j'ai eu la chance d'avoir avec eux, leurs suggestions et leurs contributions pendant ces longues années de thèse.

En premier lieu, j'aimerais remercier Delphine Freida pour son soutien constant, ses conseils techniques, ses coups de main précieux dans les dernières manips et son haut degré d'expertise dans l'organisation d'évènements festifs ;-)

Je remercie également Patricia Lecluyse pour son travail essentiel et sa disponibilité sans lesquelles la vie quotidienne des chercheurs du labo serait un enfer administratif. Je n'en serais sans doute pas où j'en suis actuellement sans ses précieux coups de main.

Je veux également remercier Béatrice Schaack pour sa gentillesse et le fait de m'avoir permis de prolonger mon séjour au laboratoire en faisant appel à mes compétences informatiques.

Enfin, je tiens à remercier vivement Vincent Haguët pour son investissement dans la relecture de mon rapport de thèse et pour avoir atteint l'Excellence de l'Excellence dans sa correction. Ses compétences véritablement supra humaines en la matière sont certainement intervenues pour une bonne part dans la clarté finale du manuscrit ;-)

Je voudrais également témoigner tout particulièrement ma profonde sympathie à Maxim Balakirev et Olga Burchak pour avoir été toujours disponibles pour me conseiller et m'aider ou tout simplement pour discuter (toujours dans la bonne humeur) autour d'une tasse de thé. Je remercie encore Stéphanie Combe et Violaine Chapuis pour m'avoir entouré de leur gentillesse et prodigué leurs conseils lorsque j'en ai eu besoin. Merci également à toi, Fred Kermarec pour ta sympathie, tes discussions et pour avoir montré à la marmotte comment mettre les bons cônes dans le papier alu ;-)

Je remercie également Brigitte Fouqué, Patricia Obeid, Stéphanie Porte et Lamya Ghenim pour leur (très) sympathique soutien durant toutes ces années. Je suis aussi redevable et très reconnaissant envers Nathalie Picollet-d'Hahan pour ses avis pertinents et sa bonne humeur.

Je tiens également à saluer François Chatelain, mon directeur de laboratoire, ainsi que tous les chefs de projet au labo pour la qualité du recrutement des permanents, stagiaires et doctorants. Chers amis thésards, je ne vais pas parler ici de vos qualités scientifiques, vous les avez déjà démontrées ou vous le ferez bientôt. Considérez simplement ces quelques mots comme un témoignage du plaisir que j'ai eu à travailler à vos côtés.

Ainsi, je tiens à remercier mes compagnons de galère, et notamment Julien Reboud, pour sa gentillesse, et ses avis souvent pertinents sur des sujets évoqués au labo et en dehors. Je remercie également Thomas Sordel pour sa simplicité et ses qualités humaines dont il a su témoigner au

cours de ces années. Je voudrais également remercier Laurent Mugerli pour sa complicité et son humour torturé *-et néanmoins haut de gamme-* qui m'ont tellement apporté et qui vont très certainement me manquer. Raphaël Dupont, toujours serviable et de bonne humeur mérite également toute ma gratitude.

J'adresse aussi mille mercis à tous les sympathiques stagiaires qui se sont succédés au laboratoire et en particulier Mélanie Abonnenc, Maud Vernaz-Gris, Laurent Loiseleux, Nicolas Roy, et Marc Gielen. Je suis également redevable à Sylvain Fouliard pour ses doctes conseils sur la programmation \LaTeX . J'ai eu le plaisir de passer de très bons moments à vos côtés au laboratoire et en dehors. Je salue également toutes les personnes venues grossir les rangs du labo pendant ces 4 années.

Je tiens également à remercier mon Ecole Doctorale, l'EDISCE et à souligner le travail admirable de Caroline Dos-Santos. Les tâches administratives sont souvent contraignantes et Caroline fait de gros efforts pour que les étudiants puissent travailler dans de bonnes conditions. Merci à toi, Caroline.

Je tiens à saluer et remercier d'autres amis qui comptent également beaucoup pour moi : Cyril et Cécile, John, Lilian et Lise, Christophe. Je salue également tous mes amis musiciens sur Annecy ou Grenoble et en particulier mes compères actuels Micha, Nico et Cyril. Je remercie également Olivier pour les excellents moments passés en sa présence. J'en profite enfin pour saluer mon ami Alex pour son talent et sa gentillesse et Jo pour ses encouragements qui m'ont beaucoup touché.

A ceux qui ne croient pas en l'amitié, je réponds que c'est parce qu'ils ne connaissent pas mes amis.

Je n'oublie pas de remercier Sophie, ma (très) chère correctrice à qui j'ai infligé la punition de s'abîmer les yeux à corriger un manuscrit traitant d'un sujet terriblement barbare. Merci sincèrement à toi pour ton aide.

J'aimerais également saluer et remercier ma famille et notamment mes parents et grands-parents pour leur soutien. Merci également à toi, Aurélien, pour m'avoir permis de décompresser et d'évacuer mon stress à travers tes diverses interventions.

Je remercie également chaleureusement ma belle-famille pour sa patience et sa compréhension.

Enfin, si la thèse de doctorat demeure un long processus pour le thésard, cela reste également difficile et ardu pour les personnes qui vivent quotidiennement cette lourde tâche. C'est pourquoi

je tiens à remercier particulièrement Monique pour son amour, ses encouragements, sa confiance et sa patience, particulièrement dans les derniers mois de cette aventure.

Table des matières

Introduction	9
1 Historique et état de l'art	11
1.1 Histoire et actions des forces optiques	11
1.1.1 Comment la lumière agit sur la matière	13
1.1.1.1 Concepts de base en piégeage optique ou <i>lumière sur le photon</i> .	13
1.1.1.2 Fonctionnement d'une pince optique	15
1.1.2 Intensité des forces optiques	16
1.2 L'utilisation des techniques de piégeage optique en biologie et leur évolution . . .	17
1.2.1 Le piégeage optique en biologie	17
1.2.1.1 Manipulation de cellules	17
1.2.1.2 Manipuler des objets biologiques et mesurer des picoforces . . .	18
1.2.2 L'évolution des pinces optiques	23
1.2.2.1 Du piège unique aux pièges multiples	24
1.2.2.2 Utilisation de modes laser particuliers	25
1.2.2.3 Utilisation d'ondes évanescentes	29
1.2.3 Conclusion	31
1.3 Systèmes de manipulation ou de tri utilisés en biotechnologie	32
1.3.1 Des semiconducteurs aux microsystèmes pour la biologie	32
1.3.2 La cytométrie en flux et les systèmes fluidiques	34
1.3.3 Systèmes mécaniques de tri et de piégeage	36
1.3.4 Systèmes électriques de tri et de piégeage	37
1.3.5 Systèmes de manipulation magnétique	41
1.3.6 Manipulation par piégeage acoustique	42
1.3.7 Systèmes optiques	43

1.4	Conclusion et objectifs	46
2	Dispositif et méthodes employées	49
2.1	Banc de manipulation optique	49
2.1.1	Rappel du principe	49
2.1.2	Conditions requises	50
2.1.3	Description du banc de manipulation optique	51
2.1.3.1	Vue d'ensemble	51
2.1.3.2	Préparation du faisceau laser	52
2.1.3.3	L'injection de lumière.	53
2.1.3.4	Visualisation	55
2.1.3.5	Contrôle de la lumière en sortie de guide.	56
2.2	Echantillons de guides d'ondes	56
2.2.1	Des technologies différentes.	56
2.2.1.1	Guides réalisés par échange d'ions potassium.	57
2.2.1.2	Guides réalisés par échange d'ions argent	59
2.2.1.3	Guides réalisés par dépôt de nitrure de silicium	60
2.2.1.4	Conclusion	63
2.3	La chambre d'observation et de manipulation	64
2.3.1	Présentation	64
2.3.2	Choix du matériau de construction	66
2.3.2.1	Un matériau intéressant : le poly(diméthylsiloxane)	67
2.3.3	Différents procédés de fabrication	68
2.3.4	Démarche et étapes de réalisation	70
2.4	Les particules	74
2.5	Les cellules	75
2.5.1	Globules rouges	75
2.5.2	Cellules Jurkat	75
2.5.2.1	Marquage cellulaire de cellules Jurkat	75
2.5.3	Levures	78
2.5.4	Bactéries	78
2.5.4.1	<i>Rhodobacter capsulatus</i>	78
2.5.4.2	Population isolée à partir de pollen.	79

2.6	Passivation de la surface du guide d'onde	80
2.7	Mise en place d'une expérience	83
2.8	Méthode de calcul des vitesses de déplacement des objets en surface du guide	84
2.9	Détermination de la viabilité cellulaire	85
2.9.1	Cellules Jurkat	85
2.9.2	Levures	87
2.10	Détermination de la prolifération cellulaire	89
3	Déplacement optique de particules et de cellules	91
3.1	Guides réalisés par échange d'ions potassium	92
3.1.1	Particules d'or	92
3.1.2	Puissance injectée dans le guide	94
3.1.3	Particules de verre	95
3.1.4	Particules de latex	96
3.1.5	Phénomènes thermiques	97
3.1.5.1	Le mouvement brownien	98
3.1.5.2	Les forces radiométriques	98
3.1.5.3	La convection	99
3.1.5.4	Conclusion sur le déplacement de billes sur des guides potassium	101
3.1.6	Déplacement de cellules sur des guides potassium	102
3.1.6.1	Nouveaux défis et nouvelles contraintes	102
3.1.7	Conclusion	111
3.2	Guides réalisés par échange d'ions argent	111
3.2.1	Résultats de déplacement de particules	112
3.2.2	Conclusion	112
3.3	Guides réalisés par dépôt de nitrure de silicium	113
3.3.1	Caractéristiques des guides utilisés	113
3.3.1.1	Rupture de la propagation lumineuse dans les guides nitrure	113
3.3.2	Particules d'or	114
3.3.3	Particules de verre	116
3.3.4	Particules de latex	117
3.3.5	Déplacement de billes sur des structures complexes	118
3.3.5.1	Utilisation de motifs courbes	118

3.3.5.2	Utilisation de motifs en Y	119
3.3.5.3	Conclusion	120
3.3.6	Conclusion sur le déplacement de billes sur des guides en nitrure de silicium	120
3.3.7	Déplacement de matériel biologique sur des guides en nitrure de silicium .	121
3.3.7.1	Des cellules et des particules	121
3.3.7.2	Déplacement de cellules non marquées	126
3.3.7.3	Illustration des forces de gradient	129
3.3.7.4	Déplacement de cellules sur des guides courbes	131
3.3.7.5	Tri optique d'une population d'intérêt dans un mélange	131
3.3.8	Mise en évidence de phénomènes particuliers	135
3.3.8.1	Autres paramètres influençant la vitesse de déplacement	135
3.3.8.2	Illustration du caractère multimode des guides utilisés	135
3.3.8.3	Illustration du découplage lumineux	136
3.3.8.4	Mise en évidence d'un déplacement préférentiel d'une population dans un mélange	138
3.3.9	Conclusion générale sur le déplacement de billes et de cellules sur des guides en nitrure de silicium	138
3.4	Conclusion du chapitre	140
	Conclusion	141
	Liste des communications et brevets	145
4	Article publié dans la revue <i>Optics Express</i>	147

Introduction

La manipulation optique de particules par la pression de radiation d'un laser focalisé est un champ de recherche en pleine expansion. Ce domaine est particulièrement vaste puisqu'il s'étend de la physique des atomes, où cette technique inventée par Arthur Ashkin fut utilisée pour le refroidissement des atomes par laser, à la biologie où cet outil a permis aux chercheurs d'étudier des moteurs moléculaires et de manipuler des cellules.

Depuis la publication de ces travaux pionniers, ces pinces optiques sont devenues un véritable outil de recherche. Très utiles, voire même quasiment indispensables dans certains domaines de la biologie et de la physique, elles sont véritablement passées du statut de la curiosité scientifique à celui de l'outil indiscutable.

Les domaines nouveaux ouverts par cette technique, ont d'ailleurs incité le monde industriel à s'engouffrer dans la brèche et à proposer des stations de travail fonctionnant sur ce principe. Et les ingénieux dispositifs utilisés lors de la naissance de cette technique en 1986 sont aujourd'hui avantageusement remplacés par des appareils véritablement conçus pour la micromanipulation optique.

La raison de l'expansion rapide de cette technique réside dans le fait qu'elle répond au besoin de l'étude d'objets de taille micrométrique et inférieure. L'absence d'outils permettant de manipuler ces objets a longtemps été un frein à leur étude. Les pinces optiques occupent donc une niche scientifique auparavant inexistante.

Parallèlement à l'expansion rapide des pinces optiques durant la dernière décade, le concept des Systèmes de Micro Analyse Totale (MicroTAS) ou Lab-On-Chip a fait son apparition. Les principales méthodes d'analyse utilisées dans les laboratoires, dont les pinces optiques, furent miniaturisées pour aboutir à des micro-dispositifs dédiés au déplacement, à l'organisation et au tri de particules et notamment d'objets biologiques comme des cellules.

Force est de constater que peu de ces outils reposent sur des technologies optiques. Pourtant, l'introduction de l'optique pourrait s'avérer particulièrement pertinente tant il est vrai qu'elle apporte des fonctionnalités nouvelles et intéressantes.

Je vous propose d'abord d'établir un tour d'horizon des différents acteurs et technologies concurrentes dans le domaine des dispositifs de tri et de micromanipulation de particules. Une analyse des technologies présentes permettra d'identifier des éventuels « vides technologiques » qu'un nouveau dispositif basé sur des concepts optiques serait susceptible de combler.

Le chapitre 1 établira donc à cet effet un panorama des techniques de manipulation et de tri de particules, notamment en biologie. Une emphase particulière sera mise sur la technologie des guides d'ondes optiques dont l'optimisation pourrait satisfaire des attentes et des exigences particulières de ce secteur. Ceci permettra de fournir des éléments de réponse concernant la pertinence de l'utilisation de composants optiques dans de tels systèmes.

Le chapitre 2 décrira le dispositif expérimental dédié à la manipulation de particules mis en place ainsi que les techniques utilisées pour toutes les étapes en amont des tests de déplacement cellulaire.

Dans le chapitre 3, nous présenterons les résultats expérimentaux des techniques mises en oeuvre. Ce chapitre tentera notamment d'évaluer la possibilité de transférer le savoir-faire acquis sur des particules à des objets biologiques. A partir de ces résultats expérimentaux, nous conclurons sur les possibilités d'intégration d'une telle technique dans un microdispositif.

Chapitre 1

Historique et état de l'art

Le principe fondamental sur lequel repose les expériences présentées dans cette thèse est l'action de la lumière sur la matière. C'est pourquoi le lecteur trouvera dans ce chapitre un aperçu des étapes importantes de l'histoire de l'étude des forces optiques.

Je démontrerai ensuite la pertinence des techniques de piégeage optique *-et des guides d'ondes en particulier-* dans le domaine de la biologie en les comparant aux méthodes actuelles de tri de particules et de cellules.

Enfin, je terminerai par une présentation de la façon dont mon travail s'insère dans le domaine des microsystèmes biologiques et sur la motivation et les enjeux de cette thèse.

1.1 Histoire et actions des forces optiques

En 1619, Kepler avança l'idée selon laquelle la lumière solaire exerce une action mécanique sur la matière. D'après ses travaux, les rayons solaires auraient un effet sur l'orientation de la queue des comètes. Cette pression exercée sur une surface exposée à un rayonnement électromagnétique, aurait pour effet, selon lui, de donner au nuage de particules composant la queue des comètes une orientation opposée au soleil. Dans sa théorie sur l'électromagnétisme de 1873, James Clerk Maxwell démontra de façon théorique que la lumière pouvait exercer une force appelée *pression de radiation* (cf 1.1.1.1), mais ceci ne fut démontré expérimentalement qu'au début du siècle suivant.

En 1873, Crookes [1] développa un appareil destiné à observer l'effet de la force de pression lumineuse (cf. figure1.1). Ce dispositif est constitué d'une ampoule de verre dans laquelle est réalisé un vide *non-parfait*, et d'un croisillon monté sur un axe. Le croisillon est composé d'ailettes en mica, dont l'une des faces reste naturelle et réfléchissante tandis que l'autre est noircie au sulfure de thallium et devient donc absorbante. La face réfléchissante devait, selon Crookes, être poussée par la lumière. Mais en réalité, ce ne sont pas les faces blanches (les plus réfléchissantes)

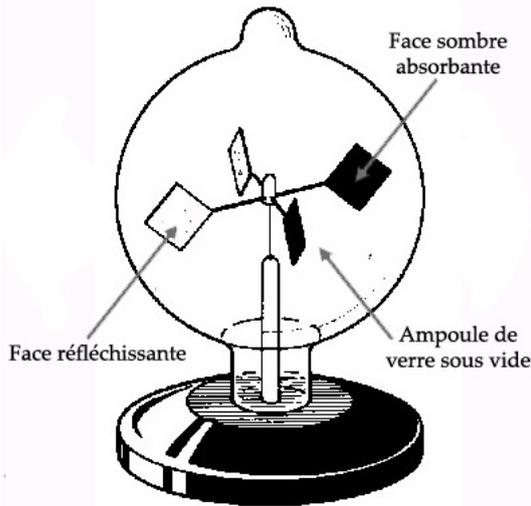


FIG. 1.1 – Schéma du radiomètre de Crookes. *L'échauffement préférentiel des faces absorbantes des pales du moulin, se traduit par un différentiel de quantité de mouvement des molécules d'air raréfié se désorbant en faveur des faces noires absorbantes. Cette quantité de mouvement devant être conservée, les faces sombres reculent, par réaction, et les ailes du moulin tournent.*

qui sont repoussées, mais bel et bien les faces sombres. L'explication généralement admise est la suivante : la lumière solaire (ou celle d'une lampe) chauffe les faces des pales du moulin. Les molécules de gaz résiduel s'adsorbent puis se désorbent en permanence sur les deux faces des pales. Mais les faces sombres des pales se retrouvent à une température plus élevée que celle des faces claires.

Ces faces noires étant plus chaudes que les blanches, les molécules d'air raréfié se désorbant des faces noires repartent (en moyenne) avec une quantité de mouvement supérieure à celle des molécules quittant les faces claires. La conservation de la quantité de mouvement implique alors que les faces sombres reculent, par réaction. Crookes, qui voulait démontrer l'existence de la pression de radiation venait en fait de mettre en évidence les forces radiatives grâce à son dispositif qui permet de transformer l'énergie radiante en énergie mécanique.

L'intensité de ces forces radiatives est telle que ces dernières ont pendant longtemps contrarié l'observation de la pression de radiation. La force radiative résultante est en effet plus importante que la force de pression de radiation dans un rapport d'environ 10^6 .

Il faudra attendre le début du XXe siècle, avec les expériences quasi simultanées de Pyotr Lebedev [2] en Russie puis Ernest Nichols et Gordon Hull [3] aux Etats-Unis pour mettre en évidence de façon claire les forces de pression lumineuses sur des corps macroscopiques. La faiblesse de ces forces a longtemps rendu difficile leur étude et leur exploitation.

L'invention du laser dans les années 1960 permit à Arthur Ashkin en 1970, de démontrer pour la première fois expérimentalement la pression de radiation ainsi que l'existence d'une force dite *force de gradient* sur le mouvement de petites particules de l'ordre du micron [4]. Les incroyables densités de puissance délivrées par les lasers, ont permis de se libérer de la contrainte des effets

radiatifs. Ces travaux démontrèrent qu'il était possible de piéger et faire léviter des particules de différents matériaux et différentes tailles [5].

L'aspect le plus frappant dans cet historique est la simultanéité de la réalisation du piégeage d'atomes dans des mélasses optiques [6] et de la démonstration du piégeage de billes de verre micrométriques dans un faisceau laser unique (pince optique ou « optical tweezers » en anglais) [7].

Les expériences menées par Ashkin et Chu [6] ont démontré notamment la manipulation optique d'atomes et de molécules, pour lesquels la pression de radiation peut devenir très importante à cause des grandes sections efficaces d'absorption au voisinage de résonances spécifiques. L'amélioration continue des techniques de refroidissement et de piégeage a permis d'augmenter la densité dans l'espace des atomes piégés jusqu'à atteindre la condensation de Bose-Einstein. La réalisation expérimentale de ce piégeage et l'évolution des techniques de refroidissement a d'ailleurs été saluée par l'attribution du Prix Nobel de Physique en 2001. Ces aspects de la pression de radiation dépassent de très loin le cadre de cette thèse et c'est pourquoi je renvoie le lecteur désireux d'en savoir plus à des articles de référence [8], [9], [10]. Mais cette expérience, considérée au départ comme une preuve de principe du piégeage d'atomes, voire comme une expérience-jeu selon ses auteurs, allait vite devenir un moyen particulièrement efficace de manipulation et d'étude d'objets micrométriques, notamment d'origine biologique.

L'expérience la plus marquante est certainement celle conduite par A. Ashkin et J. M. Dziedzic en 1987 [11] qui démontre la possibilité de piéger dans une pince optique des objets biologiques tels que des virus et des bactéries sans les détruire.

1.1.1 Comment la lumière agit sur la matière

1.1.1.1 Concepts de base en piégeage optique ou *lumière sur le photon*

La nature de la lumière a longtemps été un mystère. Elle ne s'est pleinement révélée qu'aux XIXe et XXe siècles. Depuis le XVIIe siècle, la communauté scientifique se disputait pour déterminer si la lumière est une onde (école représentée par Christiaan Huygens, Augustin Fresnel ou Thomas Young) ou si elle est faite de particules (école représentée par Isaac Newton).

La naissance de la physique quantique au début du XXe siècle est apparue comme une révolution radicale dans les concepts sur lesquels la description de la Nature était fondée jusqu'alors. Les notions qu'elle introduisit étant si souvent difficilement transposables à la vie courante, certaines de ses prédictions ont heurté violemment le sens commun. Parmi ces concepts figure notamment celui de la dualité onde-particule : la notion d'onde et de particule qui sont

séparées en mécanique classique deviennent deux facettes d'un même phénomène, décrit de manière mathématique par sa fonction d'onde. En particulier, l'expérience démontre que la lumière est composée de particules (photons, mis en évidence par l'effet photoélectrique) mais qu'elle peut également se comporter comme une onde (rayonnement produisant des interférences) selon le contexte expérimental. La révolution conceptuelle apportée par la physique quantique lors de sa naissance, obligea les physiciens à représenter les objets physiques et notamment les photons sous un angle nouveau.

La physique des quantas nous apprend ainsi que la lumière est constituée de photons d'énergie $E = h\nu$ et de quantité de mouvement (ou impulsion) $p = h\nu/c$, où h est la constante de Planck, c la vitesse de la lumière dans le vide et ν la fréquence de l'onde.

Comme Ashkin l'a montré il y a 30 ans, la lumière exerce sur de petites particules une force permettant d'agir mécaniquement sur celles-ci. Ces photons peuvent en effet transférer une partie de leur impulsion à la matière. Ce transfert d'impulsion engendre notamment des forces capables de déplacer des objets.

On peut classer ces forces en deux catégories :

- la force due à la pression de radiation, fig1.2 (a) et (b),
- la force due au gradient du champ fig1.2 (c).

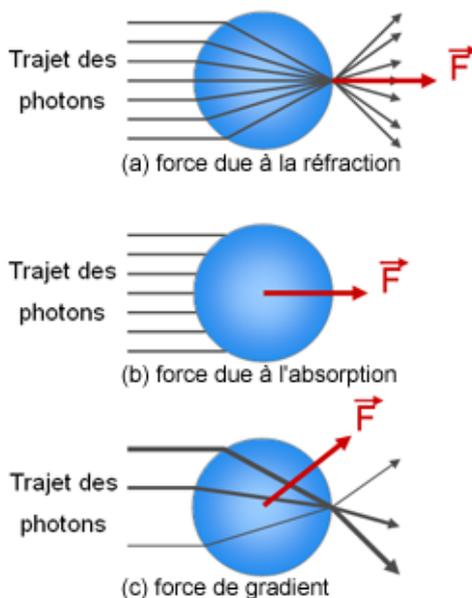


FIG. 1.2 – **Illustration des forces exercées sur une particule.**

L'épaisseur des traits représente le niveau d'intensité lumineuse. Soumise à un éclairage uniforme (intensité lumineuse homogène dans l'espace), la particule, subira après réfraction une variation de quantité de mouvement orientée selon la direction de propagation de la lumière (a). Une absorption des photons dans les mêmes conditions d'éclairage poussera également la particule selon la direction de propagation de la lumière (b). Si l'éclairage est non uniforme, la force totale pourra, selon la nature de la bille, la pousser vers les régions de l'espace où l'intensité est la plus forte (c) ou l'éjecter vers les régions où le champ est le plus faible.

La force due à la pression de radiation, ou force de diffusion est orientée selon la direction

de propagation de la lumière. Elle est liée à la réfraction ou l'absorption d'un faisceau lumineux uniforme par un objet. Dans le cas de la réfraction, les photons atteignant uniformément la particule transmettent, une fois réfractés, une quantité de mouvement orientée selon la direction de propagation du champ lumineux (cf. figure fig1.2 (a)). Le mécanisme est quasiment identique pour les photons absorbés qui, dans le même cas d'un éclairage uniforme, transmettent une impulsion également orientée dans le sens de propagation de la lumière (fig1.2 (b)).

La force de gradient, quant à elle, intervient lorsque la particule n'est pas éclairée de façon uniforme, comme dans le cas d'un faisceau gaussien, par exemple. La force totale résultant de l'interaction des photons avec cette dernière sera orientée différemment et pourra, selon la nature de la bille (particule métallique ou diélectrique), la pousser vers les régions de l'espace où l'intensité est la plus forte (cas des pinces optiques utilisant un faisceau gaussien fig1.2 (c)) ou l'éjecter vers les régions où le champ est le plus faible (cas d'une particule qui n'absorbe pas les photons mais qui les réfléchit).

Cette décomposition des effets mécaniques entre pression de radiation et force de gradient est couramment utilisée depuis qu'Ashkin a clarifié leurs définitions [12].

1.1.1.2 Fonctionnement d'une pince optique

Principe d'une pince optique

La

figure 1.3 présente le schéma de principe général d'une pince optique. Un faisceau laser gaussien est fortement focalisé grâce à un objectif de microscope de grande ouverture numérique (O.N.) en un spot de taille limitée par la diffraction. Le gradient d'intensité du faisceau incident attire les microparticules en direction du point focal, au contraire de la pression de radiation qui tend à les repousser. Dans des conditions précises, où la force de gradient domine, une particule peut être piégée efficacement dans les trois dimensions au niveau du point focal.

Comme le montre plus précisément la figure 1.4, l'éclairage d'une particule d'indice optique supérieur à celui du milieu environnant par un faisceau gaussien fortement focalisé a pour effet d'attirer et piéger efficacement la particule vers le centre du faisceau. Le piégeage de la particule est assuré si l'on considère la réfraction de deux faisceaux lumineux excentrés (figure 1.4 [14]). La conservation de la quantité de mouvement du système "*lumière + particule*" impose une force de rappel vers l'axe du faisceau laser là où le champ est le plus intense.

Ce piégeage est assez important pour contrer l'effet de la gravité et réaliser une *lévitation optique* comme dans l'expérience historique d'Ashkin dans laquelle l'auteur parvient à faire

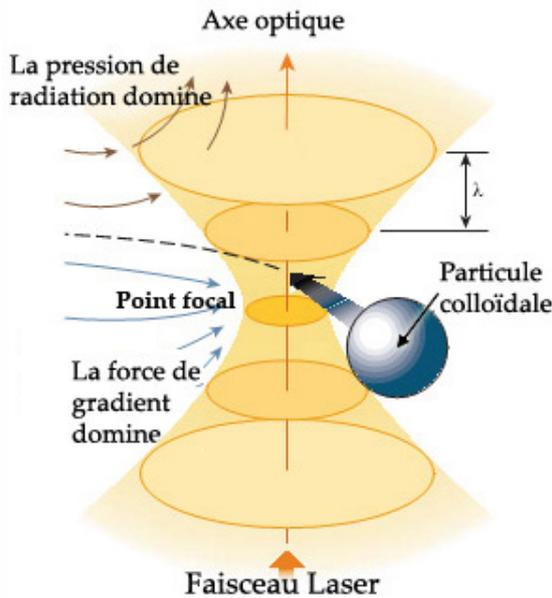


FIG. 1.3 – **Schéma de principe d'une pince optique.** Les pinces optiques utilisent un faisceau laser fortement focalisé pour piéger des objets. Le gradient d'intensité du faisceau convergent attire les petits objets, comme des particules colloïdales, vers le point focal, alors que la pression de radiation tend à les expulser. Dans des conditions où la force de gradient domine (au voisinage du point focal), une particule peut être piégée en trois dimensions au niveau du point focal [13].

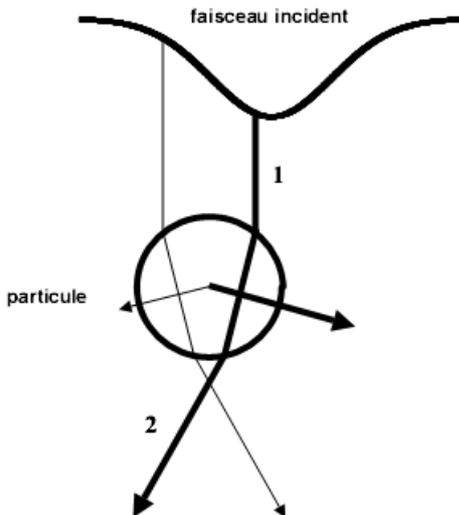


FIG. 1.4 – **Représentation de la force de gradient dans une pince optique.** Le faisceau lumineux incident est de distribution d'intensité gaussienne et l'épaisseur relative des deux rayons représentés symbolise leur intensité. Les rayons sont réfractés par la particule et induisent par réaction des forces agissant sur celle-ci. La résultante des forces tend à ramener la particule dans l'axe du faisceau laser, vers la zone d'intensité maximale.

l'éviter des microparticules en contrant la gravité par la pression de radiation [5]. L'utilisation d'un faisceau très focalisé augmente l'importance des forces de gradient et permet de piéger efficacement les particules dans les trois dimensions de l'espace, au niveau du point focal laser. Le déplacement de particules est alors réalisé par déplacement du faisceau focalisé.

1.1.2 Intensité des forces optiques

Ashkin a montré que les forces utilisées dans un dispositif de pinces optiques étaient suffisantes pour piéger efficacement des microparticules [7]. Plusieurs travaux ont estimé les valeurs des forces optiques. Elles sont de l'ordre de la centaine de picoNewton ([15], [16]). A première vue, cela peut paraître extrêmement faible. Mais c'est bien plus important que la force de gravité

s'appliquant sur ces particules qui est de l'ordre de $1 \cdot 10^{-14}$ Newton. Ce qui signifie concrètement que les forces optiques sont très supérieures à la gravité. De plus, ces forces augmentent de façon spectaculaire avec la taille et l'indice de réfraction de la particule considérée.

Pour résumer, les pinces optiques peuvent piéger des objets très petits (jusqu'à 5nm [16], [17]) et exercer des forces de plus de 100 pN [18], [19], [20], avec des résolutions en taille très inférieures au micron [21], [22], [23] et une résolution de l'ordre de 0,1 pN sur les forces appliquées [24]. Ce sont des caractéristiques particulièrement adaptées pour exercer des forces sur des systèmes biologiques et macromoléculaires et mesurer leur réponse.

1.2 L'utilisation des techniques de piégeage optique en biologie et leur évolution

Moins de vingt ans après leur création, les pinces optiques sont passées du statut de la curiosité scientifique à celui de l'outil performant. Elles ont notamment été utilisées dans des études de la résistance mécanique de membranes cellulaires ou pour le tri de particules. Mais les applications biologiques et médicales de cet outil ont connu un développement exponentiel bien trop vaste pour être énuméré ici. Je renvoie donc aux articles de revue [9], [25], [26], [27] où de larges parts sont consacrées aux applications biologiques, ainsi qu'à des articles de revue plus spécialisés [28], [29], [30]. Je vais maintenant insister sur la manipulation de cellules et la mesures de forces infinitésimales, objet de la prochaine section.

1.2.1 Le piégeage optique en biologie

L'utilisation des pinces optiques a permis de "nano-manipuler" un objet parmi d'autres, sans contact, pour trier, déplacer dans l'espace et organiser des particules et des cellules. Mais ce formidable outil a également été utilisé pour mesurer des déplacements nanométriques et des forces de l'ordre de quelques picoNewtons exercées par un moteur moléculaire unique, comme la myosine ou la kinésine [31]. D'une façon générale, l'intérêt suscité par les pinces optiques est lié à la possibilité de les utiliser soit en tant qu'outil de manipulation, déplacement ou tri sans contact physique entre l'outil et l'objet déplacé, soit en tant qu'outil de mesure ou de caractérisation d'une macromolécule, d'un objet biologique ou d'un tissu.

1.2.1.1 Manipulation de cellules

Dans l'effervescence qui suivit la création des pinces optiques et la recherche d'applications intéressantes pour cet outil, les pinces optiques ont été utilisées dans des expériences simples

de manipulation d'objets biologiques [11]. Mais passer de la physique à la biologie n'est pas si aisé et ces premières expériences mirent en évidence un paramètre particulièrement important : la longueur d'onde du laser utilisé. Le laser argon employé avait une longueur d'onde de $\lambda = 514 \text{ nm}$. Il s'avéra certes performant mais dangereux pour les objets piégés dans son faisceau. C'est pourquoi les expériences suivantes eurent recours à une lumière laser infrarouge ($\lambda = 1 \mu\text{m}$)[32]. Le choix d'une telle longueur d'onde, comprise entre 950 et 1064 nm, permet de minimiser l'absorption lumineuse par la préparation biologique et donc de limiter les risques de détériorations thermiques ou photochimiques. Cette contrainte étant intégrée, l'espoir d'utiliser des pinces optiques pour capturer, sélectionner et déplacer de nombreux types cellulaires ou organismes unicellulaires comme des bactéries, des virus, des spermatozoïdes, des globules rouges ou même des cellules rétiniennes en culture devint une possibilité concrète.

En effet, les pinces optiques ont été utilisées pour la sélection et la mise en contact de cellules photosensibles avec des cellules neuronales dans le but d'étudier le développement des contacts intercellulaires et la régénération de synapses entre ces deux types cellulaires [33]. La manipulation optique de cellules mobiles comme les spermatozoïdes pour la mesure de leurs forces de propulsion flagellaire et d'échappement au piège optique a été proposé comme un outil diagnostique de certaines stérilités [34]. L'emploi combiné de pinces optiques et de ciseaux optiques (une forme de pinces optiques permettant de découper des tissus [35], [36]) pour sélectionner, déplacer et injecter un spermatozoïde directement dans l'ovule a également été réalisé [37].

1.2.1.2 Manipuler des objets biologiques et mesurer des picoforces

Le microscope à force photonique : une nouvelle sonde de forces.

L'incroyable progrès réalisé durant les deux dernières décennies dans le domaine de la compréhension de la machinerie cellulaire est en grande partie dû au développement d'un certain nombre de technologies permettant d'observer le comportement de molécules individuelles. Parmi ces techniques on peut citer la microscopie en champ proche, la polarisation de fluorescence de molécule unique [38] et les pinces optiques.

La grande résolution qu'il est possible d'atteindre sur des mesures par pinces optiques (de l'ordre de 0,1 pN sur la force mesurée[24]), a conduit au développement du microscope à force photonique (Photonic Force Microscope ou PFM), un nouveau type de microscope à balayage [24], [18]. Dans ce système, une bille de latex fluorescente de quelques centaines de nanomètres tenue par une pince optique, est utilisée pour sonder la surface d'un objet (cf fig. 1.5). Une excitation lumineuse adaptée permet de suivre les fluctuations de la bille selon l'axe optique. Des

images d'échantillons sont obtenues en déplaçant latéralement la bille piégée tout en enregistrant l'intensité de fluorescence induite. La résolution latérale est déterminée par le diamètre de la bille et la résolution axiale peut atteindre 40 nm [39]. Le microscope à force photonique présente l'avantage, par rapport aux techniques traditionnelles de microscopie en champ proche (AFM¹ ou SNOM²), de ne pas nécessiter l'intrusion de partie mécanique dans le milieu. Cela le rend ainsi particulièrement adapté à l'étude de l'intérieur de cellules vivantes, tant que celles-ci sont transparentes au laser.

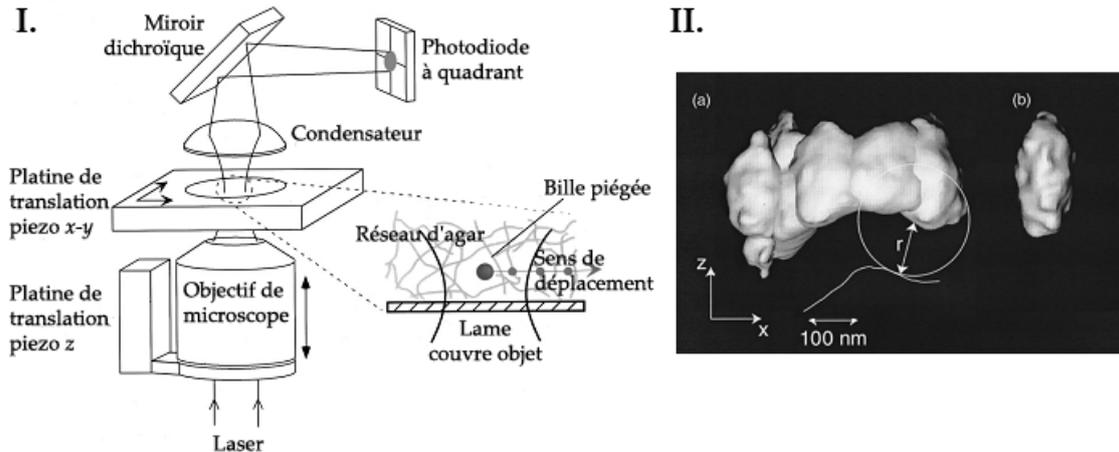


FIG. 1.5 – **Principe de la microscopie à force photonique** I) Schéma de principe du dispositif simplifié. II) Représentation tridimensionnelle du volume sondé par une bille piégée dans une pince optique dans un réseau d'agar (a) ou en solution (b). Dans le premier cas, le piège est déplacé latéralement par pas successifs de 80 nm. La surface de l'objet étudié est modélisée en prenant en compte le rayon de la particule (cercle blanc). Dans le cas de la bille en solution, on retrouve la forme caractéristique du puits de potentiel exploré par la bille en mouvement Brownien.

La sonde d'un AFM consiste en un cantilever, une pointe rigide (tip) et un substrat. En ingénierie, le terme anglais cantilever désigne une poutre en porte-à-faux. Elle est fixée au substrat solide inséré dans le système d'attache du scanner. La pointe rigide se situe à l'extrémité libre de la poutre. La plupart des cantilevers sont de forme triangulaires ou rectangulaires avec une orientation horizontale par rapport au substrat. Ces poutres ont des constantes de raideur comprises entre 0,01 et 100 N/m et peuvent permettre de détecter des forces de l'ordre de 10^{-11} N. Ghislain *et al.* [24] ont montré que l'utilisation d'un piège optique, de constante de raideur comprise entre 10^{-4} et 10^{-5} N/m (cas d'une sphère de 2 microns piégée dans un faisceau

¹ AFM pour *Atomic Force Microscopy*, le microscope à force atomique permet de visualiser la topologie et les propriétés physico-chimiques d'une surface à partir des interactions entre l'échantillon et l'extrémité d'une pointe montée sur un microlevier.

² SNOM pour *Scanning Near-field Optical Microscopy*, ce type de microscope est fondé sur l'emploi d'une sonde nanométrique servant de source de lumière et permet d'analyser les propriétés optiques d'une surface.

de 150mW) permet d'atteindre des mesures de forces aussi faibles que 10^{-13} N. Cette force est également de 2 ordres de grandeur plus faible que celle des pointes utilisées dans les microscopes à force atomique. La constante de raideur est un paramètre critique et doit en théorie être la plus faible possible pour permettre la détection de forces de plus en plus faibles. La faible raideur du piège optique utilisé rend donc possible l'étude de matériaux biologiques très mous en milieu aqueux. Avec cette dernière application des pinces optiques, nous abordons leur utilisation comme senseurs de force en physique de la matière molle, sujet de la prochaine section.

Des billes piégées dans des pinces optiques permettent donc d'appliquer et de mesurer des forces de l'ordre du piconewton. C'est une capacité qui a été amplement utilisée pour l'étude des moteurs moléculaires en biophysique, ou pour déformer de l'ADN.

En effet, de nombreux moteurs moléculaires, parmi lesquels les kinésines et les myosines, se déplacent de façon linéaire par rapport à une protéine substrat (microtubules ou filaments d'actine). D'autres moteurs, comme ceux des flagelles d'*Escherichia coli* ou l'ATP synthase, sont responsables de mouvements de type rotatif. Tous transforment de l'énergie chimique (ATP ou gradient de protons) en énergie mécanique (production d'une force, d'un déplacement ou d'une rotation). Durant la dernière décennie, l'intégration des résultats de mécanique moléculaire, de génétique et d'études ultrastructurales a donné lieu à de remarquables progrès concernant la compréhension du fonctionnement des moteurs moléculaires. Et l'engouement pour les pinces optiques est en partie lié aux possibilités d'étude de la fonction des moteurs moléculaires en configuration de molécule unique [40], [41].

Ces études de moteurs moléculaires ont apporté des confirmations précises de mécanismes moléculaires qui étaient, pour certains, déjà déduits d'études macroscopiques. Et la possibilité d'exercer un contrôle précis de la particule prise dans le piège optique, fait de la pince optique un formidable outil de mesure.

La section suivante introduit quelques-unes des études portant sur différentes classes de moteurs moléculaires et dans lesquelles l'utilisation des forces lumineuses apportées par les pinces optiques a été particulièrement pertinente.

Exemples de mesures de piconewtons.

Les kinésines.

Les kinésines se lient et se déplacent le long de microtubules (voir la figure 1.6 (a)). Elles participent à des fonctions aussi vitales pour la cellule que le transport des vésicules et des

organites, l'organisation du faisceau mitotique ou la mobilité des chromosomes [42]. Ce sont des molécules dimériques, chaque monomère comprenant un domaine moteur (ou tête), avec un site de fixation de l'ATP et un site de fixation du microtubule, une longue hélice alpha et un domaine carboxy-terminal.

La manipulation par une pince optique et l'analyse des déplacements d'une bille fixée sur l'hélice alpha de la kinésine permettent de mesurer la force et le déplacement produits par une molécule de kinésine.

Le dispositif utilisé pour mesurer la force et le déplacement élémentaire (ou "pas") de la kinésine est schématisé sur la partie gauche de la figure 1.6. Une bille piégée dans un faisceau lumineux est recouverte de quelques molécules de kinésine et mise en contact avec un microtubule.

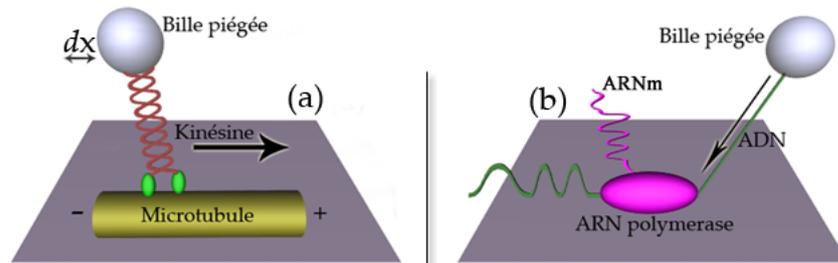


FIG. 1.6 – **Des pinces optiques pour l'étude des moteurs moléculaires.** La kinésine (a) et l'ARN polymérase (b) effectuent un grand nombre de déplacements élémentaires avant de se dissocier du substrat. Chaque déplacement élémentaire (ou pas) du moteur moléculaire (indiqué par dx) est transmis à la bille piégée dans la pince optique

La pince optique se comportant mécaniquement comme un ressort linéaire, le déplacement de la bille par rapport au centre du piège est proportionnel à la force produite par la molécule de kinésine. Une pince de faible rigidité (2.10^{-5} N/m) est utilisée lorsque l'on veut mesurer le déplacement élémentaire de la kinésine à charge nulle. La force maximale est mesurée en utilisant une pince optique plus rigide. Ce dispositif a permis à Block *et al.* de mesurer la force induite par le travail d'une molécule de kinésine unique. Cette équipe a également montré que le pas élémentaire de la kinésine est de 8 nm, ce qui correspond à la distance entre deux monomères successifs de tubuline [31]. Chaque kinésine exécute une centaine de pas élémentaires à une vitesse maximale proche de 800 nm/s avant de se détacher. La force maximale développée est de 5-7 pN. Chaque pas élémentaire est associé à l'hydrolyse d'un nucléotide NTP. On pense actuellement que les deux têtes de la molécule agissent de façon coordonnée, la fixation et l'hydrolyse de l'ATP sur l'une des têtes favorisant le départ de l'ADP de l'autre tête. Ainsi, le mouvement de

la kinésine sur le microtubule implique que l'une au moins des têtes de la molécule demeure attachée au microtubule.

L'ARN polymérase.

L'ARN polymérase II est un moteur moléculaire processif qui se fixe à l'ADN pour induire sa transcription en ARN messager [43]. Pour étudier le déplacement et la force de ce moteur, l'ARN polymérase, fixée à la surface d'une lamelle, est mise en contact avec un brin d'ADN à l'extrémité duquel est attachée une bille piégée par le faisceau laser (1.6(b)). L'ARN polymérase liée à la surface d'une lamelle induit la transcription de l'ADN (en vert) en ARN messager (en rose). L'énergie de chaque cycle d'interaction entre l'enzyme et son substrat est fournie par l'hydrolyse d'une molécule d'ATP. Au cours de la transcription, le déplacement du brin d'ADN par l'ARN polymérase II se traduit par le déplacement de la bille. La force maximale produite par le moteur est proche de 25 pN.

La myosine II, moteur musculaire.

La contraction musculaire est liée à l'interaction de la myosine musculaire, ou myosine II, avec un filament d'actine. La famille des myosines comprend par ailleurs 16 classes de myosine impliquées dans le transport de vésicules, la division cellulaire ou les mouvements cellulaires [44]. La myosine II et la kinésine présentent de nombreuses analogies de fonctionnement. Ces deux moteurs utilisent l'ATP comme source d'énergie chimique. Leur pas élémentaire résulte d'une modification conformationnelle minime d'une partie de la molécule amplifiée par un bras de levier. L'interaction avec leur substrat est caractérisée par un cycle complexe au cours duquel le moteur moléculaire est alternativement lié puis détaché [45], [46]. Cependant, contrairement à la kinésine conventionnelle, la myosine est détachée de l'actine pendant la plus grande partie de son cycle d'interaction : la myosine II n'est donc pas une enzyme processive.

Le déplacement du filament d'actine induit par la fixation de chaque molécule de myosine est équivalent au pas élémentaire de la myosine. Ces caractéristiques associées à la brièveté de la durée de l'interaction imposent un dispositif expérimental particulier comportant une double pince optique [47] (cf figure 1.7).

L'utilisation des pinces optiques a permis de comparer les propriétés des myosines de muscle lisse, squelettique ou cardiaque. Le déplacement élémentaire de ces différentes myosines varie de 4 à 10 nm en fonction de l'origine tissulaire de la myosine. De même, la force maximale

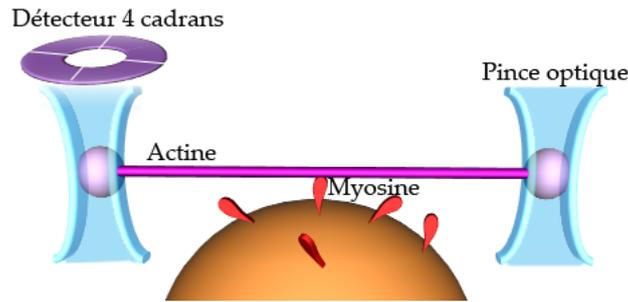


FIG. 1.7 – **Dispositif expérimental pour l'étude de la myosine.** Une bille est collée à chaque extrémité d'un filament d'actine. Le faisceau laser est envoyé alternativement sur chacune des deux billes, à fréquence suffisamment rapide, afin de créer une double pince optique. Une troisième bille de verre tapissée de quelques molécules de myosine est placée juste au-dessous du filament d'actine, de telle sorte que la myosine puisse se fixer sur l'actine. Lors de la bascule de la tête de la myosine, le déplacement et la force produits par la myosine sont transmis aux billes piégées et mesurés grâce à des détecteurs à 4 cadrans (photodiodes).

produite varie de 3 à 6 pN. Dans le muscle lisse, cependant, les durées du déplacement et de la force exercée par la molécule de myosine sur la pince optique sont d'environ un ordre de grandeur plus grand que dans le muscle squelettique, et une bascule supplémentaire de la tête de la myosine, contemporaine du départ de l'ADP, a été observée. Après la bascule, la fixation d'une molécule d'ATP sur la tête de la myosine induit le détachement du pont actine-myosine. L'interaction de la myosine musculaire avec l'actine est un phénomène rapide : l'analyse du déplacement des billes et de la force produite lors de l'interaction actine-myosine nécessite des systèmes rapides de détection (détecteurs à 4 quadrants basés sur un système de photo-diodes).

La caractérisation fonctionnelle des anomalies moléculaires de l'actine et de la myosine ouvre des perspectives pour la compréhension et le traitement des myopathies génétiques et acquises. Cette analyse moléculaire fonctionnelle a pour objectif principal de mieux comprendre la physiopathologie des myopathies et des cardiopathies.

1.2.2 L'évolution des pinces optiques

Le développement de ce nouvel outil permettant la manipulation de molécules d'intérêt biologique mais également de cellules a ouvert des voies de recherche nouvelles. Le besoin de manipuler des cellules individuelles s'est illustré dans des applications allant du développement de biocapteurs cellulaires, à la biologie cellulaire en cellule unique, en passant par la fertilisation in vitro assistée par laser. L'utilisation du piégeage optique s'est avéré être judicieux pour la manipulation cellulaire, car il permet de déplacer facilement des cellules uniques jusqu'à des points précis et la possibilité de réaliser ces expériences dans un environnement clos, stérile et

sans danger de contamination. Ainsi, le concept de pince optique a donné naissance à une grande variété de techniques et méthodes de piégeage optique, certaines basées sur des variétés nouvelles de faisceaux lasers, d'autres utilisant des composants optiques particuliers.

1.2.2.1 Du piège unique aux pièges multiples

Pince optique en configuration de piège unique

Les particules piégées par Ashkin et al. étaient en suspension dans de l'eau [7]. Dans l'expérience pionnière de lévitation optique [5], le piège réalisé est stable dans l'espace, mais ne fonctionne pas pour toutes les particules car la force de gradient est parfois insuffisante. La solution au problème passe par l'utilisation d'un objectif d'ouverture numérique plus importante qui focalise bien mieux le faisceau. De cette façon, la force de gradient devient très importante et le piège est bien plus efficace [7].

Omori et al. ont piégé des particules dans de l'éthanol et finalement réalisé en 1997 la première pince optique travaillant dans l'air [48]. La technique est maintenant suffisamment connue et popularisée pour être proposée comme travaux pratiques au niveau universitaire, il est aussi possible de la faire fonctionner dans des environnements mécaniquement bruités, puisque des pinces optiques ont été embarquées sur la Station Spatiale Internationale en 2005 [49].

Pièges optiques multiples

La manipulation simultanée de multiples particules piégées est l'un des buts recherchés par les utilisateurs de pinces optiques. En effet, pour des besoins de tri, par exemple, la simple pince optique n'est pas très adaptée. L'impossibilité de manipuler plusieurs objets en parallèle nuit à l'efficacité d'un tel dispositif.

Deux voies principales s'offrent donc aux expérimentateurs.

L'une des méthodes consiste à faire balayer par le faisceau laser des positions multiples suffisamment rapidement, de façon à créer en moyenne plusieurs pièges. La fréquence de répétition doit être adaptée à la taille des particules et à la viscosité du solvant pour être supérieure à la fréquence caractéristique du mouvement brownien. De faibles fréquences (13-50 Hz) ne permettent de piéger que de grosses particules dans des solvants assez visqueux. L'usage de miroirs piézoélectriques permet par contre d'atteindre des taux de répétition de l'ordre du kHz et de piéger ainsi de petites particules colloïdales ($1\mu\text{m}$ de diamètre) dans des suspensions peu visqueuses [50].

L'autre méthode pour obtenir des positions multiples de piégeage est l'utilisation de lasers

verticaux à émission de surface par cavité (VCSELs) avec lesquels Esener *et al.* démontrent le piégeage optique et la manipulation active de cellules et des microsphères [51], [52]. Ils ont expérimentalement vérifié que le mode laser de Laguerre-Gauss (cf. section 1.2.2.2) est efficace pour emprisonner optiquement des cellules biologiques. Un autre avantage des VCSELs est leur capacité à être utilisés en réseau. En utilisant un réseau de 2 fois 2 VCSELs, le transport simultané et indépendant de quatre globules rouges humains ($V=10\mu\text{m/s}$) a été obtenu et les auteurs indiquent que des réseaux bidimensionnels de VCSEL beaucoup plus grands peuvent être employés comme autant de pinces optiques individuelles. Cette possibilité de transport en parallèle est un avantage significatif pour les applications de tri et de déplacement cellulaire.

1.2.2.2 Utilisation de modes laser particuliers

Comme nous l'avons vu précédemment, les pinces optiques sont devenues un outil de recherche universel et ont été utilisées dans un grand nombre d'applications, comme la manipulation de cellules et de composants cellulaires, et la mesure de forces d'interaction. Récemment, de nombreux développements ont conduit à améliorer la flexibilité de ces micro-outils optiques. Une approche prometteuse consiste à utiliser des éléments diffractants [53]. La figure 1.8 présente le principe de la technique et un exemple de motif réalisé par piégeage simultané de particules [14]. Des réseaux holographiques diffractants générés par ordinateur [54] sont interposés sur le trajet du faisceau avant passage par l'objectif. Les pièges ainsi générés peuvent être utilisés pour fabriquer des arrangements micrométriques voire nanométriques de particules.

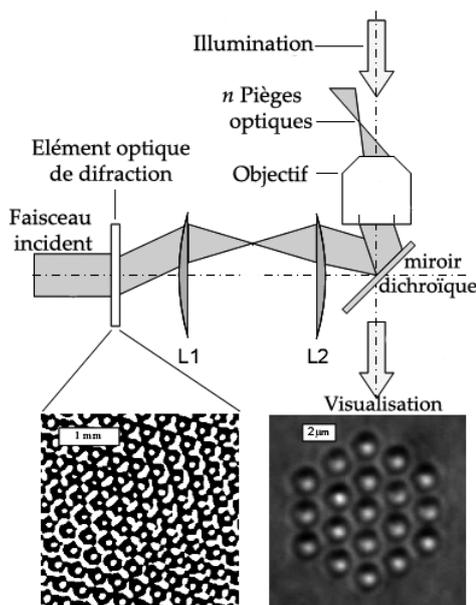


FIG. 1.8 – **Schéma d'une pince optique à hologramme.** Un faisceau laser collimaté arrivant par la gauche est mis en forme à l'aide d'un élément optique de diffraction, transféré vers l'arrière d'un objectif par des lentilles puis focalisé en un réseau de piégeage. En bas sur la gauche, le motif de phase généré par l'élément optique produit le réseau de pièges en bas à droite. Ce réseau est ainsi capable de piéger des particules de silice de $1\mu\text{m}$ dans un motif dicté par l'élément diffractant.

Une autre méthode consiste à contrôler les pinces optiques avec des modulateurs spatiaux

de lumière comme, par exemple, de petits écrans à cristaux liquide. Ils peuvent être utilisés pour moduler dans l'espace le front d'onde d'un faisceau laser avant qu'il n'entre dans le microscope. Des méthodes classiques d'optique diffractive permettent de produire des distributions d'intensité lumineuse particulières et intéressantes. Par exemple, il est ainsi possible de créer des pièges optiques de formes variées [13] [55] [56], des réseaux entiers de pièges orientables individuellement [57] [58] [59] [60]], ou des structures tridimensionnelles de piégeage [61] [62] [63]. Dans la plupart des cas de telles structures lumineuses peuvent être changées de façon dynamique et de ce fait permettent des micro-manipulations rapides [58]. Le contrôle de la distribution spatiale de la phase d'un front d'ondes permet également une transformation presque arbitraire des modes de rayon laser de l'un à l'autre. Les lasers utilisés pour les systèmes de pinces optiques émettent habituellement un mode gaussien (TEM_{00}), qui peut être mis en forme par un système optique diffractif en d'autres modes utiles pour des besoins particuliers.

Expérimentalement, les modes dits de *Laguerre-Gauss* sont créés par diffraction d'un rayon laser gaussien (en mode TEM_{00}) sur un profil de phase en hélice créé par un modulateur spatial de lumière (voir figure 1.9 (a)).

Ce mode a une forme d'hélice et se focalise non pas en un petit point mais en un anneau lumineux (figure 1.9 (b)). Cet anneau correspond à la zone où l'intensité lumineuse est la plus importante et permet le piégeage de microparticules sur cet anneau (figure 1.9 (c)).

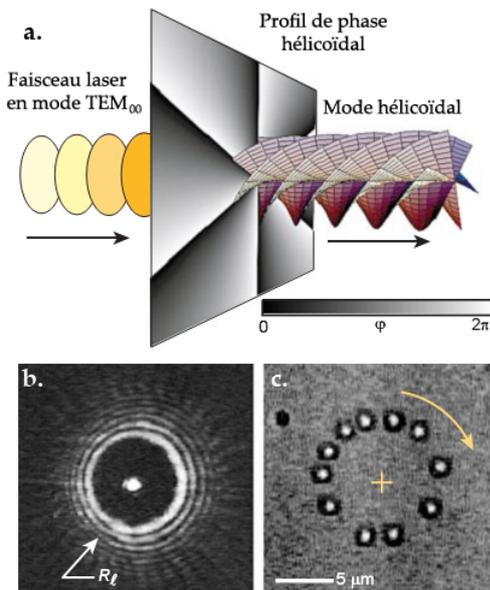


FIG. 1.9 – Des pinces optiques particulières, en mode Laguerre-Gauss.

(a) Un mode TEM_{00} rencontre un profil de phase hélicoïdal pour former un mode également hélicoïdal. (b) Contrairement aux pinces optiques classiques, ce faisceau se focalise non pas en un petit point mais en un anneau lumineux de diamètre réglable. (c) Ce mode rend possible le piégeage de petites particules sur le pourtour de l'anneau et le moment cinétique imposé par le faisceau permet leur rotation. Cette image montre 11 stades de rotation d'une particule de 800nm à 1/6 de seconde d'intervalle.

Ces faisceaux de Laguerre-Gauss se distinguent également par leur capacité à mettre en rotation les particules piégées. En effet, si la lumière peut échanger une quantité de mouvement avec la matière, on oublie souvent que des échanges de moment cinétique peuvent se produire.

Ces faisceaux de Laguerre-Gauss permettent donc de mettre en rotation les particules piégées (cf figure 1.9 c))[13].

Les modulations de phase des faisceaux de Laguerre-Gauss transforment les pinces optiques en micromanipulateurs transversaux à l'axe optique, mais les modulations radiales créent des dispositifs axiaux également intéressants. Une modification particulière crée un faisceau dit *de Bessel*, un faisceau particulier qui se propage sans se diffracter.

Ces faisceaux de Bessel présentent un intérêt pour le piégeage optique. Ce sont des faisceaux invariants au cours de leur propagation. Cette absence de divergence même lorsque le faisceau est très focalisé permet de guider avec précision des particules sur de relativement longues distances [64]. De plus, ces faisceaux sont insensibles aux perturbations du front d'onde engendrées par la présence d'objets et de surfaces, ce qui leur confère une très grande robustesse d'utilisation (cf. figure 1.10).

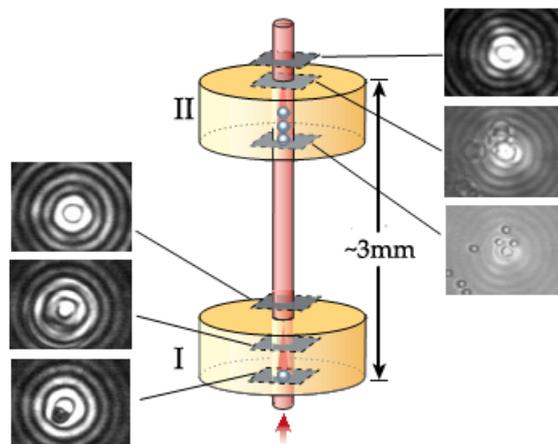


FIG. 1.10 – Un autre exemple de mode “exotique” de faisceau laser : le mode de Bessel. Le profil radial de phase crée un faisceau sans diffraction dit -de Bessel- qui se focalise en un long piège axial qui peut se prolonger sur des millimètres. Ici, le même faisceau est montré emprisonnant de multiples particules colloïdales dans deux chambres séparées par une distance de 3 millimètres. Les faisceaux de Bessel sont imperméables aux déformations parce que les fronts d'ondes sont reconstruits tandis qu'ils se propagent loin des perturbations. Sur l'image en bas à gauche, une sphère est emprisonnée entre la tache centrale et le premier anneau du faisceau de Bessel dans la chambre I. Un peu plus haut, le faisceau est distordu, mais encore un peu plus haut, il n'y a plus de distorsion, et le faisceau a retrouvé sa forme. Le processus est répété pour le même faisceau dans la chambre II, dans les plans du côté droit.

La combinaison de la robustesse des faisceaux de Bessel avec les modes de Laguerre Gauss pourraient conduire à des dispositifs optiques complexes capables d'appliquer des forces et des couples là où ces derniers se révéleraient nécessaires.

Ainsi l'utilisation de modes particuliers de lasers permet d'étendre le champ d'application

des pinces optiques en contrôlant le piégeage et la rotation de ces objets.

Machines optiques

Le paragraphe précédent a montré comment on pouvait utiliser les propriétés de faisceaux laser particuliers pour induire la rotation de particules. L'autre façon de procéder est de dissymétriser les particules elles-mêmes pour que la pression de radiation exerce un couple mécanique engendrant la rotation, comme pour des hélices.

Higurashi et al. ont ainsi démontré la rotation de particules autour de l'axe laser du piège ou perpendiculairement à celui-ci [65]. La figure 1.11 présente l'objet, son piégeage et sa mise en rotation perpendiculairement à l'axe du laser [14]. Le piégeage et la rotation de barreaux cylindriques ont aussi été prédits [66] et confirmés expérimentalement [67], [68], [69]. Les structures étoilées sont aussi de bonnes candidates pour la réalisation de roues et d'engrenages micrométriques activés par la lumière, et susceptibles d'être intégrés dans des dispositifs MOEMS (Micro Optical Electro Mechanical Systems) [70]. De telles structures sont produites de façon tout optique par polymérisation à deux photons dans des résines [71]. La figure 1.12 montre la forme de la structure polymérisée et son utilisation dans un engrenage [14]. Ces microrotors pourraient être utilisés pour induire des couples contrôlés à l'échelle microscopique et mesurer ainsi l'élasticité de torsion de polymères biologiques ou la viscosité microscopique dans des fluides.

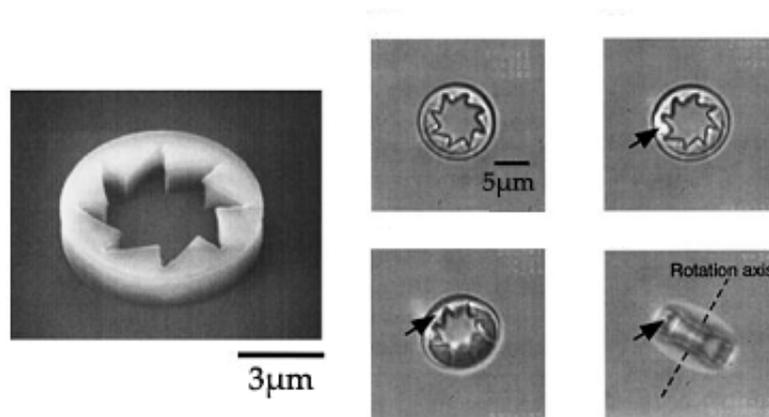


FIG. 1.11 – Mise en rotation de petits objets dissymétriques par des forces optiques. *Objet facetté mis en rotation de façon similaire à une hélice par la pression de radiation d'un faisceau laser focalisé.*

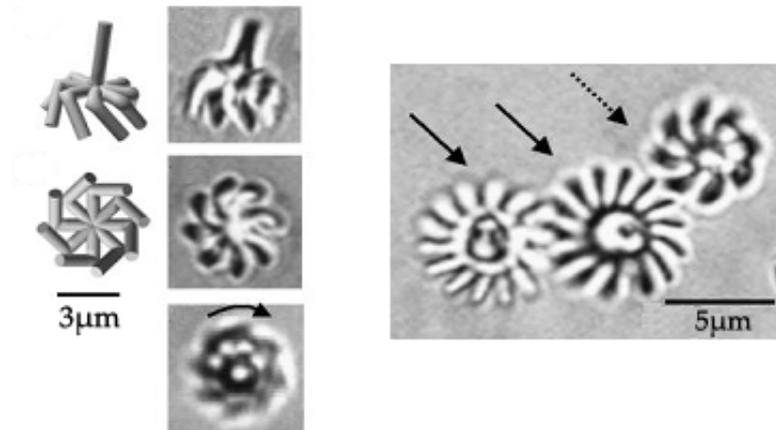


FIG. 1.12 – **Micromachines optiques.** Exemple de micromachines optiques réalisées par polymérisation à deux photons dans des résines. L'image de droite présente un microengrenage entraîné par pression de radiation.

1.2.2.3 Utilisation d'ondes évanescentes

La dernière voie prometteuse dans cette partie consacrée à l'évolution générale des techniques de piégeage et de manipulation optique concerne l'utilisation des champs évanescents pour le piégeage et la manipulation de microparticules. On rejoint ainsi le domaine en plein essor de l'optique du champ proche et des nanotechnologies.

Bien que théoriquement encore mal comprise, la manipulation de particules par champs évanescents permet notamment d'envisager d'étendre la technique des pinces optiques à l'échelle nanométrique.

L'expérience inaugurale dans ce domaine a été réalisée en 1992 par Kawata et Sugiura, qui ont observé le mouvement et le piégeage de billes micrométriques de latex et de verre dans le champ évanescent formé à l'interface d'un prisme de saphir éclairé en réflexion totale par un faisceau laser de puissance modérée ($P = 150\text{mW}$) [72]. La particule flotte et glisse le long de l'interface à la vitesse de quelques microns par seconde sous l'effet des photons tunnels, comme illustré sur la figure 1.13. Plus précisément, dans des conditions où l'indice de réfraction du milieu entourant les particules est supérieur à celui de ces mêmes particules, celles-ci sont attirées et piégées dans la zone de forte intensité (le dessus du guide d'onde) par les forces de gradient et propulsées dans la direction de propagation de la lumière par la pression de radiation. Dans certains cas où les guides sont multimodes, les particules peuvent se placer sur différentes "trajectoires optiques" dans la largeur du guide en avançant sur celui-ci. Il est important de noter que les performances de propulsion et de piégeage sont théoriquement maximales lorsque i) l'indice optique du guide

d'onde est le plus élevé possible et ii) que l'indice optique de la particule est le plus élevé possible par rapport à celui du milieu environnant.

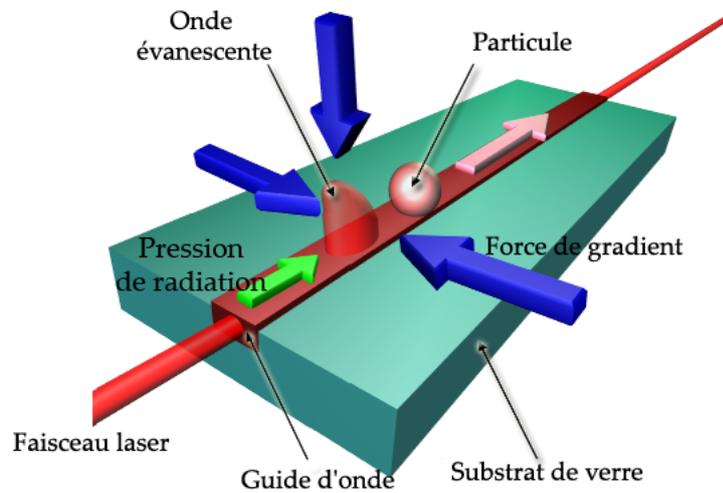
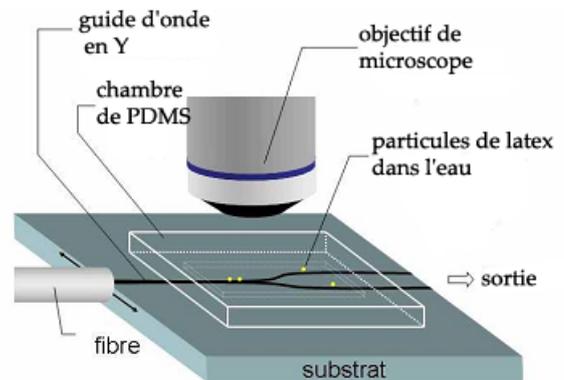


FIG. 1.13 – **Schéma du principe de la manipulation de particules par un guide d'onde**
Les forces de gradient attirent et piègent les particules sur le guide d'onde et la pression de radiation les propulse le long de celui-ci. L'indice de réfraction du milieu entourant les particules doit être supérieur à celui de ces particules.

En 1996, une équipe de la même université d'Osaka met en évidence le déplacement de particules métalliques et diélectriques sur la surface d'un guide d'onde créé par échange d'ions [73]. Cette expérience pionnière n'est pas immédiatement suivie par d'autres expériences et il faudra attendre l'an 2000 pour qu'une autre équipe de l'université de Southampton se penche à nouveau sur ce thème pour déplacer des nanoparticules métalliques [74]. En pratique, les nanoparticules sont déplacées le long du guide mais le faible piégeage ne suffit pas à contrer le mouvement brownien des particules qui finissent par sortir du piège [75] [76]. Des guides d'ondes créés par échange d'ions césium ont également été proposés pour propulser des particules. En 2004, Grujic et Hellesø proposent un système de déplacement de particules sur des guides d'ondes réalisés par un échange d'ions césium [77]. L'écart d'indice étant plus élevé avec ces guides, on s'attend logiquement à ce que les forces soient plus importantes. Effectivement, les auteurs obtiennent un déplacement plus efficace. Mais les puissances nécessaires de plusieurs centaines de mW sont encore un point faible. En 2005, cette même équipe présente un système de tri de particules basé sur l'utilisation d'une jonction Y [78]. Le contrôle précis de la position d'une fibre d'injection de lumière à l'entrée du guide d'onde, permet précisément de connaître la puissance guidée dans chaque partie de la jonction Y. Les particules sont propulsées de façon automatique et guidées sur la branche dans laquelle la puissance injectée est la plus importante

(figure 1.14). On comprend bien que cet aiguillage optique, destiné à trier des particules en ajustant en temps réel la puissance dans chaque branche de la jonction Y, ne peut être efficace que si les particules sont suffisamment éloignées les unes des autres. Et c'est bien là un point faible de ces travaux puisque les auteurs rapportent que les particules de latex utilisées ont tendance à se rapprocher pour former des chaînes [79].

FIG. 1.14 – Tri de particules par un guide d'ondes en Y. *La puissance guidée dans les branches de la jonction est réglable par le déplacement de la fibre d'injection. Les particules sont guidées et propulsées automatiquement sur la branche dans laquelle la puissance est la plus importante. Ce système permet donc d'aiguiller les particules.*



Cette nouvelle technique de manipulation de particules par des ondes évanescentes ouvre la porte à des dispositifs performants et miniaturisés et pourquoi pas en biologie où la particule privilégiée se trouve être également le plus petit élément vivant : la cellule.

1.2.3 Conclusion

A travers ce rapide état de l'art, les forces optiques apparaissent comme un moyen de plus en plus utilisé pour manipuler des particules, des micromachines et des cellules dans l'espace. Le développement exponentiel de ces techniques optiques est extrêmement vaste et je n'ai évoqué ici que les possibilités de développements en biologie et dans les sciences à son interface. Les micromachines optiques sont la promesse de nouveaux microsystèmes fluidiques pertinents pour les domaines de la biologie (biologie cellulaire, tri cellulaire, etc), des applications médicales (diagnostic de maladies, test de drogues, etc), du génie des procédés (microréacteurs par exemple), et de la chimie analytique (laboratoires sur puces, Micro Total Analysis Systems). Les domaines cités sont des exemples dont la valeur ajoutée économique et sociale est très importante, mais ils ne sont pas exhaustifs.

Nous avons montré dans cette section que les systèmes utilisant les forces optiques sont utilisés avec succès pour de nombreuses thématiques de recherche. Le prochain paragraphe exposera les systèmes de manipulation de particules utilisant des principes autres que ceux exposés précédemment, comme, par exemple, la diélectrophorèse. L'objectif est de mettre en lumière les

forces et les faiblesses de ces technologies afin d'estimer la pertinence des systèmes optiques pour ces thématiques.

1.3 Systèmes de manipulation ou de tri utilisés en biotechnologie

1.3.1 Des semiconducteurs aux microsystèmes pour la biologie

Les trente dernières années ont vu des développements importants dans le domaine de la microfabrication, dirigés essentiellement vers les circuits microélectroniques des semiconducteurs traditionnels. Les techniques de fabrication développées à l'origine pour ce domaine ont conduit au développement de capteurs et transducteurs solides et à ce qui est de nos jours connu sous le nom de microsystèmes électromécaniques (MEMS). Des systèmes intéressants dans les domaines automobile et aérospatial (capteurs de pression, accéléromètres, gyroscopes) et celui de l'industrie du stockage de données (tête de lecture de disques durs, systèmes d'impression à jet d'encre) furent développés. Ce marché représentait en 2003 plus de 10 milliards de dollars. Ce succès est en grande partie dû à trois caractéristiques principales : faible coût, grande reproductibilité, et taille réduite.

Durant ces dix dernières années, une direction nouvelle visant les sciences de la vie, la chimie et la médecine a mobilisé un nombre important de chercheurs du secteur des MEMS. Les domaines concernés sont, par exemple, le séquençage, la recherche et la délivrance de drogues, l'ingénierie tissulaire ou encore les outils de diagnostic.

Par exemple, c'est grâce au développement des séquenceurs multicapillaires que le génome humain a été séquencé en un temps très inférieur aux prévisions initiales, et c'est celui des «puces à ADN» qui a ouvert la voie à de nombreux projets actuels de biologie ou de pharmacogénomique. Mais, malgré ces progrès, il subsiste un large fossé entre ce qui est aujourd'hui possible et les outils dont biologistes, médecins et pharmaciens souhaiteraient disposer. L'un des problèmes actuels est que certaines étapes du processus d'analyse ont été considérablement parallélisées par des outils comme les «puces à ADN», mais d'autres, concernant en particulier la préparation d'échantillons en «amont», comme le tri et la centrifugation, restent dépendantes de techniques lourdes et macroscopiques, et de robots encombrants, délicats et coûteux.

Les laboratoires sur puces («lab on chips») à base de microfluidique constituent actuellement la direction de recherche la plus prometteuse pour résoudre ce problème. Ces systèmes, appelés également «microsystèmes d'analyse totale» (micrototal analysis system, ou MicroTAS)

cherchent, tout comme l'ont fait les circuits intégrés pour l'électronique, à réunir sur un support de dimensions réduites (typiquement d'une taille comprise entre celle d'une lame de microscope et d'un CD) une multitude de processus tout en permettant un haut débit d'analyse ainsi qu'un haut niveau d'automatisation. En traitant des échantillons à l'échelle du nanolitre dans des canaux de dimension micrométrique voire nanométrique, la technologie microfluidique permet une nette amélioration en termes de vitesse et de sensibilité de l'analyse, et dans le même temps une large réduction de l'encombrement et du coût. Ces quelques arguments expliquent l'essor qu'a connu au cours des dernières années ce nouveau domaine des sciences technologiques, dont les applications touchent tout autant la biologie que la physique et la chimie.

Sur le plan scientifique et technique, les laboratoires sur puces posent encore un grand nombre de questions, et constituent un terrain d'exercice particulièrement fertile pour l'imagination des chercheurs. Depuis les toutes premières puces de Manz [80] et de Harrison [81] au début des années 1990, un grand nombre de nouvelles petites sociétés se sont développées en particulier aux Etats-Unis, et des partenariats se développent à la fois avec les «majors», de l'instrumentation analytique et certains grands noms de la microélectronique tels que Motorola ou Hitachi.

L'intérêt accru de la recherche sur les MicroTAS ou Lab-On-Chip s'illustre par l'apparition de nouvelles revues (*Lab-on-Chip*), de sections spéciales sur ce sujet (MicroTAS dans *Sensors and Actuators B*), et d'une grande quantité d'articles dans des journaux relatifs à ce sujet (*Electrophoresis*, *Journal of Chromatography A*, *Analytical Chemistry*) ainsi que plusieurs autres articles passant en revue le sujet avec plus ou moins de détails [82], [83], [84], [85], [86].

Un congrès annuel de la recherche sur des microsystèmes intégrés et la nanotechnologie pour la chimie et les sciences de la vie lui est même dédié. C'est le congrès MicroTAS qui a eu lieu en 2005 à Boston aux USA et pour lequel les travaux exposés dans cette thèse ont été sélectionnés parmi plus de 832 soumissions.

En 2006, plus d'une centaine d'entreprises de part le monde sont des acteurs actifs du domaine des BioMEMS et des systèmes de microanalyse totale (MicroTAS). Les laboratoires-sur-puce recouvrent l'ensemble des microsystèmes intégrés pour la préparation, la séparation, la réaction, la détection et la synthèse en chimie et en biologie.

Le développement de tels dispositifs en biologie s'avère être une approche particulièrement avantageuse pour certaines applications. En particulier, les plateformes microfluidiques permettent, par exemple, la manipulation de cellules en petit nombre (100-10 000 cellules), ce qui est impossible à réaliser avec les cytomètres en flux conventionnels, qui requièrent typiquement un échantillon de taille supérieure à 500 000 cellules [87],[88].

En parallèle avec l'émergence de ces concepts de MicroTAS et de Lab-on-Chip, les principales méthodes de manipulation utilisées dans les laboratoires, telles que les pinces optiques, le tri magnétique ou par fluorescence, la filtration, ou encore les manipulations basées sur l'utilisation d'un champ électrique virent donc le jour sous une forme la plus miniaturisée possible.

Une description représentative des travaux basés sur ces méthodes *-et volontairement restreinte ici aux systèmes utilisés ou utilisables en biologie-* fait l'objet des paragraphes suivants.

1.3.2 La cytométrie en flux et les systèmes fluidiques

La cytométrie en flux est la méthode la plus couramment utilisée en biologie pour l'analyse et la séparation de populations cellulaires dans un mélange. Les cellules sont marquées avec un ou plusieurs colorants fluorescents spécifiques des composants cellulaires que l'on cherche à détecter, par exemple, des protéines "récepteurs" de la membrane cellulaire. Chaque cellule subit ensuite une focalisation hydrodynamique avant de traverser rapidement un faisceau d'excitation (laser ou lampe à arc de mercure). La fluorescence émise fournit une mesure quantitative de diverses propriétés biochimiques et biophysiques de la cellule, et peut ensuite être exploitée pour le tri sélectif de cellules. D'autres paramètres optiques mesurables incluent l'absorption et la dispersion de la lumière, ce dernier paramètre étant applicable à la mesure de la taille des cellules, leur forme, leur densité, leur granularité, et leur coloration. Un cytomètre de type FACS (Fluorescence-Activated Cell Sorter) permet de trier un très grand nombre de cellules par seconde, de l'ordre de 10^4 cellules par seconde. Ce tri est réalisé en fractionnant le jet de liquide en microgouttes contenant au maximum une cellule qui sont chargées électrostatiquement. Par une instrumentation de synchronisation entre le détecteur et une chambre de déviation par champ électrique, les gouttes seront ensuite déviées en fonction des paramètres spécifiés par l'utilisateur (taille, granulométrie et propriétés fluorescentes souhaitées) et récupérées dans des réservoirs distincts.

Pouvoir trier et analyser de petits échantillons contenant des cellules rares (comme les cellules foetales circulant dans le sang maternel) serait une perspective très intéressante pour le domaine du diagnostic médical. La réalisation de certains tests à partir d'échantillons de quelques microlitres de sang seulement serait ainsi envisageable. On éviterait de cette façon au patient des prélèvements plus importants et parfois risqués, comme par exemple pour le diagnostic prénatal.

Mais, si aujourd'hui, le cytomètre en flux est doté d'une cadence élevée, il a cependant des

défauts qui font qu'il ne peut pas répondre aux enjeux de la miniaturisation. Ces machines souffrent de l'écart énorme entre la taille de l'outil et celle de l'objet. Ceci gêne leur intégration dans des systèmes analytiques miniaturisés : les instruments traditionnels de cytométrie sont encombrants et mal adaptés à l'échelle micrométrique.

Si la précision et le débit de ces outils est remarquable, les besoins expérimentaux sont parfois dépassés par les capacités de ces appareils. C'est pourquoi les cytomètres traditionnels doivent être complétés par des dispositifs conçus pour les petits échantillons et adaptés à certains des nouveaux besoins de la biologie. Le très haut débit d'analyse est une caractéristique des cytomètres conventionnels non essentielle pour les MicroTAS et autres Lab-On-Chip. En effet, en cytométrie classique, un grand nombre de cellules est nécessaire, et l'on doit augmenter ce nombre si la population étudiée représente moins de 1 % de la population totale enregistrée. Si ces critères ne sont pas respectés, l'échantillon risque fort d'être épuisé avant que les réglages des paramètres d'analyse et de tri ne soient effectués.

Dans son état actuel, la cytométrie ne permet pas le traitement d'échantillons de petite taille et sa précision reste souvent insuffisante pour repérer des cellules rares. Etant donné le statut de méthode reine de cette technologie et son implantation solide dans les laboratoires de biologie, l'objectif n'est pas de développer une méthode concurrente mais d'améliorer celle-ci en apportant une solution à ses défauts. Quelques exemples de transport ou de tri de particules et de cellules sur des microdispositifs sont donc apparus où des forces hydrodynamiques [89], [90], électrocinétiques [91], électroosmotiques [92], [93] et diélectrophorétiques [94], [95], [96] [97] furent utilisées. Les travaux de Telleman [89], [98] démontrent la possibilité de trier des particules magnétiques et fluorescentes à l'aide d'un flux laminaire dans un système microfluidique et McClain [91] a, quant à lui, utilisé une focalisation électrophorétique pour la cytométrie en fluorescence de *E. coli*. Des systèmes fonctionnant par différences de pression ont aussi été proposés. Les dispositifs basés sur des champs électriques ou magnétiques seront détaillés dans les paragraphes suivants.

L'équipe de Whitesides *et al.* [99] a également conçu des dispositifs en poly(diméthyl- -siloxane) dans lesquels le flux est dirigé par des différences de pression. Tkaczyk, de l'université du Michigan a démontré en 2003 la pertinence d'un commutateur microfluidique basé sur la mise en action d'un jet liquide dans un système d'écoulement biphasé d'air-liquide (la focalisation du liquide est réalisée avec de l'air). Cette mise en action originale du liquide combine les avantages de l'écoulement biphasé et de l'activation électrique, ouvrant de nouvelles possibilités pour le tri de cellules et de particules.

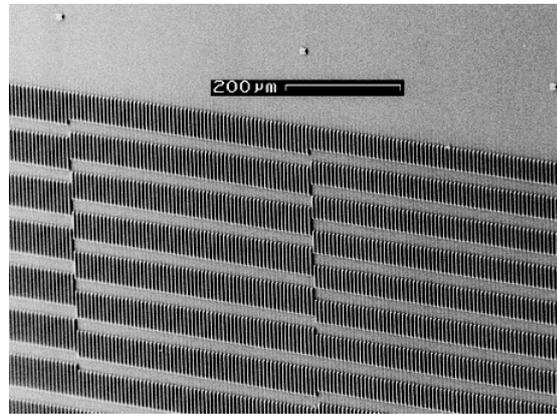
Ces dispositifs offrent des perspectives intéressantes d'intégration avec d'autres techniques

pour un système d'analyse complet. Cependant, les vitesses de tri sont encore très éloignées du haut débit souhaité et ces systèmes sont souvent caractérisés par de faibles viabilités cellulaires. C'est pourquoi des dispositifs utilisant d'autres technologies et des principes physiques différents ont été développés. Ils sont décrits de façon non exhaustive dans les lignes suivantes.

1.3.3 Systèmes mécaniques de tri et de piégeage

Le piégeage mécanique de cellules doit tenir compte des propriétés physiques et physiologiques complexes de ces objets biologiques. De nombreux paramètres sont à prendre en compte comme leur propension à adhérer aux surfaces, ou leur déformabilité, ou encore leur motilité et leur densité. Des filtres mécaniques microfabriqués ont été utilisés pour piéger différents types de cellules du sang [100].

FIG. 1.15 – Image en microscopie électronique à balayage d'une petite section de filtres mécaniques composés de réseaux de canaux rectangulaires parallèles. *Le réseau total a des canaux de longueurs variant de 20 à 110 microns, par pas de 10 microns, avec une profondeur de gravure longue et large de 5×5 microns. Le flux de fluide provient du dessus et progresse vers le bas.*



Ces filtres sont composés de réseaux de canaux rectangulaires parallèles de dimensions telles que cela ne permettrait pas aux particules plus grandes que ces canaux d'entrer dans ce réseau. Carlson *et al.* [100] et Tixier *et al.* [101] ont utilisé des forces hydrodynamiques pour déplacer le sang dans un tel treillis de canaux micro-capillaires. En pratique, les globules rouges s'y déplacent aisément alors que les globules blancs sont plus ou moins retardés par des phénomènes d'adhésion. La population de globules blancs s'auto-fractionne en différentes sous-populations correspondant aux différents sous-groupes de globules blancs.

Une technique de manipulation "active" (par opposition aux filtres passifs précédents), consiste en une paire de micropinces mécaniques mises en mouvement par un actionneur piézoélectrique. Ce système a été utilisé par Jericho *et al.* avec succès pour manipuler des billes de latex et des bactéries [102] (voir figure 1.16).

Conclusion

Si ces systèmes sont intéressants et originaux, ils ne sont néanmoins pas exempts de re-

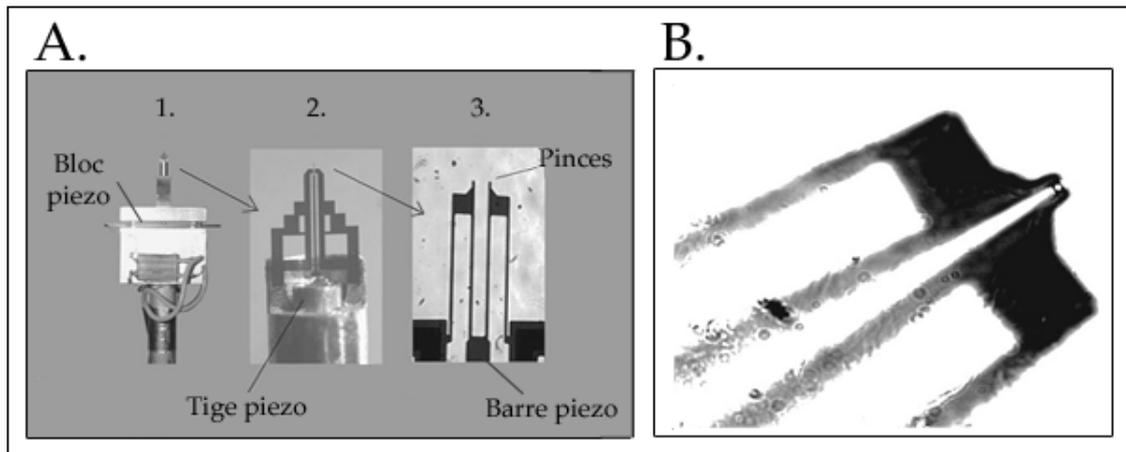


FIG. 1.16 – **Microsystème électromécanique de pinces de silicium pour manipuler des bactéries et des petites particules.** *A. Zoom progressif du système. 1. Image des pinces et de l'actionneur piézoélectrique. 2. Image des pinces de silicium montées sur une tige connectée au bloc piézo. 3. Image des pinces en position de repos, immergées dans l'eau. La distance entre les pinces est de $9\mu\text{m}$. B. Image des pinces immergées sous l'eau et tenant une bille de latex de $1\mu\text{m}$ qui a été soulevée d'une surface. Les bras de la pince près du coin inférieur gauche de l'image sont hors du plan focal en raison de la vibration piézoélectrique de l'actionneur du système.*

proches. Ainsi les expérimentateurs utilisant ces systèmes se retrouvent confrontés à des inconvénients majeurs, comme des problèmes d'adhésion, de récupération des cellules, ou de colmatage du dispositif.

1.3.4 Systèmes électriques de tri et de piégeage

Parmi les techniques de manipulation, celles basées sur une approche utilisant un champ électrique sont particulièrement adaptées à la miniaturisation [98]. Elles combinent les avantages de la rapidité, la flexibilité, le contrôle et la facilité d'automatisation. Selon la nature des particules à manipuler, différents types de champs électriques peuvent être appliqués :

- i) un champ de courant continu pour l'électrophorèse de particules chargées,
- ii) un champ non-uniforme de courant alternatif pour la diélectrophorèse (DEP) de particules polarisables (chargées ou neutres).

La diélectrophorèse est un phénomène qui trouve son origine dans les propriétés diélectriques des matériaux qui, sous l'effet d'un champ électrique, se polarisent [103]. Si le champ électrique appliqué est non uniforme à l'échelle d'une particule diélectrique, celle-ci va subir des forces diélectriques qui, de par cette non uniformité, vont l'entraîner soit du côté de la zone où le champ est le plus fort (diélectrophorèse positive) soit du côté où il est le plus faible (diélectrophorèse négative). La diélectrophorèse permet donc de manipuler des

particules avec des champs électriques. Un intérêt premier est de pouvoir travailler avec des champs alternatifs, supprimant ainsi les réactions électrochimiques parasites dans les échantillons biologiques. La manipulation de cellules biologiques par diélectrophorèse est une technique couramment utilisée aujourd'hui [104]. Les microsystèmes développés permettent de créer des champs électriques suffisamment intenses pour envisager de faire de la diélectrophorèse sur des cellules. Ainsi, le champ d'applications de la diélectrophorèse en microsystèmes s'ouvre aux biotechnologies et notamment à celui de la manipulation de petits échantillons cellulaires [97].

- iii) des champs combinés alternatifs et continus pour manipuler des particules chargées et neutres.

L'électrophorèse a été employée pour des puces en association avec l'électro-osmose pour le transport et la séparation électrocinétique de molécules et de cellules dans des microcanaux [105], [106], [92], [93]. L'électroosmose est l'un des meilleurs exemples d'un cas où la microfluidique profite de l'avantage du rapport élevé de surface des canaux par rapport au volume de liquide qu'ils contiennent. À proximité d'une surface chargée formant le microcanal (PDMS, silicium ou pyrex) une couche diffuse de contre-ions se forme le long des parois. Sous l'effet d'un champ électrique appliqué entre les extrémités des canaux, ces contre-ions se déplacent et engendrent un flux électroosmotique.

Mais étant donné que la plupart des cellules biologiques ont des mobilités électrophorétiques semblables, l'électrophorèse pour la manipulation des cellules n'a que des applications limitées.

Quake *et al.* ont développé un microsystème de tri par fluorescence utilisant un flux électroosmotique [92]. Ce dispositif de tri est fabriqué en utilisant une technologie de lithographie qui permet la conception de dispositifs fluidiques miniaturisés, peu coûteux et flexibles. Le dispositif de microFACS est réalisé en élastomère de silicone avec trois canaux se rejoignant en une jonction en T (cf fig 1.17). Les cellules sont manipulées par un flux électro-osmotique, qui est commandé par des électrodes aux puits d'entrée et de sortie. La puce est montée sur un microscope optique inversé, et la fluorescence est excitée près de la jonction en T avec un rayon laser focalisé. L'émission fluorescente est captée par le microscope et mesurée par un photomultiplicateur (PMT). Un ordinateur digitalise le signal du PMT et commande l'écoulement par les potentiels électro-osmotiques. L'algorithme de tri déplace les cellules du canal d'entrée au canal de déchet jusqu'à ce qu'une cellule fluorescente arrive au-dessus de la cellule de détection. A ce moment précis, les tensions sont temporairement changées pour détourner la cellule jusqu'au canal de collecte. Les rendements obtenus avec ce dispositif sont d'environ 20 % et les débits de 20

cellules/sec. La viabilité obtenue avec ce dispositif reste faible et est d'environ 20 %.

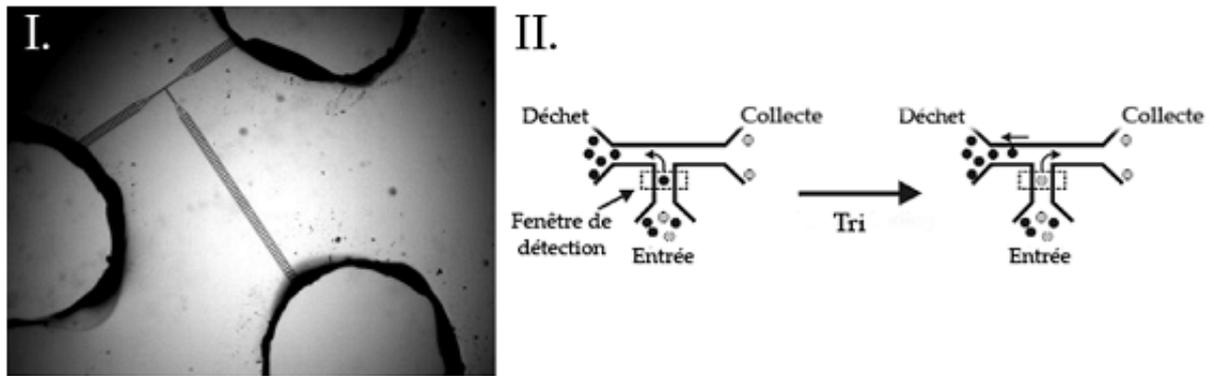


FIG. 1.17 – Microsystème de tri par fluorescence utilisant un flux électro-osmotique. I. Image du dispositif de microFACS. Le dispositif montré a des canaux de 100 microns se rétrécissant à 3 microns au niveau de la jonction. La profondeur du canal est de 4 microns, et les puits font 2 millimètres de diamètre. II. Lorsqu'une particule fluorescente est détectée, les tensions appliquées sur la puce sont inversées et la particule est orientée vers la zone de collecte.

D'un autre côté, la DEP a été utilisée avec succès à l'échelle des puces pour manoeuvrer et séparer une grande variété de cellules biologiques comme des bactéries, des levures et des cellules de mammifères [94], [95], [107], [108], [109]. Par exemple, l'enrichissement d'une population cellulaire par DEP a été utilisé pour concentrer *E. coli* (20 fois) à partir d'un échantillon dilué et des cellules mononucléaires de sang périphérique (enrichissement de 28 fois) à partir de sang entier dilué [96]. Les mêmes auteurs ont également démontré un enrichissement de 30 fois des globules blancs du sang à partir de sang entier dilué [96].

Des applications de transport et de séparation de cellules et particules dans des microréseaux d'électrodes ont ainsi été réalisées [98], notamment par Fuhret *al.* qui ont utilisé la DEP dans un dispositif pour aiguiller et concentrer des particules avec des vitesses maximales d'environ 10 mm par seconde [94] (cf fig 1.18).

Une puce à "forces multiples" comportant des éléments électromagnétiques et des électrodes DEP pour la manipulation intégrée de cellules et de molécules a été développée par Xu *et al* [110]. Des globules blancs ont été séparés par DEP, lysés et leur ARNm libéré a été lié à des billes magnétiques marquées, qui ont été retenues tout en enlevant les autres molécules. Les billes ont ensuite été libérées pour la collecte et l'analyse.

Chiou *et al.* ont présenté dans la revue *Nature* du mois de juillet 2005 un système utilisant une DEP contrôlée optiquement qui permet de modeler avec une haute résolution des champs électriques sur une surface photoconductrice afin de manoeuvrer des particules [111]. Cette

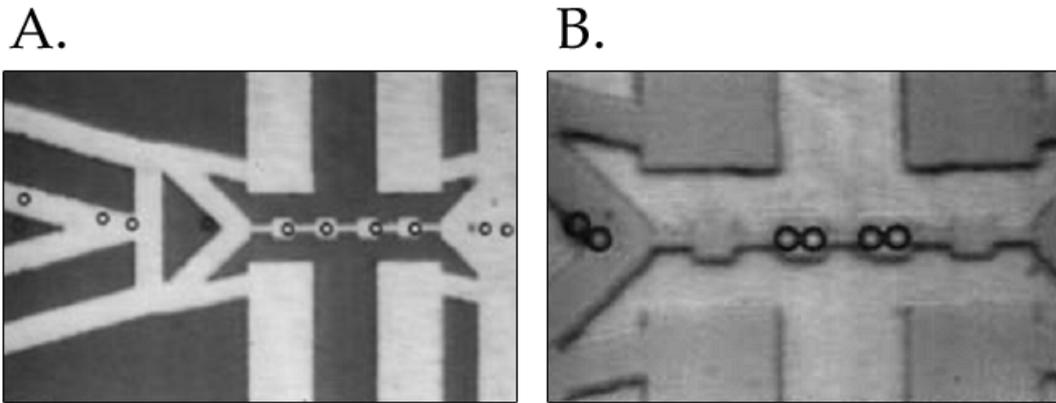
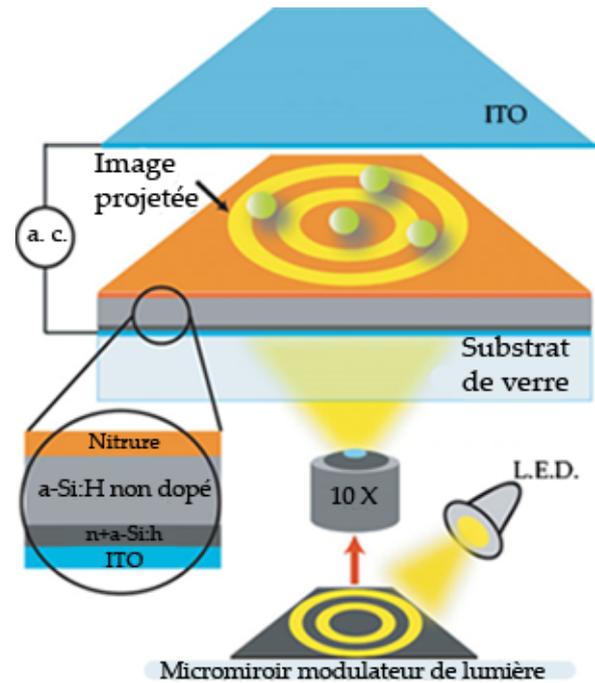


FIG. 1.18 – **Microsystème de tri par diélectrophorèse.** *A. Particules de latex, d'un diamètre de $15\mu\text{m}$, piégées dans des cages de potentiel (partie droite de l'image). Ces particules uniques ont été confinées à partir d'un flux de particules. La direction du flux est de la gauche vers la droite. B. Une vue agrandie d'un élément du dispositif d'alignement. La superposition précise des dipôles symétriques supérieurs et inférieurs permet le piégeage de paires de billes de latex à l'intérieur de cages de potentiel. Dans cette disposition, les particules sont maintenues en position stationnaire dans un flux liquide dirigé de la gauche vers la droite.*

technique exige 100 000 fois moins d'intensité optique que les pinces optiques classiques. Les auteurs ont appelé ce système "pinces optoélectroniques" (cf figure 1.19). En utilisant une source lumineuse incohérente (une diode lumineuse ou une lampe halogène) et un modulateur spatial de lumière, les auteurs ont démontré la manipulation en parallèle de 15.000 pièges de particules sur une zone de $1,3 \times 1,0$ millimètres carrés. Avec un système d'imagerie directe, de multiples fonctions de manipulation sont combinées pour réaliser des protocoles complexes. Les auteurs indiquent pouvoir manipuler simultanément plus de 10 000 cellules dans les 15 000 pièges pouvant être générés. De plus, la taille des pixels définissant les dimensions des pièges créés est imposée par le micromodulateur spatial de lumière. Néanmoins, rien n'est spécifié concernant le coût d'un tel modulateur.

La critique générale concernant ces méthodes basées sur les champs électriques est qu'elles souffrent d'une faible vitesse de tri et d'incompatibilité avec certains tampons, la présence de sels dans la solution pouvant perturber le fonctionnement du dispositif de tri. Malheureusement, ces méthodes basées sur l'utilisation de champs électriques sont limitées par la difficulté de maintenir la viabilité de cellules sous des champs électriques élevés, en particulier pour les cellules eucaryotes, et par des incompatibilités de tampons [94] [87].

FIG. 1.19 – Structure du dispositif utilisé dans les pinces optoélectroniques. Le liquide qui contient les particules microscopiques est contenu entre la couche d'ITO (Indium Tin Oxide) supérieure et la surface photosensible inférieure d'ITO recouverte de couches multiples : du silicium amorphe hydrogéné fortement dopé ($a\text{-Si:H}$), de l' $a\text{-Si:H}$ non dopé, et du nitrure de silicium. Les couches d'ITO sont polarisées avec un courant alternatif. La source d'illumination est une LED fonctionnant à 625 nm. Les images optiques montrées sur le micromiroir modulateur de lumière sont projetées sur la surface photosensible et créent le champ électrique non-uniforme pour la manipulation par DEP.)



1.3.5 Systèmes de manipulation magnétique

Le tri basé sur l'utilisation d'aimants fait partie des techniques couramment utilisées dans les protocoles de séparation en biologie. Les billes magnétiques peuvent être utilisées dans les trieurs de type MACS (magnetic-activated cell sorting) pour isoler des populations cellulaires à partir d'un mélange. Les cellules sont mélangées avec des billes magnétiques couplées avec un anticorps, un peptide ou un ligand spécifique des cellules cibles. Les cellules peuvent alors être rapidement isolées ou éliminées en plaçant le tube de la suspension cellulaire dans un champ magnétique.

Une technique immunomagnétique de séparation a été mise en oeuvre sur une plateforme microfluidique pour l'isolement de cellules spécifiques dans des échantillons de sang [112]. L'isolement de cellules et les études de purification ont particulièrement employé les cellules T, en tant que modèle de cellules de faible abondance (ratio d'environ 1 :10 000), avec l'objectif d'isoler des cellules encore plus diluées, comme les cellules souches sanguines. Les cellules T ont été séparées sur puce avec succès à partir de sang humain. Le principe utilisé dans cette puce est montré dans la figure 1.20.

La manipulation non invasive des cellules biologiques à l'intérieur d'un canal microfluidique a été démontrée par Lee *et al.* [113] en utilisant une matrice de microélectroaimants. La matrice se compose de deux couches de fils d'or droits, perpendiculairement alignés entre eux, et recouverts

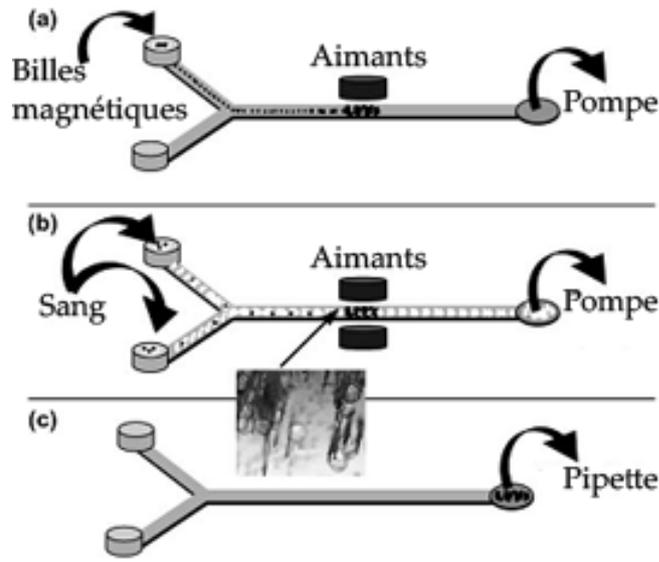


FIG. 1.20 – **Séparation immunomagnétique de cellules T.** *a) La pompe tire les billes recouvertes d'anticorps spécifiques des cellules T jusque dans le canal pour une capture magnétique (b) les échantillons sanguins sont introduits dans les deux canaux d'entrée et les cellules T sont capturées avec des aimants placés dessus et dessous, puis lavées (c) Les aimants sont retirés tandis que les cellules capturées et les billes magnétiques sont transférées en direction du canal de sortie avec une micropipette. La vignette montre les cellules T capturées par les billes dans un champ magnétique. Les billes sont visibles en tant que stries foncées, et les cellules en tant que cercles translucides (les cellules sont d'environ 15 microns de diamètre).*

par des couches d'isolant. En ajustant le courant dans chaque fil indépendant, la matrice de microélectroaimants peut créer des motifs de champ magnétique pour commander le mouvement de différentes cellules marquées en suspension dans un fluide. Des levures attachées à des billes magnétiques ont été piégées, déplacées et mises en rotation sans interruption, et des cellules viables ont été séparées de cellules non viables (figure 1.21).

1.3.6 Manipulation par piégeage acoustique

Une méthode originale basée sur l'utilisation d'un piège tridimensionnel non intrusif pour les particules microscopiques dans un liquide a également été utilisée. Ce piège est basé sur les forces acoustiques. La théorie de lévitation et de piégeage acoustique est bien comprise [114] [115]. La méthode a été appliquée pour l'étude de la tension superficielle à la surface de gouttes de liquide de l'ordre du millimètre [116], des oscillations de forme et la déformation de gouttelettes et de cellules biologiques [117], et des propriétés mécaniques de matériel biologique, comme les globules rouges [118].

Hertz *et al.* [119] ont décrit un piège tridimensionnel non intrusif basé sur les forces acous-

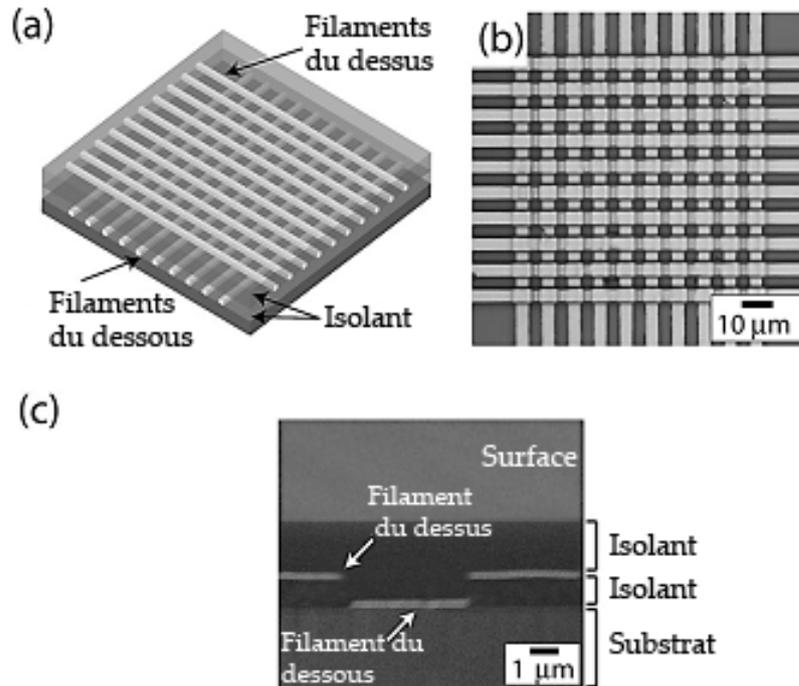


FIG. 1.21 – Matrice de microélectroaimants pour la manipulation des cellules biologiques (a) Schéma de la matrice de microélectroaimants. Deux couches de fils conducteurs sont perpendiculairement alignées et recouvertes par des couches d'isolant. (b) Photographie d'une matrice avec 10 fils d'or dans chaque couche (matrice de 10×10). La largeur et le pas des fils sont respectivement de 4 et 8 microns. (c) Coupe de la matrice en diagonale. Les fils de dessus et de dessous sont indiqués avec le substrat, les deux couches d'isolant, et la surface supérieure.

tiques dans une cavité ultrasonique. Les expériences à 11 mégahertz démontrent le concept et vérifient les forces théoriques. Les calculs théoriques pour des systèmes de plus haute fréquence indiquent un potentiel significatif pour le piégeage de particules submicrométriques, rendant le piège particulièrement approprié à la microscopie optique en champ proche.

1.3.7 Systèmes optiques

Le développement des techniques utilisant les forces optiques a incité les scientifiques à utiliser ces caractéristiques prometteuses dans la chaîne de tri cellulaire. Des exemples récents sont venus appuyer cette tendance.

Comme nous l'avons vu précédemment (section 1.2.2.1), Esener *et al.* [51], [52] ont démontré l'utilisation de lasers verticaux à émission de surface par cavité (VCSELs) pour le piégeage et la manipulation de cellules et de microsphères. L'avantage démontré est la capacité des VCSELs à être utilisés en réseau. En utilisant un réseau de 2×2 VCSELs, les auteurs ont démontré le transport simultané et indépendant de quatre globules rouges humains à une vitesse d'environ

$10\mu\text{m/s}$. Cette possibilité de transport en parallèle est un avantage significatif pour les applications de tri et de déplacement cellulaire. Cependant cette méthode reste notamment limitée par les faibles vitesses de déplacement et la lourdeur d'un tel dispositif. Chaque piège optique nécessite un composant et, même réduit, ceci nuit à la réalisation de grands réseaux efficaces de piégeage, chaque piège devant être manipulé individuellement.

En 2003, Mac Donald *et al.* [60], ont exposé leurs travaux sur un système de tri de particules associant une composante microfluidique et une composante optique (un réseau optique, voir la figure 1.22). Les particules en suspension dans un flux de particules traversent un réseau optique 3D générant des puits de potentiel. Selon leur taille et leur nature, la trajectoire initiale de certaines billes est déviée tandis que d'autres circulent dans le réseau sans perturbation. Ainsi, les particules de faible indice de réfraction ne seront pas perturbées par la présence du réseau optique tandis qu'au contraire, les particules de fort indice vont subir une force de gradient qui aura tendance à les diriger selon les puits de potentiel du réseau optique.

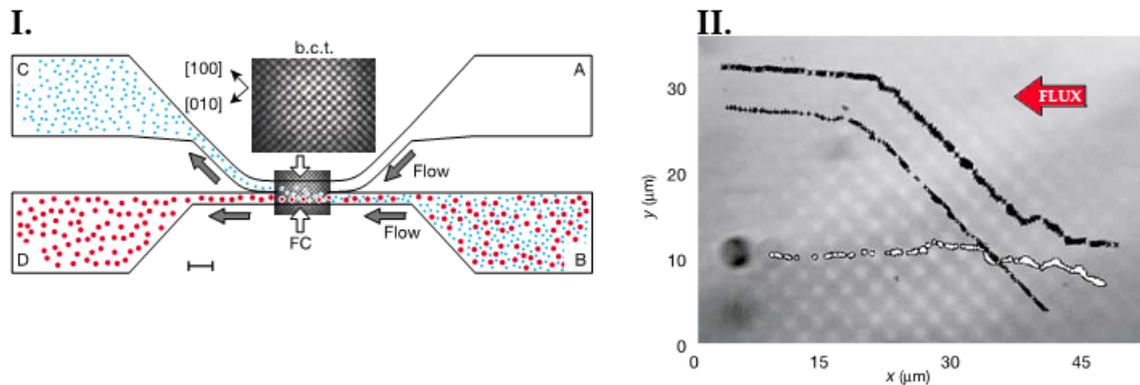


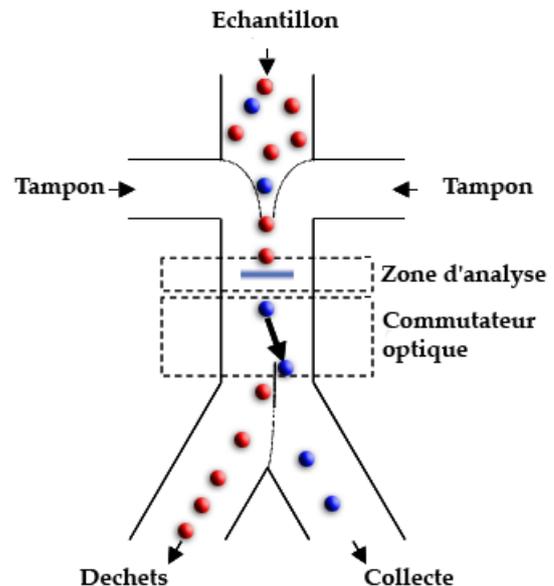
FIG. 1.22 – **Tri de particules dans un réseau optique** I. Les flux de liquide des chambres A et B sont laminaires. Les particules de la chambre B sont transportées dans la chambre D. De même, le liquide de la chambre A induit un flux dirigé en direction de la chambre C. Grâce à l'utilisation d'un réseau optique tridimensionnel dans la chambre de fractionnement (FC), une population particulière de particules est poussée de façon sélective vers le flux de liquide généré par la chambre A, ce qui la sépare des autres populations. II. Séparation suivant la taille. Les points noirs représentent les positions image après image de deux microcapsules d'un diamètre de $2\mu\text{m}$ qui se déplacent de droite à gauche dans le réseau optique. La vitesse du flux est de $20\mu\text{m/s}$ et la puissance laser totale 530 mW . Une déviation significative est obtenue alors que des capsules de $4\mu\text{m}$ (points blancs) continuent leur chemin sans être déviées.

Le réseau optique tridimensionnel est généré par les techniques holographiques décrites précédemment au paragraphe 1.2.2. A l'aide d'un laser d'une puissance de 530 mW , des billes de verre et de latex ont pu être triées avec une efficacité de plus de 96% et des microcapsules de $2\mu\text{m}$ de diamètre ont pu être séparées d'un flux de particules de $4\mu\text{m}$. Une séparation d'érythrocytes

et de lymphocytes a également été réalisée avec ce système [120]. Le dispositif fonctionne aussi dans le cas de solutions concentrées et sa vitesse de tri est d'environ 25 particules par seconde, ce qui est légèrement supérieur aux vitesses des microsystèmes de type FACS (cf. paragraphe 1.3.2). Cette technique holographique de tri est actuellement exploitée par *Arryx*, une start-up de Chicago, pour des applications (théoriques) allant de l'industrie des cosmétiques jusqu'à la purification de l'eau, en passant par les télécommunications.

Un système plus récent (2005), développé par Wang *et al.* (société Genoptix)³ (San Diego, Californie) [87] consiste en un système opto-fluidique activé par fluorescence (cf. figure 1.23). Son principe de fonctionnement est très similaire à celui du FACS présenté au paragraphe 1.3.2. Des cellules issues d'un échantillon biologique sont alignées par une focalisation hydrodynamique avant de traverser une zone d'analyse dans laquelle on détecte la fluorescence de la cellule. Si celle-ci est fluorescente, elle est considérée comme étant une cible et poussée par une pince optique vers une zone de collecte. Dans le cas contraire, la cellule est orientée vers une zone de déchets.

FIG. 1.23 – **Tri fluïdique et commutateur optique.** Des cellules issues d'un échantillon biologique sont alignées avant de traverser une zone d'analyse dans laquelle on détecte la fluorescence de la cellule. Si celle-ci est fluorescente, elle est considérée comme étant une cible et poussée par un interrupteur optique vers une zone de collecte. Dans le cas contraire, la cellule est orientée vers une zone de déchets.)



La pince optique est particulièrement efficace et c'est ce qui rend ce système si intéressant. Il s'agit en fait d'un laser de 20 W faiblement focalisé et translaté près de la cellule d'intérêt à une vitesse similaire de celle du flux de liquide. L'efficacité du tri est supérieure à 80 %, et le débit du tri est relativement élevé, avec 20 à 100 cellules analysées par seconde. La viabilité et le stress des cellules ont été évalués et les cellules ne semblent pas subir de dommages suite à ce tri.

³<http://www.genoptix.com/>

Ce dispositif démontre, avec l'exemple précédent, que la combinaison d'éléments optiques et fluidiques reste une approche pertinente et peu stressante pour le matériel biologique analysé. Cependant, les puissances laser nécessaires et les composants utilisés (élément de diffraction pour la création du réseau optique, pince optique) sont un frein au développement d'un système intégré et autonome et augmentent également les coûts de fabrication.

1.4 Conclusion et objectifs

Cette étude bibliographique non exhaustive démontre que le développement de l'utilisation des forces optiques dans de nombreux domaines et pas seulement celui de la biologie au sens strict permet d'envisager des développements nouveaux dans le domaine des microsystèmes intégrés. La souplesse, la robustesse d'utilisation et la possibilité d'automatisation confèrent aux systèmes optiques un statut qui dépasse celui de la nouveauté et de la curiosité scientifique. Ce développement n'est que très récent. En effet, des nombreux travaux majeurs ne sont apparus que durant ces dernières années, ce qui confirme l'intérêt croissant des chercheurs pour ces techniques.

Les avancées récentes dans le domaine des microsystèmes d'analyse visent la manipulation et la détection d'objets uniques. Cette tendance s'affirme nettement dans les microsystèmes cellulaires (Cell-on-chip), mais également dans le domaine des laboratoires sur puces (Lab on chip).

En tant que biologiste, mon objectif dans cette thèse était d'étudier la possibilité de réaliser des fonctions de routage et de tri de cellules en utilisant les propriétés optiques d'un composant nouveau en biologie, *le guide d'onde*, de concevoir un démonstrateur et de démontrer la réalité biologique de ce concept en terme de viabilité cellulaire.

Ce concept est apparu comme une alternative très prometteuse par rapport à d'autres systèmes de manipulation sans contact. Nous pouvons citer par exemple le cas de la diélectrophorèse qui permet, grâce à une architecture complexe d'électrodes, la lévitation et le déplacement d'objets biologiques dans une chambre de tri et d'analyse [97], [104]. Les travaux conduits dans ces projets ont permis d'appréhender les contraintes d'interface entre mondes biologiques et technologiques : pour la diélectrophorèse, ce sont par exemple, les questions de biocompatibilité cellulaire des matériaux employés pour la fabrication des microsystèmes, ainsi que les différences entre types cellulaires qui se sont parfois révélées problématiques.

En même temps, ces études font apparaître de fortes contraintes liées aux principes phy-

siques de la diélectrophorèse : la nécessité d'un contrôle précis des courants de pilotage et une instrumentation électronique délicate à mettre en oeuvre. Nous visons ainsi, à travers ces travaux, à proposer une alternative optique plus simple à exploiter pour réaliser le même type de manipulations.

C'est dans cette difficulté à concilier à la fois les exigences de la biologie et celles de l'optique, et à surmonter les obstacles expérimentaux que réside la difficulté de cette démarche : identification des contraintes de fonctionnement imposées par le système optique, intégration des exigences imposées par le type de particules manipulées (suspensions biologiques) tant du point de vue de la survie des cellules (biocompatibilité des matériaux utilisés, paramètres de fonctionnement du dispositif compatibles avec le maintien de la viabilité cellulaire) que de la stabilité du système vis-à-vis des milieux biologiques (fabrication de chambres microfluidiques, utilisation d'une chimie de surface appropriée, ...), détermination de conditions d'opération du microsystème pour les objets biologiques, et enfin design et réalisation de microdispositifs nouveaux pour le tri de cellules.

Le développement de ces systèmes optiques en biologie ou dans le domaine de la manipulation de particules permet d'envisager des évolutions intéressantes concernant de tels microsystèmes. Les avantages procurés par leur souplesse d'utilisation et leurs dimensions réduites offrent de réelles perspectives dans le domaine du tri et du routage de particules ou d'objets biologiques. En particulier, l'utilisation de guides d'ondes nous a semblé pertinente, du fait du caractère automatique du déplacement. Il est ainsi envisageable de pouvoir déplacer des cellules et du matériel biologique sans contact physique sur ces structures. C'est ce que ces travaux se proposent de démontrer.

Chapitre 2

Dispositif et méthodes employées

Ce chapitre décrit le dispositif expérimental utilisé pour notre étude de déplacement de particules et de cellules sur des guides d'onde optiques. Le lecteur y trouvera également les techniques employées pour la fabrication d'un dispositif de preuve de concept du tri optique.

Après un rappel de la technologie choisie, nous décrirons le banc de manipulation utilisé, suivi d'une description du dispositif élaboré pour obtenir un système complet, permettant la mise en oeuvre d'expériences simples. L'intégration de contraintes physiques et biologiques a été nécessaire afin de concevoir des prototypes pour une problématique cellulaire. C'est pourquoi cette description s'appuiera sur les exigences soulevées par notre étude préalable et par la pratique.

Les méthodes de préparation de l'échantillon, ainsi que les tests de viabilité cellulaire, de prolifération seront également exposés.

Nous terminerons ce chapitre par une description du mode opératoire de la manipulation cellulaire dans des expériences simples de déplacement, puis des expériences plus complexes comme un tri cellulaire.

2.1 Banc de manipulation optique

2.1.1 Rappel du principe

Bien que théoriquement encore mal comprise, la manipulation de particules par champs évanescents permet d'envisager l'extension de la technique des pinces optiques à l'échelle nanométrique. Comme nous l'avons vu précédemment dans la section 1.2.2.3, l'expérience pionnière dans laquelle les particules furent attirées et piégées sur le dessus du guide d'onde par les forces de gradient et propulsées dans la direction de propagation de la lumière par la pression de radiation a été réalisée en 1992.

Depuis, grâce à une poursuite de ces travaux dans les universités d’Osaka et de Southampton, la compréhension des phénomènes en jeu s’est améliorée à un point tel qu’il devient réaliste d’envisager l’association des techniques existantes en piégeage optique et des composants de l’optique intégrée.

Les biologistes pourraient ainsi avoir à leur disposition une “puce optique” pour la manipulation, la détection et le tri de cellules et autres objets biologiques. C’est l’application sur laquelle nous avons concentré nos efforts dans le cadre de ces travaux de thèse. Nous avons donc mis en place une démarche originale afin de démontrer la réalité de ce concept en biologie.

2.1.2 Conditions requises

S’agissant d’un sujet vraiment nouveau et, pour lequel moins d’une dizaine d’articles étaient publiés à l’époque du commencement de nos travaux, il était impossible d’utiliser un dispositif déjà existant et le lancement de ce sujet a donc nécessité le développement d’un prototype de banc de manipulation optique. Cependant, cette approche conférait une certaine souplesse puisqu’il devenait possible de développer un environnement de travail intégrant les contraintes révélées sur la base des travaux de la littérature sur le confinement optique, les brevets existants sur ce thème, ainsi que sur les travaux menés par exemple dans notre laboratoire.

Quelques paramètres particulièrement importants ont ainsi décidé de la configuration finale du dispositif :

- La longueur d’onde de travail doit être compatible avec la manipulation cellulaire (comprise entre 950nm et 1064 nm) [32].
- Le banc devra permettre de travailler dans un environnement liquide compatible avec une suspension cellulaire.
- L’utilisation d’un laser de grande puissance est également nécessaire pour compenser les inévitables pertes d’injection et maintenir une quantité suffisante de lumière dans le guide, quelle que soit la nature de ce dernier.
- En conséquence, il faudra également veiller à minimiser les échauffements thermiques : la suspension cellulaire ne doit pas dépasser une température de 40°C.
- Le dispositif doit également permettre de travailler avec un faible volume d’échantillon de l’ordre de quelques microlitres.
- Il est également nécessaire de disposer d’un puissant système de visualisation des objets déposés sur les guides (taille des objets de l’ordre de 1 à 50 μ m).

- Le banc doit permettre d'utiliser des guides d'onde variés aussi bien en taille que du point de vue de la technique utilisée pour l'injection lumineuse.

Bien que ces travaux aient débuté par une maîtrise du déplacement de microbilles de taille et de nature diverses, mon objectif était de rejoindre rapidement l'état de l'art, appréhender les contraintes propres à cette démarche et transférer l'expertise ainsi acquise au déplacement de matériel biologique.

2.1.3 Description du banc de manipulation optique

2.1.3.1 Vue d'ensemble

Le banc de manipulation optique de particules et de cellules est organisé en une suite de composants pour la plupart habituellement présents dans les laboratoires d'optique mais dont l'organisation est spécifique de l'application visée.

Ce banc a été conçu par des opticiens et l'exigence d'une conformité avec les règles de sécurité laser explique qu'il ait été réglé par des spécialistes. Je suis intervenu dans la conception de ce banc optique pour les questions touchant aux problématiques biologiques.

Le faisceau laser est tout d'abord mis en forme par une série d'éléments optiques puis il est injecté au niveau du guide d'onde et contrôlé à la sortie de celui-ci. Un dispositif d'observation placé au-dessus du guide d'onde permet d'analyser le comportement des particules et cellules en surface de celui-ci (voir figure 2.1).

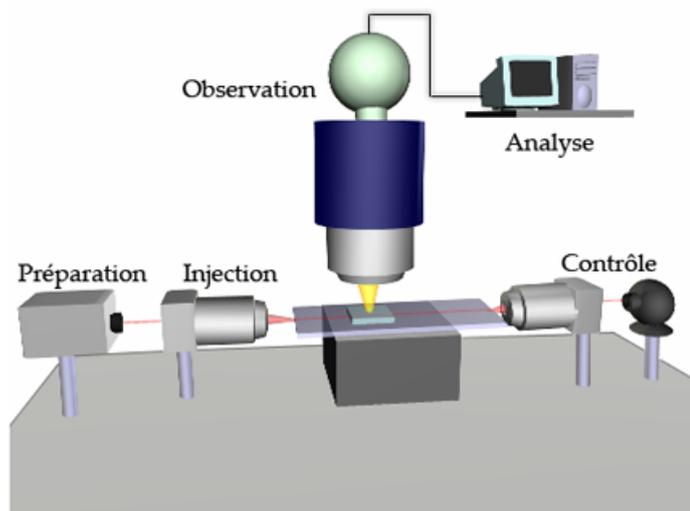


FIG. 2.1 – **Schéma de principe du banc de manipulation expérimental.** *A travers différents modules, le faisceau est préparé, injecté, contrôlé et le comportement des objets déposés en surface du guide est visualisé grâce à un système d'observation puis analysé par un ordinateur.*

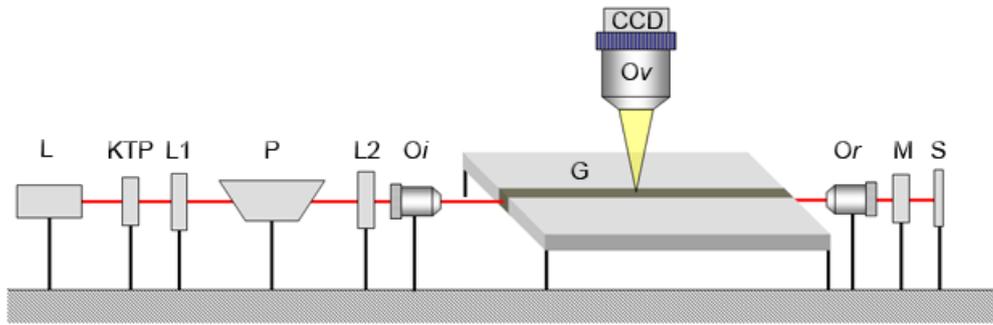


FIG. 2.2 – **Schéma de la chaîne d'éléments constituant le banc de manipulation expérimental.** La lumière issue du laser (L) passe au travers de plusieurs éléments : un cristal doubleur de fréquence (KTP) optionnel, une lame demi-onde ($L1$), un polariseur à angle de Brewster (P), une seconde lame demi-onde ($L2$), un objectif d'injection nanositionné dans les 3 axes (Oi), un guide d'onde (G), un objectif de récupération (Or), un mesureur de puissance (M). Enfin, la lumière est arrêtée par un dispositif stoppeur (S). Un objectif de visualisation (Ov) couplé à une caméra (CCD) permet l'observation des objets déposés sur le guide.

Le faisceau laser passe à travers une série de modules, depuis sa création jusqu'à l'analyse des données recueillies.

La section suivante reprendra dans le détail la description des éléments représentés de façon schématique sur la figure 2.2. Ces unités interviennent dans chacune des étapes, de la préparation du faisceau à son contrôle, en passant par l'observation des objets déposés.

2.1.3.2 Préparation du faisceau laser

Cette section décrira le rôle de chaque unité composant ce bloc fonctionnel.

Le laser.

Le rayonnement est délivré par un laser Nd :YAG (pour Neodymium Yttrium Aluminum Garnet), laser à grenat d'yttrium et d'aluminium dopé au néodyme. La longueur d'onde émise par le laser est de 1064 nm, et sa puissance maximale théorique est de 10W.

Le cristal de KTP

C'est un élément optionnel de la chaîne de conditionnement du faisceau. Il est notamment utilisé dans les phases de réglage de l'injection du faisceau laser dans le guide d'onde. Ce cristal particulier a la propriété remarquable de permettre un doublement de la fréquence laser et par conséquent une division par deux de la longueur d'onde du rayonnement incident. D'invisible, le rayon devient vert et nettement visible. Le mauvais rendement de ce doublement de fréquence est également

un avantage puisqu'il permet d'obtenir en sortie de cristal une puissance très faible, de l'ordre du milliwatt. Ceci permet de réaliser les réglages dans des conditions beaucoup plus sûres.

Les lames demi-onde.

Les lames demi-onde sont un outil optique capable de modifier la polarisation de la lumière la traversant. Elles sont utilisées sur notre banc en combinaison avec un polariseur pour faire varier la puissance injectée et la polarisation lumineuse à l'entrée du guide.

Le polariseur de Brewster.

Il s'agit d'un polariseur à angle de Brewster en silice, traité pour résister aux hautes densités d'énergie. Ce substrat laisse passer la totalité de la composante verticale de la polarisation du faisceau et réfléchit au moins à 95% la composante horizontale. Associé à la lame demi-onde précédente, ce système permet de régler précisément la puissance laser incidente (cf. figure 2.2).

La seconde lame demi-onde permet d'ajuster la polarisation lumineuse :

- mode TE (transverse électrique), où le champ électrique est parallèle à la surface du guide et où le champ magnétique possède une composante dans la direction de propagation de l'onde,
- mode TM (transverse magnétique), où le champ magnétique est parallèle à la surface du guide et où le champ électrique possède une composante dans la direction de propagation de l'onde.

2.1.3.3 L'injection de lumière.

Principe.

Durant cette thèse, des expériences de manipulation ont été réalisées avec des guides d'onde de taille et de nature très différentes (description détaillée au paragraphe 2.2). Pour l'exemple, les plaquettes des guides réalisés par échange d'ions potassium sont de dimensions proches de celles d'une lame de microscope ($76\text{mm} \times 26\text{mm}$) alors que la plaquette des guides de nitrure de silicium est un rectangle de $9\text{mm} \times 18\text{mm}$. De même, les dimensions des deux types de guides n'ont rien de similaire. En effet, les guides réalisés par échange d'ions potassium sont épais de quelques microns, alors que les guides en nitrure de silicium sont d'une épaisseur de l'ordre de quelques centaines de nanomètres.

Cette variabilité des échantillons de guides d'ondes a conduit à utiliser un système de couplage suffisamment souple pour s'adapter à cette diversité : la lumière est injectée dans les guides

par l'intermédiaire d'une fibre optique ou d'un objectif de microscope (figure 2.3). Ces composants ont été choisis spécifiquement de façon à permettre la transmission de la lumière à notre longueur d'onde de travail (1064 nm).

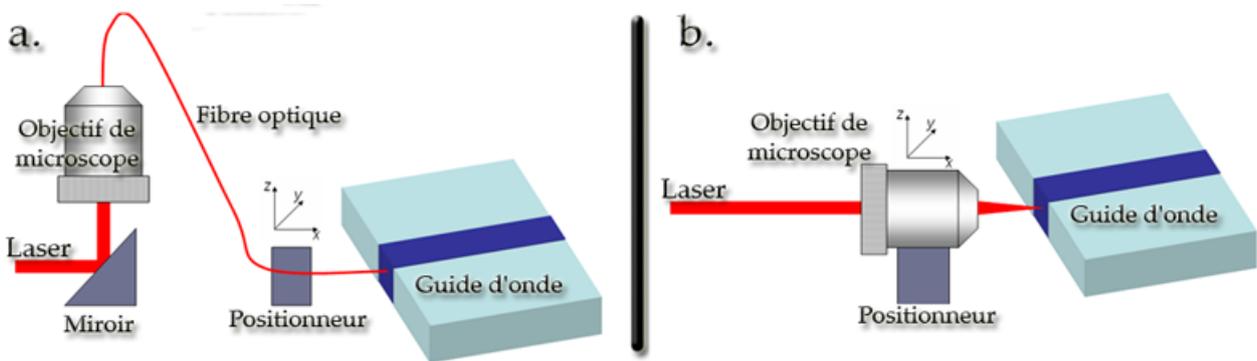


FIG. 2.3 – Les deux modules d'injection de la lumière dans le guide. *a. Injection avec une fibre optique. b. Injection avec un objectif de microscope.*

Couplage par une fibre optique.

L'opération consiste à rapprocher au maximum la fibre optique de l'extrémité du guide d'onde (figure 2.3 a.). La fibre optique est montée sur un micromanipulateur pour le réglage du couplage. Ce mode d'injection aide grandement le réglage car l'expérimentateur voit la fibre et l'extrémité du guide et peut donc faciliter leur alignement. Le dépôt d'une goutte de liquide d'indice sur l'extrémité de la fibre améliore la qualité de l'injection en faisant le lien entre les deux milieux optiques (la fibre et le guide) et en évitant ainsi les réflexions parasites sur les interfaces.

Notre banc utilise un objectif de microscope de grossissement X30 et d'ouverture numérique 0,3 dont la transmission de la lumière est de 76 % à 1064 nm. Au niveau du point focal en sortie de l'objectif, une fibre est positionnée de façon précise par un dispositif optique. Dans notre cas, la taille du faisceau laser est proche de la taille du mode guidé dans la fibre. En conséquence, le taux de couplage entre l'objectif et la fibre est d'environ 76 %.

La lumière laser arrive donc par cet objectif relié à une fibre optique dont l'autre extrémité est fixée sur un positionneur piézoélectrique trois axes de précision nanométrique. Ce positionneur permet de placer précisément la fibre dans l'espace pour la rapprocher au plus près du guide et réaliser une bonne injection lumineuse.

Du fait de la taille importante de la fibre optique, il s'agit d'une méthode mal adaptée aux guides de faibles dimensions, tels que les guides en nitrure de silicium que nous décrirons

ultérieurement. En effet, dans ce cas, le rapport de dimensions de la fibre (quelques microns de diamètre) comparée au guide (200nm de hauteur) défavorise grandement le couplage lumineux.

Couplage par un objectif de microscope.

Le couplage par un objectif de microscope (figure 2.3 b.) est utilisé dans le cas de guides de très faibles dimensions car la technique précédente par fibre optique n'est adaptée qu'aux guides de dimensions micrométriques. Le couplage par un objectif de microscope permet d'obtenir un spot laser de taille très inférieure à celle d'une fibre optique et ainsi d'injecter de la lumière dans de très petits guides (200nm dans notre cas). C'est une méthode simple en apparence mais complexe en pratique. Elle consiste à focaliser le faisceau au niveau de l'extrémité du guide d'onde. Le réglage de l'injection par cette méthode est assez difficile. En effet, contrairement à la méthode précédente, le point focal de l'objectif est extrêmement délicat à visualiser. C'est pourtant ce point focal qu'il faut positionner au niveau de l'extrémité du guide d'onde. Par analogie avec le procédé de couplage décrit précédemment, on peut associer ce point focal laser à l'extrémité de la fibre optique.

En pratique, on utilise un objectif de grossissement X80, et d'ouverture numérique 0,9. Comme pour la méthode précédente, cet objectif a été choisi de façon à transmettre la lumière à 1064 nm de bien meilleure façon que celle d'un objectif standard. Sa transmission est de 82% à 1064 nm. Il est placé sur le même système de positionnement piézoélectrique trois axes que celui décrit précédemment.

2.1.3.4 Visualisation

Le système de visualisation des objets déposés en surface du guide se compose d'un zoom optique, et d'une caméra.

Le zoom.

C'est

un "ultrazoom" 12X de marque Navitar. Il est associé à un objectif de marque Mitutoyo de grossissement 50X et d'ouverture numérique 0,55. L'ensemble autorise une grande flexibilité de zoom pour le manipulateur. Le zoom est muni d'un système d'illumination coaxial.

La caméra de visualisation.

Nous utilisons une caméra miniature dotée d'une matrice CCD 1/2", le modèle Toshiba IK-M41A 1/2" dont le capteur est composé de 410 000 pixels. Ses caractéristiques ne permettent malheureusement pas des temps de pose suffisants pour travailler en fluorescence, ce qui eut

été fort pratique du point de vue du biologiste. Sa disponibilité sur le site a décidé de son incorporation dans le banc optique.

Les données de la caméra sont converties par une carte d'acquisition vidéo en données exploitables sur un ordinateur.

2.1.3.5 Contrôle de la lumière en sortie de guide.

Il s'agit d'une partie du banc permettant d'étudier la forme d'onde guidée ou de mesurer la puissance laser injectée dans le guide.

Etude du mode guidé.

La lumière sortant du guide est collectée par un objectif de récupération (10X, ON=0,25) et focalisée sur une webcam CCD adaptée sur le banc. Il s'agit d'une caméra "Toucam Pro" de Philips équipée d'un capteur CCD Sony format 1/3" de définition VGA (640 x 480 pixels) et de bonne sensibilité (0,5 lux environ).

Le capteur de cette caméra est encore excitable à 1064nm et sa très bonne sensibilité permet de visualiser la qualité de l'injection ainsi que le caractère mono ou multimode du guide injecté.

Contrôle de la puissance injectée.

Le même objectif de récupération que celui décrit précédemment focalise la lumière sur un mesureur de puissance équipé d'un diaphragme permettant d'éliminer la lumière parasite. Ce système permet de déterminer en temps réel la puissance guidée durant l'expérience.

2.2 Echantillons de guides d'ondes

Le banc de manipulation étant décrit, nous allons maintenant nous intéresser au coeur du dispositif, le guide d'onde. Il se compose d'une plaquette de verre ou de silicium, sur laquelle sont alignés plusieurs guides d'onde de largeurs différentes.

2.2.1 Des technologies différentes.

Une collaboration avec une équipe de simulation optique du CEA nous a démontré que les caractéristiques des guides d'ondes pouvait grandement influencer sur le comportement des objets déplacés. La vitesse de déplacement de ces objets serait notamment très dépendante de la nature des guides.

Nous avons tenté de démontrer expérimentalement cette influence avec des guides utilisant trois technologies différentes :

- des guides réalisés par un échange d'ions potassium
- des guides réalisés par un échange d'ions argent
- des guides réalisés par un dépôt de nitrure de silicium.

Ces guides sont différents du point de vue de la technologie utilisée pour leur fabrication mais également du point de vue du confinement de lumière qu'ils autorisent. En effet, ces guides présentent des sauts d'indice optique assez variés.

2.2.1.1 Guides réalisés par échange d'ions potassium.

Ces guides sont issus de l'IMEP (Institut de Microélectronique, Electromagnétisme et Photonique de Grenoble) ¹, un laboratoire qui possède l'expertise et les moyens de fabrication de guides d'ondes par échange ionique.

L'échange d'ions.

Lorsqu'un substrat de verre (contenant du sodium) est plongé dans un bain de sels contenant, par exemple du potassium, un échange d'ions entre le potassium du bain et le sodium du verre s'effectue tout d'abord à la surface du verre (équilibre électrochimique), puis les ions diffusent peu à peu vers l'intérieur (sous l'action d'un gradient de concentration). Ceci conduit à une augmentation locale de l'indice optique du verre, au niveau de la zone d'échange ionique. Lorsqu'un masque métallique imperméable d'aluminium ou de chrome est déposé à la surface du verre, on peut limiter la surface d'échange des ions potassium et ainsi fabriquer des guides bidimensionnels (confinés) de surface (voir figure 2.4).

Cet échange ionique conduit à une augmentation faible de l'indice optique, de l'ordre de 0,01 dans le cas d'un échange au potassium. Au besoin, le guide ainsi formé peut être ensuite enterré à l'intérieur du verre, afin de diminuer les pertes. Ceci peut être réalisé par exemple en appliquant un champ électrique au substrat de verre.

Guides échangés au potassium.

Ces guides ont été réalisés à partir de verre BK7. Le BK7 est un verre optique borosilicate, homogène et relativement exempt d'inclusions. Ses bonnes propriétés physiques et chimiques en font un verre employé couramment dans la gamme de longueurs d'ondes visible et proche infrarouge. La plupart des fenêtres, des objectifs, des prismes employés dans les systèmes optiques, sont réalisés à partir de verre BK7. Les lamelles de microscope standard sont également fabriquées à partir de ce verre.

¹<http://www.imep.enserg.fr>

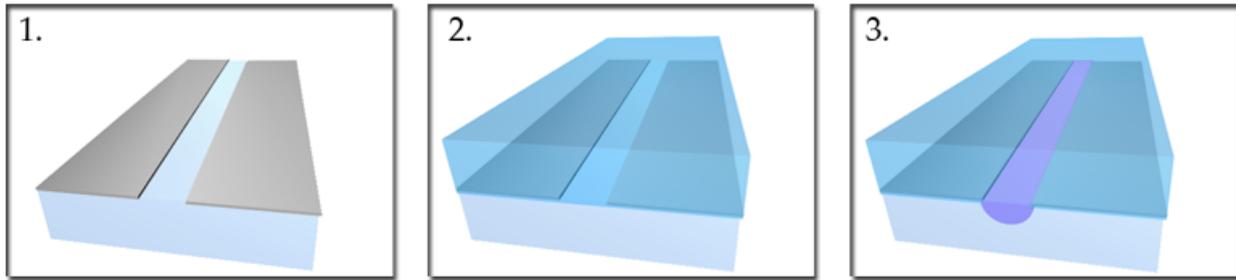


FIG. 2.4 – **Principe de l'échange d'ions.** *Lorsqu'un substrat de verre (contenant du sodium) est protégé par un masque d'aluminium ou de chrome déposé à sa surface (1.) puis plongé dans un bain de sels fondus contenant par exemple du potassium (2.), un échange de ces deux ions s'effectue tout d'abord à la surface du verre par un équilibre électrochimique, puis les ions diffusent peu à peu vers l'intérieur sous l'action d'un gradient de concentration(3.). Le masque d'aluminium ou de chrome permet de limiter la surface d'échange des ions du bain et ainsi fabriquer des guides bidimensionnels (confinés) de surface si la plaquette est masquée partout sauf sur quelques lignes à la surface du verre.*

L'échange d'ions a été réalisé sur des lames de verre BK7 dont la surface d'échange a été limitée par un masque métallique permettant d'obtenir des guides droits, dont la largeur varie de 2 à $10\mu\text{m}$. Cette lame a été plongée dans un bain de sels de potassium à 380°C pendant 1h15. Pendant cet échange, les ions sodium du verre sont remplacés par les ions potassium. Ces derniers étant d'un diamètre supérieur à celui des ions sodium, l'échange ionique provoque des contraintes de compression, qui se manifestent par un bombement de la surface des guides d'environ 60nm (figure 2.5).

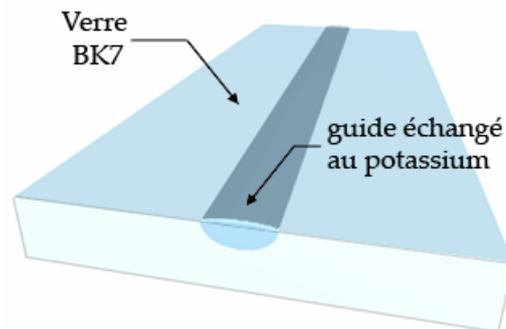


FIG. 2.5 – **Schéma du guide échangé au potassium.** *Il s'agit d'un modèle de guide d'onde réalisé par échange ionique à partir d'une lamelle de verre BK7 plongée dans un bain de sels de potassium fondus. Pendant cet échange, les ions sodium du verre sont remplacés par les ions potassium. Ces derniers étant d'un diamètre supérieur à celui des ions sodium, l'échange ionique provoque des contraintes de compression, qui se manifestent par un bombement de la surface des guides.*

Notre démarche étant basée sur l'utilisation de l'onde évanescente de surface, les guides n'ont pas été enterrés, afin de préserver cette dernière. Lors de l'injection de la lumière laser

par l'intermédiaire de la fibre optique, nous avons mesuré des pertes de *couplage* de l'ordre de 5 dB. Le mode des guides recouvre en effet assez mal celui de la fibre optique. Ces guides ont des facettes clivées, ce qui est a priori moins bon que des facettes polies et peut expliquer les pertes importantes observées pour le couplage. Les pertes de *propagation* sont, quant à elles, d'environ 0,5 dB/cm.

Par la suite, nous désignerons ces guides sous la dénomination de "guides potassium".

2.2.1.2 Guides réalisés par échange d'ions argent

Ces guides ont été fabriqués à Grenoble par le Groupement d'Electromagnétisme Expérimental et d'Optoélectronique, le GEEO ².

Ces guides ont la particularité d'être très légèrement enterrés (figure 2.6). En effet, l'utilisation des ions argent nécessite cet enfouissement pour éviter une oxydation de surface qui serait préjudiciable à notre étude. Cette opération est optimisée de façon à préserver la formation de l'onde de surface.

La technique utilisée pour réaliser cette étape consiste à reconstituer le verre initial en surface. Concrètement, cet enterrage a été réalisé en appliquant un champ électrique au substrat de verre, dont les faces inférieure et supérieure sont en contact avec des bains électriquement isolés.

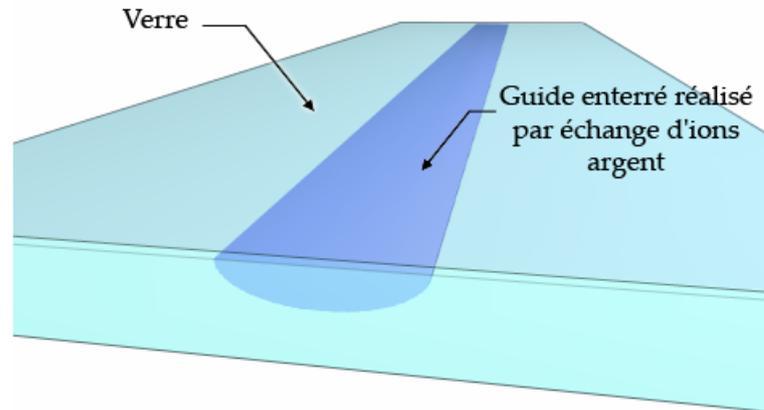


FIG. 2.6 – **Schéma du guide échangé à l'argent.** Comme pour le guide potassium, il s'agit d'un modèle de guide d'onde réalisé par échange ionique. Pour éviter une oxydation de surface qui serait préjudiciable à notre étude, ces guides sont très légèrement enterrés, sous l'effet d'un champ électrique.

Comme pour les guides échangés au potassium, l'écart d'indice Δn est de l'ordre de 0,01, ce qui est plutôt faible. Ces guides ont une largeur variable comprise entre 1,6 et 3,1 μm . Contraire-

²<http://www.geeo.com>

ment aux guides potassium, les profils de modes de ces guides échangés à l'argent ont une forme beaucoup plus circulaire que ceux des guides potassium. Le mode de la fibre optique s'adapte donc assez bien à celui des guides échangés à l'argent et, contrairement aux guides potassium, les facettes de ces guides sont polies. Les pertes de *couplage* sont, par conséquent faibles, de l'ordre de 1 à 2 dB. Les pertes de *propagation* sont de l'ordre de 0,25 dB/cm.

Par la suite, nous désignerons ces guides sous la dénomination de “guides argent”.

2.2.1.3 Guides réalisés par dépôt de nitrure de silicium

Ces guides ont été réalisés par le CEA/LETI.

Principe.

A la différence des guides réalisés par la méthode d'échange d'ions décrite précédemment, ce type de guide utilise des matériaux d'indice optique différents afin de guider la lumière. Plus précisément, ces guides utilisent le nitrure de silicium ($n=1,98$ à 1064 nm) comme zone guidante. Ce matériau est déposé sous la forme d'un film très mince sur une couche de silice ($n=1,45$ à 1064 nm) par la technologie LPCVD (Low Pressure Chemical Vapor Deposition), un dépôt chimique en phase vapeur et à basse pression. Une méthode de gravure ionique appelée RIE (Reactive Ion Etching) est utilisée pour définir des guides d'onde sous la forme de rubans de nitrure de silicium. Le substrat de départ est le silicium mais il est absorbant à notre longueur d'onde de travail, et c'est pourquoi, avant le dépôt de la couche de nitrure, une couche de silice lui est superposée de façon à éviter que la lumière ne s'y propage.

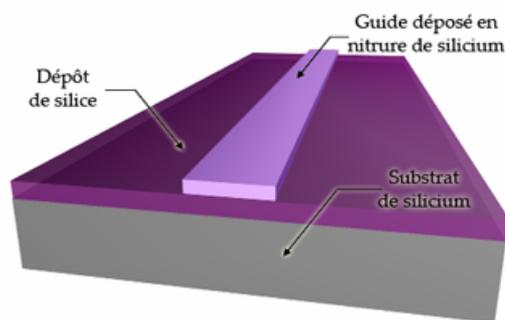


FIG. 2.7 – **Schéma des guides en nitrure de silicium.** Ces guides sont réalisés par dépôt puis gravure d'une couche de nitrure de silicium qui forme la zone guidante du dispositif. Cette couche est déposée sur une autre couche de silice, destinée à éviter les fuites de lumière dans le substrat de silicium. Note : les couches et le guide d'onde ne sont pas à l'échelle sur le schéma.

Spécifications.

La couche de silice déposée sur le substrat de silicium a une épaisseur de 2 microns. Les

guides réalisés par dépôt de nitrure de silicium ont une épaisseur de 200 nanomètres et une largeur comprise entre 1 et 10 microns (schéma 2.7). A la différence des guides à échange d'ions potassium et argent décrits précédemment, les guides dessinés sur ce type d'échantillons ne sont pas uniquement des guides droits. En effet, lors du dessin des guides, nous avons incorporé des motifs de jonction en Y et d'autres motifs particuliers, notamment des guides courbes.

Aucun de ces guides n'est monomode, les guides injectés présentent plusieurs formes d'onde lumineuse lors d'une injection. Il en résulte qu'en pratique les objets déplacés sur ces structures vont parfois suivre des trajectoires en zigzag, les particules suivant en permanence les maxima locaux d'intensité lumineuse sur le guide (voir figure 2.8).

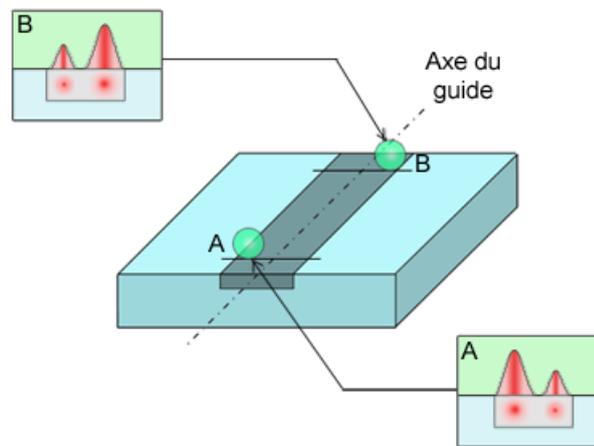


FIG. 2.8 – **Guide multimode.** D'un point à l'autre du guide, le profil d'intensité lumineuse varie dans un guide multimode. Sur cet exemple, au point A, le profil d'intensité représenté dans la vignette est tel que la force de gradient aura tendance à piéger les particules au niveau du mode le plus intense en ce point, sur la gauche du guide dans ce cas. Ailleurs, comme par exemple au point B, le profil d'intensité lumineuse peut être différent. La force de gradient piégera toujours les particules au niveau du maximum local d'intensité mais sur la droite dans cet exemple. En pratique cela se traduit par un zigzag des particules sur le guide, qui se placent en permanence à l'endroit où l'intensité est la plus importante.

En raison de ce caractère multimode des échantillons de guides nitrure, le profil d'intensité lumineuse en surface est complexe et varie : l'intensité est répartie dans la largeur du guide au lieu d'être concentrée en son centre (profil d'intensité gaussien).

Ce paramètre a une incidence directe sur la vitesse des objets déplacés, puisqu'au lieu de se déplacer en ligne droite, ces derniers seront propulsés à une vitesse globale moindre étant donné leur trajectoire non rectiligne utilisant la largeur du guide (voir figure 2.9). C'est une caractéristique intrinsèque de ces guides et qui est insurmontable.

Les pertes de *propagation* sont de l'ordre de 2 dB/cm. Mais elles peuvent augmenter jusqu'à

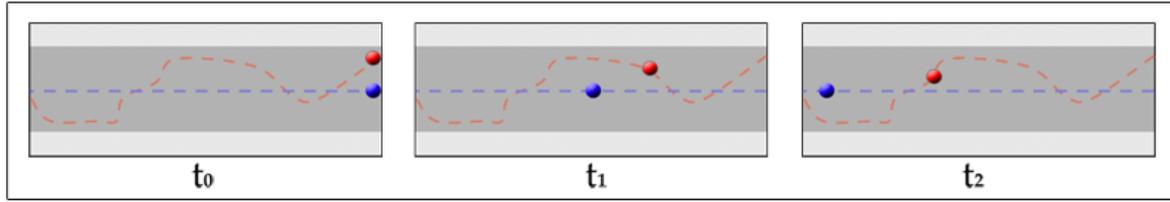


FIG. 2.9 – **Influence de la multimodalité d'un guide sur la vitesse des objets déplacés à sa surface.** Dans cet exemple, on suppose que les particules sont déplacées de la droite vers la gauche sur le guide d'onde. Que le guide soit multimode ou monomode, la bille est toujours piégée sur le maximum d'intensité lumineuse, en surface du guide. Dans le cas d'un guide multimode (bille et trajectoire rouges) la bille peut être amenée à suivre une trajectoire non rectiligne, alors que dans le cas d'un guide monomode (bille et trajectoire bleues) le chemin parcouru a l'allure d'une ligne droite. Ceci a pour conséquence une vitesse plus faible des billes placées sur un guide multimode comparé à un guide monomode, du fait d'une plus faible distance parcourue par unité de temps.

3 dB/cm en polarisation TE et bien plus brutalement jusqu'à 14 dB/cm en polarisation TM. Il conviendra de considérer avec attention ce paramètre lors de nos futures expériences. La polarisation de la lumière peut en effet théoriquement influencer sur le comportement des particules déplacées.

La couche de silice déposée sur le silicium est d'une épaisseur malheureusement insuffisante à notre longueur d'onde de travail pour éliminer les fuites de lumière dans le substrat de silicium et cette caractéristique explique les pertes de propagation importantes citées ci-dessus. La nature intrinsèque de ces guides nous oblige à recouvrir la totalité du guide d'onde d'une pellicule d'eau pendant l'expérience puisque ces guides ont été élaborés de façon à fonctionner avec un superstrat d'eau.

L'expérience montre que lorsque ces guides sont recouverts d'air, la propagation de la lumière dans le guide est très perturbée, ce qui se traduit par une diminution de l'efficacité de couplage et une fuite de lumière dans le substrat. Ces paramètres seront à prendre en compte lors de l'élaboration d'un dispositif destiné à recevoir l'échantillon et à être placé sur la plaquette de guide d'onde. D'une façon générale, l'expérimentateur doit faire très attention à ce que le guide d'onde utilisé soit toujours recouvert d'une fine pellicule d'eau et à ce qu'aucune bulle ne vienne se placer au-dessus de ce guide.

Couplage.

Les guides utilisés étant de dimensions très inférieures au micron (Rappel : 200nm de hauteur), l'injection de lumière dans le guide devient particulièrement délicate. Comme les guides

réalisés par échange d'ions argent, les facettes de ces guides sont polies, ce qui améliore sensiblement la qualité de l'injection. Pour ce type d'échantillons, c'est la méthode d'injection par un objectif de microscope qui est utilisée. Les pertes de *couplage* sont très importantes, de l'ordre de 13 dB. Il existe cependant dans la littérature des dispositifs qui ont démontré leur utilité dans l'amélioration de la qualité du couplage avec des guides en nitrure de silicium. Ces structures en pointes, appelées *taper* permettent d'obtenir de très bons taux de couplage, de l'ordre de 80 % [121]. L'utilisation de tels dispositifs n'a pas pu être entreprise faute de temps.

Par la suite, nous désignerons ces guides sous la dénomination de "guides nitrure".

2.2.1.4 Conclusion

Les guides utilisés pour nos expériences diffèrent fortement les uns des autres, que ce soit par la méthode employée pour leur fabrication ou par l'écart d'indice optique qu'ils permettent d'atteindre. Le lecteur trouvera un résumé des principales caractéristiques de ces guides dans le tableau suivant.

Type de guide	Δn	Pertes de couplage	Pertes de propagation	Dimensions ($l \times h$)
Potassium	0,01	5 dB	0,5 dB/cm	1-10 μm x qq μm
Argent	0,01	1 - 2 dB	0,25 dB/cm	1,6-3,1 μm x qq μm
Nitrure de silicium	0,52	13 dB	2 dB/cm 14 dB/cm (mode TM) 3 dB/cm (mode TE)	1-10 μm x 200 nm

TAB. 2.1 – Tableau récapitulatif des caractéristiques de chaque type de guide d'onde utilisé.

Il ressort de cette comparaison que les guides permettant l'écart d'indice le plus élevé ont malheureusement un rendement de couplage assez faible. Toute la problématique est là : le confinement de lumière est le plus important mais les pertes de couplage et les dimensions sont telles qu'il est assez difficile d'injecter de la lumière dans ces guides nitrure. Cependant, ce sont les candidats théoriques les plus performants en vue de nos applications de déplacement de particules et de cellules.

2.3 La chambre d'observation et de manipulation

2.3.1 Présentation

Lors de chaque expérience, les particules ou les cellules sont déposées en surface des guides dans un dispositif d'observation rempli d'une solution aqueuse compatible avec les échantillons utilisés. Comme nous l'avons vu précédemment, le système développé devra permettre l'observation du comportement des particules en surface du guide injecté mais également permettre un recouvrement permanent du guide nitrure utilisé par un film d'eau, ceci tout en minimisant la formation de bulles préjudiciables à l'étude.

Dans le cas des guides réalisés par échange d'ions, nous avons utilisé une chambre de type *gene frame* © (Millian France). Il s'agit d'un système de jointure souvent utilisé en biologie pour les procédures d'hybridation et d'amplification in situ sur des biopuces à ADN en lame de verre. Ce dispositif est imperméable aux gaz et prévient la perte de réactif due à l'évaporation. Il se présente sous la forme d'un adhésif double face délimitant une chambre intérieure d'un volume de 25 μL ou 65 μL selon la référence employée. En déposant une lamelle de microscope sur le dessus de cet adhésif, on obtient un dispositif simple qui définit un espace fermé de volume connu et permet de travailler à l'abri des perturbations dues aux écoulements et à l'évaporation (voir figure 2.10). Utilisé sur les guides à échange d'ions, il ne perturbe pas l'injection de lumière.

En revanche, la pratique a révélé que tout objet déposé sur un guide de nitrure de silicium perturbe grandement l'injection de lumière et stoppe la propagation de la lumière dans le guide au niveau de l'objet déposé. Par objet, nous entendons ici un corps solide de dimensions très supérieures au micron, car en pratique, l'interaction de microbilles ou de cellules avec le guide injecté perturbe très peu l'injection de lumière. C'est un paramètre issu de l'expérience et dont il a fallu tenir compte pour la conception du dispositif.

Ceci contraint le manipulateur à travailler avec une chambre d'observation partiellement ouverte (voir figure 2.11). Nous avons utilisé ce système de chambre notamment pour les expériences de déplacement de particules, qui seront exposées au chapitre suivant.

Ce système de chambre ouverte est le seul moyen à notre connaissance qui permette de supprimer le découplage de lumière dû à la perturbation du mode guidé, exception faite de la réalisation d'une chambre de silice pour cet usage. Bien que théoriquement possible et satisfaisante, cette solution aurait vraisemblablement été longue à obtenir et avec le risque d'endom-

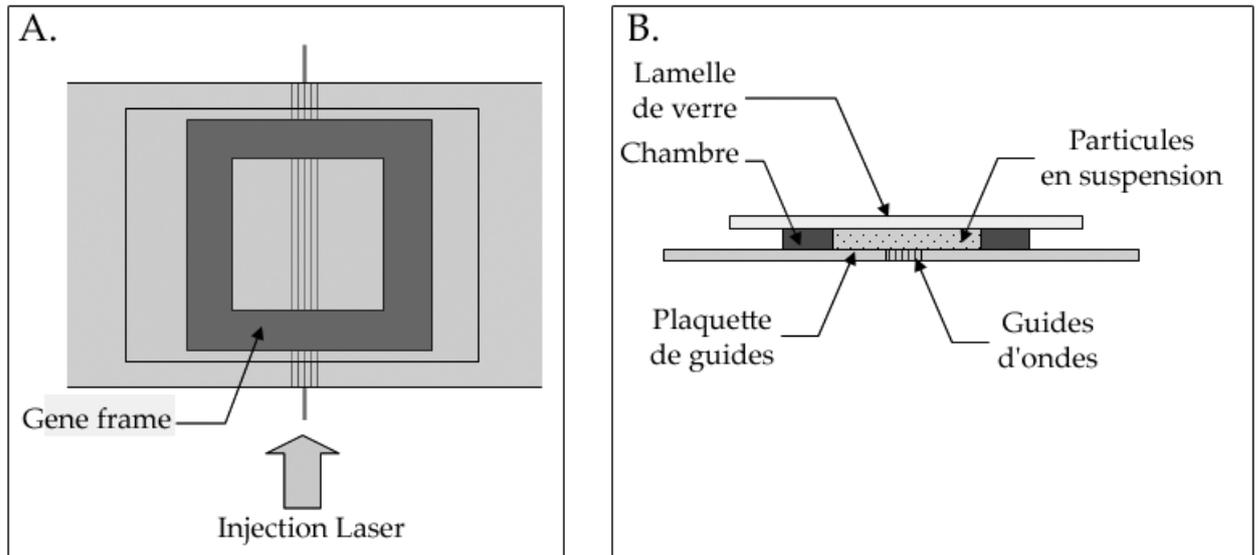


FIG. 2.10 – Schéma de la chambre d'observation utilisée pour les expériences menées sur les guides réalisés par échange d'ions. En A, une vue de dessus de la chambre d'observation. Nous avons utilisé un gene frame \odot , un adhésif double face délimitant une chambre intérieure où l'échantillon sera déposé. En B, une vue transversale du dispositif utilisé. Le gene frame \odot est rempli d'une suspension liquide de billes ou de cellules et recouvert d'une lamelle de verre.

mager nos échantillons.

Une chambre ouverte au niveau des guides était donc une solution préférable de ce point de vue. Malheureusement, cette configuration ouvre la porte aux problèmes d'évaporation et de mouvement de fluides. Toute la difficulté de cet exercice consiste à permettre une injection de lumière satisfaisante tout en minimisant les phénomènes liés à l'évaporation de liquide.

Une chambre microfluidique intégrant ces contraintes a donc été conçue dans le but de minimiser ces phénomènes parasites.

Ce système que l'on adapte sur la plaquette d'échantillons de guides d'ondes, doit pouvoir servir de réservoir de milieu liquide et de matériel (microbilles ou matériel cellulaire) et permettre la démonstration sur ce même matériel de la réalité de ce nouveau concept de manipulation et de tri, tout en permettant une observation correcte du comportement des objets étudiés.

Lors du démarrage de cette thèse, l'état de l'art était relativement peu développé. La compréhension des mécanismes d'interaction entre une onde évanescente et un objet était, et reste encore incomplète. Et malgré une réflexion préalable intégrant les contraintes déjà identifiées à l'époque et de précieuses simulations, dans un cas comme celui-ci, des problèmes peuvent

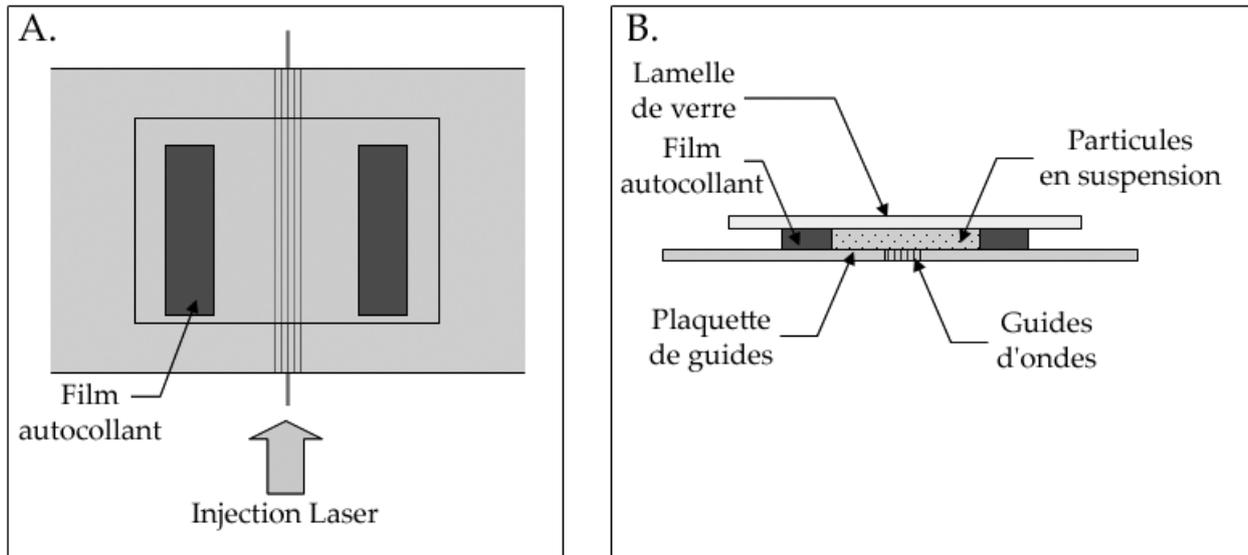


FIG. 2.11 – Schéma de la chambre d’observation ouverte utilisée pour les déplacements de particules sur des guides de nitrure de silicium. En A, une vue de dessus de la chambre d’observation. Nous avons utilisé deux bandes de gène frame disposées de façon parallèle, sans aucun contact optique avec les guides d’ondes. En B, une vue transversale du dispositif utilisé. Une goutte de suspension liquide de billes d’environ $30\mu\text{L}$ est déposée entre les bandes de gène frame. L’ensemble est ensuite recouvert d’une lamelle de verre pour étaler la goutte déposée et permettre une bonne observation.

apparaître de façon peu ou pas prévisible. Pour citer un exemple, le découplage de lumière par un objet déposé sur le guide (voir la section 3.3.8.3) est une contrainte issue de l’expérience et non prévue par l’étude préliminaire. Une méthode de prototypage souple, rapide et peu chère était donc nécessaire pour réagir presque instantanément aux problèmes rencontrés et permettre le test d’une solution dans un intervalle de temps le plus court possible.

2.3.2 Choix du matériau de construction

Bénéficiant des technologies issues du domaine de la micro-électronique, les systèmes microfluidiques basés sur le verre ou le silicium étaient majoritaires durant les premières années qui ont suivi la naissance des microTAS. L’expertise du CEA et notamment du Leti en matière de micro-électronique aurait pu orienter notre choix vers ces matériaux classiques. Les techniques dérivées de la micro-électronique, comme par exemple la photolithographie ou la gravure du silicium ou de l’oxyde de silicium, auraient pu être utilisées. Mais l’extension des applications de ces matériaux a été grandement limitée par leur prix relativement élevé et le temps nécessaire à leur production.

En effet, le silicium est un matériau relativement onéreux qui a de plus l’inconvénient d’être

opaque aux longueurs d'onde visibles du spectre lumineux, ce qui le rend inadapté du point de vue de la détection optique. Le verre est, quant à lui, transparent. Mais parce qu'il est amorphe, la gravure de motifs verticaux est plus difficile à réaliser que pour le silicium. De plus, bien que ces techniques soient connues, leur réalisation n'est souvent possible que dans un environnement exempt de poussières, disponible dans un milieu du type des salles blanches. Ces procédés requièrent également souvent de hauts voltages ainsi que des hautes températures. Nous avons donc cherché une méthode et des matériaux plus adaptés à notre problématique.

Depuis les travaux pionniers dans le domaine de la microfluidique, la communauté scientifique a manifesté un intérêt croissant pour de nouveaux types de matériaux et notamment les polymères. Des polymères [122] tels que le polyméthylméthacrylate (PMMA) [123] et le polyethylene terephthalate (PET) [124] ont été introduits en tant que substituts au silicium et au verre dans la fabrication de systèmes microfluidiques de par leur faible coût. Contrairement au silicium et au verre, des canaux ainsi que des motifs complexes peuvent être formés par simple moulage plutôt que par gravure.

2.3.2.1 Un matériau intéressant : le poly(diméthylsiloxane)

Suite à une étude bibliographique, nous avons choisi de former notre dispositif microfluidique en poly(diméthylsiloxane) (PDMS), un matériau qui n'a cessé de gagner en popularité durant la dernière décennie, particulièrement dans le domaine de la microfluidique. La formule chimique du PDMS est $(CH_3)_3SiO[SiO(CH_3)_2]_nSi(CH_3)_3$, où n est le nombre de répétitions des unités du monomère $[SiO(CH_3)_2]$. Le PDMS utilisé dans ces expériences est constitué de deux composés, une base et un agent de polymérisation (Dow Corning Sylgard Elastomer 184). Les groupements hydrure de silicium (Si-H) présents dans l'agent de polymérisation réagissent avec les groupes vinyle (i.e. les doubles liaisons C=C) présents dans la base et forment un solide élastomérique et réticulé.

Le PDMS possède plusieurs caractéristiques avantageuses [83], [125], [126]. C'est un matériau environ 50 fois meilleur marché que le silicium [127] et il est tout à fait adapté pour la fabrication de systèmes de micro canaux pour une utilisation avec du matériel biologique, ceci pour plusieurs raisons :

- (i) des détails de l'ordre du micron peuvent être reproduits avec une grande fidélité dans du PDMS par moulage ;
- (ii) il est optiquement transparent (85% de transmission entre 280 et 600nm [128]) et peut donc être utilisé pour un grand nombre de détections (par exemple pour l'absorbance et

- la fluorescence en UV et visible) ;
- (iii) il polymérise à des températures relativement basses ;
 - (iv) il n'est pas toxique ; des cellules de mammifères peuvent être cultivées directement sur du PDMS et des dispositifs fabriqués à partir de ce matériau peuvent être implantés *in vivo* ;
 - (v) il peut être déformé de façon réversible ;
 - (vi) il peut être scellé de façon réversible à lui-même ainsi qu'à une grande variété d'autres matériaux (dont le verre et le silicium) par des contacts moléculaires de type Van der Waals avec la surface ou être scellé de façon irréversible après exposition par exemple à un plasma oxygène par formation de ponts covalents ;
 - (vii) sa nature élastique l'autorise à se détacher des motifs délicats du moule sans endommager ces derniers ni lui-même.

Pour toutes ces raisons, le PDMS nous est apparu comme un matériau très prometteur pour la réalisation de ce dispositif.

En dépit des nombreux avantages du PDMS mentionnés ci-dessus, la faible mouillabilité de sa surface est un inconvénient significatif. Le PDMS non traité est hydrophobe, avec un angle de contact d'environ 108° dû aux groupements méthyle hydrophobes [129]. Plusieurs travaux ont montré que le traitement de la surface du PDMS par un plasma d'oxygène réduit l'hydrophobicité du PDMS [129]. D'après la littérature disponible, il semblerait que ce traitement génère des groupes silanols (Si-OH) sur la surface du PDMS par des réactions d'oxydation [130]. Ce traitement donne un caractère hydrophile aux surfaces de PDMS exposées à ce traitement, mais celles-ci ne restent pas hydrophiles longtemps. Une surface ainsi oxydée retourne à l'état hydrophobe dans les heures qui suivent le traitement. De nombreux travaux suggèrent que le stockage dans l'eau désionisée réduit grandement le taux du rétablissement de l'état hydrophobe, jusqu'à pratiquement autoriser une conservation sans limite de temps du caractère hydrophile des surfaces exposées [125], [131], [132].

2.3.3 Différents procédés de fabrication

L'utilisation du PDMS est devenue de plus en plus fréquente de par sa facilité de préparation [126], [99]. La fabrication de systèmes microfluidiques en PDMS peut être simplement réalisée en (i) déposant le mélange de monomère de PDMS et d'agent de polymérisation sur le moule et (ii) en chauffant ce mélange à température modérée ($65 - 70^\circ\text{C}$) pendant 1 à 2 heures [125].

Des méthodes variées pour la fabrication des moules ont été développées pour des études de systèmes microfluidiques en PDMS [133], [134], [135], [136]. Au départ, Effenhauser *et al.* utilisèrent un wafer de silicium à dessin positif comme moule [133]. L'équipe de Whitesides créa par la suite un procédé de prototypage rapide pour fabriquer des moules en combinant l'impression à très haute résolution (3386 dpi) à la photolithographie [134]. Ces deux procédés ont été largement appliqués et le lecteur désireux d'en savoir plus pourra se référer à des articles de référence [99], [126]. Pour simplifier encore plus et accélérer la fabrication des moules, Whitesides et ses collaborateurs ont amélioré leur propre méthode en utilisant des procédés photolithographiques combinés à l'utilisation d'imprimantes de bureau (600 dpi) pour remplacer les imprimantes à haute résolution [135].

Cependant, bien que cette méthode soit rapide, elle nécessite tout de même l'utilisation de résine photosensible. C'est pourquoi des dispositifs et des technologies spécifiques furent développés pour permettre une fabrication plus simple de ces moules [137], [138], [139]. Pour fabriquer des structures microfluidiques de PDMS en trois dimensions, Whitesides et ses collaborateurs utilisèrent l'impression d'objets solides pour réaliser le masque directement [137]. Glennon et ses collaborateurs [138] développèrent la fabrication rapide de moules utilisant une machine photocopieuse pour transférer la structure imprimée sur un film transparent. La validité de ces protocoles a été démontrée à la fois en salles blanches (équipements lourds et spécifiques) ainsi qu'en laboratoire (équipement général). Ces approches permettent d'éviter les procédés photolithographiques.

Récemment, do Lago et ses collaborateurs ont développé un système microfluidique en utilisant deux transparents imprimés en symétrie miroir à l'aide d'une imprimante de bureau (600 dpi)[140]. L'encre déposée ne mesurant que six microns de hauteur, le dispositif microfluidique ainsi produit se compose donc des deux films transparents et de l'encre imprimée. Cette même équipe développa un peu plus tard une méthode alternative basée sur le dépôt d'encre laser sur un substrat de verre. Les imprimantes commerciales étant incapables d'imprimer directement sur le verre, l'encre doit d'abord être déposée sur un papier spécial puis transférée par chauffage et sous pression à la surface de verre. Bien que cette procédure soit plus complexe que la précédente, elle peut être répétée plusieurs fois (jusqu'à quatre couches de motifs ont pu ainsi être empilées de façon satisfaisante).

Pour nos travaux, nous avons simplifié la méthode de lithographie douce du Pr. Whitesides en supprimant l'étape de photolithographie. Nous avons utilisé un film transparent commercial imprimé directement à l'aide d'une imprimante laser commerciale de bureau (résolution de 1200

dpi). Les motifs imprimés sur ce transparent servent ensuite de moule pour le PDMS. Cette méthode est pratique, peu chère, et extrêmement rapide pour la conception de prototypes microfluidiques notamment fabriqués en PDMS. Quant à la résolution, elle est largement suffisante pour ce qui concerne nos travaux.

L'utilisation de l'encre déposée sur le transparent en tant que moule est une méthode très directe qui évite les étapes de transfert et élimine par conséquent les erreurs propres à cette démarche. La hauteur d'encre du motif imprimé, de l'ordre d'une dizaine de microns, permet d'utiliser cette encre comme relief positif. Cette hauteur d'encre est suffisante pour autoriser la circulation de matériel biologique, et notamment de cellules (globules rouges et lymphocytes), dans les micro canaux fabriqués par cette méthode. Il convient de souligner qu'avec cette approche, le temps total depuis le dessin des moules jusqu'à la création du système microfluidique en PDMS est réduit de façon significative, sans dispositif spécifique. Cette technique permet le test d'un prototype dont le moule a été créé moins de trois heures auparavant. Il m'a ainsi été possible de réaliser plusieurs cycles successifs de conception, production et test d'un dispositif dans la même journée.

2.3.4 Démarche et étapes de réalisation

Les micro canaux du dispositif ont été fabriqués à partir d'un transparent imprimé par laser en utilisant la procédure de lithographie douce [125]. Le transparent commercial utilisé est identique à celui employé en routine au laboratoire. L'imprimante utilisée est une HP LaserJet 4100 équipée d'une cartouche de toner C8061 [141]. Elle est utilisée à une résolution de 1200x1200 dpi. Le dessin des lignes sur le transparent a été réalisé à l'aide des logiciels Adobe Freehand et Microsoft PowerPoint. Il est important de noter que, lorsque cela s'avère nécessaire, l'impression de deux lignes orthogonales est réalisée en deux étapes : ceci afin d'obtenir une qualité d'impression identique pour les deux lignes. En pratique, le transparent est découpé sous la forme d'un carré (21x 21cm) puis les lignes horizontales sont d'abord imprimées sur le transparent. Ce dernier est ensuite retourné de 90° et les lignes verticales sont également imprimées à l'horizontale.

L'étape suivante est la production d'une réplique en PDMS d'un moule. Pour construire une réplique, on mélange les deux composés ensemble (typiquement dans un ratio de 10 :1 (v/v) base/agent de polymérisation), puis on verse le liquide pré-polymère sur le moule-transparent avant de mettre à cuire environ 1h15 à 70°C. Le PDMS pré-polymère liquide s'adaptant à la forme du moule reproduit ainsi les détails avec une grande fidélité (quelques dizaines de nanomètres). La très faible énergie de surface du PDMS (22 mN/m) et son élasticité lui permettent, une fois

cuit, de se désolidariser du moule sans endommager ni le moule ni lui-même.

Le dispositif de PDMS, une fois cuit, est nettoyé à l'acétone puis à l'eau et enfin à l'éthanol pour éliminer les traces d'encre du moule restant après démoulage. La chambre de PDMS est ensuite déposée sur la plaquette d'échantillon.

L'un des avantages du PDMS est qu'il peut se lier à lui-même ou à d'autres surfaces, de façon réversible ou irréversible, sans distorsion. Le PDMS moulé sur une surface lisse peut très bien se lier à d'autres surfaces lisses même si celles-ci ne sont pas parfaitement planes, car il est élastomérique. Un scellement réversible (actions des forces de Van der Waals) réalisé par un simple contact, est imperméable à l'eau mais ne peut pas supporter des pressions supérieures à environ 350 mbar [126]. C'est ce type de scellement que j'ai principalement utilisé dans mes expériences, lors du dépôt de cette chambre sur la plaquette de guides d'ondes.

Pour réaliser un scellement irréversible, on expose le PDMS et, selon les cas, la seconde surface, à un plasma d'oxygène pendant environ 1 minute [126], [142]. Ce processus de scellement, bien que simple et facilement reproductible, requiert cependant une certaine maîtrise technique. Les deux surfaces doivent être mises en contact rapidement, moins d'une minute après l'oxydation, car les surfaces du PDMS oxydé se reconstruisent rapidement à l'air libre [143], [144]. La conservation dans de l'eau pure désionisée ou des solvants organiques polaires maintient le caractère hydrophile de la surface de PDMS pendant un temps que j'ai mesuré comme supérieur à 24 heures, bien que certains auteurs estiment que ce procédé permet de conserver indéfiniment le caractère hydrophile du PDMS oxydé [134], [143].

Une méthode alternative développée par Quake *et al.* pour sceller de façon irréversible deux morceaux de PDMS consiste à ajouter un excès de base à l'une des parties et d'agent de polymérisation à l'autre partie [145]. Quand les deux parties sont mises en contact et cuites de nouveau, elles ne peuvent plus être distinguées l'une de l'autre. Quake *et al.* ont utilisé cette technique notamment pour réaliser des dispositifs PDMS en plusieurs couches.

L'expérience m'a démontré qu'il est possible de simplifier cette méthode en déposant du PDMS liquide pré-polymère sur les surfaces de PDMS que l'on désire sceller, avant de mettre l'ensemble à cuire. Cette méthode fonctionne avec les ratios habituels, sans utiliser d'excès de base ou de réticulant et s'avère pratique lorsque l'on désire réaliser des empilages de motifs particuliers pour des dispositifs plus complexes.

La validation de notre amélioration de la technique de lithographie douce a été effectuée par des tests de circulation de matériel biologique dans les canaux. En pratique, cette méthode permet d'obtenir des micro canaux de PDMS d'une hauteur suffisamment importante pour

permettre une circulation fluide et rapide d'érythrocytes humains (7 microns) dans des canaux réalisés selon cette méthode. Ceci m'a également permis d'observer une circulation fluide et rapide, dans des micro canaux ainsi réalisés, de lymphocytes humains, dont la taille est comprise entre 10 et 15 microns de diamètre. En imprimant à l'identique le même motif en deux étapes successives au même endroit sur le même transparent, il est théoriquement possible d'augmenter l'épaisseur totale d'encre déposée et donc la taille des futurs canaux.

Cette phase de tests a fait apparaître un paramètre critique : l'évaporation de milieu liquide. Ce phénomène, accentué par l'importante ventilation de la salle dans laquelle se trouve notre banc de manipulation, provoque des mouvements parasites de fluide qui sont évidemment préjudiciables à nos expériences de déplacement. L'intégration de cette contrainte s'est effectuée par le développement de petits réservoirs de tampon pour compenser les inévitables pertes dues à l'évaporation. Les objets destinés à former ces réservoirs seront placés sur le moule transparent imprimé, avant le dépôt de PDMS pré-polymère.

Pour réaliser le moulage de ces réservoirs, mon choix s'est porté sur des argiles polymères. Ces pâtes sont également connues sous le nom de *polyclay*. C'est une matière notamment employée dans l'industrie du cinéma d'animation pour réaliser les sculptures de base d'un personnage. Il s'agit d'une argile polymère constituée essentiellement de minuscules particules de chlorure polyvinyle (PVC). Cette pâte polymère doit être cuite au four. Sous l'effet de la chaleur, les particules de PVC fondent et forment un condensé de matière solide. J'ai donc combiné ma méthode précédente de lithographie douce avec l'utilisation de pâte polymère.

L'argile polymère utilisée est la pâte *FIMO® classic* de Eberhard Faber. Il s'agit d'un matériau souple à partir duquel il est assez simple de réaliser de petits objets. Sa consistance lui permet de ne pas s'écraser lors de la découpe et de conserver les dimensions désirées par l'utilisateur. La découpe au scalpel donne un résultat propre et net. Les petits objets ainsi réalisés sont ensuite déposés sur une lamelle de verre et cuits au four à 130°C pendant environ 30 minutes conformément aux indications du fabricant. L'objet, une fois cuit, présente une surface douce et sans rugosités.

J'ai utilisé cette technique pour réaliser des éléments de grand volume (environ 100 μL) à placer sur une surface limitée (9x18 mm) correspondant à l'espace disponible sur les plaquettes de guides nitrure. Bien entendu, cette méthode est plus grossière que la stéréolithographie [146], [147], [148], ou l'impression d'objets solides par dépôt de couches de thermoplastique [137]. Cependant, elle convient tout à fait pour notre étude en termes de précision, état de surface et temps de réalisation.

Afin de contrer l'évaporation du milieu liquide pendant l'expérience, un morceau d'argile polymère cuite est donc judicieusement posé sur le motif imprimé. Une fois moulé, cet espace servira de réservoir pour compenser cette évaporation (voir figure 2.12).

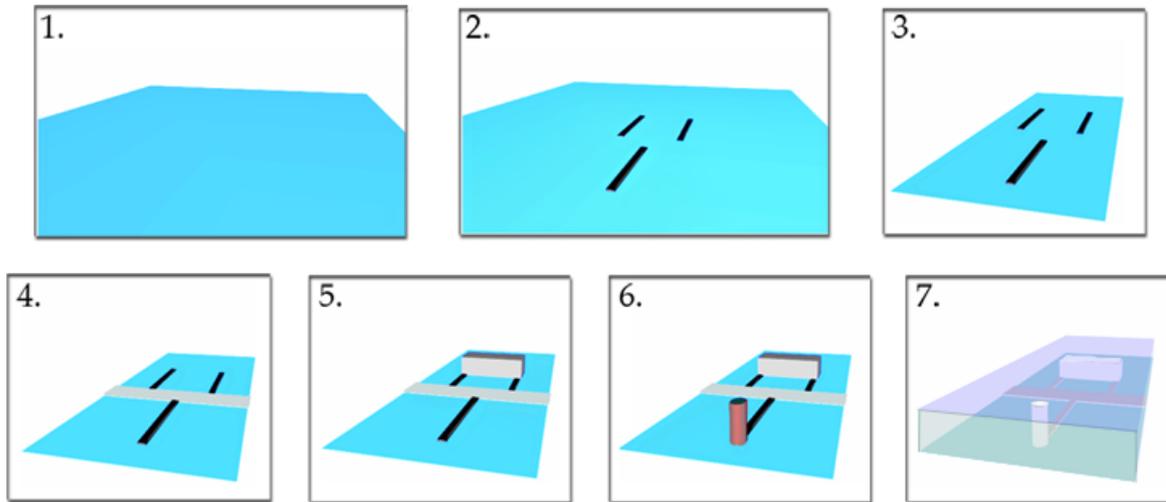


FIG. 2.12 – Schéma de principe de la réalisation du dispositif de PDMS. *Le transparent (1) subit une impression de toner par une imprimante laser (2) puis il est découpé (3). La zone correspondant aux guides d'ondes est protégée par un film adhésif (4) avant d'ajouter une pièce de polyclay cuite pour former un réservoir de liquide (5) et un tube de verre pour délimiter l'espace d'injection de l'échantillon (6). Le PDMS pré-polymère liquide s'adapte au moule ainsi formé et reproduit finement ses détails pour obtenir en fin de cycle un dispositif de PDMS solidifié par une cuisson à 70°C pendant une heure (7).*

Ces réservoirs sont une solution efficace à ce problème d'évaporation. Ainsi, des expériences de plusieurs minutes ont pu être réalisées sans perturbation due à un mouvement de fluide engendré par l'évaporation.

Une contrainte demeure cependant. Pour rappel, un guide d'onde injecté ne doit pas être perturbé par un contact avec le dispositif de PDMS créé. A cet effet, la zone contenant les guides étudiés sera matérialisée sur le moule par un fin film de 58 microns d'épaisseur et dont l'état de surface est parfaitement compatible avec le système d'observation de notre banc optique. Pour terminer, un petit cylindre de verre est placé à l'endroit où se réalisera ultérieurement l'injection de la suspension cellulaire. Le dépôt de ces objets (blocs réservoirs ou film protecteur des guides) s'effectue préalablement au dépôt de PDMS liquide.

Après dépôt du PDMS, l'ensemble est mis à cuire à 70°C pendant une heure. La chambre de PDMS est ensuite nettoyée à l'acétone puis à l'eau et enfin à l'éthanol, pour éliminer les traces d'encre du moule et s'assurer que les surfaces soient parfaitement propres pour ainsi réaliser un

scellement efficace entre le PDMS et la plaquette de guides d'ondes.

La chambre de PDMS ainsi conçue pour les expériences de déplacements cellulaires est décrite dans la figure 2.13.

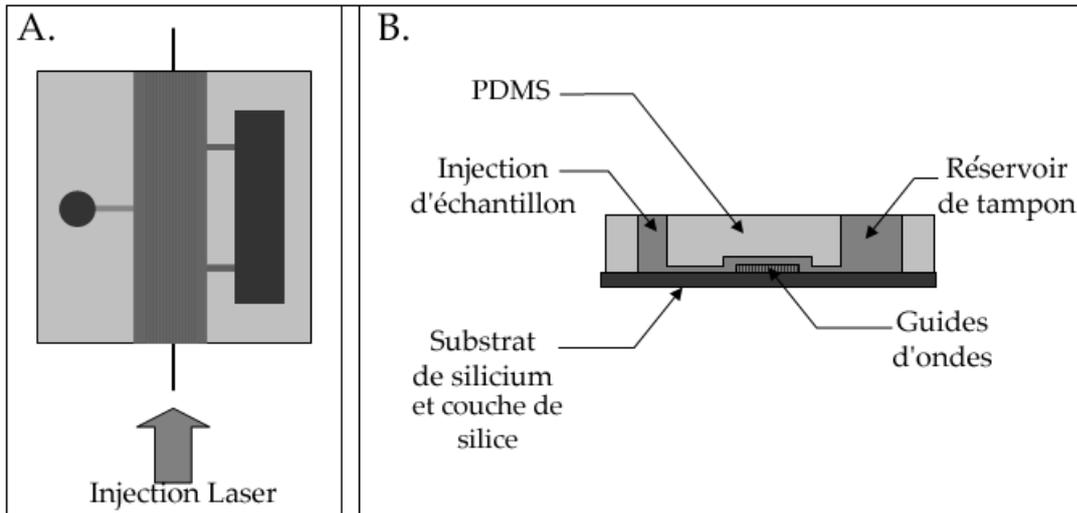


FIG. 2.13 – Schéma de la chambre d'observation utilisée pour les études de déplacement cellulaire. En A, une vue de dessus de la chambre d'observation utilisée. En B, une vue transversale du dispositif utilisé. Le dispositif conçu possède un réservoir de milieu liquide relié à la zone des guides, afin de compenser les pertes d'évaporation. Une zone particulière est dédiée à l'injection de l'échantillon et reliée à la zone des guides d'ondes. Ces guides sont protégés de tout contact optique avec le PDMS par un couloir de 2mm de large et $58\mu\text{m}$ de hauteur.

2.4 Les particules

Les particules que nous avons utilisées pour nos expériences sont de petites billes de taille et de nature différentes. Leurs caractéristiques sont regroupées dans le tableau 2.2.

Matériau	or	verre	latex	mélamine
taille (μm)	0,25/1	2	3	1
indice	$0,272 + 7,07i$	1,55	1,59	1,67
densité	19,3	2,5	1,01	1,51

TAB. 2.2 – Principales caractéristiques des particules utilisées

De part leur taille, l'observation des particules en suspension fait apparaître un mouvement brownien important par rapport à leur dimension. Ce mouvement brownien a été un indicateur particulièrement utile de l'interaction des particules avec la surface des plaquettes de guides :

l'agitation thermique est réduite lorsque les particules sont en contact avec la surface en raison des interactions physico-chimiques qui s'établissent entre les billes et la surface (section 2.6).

2.5 Les cellules

2.5.1 Globules rouges

Ces cellules sont préparées simplement par dilution d'une goutte de sang frais dans du mannitol 280 mM, supplémenté en EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique à 0,5 mM dans le mannitol 280mM), pour prévenir les phénomènes de coagulation. Elles sont lavées trois fois (centrifugation 1000 rpm, élimination du surnageant et resuspension) dans la solution d'EDTA 0,5 mM en mannitol 280mM (pH=5,5).

2.5.2 Cellules Jurkat

Il s'agit de cellules issues d'une lignée lymphocytaire T immortalisée. Les cellules T dont elles dérivent sont circulantes (ce sont des cellules sanguines) et non adhérentes, et les cellules Jurkat ont gardé ces caractéristiques durant le processus d'immortalisation. Ces cellules sont également intéressantes d'un autre point de vue. En effet, en tant que clones de lymphocytes T, elles possèdent à leur surface des marqueurs protéiques particuliers et notamment le marqueur CD3 associé au récepteur pour l'antigène des lymphocytes T.

Ce marqueur pourra être judicieusement utilisé pour réaliser un marquage cellulaire. En effet, dans le but d'améliorer l'efficacité du guidage cellulaire, nous avons envisagé d'utiliser des microbilles en tant que "poignées optiques" : le contraste d'indice entre les billes et le milieu liquide étant important, il est envisageable de pouvoir améliorer le piégeage et la manipulation de ces cellules Jurkat en réalisant un marquage à l'aide de billes, dans le cas où les cellules ne seraient pas intrinsèquement sensibles à l'onde évanescente guidée.

2.5.2.1 Marquage cellulaire de cellules Jurkat

Ce marquage consiste à (i) fonctionnaliser la particule avec une streptavidine par simple adsorption sur la surface de la particule, (ii) à attacher un anticorps biotinylé anti-CD3 sur la surface de la particule, qui reconnaîtra le marqueur CD3 à la surface des cellules et (iii) à incuber les cellules Jurkat avec ce mélange de billes/anticorps. Lorsque la reconnaissance antigène/anticorps a lieu, l'anticorps se fixe fortement sur le marqueur reconnu et une bille est alors attachée à la cellule par l'intermédiaire de l'assemblage bille-streptavidine-biotine-anticorps-cellule. La particule utilisée pour le marquage pourra être soit une bille d'or, soit

une bille de latex selon les conditions de l'expérience.

Protocole de fonctionnalisation des billes d'or

Dans le cas où les billes d'or seront utilisées, le protocole de fonctionnalisation est le suivant :

1. Une solution de billes d'or à 2,5% dans du thiol C-18 (octadécane-thiol) à 1mM, est mise sous bullage à l'argon et à température ambiante pendant une nuit.
2. Cette solution est ensuite centrifugée à 10 000 rpm.
3. Le surnageant est éliminé et le culot de billes d'or subit une brève sonication aux ultrasons dans l'éthanol anhydre afin de resuspendre les billes.
4. Cette étape de centrifugation, sonication et lavage dans l'éthanol anhydre est répétée trois fois.
5. Les billes sont de nouveau centrifugées, soniquées et resuspendues trois fois mais cette fois dans l'eau désionisée.
6. La solution de billes est centrifugée à 10 000 rpm et resuspendue dans du PBS.
7. La streptavidine est ajoutée à ce mélange à raison de 400 microgrammes par millilitre de solution de billes et l'ensemble est agité doucement à température ambiante pendant une heure.
8. La solution est ensuite lavée trois fois par centrifugation (10 000 rpm) et resuspendue dans du PBS. Après le dernier lavage, les billes sont resuspendues dans une solution de 2% de BSA en PBS et mises sous agitation pendant 20 minutes.
9. Les billes d'or sont enfin lavées (centrifugation à 10 000 rpm, resuspension, sonication) dans une solution de 1% de BSA en PBS et peuvent être conservées dans cette solution de stockage à 20 ° C au réfrigérateur.

Protocole de fonctionnalisation des billes de latex

Les méthodes de couplage utilisées pour la fonctionnalisation sont celles conseillées par le fabricant ³

- Méthode par adsorption simple

Il s'agit d'une méthode très simple couramment utilisée pour accrocher une protéine à une particule. La séquence du protocole est la suivante :

- Le tampon initial est le tampon Borate, utilisé à 0,1M et à pH 8,5.
- Une solution de billes de latex à 2,5 % est resuspendue dans ce tampon, puis centrifugée et remise en suspension dans du tampon frais.
- Cette étape est répétée trois fois.
- La streptavidine est ajoutée à raison de 400 microgrammes par millilitre de solution de billes et mélangée sur la durée d'une nuit.
- Le mélange est centrifugé, et le surnageant est éliminé.
- Les billes sont ensuite lavées en présence de protéines "inertes" pour bloquer les sites de liaisons non occupés. Le compétiteur d'adsorption que nous avons utilisé à cet effet est une solution de BSA (bovin serum albumin) à 10%.
- Les billes sont ensuite centrifugées et resuspendues encore une fois dans le tampon de BSA.

³ Sigma-Aldrich : <http://www.sigmaaldrich.com/>

- Les particules peuvent être conservées dans un mélange de PBS (Phosphate Buffered Saline) et de BSA à 2%.

De cette façon, la protéine se fixe directement à la surface des billes. C'est une méthode qui donne de bons résultats et qui permet une conservation des billes ainsi fonctionnalisées pendant plusieurs mois sans perte significative d'efficacité.

- Méthode utilisant le Glutaraldéhyde

Le glutaraldéhyde est un aldéhyde dont les fonctions $-CHO$ se lient aux groupements aminés $-NH_2$ disponibles à la surface des billes. Ce protocole ne convient donc qu'aux billes équipées d'un groupement amino réactif.

Dans le cas où des billes de latex possédant des groupements aminés disponibles à leur surface seront utilisées, le protocole de fonctionnalisation est le suivant :

1. Une solution de billes de latex à 2,5% dans du PBS subit trois cycles de lavage par centrifugation à 10 000 rpm, sonication et resuspension dans du PBS.
2. Les billes sont suspendues dans une solution de 8% de glutaraldéhyde dans le PBS et mises sous agitation douce à température ambiante pendant 6 heures.
3. Ce mélange est ensuite lavé (centrifugation à 10 000 rpm, sonication et resuspension) trois fois dans le PBS avant d'ajouter la streptavidine à raison de 400 microgrammes par millilitre de solution de billes et l'ensemble est agité doucement à température ambiante pendant une nuit.
4. Les billes sont ensuite lavées (centrifugation à 10 000 rpm, sonication et resuspension) trois fois dans le PBS avant d'être resuspendues dans une solution d'éthanolamine 0,2M en PBS.
5. Le mélange est agité doucement pendant 30 minutes.
6. La solution est ensuite lavée trois fois par centrifugation (10 000 rpm) et resuspendue dans du PBS. Après le dernier lavage, les billes sont resuspendues dans une solution de 2% de BSA en PBS. Le BSA est utilisé comme compétiteur d'adsorption pour bloquer les sites de liaison non occupés. Les billes sont ensuite mises sous agitation pendant 20 minutes.
7. Les billes d'or sont enfin lavées (centrifugation à 10 000 rpm, resuspension, sonication) dans une solution de 1% de BSA en PBS et peuvent être conservées dans cette solution de stockage à 20 ° C au réfrigérateur.

Nos expériences n'ont pas mis en évidence de différence significative d'efficacité entre ces méthodes. Le choix est dicté par la nature chimique des billes.

Protocole de marquage de cellules Jurkat

Ce marquage repose sur une double reconnaissance : i) l'anticorps biotinylé anti-CD3 reconnaît l'antigène présent à la surface des Jurkat et ii) la biotine présente sur l'anticorps reconnaît la streptavidine adsorbée à la surface des billes et s'y lie fortement. L'ensemble permet d'accrocher indirectement des billes aux cellules.

Le protocole de ce marquage est le suivant :

1. 250 μ L de cellules à 2.10⁶ cellules/mL sont rincées trois fois dans un tube eppendorf par centrifugation (1000 rpm), élimination du surnageant et resuspension dans du PBS. Le tube est complété à 500 μ L avec du PBS.
2. 50 μ L de billes fonctionnalisées à la streptavidine sont ajoutées à la suspension cellulaire.
3. 20 μ L d'anticorps (anti-CD3 humain, BD Pharmingen) biotinylé reconnaissant le marqueur de surface CD3 des cellules Jurkat est ajouté à la solution précédente.
4. Ce mélange est agité doucement à 37 ° C pendant 2 heures.
5. La solution de cellules marquées est ensuite lavée quatre fois (centrifugation à 1000 rpm, élimination du surnageant et resuspension) dans le mannitol 280 mM.
6. Les cellules peuvent ensuite être utilisées sur le banc optique.

Culture des cellules Jurkat

Ces cellules sont cultivées dans un milieu de culture adapté et selon un protocole simple et précis :

- Les cellules sont cultivées dans le milieu complet RPMI 1640-glutamax (Invitrogen/Gibco Brl), supplémenté à 10 % en SVF ((Sérum de Veau Foetal, Dominique Dutscher) et à 1 % en pénicilline streptomycine (Invitrogen/Gibco Brl). Les cultures cellulaires sont réalisées dans une atmosphère humide à 37 ° C et 5% de CO₂.
- Un aliquot de la suspension cellulaire de départ est prélevé pour une numération en cellule de Malassez, qui permettra de déterminer la concentration cellulaire de départ.
- La concentration finale de cellules est de 1.10⁶ cellules/mL.
- En fonction de la concentration de départ, effectuer une simple dilution des cellules dans le milieu complet (RPMI 10% SVF 1% pénicilline streptomycine) permet d'obtenir la concentration voulue de cellules.

2.5.3 Levures

Ces levures sont du type *Saccharomyces cerevisiae*. Elles proviennent d'un bloc commercial de levure pressée alimentaire (Hirondelle, Lesaffre). Une petite quantité de la levure du bloc de départ est resuspendue dans le milieu YPD (Yeast peptone dextrose) composé de 1% d'extrait de levure, 2% de peptone, et 2% de dextrose. Préalablement à une manipulation sur le banc optique, ces levures sont lavées (centrifugation à 1000 rpm, élimination du surnageant et resuspension) dans du mannitol 280mM ou de l'eau désionisée, selon les conditions de l'expérience. Ces organismes sont en effet d'une grande tolérance vis-à-vis de la pression osmotique. Par conséquent, elles peuvent être resuspendues dans l'eau pure, dans le PBS, ou encore le mannitol, sans subir de choc osmotique. Les levures ont une apparence sphérique et une taille avoisinant les 6 microns de diamètre.

2.5.4 Bactéries

2.5.4.1 *Rhodobacter capsulatus*

Rhodobacter capsulatus est une bactérie pourpre non-sulfureuse qui nous a été fournie par le Laboratoire Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés (BBSI) du CEA de Grenoble.

La taille de cette bactérie est de l'ordre du micron. Cette bactérie est cultivée dans le même milieu YPD (1% extrait de levure, 2% peptone, 2% dextrose) que précédemment. Préalablement à une manipulation sur le banc optique, ces bactéries sont lavées (centrifugation à 1000 rpm, élimination du surnageant et resuspension) dans du mannitol 280mM.

2.5.4.2 Population isolée à partir de pollen.

Ces bactéries proviennent de la resuspension de pelotes de pollen. Cet assortiment de spécimens de pollens a été acheté dans un magasin d'alimentation biologique. S'agissant d'un complément alimentaire et non pas d'un produit destiné à la recherche en laboratoire, nous ne disposons d'aucune information sur la nature des végétaux entrant dans sa composition. Plusieurs pollens d'espèces différentes sont rassemblés dans ce produit (voir figure 2.14).



FIG. 2.14 – **Pelotes de pollen utilisées pour le déplacement optique.** *Le pollen utilisé (pelotes de quelques millimètres de diamètre) est issu de plusieurs espèces végétales. Cette diversité est illustrée par des pelotes de couleurs différentes. Chaque type de pelote sera ensuite remis en suspension en milieu liquide pour une détermination de l'aptitude de chaque espèce à être déplacée sur nos guides.*

En effet, l'analyse de chaque "variété" de pollen, par resuspension des pelotes en milieu liquide, nous a permis d'observer des particules de taille très importante, de l'ordre de 50 à 100 microns (cercles verts sur la figure 2.15 A.). Ces gros objets n'ont pas pu être déplacés sur les guides d'onde, probablement à cause de leur très grande taille.

Cependant, l'analyse du pollen d'une certaine espèce, a révélé l'existence d'une sous-population particulière, présente aux côtés des grains de pollen dans la suspension de pelotes. Ces individus, de forme oblongue, ont attiré notre attention sur plusieurs points :

- leur petite taille comprise entre 3 et $5\mu\text{m}$ fait d'eux un bon candidat théorique au déplacement sur nos guides.
- leur capacité à se déplacer (sur et en dehors des guides d'ondes) par petits bonds aléatoires de plusieurs microns, nous indique qu'il s'agit de cellules vivantes, probablement des

bactéries (voir figure 2.15 B).

Bien que peu fréquents, ces sauts n'ont jamais pu être observés si l'échantillon a subi un choc pouvant provoquer sa stérilisation (ébullition, mise en présence de fortes concentrations d'éthanol). Cette observation appuie l'hypothèse d'une entité vivante présente précisément dans cette variété de pollen. Cette population n'est en effet retrouvée que dans un seul type de pelote, parmi le mélange varié de notre assortiment de pollen acheté en magasin.

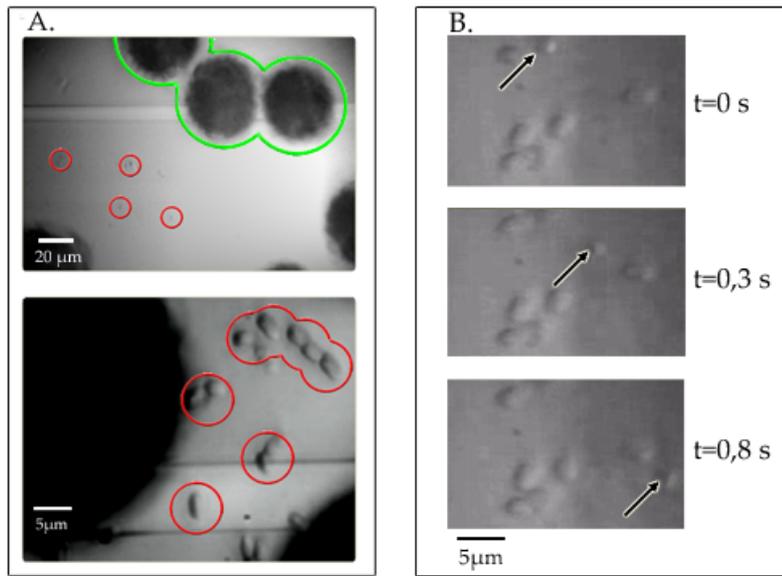


FIG. 2.15 – Photographies des particules isolées à partir d'une pelote de pollen. A. Suspension initiale d'une variété de pelotes de pollen, montrant une sous-population intéressante (cercles rouges) mélangée à une autre sous-population de taille beaucoup plus grosse (cercles verts). B. Après filtration de la suspension précédente, la sous-population d'intérêt est beaucoup plus concentrée. Les particules concentrées sont animées par un mouvement brownien et se déplacent parfois par des accélérations brèves (flèches noires), ce qui donne à penser qu'il s'agit d'entités vivantes, probablement des bactéries.

2.6 Passivation de la surface du guide d'onde

Dans certaines conditions dépendantes de l'état de surface du guide utilisé (*i.e.* sa propreté ou sa fonctionnalisation chimique), les objets ont tendance à se coller au guide. Ceci se traduit par une suppression du mouvement brownien des particules qui nous sera utile par la suite pour déterminer si les particules sont libres ou sont adhérentes à la surface du substrat et donc dans l'impossibilité d'être déplacées par l'onde évanescente.

Afin d'éviter l'adhésion des particules sur la surface de la plaquette de guide d'onde, nous avons entrepris la recherche d'un composé susceptible de passiver efficacement la surface de nos guides et empêcher les interactions des particules avec la surface. Ces interactions peuvent

engendrer un frottement plus important de la particule avec le substrat voire même bloquer cette dernière sur la surface, rendant impossible tout déplacement ultérieur.

Plusieurs travaux se sont intéressés au problème de l'adsorption des molécules biologiques sur différents types de substrat [149] [150] [151] [152] [153].

D'une manière générale, lors d'une expérience de dépôt de cellules sur une surface synthétique, on doit tenir compte non seulement de l'adsorption des protéines sécrétées par les cellules, en particulier la matrice extra cellulaire (MEC), mais également des protéines qui peuvent être contenues dans le milieu baignant les cellules, et en particulier la BSA (sérum albumine bovine) et le SVF (sérum de veau foetal). De plus, dans certaines expériences, on peut vouloir préconditionner un support avec une ou plusieurs protéines en les laissant s'adsorber à la surface ; ces protéines peuvent favoriser l'adhésion des cellules (ligands spécifiques) ou inversement la défavoriser (BSA, SVF) en entrant en compétition d'adsorption avec les protéines favorisant l'adhérence (MEC sécrétée).

Brièvement, la matrice extra cellulaire est composée de glycoprotéines, en particulier le collagène, l'élastine, les protéoglycanes, les protéines d'adhésion comme la fibronectine, la laminine, la vitronectine, et de sucres comme l'acide hyaluronique par exemple.

Les macromolécules présentes dans la matrice extracellulaire sont synthétisées et sécrétées par les cellules adhérentes (chondrocytes, ostéocytes, etc.) lors de leur contact avec la matrice extracellulaire. Cette matrice est reconnue de façon spécifique par des récepteurs disposés sur la membrane cellulaire, en particulier les intégrines ou le récepteur à la laminine, qui reconnaissent respectivement la fibronectine et la laminine, mais aussi d'autres glycoprotéines [154]. Cette matrice sert de base indispensable à la croissance et au développement des cellules adhérentes sur un substrat.

Dans le cas particulier de la silice et du verre - *les matériaux utilisés pour la fabrication de nos guides* -, Zhang *et al.* montrent qu'un composé hydrophile, le polyéthylène glycol (PEG), réduit considérablement l'adsorption des protéines et l'adhérence cellulaire [152]. Un film de PEG couvrant du SiO_2 tend à écranter les charges négatives du SiO_2 et ainsi à réduire l'adsorption des protéines. Les auteurs pensent qu'en plus de la diminution des interactions ioniques, on doit tenir compte de la force stérique du PEG dans la réduction de l'adsorption protéique et/ou de l'adhésion des cellules.

Dans ces travaux, ce n'est pas le critère d'hydrophilicité qui peut être retenu. En effet, les travaux de Dewez *et al* en particulier [150] [151] [153] qui ont visé à étudier l'influence des

propriétés physico-chimiques des substrats, à savoir l'hydrophobicité et la charge électrostatique de surface du substrat sur l'adsorption des protéines, ont montré que quand le matériau est extrêmement hydrophobe (angles de contact des gouttes d'eau compris entre 85 et 100°, par exemple sur le polystyrène brut), les protéines sont très mal adsorbées. Les auteurs notent également que lorsque le matériau perd de son hydrophobicité (traitement plasma O_2 ou NH_3 provoquant une modification de la chimie de surface), le matériau devient beaucoup plus réceptif aux protéines qui adsorbent mieux : les protéines sont adsorbées lorsque l'angle de mouillage devient inférieur à 50°.

Dans le cas du PEG qui est très hydrophile, il semblerait donc que ce soit plutôt l'écrantage des charges du substrat (perte de l'interaction ionique) et surtout son caractère stérique répulsif qui soit en cause, d'après Zhang *et al.*

Depuis ces travaux, les matériaux sur lesquels sont greffées des chaînes de polyéthylène glycol sont souvent considérés comme particulièrement bien adaptés pour réduire l'adhésion cellulaire et l'adsorption non spécifique de protéines. Toutefois, il est important de noter que si notre objectif est d'éviter l'adhésion des cellules et particules sur nos guides, on peut également émettre l'hypothèse que l'adsorption de protéines à la surface de ces mêmes guides pourrait perturber le mécanisme de piégeage et de déplacement par ondes évanescentes guidées.

Nous nous sommes donc logiquement orientés vers le greffage de PEG en surface de notre substrat de silice pour atteindre cet objectif. Plus précisément, nous avons effectué une réaction de silanisation utilisant du silane-PEG. En effet, la méthode de greffage la plus utilisée consiste à faire réagir un silane sur le groupement silanol $SiOH$ présent à la surface de la silice. La réaction de silanisation consiste donc en une substitution des atomes d'hydrogène des groupements silanol par un groupement organosilyl.

Cette réaction de silanisation a été largement employée, notamment pour des techniques analytiques, en chromatographie en phase liquide [155] ou en chromatographie en phase gazeuse [156] pour le greffage de divers groupements sur des surfaces de silice. Le composé de silane-PEG nous a été fourni par l'équipe de chimistes de notre laboratoire. Le PEG utilisé est le PEG 400. En effet, les polyéthylène glycols sont une famille de polymères dont le poids moléculaire varie en fonction du nombre de groupements d'oxyde d'éthylène n dans la molécule. Leur formule chimique s'écrit : $H(OCH_2CH_2)_nOH$. Dans notre cas du PEG 400, le monomère de base est répété neuf fois ($n = 9$).

La méthode de greffage du PEG sur nos surfaces est la suivante :

1. Les surfaces sont d'abord nettoyées pour retirer la graisse et les poussières éventuellement

présentes. Idéalement, ce nettoyage s'effectue au mélange piranha (30% H_2O_2 , 70% H_2SO_4). Cependant, ce mélange étant extrêmement agressif, nous n'avons pas pris le risque d'endommager nos guides nitrure dont la taille est très faible (200 nm de hauteur). Nous avons donc simplement nettoyé les échantillons à l'acétone, à l'eau désionisée, et à l'éthanol, tel que le recommandent les technologues pour le nettoyage des plaquettes de silicium.

2. Les surfaces sont ensuite plongées dans une solution de silanisation, de façon à recouvrir la lame de silicium. Cette solution est composée de silane-PEG à 1% dans le toluène.
3. Le dépôt en phase liquide de silane-PEG dure deux heures. La lame est ensuite rincée au toluène, puis à l'acétone, puis le dépôt est recuit au four à 115 ° C pendant deux heures.
4. La lame est ensuite prête pour être testée.

Puisque nous avons vu précédemment que les travaux de Dewez *et al* ont montré l'efficacité des surfaces hydrophobes contre l'adsorption de protéines - adsorption de protéines qui peut potentiellement interagir par la suite avec les cellules et donc contrarier nos expériences de déplacement cellulaire - nous avons également déposé un composé très hydrophobe sur nos lames, le perfluorosilane (1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl-triéthoxysilane), par une méthode de silanisation semblable à la précédente. Le protocole est le suivant :

1. Les surfaces sont d'abord nettoyées à l'acétone, à l'eau désionisée, et à l'éthanol.
2. La lame est immergée dans une atmosphère saturée par une solution de pentane contenant 1% de perfluorosilane (*1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl-triéthoxysilane*) versée dans un dessiccateur.
3. Le dépôt en phase vapeur de perfluorosilane dure deux heures. La lame est ensuite rincée à l'acétone, puis le dépôt est recuit au four à 115 ° C pendant deux heures.
4. La lame est ensuite prête pour être testée.

2.7 Mise en place d'une expérience

La préparation des expériences repose sur une étape de lavage adapté des billes ou des cellules, et un nettoyage approfondi de la surface exposée des plaquettes de guides d'onde. Le protocole de préparation de particules (billes ou cellules) et de la surface des guides est donc le suivant :

1. Les cellules et les particules sont lavées quatre fois dans du mannitol 280mM par centrifugation et resuspension dans du mannitol frais. Ces lavages visent à éliminer les sels et autres composants présents dans le tampon PBS et RPMI et suspectés d'intervenir dans les phénomènes d'adhésion observés.
2. La surface des guides d'ondes est délicatement nettoyée avant et après expérience à l'eau désionisée, à l'acétone puis à l'éthanol anhydre et enfin séchée à l'air comprimé.
3. La chambre de PDMS est également lavée à l'eau désionisée puis à l'éthanol glacial et enfin séchée à l'air comprimé. Elle est ensuite délicatement déposée sur la plaquette de guides afin d'établir un scellement réversible entre les deux surfaces.
4. L'ensemble est placé précisément sur le banc de manipulation.
5. Les réservoirs de tampons sont ensuite remplis et le matériel à déplacer (billes ou cellules) est rapidement introduit dans un réservoir dédié menant au guide injecté.

2.8 Méthode de calcul des vitesses de déplacement des objets en surface du guide

Pour connaître la distance de déplacement de l'objet en surface du guide, il est nécessaire d'étalonner le dispositif d'observation du banc. Il faut tout d'abord effectuer la mise au point sur les divisions d'un micromètre (voir figure 2.16). Ensuite on superpose le zoom aux divisions du micromètre et on détermine de cette façon le diamètre réel du champ d'observation (nombre entier de divisions auquel on ajoute l'estimation éventuelle de la fraction restante).

Ensuite il est nécessaire de passer par un logiciel de traitement vidéo (VirtualDub, Avery Lee) pour analyser les films de déplacement. Grâce à ce logiciel, il est possible d'extraire des images correspondant à des instants précis d'une séquence filmée. Le chronomètre interne du logiciel, calé sur le film encodé, permet d'avoir accès au temps des images de déplacement des objets.

Les images extraites des films de déplacement sont ensuite analysées par un logiciel d'image (Photoshop d'Adobe). La position des objets déplacés est pointée précisément à partir des images extraites avec le logiciel de traitement vidéo.

Cette méthode m'a permis d'avoir accès aux valeurs de distance et de temps, nécessaires pour calculer la vitesse de déplacement des microparticules et des cellules sur les guides d'onde.

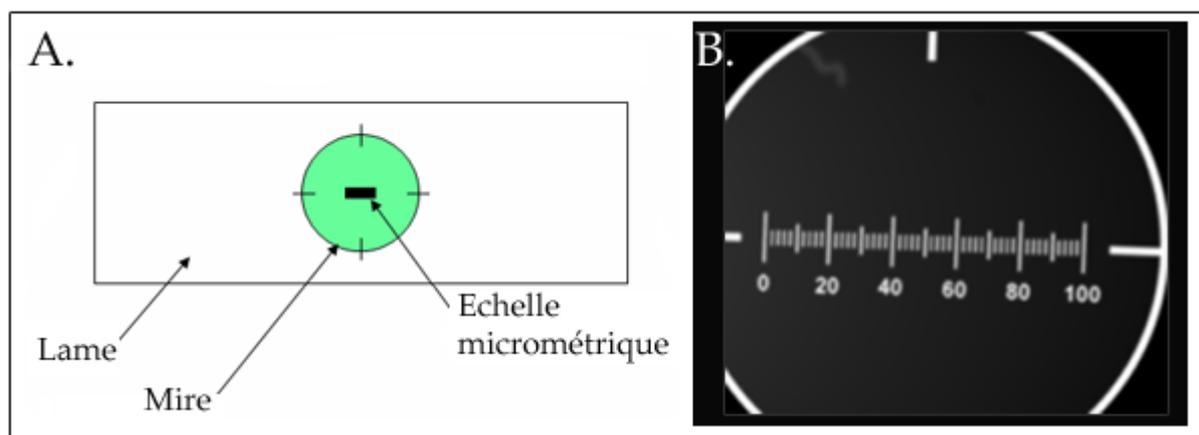


FIG. 2.16 – **Micromètre pour l'étalonnage du système de visualisation du banc optique.** Pour étalonner notre dispositif d'observation, on utilise un micromètre (A) dont la mire graduée (B) permet de déterminer le diamètre réel du champ d'observation.

2.9 Détermination de la viabilité cellulaire

Pour cette phase visant à évaluer l'impact de nos expérimentations sur le matériel cellulaire, j'ai utilisé des chambres de PDMS que j'ai conçues spécialement pour ces travaux.

2.9.1 Cellules Jurkat

La chambre d'observation utilisée ici présente un réservoir d'environ $80\mu L$ destiné à accueillir la suspension de cellules Jurkat (cf figure 2.17). La largeur de ce réservoir (2mm) correspond à la largeur totale de la zone dans laquelle se trouvent les guides d'ondes droits susceptibles d'être utilisés durant l'expérience.

Une fois l'injection lumineuse réglée, les cellules lavées au mannitol 280mM sont déposées sur la surface d'un guide dans lequel la puissance modale est de l'ordre de 60 mW, et soumises à l'effet du guide injecté pendant une durée d'environ 20 minutes.

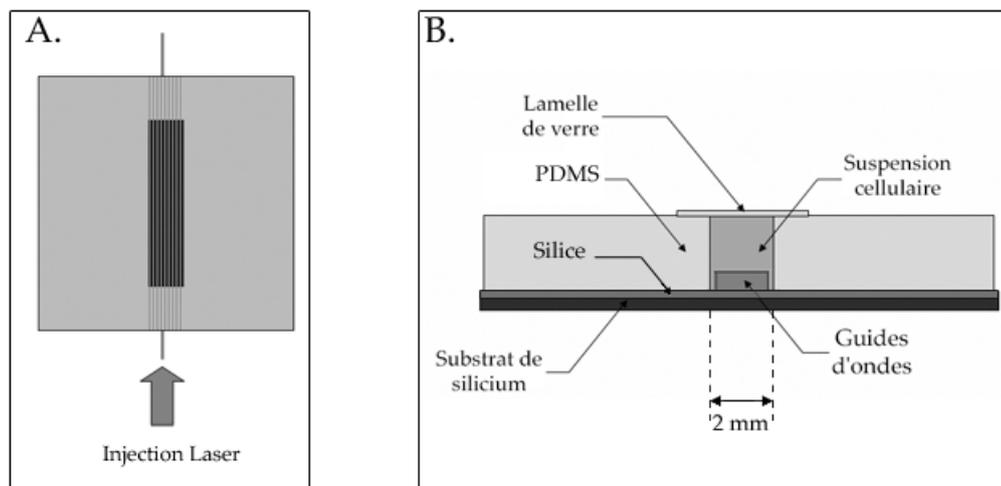


FIG. 2.17 – Schéma de la chambre d'observation utilisée pour les études de viabilité des cellules Jurkat. En A, une vue de dessus de la chambre d'observation utilisée. En B, une vue transversale du dispositif utilisé. La largeur du réservoir contenant la suspension cellulaire est dictée par la largeur de la zone dans laquelle se trouvent les guides d'ondes.

A l'issue de ce délai, les cellules sont récupérées et l'impact de ces expériences est analysé en cytométrie. Nous avons utilisé pour ces tests un appareil de la société Guava Technologies ⁴, le modèle Easycyte, que nous possédons au laboratoire.

Cette machine est bien adaptée à des tests de viabilité cellulaire car sa technologie de gestion des fluides, basée sur un capillaire d'aspiration, réduit le volume d'échantillon nécessaire et le temps d'analyse. Ce cytomètre fonctionne aussi bien en format tube (jusqu'à 10 positions) qu'en

⁴ www.guavatechnologies.com

format microplaque 96 puits. Il est ainsi possible de déterminer, en moins d'une minute, le nombre exact de cellules vivantes et celui des cellules en apoptose grâce au comptage absolu que permet l'analyse cellule à cellule. Le résultat est précis avec un petit volume d'échantillon (taille minimale d'environ 500 à 2000 cellules, soit environ 20 à 50 μ l de suspension cellulaire).

Ce système est très simple d'utilisation et le fabricant commercialise des kits au protocole rapide (15 minutes d'incubation de la suspension cellulaire avec le réactif) et aux réactifs optimisés permettant d'analyser la viabilité ainsi que l'apoptose.

Test de la viabilité sur les cellules Jurkat

Ce test fait intervenir le kit *Guava ViaCount*®. Il utilise un marqueur du fabricant qui se fixe à l'ADN. La perméabilité différente entre les cellules mortes et vivantes permet *in fine* de numérer et de déterminer la viabilité des cellules adhérentes et non adhérentes. Le protocole suivi est celui préconisé par le fabricant et fourni avec les réactifs du kit.

Test d'apoptose sur les cellules Jurkat

Ce test utilise le kit *Guava Nexin*®. Il fait intervenir deux composés : l'Annexine V et le 7-AAD.

L'Annexine V est une protéine classiquement utilisée pour marquer les cellules en apoptose. Elle se fixe à la phosphatidylsérine (PS), un composé localisé en temps normal sur la face interne de la membrane des cellules et externalisé lors du processus d'apoptose précoce.

Le 7-AAD est un marqueur exclu des cellules vivantes et des cellules en phase précoce d'apoptose, mais qui sera incorporé dans les cellules mortes ou en phase avancée d'apoptose.

Les différentes populations cellulaires qui peuvent être ainsi distinguées sont regroupées dans le tableau 2.3.

Cellules	Annexine V	7-AAD
Non apoptotiques	(-)	(-)
Apoptose précoce	(+)	(-)
Apoptose avancée ou cellules mortes	(+)	(+)

TAB. 2.3 – Populations cellulaires analysées dans un mélange grâce aux réactifs du kit d'apoptose *Guava Nexin*®

Le protocole suivi est celui préconisé par le fabricant et fourni avec les réactifs du kit.

Plusieurs échantillons cellulaires seront analysés grâce à cette méthode. En effet, en plus des cellules exposées aux effets optiques de nos guides, ces paramètres d'apoptose et de viabilité ont été comparés à ceux d'échantillons de cellules Jurkat ayant subi d'autres traitements :

- Cellules Jurkat dans du milieu complet (RPMI 10% SVF 1% pénicilline streptomycine), incubées 30 minutes à température ambiante.
- Cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à température ambiante.
- Cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à 37 ° C.
- Cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à 39 ° C.
- Cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à 42 ° C.
- Cellules Jurkat dans du milieu complet, incubées 10 minutes à 80 ° C.

L'étude du même type cellulaire dans ces différentes conditions permet d'évaluer l'impact de nos expérimentations, en termes de température. Les résultats de ces analyses permettront de déterminer si un échauffement important existe près du guide d'onde lors de nos expériences et si cette élévation de température perturbe l'intégrité des cellules.

2.9.2 Levures

Dans le cas des levures, la chambre d'observation et de manipulation est différente. Pour des raisons expérimentales qui seront expliquées dans les résultats au prochain chapitre, le réservoir est cette fois divisé en deux parties (voir figure 2.18). L'échantillon est introduit dans la première chambre, et les cellules déplacées sont récupérées dans la seconde.

Ces chambres présentent un volume d'environ $60\mu L$ destiné à accueillir l'échantillon (figure 2.18). Comme précédemment, la largeur de ces cavités (2mm) correspond à la largeur totale de la zone dans laquelle se trouvent les guides d'ondes droits susceptibles d'être utilisés durant l'expérience.

Une fois l'injection lumineuse réglée, du tampon est introduit dans le réservoir associé à la chambre de récupération. Le remplissage du dispositif s'effectue par capillarité en quelques secondes pendant lesquelles le matériel cellulaire est rapidement mais délicatement introduit dans la chambre de dépôt. De cette façon, les cellules déposées sont repoussées par l'avancée du tampon précédemment introduit et ne se retrouvent pas dans la chambre de récupération.

Les levures sont propulsées en surface d'un guide dans lequel la puissance modale est de l'ordre de 40 mW, et soumises à l'effet du guide injecté pendant une durée de 25 minutes.

A l'issue de ce délai, les cellules sont récupérées. On procède de la façon suivante :

- une lamelle de verre est déposée à la fois sur la chambre de dépôt et également au-dessus

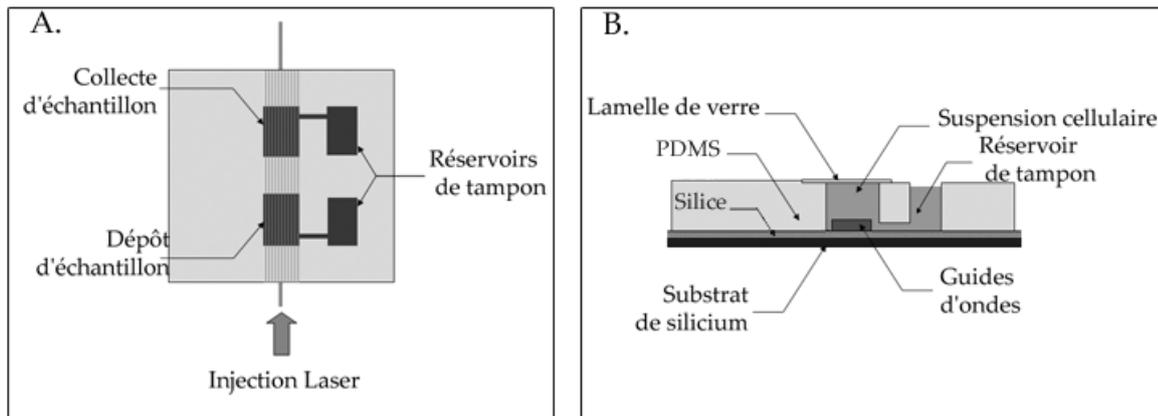


FIG. 2.18 – Schéma de la chambre d'observation utilisée pour les études de viabilité des levures. En A, une vue de dessus de la chambre d'observation utilisée. En B, une vue transversale du dispositif utilisé. La largeur des chambres de dépôt et de collecte est dictée par la largeur de la zone dans laquelle se trouvent les guides d'ondes. Chaque chambre est reliée à un réservoir de tampon. Les deux chambres communiquent par un couloir de même largeur que les chambres et haut de $68\mu\text{m}$, ce qui protège les guides de tout contact optique avec le PDMS.

du réservoir de tampon qui lui est associé, de façon à les isoler.

- un excès de tampon est introduit dans le réservoir associé au site de collecte, de telle façon qu'une goutte se forme en surface de ce réservoir.
- On récupère les cellules déplacées présentes dans la chambre de collecte par aspiration avec une pipette. Par cette opération, le tampon contenant les cellules est attiré dans la pipette et remplacé par le tampon du réservoir associé. L'aspiration de la suspension dans cette cavité fait baisser le niveau du réservoir de tampon associé à cette chambre et permet un retour à un niveau normal de ce dernier.
- La suspension cellulaire aspirée est placée dans un tube eppendorf à des fins d'analyse.

Test de la viabilité sur les levures

L'appareil et les kits employés pour les cellules Jurkat ne sont pas utilisables pour les levures, car ces kits ne fonctionnent que pour les cellules de mammifères. La viabilité des levures sera donc analysée par une méthode alternative.

La société Beckman Coulter, Inc. ⁵ produit et distribue des appareils et réactifs dans le domaine des analyses de laboratoires et possède une expertise certaine dans le domaine de la cytométrie en flux. Cette société démontre dans une note technique [157] que le colorant vital bleu trypan est très bien adapté à l'estimation de la viabilité des espèces de levure, et en particulier de *Saccharomyces cerevisiae*.

⁵ www.beckmancoulter.com

Le pourcentage de viabilité est donc estimé par le test d'exclusion au bleu trypan selon le protocole suivant : un aliquot de $50\mu l$ de la suspension de levures précédemment récupérée est prélevé et mélangé à $50\mu l$ de bleu trypan. Les cellules mortes se colorent en bleu, les cellules vivantes ne sont pas colorées. La numération est effectuée à l'aide d'une lame de Malassez.

L'impact d'un déplacement optique sur les levures sera analysé en comparant la viabilité des levures exposées au flux optique durant une expérience de déplacement, à celle d'un lot de levures témoin préparées de façon identique au lot de levures déplacées et n'ayant pas été mis en contact avec le guide d'onde.

2.10 Détermination de la prolifération cellulaire

L'innocuité de ces expériences de déplacement optique a été également vérifiée par des tests de prolifération cellulaire en culture.

Après l'expérience de déplacement optique, un aliquot de la suspension cellulaire - déjà dit au début de la phrase - est prélevé pour un comptage en cellule de Malassez, qui permettra de déterminer la concentration cellulaire de départ pour le test de prolifération cellulaire.

Ensuite, les cellules restantes sont déposées dans un puits de microplaque et on ajoute $500\mu L$ de milieu de culture RPMI, 10% SVF, 1% penicilline-streptomycine dans le cas des cellules Jurkat, ou de milieu YPD pour les levures. La plaque multipuits est placée dans une atmosphère humide à $37^\circ C$ et 5% de CO_2 pendant deux jours. Au bout de ce laps de temps, un aliquot de la suspension cellulaire est prélevé pour une numération en cellule de Malassez, qui permettra de déterminer la concentration cellulaire d'arrivée.

Dans le cas où la concentration finale est significativement supérieure à celle de départ, le test de prolifération est considéré comme positif. En d'autres termes, cela signifiera que les expériences sur guides d'ondes n'ont pas porté préjudice aux cellules au point d'entraver leur reproduction prolifération.

Chapitre 3

Déplacement optique de particules et de cellules

Le banc de manipulation assemblé et réglé, nous nous sommes investis dans les premières expériences de déplacement de particules. Le premier objectif était d’emmagasiner de l’expérience avec des particules afin de rejoindre au plus vite l’état de l’art, pour ensuite transférer l’expertise ainsi acquise au déplacement cellulaire.

Cette thèse a été réalisée en collaboration avec le département Optronique du LETI au CEA dans lequel une doctorante a étudié les aspects ”optiques” de notre problématique, des points de vue théorique et expérimental. Le réglage du banc, la modélisation des forces optiques s’exerçant sur les particules à déplacer ainsi que la conduite d’expériences d’analyse de l’influence de paramètres optiques (polarisation lumineuse, nature et taille des billes) sur le comportement des billes déplacées, ont été principalement réalisés par cette doctorante [158].

Ma participation à cette collaboration s’est notamment traduite par un apport d’outils qui ont rendu possibles les expériences de déplacement de billes et de cellules (conception des chambres d’observation, fourniture d’un milieu de suspension adapté au déplacement sur les guides, optimisation de protocoles), par des études de passivation des surfaces, la préparation d’échantillons biologiques (études décrites au chapitre précédent), ou encore par la réalisation d’expériences, notamment celles menées sur du matériel biologique, comme le tri d’une population particulière dans un mélange. Nous avons par ailleurs publié nos résultats communs sur le déplacement de billes et de cellules dans la revue *Optics Express* (article fourni en annexe A, [159]).

Les déplacements de particules m’ont servi à appréhender les contraintes propres à l’expérience, ainsi qu’à identifier les paramètres expérimentaux à maîtriser pour optimiser les chances de succès d’un déplacement de particules biologiques. Le but final de cette thèse était de démontrer

la réalité biologique de ce concept et l'utilité d'un tel outil dans une approche de type micro-système. C'est pourquoi, certains déplacements de particules seront exposés dans ce chapitre, dans la mesure où ils ont servi de base aux expériences conduites sur des cellules.

Pour rappel, le concept sur lequel reposent les travaux exposés dans cette thèse fait appel à un composant totalement nouveau en biologie : le guide d'onde optique. Nous avons utilisé plusieurs types de guides d'ondes, qui confinent plus ou moins bien la lumière guidée et qui font appel à des technologies différentes. Dans un souci de clarté, les observations seront regroupées par type de guide d'onde (guide par échange d'ions potassium, guide par échange d'ions argent, et guide fabriqué par dépôt de nitrure de silicium). De plus, sauf précision contraire, la lumière se propage de la droite vers la gauche sur toutes les images présentées.

3.1 Guides réalisés par échange d'ions potassium

Ces guides sont les premiers que nous ayons eus à notre disposition. Ils sont représentatifs d'une technique de fabrication des guides très répandue : l'échange d'ions. Cette méthode, expliquée au chapitre précédent (voir la section 2.2.1.1), a produit des échantillons de guides caractérisés par un faible saut d'indice ($\Delta n = 0,01$). Ce faible écart d'indice est néanmoins compensé en partie par la robustesse de ces guides et les taux de couplage relativement importants (30%) qu'ils autorisent. C'est pourquoi ces guides nous ont semblé tout à fait appropriés pour rejoindre rapidement l'état de l'art et appréhender relativement facilement les contraintes de l'optique guidée.

Expérimentalement, les dimensions du guide sont difficilement estimables. En effet, les limites spatiales du guide sont délicates à observer. Il existe toutefois un très léger contraste au niveau du guide, qui est lié à l'augmentation locale de l'indice du verre. Ceci nous permet de localiser approximativement l'emplacement du guide. Les figures présentées dans cette section, montrent, lorsque nécessaire, la région de l'échantillon dans laquelle se situe le guide.

3.1.1 Particules d'or

L'étude préliminaire réalisée avec nos collaborateurs a mis en lumière un avantage théorique des billes micrométriques métalliques, pour lesquelles les forces mises en jeu sont les plus fortes. Ces particules ont également été très utilisées dans les expériences pionnières de déplacement sur guide d'onde optique [72], [73], [74], [76]. Nos premières expériences ont ainsi tout naturellement débuté avec des microparticules d'or de $1\ \mu\text{m}$ de diamètre. Pour ces premières expériences, les billes sont tout simplement en suspension dans de l'eau pure désionisée. On dépose ensuite une

gouttelette de ce mélange au-dessus du guide, dans lequel une puissance d'environ 200 mW est injectée.

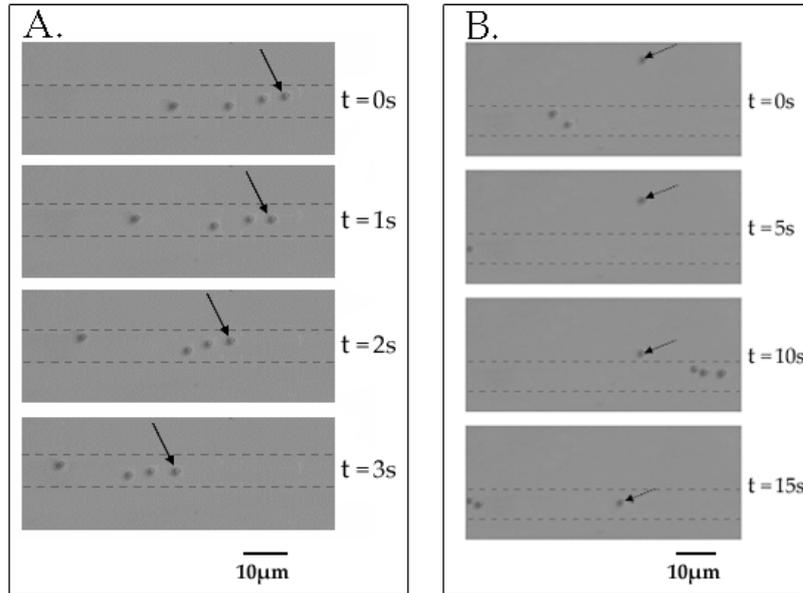


FIG. 3.1 – **Piégeage et déplacement de microbilles d'or de $1\mu\text{m}$ de diamètre sur un guide à échange d'ions potassium.** *La lumière est injectée sur la droite de chaque image et se propage de droite à gauche. La région de l'échantillon dans laquelle se situe le guide est matérialisée par les lignes pointillées. A. Illustration expérimentale de la pression de radiation qui pousse les billes le long du guide. B. Illustration expérimentale du regroupement des particules en surface du guide. Cet effet s'observe sur une distance supérieure à l'action théorique des forces de gradient.*

La pression de radiation déplace les billes dans le sens de la lumière à une vitesse d'environ $9\mu\text{m/s}$ (figure 3.1 A.). Sur la figure 3.1 B., on observe un piégeage latéral d'une microbille d'or, réalisé par les forces de gradient. Ces observations confirment le modèle théorique décrit au chapitre 1 (section 1.2.2.3).

Cependant, on observe un piégeage latéral très efficace et un mouvement de concentration des microparticules d'or vers le guide d'onde qui n'étaient pas prévus par la théorie. Dans nos observations, ce mouvement latéral de concentration des billes d'or vers le guide s'exerce sur la quasi-totalité des billes situées à quelques dizaines de microns du guide. Expérimentalement, cela se manifeste par une concentration des particules sur le guide, jusqu'à montrer un regroupement au niveau du guide de l'ensemble des billes situées dans le champ d'observation. Ce regroupement est observable à une distance du guide comprise entre 50 et 100 microns, selon les conditions de l'expérience, soit une distance beaucoup plus importante que les dimensions latérales du mode guidé : d'après les calculs de simulation, les forces de gradient de l'onde évanescente n'agiraient

qu'à quelques microns du guide.

Si ces expériences préliminaires confirment donc bien la théorie du piégeage optique sur guides d'ondes, elles mettent également en évidence des phénomènes d'origine inconnue (vraisemblablement d'origine thermique ou fluïdique) pour expliquer l'important mouvement de concentration vers le guide.

Ces phénomènes dont les effets sont importants n'étaient toutefois pas prévus par notre modèle théorique et ils illustrent la compréhension incomplète de ce tout nouveau domaine de la recherche en optique. La construction d'hypothèses pour expliquer ses phénomènes parasites a été aidée par des observations ultérieures réalisées avec d'autres types de particules et de guides.

3.1.2 Puissance injectée dans le guide

Notre collaboration avec les opticiens a démontré l'importance de la puissance injectée dans le guide sur le déplacement des particules (voir figure 3.2) [158]. En considérant le déplacement de ces billes d'or, on constate que, globalement, la vitesse de propulsion des billes augmente avec la puissance injectée dans le guide. Les particules ne se mettent en mouvement qu'au-delà d'une valeur seuil d'intensité correspondant à une puissance injectée de l'ordre de 150 mW. A cette intensité, les particules se déplacent avec une vitesse très modeste de quelques microns par seconde. Au-delà de cette valeur seuil, les vitesses augmentent presque linéairement avec la puissance injectée, pour atteindre environ $18\mu\text{m/s}$ pour un peu moins de 300 mW injectés.

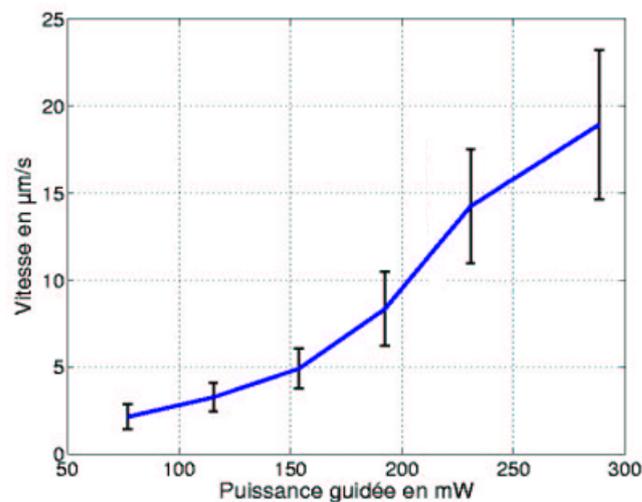


FIG. 3.2 – **Influence de la puissance injectée dans le guide sur la vitesse des particules.** *Au-dessus d'une valeur seuil d'environ 150 mW, la vitesse des billes augmente linéairement par rapport à la puissance guidée. Lorsque la valeur de la puissance injectée est inférieure à ce seuil, le déplacement des particules est vraisemblablement pénalisé par des interactions avec la surface des guides.*

L'existence de cette valeur seuil pourrait illustrer un frottement à surmonter pour pouvoir déplacer des particules ou des cellules. Ces observations confirment celles déjà faites par Ng *et al.* [74] sur des billes d'or et indiquent que nous rejoignons bien l'état de l'art à travers ces premières expériences.

3.1.3 Particules de verre

Pour démontrer la propulsion d'objets diélectriques, notre choix s'est porté sur des billes de verre ($n = 1,55$ à 1064 nm, $2\ \mu\text{m}$ de diamètre) également très utilisées dans les articles de la littérature sur le sujet.

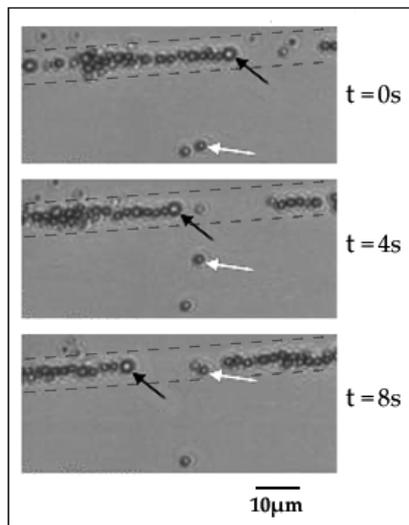


FIG. 3.3 – Piégeage, déplacement et regroupement de microbilles de verre de $2\ \mu\text{m}$ sur un guide à échange d'ions potassium. La lumière est injectée sur la droite de chaque image et se propage de droite à gauche. La région de l'échantillon dans laquelle se situe le guide est matérialisée par les lignes pointillées. La propulsion due à la pression de radiation est mise en évidence par les flèches noires. On remarque l'organisation spontanée des billes en petites chaînes. Le piégeage de particules est mis en évidence par les flèches blanches.

Le comportement de ces particules sur le guide diffère de celui des billes d'or précédentes sur plusieurs points. Premièrement, ces particules ont tendance à se suivre et à se toucher en formant de petites chaînes de billes qui avancent sur le guide. Il s'agit d'un phénomène déjà démontré par Grujic *et al.*[79] sur des guides à échange d'ions césium. Il est intéressant de noter que la vitesse des chaînes de particules est légèrement supérieure à celle des particules seules [79]. Dans notre cas, la vitesse de propulsion des chaînes est d'environ $2\ \mu\text{m}/\text{s}$, contre un peu plus de $1\ \mu\text{m}/\text{s}$ pour les billes seules.

Ces observations pourraient s'expliquer par le fait que la première particule d'une chaîne est notamment freinée dans son déplacement par des frottements avec le fluide présent autour d'elle. Mais le fluide déplacé par cette sphère entraîne la suivante par un phénomène d'aspiration qui s'illustre par exemple lors de la chute de deux billes successives dans un liquide visqueux ou en course automobile. La force de frottement qui s'exerce sur la seconde bille et sur les

suivantes serait donc moindre que pour la première bille de la chaîne, alors que la force optique de déplacement reste constante. Il est ainsi possible que les billes suivant la première d'une chaîne poussent celle-ci et augmentent la vitesse de déplacement de l'ensemble. Il est également possible que des phénomènes d'interaction optique puissent jouer un rôle dans l'augmentation de cette vitesse. On peut imaginer que l'ensemble formé par plusieurs billes en contact forme un meilleur "véhicule optique" qu'une bille seule.

De plus, les particules de verre, tout comme les billes d'or précédentes, vérifient bien le concept théorique en se déplaçant le long du guide sous l'influence de la pression de radiation. Néanmoins, les puissances nécessaires à cette propulsion sont plus élevées (de l'ordre de 400 mW contre 200 mW pour des particules d'or). Ceci confirme le choix des billes d'or pour débiter nos expériences puisque la théorie prévoyait des forces optiques supérieures à celles agissant sur des billes diélectriques telles que ces billes de verre. Il convient enfin de noter que l'effet de concentration vers le guide décrit précédemment est plus important avec les billes de verre. La puissance injectée pour déplacer ces billes étant nettement supérieure à celle injectée pour la propulsion de billes d'or, ceci nous fait donc penser à des forces d'origine thermique.

Les billes d'or restent donc les meilleures candidates au déplacement optique sur ces guides et, par conséquent, le meilleur marqueur en vue d'un greffage en surface des cellules.

3.1.4 Particules de latex

Suite à ces essais, nous avons essayé de déplacer des billes de latex ($3\ \mu\text{m}$ de diamètre). Les billes de latex sont en effet un autre type de particules particulièrement étudié dans la littérature du piégeage optique.

A notre grand étonnement, ces particules ont dévoilé un comportement très différent de celui observé pour les particules précédentes. Bien que l'effet de concentration des billes au niveau du guide perdure sur une portée de l'ordre de quelques dizaines de microns, ces particules ne sont plus propulsées sur le guide par la pression de radiation mais plutôt repoussées en hauteur, au-dessus de celui-ci (figure 3.3). Des courants de convection sont vraisemblablement générés pendant l'expérience par un échauffement au niveau du guide d'onde. En effet, des mouvements de convection se manifestent par une attraction des billes vers le guide, suivie d'une élévation au-dessus de celui-ci, un déplacement des billes vers le haut de la chambre pour continuer ensuite dans la direction opposée en formant une boucle de chaque côté du guide.

Ceci peut s'expliquer par le fait que la densité des particules de latex est assez faible (densité de 1,01), ce qui fait que ces billes peuvent être très sensibles aux mouvements de convection liés

à l'échauffement du liquide.

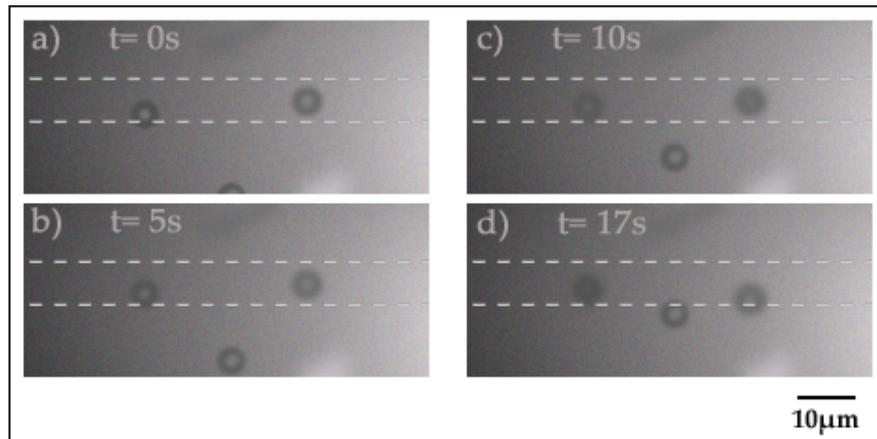


FIG. 3.4 – **Convection de microbilles de latex de $3\ \mu\text{m}$ sur un guide à échange d'ions potassium.** *La région de l'échantillon dans laquelle se situe le guide est matérialisée par les lignes pointillées. Les particules de latex sont attirées au niveau du guide puis elles remontent au dessus du guide par un mouvement de convection. En effet, les particules se défocalisent rapidement, ce qui traduit expérimentalement la convection du liquide. Le mouvement des particules s'inverse ensuite et les particules s'éloignent alors du guide, terminant la boucle d'une cellule de convection.*

Ceci nous fait réfléchir sur la possibilité que le regroupement de particules au niveau du guide soit fortement lié à des phénomènes thermiques, fluidiques et convectifs plutôt que seulement d'origine optique, en particulier pour les particules éloignées du guide.

Sans remettre en cause les forces de gradient optiques prédites par le modèle théorique, ces effets supposés convectifs semblent prépondérants

3.1.5 Phénomènes thermiques

Nous avons cherché, à travers quelques expériences, à déterminer l'impact des effets thermiques, en vue d'une optimisation de notre démarche pour accroître les chances de réussite d'un déplacement cellulaire.

Des effets d'origine physique viennent se mêler aux forces optiques dans nos expériences. Leur importance dans le cas des particules de latex de $3\ \mu\text{m}$ de diamètre est telle que ces phénomènes peuvent masquer les effets optiques et rendre impossible le déplacement désiré, notamment en raison de phénomènes de convection.

Les résultats expérimentaux démontrent une combinaison de ces effets thermiques avec les phénomènes d'origine optique. La concentration d'une intense lumière laser sur une région large de quelques microns entraîne inévitablement des pertes qui se traduisent par un échauffement local de l'environnement proche du guide.

Il nous a donc paru utile, pour la compréhension de notre approche, d'étudier les effets thermiques intervenant dans nos expériences.

Cette section a pour but de détailler ces forces et d'expliquer quelle peut être leur influence sur le déplacement des particules dans notre technique de manipulation optique.

3.1.5.1 Le mouvement brownien

Le mouvement brownien, découvert en 1827 par le botaniste écossais Robert Brown (1773-1858), désigne le phénomène de mouvements incessants et aléatoires de micro- et de nanoparticules. Il résulte des impulsions transmises aux particules par les molécules du milieu soumises à l'agitation thermique.

Lors de précédentes tentatives de manipulation de particules sur guides d'ondes par des chercheurs de l'université de Southampton, ce phénomène s'est révélé comme un obstacle à la manipulation optique sur guides. En effet, des nanoparticules d'or ont été déplacées le long du guide mais le faible piégeage ne suffisait pas à contrer le mouvement brownien des billes qui finissaient par sortir du piège [75], [76].

Dans nos expériences, le mouvement brownien n'a pas été un obstacle. Il s'est même avéré utile pour optimiser les traitements de surface des guides afin d'éviter une adsorption des particules à sa surface (voir section 2.6).

3.1.5.2 Les forces radiométriques

Mises en évidence par Crookes et son radiomètre (cf fig 1.1), les forces radiométriques ou thermophorèse, proviennent des interactions asymétriques des molécules du milieu entourant la particule dans un gradient de température ou de concentration.

Ces forces, dues à une élévation locale de la température, augmentent l'agitation thermique au niveau de la zone la plus chaude de l'objet. La force résultante tend à le pousser vers les régions les plus froides de son environnement.

La photophorèse est un cas particulier de la thermophorèse. Une particule éclairée dans un milieu liquide ou gazeux subit une force radiométrique dans le sens opposé à la source d'éclairage. Ce flux lumineux induit un gradient de température de sorte que la face éclairée devient plus chaude que l'autre face. Par conduction, la température de la surface de la particule se transmet au milieu environnant d'où l'établissement d'un gradient de température autour de la particule. La force de photophorèse dépend de l'intensité et de la longueur d'onde du rayonnement incident ainsi que de la dimension, la forme, le matériau de la particule, et de la pression si le milieu est un

gaz. Elle dépend également de l'absorption de la particule, elle peut être alors soit positive (force s'exerçant dans la direction opposée à la source lumineuse) pour les particules très absorbantes et les grosses particules peu absorbantes et négative pour les petites particules peu absorbantes [160].

Dans le cadre de nos expériences avec des microparticules diélectriques très peu absorbantes, les effets photophorétiques peuvent être négligés [4]. Par contre pour les billes d'or, pour lesquelles le coefficient d'absorption est environ 10^6 fois plus important que pour les particules diélectriques [16], un effet photophorétique peut donc se superposer aux effets de pression de radiation pour déplacer les billes sur le guide, ce qui pourrait en partie expliquer les excellentes performances des billes d'or sur ces guides.

3.1.5.3 La convection

Ce phénomène correspond à des mouvements de fluide qui se produisent lorsqu'on a du matériel dense en haut de la chambre de liquide et peu dense en bas. Dans cette situation, le matériel du haut a tendance à descendre, et celui du bas a tendance à monter. Ce gradient de densité "inverse" est le plus souvent dû à des différences de température : chaud et peu dense en bas, froid et dense en haut. On parle alors de *convection thermique*.

Dans le cas de notre système, *i.e.* dans la chambre d'observation des particules, il se crée un gradient de température qui peut générer des phénomènes de convection. Ces phénomènes pourraient être à l'origine du regroupement des particules que nous observons sur le guide potassium pour toutes les particules, et de l'élévation des billes de latex au-dessus de ces mêmes guides.

Cette section se propose de donner des éléments de réponse pour expliquer le regroupement de particules observé.

La convection thermique est un terme regroupant plusieurs phénomènes. La forme la plus courante est la convection de Rayleigh-Bénard. C'est elle qui est responsable, par exemple, du mouvement spontané de l'eau dans la casserole chauffée par une plaque électrique. L'autre type majeur de convection est la convection de Bénard-Marangoni. Elle survient lorsque la face supérieure du fluide est libre et la couche liquide assez mince. Ces deux modèles de convection se mettent en place dans le système lorsque la conduction ne suffit plus à évacuer la chaleur, quand la différence de température atteint un seuil critique.

Convection de Rayleigh-Bénard

Bien que fréquemment observés dans la vie courante, ces mouvements spontanés de fluides froids et chauds (appelés "cellules de convection") ne se produisent que dans certaines conditions de gradient de température dépendant du fluide considéré et des dimensions de la cavité étudiée.

Le transfert de chaleur par convection est décrit par la loi de Newton : $\dot{q} = h \cdot \Delta T$ où \dot{q} est la densité de flux thermique (en $W \cdot m^{-2}$), h est le coefficient de convection ($h \approx 400$ à $800 W \cdot m^{-2} \cdot K^{-1}$ pour l'eau liquide) et ΔT est la variation de température entre la partie de fluide chaude et la partie de fluide froide. Si on suppose que la totalité de la puissance perdue par le guide d'onde est transmise au liquide (aucune puissance perdue dans le substrat, pas de pertes sous forme de rayonnement infrarouge), la densité de flux thermique \dot{q} dans le liquide correspond aux pertes de propagation du guide d'onde, *i.e.* 0,5 dB/cm (tableau 2.1) soit une perte d'environ 11 % par cm. Les guides potassium font entre 1 et 10 μm de largeur et environ 2 mm de longueur. Dans le cas de nos expérimentations, les puissances laser sont de quelques centaines de mW au niveau du guide. Par conséquent, la densité de flux thermique \dot{q} transférée dans le liquide est comprise entre $2,5 \cdot 10^6$ et $2,5 \cdot 10^7 W \cdot m^{-2}$. Il apparaît donc que cette convection reviendrait à une élévation de température de plusieurs milliers de degrés. Ce phénomène tel que décrit ici n'est donc très probablement pas celui responsable du regroupement des particules sur les guides potassium. Pour un rassemblement des billes par convection de Rayleigh-Bénard, il est nécessaire que les pertes de propagation vers le liquide soient très inférieures de plusieurs ordres de grandeur à celles supposées précédemment, *i.e.* une fraction minime de l'ensemble des pertes de propagation du guide. L'utilisation d'une caméra thermique pour examiner précisément notre dispositif en fonctionnement ne nous a pas permis d'obtenir de preuves expérimentales d'un échauffement du guide, peut-être à cause de la sensibilité de la caméra (résolution de 5°C). Il est possible que la convection thermique dans la chambre se produise pour une température inférieure à la sensibilité de la caméra utilisée. La densité de flux thermique à l'origine du mouvement de convection serait alors inférieure à $2000 W \cdot m^2$.

J'ai entrepris une approche expérimentale, basée sur le chauffage électrique d'un fin fil métallique. Un courant élevé a été produit à travers le fil métallique par le biais d'un générateur de courant. Le but était de mimer l'échauffement induit par l'injection laser dans le guide, pour obtenir des éléments de réponse susceptibles de nous permettre de mieux comprendre les phénomènes en jeu dans nos expériences. Ces expérimentations n'ont cependant pas permis de reproduire ces phénomènes.

Convection de Bénard-Marangoni

Une variante de la convection de Rayleigh-Bénard, l'instabilité de Bénard-Marangoni, survient lorsque la face supérieure du fluide est libre (en contact avec un gaz) et la couche fluide assez mince. Le mécanisme de cette instabilité, dite thermo-capillaire, est lié à la variation de la tension interfaciale d'un fluide avec la température. Il s'agit d'un phénomène dynamique au cours duquel un gradient de tension interfaciale provoque un mouvement des fluides adjacents qui induit la formation d'une cellule de convection.

Le modèle théorique de cette convection repose également sur l'existence d'une surface libre. Notre système ne répond pas à cette condition et par conséquent les phénomènes observés ne peuvent être expliqués par ce modèle théorique.

Conclusion sur l'influence des effet thermiques

Le regroupement des billes sur le guide d'onde révélé par nos expériences agit sur une distance supérieure au domaine d'action des forces optiques. L'importance de ce phénomène et son caractère automatique en fait un outil, a priori, exploitable dans un microsystème. L'origine de ces mouvements convectifs demeure inconnue. Néanmoins, le mouvement d'attraction des billes vers le guide, puis l'élévation et la répulsion des billes loin du guide plaident pour une convection thermique de type "cellules de convection", probablement selon un modèle d'instabilité de Rayleigh-Bénard basé sur des pertes de propagation faibles vers le liquide. Notons que si l'échauffement près du guide est faible, il est possible que les cellules de convection ne soient localisées que dans le proche voisinage du guide. Les mouvements de fluide rassemblant les particules s'établissent sur une distance de quelques dizaines de microns seulement ce qui devrait correspondre à la taille approximative des cellules de convection si ce modèle est exact.

3.1.5.4 Conclusion sur le déplacement de billes sur des guides potassium

Ces résultats expérimentaux nous dévoilent un comportement des particules qui diffère selon leur nature. En effet, contrairement à ce que l'on observe pour les particules métal-liquides, des phénomènes d'auto-organisation en petites chaînes sont observés lors du déplacement de particules de verre. De plus, si l'effet de propulsion des billes dû aux forces de pression optique générées par l'onde évanescente, prévu théoriquement, a bien été vérifié expérimentalement, les forces de gradient n'ont pu être mises en évidence car masquées par des mouvements fluidiques convectifs d'une portée supérieure.

Les résultats expérimentaux font apparaître que les billes d'or semblent les mieux adaptées

à un marquage cellulaire visant à améliorer le guidage des cellules. En effet, sur ces guides, les billes de verre se sont révélées plus lentes à déplacer et avec une auto-organisation en chaîne qui pourrait se révéler préjudiciable pour le déplacement des cellules. Quant aux billes de latex, l'importance des phénomènes convectifs observés sur ces objets est un obstacle à leur emploi dans une problématique biologique.

3.1.6 Déplacement de cellules sur des guides potassium

L'objectif de ma thèse est bien de démontrer expérimentalement la possibilité de déplacer des cellules par des moyens optiques sur des guides d'onde et ainsi de prouver la réalité biologique de ce concept. Le déplacement de particules, diélectriques ou métalliques, n'était qu'une étape, certes bien nécessaire, pour acquérir de l'expérience et transférer le savoir-faire ainsi acquis à la biologie. La démonstration de la possibilité d'utiliser les forces optiques pour trier ou déplacer des cellules pourrait décider de l'incorporation de cette technique dans un microsystème.

3.1.6.1 Nouveaux défis et nouvelles contraintes

Absorption

Malgré une forme généralement sphérique et une bonne transparence, une cellule vivante n'est pas une bille et, par conséquent, la manipulation d'objets biologiques amène son lot de spécificités.

La cellule est un système complexe qui intègre l'ensemble des informations provenant de son environnement et réagit en exprimant une panoplie de gènes particuliers. C'est pourquoi une irradiation laser à une longueur d'onde inadaptée peut exciter des molécules présentes dans la cellule et les endommager. Dans ce cas, la cellule peut mettre en route des mécanismes de stress ou de compensation, ce qui modifie son état et est préjudiciable à son étude.

Ceci explique que les manipulations optiques de matériel biologique nécessitent un laser de longueur d'onde proche de l'infrarouge (1064 nm), comme le montre la figure 3.5 [32].

Les chromophores et autres molécules réactives présentes dans la cellule ne réagissent pas, ou très peu, aux rayons infrarouge. D'autre part, leur absorption par l'eau est faible.

Le laser utilisé sur notre banc, de type Nd :YAG, émet à 1064 nm et est donc particulièrement bien adapté à ce type d'expériences. Cependant, le biologiste ne doit pas oublier de pondérer cette observation en songeant aux dommages qui pourraient être causés par une irradiation trop longue ou trop intense à cette longueur d'onde [161].

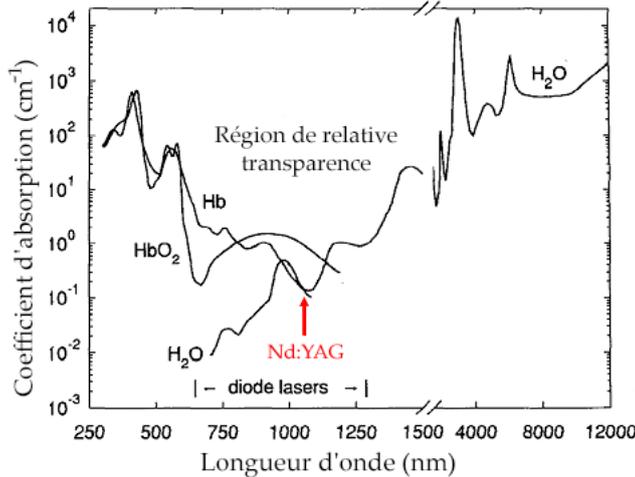


FIG. 3.5 – Illustration de la relative transparence du matériel biologique dans la région proche infrarouge du spectre lumineux. Représentation de l'absorption de l'eau et de quelques chromophores communs en fonction de la longueur d'onde. Hb et HbO₂ représentent la désoxyhémoglobine et l'hémoglobine. L'eau absorbe fortement au-delà de 2 μm . La longueur d'onde de notre laser Nd :YAG est indiquée. Le proche infrarouge est bien une zone de transparence biologique [28].

Indice de réfraction

Les propriétés optiques d'une cellule peuvent également laisser perplexes. En effet, une cellule n'est pas optiquement homogène. Son indice optique est un indice global qui dépend de ses constituants (cytoplasme, noyau, organelles) et de leur répartition. Plusieurs auteurs ont tenté de caractériser l'indice optique des composants d'une cellule. Les valeurs varient selon les études et les types cellulaires. Par exemple, l'indice optique du cytoplasme montre des valeurs de 1,36 à 1,38 pour les cellules CHO (*Chinese Hamster Ovary*, des cellules de mammifère) tandis que cette valeur est légèrement plus importante pour les noyaux (de 1,38 à 1,41) (voir le tableau 3.1 suivant et la référence [162]).

Constituant cellulaire	Indice de réfraction	Référence
Fluide extracellulaire	1,35-1,36	[163]
Cytoplasme	1,36-1,375	[164]
Noyau	1,38-1,41	[164]
Mitochondrie et organelles	1,38-1,41	[165]
Mélanine	1,6-1,7	[166]

TAB. 3.1 – Valeurs d'indice de réfraction des constituants de la cellule, obtenues à partir de différents travaux de la littérature, d'après Drezek *et al.* [162].

Cherchant à manipuler les cellules entières et non pas seulement leur cytoplasme ou leur noyau, nous nous intéressons plus particulièrement à l'indice optique global des cellules. La littérature nous donne des valeurs de l'ordre de 1,36 pour les globules rouges, tandis que les levures ont vraisemblablement un indice optique plus important compris entre 1,36 et 1,40.

[52]. Les cellules de lignée Jurkat que nous utilisons dans nos expériences sont une lignée de cellules T issues de leucémie humaine. Ce sont des cellules de type lymphocyte. Il ne nous a malheureusement pas été possible de trouver de valeur précise d'indice optique pour ces cellules.

La microscopie à contraste de phase aurait pu nous aider à déterminer cette valeur. Brunsting *et al.* donnent un exemple d'utilisation de cette technique pour déterminer l'indice optique d'une cellule [164]. Ce type de microscopie s'appuie sur le fait que la lumière chemine à des vitesses différentes dans les régions de la cellule dont la composition diffère. Le microscope à contraste de phase convertit les différences d'indice de réfraction en différences de contraste, révélant de cette façon beaucoup plus de détails (voir figure 3.6).

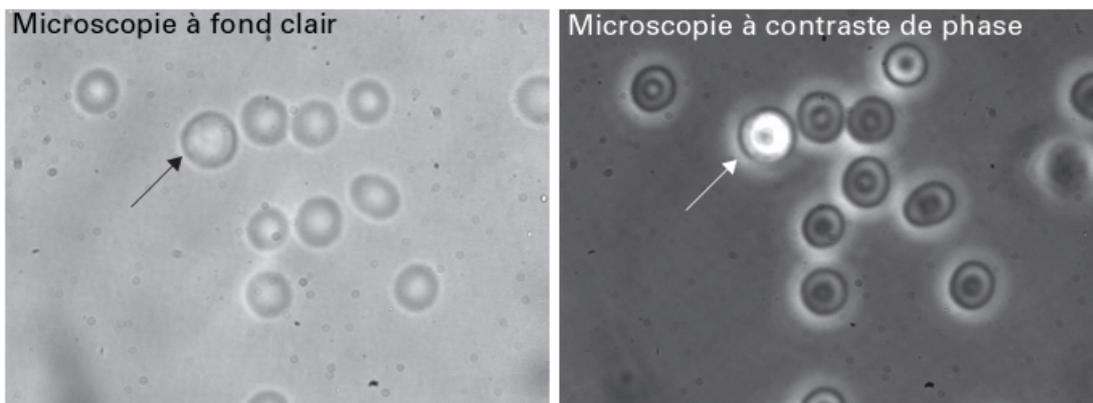


FIG. 3.6 – Cellules de sang humain vues par microscopie à fond clair ou par microscopie à contraste de phase. La plupart des cellules vivantes n'ont que peu de couleurs, à l'exception évidente des cellules végétales, et sont donc très transparentes à la lumière. La microscopie à contraste de phase convertit les différences d'indice de réfraction en différences de contraste, révélant de cette façon beaucoup plus de détails, et permettant de distinguer différentes populations dans un mélange. Cette distinction s'illustre dans cet exemple par un globule blanc observé en contraste de phase (flèche) dont on remarque la grande différence d'intensité lumineuse, comparé aux globules rouges adjacents.

Cette méthode repose sur l'immersion d'une fraction de la population cellulaire à étudier dans une solution de protéines et l'immersion d'une autre fraction de la même population dans une autre solution de protéines. La protéine peut être, par exemple, l'albumine bovine. La solution obtenue ne doit apparaître ni trop foncée ni trop claire par rapport au cytoplasme de la cellule observée en contraste de phase. Ainsi, cela signifie que son indice de réfraction sera proche de celui du cytoplasme de la cellule. L'indice de réfraction de la solution peut être ensuite mesuré à l'aide d'un réfractomètre de grande précision, à la longueur d'onde d'intérêt.

Bien qu'utile, il s'agit cependant d'une méthode lourde et dont la phase de détermination de la solution la plus adaptée à l'échantillon introduit une imprécision préjudiciable à la qualité de

la valeur obtenue *in fine*. Nous ne disposions pas du matériel nécessaire pour cette technique et notamment du réfractomètre de précision fonctionnant à notre longueur d'onde de travail. Cette méthode n'a par conséquent pas pu être employée pour la détermination de l'indice optique d'une cellule.

Milieu liquide de suspension des cellules

Dans le corps humain, les cellules sont baignées dans un milieu complexe dont les paramètres (pH, concentration en sels et nutriments, etc...) sont contrôlés précisément par l'organisme. En biologie, et plus généralement en culture cellulaire *in vitro*, les cellules sont cultivées dans un milieu liquide dont la formulation dépend du type cellulaire étudié. Ces cellules peuvent être non adhérentes, c'est le cas des cellules Jurkat, ou adhérentes comme par exemple des fibroblastes qui ont besoin d'un support sur lequel ils peuvent s'accrocher et se développer.

Dans ces milieux de culture, on trouve généralement des acides aminés, des vitamines, des sucres, des sels et un tampon.

Les sels sont responsables du maintien de l'isotonicité. Par exemple, si une hématie est plongée dans un milieu hypertonique, le volume de l'hématie diminue par perte de l'eau interne. Dans un milieu hypotonique, le volume de la cellule augmente, l'hématie peut éclater (hémolyse) quand la pression développée est supérieure à la résistance de la membrane.

Ces milieux sont donc chargés d'apporter les nutriments nécessaires à la croissance des cellules, de fixer le pH mais surtout d'assurer l'isotonicité de la solution nécessaire à la préservation des membranes cellulaires.

Dès les premières tentatives de manipulation cellulaire, nous avons donc utilisé les milieux classiques en biologie que sont le milieu de culture RPMI et le tampon phosphate isotonique PBS (Phosphate Buffered Saline). Malheureusement ces tampons ont révélé un comportement décevant des particules et des cellules déposées sur le guide. En effet les tampons PBS et RPMI utilisés pour suspendre les particules et les cellules provoquent une importante adhésion des objets à la surface des plaquettes de guide d'onde. Les billes ainsi que les cellules se collent aux guides et ne se déplacent plus. Leur mouvement brownien est même supprimé, ce qui laisse supposer une interaction forte de la particule ou de la cellule avec son substrat, interaction préjudiciable au déplacement.

Nous nous sommes donc mis en quête d'un moyen de supprimer ces phénomènes d'adhésion tout en préservant l'intégrité de nos échantillons biologiques. Une étude bibliographique nous a orienté vers des traitements visant à réduire l'adhésion des cellules et des billes en surface de

nos guides. Cette démarche, décrite dans le détail au chapitre précédent (section 2.6), nous a conduit à étudier l'influence des composés greffés en surface de nos guides sur le comportement des objets déposés à sa surface.

Nous avons notamment greffé un composé hydrophile, le PEG, dont la force stérique est susceptible de réduire l'adhésion des cellules et des particules en faisant écran aux charges du substrat (perte de l'interaction ionique). Mais cette même étude bibliographique a également fait apparaître qu'un matériau très hydrophobe (angles de contact des gouttes d'eau compris entre 85 et 100°), pouvait réduire de façon significative l'adsorption des cellules en surface du guide. Nous avons donc étudié l'influence du greffage d'un composé très hydrophobe en surface des guides, le perfluorosilane (*1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl-triéthoxysilane*) sur le comportement des objets déposés à sa surface.

L'angle de contact de gouttes d'eau avant dépôt d'une couche de passivation sur le silicium est d'environ 51°, ce qui indique un comportement plutôt hydrophile. Après greffage de silane-PEG, il passe à 41° en moyenne, ce qui est indicateur d'un caractère plus hydrophile de la surface. En ce qui concerne l'angle de contact de gouttes d'eau après greffage de perfluorosilane, il passe à 92°, ce qui indique que le substrat est très hydrophobe.

Durant notre étude d'influence de la passivation des surfaces, nous avons utilisé les milieux RPMI et le PBS. En présence de ces tampons, le dépôt de perfluorosilane montre une adhésion très forte des particules d'or sur sa surface, avec l'observation d'une suppression du mouvement brownien des particules. Par contre, celui-ci est plutôt conservé pour les particules déposées sur une surface hydrophile. Néanmoins, même si ce comportement est meilleur qu'avec un substrat hydrophobe, des particules restent tout de même collées à la surface, ce qui ne nous a pas permis de retenir cette solution dans notre protocole global de préparation des guides.

Nous nous sommes également rendus compte de la très grande importance à travailler avec des échantillons aux surfaces les plus propres possibles.

C'est pourquoi nous avons amélioré notre protocole de nettoyage des échantillons de guides d'ondes. Ce nettoyage à l'eau désionisée, à l'acétone puis à l'éthanol anhydre suivi d'un séchage à l'air comprimé est réalisé avant et après manipulation et diminue de façon très nette l'adhésion des particules et des cellules sur les guides.

Mais ce paramètre seul ne suffit pas à expliquer la préservation de la liberté des particules déposées sur les plaquettes. En effet, avec ou sans passivation de la surface des guides, les tampons PBS et RPMI ont révélé un comportement décevant vis-à-vis des particules et des cellules déposées sur le guide. Ces tampons utilisés pour baigner les particules et les cellules

provoquent une importante adhésion des objets à la surface des plaquettes de guide d'onde. Les billes ainsi que les cellules se collent trop souvent aux guides (mêmes traités) et ne se déplacent plus, ou difficilement. Leur mouvement brownien est même supprimé, ce qui laisse supposer une interaction forte de la particule ou de la cellule avec son substrat.

La solution nous est venue d'un tampon utilisé notamment pour les expériences de diélectrophorèse dans notre laboratoire [97], le tampon mannitol 280mM dont l'isotonicité est assurée par un composant sucré, le mannitol, au lieu d'ions salins. Cependant, il est tout à fait compatible avec la préservation d'échantillons de biologie cellulaire animale. Des études réalisées avec le cytomètre Guava Tech ont montré que la viabilité et la prolifération cellulaires sont préservées dans ce milieu. Il s'avère que l'utilisation de ce milieu pour baigner nos échantillons supprime les effets d'adhésion observés auparavant avec les milieux RPMI et PBS.

Nous avons mesuré les indices de réfraction respectifs de ces différentes solutions à l'aide d'un réfractomètre. Les valeurs mesurées sont regroupées dans le tableau 3.2.

Solution	eau	PBS	RPMI	Mannitol	Mannitol (<i>dilué 1/2</i>)
Indice optique	1,333	1,334	1,335	1,341	1,337

TAB. 3.2 – Indices optiques des différents milieux utilisés dans nos expériences.

Il ressort de ces mesures que les indices mesurés sont supérieurs à ceux de l'eau. Cette remarque est encore plus vraie pour le mannitol. Les performances du déplacement étant théoriquement liées à l'importance de l'écart d'indice entre la particule et le milieu qui l'entoure (voir les indices de réfraction des particules dans le tableau 2.2), ceci laisse présager des performances moindres lorsque les particules seront suspendues dans le mannitol plutôt que dans l'eau. De plus, le faible indice optique des cellules (environ 1,4 à 1064 nanomètres) laisse présager des vitesses de déplacement bien plus faibles que celle des particules de verre. Bien que les performances de déplacement de particules et de cellules sur des guides en optique ne dépendent pas linéairement de l'indice optique des particules considérées, les vitesses seront théoriquement plus importantes si les indices de réfraction du guide ou de la particule sont importants.

Manipulation de cellules seules Nos premières tentatives de manipulation se basent sur un mode opératoire très proche de celui utilisé pour déplacer des particules. Les cellules, des Jurkat de type lymphocyte, sont lavées et resuspendues dans un milieu adéquat (*i.e.* le milieu mannitol) et une goutte de ce mélange est simplement déposée en surface du guide.

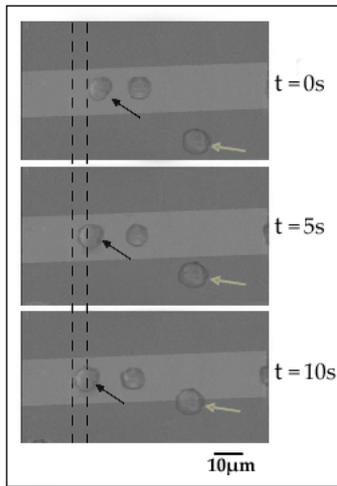


FIG. 3.7 – **Illustration du mouvement des cellules sur des guides potassium.** La lumière est injectée de la droite vers la gauche. La zone plus claire matérialise l'emplacement du guide d'onde. Comme les particules, les cellules sont regroupées sur le guide par des mouvements de fluide (flèches blanches). Elles sont ensuite très légèrement poussées le long du guide. Les lignes pointillées montrent la distance parcourue par la cellule désignée par les flèches noires sur une durée de 10 secondes.

Tout comme les particules, les cellules sont dans un premier temps attirées vers le guide puis très légèrement déplacées le long de celui-ci (figure 3.7). Cette propulsion ne semble pas être d'origine strictement optique puisque les cellules voisines du guide sont également sensibles au guide optique. Il pourrait s'agir d'un phénomène de déplacement de fluide près du guide qui entraîne les particules à proximité. Le déplacement de fluide est toujours dans le sens de la propulsion. Malheureusement, ce déplacement est beaucoup trop faible pour être exploitable (la vitesse sur le guide vaut environ $0,7 \mu\text{m}/\text{s}$). Par contre, l'effet de concentration de cellules sur le guide est assez rapide et d'une portée d'une centaine de microns environ. Par conséquent, cet effet pourrait se révéler utile pour concentrer des échantillons biologiques [167].

Manipulation de cellules marquées par des microbilles

Puisqu'il est impossible d'améliorer l'indice du guide potassium, nous avons tenté d'augmenter la sensibilité des cellules aux forces optiques. Nous avons donc développé une solution reposant sur le marquage cellulaire par des particules (billes d'or ou de verre) destiné à améliorer le comportement des cellules sur un guide potassium injecté.

Cette méthode a été envisagée pour augmenter de façon artificielle l'indice optique des cellules. En effet, nous avons déjà validé le déplacement de billes d'or ou de verre sur des guides potassium et grâce à cette méthode il serait envisageable que les forces optiques s'exerçant sur les billes soient suffisantes pour tracter les cellules le long du guide injecté.

Le marquage est une technique courante en biologie qui utilise la présence de marqueurs spécifiques à la surface des membranes cellulaires. Dans le cas des Jurkat, le marqueur est la protéine de surface CD3, qui est spécifique de ces cellules. De façon pratique, cela consiste à (i) fonctionnaliser la particule pour pouvoir lui accrocher un anticorps qui reconnaîtra le marqueur

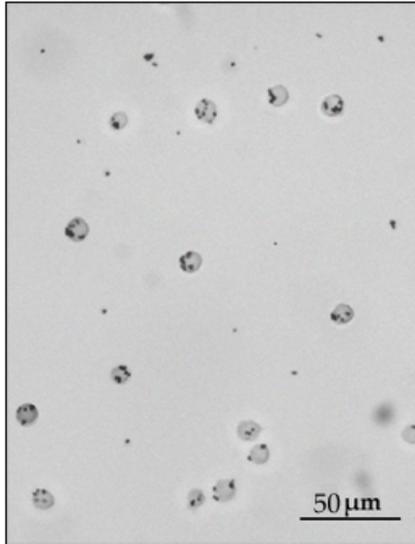


FIG. 3.8 – **Illustration du marquage de cellules par des billes d'or.** Les cellules Jurkat que nous utilisons sont une lignée de cellules de type lymphocyte, issue de leucémie humaine. Les particules utilisées pour ce marquage sont des billes d'or de 1 micron de diamètre. Ce sont les particules les plus performantes sur les guides potassium. Sur cette image réalisée en microscopie optique, les particules d'or apparaissent comme de petits points noirs sur le contour des cellules.

CD3 à la surface des cellules et (ii) à incuber les Jurkat avec ce mélange de billes/anticorps. Lorsque la reconnaissance antigène/anticorps a lieu, une bille est attachée à la cellule par l'intermédiaire de l'anticorps. Cette technique est décrite plus en détail au chapitre précédent (section 2.5.2.1). Des simulations préliminaires ont été réalisées afin d'évaluer les conditions théoriques les plus efficaces pour ce marquage. Selon les prévisions de nos collaborateurs opticiens, le déplacement de cellules par cette méthode serait possible si au moins une particule est accrochée sur la cellule et si cette particule interagit avec le mode guidé.

Après optimisation des conditions de marquage (voir section 2.5.2.1), j'ai ainsi pu obtenir des préparations cellulaires pour lesquelles, plus de 80% des cellules étaient marquées (cf fig 3.8).

La stratégie expérimentale est ensuite identique à celle suivie pour les cellules non marquées : l'échantillon de cellules marquées est lavé puis resuspendu dans un milieu adéquat (mannitol) et déposé dans la chambre d'observation en surface du guide. Le comportement des objets déposés est visualisé par le dispositif d'observation du banc. Nos premières tentatives de déplacement de cellules sur les guides potassium ont mis en évidence des faits intéressants.

En premier lieu, il reste, après marquage, de très nombreuses billes libres (non attachées) dans le mélange déposé. Celles-ci se déplacent sous l'effet de la pression de radiation. Ceci provoque un flux hydrodynamique qui entraîne les cellules sur le guide et les fait avancer (cf fig 3.9). Ceci permet de dire que les cellules utilisées en combinaison avec des particules permettent de déplacer ces dernières.

En raison de l'encombrement sur le guide (très grand nombre de billes libres attirées par les forces de gradient), les cellules situées à proximité du guide ne s'insèrent sur le guide que très difficilement. Néanmoins, le flux hydrodynamique généré par le déplacement des billes est

suffisant pour provoquer le déplacement des cellules les plus proches du guide. Le manque de spécificité de ce déplacement est toutefois un inconvénient.

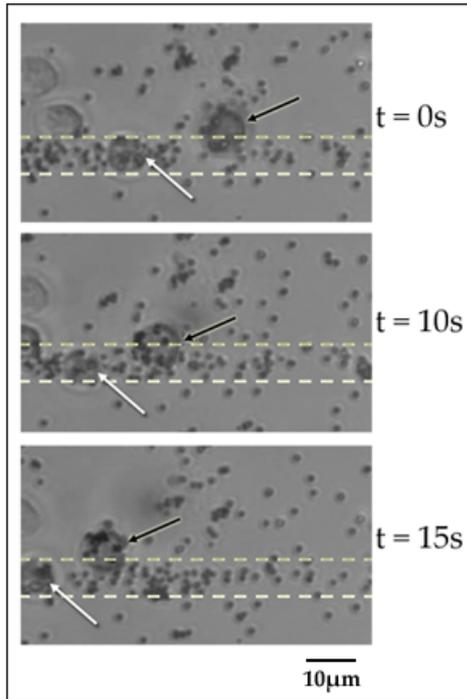


FIG. 3.9 – Illustration du déplacement de cellules marquées par des billes d'or sur un guide potassium. *Les nombreuses billes libres restantes dans le mélange se déplacent et provoquent un flux hydrodynamique qui pousse les cellules placées sur le guide (flèches blanches). Les cellules situées à proximité du guide s'y insèrent difficilement en raison de l'encombrement, mais le flux généré par les billes est suffisant pour provoquer un déplacement des cellules les plus proches (flèches noires). Les billes libres utilisées en combinaison avec des cellules permettent donc de déplacer ces dernières de façon assez efficace mais non spécifique.*

Le nombre de billes libres a été réduit en utilisant un système de filtres. Ces filtres possèdent des pores de $3 \mu m$ et retiennent les cellules marquées ($10 \mu m$) tout en laissant passer les billes libres. Ceci permet de diminuer de façon importante le nombre de billes libres restant dans le mélange.

En appliquant ce protocole à la préparation de notre matériel, le résultat est différent.

Nous n'avons observé ni déplacement de cellules sur le guide, ni mouvement de fluide (pas de cellules entraînées à proximité du guide). La pression de radiation, qui était capable de pousser les cellules non marquées (figure 3.6), s'avère donc insuffisante pour attirer des cellules marquées avec des particules d'or. Ce résultat à première vue contradictoire peut s'expliquer par des forces optiques trop faibles pour tracter les cellules marquées, ou par une trop faible interaction des billes accrochées avec le mode guidé. Il est utile de rappeler que l'onde évanescente en surface du guide est exponentiellement décroissante en surface du guide. Par conséquent, l'interaction de la bille avec le guide est d'autant plus importante que celle-ci est proche de la surface du guide. Il est possible que les billes d'or accrochées aux cellules soient trop éloignées pour subir une pression de radiation suffisante. Un éloignement de la bille de l'ordre de deux ou trois microns réduit grandement les forces optiques appliquées à la bille et, par conséquent, l'efficacité du déplacement est réduite. Nous pouvons aussi noter que la force de gravité s'exerçant sur la

cellule marquée engendre un frottement plus important sur la surface de l'échantillon qu'une cellule seule et cette force de frottement défavorise le déplacement.

3.1.7 Conclusion

Ces premières expériences sur des guides potassium, nous ont permis d'avoir une meilleure compréhension des phénomènes mis en jeu, en mettant en évidence les effets des forces de pression de radiation ainsi que des forces de gradient sur des particules métalliques et diélectriques. Nous avons également montré l'existence d'interactions de surface entre la bille et le guide ainsi que des phénomènes convectifs qui influent sur le comportement des particules étudiées. Ces aspects physiques, d'origine chimique, thermique ou fluïdique, sont difficilement contrôlables et ils influent nettement sur les expériences.

Grâce à ces guides simples et robustes, nous avons acquis un savoir-faire que nous avons rapidement tenté de transférer aux objets biologiques. Par comparaison avec la littérature, la propulsion de matériel biologique sur des guides d'ondes optiques n'a jamais été réalisée auparavant. L'effet de concentration de cellules sur le guide est rapide et d'une portée d'une centaine de microns environ. Il pourrait par exemple être utilisé pour concentrer des échantillons biologiques. Ainsi, nous avons décidé de déposer un brevet sur la base de ces résultats [167].

En ce qui concerne le déplacement des cellules sur le guide, la propulsion de cellules seules est si faible qu'elle semble difficilement exploitable. Par contre, nous avons montré que les particules utilisées en combinaison avec des cellules permettent de déplacer rapidement ces dernières, probablement par le biais d'un flux hydrodynamique provoqué par le déplacement des particules sur le guide. Toutefois, ce déplacement est non spécifique.

Ces résultats nous montrent toute la difficulté qu'il existe à déplacer des cellules sur des guides potassium. Avec ou sans marquage, notre modèle, la cellule Jurkat, reste très peu sensible aux effets des forces optiques.

3.2 Guides réalisés par échange d'ions argent

Ces guides, décrits dans le chapitre 2, sont caractérisés par un faible saut d'indice, de l'ordre de 0,01 et sont très légèrement enterrés afin d'empêcher l'oxydation de l'argent utilisé pour leur fabrication. De telles caractéristiques ne présageaient pas, a priori, une amélioration des performances du déplacement de matériel biologique par rapport à celui obtenu sur les guides potassium.

3.2.1 Résultats de déplacement de particules

Ces guides ont été créés par la même technologie que celle utilisée pour les guides potassium : l'échange d'ions. Cependant, les guides argent diffèrent des guides potassium par un léger enterrage du guide.

L'impact de cet enterrage s'est illustré notamment par les puissances nécessaires au déplacement qui sont plus importantes : la valeur seuil d'intensité a été mesurée aux alentours de 400 mW contre seulement 150 mW pour les guides potassium.

Certaines observations réalisées sur les guides potassium sont confirmées sur ces guides argent. C'est le cas de la vitesse des particules d'or pour laquelle il existe une relation linéaire avec la puissance guidée ($4 \mu\text{m}/\text{s}$ pour 300 mW injectés puis $10 \mu\text{m}/\text{s}$ pour une puissance de 650 mW).

Ensuite, ces échantillons diffèrent en ce qui concerne les interactions avec la surface. Sur les guides échangés à l'argent, les particules montrent une nette tendance à se coller sur la plaquette, ce qui rend très difficile leur déplacement. De plus, il existe un seuil de puissance à dépasser pour déplacer les particules, ce qui révèle l'existence de frottements sur la surface. Cette valeur seuil est d'environ 100mW.

Une autre différence concerne le regroupement des particules sur le guide. Cet effet est très faible et d'une portée de seulement quelques microns, ce qui laisse penser que seules les forces de gradient agissent. Les effets thermiques ne se sont jamais manifestés et nous n'avons pas observé d'effets de convection tels que ceux décrits précédemment.

Le déplacement de particules de verre est également moins efficace. Les billes avancent très peu, mais on continue d'observer la formation automatique de chaînes comme sur les guides potassium.

3.2.2 Conclusion

Ces guides ont confirmé certains comportements déjà observés sur les guides potassium. Par contre, à puissance injectée égale, ils montrent une efficacité moindre de déplacement des particules et ils ne développent pas de mouvements convectifs à leur surface. Tout porte à croire que la couche supplémentaire de silice en surface du guide d'onde diminue l'intensité de l'onde évanescente et limite les pertes vers le milieu liquide probablement responsables des flux convectifs vers le guide.

La propulsion de particules sur ces guides s'est avérée insuffisante pour décider d'engager des expériences de déplacement de matériel biologique sur ces échantillons. Nous nous sommes donc plutôt tournés vers des guides en nitrure de silicium dont l'indice de réfraction élevé laissait présager de bonnes performances de déplacement cellulaire.

3.3 Guides réalisés par dépôt de nitrure de silicium

3.3.1 Caractéristiques des guides utilisés

Contrairement aux guides décrits précédemment, les guides nitrure reposent sur une technologie différente, le dépôt de couche mince. C'est ici le nitrure de silicium qui est déposé sous la forme d'un film très fin sur une couche de silice et est utilisé comme zone guidante. Ce procédé confère aux guides ainsi créés un écart d'indice très important de la zone guidante par rapport au substrat ($\Delta n = 0,52$). En fin de procédé, les guides ont la forme de fins rubans de nitrure de silicium d'une épaisseur de 200 nm qui forment une marche à monter pour les particules à déplacer. Un surgravage latéral durant la phase de création des échantillons de guides (gravure ionique de type RIE) a rendu inutilisables les guides de largeur inférieure au micron. Les guides restants, de largeur comprise entre 1 et 10 microns, sont tous multimodes. La caractérisation de ces guides par des collaborateurs opticiens a révélé des pertes de propagation très importantes en polarisation TM, de l'ordre de 14 dB/cm (voir section 2.2.1.3) [158].

Bien que ces guides offrent des performances théoriques de tout premier ordre, il convient de vérifier ces qualités par l'étude du déplacement de particules avant de s'intéresser à des expériences plus complexes de déplacement cellulaire.

La section suivante décrira donc l'étude du déplacement de ces billes de taille, et de nature différentes. Comme auparavant et sauf précision, sur toutes les images présentées, la lumière se propage de droite à gauche. Contrairement aux guides à échange d'ions présentés précédemment, les limites spatiales du guide sont aisément visibles. Le dépôt formant la zone guidante présente un contraste d'indice important et sa géométrie en forme de ruban rend bien plus facile sa visualisation.

3.3.1.1 Rupture de la propagation lumineuse dans les guides nitrure

Dans certaines conditions expérimentales, le couplage lumineux avec des guides de nitrure de silicium peut se dégrader très rapidement. La propagation de la lumière dans le guide est réduite considérablement. Les observations expérimentales montrent localement un guide à l'aspect craquelé (figure 3.10).

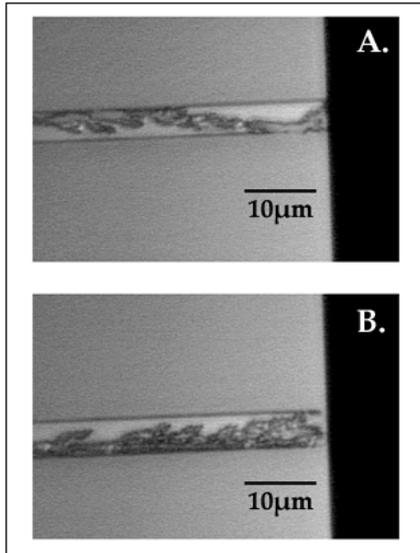


FIG. 3.10 – Dépôt sur des guides en nitrure de silicium. A. guide de $5\mu\text{m}$ et B. guide de $6\mu\text{m}$ de large. Dans certaines conditions de puissance et d'évaporation du milieu liquide, les guides de nitrure de silicium prennent un aspect craquelé. Le guide semble toujours présent (son aspect de ruban est conservé). Ce phénomène non élucidé qui stoppe la propagation lumineuse pourrait être dû à un dépôt de sels ou de sucre qui absorberait toute la lumière guidée, ou peut-être à une détérioration mécanique du ruban guidant provoqué par l'échauffement.

Il est difficile de savoir avec précision s'il s'agit d'un dépôt sur le guide ou d'une détérioration mécanique du guide. Néanmoins, ce phénomène semble se déclencher de préférence lorsque l'eau recouvrant le guide s'évapore en laissant un résidu absorbant sur la surface. Cet aspect pourrait donc être dû à une cristallisation et une absorption de sels ou de sucre présents dans le milieu liquide. Malheureusement, notre protocole de lavage n'est pas venu à retirer ce dépôt. On parvient à limiter le risque d'un arrêt de la propagation lumineuse en travaillant avec une épaisseur de liquide relativement importante, y compris au niveau des extrémités de la puce, et en limitant la durée des expériences à quelques dizaines de minutes.

3.3.2 Particules d'or

Un comportement différent.

Dans ces expériences, nous utilisons les mêmes billes d'or de $1\mu\text{m}$ de diamètre. Il convient de rappeler que ces particules s'étaient avérées les plus performantes sur les guides potassium, avec des vitesses de déplacement d'environ $9\mu\text{m/s}$ (voir section 3.1.1).

Le comportement des billes d'or est très différent sur les guides nitrure. Ces billes montrent un déplacement par à-coups sur ce type de guide. Elles montrent une nette tendance à se mouvoir sur les côtés du guide, au niveau du substrat de silice. Cette propulsion est caractérisée par des accélérations au cours desquelles la particule progresse rapidement. Ces accélérations sont ensuite généralement suivies d'une pause plus ou moins brève après laquelle la particule se déplace par une nouvelle accélération.

De plus, aucun phénomène de regroupement n'a été observé avec ces particules. Enfin, ces billes ne restent que peu de temps sur le guide, avancent en zigzag et à faible vitesse. Elles

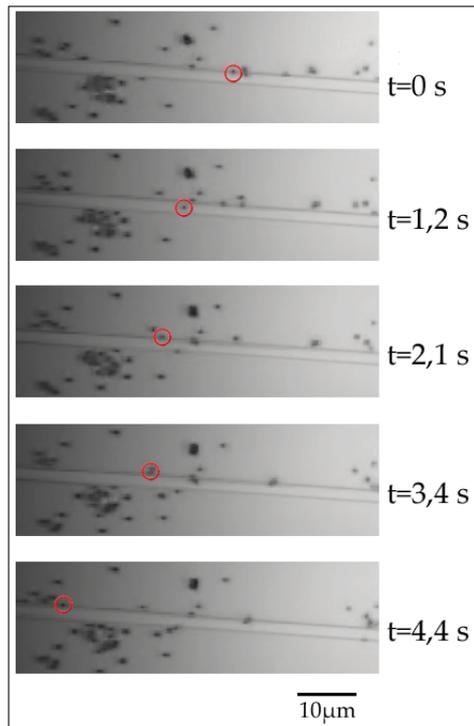


FIG. 3.11 – Déplacement de microbilles d'or de $1\mu\text{m}$ de diamètre sur un guide en nitrure de silicium de $4\mu\text{m}$ de large. Le déplacement d'une bille d'or parmi d'autres est matérialisé par le cercle rouge sur chacune des figures. Les billes d'or avancent par à-coups préférentiellement sur les côtés du guide. Ce déplacement nécessite une puissance plus importante que celle requise pour propulser les billes de verre sur ce même type de guide (voir section suivante).

redescendent assez rapidement sur la tranche du guide où elles poursuivent ce déplacement caractérisé par de brèves accélérations. Le caractère discontinu de ce déplacement rend les vitesses assez difficiles à évaluer mais elles semblent comprises entre 15 et $20\mu\text{m}/\text{s}$ à leur maximum. Les billes peuvent ensuite rester sur la tranche du guide pendant un temps généralement inférieur à la seconde avant de reprendre leur déplacement.

Malgré un déplacement par à-coups, les performances de déplacement sur les guides nitrure semblent confirmer la pertinence de leur utilisation en vue d'une problématique de déplacement cellulaire. Mais ces résultats tendent à montrer que les billes d'or ne sont pas les particules les mieux adaptées pour un marquage cellulaire. Leur déplacement trop brutal et discontinu est un frein à leur utilisation ultérieure.

Déplacements de nanoparticules d'or

Nous avons étudié la possibilité de déplacer des nanoparticules d'or de 250nm de diamètre sur les guides nitrure. La vitesse de déplacement de ces billes (environ $300\mu\text{m}/\text{s}$ sur la figure suivante, mais jusqu'à $700\mu\text{m}/\text{s}$ observés au maximum) explique le flou de l'image. On observe aussi un fond lumineux au niveau du guide produit par des pertes de diffusion sur les rugosités de surface. Le phénomène de découplage lumineux sur une nanoparticule d'or se manifeste sur les guides nitrure. En effet, avec ces guides, l'interaction entre la lumière guidée et les billes est particulièrement intense.

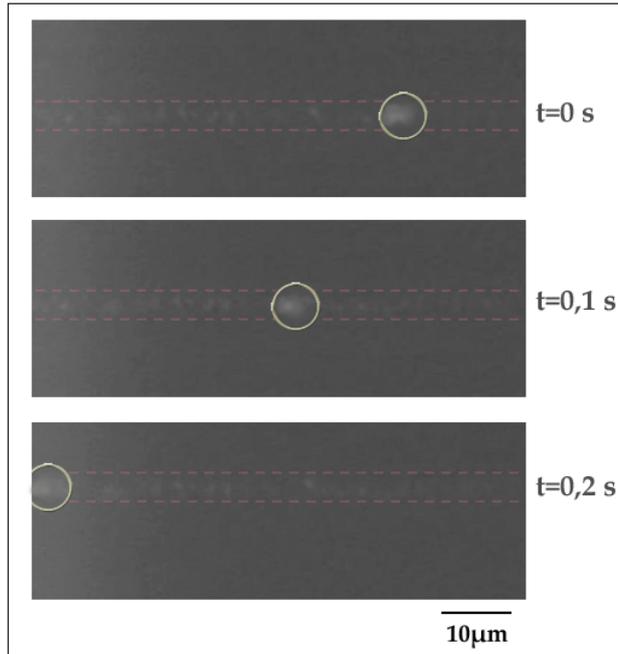


FIG. 3.12 – Déplacement d’une bille d’or de 250nm sur un guide en nitrure de silicium de $2\mu\text{m}$ de large. Un phénomène de découplage de la lumière entre les nanoparticules et le guide est observé : lorsque l’échantillon n’est pas éclairé, on observe des zones plus claires en mouvement sur le guide (cercles gris). C’est la manifestation de l’interaction d’une nanoparticule avec le guide. La vitesse de déplacement de ces billes (environ $300\mu\text{m/s}$) explique le flou de l’image. Dans les mêmes conditions, le guide (délimité par les pointillés) se matérialise également par des taches lumineuses semblables, révélant des pertes de diffusion à sa surface.

3.3.3 Particules de verre

Une pression de radiation élevée.

Les billes de verre ($2\mu\text{m}$ de diamètre) ont été les suivantes à être déplacées sur les guides nitrure. La puissance injectée est d’environ 40mW et les guides choisis ont une largeur de $6\mu\text{m}$.

La première remarque que nous pouvons faire est qu’avec une puissance guidée dix fois inférieure à celle utilisée avec les guides potassium, les vitesses de déplacement des billes de verre sont beaucoup plus importantes, de l’ordre de $50\mu\text{m/s}$. Ces résultats nous confortent dans le choix de cette technologie de guide d’onde qui offre des performances très intéressantes malgré l’étape d’injection lumineuse assez délicate à régler (voir la section 2.1.3.3).

Si l’on tente de déplacer les billes sur un guide d’une largeur de $1\mu\text{m}$ avec une puissance lumineuse d’environ 20mW , on constate que les vitesses de déplacement avoisinent les 20 microns par seconde. On constate également que les particules situées à proximité du guide y sont attirées. Les billes se déplacent latéralement jusqu’au guide avant de se déplacer sur celui-ci selon la direction de propagation de la lumière. Ceci démontre l’existence de forces de gradient suffisamment intenses pour attirer les particules et leur faire grimper la marche de 200nm correspondant à l’épaisseur du ruban formant le guide (voir figure 3.13).

Conclusion.

Ces expériences mettent en évidence les performances très intéressantes des guides nitrure sur



FIG. 3.13 – **Illustration de l'existence de forces de gradient pour un guide de nitrure de silicium et des particules de verre.** *Les forces de gradient générées avec les guides en nitrure de silicium permettent aux billes de verre (flèche noire) de grimper la marche de 200 nm formant la zone guidante.*

les particules de verre de $1\mu\text{m}$ de diamètre. Elles montrent notamment qu'il est possible d'obtenir des vitesses de propulsion très importantes pour les billes de verre avec une puissance laser typiquement vingt fois inférieure à celle utilisée lors de nos précédentes expériences avec les guides à échange d'ions. Les pertes de puissance importantes lors de l'insertion et la propagation, ainsi que la difficulté à focaliser précisément le faisceau laser à l'entrée du guide nitrure, n'empêchent pas l'obtention de bonnes performances de déplacement.

3.3.4 Particules de latex

Premières observations.

Les expériences de déplacement de billes de latex ($1\mu\text{m}$ de diamètre) ont été réalisées immédiatement après celles des billes de verre. En injectant une puissance de 20mW dans un guide de $1\mu\text{m}$ de large, on observe une attraction rapide des billes proches du guide (distance de quelques microns environ) suivi d'un déplacement rapide des particules, de l'ordre de $20\mu\text{m}/\text{s}$. Cette observation contraste avec le comportement des billes de latex sur les guides à échange d'ions, sur lesquels les billes de latex n'ont jamais été déplacées.

Nous pouvons faire plusieurs remarques sur le comportement des billes de latex sur les guides nitrure. Premièrement, étant donné leur faible densité ($d = 1,01$), ces billes ne tombent pas toutes sur le fond de la chambre sous l'effet de la gravité. Elles ne sont piégées et déplacées que lorsqu'elles entrent en contact avec le guide injecté ou arrivent dans son voisinage proche. Les forces de gradient agissent sur les billes de latex sur une distance de quelques microns. On remarque qu'une fois piégées, ces billes ne quittent plus le guide, ce qui illustre des forces de gradient particulièrement importantes pour les particules de latex sur ces guides.

D'autre part, le mouvement de convection observé pour les billes de latex autour des guides potassium ne s'est jamais manifesté sur ces échantillons. La concentration des billes ne s'étend que sur une distance de quelques microns à proximité du guide nitrure, à l'inverse de la convection

relativement élevée qui a été observée pour les particules de latex sur les guides potassium (section 3.1.3).

Conclusion.

Les résultats expérimentaux obtenus avec les particules de latex confirment les excellentes performances de ces guides. D'une manière générale, pour une puissance guidée très faible, les vitesses de déplacement sont bien plus importantes que celles obtenues avec des guides à échange d'ions. Les forces optiques sur ces guides sont très fortes, à la fois en propulsion et en piégeage. Ceci est intéressant car l'utilisation d'une faible puissance est un gain en termes de sécurité et de coût du microsysteme final. Nous avons également observé une grande variabilité des comportements et des vitesses des particules qui sont fonction de leur nature.

3.3.5 Déplacement de billes sur des structures complexes

La démonstration de la possibilité de déplacer des échantillons biologiques sur des guides d'ondes droits par des effets optiques serait un fait novateur. Mais il serait encore plus intéressant de réaliser des expérimentations d'un niveau de complexité supérieur en utilisant des géométries guidantes adaptées. Nous disposons sur les échantillons de guides nitrure de motifs particuliers potentiellement utilisables par un biologiste dans des expériences plus pertinentes de routage ou de tri.

3.3.5.1 Utilisation de motifs courbes

Nous avons testé la possibilité de déplacer des particules de verre sur des guides courbes (cf. figure 3.14). Ce type de structure amène un niveau de complexité supérieur au dispositif en permettant d'étudier les possibilités de routage de particules. Les guides courbes utilisés ont une largeur de $1\ \mu\text{m}$ et un rayon de courbure de $130\ \mu\text{m}$.

Il apparaît que le déplacement des billes de verre sur ce type de guide n'est pas modifié par rapport à un guide droit. Ainsi, on observe des particules de verre qui s'insèrent sur le guide avant d'y être propulsées (flèches noires sur la figure 3.14). Les forces de gradient et la pression de propulsion ne sont donc pas modifiées par la courbure du guide. La vitesse de déplacement, environ $28\ \mu\text{m}/\text{s}$ pour 30mW injectés dans le guide, est proche de celle sur les guides droits pour des puissances de laser comparables ($20\ \mu\text{m}/\text{s}$ sur un guide droit pour une puissance de $20\ \text{mW}$; valeur donnée dans la section précédente). La légère différence de vitesse entre les deux types de guides peut être due à la difficulté à optimiser le couplage entre le faisceau laser et le guide

d'onde lors de l'injection.

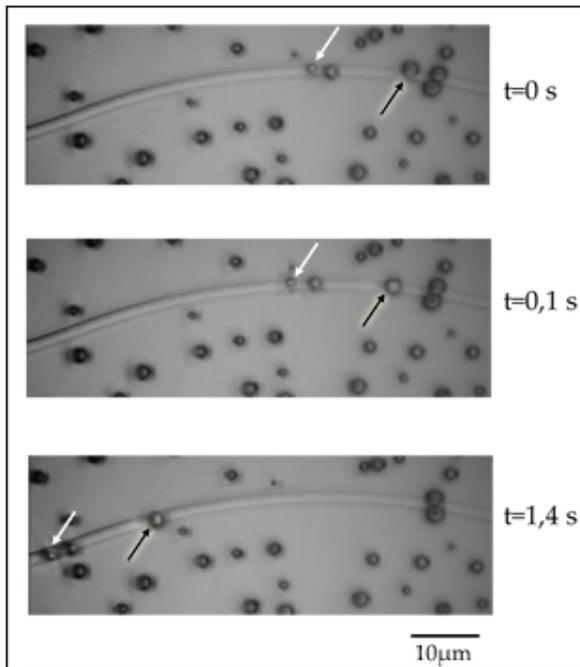


FIG. 3.14 – **Déplacement de billes de verre sur un guide courbe.** On observe une attraction des billes sur le guide, suivie d'une propulsion (flèche noire). La courbure du guide n'est pas préjudiciable au déplacement. Les forces de gradient maintiennent les billes sur le guide durant leur déplacement (flèches noires et blanches).

3.3.5.2 Utilisation de motifs en Y

Ce type de structure que nous désignerons par la suite sous le terme de jonction en Y a également été utilisé avec succès avec des billes de verre. La structure présentée sur la figure 3.15 est large de $1\mu\text{m}$ au niveau des guides et ses branches ont un rayon de courbure de $505\mu\text{m}$. Ce type de structure permettrait d'envisager des fonctions de tri et de routage entre différentes voies.

Cette étude a fait apparaître des points importants.

Premièrement, dans cette expérience, les particules sont propulsées sur chaque branche de la jonction, mais de façon inégale. En effet, la lumière ne se répartit pas de façon identique dans chaque guide, comme nous avons pu le vérifier avec la caméra CCD en sortie du guide d'onde (figure 2.2). Ainsi, expérimentalement, les particules se dirigent de façon préférentielle vers la branche dans laquelle la puissance est la plus importante (la branche supérieure dans la figure 3.15). La vitesse des billes de verre est d'environ $35\mu\text{m}/\text{s}$ sur le guide en amont de la jonction en Y. Après la jonction, les billes de verre sont propulsées à environ $28\mu\text{m}/\text{s}$ dans la branche supérieure et à environ $4\mu\text{m}/\text{s}$ dans la branche inférieure. Logiquement, la puissance guidée étant plus faible dans la deuxième branche, la vitesse des billes est moins importante.

Notons toutefois que les billes tendent parfois à s'amasser au niveau de la division du guide initial en deux branches et finissent par perturber le bon fonctionnement de cette répartition.

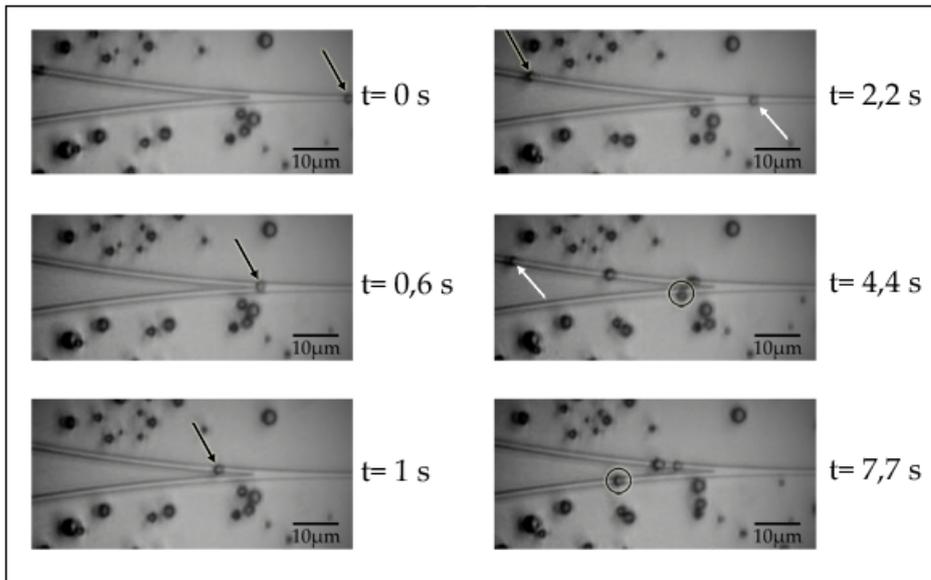


FIG. 3.15 – **Déplacement de billes de verre sur un guide dédoublé formant une jonction en Y.** *Les particules sont propulsées de façon inégale, à cause d'une répartition lumineuse différente entre chaque branche. Les particules se dirigent de façon préférentielle vers la branche supérieure dans laquelle la puissance est la plus importante (flèches noires et blanches). La vitesse des billes sur le deuxième guide est inférieure, la puissance guidée étant plus faible. Le nombre de billes propulsées y est également moindre (cercle noir).*

C'est un point que nous ne sommes pas parvenus à maîtriser.

3.3.5.3 Conclusion

Les expériences menées sur ces structures nous ont permis de vérifier le bon comportement des billes sur ces guides. La concentration et la propulsion de particules sur des guides courbes et des jonctions en Y permet d'envisager des expériences d'un niveau de complexité très supérieur au simple déplacement sur des guides droits. Ce sont ainsi plusieurs perspectives importantes du domaine des microsystèmes -*d'un intérêt évident en biologie mais aussi en chimie*- comme le routage, le tri et le regroupement qui deviennent possible.

3.3.6 Conclusion sur le déplacement de billes sur des guides en nitrure de silicium

Les travaux réalisés avec des microbilles sur les guides en nitrure de silicium nous ont permis d'appréhender les points clés du déplacement optique, d'observer les phénomènes physiques mis en jeu et de déterminer les conditions les plus favorables au déplacement de matériel biologique. En particulier, il s'avère que, contrairement à ce qui a été observé sur les guides potassium,

les billes d'or ne semblent pas être les particules les plus adaptées en vue d'une problématique cellulaire. Les particules diélectriques, comme les billes de verre ou de latex, offrent de bien meilleures performances de déplacement pour une faible puissance lumineuse injectée. Nous envisageons par conséquent d'utiliser ces particules comme marqueur dans des expériences de greffage cellulaire visant à renforcer la qualité du piégeage optique de cellules (voir la discussion à ce sujet au paragraphe 3.3.7.1).

Concernant les guides, nous avons ainsi remarqué que les excellentes performances théoriques des guides nitrure s'accompagnent d'une forte sensibilité à certains paramètres auparavant mineurs. Des difficultés expérimentales sont venues peser sur le rendement de ces guides (voir les pertes pour chaque type de guide dans le tableau 2.1). Les expériences préliminaires nous avaient ainsi fait croire à un faible bénéfice en terme de performances pour les guides nitrure par rapport aux technologies de guides par échange d'ions. En fait, le gain d'efficacité n'est expérimentalement possible que grâce à un contrôle rigoureux du protocole expérimental. La mise en place d'une démarche adaptée à l'extrême sensibilité de ces guides a permis de nettement améliorer la qualité de nos expériences. Le contrôle de la puissance guidée, de l'injection et de l'évaporation se sont notamment révélés être particulièrement importants.

Finalement, la maîtrise de ces paramètres majeurs nous a donné l'expérience nécessaire pour le transfert à des objets biologiques et nous a laissé espérer des performances exploitables pour des problématiques biologiques.

3.3.7 Déplacement de matériel biologique sur des guides en nitrure de silicium

3.3.7.1 Des cellules et des particules

Les résultats du déplacement de particules sur les guides nitrure, présentés précédemment, démontrent toute l'importance des travaux préliminaires. Cette étude nous a en effet permis d'identifier les paramètres importants de l'expérience, ainsi que les conditions théoriques les meilleures pour nos futurs déplacements de cellules.

Lors de nos précédentes expériences de déplacement de cellules sur des guides au potassium (cf section 3.1.6), nous avons marqué les cellules à l'aide de microbilles d'or. Ces billes étaient les plus performantes sur ce type de guide, d'après les expériences réalisées auparavant avec des billes d'or en solution (section 3.1.4.6). Malheureusement, le marquage des cellules avec des billes d'or n'a pas fourni les résultats escomptés.

Nous avons suivi le même raisonnement pour ces expériences de déplacement de cellules sur

des guides nitrure. Les résultats obtenus avec des billes seules tendent à montrer que les billes d'or ne sont pas les particules les mieux adaptées en vue d'une utilisation avec des échantillons biologiques. Leur déplacement très brutal et discontinu est un frein à leur utilisation ultérieure en tant que marqueur cellulaire sur les guides nitrure (voir section 3.3.2). En effet, les billes d'or placées sur le guide avancent plutôt lentement selon un mouvement de zigzag avant de redescendre pour avancer par à-coups sur le côté du guide.

A l'inverse, les billes de latex ($1\mu\text{m}$ de diamètre) ont montré un comportement tout à fait compatible (voir section 3.3.4). C'est pourquoi ce sont ces billes qui ont été choisies pour les expériences utilisant du matériel biologique. En effet, elles sont attirées sur le guide puis propulsées efficacement par les forces de pression de radiation. La puissance nécessaire à un tel déplacement est raisonnable, de l'ordre de 20 mW. De plus, les phénomènes convectifs observés sur les guides potassium avec les billes de latex n'ont jamais été observés sur les guides nitrure.

Cellules Jurkat seules

Préalablement aux expériences biologiques faisant intervenir des particules, il est indispensable de vérifier le comportement des cellules seules sur un guide nitrure injecté. Le modèle cellulaire de référence est ici encore la cellule Jurkat, une lignée issue des lymphocytes T du sang. Le protocole expérimental est simple : l'échantillon de cellules est lavé puis resuspendu dans du mannitol 280 mM. On dépose ensuite ce mélange dans la chambre d'observation en surface d'un guide nitrure. Malgré de nombreuses tentatives, il est apparu que les cellules Jurkat seules non marquées ne sont pas sensibles aux forces optiques générées à la surface des guides nitrure.

Cette étude préliminaire justifie l'utilisation de marqueurs pour sensibiliser la cellule aux forces optiques générées dans nos expériences. En marquant les cellules, nous supposons que les forces optiques s'exerçant sur les billes accrochées seront alors suffisantes pour les traquer sur le guide.

Cellules Jurkat non marquées mélangées à des billes de latex

Avant de réaliser un marquage cellulaire, nous avons voulu observer le comportement de cellules Jurkat non marquées mises en présence de particules de latex déposées sur un guide injecté. L'échantillon de cellules est lavé puis resuspendu dans du mannitol 280 mM. On ajoute ensuite les billes de latex et on dépose ce mélange dans la chambre d'observation en surface d'un guide nitrure d'une largeur de $2\mu\text{m}$ (figure 3.16).

Les billes libres présentes dans la solution sont piégées et propulsées sur le guide à une

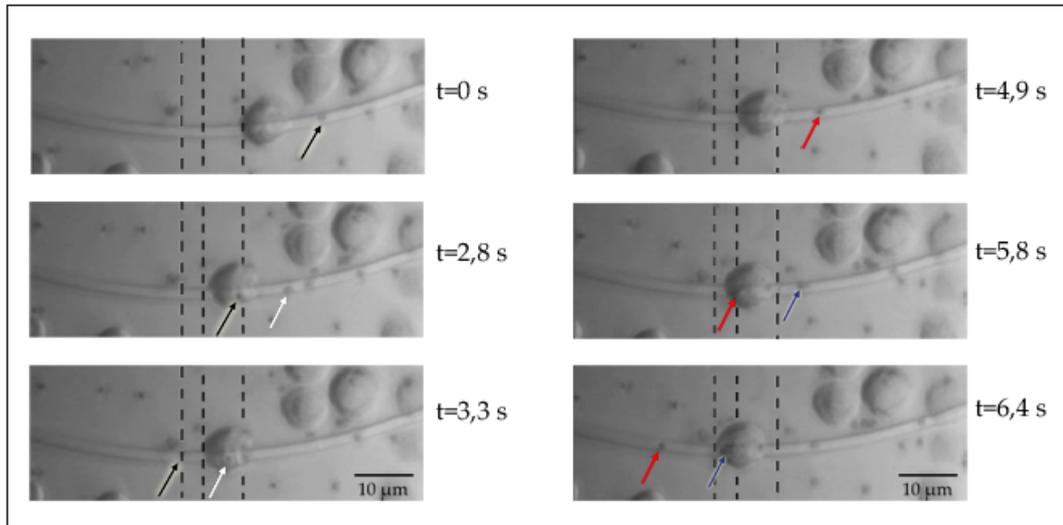


FIG. 3.16 – **Propulsion d’une cellule Jurkat non marquée par des billes de latex.** *Les billes piégées sur le guide poussent les cellules présentes sur leur trajectoire. Cette propulsion se réalise sur plusieurs microns (mise en évidence du déplacement par les lignes pointillées), avant que la cellule ne finisse par sortir du guide et ne soit plus poussée par les billes s’y déplaçant. Les flèches de couleur désignent les billes qui poussent les cellules. La transparence relative des cellules permet de voir les billes les propulsant.*

vitesse d’environ $22\mu\text{m}/\text{s}$. Elles entrent parfois en collision avec les cellules présentes sur leur trajectoire. Le guide choisi étant étroit, la particule ne peut contourner l’obstacle. La particule passe alors sous la cellule et la pousse de $3,5\mu\text{m}$ en moyenne (jusqu’à plus de $30\mu\text{m}$ de distance après plusieurs poussées successives). Sur la figure 3.16, la vitesse des cellules résultant de ces poussées est d’environ $2,3\mu\text{m}/\text{s}$.

Nous démontrons ainsi qu’il est possible de déplacer simplement des cellules non marquées sur des guides en nitrure de silicium à l’aide de microbilles. Cependant, l’absence d’interaction entre la particule et la cellule rend ce déplacement imprévisible en termes de fréquence, de distance et de durée. Les cellules ne semblent pas piégées ni poussées par les effets optiques du guide, comme nous l’avons vu dans la section précédente (“Cellules Jurkat seules”). Finalement, les chocs successifs avec les billes dévient peu à peu la cellule, qui finit par sortir du guide, que celui-ci soit droit ou courbe. La cellule n’est pas ramenée sur le guide par les forces de gradient optique.

Cellules Jurkat marquées par des billes de latex

Tout comme pour les marquages réalisés lors des expériences conduites sur les guides potassium, nous utilisons le marqueur membranaire CD3, qui est spécifique des cellules Jurkat.

α - Marquage cellulaire

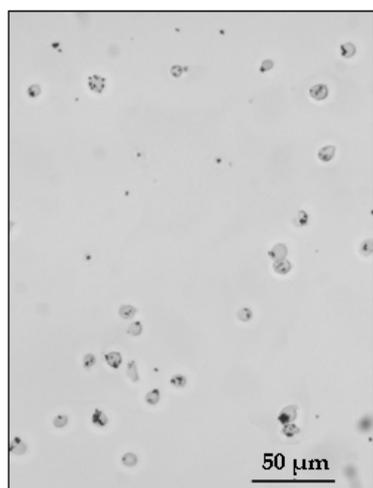


FIG. 3.17 – **Illustration du marquage de cellules par des billes de latex.** *Les particules utilisées pour le marquage des cellules Jurkat sont des billes de latex de $1\mu\text{m}$, qui sont les particules les plus performantes sur les guides au nitrure de silicium.*

Deux méthodes de fonctionnalisation des billes de latex ont été employées : une méthode par adsorption simple de streptavidine sur les billes de latex, et une méthode basée sur une fixation covalente de glutaraldéhyde sur les billes de latex avant l'adsorption de la streptavidine. Le marquage des cellules Jurkat avec les billes de latex est obtenu grâce à un anticorps biotinylé anti-CD3. Les méthodes de couplage utilisées pour la fonctionnalisation sont celles conseillées par le fabricant ¹ et sont décrites dans le chapitre 2.

Nos expériences n'ont pas mis en évidence de différence significative d'efficacité entre ces différentes méthodes de fonctionnalisation. Le choix est dicté par la nature chimique des billes. Si la particule présente un groupement amino en surface, on choisira la méthode utilisant le glutaraldéhyde. Dans le cas contraire, on utilisera la méthode d'adsorption passive de la streptavidine, qui donne de bons résultats avec les autres variétés de billes utilisées.

Dans les deux cas, le mélange final de billes fonctionnalisées est mis en présence de notre modèle cellulaire, la cellule Jurkat. L'anticorps nouvellement fixé à nos billes va alors reconnaître le marqueur membranaire CD3 spécifique de notre modèle. En pratique, on incube les cellules avec une petite quantité du mélange de billes couplées à l'anticorps. L'ensemble est ensuite très doucement agité pendant un certain temps, afin de favoriser la rencontre anticorps/antigène.

L'optimisation de ce protocole (quantités de produits et temps d'incubation notamment) a permis d'obtenir un très bon rendement de réaction. Au final, la majorité des cellules sont marquées par une ou plusieurs billes attachées à leur membrane (cf fig 3.17).

β - Expériences de propulsion de cellules marquées par des billes de latex

Les expériences précédentes nous ont permis d'observer un phénomène de poussée des cellules

¹ Sigma-Aldrich : <http://www.sigmaaldrich.com/>

Jurkat par des billes seules, identique à celui décrit précédemment. En revanche, la propulsion de ces cellules par des billes de latex accrochées à leur membrane, bien que théoriquement possible, n'a jamais été observée lors de nos expérimentations. Cet écueil est similaire à celui rencontré pour les cellules Jurkat marquées avec des billes d'or et placées sur des guides potassium. Les billes sont probablement trop éloignées du guide pour ressentir les forces de gradient et la pression de radiation, ou bien les interactions - *entre la particule et l'onde évanescente* - sont en trop faible nombre pour que cette traction puisse se produire.

De nombreuses expériences successives nous ont montré que ce modèle cellulaire affiche une neutralité remarquable vis-à-vis des effets optiques. La cellule ne colle pas au guide (c'est une cellule non adhérente), mais elle n'est pas piégée ni déplacée sur un guide injecté, même à forte puissance. Finalement, cette caractéristique pourra être judicieusement mise à profit pour des expériences ultérieures (voir la section 3.3.7.5).

γ -Viabilité des cellules déplacées

Des expériences ont été réalisées afin d'évaluer l'impact de la proximité avec les guides nitrure en termes de viabilité des cellules Jurkat. En effet, bien que ces cellules ne soient pas déplacées, nous avons souhaité vérifier que l'injection lumineuse prolongée ne provoque pas d'échauffement de la suspension susceptible d'endommager les cellules.

Des tests de viabilité des cellules Jurkat, décrits au chapitre précédent dans la section 2.9.1, ont donc été appliqués sur des cellules issues d'une expérience sur le banc optique (tube 1) et comparés ensuite à des lots témoins conservés à température ambiante ou exposés à un choc thermique :

- Cellules Jurkat dans du milieu complet (RPMI 10% SVF 1% pénicilline streptomycine), incubées 30 minutes à température ambiante : tube 2.
- Cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à température ambiante : tube 3.
- Cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à 37 ° C : tube 4.
- Cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à 39 ° C : tube 5.
- Cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à 42 ° C : tube 6.
- Cellules Jurkat dans du milieu complet, incubées 10 minutes à 80 ° C : tube 7.

Les résultats rassemblés dans le tableau 3.18 montrent que les expériences menées sur les cellules Jurkat sur le banc optique n'ont pas provoqué d'échauffement susceptible de faire chuter la viabilité de ces cellules ou de les faire entrer en apoptose.

Conditions	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4	Tube 5	Tube 6	Tube 7
Viabilité (%)	89	93	92	84	82	83	6
Etat d'apoptose	Non apoptotique	Apoptose avancée					

FIG. 3.18 – Résultats des tests de viabilité et d'apoptose menés sur les cellules Jurkat. Tube 1 : Cellules issues d'une expérience de déplacement. Tube 2 : cellules Jurkat dans du milieu complet, incubées 30 minutes à température ambiante. Tube 3 : cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à température ambiante. Tube 4 : cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à 37 °C. Tube 5 : cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à 39 °C. Tube 6 : cellules Jurkat dans du mannitol, incubées 30 minutes à 42 °C. Tube 7 : cellules Jurkat dans du milieu complet, incubées 10 minutes à 80 °C.

3.3.7.2 Déplacement de cellules non marquées

La neutralité des lymphocytes T (Jurkat) vis-à-vis des guides d'onde étant acquise, nous avons donc cherché à déplacer d'autres échantillons biologiques, comme les érythrocytes ou les levures, déjà utilisés dans des dispositifs basés sur des pinces optiques [52]. Ces modèles ont été choisis en raison d'un indice optique assez important, ce qui laisse présager *a priori* d'un comportement assez différent.

Propulsion optique de cellules sanguines

Les cellules ont été préparées par dilution d'une goutte de sang frais dans du mannitol (280 mM) supplémenté en EDTA à 0.5 mM pour prévenir la coagulation. On dépose ensuite délicatement une goutte de ce mélange en surface d'un guide d'onde de nitrure de silicium (10 μm de large, 60 mW injectés). *Note : l'échantillon de travail est issu de sang total. Si les hématies y sont très majoritaires, les autres cellules du sang sont également présentes.*

Les hématies sont propulsées sur le guide sans aucun marquage. La vitesse de déplacement est plutôt faible, de l'ordre de 1 $\mu\text{m}/\text{s}$ pour une puissance injectée de 60 mW. Si on se limite à des critères morphologiques, les cellules déplacées ne semblent pas subir de dommages visibles durant cette propulsion. De plus, cette propulsion ne nécessite aucun marquage.

Propulsion optique de levures

Nous avons également tenté de déplacer des levures par la même méthode. La levure utilisée est de la levure de boulanger, *Saccharomyces cerevisiae*, dont les individus ont une taille comprise entre 6 et 8 microns environ. On rappelle que la littérature ne donne pas de valeur consensuelle concernant l'indice optique des levures, même s'il semble compris entre 1,36 et 1,40 [52].

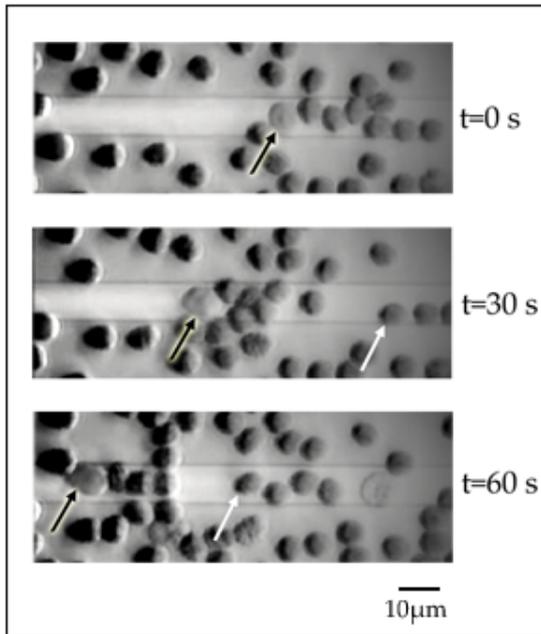


FIG. 3.19 – Démonstration de la propulsion optique de cellules sanguines sur des guides en nitrure de silicium. Les hématies sont propulsées le long du guide par la pression de radiation à des vitesses de l'ordre du micron par seconde. Cette propulsion ne nécessite aucun marquage.

L'échantillon peut dans ce cas être préparé de plusieurs façons différentes. En effet, la membrane particulièrement résistante de ces levures lui permet de supporter une gamme de pression osmotique assez large. En conséquence, le milieu liquide de suspension utilisé dans notre protocole expérimental pourra être de l'eau, du mannitol 280 mM, ou encore une dilution de cette dernière solution.

α - Propulsion de levures dans l'eau

Nous avons testé le déplacement de levures *Saccharomyces cerevisiae* placées dans l'eau ($n = 1,333$) sur un guide de $8\ \mu\text{m}$ de large et avec une puissance guidée d'environ 45 mW. Dans ce milieu, les levures se déplacent à une vitesse d'environ $4\ \mu\text{m}/\text{s}$ (cf figure 3.20) en poussant les levures parfois immobilisées sur le guide (flèches rouges sur la figure 3.20).

β - Propulsion de levures dans du mannitol à 280mM

Nous avons testé ensuite le déplacement de levures *Saccharomyces cerevisiae* placées dans du mannitol à 280mM ($n = 1,341$) sur un guide de $5\ \mu\text{m}$ de large et avec une puissance guidée d'environ 45 mW. Dans ce milieu, les levures se déplacent à des vitesses inférieures ou égales au micron par seconde. (cf figure 3.21). Ceci pourrait être dû à l'augmentation de l'indice optique du milieu environnant par rapport à l'indice optique des objets déplacés (nous avons vu l'importance de ce paramètre dans le chapitre 1 à la section 1.2.2.3).

Mais un autre paramètre peut expliquer la réduction de la vitesse de déplacement de *Saccharomyces cerevisiae* à puissance injectée égale : l'augmentation de la viscosité du milieu. En effet,

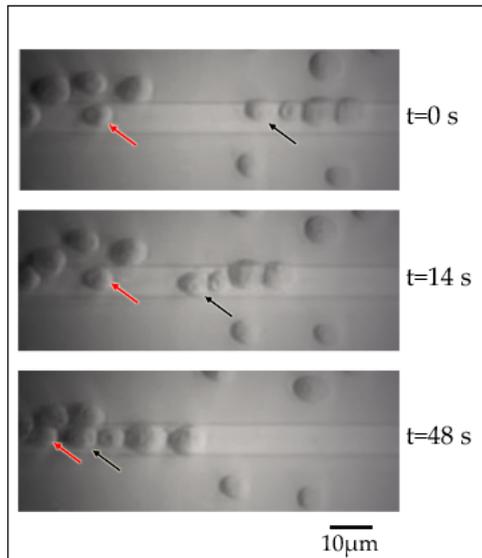


FIG. 3.20 – Démonstration de la propulsion optique de *Saccharomyces cerevisiae* dans l'eau sur des guides en nitrure de silicium. Les levures sont propulsées le long du guide par la pression de radiation à des vitesses de l'ordre de $4\mu\text{m/s}$ (flèches noires). Cette propulsion ne nécessite aucun marquage. On notera que les levures parfois immobilisées sur le guide (flèches rouges) sont poussées par les levures en mouvement.

le mannitol à 280 mM est plus visqueux que l'eau pure utilisée précédemment, ce qui produit des forces de frottement plus grandes sur les particules en déplacement.

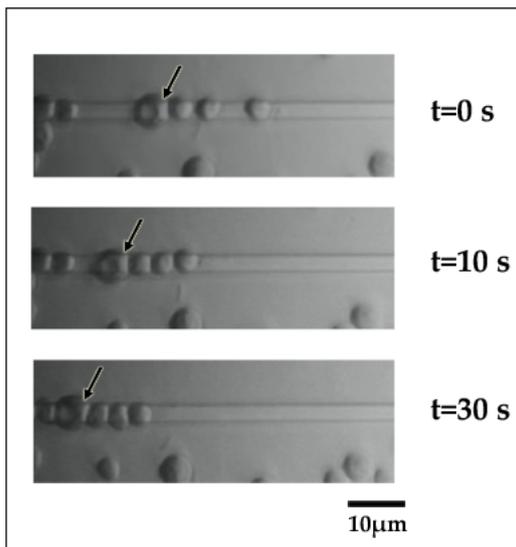


FIG. 3.21 – Démonstration de la propulsion optique de *Saccharomyces cerevisiae* dans le mannitol à 280mM sur des guides droits en nitrure de silicium. Les levures sont propulsées le long du guide par la pression de radiation à des vitesses inférieures ou égales au micron par seconde. Ceci pourrait s'expliquer par l'augmentation de l'indice optique du milieu environnant par rapport à l'indice optique des objets déplacés.

γ - Propulsion de levures dans du mannitol dilué

Voulant démontrer que l'augmentation de l'indice optique du milieu environnant par rapport à l'indice optique des objets déplacés pouvait expliquer les moins bonnes performances obtenues en déplaçant des levures dans le milieu mannitol (indice optique 1,34) plutôt que dans l'eau ((indice optique 1,33) nous avons déplacé des levures dans une solution diluée au 1/2 du tampon de mannitol (concentration de mannitol à 140 mM). Malheureusement, les résultats obtenus ne nous permettent pas d'identifier quel phénomène est prépondérant à cause d'une dispersion importante sur les vitesses qui ne nous autorise pas à établir de tendance générale.

Les vitesses moyennes obtenues dans ce cas sont légèrement inférieures au micron par seconde.

δ- Viabilité des levures déplacées

La méthode d'estimation de la viabilité par comptage au bleu trypan, décrite au chapitre précédent (section 2.9.2), a permis d'analyser l'influence des expériences de déplacement optique sur les levures. Les résultats montrent une viabilité de 86% pour le groupe de levures témoin n'ayant subi aucun test de déplacement. Ces valeurs proviennent des résultats menés sur 11 expériences, pour une durée moyenne de déplacement de 17 minutes. La différence sur la valeur estimée de la viabilité n'étant pas significative, on peut en conclure que l'impact du déplacement optique sur la viabilité d'une cellule de levure est négligeable.

Propulsion optique de particules issues du pollen

Voulant démontrer que ce concept de déplacement optique était également applicable à d'autres particules micrométriques biologiques, nous avons cherché un modèle végétal simple. Nous nous sommes tournés vers le pollen, dont les grains sont, *a priori*, un bon modèle pour réaliser une telle démonstration. Le matériel utilisé se présente sous la forme d'un assemblage de pollen de plusieurs origines, révélé par des pelotes de couleur et d'aspect différent. Nous avons resuspendu chaque variété présente dans l'échantillon de départ. Nous avons ensuite testé le comportement de ces différents grains de pollen sur les guides d'ondes. Cependant, leur taille très importante, de l'ordre de 50 à 100 microns n'a pas permis leur déplacement. Mais à cette occasion, nous avons mis en évidence, aux côtés des grains de pollen, une sous-population d'individus très différents et beaucoup plus petits, décrits au chapitre précédent dans la section 2.5.4.2. Cette population a dévoilé un excellent comportement, en se déplaçant à des vitesses de l'ordre de $12\mu\text{m}/\text{s}$ sur les guides optiques, pour 40 mW de puissance injectée environ (voir la figure 3.22).

3.3.7.3 Illustration des forces de gradient

Pour avoir un démonstrateur pertinent, il ne faut pas seulement une bonne efficacité de propulsion ; il faut également un piégeage stable qui permette de contrer le mouvement brownien des objets déplacés. Ainsi, il devient possible de concentrer des objets [167], mais aussi de les faire évoluer sur des motifs de guides particuliers, comme des structures courbes, en étant certain de ne pas perdre les cellules lors du trajet sur le guide optique.

Dans une solution de mannitol à 280mM, nous avons montré que les levures sont attirées sur le guide par des forces de gradient visiblement très élevées (figure 3.23). C'est une donnée importante que nous avons ainsi validée.

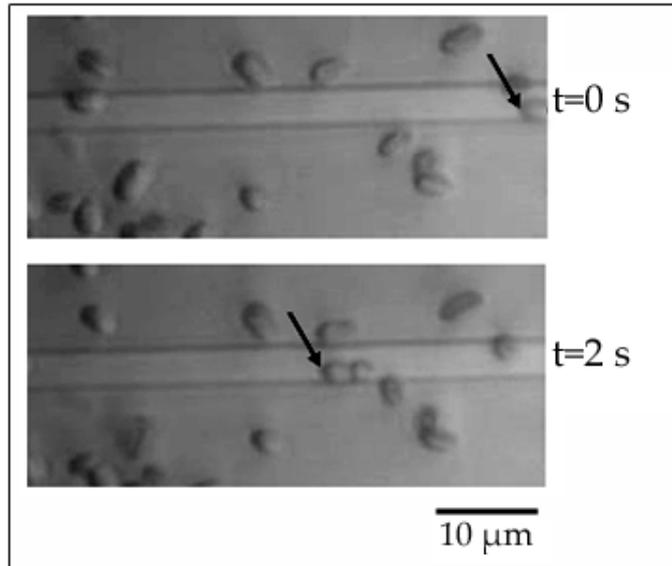


FIG. 3.22 – Propulsion optique de particules isolées à partir du pollen, sur des guides en nitrure de silicium. Ces particules sont déplacées sur le guide par les forces optiques à des vitesses de l'ordre de $12\mu\text{m/s}$ (flèches). Cette propulsion ne nécessite aucun marquage.

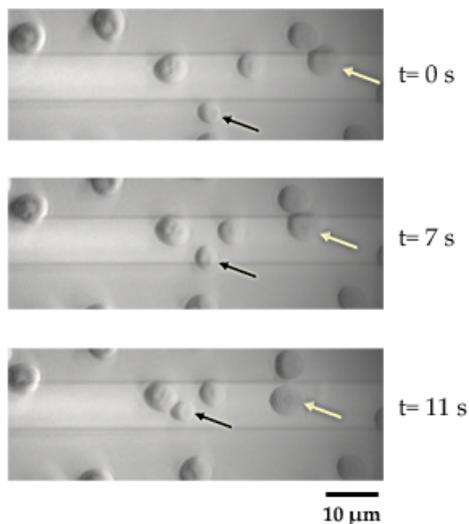


FIG. 3.23 – Démonstration de l'attraction de levures *Saccharomyces cerevisiae* par les forces de gradient sur des guides en nitrure de silicium. Les levures sont attirées sur le guide par les forces de gradient (flèches noires et blanches). Ces forces très importantes permettent aux levures de monter sur le guide (surélevé de 200nm au-dessus du substrat), de s'insérer sur le guide et d'y rester malgré la courbure du guide, avant que la pression de radiation ne les déplace le long du guide.

Propulsion optique de bactéries

Nous avons testé et validé le déplacement de bactéries sur des guides de $4\mu\text{m}$ de large pour une puissance guidée d'environ 40 mW . Les bactéries présentées sur la figure 3.24 sont issues d'une souche de *Rhodobacter capsulatus*, une petite bactérie pourpre non-sulfureuse. Cette bactérie s'est déplacée sur des guides droits et courbes à une vitesse d'environ $1,5\mu\text{m/s}$, mais des accélérations brusques jusqu'à $4\mu\text{m/s}$ ont également été observées.

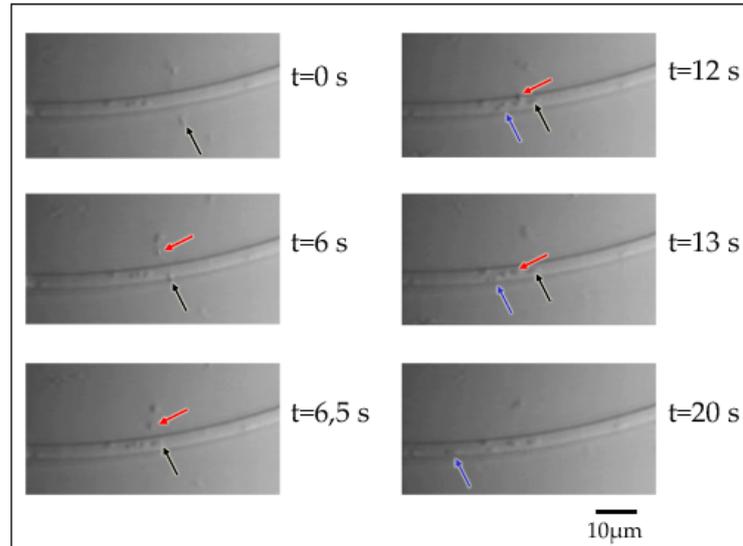


FIG. 3.24 – **Démonstration de la propulsion optique de *Rhodobacter capsulatus* dans l'eau sur des guides en nitrure de silicium.** Les bactéries sont regroupées sur le guide par les forces de gradient (flèches noires et rouges) et propulsées le long du guide par la pression de radiation à des vitesses de l'ordre de $1,5\mu\text{m/s}$ (flèches bleues). Cette propulsion ne nécessite aucun marquage.

3.3.7.4 Déplacement de cellules sur des guides courbes

Les guides droits sont les outils privilégiés pour démontrer la preuve du concept de déplacement optique. Mais cette technologie ne se résume pas au simple déplacement en ligne droite. Nous avons ainsi démontré qu'il était possible de déplacer des bactéries (figure 3.24) et des cellules (figure 3.25) sur des guides courbes. Les levures présentées ici sont attirées et piégées sur le guide et propulsées ensuite sur un guide courbe de $4\mu\text{m}$ et $6\mu\text{m}$ de large respectivement, pour une puissance d'environ 40 mW.

Il apparaît donc réaliste d'utiliser des motifs de guides de forme variée dans le cadre d'expériences de convoyage de particules biologiques sur des distances relativement grandes, *i.e.* sur quelques centimètres. Nous estimons que cette capacité à concentrer, aligner et déplacer des particules pourrait s'avérer utile dans des systèmes de préparation, de transfert ou d'observation d'échantillons. La section suivante présente une application potentielle pour la séparation de deux populations cellulaires.

3.3.7.5 Tri optique d'une population d'intérêt dans un mélange

En utilisant de façon pertinente l'absence de réactivité des cellules Jurkat vis-à-vis des forces optiques, il est possible de réaliser une démonstration de séparation de deux populations cellulaires.

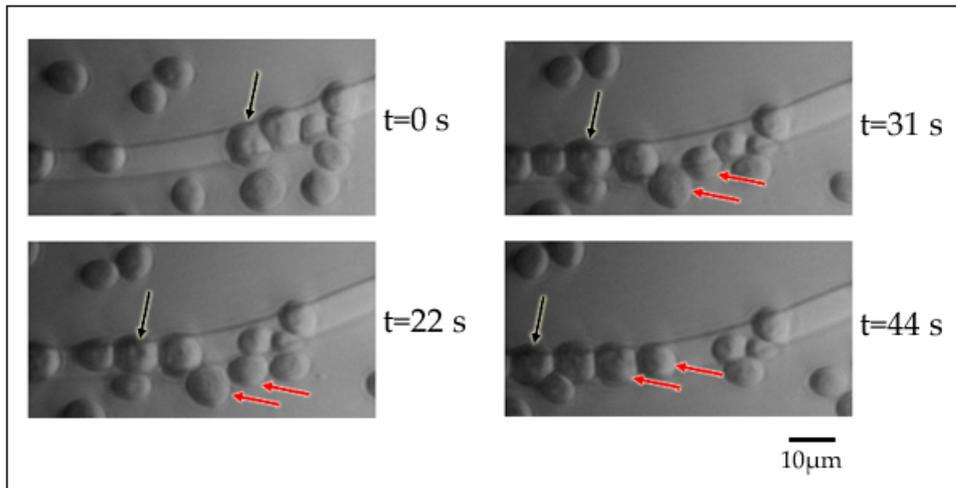


FIG. 3.25 – Démonstration de la propulsion optique de *Saccharomyces cerevisiae* dans le mannitol à 280mM sur des guides courbes en nitrure de silicium. Les levures sont propulsées le long du guide par la pression de radiation à des vitesses inférieures ou égales au micron par seconde (flèches noires). Les forces de gradient très importantes permettent aux levures de s'insérer sur le guide et d'y rester malgré la courbure du guide (flèches rouges).

Pour réaliser ces expériences, une chambre en PDMS a été construite selon la méthode décrite en détail à la section 2.3.4 et présentée dans la figure suivante. Des bactéries issues du pollen ont été mélangées à des cellules Jurkat (entre 4500 et 6000 cellules Jurkat environ sont mélangées à des bactéries et injectées dans la chambre).

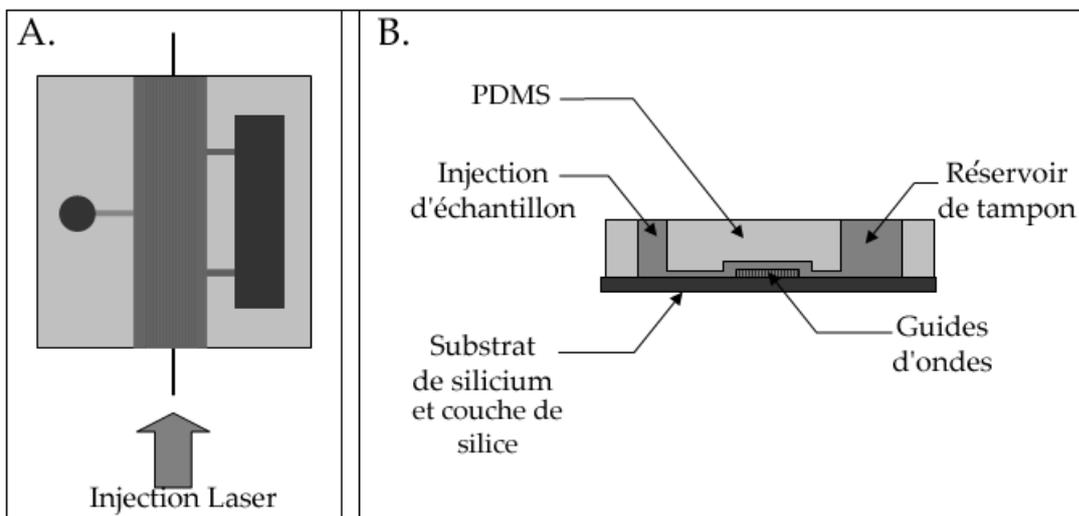


FIG. 3.26 – Schéma de la chambre utilisée pour les expériences de tri optique. En A, une vue de dessus de la chambre d'observation. En B, une vue transversale du dispositif. Un grand réservoir de milieu liquide est relié à la zone des guides, afin de compenser les pertes par évaporation. Une zone particulière est dédiée à l'injection de l'échantillon et reliée elle aussi à la zone des guides d'ondes. Ces guides sont protégés de tout contact physique avec le PDMS par un couloir de 2mm de large et 68 μ m de hauteur.

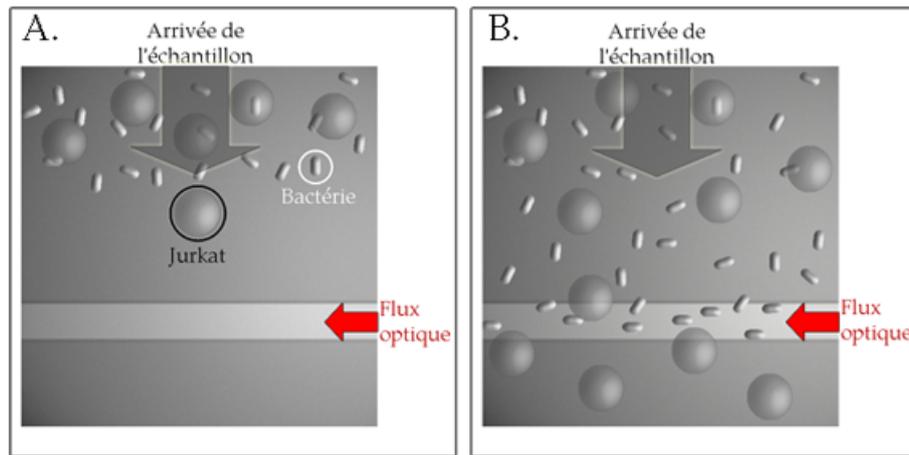


FIG. 3.27 – Principe du tri optique de deux populations cellulaires dans un mélange.

A. Au début de l'expérience, le mélange est introduit perpendiculairement au guide injecté. Il contient deux populations bien distinctes, des cellules insensibles aux effets optiques (Jurkat, cercle noir) et une autre population bactérienne (cercle blanc). B. Lorsque l'échantillon arrive au niveau du guide, les cellules Jurkat traversent le guide sous l'effet du flux. En revanche, les bactéries sont piégées sur le guide puis entraînées sur le guide. Les deux populations, cellules Jurkat et bactéries, se retrouvent donc séparées dans deux zones distinctes.

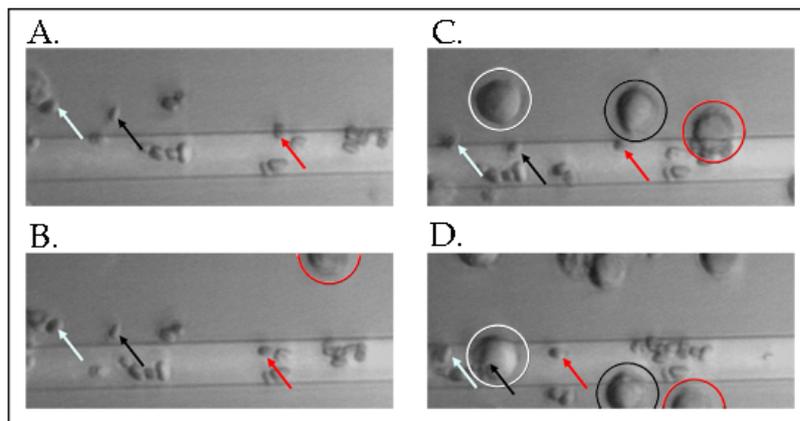


FIG. 3.28 – Démonstration d'un tri optique de deux populations cellulaires dans un mélange. Séquence montrant la possibilité de trier optiquement deux populations dans un mélange : des cellules Jurkat et des bactéries, respectivement matérialisées par des cercles et des flèches. L'échantillon arrive par le haut de l'image, perpendiculairement au guide. Suivant le principe présenté à la figure 3.27, les deux populations sont séparées en deux populations homogènes.

En injectant perpendiculairement au guide un échantillon composé de cellules Jurkat et de bactéries issues du pollen, il est possible de piéger et déplacer sélectivement la population bactérienne du mélange. Le schéma de principe de la séparation des deux populations est indiqué à la figure 3.27. Les cellules Jurkat étant insensibles aux effets optiques, nous avons utilisé cette caractéristique pour effectuer un tri cellulaire.

La démonstration du principe de tri est présentée sur la figure 3.28.

Ainsi, l'échantillon contenant le mélange de cellules Jurkat et de bactéries est amené sur le guide par un flux orthogonal au guide. Les cellules Jurkat poussées par le flux et insensibles aux forces de gradient ainsi qu'à la pression de radiation traversent le guide sans être déviées. A l'inverse, les bactéries sont attirées et piégées sur le guide d'onde. Elles sont alors éloignées de la zone de tri par déplacement à la surface du guide. **L'efficacité de ce tri est de l'ordre de 85%**(*nb bactéries piégées/nb bactéries total*).

De façon intéressante, le processus de tri et le transport de la population bactérienne est effectué par le même composant, le guide d'onde. Il faut aussi noter que puisque l'ensemble de l'échantillon est amené en contact avec le guide d'onde, les deux sous-populations de cellules et de bactéries peuvent en théorie être considérablement enrichies avec un taux d'erreur de tri supposé faible si la densité d'objets sur la surface n'est pas trop élevée. On peut également imaginer plusieurs guides d'onde de dimension variable et de différente nature disposés parallèlement et sur lesquels l'échantillon à trier passerait simultanément. Ceci permettrait d'affiner la qualité du tri, en particulier pour séparer un mélange cellulaire plus complexe.

Un défaut identifié de cette méthode concerne le débit de l'opération de tri. En effet, le flux hydrodynamique qui transporte le mélange de cellules jusqu'au guide d'onde est peu élevé. Néanmoins, le tri s'effectue sur un guide pouvant aisément faire plusieurs centimètres de long, *i.e.* l'échantillon à trier peut être réparti sur l'ensemble du guide. A la différence des microsystèmes de tri en flux présentés dans la littérature (voir des exemples de tels dispositifs dans la section 1.3), la suspension cellulaire n'est pas confinée dans un microcanal et il n'est pas nécessaire que les cellules arrivent une à une devant le détecteur et le moyen de tri. Dans le cas du tri sur guide d'onde, la séparation peut s'effectuer en parallèle sur toute la longueur du guide.

La seule limitation en terme de débit de tri semble être la densité d'objets circulant sur le guide : d'une part une grande quantité de particules sur le guide pourrait empêcher les cellules de traverser ou de s'insérer sur le guide, d'autre part des cellules devant traverser le guide pourraient être entraînées sur le guide en étant poussées par les particules plus petites, à la manière des cellules Jurkat poussées par les billes de latex sur les guides nitrure (figure 3.14). Un autre défaut concerne l'équipement associé au microdispositif. Bien que le guide d'onde soit un composant simple et durable, la nécessité d'employer un matériel optique complexe et coûteux (laser, objectifs, ...) autour du guide demeure une limitation technique importante.

Notons encore que le tri présenté ici est effectué sur la base des propriétés optiques intrinsèques des cellules Jurkat et des bactéries. Ainsi, la technologie de tri de particules décrite

ici se classe dans les méthodes de manipulation sans marquage et non invasives de suspensions cellulaires. De plus, d'après les études précédentes réalisées sur les cellules Jurkat et les levures *Saccharomyces cerevisiae*, la viabilité des cellules placées en contact avec le guide d'onde pendant quelques dizaines de minutes, ne semble pas compromise.

3.3.8 Mise en évidence de phénomènes particuliers

3.3.8.1 Autres paramètres influençant la vitesse de déplacement

Outre le transfert par à-coups entre maxima d'intensité lumineuse sur le guide multimode, d'autres paramètres influant directement la valeur des vitesses de déplacement ont été observés. En particulier, des mesures de vitesse effectuées sur le même guide et avec la même puissance peuvent révéler des dispersions très importantes. Ceci peut s'expliquer de plusieurs façons :

- Les interactions de surface (liaisons ioniques, hydrophobes,...) gênent le mouvement des billes ou des cellules.
- Le nombre de cellules en surface du guide semble également directement influencer leur vitesse. En effet, chaque objet interagit avec le guide et découple une partie de la puissance lumineuse injectée dans le guide. La puissance disponible pour chaque particule dépend donc du nombre de particules présentes simultanément sur le guide.
- L'intensité du couplage entre les particules et le guide varie continuellement le long du guide, en fonction de la hauteur de la particule et de l'intensité lumineuse locale située sous chaque particule.

3.3.8.2 Illustration du caractère multimode des guides utilisés

Le caractère multimode des guides utilisés (décrit par la figure 2.8 dans la section 2.2.1.3) peut être fréquemment observé pour les guides en nitrure de silicium. Ainsi, la trajectoire des petites particules sur les guides suit les maxima d'intensité lumineuse à la surface du guide.

Les particules présentées ici sont des bactéries d'une taille moyenne comprise entre 3 et $5\mu m$, et la puissance injectée est d'environ 40 mW dans un guide de $5\mu m$ de large (figure 3.29). Nous pouvons voir que les cellules ne se déplacent pas suivant une trajectoire rectiligne. Elles avancent selon un chemin en zigzag, sur la largeur du guide. On notera que cette course est la même pour toutes les cellules déplacées sur le guide lors d'une même expérience. Ceci confirme que le trajet des particules sur un guide est dicté par des maxima locaux d'intensité. Le déplacement en zigzag des particules peut aussi être observé sur les figures 3.1, 3.19, 3.20, 3.29 et 3.30.

Une conséquence de ce type de trajectoire concerne la vitesse réelle des particules propulsées

sur le guide. D'une part, comme indiqué dans la figure 2.9 (section 2.2.1.3), le chemin parcouru par les particules moins larges que le guide, *i.e.* par les particules sensibles à la position des maxima d'intensité lumineuse, est plus long que le chemin parcouru par les particules d'une taille comparable ou supérieure à la largeur du guide. D'autre part, la vitesse des petites particules varie suivant la région du guide considérée en raison des variations de l'intensité locale le long du guide. Les particules ont donc tendance à avancer par à-coups sur le guide d'un maximum d'intensité à un autre.

Il conviendra donc de choisir la largeur des guides en fonction de la taille des particules à déplacer. Pour les petites particules, l'utilisation de guides étroits permettrait de limiter le déplacement en zigzag si cela s'avère nécessaire pour certaines applications. Néanmoins, l'injection lumineuse dans des guides étroits est non seulement ardue à réaliser, mais également très délicate à maintenir dans le temps. De plus, ces guides sont assez fragiles et semblent plus sensibles aux phénomènes d'échauffement. En effet, d'un point de vue expérimental, les guides étroits sont plus fréquemment concernés par ces phénomènes que les guides larges (d'une largeur supérieure à $5\mu\text{m}$).

Les particules présentées ici sont des bactéries d'une taille moyenne comprise entre 3 et $5\mu\text{m}$ et la puissance injectée est d'environ 40 mW dans un guide de $5\mu\text{m}$ de large (cf. figure 3.29).

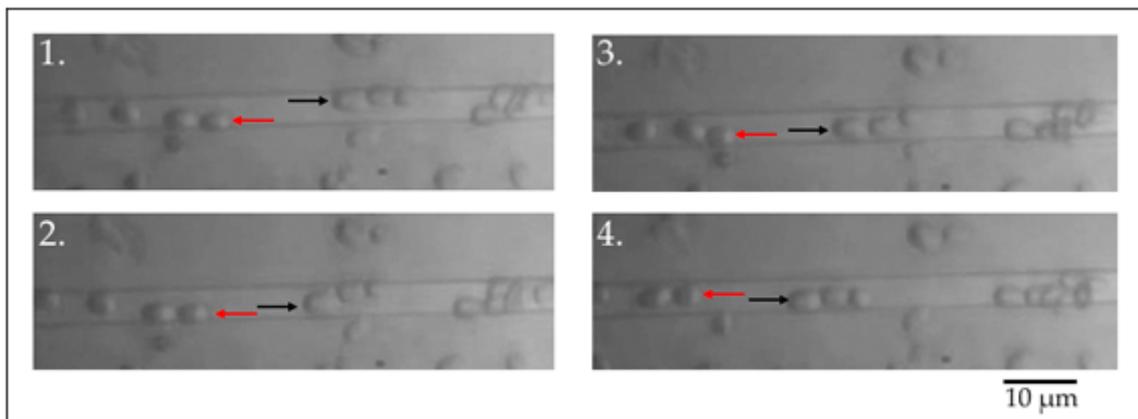


FIG. 3.29 – **Illustration du caractère multimode des guides utilisés.** *Les cellules se déplacent selon une trajectoire complexe en suivant les variations d'intensité locale dues à la multimodalité du guide.*

3.3.8.3 Illustration du découplage lumineux

Avec la caméra CCD que nous utilisons sur notre banc optique pour observer les échantillons, il est possible de visualiser le découplage de la lumière infrarouge injectée dans le guide. En effet, si l'oeil n'est pas sensible à une longueur d'onde de 1064 nm, les caméras CCD le sont encore

puisqu'il faut que le filtre du silicium n'intervienne qu'à 1100 nm. Lorsque la lumière de notre système de visualisation est éteinte, le déplacement des cellules, des levures sur la figure 3.30, est caractérisé par des clignotements lumineux irréguliers correspondant à une interaction de l'objet déplacé avec le guide injecté (voir figure 3.30 : flèches noires). Ces petits clignotements lumineux sont produits par un découplage ponctuel de la particule et du guide : la lumière laser confinée dans le guide se diffuse à travers la particule et est détectée par notre caméra d'observation.

Cette observation est intéressante à plusieurs points de vue :

- ceci démontre une interaction particulièrement forte de l'objet déplacé sur le guide. Le découplage lumineux peut donc être considéré comme un indicateur de la bonne qualité du réglage de l'injection.
- ce phénomène pourrait être judicieusement exploité dans un microdispositif pour détecter le déplacement d'une particule sur un guide injecté, en positionnant un photodétecteur sur le trajet du guide d'onde. A titre d'exemple, l'émission lumineuse due aux découplages permettrait de détecter la particule transportée sur le guide d'onde, et ainsi de modifier la répartition de la puissance du faisceau lumineux pour réaliser un tri sur une jonction en Y. En effet, cette détection ne nécessite pas de système d'observation particulièrement complexe pour être réalisée. Un photodétecteur simple, du même type que celui utilisé dans notre expérience, pourrait donc être employé.

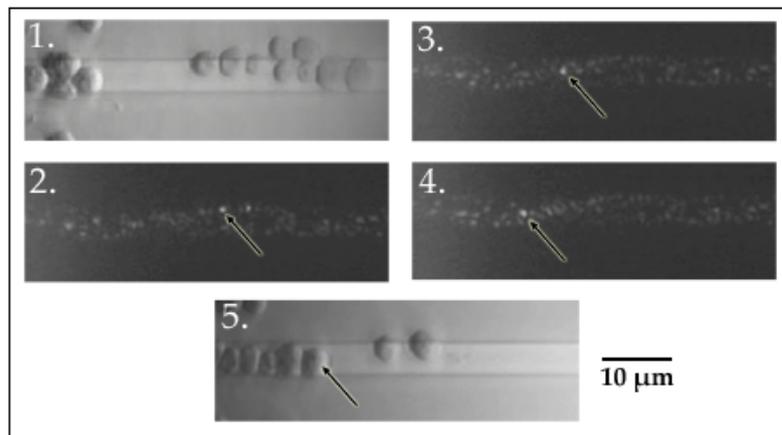


FIG. 3.30 – Illustration de l'interaction de *Saccharomyces cerevisiae* avec un guide de nitrure de silicium injecté. Lorsque l'éclairage de notre système de visualisation est coupé, le déplacement des levures est mis en évidence par des clignotements lumineux correspondant à l'interaction de l'objet avec le guide injecté (flèches noires). Ces découplages lumineux ponctuels correspondent à la cellule indiquée sur l'image 5. La lumière laser confinée dans le guide, se découple dans la particule et vient exciter le capteur de notre caméra d'observation.

3.3.8.4 Mise en évidence d'un déplacement préférentiel d'une population dans un mélange

Nous nous sommes ensuite intéressés au comportement d'un mélange de deux populations cellulaires sur un guide injecté. En mélangeant des levures à des bactéries issues du pollen, nous avons mis en évidence un déplacement différentiel. Les bactéries, plus rapides, dépassent les levures plus lentes situées sur le guide (voir figure 3.31). De cette façon, nous réalisons un tri cellulaire. En effet, la population cellulaire la plus rapide sera, en fin d'expérience, séparée de la population se déplaçant le plus lentement, pour peu que l'expérience dure assez longtemps pour que la séparation puisse s'établir, à la manière d'une chromatographie ou d'une électrophorèse.

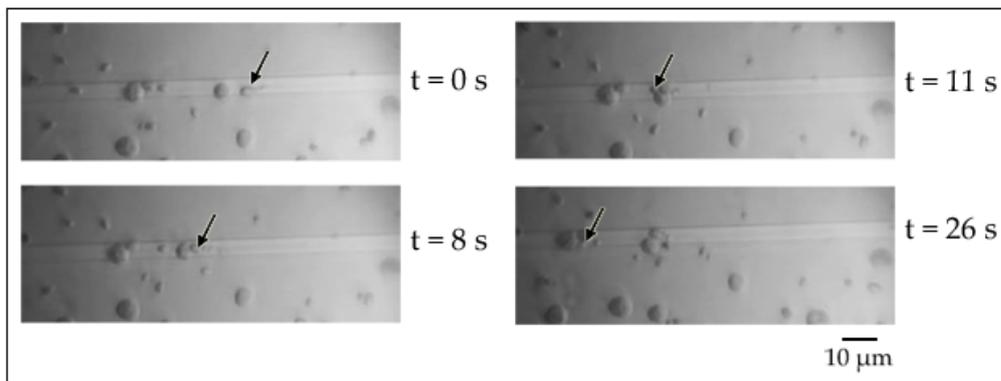


FIG. 3.31 – **Illustration d'un déplacement préférentiel d'une population dans un mélange.** Un mélange de levure et de bactéries issues du pollen est déposé sur un guide de $6\mu\text{m}$ de large. On observe que les bactéries, plus rapides, dépassent les levures plus lentes situées sur leur passage (une bactérie est désignée par les flèches noires).

3.3.9 Conclusion générale sur le déplacement de billes et de cellules sur des guides en nitrure de silicium

Nous avons montré la possibilité de déplacer des microparticules et des cellules sur les guides de nitrure de silicium. Les particules d'or (diamètre d'un micron) sont préférentiellement transportées par à-coups sur le côté du guide, tandis que les particules de verre et de latex (diamètres de $2\mu\text{m}$ et $1\mu\text{m}$ respectivement) sont déplacées de manière très efficace sur le guide pour une puissance injectée réduite à quelques dizaines de milliwatts. Bien que les cellules Jurkat, marquées ou non, se sont révélées insensibles aux forces optiques, celles-ci peuvent être poussées par des billes circulant sur le guide. En revanche, il s'est avéré possible de transporter des hématies, des levures et des bactéries non marquées sur les guides nitrure.

Trois schémas différents ont été proposés pour réaliser une opération de tri des particules :

- une séparation de deux particules placées en contact d'un guide, la population cellulaire sensible aux forces optiques étant retirée du mélange ;
- une séparation (théorique) sur une jonction en Y en modulant la puissance injectée dans chaque branche du guide pour orienter chaque particule. Le découplage lumineux entre les cellules et le guide pourrait éventuellement être employé comme moyen de détecter une cellule sur le guide en amont de la jonction en Y ;
- une séparation sur le guide entre deux populations cellulaires transportées à deux vitesses différentes.

La perte importante sur les guides nitrure au niveau de l'injection (pertes de couplage de 13 dB ; tableau 2.1) rend nécessaire l'utilisation d'un laser de forte puissance. L'utilisation de fibres optiques effilées en pointe pourrait permettre d'améliorer de façon significative ce paramètre.

De plus, les caractéristiques intrinsèques de nos échantillons de guides nitrure, et notamment l'épaisseur de la couche de silice, font que les pertes de propagation (2 dB/cm) sont supérieures à celles obtenues sur des guides réalisés par échange d'ions (0,5 dB/cm pour les guides potassium et 0,25 dB/cm pour les guides argent). Cependant, il est possible de construire des guides nitrure avec une couche de silice plus importante pour éviter les fuites de puissance dans le substrat et ainsi réduire les pertes de propagation des guides nitrure.

Il est également possible d'imaginer un couplage avec un système fluïdique pour surmonter ce problème et prendre en charge les particules déplacées optiquement jusqu'au site d'une étape ultérieure, comme par exemple un tri optique tel que celui présenté précédemment.

La réalisation d'une chambre de PDMS destinée à accueillir l'échantillon a été un point important pour la conduite des expériences biologiques sur les guides en nitrure de silicium. Grâce à ce dispositif, nous avons évité les problèmes liés à l'évaporation de liquide et aux mouvements de fluides parasites qui peuvent perturber le bon déroulement d'une expérience. Il est également possible d'imaginer un système fluïdique pour prendre en charge les particules déplacées optiquement jusqu'au site d'une étape ultérieure, comme par exemple un tri optique.

Les résultats donnés dans les paragraphes précédents ne donnent qu'un aperçu des phénomènes observés dans nos expériences. D'autres paramètres influant directement sur la valeur des vitesses de déplacement ont été découverts. En particulier, des mesures sur le même guide et avec la même puissance peuvent révéler des dispersions importantes sur les vitesses. Ceci peut s'expliquer de plusieurs façons :

- i) Les interactions de surface gênent le mouvement des billes ou des cellules.
- ii) Le nombre de cellules en surface du guide semble également directement influencer les

mesures. En effet, chaque objet interagit avec le guide et découple une partie de la puissance lumineuse injectée dans le guide. Evidemment, cet effet est sous l'influence de plusieurs paramètres, parmi lesquels figurent la concentration de particules et l'intensité d'interaction des particules avec le guide.

3.4 Conclusion du chapitre

Cette étude du déplacement de particules et de cellules sur des guides d'ondes variés nous a permis d'identifier des phénomènes associés au déplacement des particules, les paramètres clés des expériences et les meilleures conditions pour un déplacement d'objets biologiques. En particulier, d'un point de vue biologique, nous retiendrons que cette technologie permet de déplacer des cellules et même de trier des populations cellulaires dans un mélange. Le transport de cellules est en partie dû aux performances des guides en nitrure de silicium qui permettent, par comparaison avec les guides à échange d'ions, d'obtenir des vitesses de déplacement supérieures pour une puissance guidée très inférieure. Ces guides nitrure sont bien plus efficaces que les guides potassium en terme vitesses obtenues par rapport à la puissance injectée. Les guides césium très utilisés jusqu'alors dans la littérature sont également environ 20 fois moins performants que nos guides nitrure [77]. Cette étude nous a permis de mieux connaître les phénomènes impliqués dans ce déplacement optique. L'identification de paramètres physiques, fluidiques ou de chimie des surfaces, se combinant dans nos expériences, nous a donné l'occasion d'étudier leur impact sur la qualité du transport sur guide d'onde. Ces paramètres sont autant de points grâce auxquels ce dispositif pourrait être amélioré de façon significative. La technologie de concentration et de transport sur guide d'onde permet d'envisager des applications intéressantes et utiles, en biologie, en chimie ou dans le domaine du tri de particules. Finalement, l'intégration de cette technologie dans un dispositif intégrant d'autres techniques, comme la microfluidique ou la diélectrophorèse, pourrait permettre la réalisation de microsystèmes intéressants et novateurs.

Conclusion

Au commencement de cette thèse, très peu d'informations étaient disponibles sur le mode de transport de particules sur guide d'onde. Dans une première partie, nous avons cherché à reproduire les résultats présentés dans la littérature avec des particules d'or et de verre. Notre approche a reposé sur l'analyse des phénomènes mis en jeu, pour mieux comprendre le fonctionnement d'une onde évanescente et identifier les paramètres clés à maîtriser. Nous avons ainsi commencé par rejoindre l'état de l'art en déplaçant ce type de particules et ainsi acquis la compréhension et l'expertise nécessaires à un transfert au déplacement de cellules vivantes par des ondes évanescentes. Nous avons démontré, pour la première fois à notre connaissance, la possibilité de déplacer du matériel biologique sur des guides d'ondes optiques. Nous voulions finalement démontrer la réalité biologique d'une telle technologie et son intérêt potentiel dans un microsystème, en concevant un démonstrateur de tri. A cet effet, un banc expérimental de manipulation optique a été mis en place pour étudier le comportement de particules et d'objets biologiques sur des guides d'ondes optiques. Sa souplesse d'utilisation a notamment permis d'utiliser des échantillons de guides d'ondes représentatifs de technologies de fabrication différentes. Nous avons ainsi pu juger expérimentalement des forces et des faiblesses propres à chaque technologie de guide et déterminer les conditions les plus favorables en vue d'un déplacement de matériel biologique. Ainsi, dès les premières expériences de manipulation de particules sur des guides réalisés par dépôt de couches minces en nitrure de silicium, il nous est apparu que ce matériau était le plus performant. En effet, la puissance nécessaire au déplacement de particules sur les guides en nitrure de silicium s'est avérée être environ 20 fois inférieure à celle nécessaire pour des guides à échange d'ions césium, pour des performances équivalentes.

Ces excellentes performances rendent possible l'application de cette technologie à des objets de masse ou de taille supérieures et à d'autres domaines scientifiques, comme la chimie ou la biologie. Nous avons ainsi démontré expérimentalement le déplacement de globules rouges, de levures et de bactéries sans aucun marquage.

Ce transport de cellules vivantes sur des guides d'ondes optiques constitue, à notre connais-

sance, la première démonstration expérimentale de la propulsion d'objets biologiques par ondes évanescentes et illustre l'intérêt de cette technologie en biologie, notamment dans une approche de type microsysteme.

L'efficacité de ce déplacement pour une espèce bactérienne nous a permis de réaliser avec succès des expériences de tri cellulaire de sous-populations dans un mélange de bactéries et de cellules Jurkat. Ceci démontre la capacité à réaliser, sur une petite surface, des expériences biologiques simples grâce à de tels dispositifs et renforce l'espoir de l'utilisation d'une telle technique dans une approche de type laboratoire-sur-puce.

Mais *-comme tout démonstrateur-*, cette technologie a encore un long chemin à parcourir, et des défis à relever, pour passer de son statut actuel à celui d'une technologie bien implantée et couramment utilisée dans les laboratoires.

D'ici là, de nombreux points restent encore à résoudre, tant du point de vue optique que de la chimie ou de la biologie. Le développement d'une méthode de prototypage rapide de dispositifs en PDMS nous a certes permis de maîtriser certains aspects fluidiques liés à la manipulation optique sur ces dispositifs. Mais certains verrous expérimentaux restent encore à améliorer. En particulier, les facteurs impliqués dans les phénomènes d'adhésion, comme l'état de surface ou les caractéristiques du milieu liquide baignant les particules ou les cellules, mériteraient d'être étudiés de plus près. D'autre part, une optimisation des caractéristiques des guides et notamment l'épaisseur de la couche de silice déposée sur le substrat de silicium, permettrait de réduire fortement les fuites dans le substrat et les pertes de propagation observées sur les guides en nitrure qui en découlent. De même, il serait utile d'étudier d'autres types de guides constitués de matériaux différents. Les indices optiques élevés des billes de latex utilisées permettent de penser que des structures guidantes réalisées dans ces mêmes matériaux polymères seraient théoriquement performantes et peut-être plus simples à utiliser que les guides en nitrure de silicium, les meilleurs candidats actuels.

Néanmoins, les informations acquises lors de nos expériences ont permis de réaliser un démonstrateur de propulsion optique très intéressant. Nous avons introduit la biologie dans ce domaine nouveau et réalisé des expériences inédites. La possibilité de manipuler des cellules sans contact agressif ni létal pour les cellules a été vérifiée.

L'application d'un tel système dans d'autres domaines technologiques que le simple transport de cellules pourrait en outre s'avérer particulièrement pertinente. Dans certaines problématiques de recherche, il est parfois nécessaire de pouvoir par exemple fusionner, déplacer et stocker des réactifs afin que des réactions cinétiques puissent se produire. Les capacités de routage de cette

technologie mériteraient donc d'être explorées bien au-delà de la manipulation de particules et de cellules.

Liste des communications et brevets

Publications

- **G. Colas**. De la lumière pour manipuler les choses. *Le Gluon, Université Joseph Fourier*, Novembre 2004.
- S. Gaugiran, S. Gétin , J. M. Fedeli, **G. Colas**, A. Fuchs, F. Chatelain et J. Dérourard. Optical manipulation of microparticles and cells on silicon nitride waveguides. *Optics Express*. Vol 13, N°18, pages : 6956-6963, septembre 2005. Fourni en annexe 4
- S. Gaugiran, **G. Colas**, A. Fuchs, S. Getin and J. Derouard. Microparticles manipulation and cells handling on optical waveguides. *Proceedings of μ TAS 2005*, 9-13 octobre 2005, Boston, USA.
- **G. Colas**, S. Gaugiran, A. Fuchs, S. Getin, F. Chatelain and J. Dérourard. Cell manipulation on optical waveguides. *Proceedings of NanoBio-Europe 2006*, 14-16 Juin 2006, Grenoble, France.

Brevets

- S. Getin, A. Fuchs, **G. Colas**, et S. Gaugiran. Procédé de concentration de particules. WO2005054819
- S. Getin, A. Fuchs, **G. Colas**, et S. Gaugiran. Procédé de tri de particules. WO2005054832
- S. Getin, A. Fuchs, **G. Colas**, et S. Gaugiran. Dispositif de séparation d'objets par voie optique. WO2005054818

Participation aux congrès.

- Présentation de poster : Micro Total Analysis Systems (Boston, US). Octobre 2005
- Exposé oral : NanoBio-Europe 2006 (Grenoble, France) 14-16 Juin 2006. *Prix du meilleur exposé oral (Best Oral Communication Award)*.

Chapitre 4

Article publié dans la revue *Optics
Express*

Optical manipulation of cells on silicon nitride waveguides

S. Gaugiran, S. Gétin and J. M. Fedeli

Laboratoire d'Electronique et des Technologies de l'Information, Commissariat à l'Energie Atomique, 17, avenue des martyrs, 38000 Grenoble, France

gaugiran@chartreuse cea.fr, getin@chartreuse cea.fr

G. Colas and A. Fuchs

Laboratoire Biopuces, Département des Sciences du Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique, 17, avenue des martyrs, 38000 Grenoble, France

J. Dérourard

Laboratoire de Spectrométrie Physique, Université Joseph Fourier, BP 87 38402 Saint Martin d'Hères, France

Abstract : We demonstrated the optical manipulation of live cells and dielectric particles on the surface of silicon nitride waveguides. 2 μ m glass particles were propelled at velocities of 15 μ m/s with a guided power of only 20mW. This high power efficiency permits to use this device on low refractive index objects as cells. Red blood cells and yeast cells are trapped on the waveguide and pushed along it by the action of optical forces. This kind of system can be easily combined with various integrated optics structures and open the way to the development of new microsystems for cells sorting applications.

© 2005 Optical Society of America

OCIS codes: (130.3120) Integrated optics devices; (140.7010) Trapping; (170.4520) Optical confinement and manipulation; (230.7380) Waveguides, channeled

References and links

1. A. Ashkin, "Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure ", Phys. Rev. Lett. **24**, 156-159 (1970)
2. A. Ashkin, J. M. Dziedzic, "Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria" , Science **235**, 1517-1520 (1987)
3. D. L. J. Vossen , "Building two and three-dimensionnal structures of colloidal particles on surfaces using optical tweezers and critical point drying" *Mat. Res. Symp. Proc.*, Vol. 705, (2002)
4. J. Arlt and V. Garcés-Chavez, "Optical micromanipulation using a Bessel light beam", Opt. Comm. **197**, 239-245 (2001)
5. E.R. Dufresne, D.G. Grier "Optical tweezers arrays and optical substrates created with diffractive optics" Rev. Sci. Instr. **69**, 1974-1977 (1998)
6. R. A. Flynn, A. L. Birkbeck, M. Gross, M. Ozkan, B. Shao, M. M. Wang, and S. C. Esener, "Parallel transport of biological cells using individually addressable VCSEL arrays as optical tweezers", Sensors and Actuators B **87**, 239-243 (2002)
7. H. Andersson, and A. Van Der Berg., "Microfluidic devices for cellomics: a review", Sensors and Actuators B **92**, 315-325 (2003)
8. M.M. Wang, " Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching", Nature Biotech., **23**, 1, 83-87 (2005)
9. M.P. MacDonald, G.C. Spadling. and K. Dholakia., "Microfluidic sorting in an optical lattice", Nature **426**, 421-424 (2003)
10. S. Kawata and T. Sugiura, "Movement of micrometer-sized particles in the evanescent field of a laser beam", Opt. Lett., **17**, 772-774 (1992)
11. S. Kawata and T. Tani, "Optically driven Mie particles in an evanescent field along a channeled waveguide" Opt. Lett. **21**, 1768-1770 (1996),

12. L.N.Ng., and B.J. Luff., "Propulsion of gold nanoparticles on optical waveguides", *Opt. Com.* **208**, 117-124 (2002)
 13. K. Grujic, and O.G. Helleso, "Sorting of polystyrene microspheres using a Y-branches optical waveguide", *Opt. Express* **13** (1), 1-7 (2005) <http://www.opticsexpress.org/abstract.cfm?URI=OPEX-13-1-1>
 14. K. Grujic, and O.G Helleso., "Optical propulsion of microspheres along a channel waveguide produced by Cs⁺ ion-exchange in glass", *Opt. Comm.* **239**, 227-235 (2004)
 15. H.Y. Jaising and O.G.Helleso, "Radiation forces on a Mie particle in the evanescent field of an optical waveguide", *Opt. Comm.* **246**, 373-383 (2005)
 16. J.D. Jackson, "*Classical electrodynamics*", Wiley (1975)
 17. R.C. Gauthier , " computation of the optical trapping force using an FDTD based technique ", *Opt Express* **13** (10), 3707-3718
 18. L.N.Ng., and B.J. Luff., "Forces on a Rayleigh particle in the cover region of a planar waveguide", *Jnl Light. Techno.* **18**, 388-400 (2000)
-

1. Introduction

The experimental demonstration of optical trapping by a laser beam by A. Ashkin in 1970 [1] opened the way to numerous applications in the field of biology [2] as well as in that of nanofabrication [3]. Indeed, optical tweezers are a contactless and non destructive tool perfectly adapted to particles and biological objects manipulation. However, they do not fit very well to sorting applications particularly because they move particles one by one. That's why several strategies have been used to build optical tools designed for the parallel manipulation of several objects. Some of them are based on the shape modification of the trapping light beam as Bessel beams [4] or holographic tweezers [5]. Other techniques employ VCSEL [6] (Vertical Cavity Surface Emitting Laser) arrays that can be produced on a large scale in microelectronics facilities.

This kind of tool makes easier new approaches in the field of cellular sorting or intracellular surgery particularly because their dimensions fit well to that of the studied object [7]. For example, biological analysis microsystems can deal with small samples sizes and allow to isolate rare cells which are hard to extract with traditional techniques. Various physical concepts have been used on Labs on Chip (electrical, mechanical, magnetic) [7] but recently some demonstrators combining optics and fluidics have been proved to be specially efficient. For example, Wang *et al.* designed an optical microcytometer [8] with high throughput (up to 100cell/s) and Mac Donalds *et al.* [9] used a reconfigurable optical lattice for high efficiency sorting (96% efficiency).

In this paper we focus on another kind of microsystem for biological objects manipulation based on waveguides. The optical manipulation of particles by an evanescent field have been demonstrated in 1992 by Kawata and Tani [10] and then used for the automatic propulsion of metallic and dielectric particles on optical waveguides [11,12]. Recently, this kind of device has been used to sort particles on a Y-junction branches [13]. However, even if it has been mentioned in the first publications of Kawata [11], this techniques has never been employed to move biological cells. In this communication, we use silicon nitride waveguides to improve the particles propulsion efficiency and to manipulate, without label, red blood cells and yeast cells.

In a first section , we will compare, in a theoretical way, various waveguide performances. Then we will describe the experimental setup and the silicon nitride waveguides. In a third part, we will present the results we have reached on dielectric particles and cells. We will finish with some perspectives.

2. Theoretical comparison of waveguides technologies.

Up to day, the particle propulsion on optical waveguides has been mainly performed on potassium or cesium exchanged waveguides [11] [14]. These works have shown that refractive index contrast between the substrate and the waveguide strongly affects the optical

forces. In this theoretical section, we are going to compare ion exchange techniques with thin films depositions technologies which allows higher index contrast. We will study three different kind of structures: potassium ion exchanged waveguides ($\Delta n= 0.01$), cesium ion exchanged waveguides ($\Delta n= 0.03$) and silicon nitride waveguides ($\Delta n= 0.52$).

Several approaches are possible to compute the optical forces on particles located on a waveguide surface. From an analytical point of view, dipolar models are the simplest but they are only valid for Rayleigh particles. For micrometric spheres, the Arbitrary Beam Theory allows the evaluation of the particles velocities on an infinite slab waveguide [15]. Since it's analytical, this method does not permit to take into account the lateral confinement of light in a channel waveguide.

That's why we have choosen a numeric approach of the problem based on the finite element method and the FEMLAB (Comsol) software. This method takes into account the numeric profile of the guided mode thanks to 3D calculations. The optical forces F are calculated thanks to the Maxwell stress tensor T [16] by integration on the external surface S of the particle.

$$\vec{F} = \oint_S \vec{T} \cdot \vec{n} d\vec{S} = \iiint_V f_v dV \quad (1)$$

where n is the normal of the surface and f_v the local force density on the particle.

The sphere's velocity is evaluated with Stokes Law and a modified expression for the viscosity which is valid for a microparticle near a surface [15].

The finite element method offers the advantage of using a fine mesh in the regions of interest and a coarse one in other places. This flexibility allows important virtual memory savings compared to other numerical methods as FDTD [17]. In the same way, the calculation time corresponding to the presented structures are around 10 minutes on a personal computer of 1Go RAM.

The waveguide geometric properties used in the simulation are summarized in table 1. The vertical dimensions correspond to the optimized thickness for the optical forces when the propagation wave is TE polarized. This value has been calculated by a dipolar model as in [18]. In all the calculations, the guided power is normalized to 1W, the lighthwave is 1064nm, and we study TE polarization. The particles are dielectric spheres ($n=1.55$ at 1064 nm) of 250nm diameter located at an altitude of 2 nm from the surface of the waveguide. For the sake of computer memory, we could not study larger spheres.

Table1. Properties of the different waveguides.

	Δn	Vertical size	Lateral size
Potassium	0.01	1.9 μm	4 μm
Cesium	0.03	1 μm	3 μm
Nitride	0.52	0.2 μm	1 μm

As an example, we have represented on figure 1 the local forces acting on the sphere's surface above a silicon nitride waveguide. For more clarity, we used a coarse mesh on the particle. We observe a strong decrease in the local forces at the top of the sphere and a stretching action of the field. Moreover, the resultant vertical forces are attractive toward the waveguide and the lateral forces tend to push the sphere along the light propagation direction. This forces are characteristic of gradient forces and radiation pressure [1].

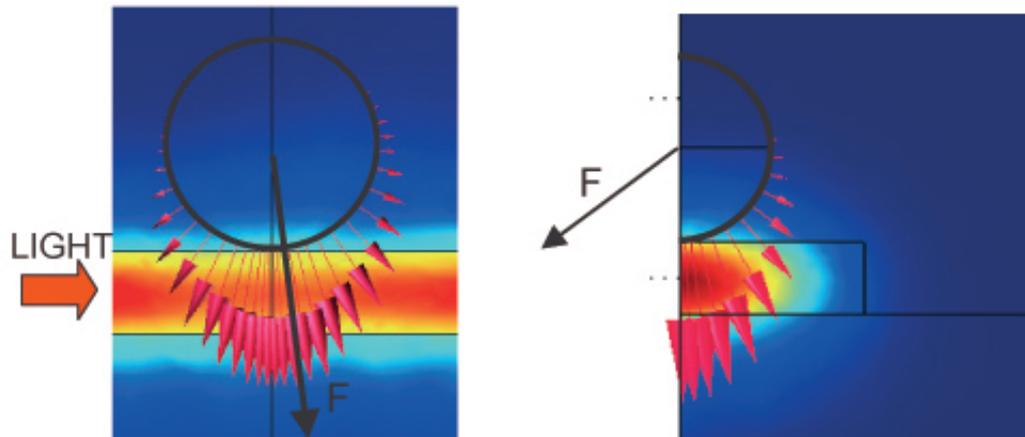


figure1 : Representation of the local forces (f_v) distribution on the surface of the particle. On left, a cross-section parallel to the waveguide. On the right, a cross section orthogonal to the waveguide.

In order to check our calculations, we confirmed their convergence as a function of the mesh size. Moreover, we compared the results with the analytical expressions based on Rayleigh theory (cf figure 2). The calculation has been made for silicon nitride waveguides and we found a good agreement of the two models.

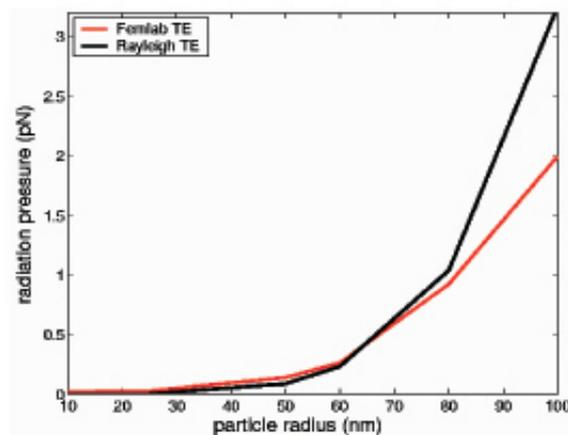


figure 2: Comparison of forward forces using numerical calculation and Rayleigh theory.

We compared the computed forces on different kinds of waveguides. Results normalized by the guided power are reported in table 2. We can notice that forces increase strongly when the refractive index gap between the guide and the substrate rises. In theory, the use of silicon nitride thin films should increase the optical forces by a factor 100 compared to potassium exchanged waveguides.

Table2: Optical forces on different kinds of waveguides.

	F propulsion	F gradient	Particle velocity
Potassium	0.15 pN/W	-0.9 pN/W	10 $\mu\text{m/s/W}$
Cesium	0.6 pN/W	-4 pN /W	41 $\mu\text{m/s/W}$
Nitride	16.5 pN/W	-153 pN/W	1100 $\mu\text{m/s/W}$

These results show that even if the evanescent wave decay is faster on high refractive index waveguides, optical forces on Mie particles remains higher on these structures. So silicon nitride waveguides should to be particularly efficient for particle propulsion.

3. Experimental procedures

Waveguides are made of a silicon substrate covered by a $2\mu\text{m}$ silica film ($n=1.45$ at 1064nm) and a silicon nitride strip ($n=1.97$ at 1064nm). The strips are deposited by LPCVD (Low Pressure Chemical Vapor Deposition) which gives them good optical properties and etched by RIE (Reactive Ion Etching). Silicon nitride film thickness is around 200nm and the strip width is varying between $1\mu\text{m}$ and $10\mu\text{m}$ which corresponds to multimode waveguides.

The experimental setup is shown in Figure 2. Linearly polarized light (TE) from a continuous Nd:YAG laser source operating at $1.064\mu\text{m}$ was coupled into the waveguide through a microscope objective (ON=0.9). Since we don't have tapered structures, insertion losses are important ($\sim 10\text{dB}$) and propagation losses are around 2dB/cm . The effective guided power was monitored using an optical power meter at the end of the waveguide after a microscope objective and a diaphragm.

We used glass particles ($n=1.55$ at 1064nm) of $2\mu\text{m}$ diameter and a standard deviation around 35% (Duke scientific), red blood cells and yeast cell of approximately $5\mu\text{m}$ diameter. A cell defined by double-sided adhesive tape spacer and a cover slip was glued on the surface sample in order to form a chamber for the particles in de-ionized water (cf figure2). Motion of the particles was observed using a zoom system (with a 20X and NA=0.55 microscope objective) and a CCD camera mounted above the waveguide.

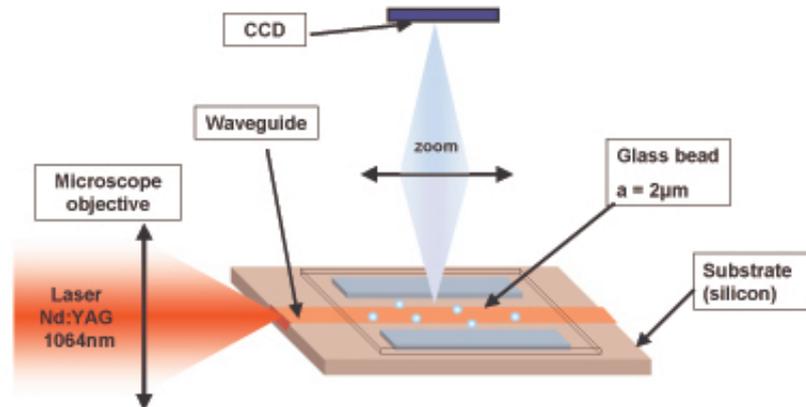


Figure 3: experimental set-up

4. Results

4.1 Dielectric particles manipulation

The use of silicon nitride waveguides allowed to demonstrate both the trapping and the propulsion of $2\mu\text{m}$ glass particles and $1\mu\text{m}$ latex particles (cf figure 4). We noticed that on this kind of structure, there is a strong interaction between the beads and the guided light. In particular, we can clearly visualize the light extracted from the waveguide. Furthermore, we observed the formation of particles chains as reported in [14].

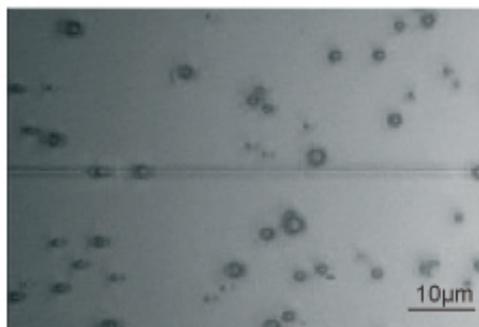


Figure 4: Movie (3.4MB) glass particles& propulsion

Even if the guided power is weak, the propulsion is very efficient. Typically, for glass particles, the mean velocities are around $15\mu\text{m/s}$ for a guided power near 20mW . This power value has been measured at the end of the waveguide and corrected by taking into account the large light diffraction at the end of the structure. This device efficiency permits, with the same speed, to reduce by approximately 20 times the guided power compared with cesium ion exchanged waveguides. The drawback comes from the high insertion losses but they could be strongly reduced by using tapers at the entrance of the guide.

4.2 Cells manipulation

The propulsion efficiency of dielectric particles on silicon nitride waveguides encouraged us to try cell manipulation. Cells have different optical and physical properties than glass particles: they are bigger ($5\mu\text{m}$ diameter) and have lower refractive index ($n \approx 1.4$). We worked with 2 kind of cells: red blood cells and yeast cells (*Saccharomyces cerevisiae*).

Red blood cells were just mixed with EDTA (EthyleneDiamineTetraAcetic) to prevent coagulation and put in a mannitol buffer. On a $10\mu\text{m}$ width waveguide, we observed the propulsion of the red blood cells with velocities around $1\mu\text{m/s}$ for nearly 60mW inside the waveguide (cf figure 5). We can notice that, as cell refractive index are low, we need more power to move them. Furthermore, it seems that light do not destroy the cells.



figure 5 movie (1MB) red blood cells manipulation

For yeast cells, the propulsion velocities are approximately $1\mu\text{m/s}$ for a guided power around 40mW (cf figure 6). Like dielectric particles, cells tend to form small chains and even smaller bacteria seems to be attracted toward the yeast cells. Laterally, the attraction of the cells located near the waveguide highlights the presence of an intense gradient force whose range is only a few micrometers.

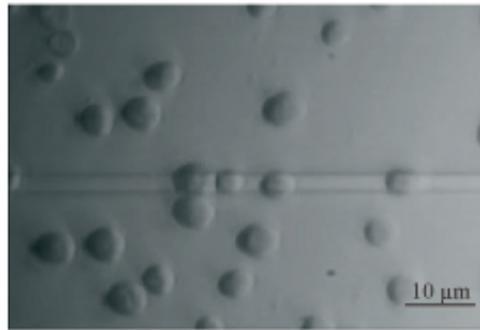


figure 6 movie (2MB) Yeast cells manipulation

5. Conclusion

In this paper, we demonstrated both theoretically and experimentally that silicon nitride waveguides can move dielectric glass particles of various sizes and biological cells. To the best of our knowledge, it's the first demonstration of biological object manipulation by an evanescent wave.

Thanks to the high confinement rate of light intensity in the silicon nitride films, the power required for dielectric particles propulsion is reduced by a factor around 20 compared to cesium ion exchanged waveguides. This optimized power efficiency allows an extension of this method to the manipulation of low index objects as cells. Yeast cells have been propelled along the waveguide with velocities around $1\mu\text{m/s}$ and attracted toward the guide by gradient forces.

This kind of device can be easily combined with various integrated optics structures and open the way to the development of new microsystems for cells sorting applications.

Bibliographie

- [1] W. Crookes. On attraction and repulsion resulting from radiation. *Philosophical transactions of the Royal society of London*, 164 :501, 1874.
- [2] P. N. Lebedev. Untersuchungen über die druckkräfte des lichtes. *Annalen der Physik*, 6 :433–458, 1901.
- [3] E. Nicols and G. F. Hull. The pressure due to radiation. *Physical Review*, 26(91) :104, 1903.
- [4] A. Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical Review Letters*, 24(4) :156–159, 1970.
- [5] A. Ashkin and J. M. Dziedzic. Optical levitation by radiation pressure. *Applied Physics Letters*, 19(8) :283–285, 1971.
- [6] A. Ashkin, S. Chu, J. E. Bjorkholm, and A. Cable. Experimental observation of optically trapped atoms. *Physical Review Letters*, 57(3) :314–317, 1986.
- [7] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu. Observation of a single beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Optics Letters*, 11(5) :288–290, 1986.
- [8] S. Stenholm. The semiclassical theory of laser cooling. *Reviews of modern physics*, 58(3) :699–735, 1986.
- [9] A. Ashkin. Optical trapping and manipulation of neutral particles using laser. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 94 :4853–4860, 1997.
- [10] M. R. Matthews, N. J. Van Druten, D. S. Durfee, D. M. Kurn, K. B. Davis, M. O. Mewes, and W. Ketterle. Observation of bose-einstein condensation in a dilute atomic vapor. *Science*, 269 :198–201, 1995.
- [11] A. Ashkin and J. M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235 :1517–1520, 1987.
- [12] A. Ashkin. Forces of a single beam gradient trap on a dielectric sphere in the ray optics regime. *Biophysical Journal*, 61 :569–582, 1992.

- [13] D. G. Grier. A revolution in optical manipulation. *Nature*, 424 :810–816, 2003.
- [14] A. Casner. *Déformations, manipulations et instabilités d'interfaces liquides induites par la pression de radiation d'une onde laser*. PhD thesis, Université Bordeaux III, juin 2002.
- [15] Y. Harada and T. Asakura. Radiation forces on a dielectric sphere in the rayleigh scattering regime. *Optics Communication*, 124 :529–541, 1996.
- [16] K. Svoboda and S.M. Block. Optical trapping of metallic rayleigh particles. *Optics Letters*, 19 :930–932, 1994.
- [17] P. C. Ke and M. Gu. Characterization of trapping force on metallic mie particles. *Applied Optics*, 38 :160–167, 1999.
- [18] L. P. Ghislain, N. A. Switz, and W. W Webb. Measurement of small forces using an optical trap. *Review of Scientific Instruments*, 65 :2762–2768, 1994.
- [19] A. Rohrbach and E. H. K. Stelzer. Trapping forces, force constants, and potential depths for dielectric spheres in the presence of spherical aberrations. *Applied Optics*, 41 :2494–2507, 2002.
- [20] R. I. Litvinov, H. Shuman, J. S. Bennett, and J. W. Weisel. Binding strength and activation state of single fibrinogen-integrin pairs on living cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 99 :7426–7431, 2002.
- [21] F. Gittes and C. F. Schmidt. Signals and noise in micromechanical measurements. *Methods in cell biology*, 55 :129–156, 1998.
- [22] F. Gittes and C. F. Schmidt. Interference model for back-focal-plane displacement detection in optical tweezers. *Optics Letters*, 23 :7–9, 1998.
- [23] A. Pralle, M. Prummer, E. L. Florin, E. H. K. Stelzer, and J. K. H. Horber. Three-dimensional high-resolution particle tracking for optical tweezers by forward scattered light. *Microscopy Research and Technique*, 44 :378–386, 1999.
- [24] L. P. Ghislain and W. W Webb. Scanning force microscope based on an optical trap. *Optics Letters*, 18(19) :1678–1680, 1993.
- [25] A. Ashkin. History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules. *IEE Journal on selected Topics in Quantum Electronics*, 6(6) :841–856, 2000.

- [26] K. Svoboda, P. P. Mitra, and S. M. Block. Fluctuation analysis of motor protein movement and single enzyme-kinetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 91 :11782–11786, 1994.
- [27] C. Bustamante, S. Smith, J. Liphardt, and D. Smith. Single-molecule studies of dna mechanics. *Current Opinion in Structural Biology*, 10 :279–285, 2000.
- [28] S. M. Block. Optical tweezers : a new tool for biophysics. *Noninvasive techniques in cell biology.*, pages 375–402, 1990.
- [29] S. M. Block and Svoboda K. Biological applications of optical forces. *Annual Review of Biophysical and Biomolecular Structure*, 23 :247–285, 1994.
- [30] N. A. Schofield, D. Allaway, and P. S. Poole. Optical traps : shedding light on biological processes. *Biotechnology Letters*, 22 :887–892, 2000.
- [31] S.M. Block, L.S.B. Goldstein, and B.J. Schnapp. Bead movement by single kinesin molecules studied with optical tweezers. *Nature*, 348 :348–352, 1990.
- [32] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, and T. Yamane. Optical trapping and manipulation of single cells using infrared beams. *Nature (London)*, 330 :769–771, 1987.
- [33] E. Townes-Anderson and RS. St Jules. Micromanipulation of retinal neurons by optical tweezers. *Molecular Vision*, 4(12), 1998.
- [34] K. Konig, L. Svaasand, Y.G. Liu, G. Sonek, P. Patrizio, Y. Tadir, M.W. Berns, and B.J. Tromberg.
- [35] K.O. Greulich and G. Pilarczyk. Laser tweezers and optical microsurgery in cellular and molecular biology. working principles and selected applications. *Cellular and Molecular Biology*, 44(5) :701–710, 1998.
- [36] M.W. Berns, Tadir Y., H. Liang, and B. Tromberg. Laser scissors and tweezers. *Methods in Cell Biology*, 55 :71–98, 1998.
- [37] K. Schutze, A. Clementsengewald, and A. Ashkin. Zona drilling and sperm insertion with combined laser microbeam and optical tweezers. *Fertility and Sterility*, 61(4) :783–786, 1994.
- [38] N. J. Forkey, M. E. Quinlan, and Y.E. Goldman. Protein structural dynamics by single molecule fluorescence polarization. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 74(1) :1–35, 2000.

- [39] J. K. H. Horber, E. L. Florin, A. Pralle, and E. H. K. Stelzer. Photonic force microscope based on optical tweezers and two-photon excitation for biological applications. *Journal of structural biology*, 119 :202–211, 1997.
- [40] C. Bustamante, Macosko J.C., and Wuite G.J.L. Grabbing the cat by the tail : manipulating molecules one by one. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, 1(2) :130–136, 2000.
- [41] A.D. Mehta, Rief M., Spudich J.A., D.A. Smith, and R.M. Simmons. Single-molecule biomechanics with optical methods. *Science.*, 283(5408) :1689–1695, 1999.
- [42] G. Woehlke and M. Schliwa. Walking on two heads : the many talents of kinesin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 1(1) :50–58, 2000.
- [43] J. Gelles and R. Landick. Rna polymerase as a molecular motor. *Cell.*, 93(1) :13–16, 1998.
- [44] J.R. Sellers. Myosins : a diverse superfamily. *Biochimica et Biophysica Acta.*, 1946 :3–22, 2000.
- [45] A.F. Huxley. Cross-bridge action : present views, projects, and unknowns. *Journal of Biomechanics*, 33(10) :1189–1195, 2000.
- [46] J.A. Spudich. The myosin swinging cross-bridge model. *Nature Reviews Molecular Cell Biology.*, 2 :387–392, 2001.
- [47] A.E. Knight, C. Veigel, C. Chambers, and J.E. Molloy. Analysis of single-molecule mechanical recordings : application to acto-myosin interactions. *Progress in Biophysics and Molecular Biology*, 77(1) :45–72, 2001.
- [48] R Omori, T Kobayashi, and A. Suzuki. Observation of a single-beam gradient-force optical trap for dielectric particles in air. *Optics Letters*, 22 :816–818, 1997.
- [49] A. Resnick. Design and construction of a space-borne optical tweezer apparatus. *Review of Scientific Instruments*, 72 :4059–4065, 2001.
- [50] A. Terray, C. Mio, T. Gong, and D. W. M. Marr. Design of a scanning laser optical trap for multiparticle manipulation. *Review of Scientific Instruments*, 71 :2196–2200, 2000.
- [51] M. Ozkan, M. Wang, C. Ozkan, R.A. Flynn, and S. Esener. Optical manipulation of objects and biological cells in microfluidic devices. *Biomedical Microdevices*, 5 :47–54, 2003.
- [52] R.A. Flynn, A.L. Birkbeck, M. Gross, M. Ozkan, B. Shao, M.M. Wang, and S.C. Esener. Parallel transport of biological cells using individually addressable vscel arrays as optical tweezers. *Sensors and Actuators B*, 87 :239–243, 2002.

- [53] E. R. Dufresne and D. G. Grier. Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics. *Review of Scientific Instruments*, 69 :1974–1977, 1998.
- [54] M. T. Dearing, S. V. Sheets, E. R. Dufresne, and D. G. Grier. Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics. *Review of Scientific Instruments*, 72 :1810–1816, 2001.
- [55] P. J. Rodrigo, R. L. Eriksen, V. R. Daria, and J. Gluckstad. Interactive light-driven and parallel manipulation of inhomogeneous particles. *Optics Express*, 10 :1550–1556, 2002.
- [56] J. Liesener, M. Reicherter, T. Haist, and H. J. Tiziani. Multi-functional optical tweezers using computer-generated holograms. *Optics Communications*, 185 :77–82, 2000.
- [57] J.E. Curtis, B.A Koss, and D.G. Grier. Dynamic holographic optical tweezers. *Optics Communications*, 207 :169–175, 2002.
- [58] W. J. Hossack, E. Theofanidou, J. Crain, K. Heggarty, and M. Birch. High-speed holographic optical tweezers using a ferroelectric liquid crystal microdisplay. *Optics Express*, 11 :2053–2059, 2003.
- [59] P. T. Korda, M. B. Taylor, , and D. G. Grier. Kinetically locked-in colloidal transport in an array of optical tweezers. *Physical Review Letters*, 89, 2002.
- [60] M. P. MacDonald, G. C. Spalding, and K. Dholakia. Microfluidic sorting in an optical lattice. *Nature*, 426 :421–424, 2003.
- [61] H. Melville, G. F. Milne, G. C. Spalding, W. Sibbett, K. Dholakia, and D. McGloin. Optical trapping of three-dimensional structures using dynamic holograms. *Optics Express*, 11 :3562–3567, 2003.
- [62] J. Leach, G. Sinclair, P. Jordan, J. Courtial, M. J. Padgett, J. Cooper, and Z. J. Laczik. 3d manipulation of particles into crystal structures using holographic optical tweezers. *Optics Express*, 12 :220–226, 2004.
- [63] D. McGloin, G. C. Spalding, H. Melville, W. Sibbett, and K. Dholakia. Three-dimensional arrays of optical bottle beams. *Optics Communications*, 225 :215–222, 2003.
- [64] V. Garces-Chavez, D. McGloin, H. Melville, W. Sibbett, and K. Dholakia. Simultaneous micromanipulation in multiple planes using self-reconstructing light beam. *Nature*, 419 :145–147, 2002.

- [65] R. Sawada, E. Higurashi, and T. Ito. Optically induced rotation of a trapped micro-object about an axis perpendicular to the laser beam axis. *Applied Physics Letters*, 72 :2951–2953, 1998.
- [66] R.C. Gauthier. Theoretical investigation of the optical trapping force and torque on cylindrical micro-objects. *Journal of the Optical Society of America*, 14 :3323–3333, 1997.
- [67] R.C. Gauthier, M. Ashman, A. Frangioudakis, H. Mende, and S.J. Ma. Radiation-pressure-based cylindrically shaped microactuator capable of smooth, continuous, reversible, and stepped rotation. *Applied Optics*, 38 :4850–4860, 1999.
- [68] M. Ashman, R.C. Gauthier, and C.P. Grover. Experimental confirmation of the optical-trapping properties of cylindrical objects. *Applied Optics*, 38 :4861–4869, 1999.
- [69] R.C. Gauthier. Optical levitation and trapping of a micro-optic inclined end-surface cylindrical spinner. *Applied Optics*, 40 :1961–1973, 2001.
- [70] R.C. Gauthier, R.N. Tait, H. Mende, and C. Pawlowicz. Optical selection, manipulation, trapping, and activation of a microgear structure for applications in micro-optical-electromechanical systems. *Applied Optics*, 40 :930–937, 2001.
- [71] P. Galadja and P. Ormos. Complex micromachines produced and driven by light. *Applied Physics Letters*, 78 :249–251, 2001.
- [72] S. Kawata and T. Sugiura. Movement of micrometer-sized particles in the evanescent field of a laser beam. *Optics Letters*, 17 :772–774, 1992.
- [73] S. Kawata and T. Tani. Optically driven mie particles in an evanescent field along a channeled waveguide. *Optics Letters*, 21 :1768–1770, 1996.
- [74] L. N. Ng, M. N. Zervas, J. S. Wilkinson, and B.J. Luff. Manipulation of colloidal gold nanoparticles in the evanescent field of a channel waveguide. *Applied Physics Letters*, 76 :1993–1995, 2000.
- [75] L. N. Ng, B.J. Luff, M. N. Zervas, and J. S. Wilkinson. Forces on a rayleigh particle in the cover region of a planar waveguide. *Journal of Lightwave Technology*, 18 :388–400, 2000.
- [76] L. N. Ng, B.J. Luff, M. N. Zervas, and J. S. Wilkinson. Propulsion of gold nanoparticles on optical waveguides. *Optics Communications*, 208 :117–124, 2002.
- [77] K. Grujic, O.G. Hellesø, J. S. Wilkinson, and J.P. Hole. Optical propulsion of microspheres along a channel waveguide produced by cesium ion-exchange in glass. *Optics Communications*, 239 :227–235, 2004.

- [78] K. Grujic, O.G. Hellesø, J.P. Hole, and J. S. Wilkinson. Sorting of polystyrene microspheres using a y-branched optical waveguide. *Optics Express*, 13 :1–7, 2005.
- [79] K. Grujic, O.G. Hellesø, and J. S. Wilkinson. Microsphere chain formation in the evanescent field of an optical waveguide. *12th European Conference on Integrated Optics*, 13 :273–276, 2005.
- [80] A. Manz and N. Graber. Miniaturized total chemical analysis systems : a novel concept for chemical sensing. *Sensors and Actuators B*, 1 :244–248, 1990.
- [81] D.J. Harrison, K. Fluri, K. Seiler, Z.H. Fan, C.S. Effenhauser, and A. Manz. Micromachining a miniaturized capillary electrophoresis-based chemical analysis system on a chip. *Science*, 261 :895–897, 1993.
- [82] D. Reyes, D. Iossifidis, P. Auroux, and A. Manz. Micro total analysis systems. part 1. introduction, theory, and technology. *Analytical Chemistry*, 74 :2623–2636, 2002.
- [83] D. Reyes, D. Iossifidis, P. Auroux, and A. Manz. Micro total analysis systems. part 2. analytical standard operations and applications. *Analytical Chemistry*, 74 :2637–2652, 2002.
- [84] A. Tudos, G. Besselink, and R. Schasfoort. Trends in miniaturized total analysis systems for point-of-care testing in clinical chemistry. *Lab on a Chip*, 1 :83–95, 2001.
- [85] E. Verpoorte. Microfluidic chips for clinical and forensic analysis. *Electrophoresis*, 23 :677–712, 2002.
- [86] A. Van den Berg and T. Lammerink. Micro total analysis systems : microfluidic aspects, integration concept and applications. *Topics in Current Chemistry*, 194 :21–49, 1998.
- [87] M. M. Wang, E. Tu, D. E. Raymond, J. M. Yang, H. Zhang, N. Hagen, B. Dees, E. M. Mercer, A. H. Forster, I. Kariv, P. J. Marchand, and W. Butler. Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching. *Nature Biotechnology*, 23(1) :83–87, 2005.
- [88] H.M. Shapiro. *Practical Flow Cytometry*. Wiley Liss, 2003.
- [89] P. Telleman, U. Darlin Larsen, and J. Philip. Cell sorting in microfluidic systems. *Proceedings of MicroTAS, Banff, Canada*, pages 39–44, 1998.
- [90] P. Blankenstein, U. Darlin Larsen, and J. Philip. Modular concept of a laboratory on a chip for chemical and biochemical analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 13 :427–438, 1998.

- [91] M. McClain, C. T. Culbertson, S. C. Jacobson, and J. M. Ramsey. Flow cytometry of escherichia coli on microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 73 :5334–5338, 2001.
- [92] A. Y. Fu, C. Spence, A. Scherer, F. H. Arnold, and S. Quake. A microfabricated fluorescence-activated cell sorter. *Nature Biotechnology*, 17 :1109–1111, 1999.
- [93] P. Li and J. Harrison. Transport, manipulation, and reaction of biological cells on-chip using electrokinetic effects. *Analytical Chemistry*, 69 :1564–1568, 1997.
- [94] S. Fiedler, T. Shirley, S. G. Schnelle, and G. Fuhr. Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem. *Analytical Chemistry*, 70 :1909–1915, 1998.
- [95] G. Markx, Y. Huang, and R. Pethig. Dielectrophoretic characterization and separation of microorganisms. *Microbiology*, 140 :585–591, 1994.
- [96] Y. Huang, M. Ewalt, R. Tirado, and A. Haigis. Electric manipulation of bioparticles and macromolecules on microfabricated electrodes. *Analytical Chemistry*, 73 :1549–1559, 2001.
- [97] A. B. Fuchs, A. Romani, D. Freida, G. Medoro, M. Abonnenc, L. Altomare, I. Chartier, D. Guergour, C. Villiers, P. N. Marche, M. Tartagni, R. Guerrieri, F. Chatelain, and N. Maresi. Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples. *Lab on a Chip*, 6 :121–126, 2006.
- [98] H. Andersson and A. Van Der Berg. Microfluidic devices for cellomics : a review. *Sensors and Actuators B*, 92 :315–325, 2003.
- [99] S. K. Sia and G. M. Whitesides. Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies. *Electrophoresis*, 24 :3563–3576, 2003.
- [100] R. H. Carlson, C. V. Gabel, S. S. Chan, R. H. Austin, J. P. Brody, and J. W. Winkelman. Self-sorting of white blood cells in a lattice. *Physical Review Letters*, 79(11) :2149–2152, 1997.
- [101] A. Tixier-Mita, Y. Mita, and H. Fujita. A simple, robust and controllable nano-structures fabrication technique using standard silicon wafers. In *Proceedings of IEEE : The 12th international conference on solid state sensors, actuators and microsystems*, pages 250–253, june 8-12 2003.
- [102] S. K. Jericho, M. H. Jericho, T. Hubbard, and M. Kujath. Micro-electro-mechanical systems microweavers for the manipulation of bacteria and small particles. *Review of Scientific Instruments*, 75(5) :1280–1282, 2004.

- [103] H. A. Pohl. *Dielectrophoresis : the behavior of neutral matter in nonuniform electric fields*. Cambridge ; New York : Cambridge University Press,, 1978.
- [104] G. Fuhr, T. Schnelle, T. Mueller, and H. Glasser. Positioning and manipulation of cells and microparticles using miniaturized electric field traps and travelling waves. *Sensors and Materials*., 7 :131–146, 1995.
- [105] A. Manz, C. Effenhauser, N. Brugggraf, D.J. Harrison, K. Seiler, and K. Fluri. Electroosmotic pumping and electrophoretic separations for miniaturized chemical analysis systems. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 4 :257–265, 1994.
- [106] M. Ramsey, S. Jacobson, and M. Knapp. Microfabricated chemical measurement systems. *Nature Medicine*, 1 :1093–1095, 1995.
- [107] J. Cheng, E. Sheldon, and A. Gerrue L.O. Carrino J. Heller M.J. O’Connell J.P. Wu, L. Uribe. Preparation and hybridization analysis of dna/rna from e. coli on microfabricated bioelectronic chips. *Nature Biotechnology*, 16 :541–546, 1998.
- [108] F. Becker, X. Wang, X. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal, and P. Gascoyne. Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proceedings of the National Academic of Sciences USA*, 92 :860–864, 1995.
- [109] X. Wang, J. Yang, Y. Huang, J. Vykoukal, F.F. Becker, and P. Gascoyne. Cell separation by dielectrophoretic field-flow-fractionation. *Analytical Chemistry*, 72 :832–839, 2000.
- [110] J. Xu, L. Wu, Z. Yang, W. Yang, M. Huang, J. Cheng, and X. Wan. Functional biochips for cell and molecular manipulation. *Proceedings of the MicroTAS 2001 Conference*, pages 313–314, 2001.
- [111] P.Y. Chiou, A.T. Ohta, and M.C. Wu. Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images. *Nature Biotechnology*, 436 :370–372, 2005.
- [112] V.I. Furdul and J.D. Harrison. Immunomagnetic t cell capture from blood for pcr analysis using microfluidic systems. *Lab on a Chip*, 4 :614–618, 2004.
- [113] H. Lee, A.M. Purdon, and R.M. Westervelt. Manipulation of biological cells using a microelectromagnet matrix. *Applied Physics Letters*, 85 :1063–1065, 2004.
- [114] L.A. Crum. Acoustic force on a liquid droplet in an acoustic stationary wave. *Journal of the Acoustical Society of America*, 50 :157–163, 1971.
- [115] J.A. Rooney. *Methods in Expérimental Physics*. P.D. Edmonds. Academic Press, Vol. 19., 1981.

- [116] E. H. Trinh, P. L. Marston, and J. L. Robey. Acoustic measurement of the surface tension of levitated drops. *Journal of Colloid and Interface Science*, 74 :2623–2636, 1988.
- [117] Z. M. Zhu and R. E. Apfel. Shape oscillations of microparticles on an optical microscope stage. *Journal of the Acoustical Society of America*, 78 :1796–1798, 1985.
- [118] M. A. Weiser and R. E. Apfel. Extension of acoustic levitation to include the study of micron-size particles in a more compressible host liquid. *Journal of the Acoustical Society of America*, 71 :1261–1268, 1982.
- [119] H.M. Hertz. Standing-wave acoustic trap for nonintrusive positioning of microparticles. *Journal of Applied Physics*, 78 :4845–4849, 1995.
- [120] M. P. MacDonalds, S. Neale, L. Paterson, A. Richies, K. Dholakia, and G. C. Spalding. Cell cytometry with a light touch : Sorting microscopic matter with an optical lattice. *Journal of biological regulators and homeostatic agents*, 18 :200–205, 2004.
- [121] S. McNab, N. Moll, and Y Vlasov. Ultra-low loss photonic integrated circuit with membrane-type photonic crystal waveguides. *Optics Express*, 11 :2927–2939, 2003.
- [122] H. Becker and L.E. Locascio. Polymer microfluidic devices. *Talanta*, 56 :267–287, 2002.
- [123] J.Y. Cheng, C.W. Wei, K.H. Hsu, and T.H. Young. Direct-write laser micromachining and universal surface modification of pmma for device development. *Sensors and Actuators, B Chemical*, 99 :186–196, 2004.
- [124] F. Bianchi, H.J. Lee, and H.H. Girault. Ionode detection and capillary electrophoresis integrated on a polymer micro-chip. *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 523 :40–48, 2002.
- [125] J.C. McDonald and G.M. Whitesides. Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices. *Accounts of Chemical Research*, 35 :491–499, 2002.
- [126] J.C. McDonald, D.C. Duffy, J.R. Anderson, D.T. Chiu, H.K. Wu, O.J.A. Schueller, and G.M. Whitesides. Fabrication of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Electrophoresis*, 21 :27–40, 2000.
- [127] S.R. Quake and A. Scherer. From micro- to nanofabrication with soft materials. *Science*, 290 :1536–1540, 2000.
- [128] M. Bender, U. Plachetka, J. Ran, A. Fuchs, B. Vratzov, H. Kurz, T. Glinsner, and F. Lindner. High resolution lithography with pdms molds. *Journal of Vacuum Science and Technology B*, 22 :3229–3232, 2004.

- [129] B.H. Jo, L.M. Van Lerberghe, K.M. Motsegood, and D.J. Beebe. Three-dimensional micro-channel fabrication in polydimethylsiloxane (pdms) elastomer. *Journal of Microelectromechanical Systems*, 9 :76–81, 2000.
- [130] M.J. Owen and P.J. Smith. Plasma treatment of polydimethylsiloxane. *Journal of Adhesion Science and Technology*, 8 :1063–1075, 1994.
- [131] J.N. Lee, C. Park, and G.M. Whitesides. Solvent compatibility of poly(dimethylsiloxane)-based microfluidic devices. *Analytical Chemistry*, 75 :6544–6554, 2003.
- [132] J.M.K. Ng, I. Gitlin, A.D. Stroock, G.M. Whitesides, and G.M. Whitesides. Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems. *Electrophoresis*, 23 :3461–3473, 2002.
- [133] C.S. Effenhauser, G.J.M. Bruin, and A. Paulus. Integrated capillary electrophoresis on flexible silicone microdevices : Analysis of dna restriction fragments and detection of single dna molecules on microchips. *Accounts of Chemical Research*, 35 :491–499, 2002.
- [134] D.C. Duffy, J.C. McDonald, O.J.A. Schueller, and G.M. Whitesides. Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane). *Analytical Chemistry*, 70 :4974–4984, 1998.
- [135] T. Deng, H.K. Wu, S.T. Brittain, and G.M. Whitesides. Prototyping of masks, masters, and stamps/molds for soft lithography using an office printer and photographic reduction. *Analytical Chemistry*, 72 :3176–3180, 2000.
- [136] C.C. Chen, D. Hirdes, and A. Folch. Gray-scale photolithography using microfluidic photomasks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 100 :1499–1504, 2003.
- [137] J.C. McDonald, M.L. Chabinyc, S.J. Metallo, J.R. Anderson, A.D. Stroock, and G.M. Whitesides. Prototyping of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) using solid-object printing. *Analytical Chemistry*, 74 :1537–1545, 2002.
- [138] A.M. Tan, K. Rodgers, J.P. Murrhly, C. O’Mathuna, and J.D. Glennon. Rapid fabrication of microfluidic devices in poly(dimethylsiloxane) by photocopying. *Lab on a Chip*, 1 :7–9, 2001.
- [139] P. Vulto, N. Glade, L. Altomare, J. Babet, L. Del Tin, G. Medoro, I. Chartier, N. Manaresi, M. Tartagni, and R. Guerrieri. Microfluidic channel fabrication in dry film resist for production and prototyping of hybrid chips. *Lab on a Chip*, 5 :158–162, 2005.

- [140] C.L. do Lago, H.D.T. da Silva, C.A. Neves, J.G.A. Brito-Neto, and J.A.F. da Silva. A dry process for production of microfluidic devices based on the lamination of laser-printed polyester films. *Analytical Chemistry*, 75 :3853–3858, 2003.
- [141] Hewlett-Packard. *Material Safety Data Sheet for the HP LaserJet Print Cartridge C8061*. Hewlett Packard Boise ID USA, 2002.
- [142] M.K. Chaudhury and G.M. Whitesides. Direct measurement of interfacial interactions between semispherical lenses and flat sheets of poly(dimethylsiloxane) and their chemical derivatives. *Langmuir*, 7 :1013–1025, 1991.
- [143] M. Morra, E. Occhiello, R. Marola, F. Garbassi, P. Humphrey, and D. Johnson. On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces. *Journal of Colloid and Interface Science*, 137 :11–24, 1990.
- [144] J Kim, MK Chaudhury, and MJ Owen. Hydrophobic recovery of polydimethylsiloxane elastomer exposed to partial electrical discharge. *Journal of Colloid and Interface Science*, 226 :231–236, 2000.
- [145] M.A. Unger, H.P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, and S.R. Quake. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288 :113–116, 2000.
- [146] M. Madou. *Fundamentals of Microfabrication*. CRC Press, New York., 1997.
- [147] S.A. Soper, S.M. Ford, S. Qi, R.L. McCarley, K. Kelly, and M.C. Murphy. Polymeric microelectromechanical systems. *Analytical Chemistry*., 72 :642–651, 2000.
- [148] K. Ikuta, K. Hirowatari, and T. Ogata. Three dimensional micro integrated fluid systems (mifs) fabricated by stereo lithography. *Proceedings of the IEEE Workshop on Micro Electro Mechanical Systems.*, pages 1–6, 1994.
- [149] J. Folkman and A. Moscona. Shape oscillations of microparticles on an optical microscope stage. *Nature*, 273 :345–349, 1978.
- [150] J.L. Dewez, V. Berger, Schneider Y.J., and P. G. Rouxhet. Influence of substrate hydrophobicity on the adsorption of collagen in the presence of pluronic f68, albumin, or calf-serum. *Journal of Colloid and Interface Science*, 191 :1–10, 1997.
- [151] J.L. Dewez, J.B. Lhoest, E. Detrait, V. Berger, C. C. Dupont-Gillain, L.M. Vincent, Y.J. Schneider, P. Bertrand, and P. G. Rouxhet. Adhesion of mammalian cells to polymer surfaces : from physical chemistry of surfaces to selective adhesion on defined surfaces. *Biomaterials*, 19 :1441–1445, 1998.

- [152] M. Zhang, T. Desai, and M. Ferrari. Proteins and cells on peg immobilized silicon surfaces. *Biomaterials*, 19 :953–960, 1998.
- [153] J.L. Dewez, A. Doren, Schneider Y.J., and P. G. Rouxhet. Competitive adsorption of proteins : key of the relationship between substratum surface properties and adhesion of epithelial cells. *Biomaterials*, 20 :547–559, 1999.
- [154] B. M. Gumbiner. Cell adhesion : the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, 84 :345–357, 1996.
- [155] R. Rosset, M. Caude, and A. Jardy. *Manuel pratique de chromatographie en phase liquide*. Masson, Paris, 1982.
- [156] J. Tranchant, P. Arpino, A. Prévôt, J. Serpinet, A. Vergnol, and P. Witier. *Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse*. Masson, Paris, 1995.
- [157] S. E. Szabo. *Comparison of the efficacy of various yeast viability stains - Technical Application Information Bulletin.*, volume TA-204. Beckman Coulter, Inc.
- [158] S. Gaugiran. *Déplacement de particules et d'objets biologiques sur des guides d'ondes*. PhD thesis, Université Joseph Fourier, 2005.
- [159] S. Gaugiran, S. Gétin, J.M. Fedeli, G. Colas, A. Fuchs, F. Chatelain, and J. Deroard. Optical manipulation of microparticles and cells on silicon nitride waveguides. *Optics Express*, 13 :6956–6963, 2005.
- [160] O. Preining. Photophoresis. *Aerosol Science*, 1966.
- [161] K. C. Neuman, E. H. Chadd, G. F. Liou, K. Bergman, and S. M. Block. Characterization of photodamage to escherichia coli in optical traps. *Biophysical Journal*, 77(5) :2856–2863, 1999.
- [162] R. Drezek, A. Dunn, and R. Richards-Kortum. Light scattering from cells : Finite-difference time-domain simulations and goniometric measurements. *Applied Optics*, 124 :3651–3661, 1999.
- [163] J. Maier, S. Walker, S. Fantini, S. Franceschini, and E. Gratton. Possible correlation between blood glucose concentration and the reduced scattering coefficient of tissues in the near infrared. *Optics Letters*, 19 :2062–2064, 1994.
- [164] A. Brunsting and P. Mullaney. Differential light scattering from spherical mammalian cells. *Biophysical Journal*, 14 :439–453, 1974.

- [165] H. Liu, B. Beauvoit, M. Kimura, and B. Chance. Dependence of tissue optical properties on solute-induced changes in refractive index and osmolarity. *Journal of Biomedical Optics*, 1 :200–211, 1996.
- [166] I. Vitkin, J. Woolsey, B. Wilson, and R. Anderson. Optical and thermal characterization of natural *sepia officinalis* melanin. *Photochemistry and Photobiology*, 59 :455–462, 1994.
- [167] G. Colas, Gaugiran, A. Fuchs, and S. S. Gétin. Procédé de concentration de particules. wo2005054819.

newpage

Piégeage et manipulation d'objets biologiques par guides d'ondes optiques.

Résumé : Le piégeage et la manipulation d'objets à la surface d'un guide d'onde est une approche intéressante, qui permet d'envisager des développements nouveaux dans le domaine des microsystèmes intégrés. Mais la mise au point de tels dispositifs, était jusqu'à maintenant limitée par la difficulté à comprendre et à maîtriser les phénomènes physiques mis en jeu dans une expérience. Ces points-clé technologiques et expérimentaux avaient empêché la démonstration de la manipulation d'objets biologiques, comme des cellules, sur ces structures. L'utilisation de guides d'ondes optiques représentatifs de technologies de fabrication différentes nous a ainsi permis de juger expérimentalement des forces et des faiblesses propres à chaque technologie et déterminer les conditions les plus favorables en vue d'un déplacement de matériel biologique. En particulier, l'utilisation de guides en nitrure de silicium a permis une amélioration significative des performances de piégeage et de manipulation de particules sur ces structures.

Ceci nous a ainsi permis de réaliser un démonstrateur de propulsion optique et a rendu possible l'application de cette technologie à des objets de masse ou de taille supérieures ainsi qu'à d'autres domaines scientifiques, comme la chimie ou la biologie. Nous avons effectué la première démonstration expérimentale à notre connaissance de la propulsion d'objets biologiques par ondes évanescentes. En particulier, nous avons réalisé des expériences de tri cellulaire de sous-populations dans un mélange. Ceci démontre la capacité à réaliser, sur une faible surface, des expériences biologiques simples grâce à de tels dispositifs et renforce l'espoir d'utiliser une telle technique dans une approche de type laboratoire-sur-puce.

Mots-clés : *microsystème, guides d'ondes, manipulation optique, piégeage, routage, tri cellulaire, manipulation de cellules.*

Trapping and manipulation of biological objects by optical waveguides.

Abstract : The trapping and the manipulation of objects on the surface of a waveguide is an interesting approach, which makes it possible to consider new developments in the field of the integrated microsystems. But the development of such devices, was until now limited by weak performances of trapping and propulsion but also by difficulties of understanding and controlling the physical phenomena in an experiment. These technological and experimental keypoints had prevented the demonstration of the manipulation of biological objects, like cells, on these structures. The use of optical waveguides created by different technologies thus allowed us to judge in experiments the forces and weaknesses of each technology and to determine the best conditions for a biological experiment. In particular, the use of silicon nitride guides allowed a significant improvement of the performances of trapping and manipulation of particles on these structures.

This has thus allowed us to develop an optical propulsion demonstrator and to apply this technology with objects of higher mass or size than previously reported and in other scientific fields, like chemistry or biology. We carried out the first experimental demonstration to our knowledge of the propulsion of biological objects by evanescent waves. In particular, we carried out experiments of cellular sorting of subpopulations in a mixture. This shows the capacity to carry out, on a small surface, simple biological experiments thanks to such devices and reinforces the hope of using such a technique in a lab-on-chip approach.

Keywords : *microsystem, waveguides, optical handling, trapping, routing, cell sorting, cell manipulation.*

Guillaume COLAS, *Laboratoire Biopuces, CEA Grenoble /DSV/DRDC,*
17 rue des Martyrs, 38054 GRENOBLE Cedex 9.