



HAL
open science

Développement d'un microsystème de visualisation et de suivi de cellules adhérentes par imagerie de contact

Marion Gabriel

► To cite this version:

Marion Gabriel. Développement d'un microsystème de visualisation et de suivi de cellules adhérentes par imagerie de contact. Biophysique [physics.bio-ph]. Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 2009. Français. NNT: . tel-00502525

HAL Id: tel-00502525

<https://theses.hal.science/tel-00502525>

Submitted on 15 Jul 2010

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.

Université Joseph Fourier-Grenoble I
Ecole doctorale Ingénierie pour la santé la cognition et l'environnement

THESE

pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université Joseph Fourier – Grenoble 1

Spécialité :

Biotechnologie, instrumentation, signal et imagerie pour la biologie, la médecine et
l'environnement

Présentée et soutenue publiquement le 3 Décembre 2009
par **Marion GABRIEL**

DEVELOPPEMENT D'UN MICROSYSTEME DE VISUALISATION ET DE SUIVI DE CELLULES ADHERENTES PAR IMAGERIE DE CONTACT

Directrice de thèse: Dr. Nathalie PICOLLET D'HAHAN
Encadrant : Dr. Vincent HAGUET

Composition du jury :

Pr. Bertrand TAVITIAN	Rapporteur
Pr. Damien GRENIER	Rapporteur
Dr. Hervé RIGNEAULT	Examinateur
M. Jacques DEROUARD	Examinateur
Dr. Nathalie PICOLLET D'HAHAN	Directrice de thèse
Dr. Vincent HAGUET	Encadrant

Thèse préparée au sein du **Laboratoire Biopuces**,
Institut des recherches en Technologies et Sciences pour le Vivant,
Département des Sciences du Vivant, Commissariat à l'Energie Atomique, Grenoble

A Pichem,

Remerciements

Le travail d'une thèse peut être comparé au concert d'un orchestre, dont, en tant que doctorante, je serais la soliste ou plus modestement le premier violon.

Voici donc le moment de la fin du concert, où tous les protagonistes sans qui ce moment n'aurait pu avoir lieu sont invités sur la scène pour être remerciés.

Tout d'abord, je rends hommage à la contribution financière des mécènes de ce projet : ici l'ensemble des contribuables français par leurs impôts.

Cette thèse n'aurait pu avoir lieu sans structure d'accueil : le CEA, et le directeur de cette structure : le haut commissaire, que je remercie pour m'avoir offert l'opportunité d'y travailler sous la forme d'un contrat de formation par la recherche. L'INSTN, institut de formation du CEA, a donc financé mon salaire et certaines formations (Merci à C. Cochin et C. Tardiff pour le travail qu'elles effectuent auprès des doctorants).

Je remercie sincèrement les critiques assermentés que sont les membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail, en particulier les rapporteurs pour le temps qu'ils ont accordés à la lecture de ce document.

A la direction des programmes, 3 chefs de laboratoire se sont succédés ?. Je remercie François Chatelain pour avoir initié le projet, Brigitte Fouqué pour l'avoir soutenu, et enfin Xavier Gidrol pour m'avoir montré une vision belle de la biologie.

A la direction de l'orchestre, le chef habilité, Nathalie Picollet D'hahan, a su me montrer un modèle du professionnalisme attendu dans le poste de chercheur. Scientifiquement, elle a eu le courage de suivre un travail éloigné de ses compétences scientifiques, et elle a su m'orienter vers les expertises nécessaires dans son réseau. Humainement, j'espère acquérir un jour ses compétences de conciliation et de communication. Je la remercie donc sincèrement de m'avoir montré un modèle efficace du métier de chercheur.

A la direction de l'orchestre, dans le difficile rôle du chef au quotidien, Vincent Haguet n'a pas compté ses heures pour le projet dans laquelle ma thèse s'inscrivait. Il a porté le projet à bras le corps tout en sachant me laisser la liberté nécessaire à l'apprentissage de la recherche.

Aux sons et lumières, sans elle cette thèse ne se serait pas passée dans les mêmes conditions matérielles, je remercie vivement Patricia Lecluyse pour avoir facilité tous les détails pratiques au quotidien : les commandes, les inscriptions,... et surtout pour sa bonne humeur.

Remerciements

Parmi les collègues de pupitres de la thèse, les différents membres du laboratoire ont tous chacun à leur manière permis un bon déroulement dans une bonne ambiance :

Le pupitre des permanents:

Merci Lamy pour les discussions sur le chemin du retour le soir

Merci à Manuel de communiquer ainsi ton enthousiasme

Merci Maxime pour tes bonnes idées et ton optimisme communicatif,

Merci à Stéphanie, Fred et Delphine pour l'aide régulière avec la culture cellulaire

Merci Amandine pour m'avoir écoutée, et soutenue dans les manip

Merci à Patricia pour la patience dont elle a fait preuve avec la gestion des différents logiciels et ordinateurs

Merci à Stéphanie pour avoir supporté l'augmentation de tes statistiques de sécurité dû à mes petits tests.

Le pupitre à durée variable des non-permanents :

Merci Violaine pour m'avoir accueillie

Merci Aurélie pour ta bonne humeur, les daims, IKEA, ...l'arrêt au bar de ton bureau m'a vraiment manqué

Merci Priscillia pour ton aide, tes idées et pour m'avoir appris à utiliser quelques logiciels

Merci Maria pour les idées et le soutien quotidien lors de ta présence au laboratoire

Merci Stéphanie pour tes idées, les manip futées, les commentaires, et ton soutien

Merci Gaëlle pour le rayon de bonne humeur sur les derniers mois au labo (j'ai commencé par soleil mais je me suis dis que c'était vraiment incompréhensible)

Merci Yann, Thomas, Cécile, Emilie, Sami, Ning, Tsong et Elodie pour les discussions et la bonne ambiance que vous avez amenées.

Au pupitre des membres d'un autre orchestre (ou laboratoire) ayant accepté de travailler sur la partition de ma thèse :

Merci François pour ton aide immense en optique, pour les discussions, les critiques, les idées, l'aide à la formation ,...

Merci Stéphane d'avoir suivi la partition du mieux que tu pouvais avec ton emploi du temps chargé.

Merci Marc de nous avoir ouvert les portes de l'IAB

Merci Nadine pour ton soutien régulier en packaging et pour les solutions concrètes apportées

Merci Venceslass pour tes doigts de fées, sans toi la caméra ne marcherait pas

Merci Régis pour l'aide sans conditions et rapide, les découpes, les dépôts rapides sont vraiment exceptionnellement utiles.

Merci à tous les membres de l'atelier mécanique pour les petites pièces usinées sur mesure et pratique au quotidien

Merci Claudine pour m'avoir donné accès au bâti de parylène, clef du succès.

Remerciements

La thèse est une pièce un peu particulière comme si une radio accompagnait la partition principale, j'ai certainement oublié des gens dans cette liste ...Le CEA et le site de Grenoble est un endroit magique pour un scientifique car un nombre INCROYABLE de chercheurs et d'instruments sont disponibles. Merci donc à tous ceux dont j'ai brièvement croisé la route pendant ces trois ans.

Merci aux membres de l'orchestre particulièrement Anne et Claire. Cette aventure fut une belle occasion de me remettre plus sérieusement à la musique. Merci de m'avoir rappelé à quel point j'aime jouer!

Merci aux membres de la section poterie particulièrement Bernard et Gérard, pour la somme des connaissances transmises, l'enthousiasme, les moments partagés. La section fût un îlot de bien-être dans ses 3 ans.

Merci à tous les membres de Globule pour l'évasion. Ces années au sein de l'association m'ont apporté bien plus que la création d'un « réseau ».

Merci à Béa et Simon d'avoir montré la voie,

Merci à Dalil pour les moments ensemble dans le bureau (et les inoubliables week ends CJC),

Merci à Isma et Nicolas d'avoir repris le flambeau,

Merci les filles (Delphine et Florence) pour votre bonne humeur et votre vision plus apaisée de la vie associative...

Enfin et ce n'est pas les moindres, même si certains diraient qu'il y a prescription je remercie mes parents de m'avoir permis de réaliser mes études dans des conditions exceptionnelles. Il n'y a pas de mots assez forts, je dirais donc simplement : MERCI.

Yannick, la comparaison filée avec l'orchestre a certes ses limites, mais je ne sais pas comment exprimer ma gratitude pour m'avoir tenu le pupitre droit dans les moments où je l'aurais bien laissé tombé au plus bas de la fosse. Après Stockholm, 3 années d'aventure à Grenoble s'achèvent, j'espère que les suivantes seront aussi heureuses, plus sereines, plus nombreuses,....Je ne sais pas ce que l'avenir nous réserve mais j'espère bien que tu seras encore là longtemps pour jouer à côté de moi.

TABLE DES MATIERES

Abréviations	1
1 Introduction	2
1.1 Microscopie optique.....	3
1.1.1 Grandes avancées	3
1.1.1.1 Le microscope optique par transmission ou « à fond clair »	3
1.1.1.2 Le microscope à contraste de phase.....	4
1.1.1.3 Microscopie et résolution	6
1.1.1.4 Le microscope à fluorescence.....	7
1.1.2 De la microscopie à la vidéomicroscopie	9
1.1.3 Défis pour l'imagerie cellulaire	11
1.2 Miniaturisation : le laboratoire sur puce	12
1.2.1 Laboratoire sur puce pour les cellules ou « cell-on-chip »	14
1.2.2 Microsystèmes de détection optique	16
Mini-microscopes.....	17
Imagerie directe.....	19
1.2.3 L'imagerie directe pour les cellules	21
1.2.3.1 L'imagerie de contact	21
Imagerie de contact pour un laboratoire sur puce de suivi multiparamétrique de cellules	21
Imagerie de contact pour le comptage de cellules	23
Compréhension de l'imagerie de contact par l'état de l'art.....	25
Bilan de l'état de l'art sur l'imagerie de contact.....	26
1.2.3.2 Le microscope optofluidique	26
1.3 Objectifs de la thèse	28
2 Techniques et matériels utilisés	29
2.1 Culture cellulaire.....	30
2.1.1 Lignées cellulaires.....	30
2.1.2 Le maintien en culture.....	31
2.1.3 Traitement de surface.....	33
2.1.4 Marquage fluorescent.....	34
2.2 Généralités sur les technologies de capteur d'image	35
2.2.1 Structure	36
2.2.2 Performances.....	39
3 Développement d'un microdispositif de visualisation de cellules adhérentes	41
3.1 Développement d'un prototype.....	42
3.1.1 Choix du capteur et de l'électronique	42
3.1.2 Préparation du capteur	45
3.1.2.1 Suppression de la protection supérieure	45
3.1.2.2 Protection des connectiques.....	46
3.1.2.3 Protection des connectiques par glop top	49

3.1.3	Biocompatibilité des matériaux en contact avec des cellules.....	51
3.1.4	Assemblage du prototype	56
3.2	Visualisation de cellules	57
3.2.1	Dépôt de cellules directement sur la surface du capteur	57
3.2.2	Cellules sur une lamelle de verre.....	58
	Dimensions de la lamelle de verre.....	59
	Traitement de surface de la lamelle de verre.....	60
3.2.2.1	Images de cellules	62
	Morphologie cellulaire	63
	Comparaison avec la microscopie classique à l'optimum.....	64
4	Appréhension du mécanisme de formation d'image.....	67
4.1	Caractérisation du système optique	68
4.1.1	Structure du capteur.....	68
4.1.1.1	Matrice de pixels	68
4.1.1.2	Microlentilles	69
	Forme des microlentilles	69
	Détermination de l'indice de réfraction des microlentilles	70
	Stabilité thermique des microlentilles	71
4.1.1.3	Dimensions des photodétecteurs	73
4.1.1.4	Empilement vertical au-dessus d'un photodétecteur.....	75
4.1.2	Nature des lamelles de verre.....	76
4.1.3	Dimension et indices de réfraction des cellules et du milieu	76
	Dimension et indices de réfraction des cellules	76
	Indices de réfraction et dimensions du milieu	77
4.1.4	Propriétés de la source lumineuse	77
4.1.5	Schéma récapitulatif	79
4.2	Etudes des images obtenues par le microsystème	79
4.2.1	Analyse des images de RPE1	80
4.2.2	Observation de réseaux de Ronchi	82
4.2.3	Résolution du microsystème.....	84
4.3	Compréhension du mécanisme de formation de l'image	84
4.3.1	Dans le cadre de l'optique géométrique	85
4.3.2	Dans le cadre de l'optique physique.....	89
	Existence du phénomène de diffraction	89
	Existence du phénomène d'interférence dans notre configuration.....	89
	Formation d'une image.....	90
5	Mise en place et démonstration de la vidéomicroscopie sur puce.....	93
5.1	Modifications du prototype pour la vidéomicroscopie.....	94
5.1.1	Protection du circuit électronique.....	94
5.1.2	Adaptation supplémentaire du capteur	95
	Ajout d'une chambre	95

Table de matières

Amélioration de la robustesse du capteur assemblé.....	97
5.1.3 Température à la surface du capteur	98
5.2 Exemples de suivi vidéomicroscopique	101
5.2.1 Suivi de la prolifération.....	101
5.2.2 Suivi de la motilité	102
5.2.3 Suivi de l'apoptose.....	103
6 Conclusion.....	105
6.1 Bilan	106
6.1.1 Résumé de la démarche.....	106
6.1.2 Comparaison avec des outils d'observation de cellules.....	108
Comparaison de notre microsystème avec l'état de l'art des dispositifs d'imagerie directe.....	108
Comparaisons de notre microsystème avec la microscopie et la vidéomicroscopie	110
6.1.3 Apports de notre prototype et applications potentielles.....	110
6.2 Limitations et perspectives.....	111
6.2.1 Amélioration de la résolution.....	111
6.2.2 Visualisation de cellules en luminescence ou fluorescence.....	112
6.3 Applications à d'autres domaines	114
Bibliographie	115

Abréviations

μTAS	Micro Total Analysis System
16hBE	Nom d'une lignée de cellules humaines épithéliales de bronches
ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	Atomic Force Microscopy
APS	Active Pixel Sensor
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adénosine TriPhosphate
BAOSMC	Bovine Aortic Smooth Muscle Cells
C2C12	Nom d'une lignée de myoblastes de souris
CCD	Charged-Coupled Device
CD4	Cluster de Différentiation 4
CMOS	Complementary Metal Oxide Semiconductor
CVD	Chemical Vapor Deposition
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-Phénylindole
DDP	Différence De Potentiel
ECACC	European Collection of Animal Cell Cultures
EDTA	Acide Ethylène Diamine Tétra Acétique
FIB	Focused Ion Beam
FITC	Fluorescein IsoThioCyanate
GFP	Green Fluorescent Protein
HeLa	Nom d'une lignée de fibroblastes humains
LED	Light-Emitting Diode
LUCAS	Lensless Ultra wide field Cell monitoring Array System
MEB	Microscope Electronique à Balayage
MOEMS	Systèmes Micro-Opto-Electro-Mécaniques
PDMS	Poly-Di-Méthyl-Siloxane
PLL PEG	PolyLysine Poly (Ethylène Glycol)
RPE1	Retinal Pigmented Epithelial
SIDA	Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis
SU8	Nom d'une photorésine
VELM	Video-Enhanced Light Microscopy
VGA	Video Graphics Array
SPR	Surface Plasmon resonance

1 Introduction

L'observation est une des clefs de voûte de la méthode scientifique. Des instruments performants et facilement accessibles sont donc cruciaux pour la recherche. Cela est particulièrement vrai pour les cellules qui sont très généralement invisibles à l'œil nu. Unité de base de notre corps, la plupart des cellules humaines mesurent entre 10 μm et 30 μm . Cette taille est environ dix fois moindre que le pouvoir séparateur de l'œil. Pour cette raison, les premières observations ne furent réalisées qu'au milieu du XVII^{ème} siècle avec l'apparition des premiers microscopes. L'histoire de la biologie cellulaire est intimement liée au développement de techniques de visualisation de plus en plus performantes. Cette introduction aborde certains épisodes marquants de cette évolution. Les grandes directions de développement et les défis actuels de l'imagerie cellulaire sont ensuite décrits. Les avantages de la miniaturisation sont présentés dans ce cadre. Enfin, après une analyse des microdispositifs existants, nous présenterons les motivations et les enjeux du présent travail de développement d'un microsystème pour imager des cellules adhérentes.

1.1 Microscopie optique

1.1.1 Grandes avancées

1.1.1.1 Le microscope optique par transmission ou « à fond clair »

Le mot « cellule » appliqué à un objet biologique apparaît pour la première fois en 1665 dans le traité scientifique « *Micrographia* » de Robert Hooke [1, 2].

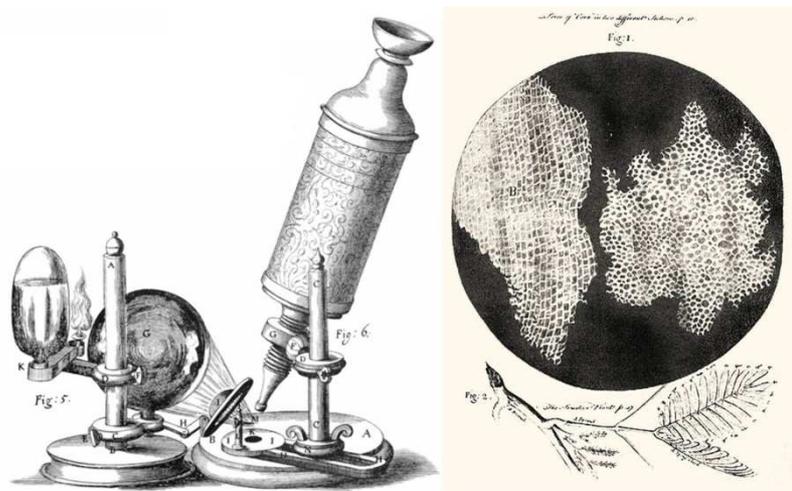


Figure 1- Dispositif d'observation (gauche), cellules de liège (droite), dessins issus de *Micrographia* [2].

Différents organismes y sont présentés et décrits. Chaque échantillon est éclairé par la lumière condensée d'une lampe à huile, et observé au travers d'un système de lentilles (Figure 1). Hooke observe, en particulier, une coupe de liège. La structure rappelle à Hooke les cellules de monastères. Il appelle donc « cellules » les petites chambres qu'il observe au sein du tissu végétal.

La notion moderne de cellule est formulée au milieu du XIX^{ème} siècle par les anatomistes allemands Schleiden et Schwann. Les observations nécessaires à l'élaboration de cette théorie ont été possibles à la faveur de progrès techniques [3, 4]. Ainsi le perfectionnement continu de la structure des microscopes a amélioré la résolution et limité les aberrations : par exemple avec l'arrivée des premiers achromats pour corriger les aberrations chromatiques (Amici, 1827), ou bien avec l'amélioration de la qualité des lentilles et de leur assemblage (Zeiss, Abbe et Schott, de 1870 à 1885), ou bien encore avec la correction de l'éclairage par l'illumination Köhler (1893). Ces perfectionnements ont abouti à la structure minimale d'un microscope photonique. Outre une partie mécanique pour supporter les différents éléments, deux assemblages de lentilles et de diaphragmes sont indispensables : l'un pour l'éclairage et l'autre pour la formation de l'image. Les principaux éléments optiques sont schématisés sur la Figure 2 :

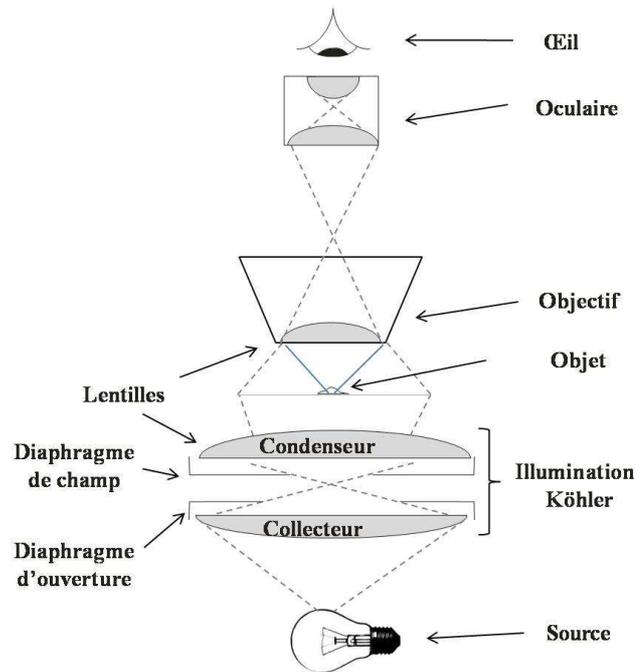


Figure 2- Schéma d'un microscope optique par transmission ou « à fond clair »

Les microscopes « par transmission » ou « à fond clair » permettent de visualiser des différences d'absorption relative. Or dans un milieu transparent, comme les cellules de mammifères sont également transparentes, ces contrastes se révèlent faibles. Pour cette raison, leur visualisation a été facilitée par le développement simultané de multiples colorants tel que le cristal violet qui se fixe particulièrement sur le noyau. Néanmoins, le marquage des cellules nécessite souvent de les fixer¹ au préalable et de perméabiliser leur membrane pour favoriser la pénétration des colorants.

1.1.1.2 Le microscope à contraste de phase

Dans les années 1950, la diffusion dans les laboratoires de biologie de microscopes utilisant le caractère ondulatoire de la lumière, a rendu possible une meilleure visualisation des cellules vivantes sans marquage (Figure 3).

¹ La fixation consiste à mettre les cellules en présence de produits chimiques, comme le paraformaldéhyde, qui permettent de figer la structure de la cellule. La membrane peut ensuite être perméabilisée sans être lysée (destruction de la membrane). La fixation ôte la vie aux cellules.

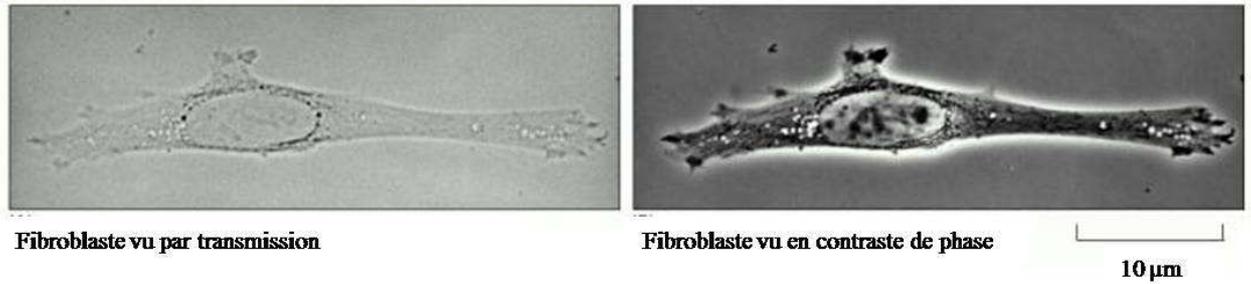


Figure 3- Images de fibroblaste en transmission et par microscopie à contraste de phase issues de [4].

Le principal de ces instruments est le microscope à contraste de phase (Figure 4). Il tire avantage du décalage dans la phase de la lumière introduit par les membranes des cellules.

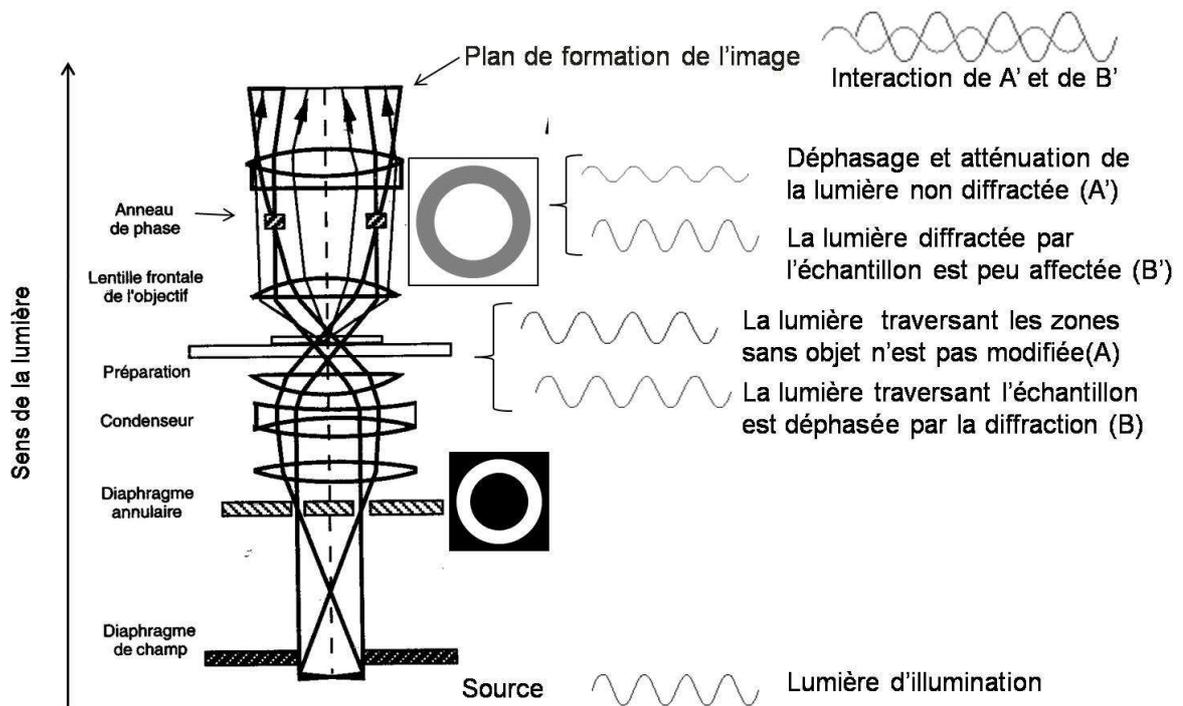


Figure 4- Schéma du microscope à contraste de phase, adapté de [5].

Un diaphragme annulaire est placé entre le diaphragme de champ et le condenseur, et son complémentaire, l'anneau de phase, dans l'objectif. Le diaphragme annulaire laisse passer un cône creux de lumière vers l'objet (préparation). Celui-ci diffracte cette lumière. Les objets de phase comme les cellules produisent une onde retardée de $\pi/2$ ($\lambda/4$) par rapport à l'onde d'éclairage. La majorité de la lumière traversant l'objet évite l'anneau de phase pour atteindre le plan de formation de l'image (traits fins avec une flèche). Par contre, la lumière d'éclairage converge au plan focal sur l'anneau de phase qui l'atténue et engendre également une avance de phase de $\pi/2$. L'onde traversant l'objet et l'onde d'éclairage sont ainsi décalées de π . Il en résulte une interférence destructive qui améliore le contraste [5]. Ce développement exceptionnel valut le prix Nobel à Frits Zernike en 1953.

1.1.1.3 Microscopie et résolution

L'amélioration de la connaissance des constituants de la cellule nécessite de meilleures résolutions. La résolution en microscopie optique est de l'ordre de la longueur d'onde soit de 400 à 800 nm. Plus précisément, la résolution se définit comme la capacité du système optique à séparer deux points très voisins. Du fait de la diffraction dans le système de lentilles, l'image d'un point est une tâche de diffraction appelée tâche d'Airy (Figure 5).

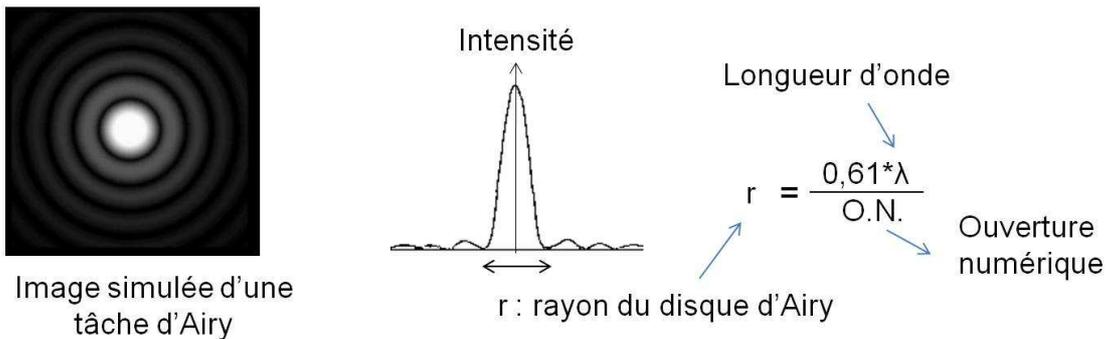


Figure 5- Tâche d'Airy [6, 7].

Différents critères existent pour qualifier la résolution. Le critère de Rayleigh postule que pour que deux points soient discriminés ils doivent être séparés d'une distance au moins égale au rayon r du disque d'Airy (Figure 6).

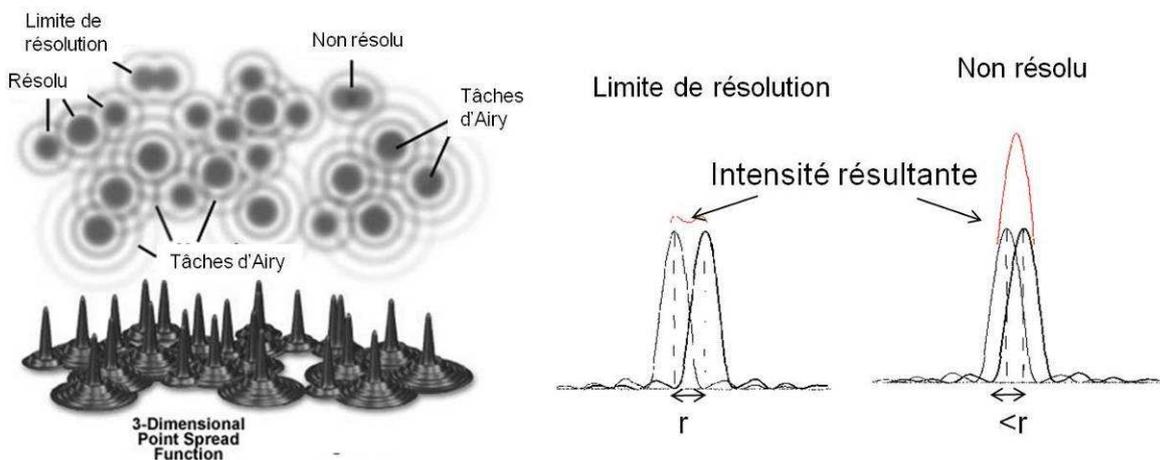


Figure 6- Critère de Rayleigh [6, 7].

Considérant la formule du paramètre « r » (Figure 5), deux voies de perfectionnement de la résolution sont possibles. Tout d'abord, il est possible d'augmenter l'ouverture numérique, qui dépend de l'ouverture angulaire de l'objectif et de l'indice de propagation de la lumière entre ce dernier et l'objet (Figure 7).

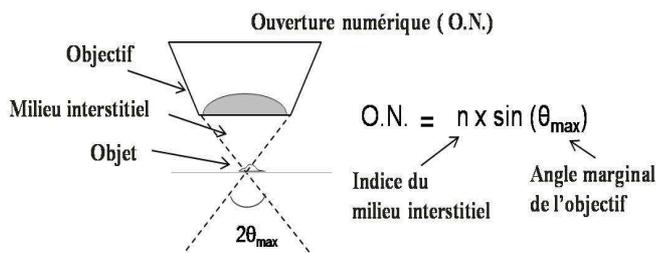


Figure 7- Ouverture numérique d'un objectif

L'augmentation de l'indice du milieu interstitiel améliore donc la résolution. Cette solution correspond aux objectifs à immersion utilisant de l'huile ($n=1,4$) comme milieu interstitiel et non l'air ($n\sim 1$). L'amélioration peut aussi porter sur une plus grande ouverture angulaire de l'objectif, qui se traduit par une profondeur de champ réduite. Ces objectifs sont en général de prix élevé.

Une autre voie de perfectionnement à partir de la formule de « d » (Figure 5) est de recourir à des longueurs d'onde plus faibles par exemple avec des électrons. Cette méthode est exploitée depuis les années 1960 pour le microscope électronique à transmission. La résolution peut atteindre 2 nm [4], ce qui donne accès à la structure interne de la cellule. En contrepartie, les échantillons doivent être soigneusement préparés pour supporter un vide très poussé, ce qui exclut la visualisation de cellules vivantes en milieu liquide.

1.1.1.4 Le microscope à fluorescence

La révolution la plus remarquable en biologie cellulaire fut l'apparition du marquage fluorescent dans les années 1960. En effet, l'intérêt du marquage colorimétrique pour les cellules vivantes est limité par :

- une spécificité insuffisante. Elle se borne généralement aux organelles (ex : le vert Janus se fixe sur les mitochondries).
- une durée du marquage restreinte (ex : le rouge neutre colorant le cytosol est connu pour rapidement se répandre dans le milieu extracellulaire).
- une toxicité fréquente (ex : le bleu de trypan colore les cellules mortes mais tue rapidement les autres cellules).

En revanche, les fluorophores le plus souvent couplés à des anticorps spécifiques peuvent « étiqueter » efficacement des protéines d'intérêt². Plusieurs fluorophores peuvent être associés pour mettre en évidence les structures dans la cellule (Figure 8).

² Cette technique de marquage est dite d'« immunofluorescence ». Les anticorps ciblent l'épitope de protéines spécifiques ou antigènes.

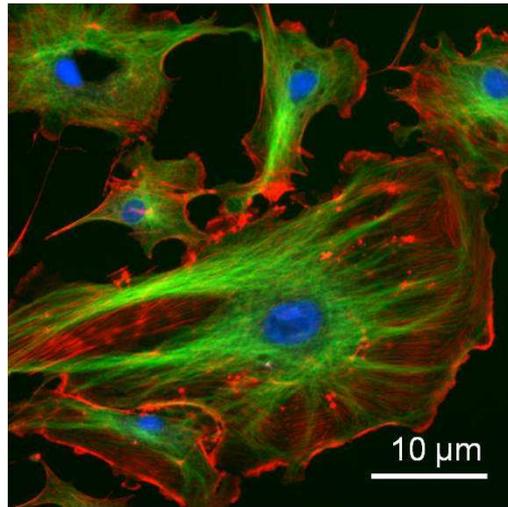


Figure 8- Cellules endothéliales d'artère pulmonale de bovin marquées par 3 fluorophores différents : le noyau au DAPI (bleu), les microtubules avec un anticorps couplé au FITC (vert), l'actine avec un anticorps couplé à la rhodamine (rouge) [8].

Pour observer les fluorophores, il a fallu développer des microscopes dédiés. En effet, les fluorophores absorbent la lumière d'une certaine longueur d'onde, et en émettent à une longueur d'onde plus importante. Le décalage entre les deux longueurs d'ondes, ou décalage de Stokes, est généralement de quelques dizaines de nanomètres. Ainsi, pour ne pas gêner la visualisation, la lumière d'excitation est séparée de la lumière d'émission. Dans le cas du microscope dit « à épifluorescence », cette séparation est réalisée par des filtres et un miroir dichroïque. L'observation se fait en « réflexion » et non en transmission (Figure 9).

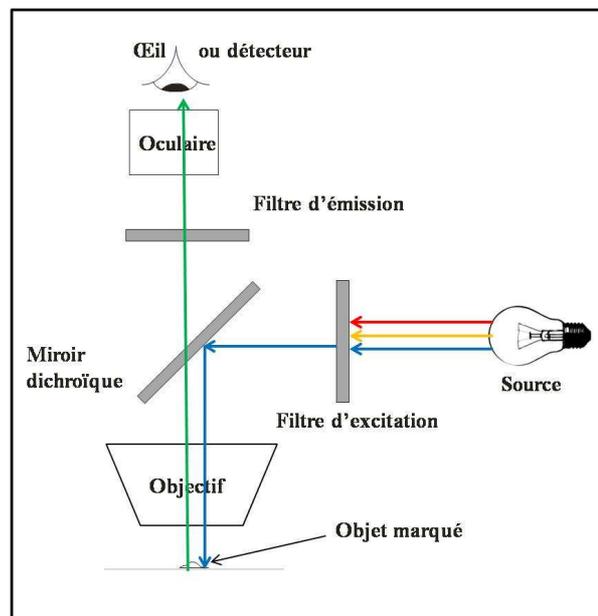


Figure 9- Schéma de principe du microscope à épifluorescence.

Dans les années 1990, l'utilisation des protéines fluorescentes a révolutionné cette technique [9, 10]. La plus connue est la GFP (Green Fluorescent Protein) qui fut découverte, dans les années 1960, par Shimomura Osamu chez une méduse. Martin Chalfie a été, par la suite, le

premier dans les années 1990 à l'utiliser comme marqueur du ver *C. elegans*³, et enfin Roger Tsien s'en est inspiré pour développer des protéines fluorescentes à des longueurs d'onde différentes de celle de la GFP. Ces recherches leur ont valu le prix Nobel de chimie en 2008. Comme toute protéine, ces fluorophores peuvent être synthétisés par des cellules. Ainsi en couplant par génie génétique la production du fluorophore à celle d'un gène étudié, l'émission de fluorescence indique la localisation spatio-temporelle de la protéine d'intérêt dans les cellules.

De nombreuses techniques de microscopies existent, mais le contraste de phase et l'épifluorescence restent celles les plus utilisées en routine. Cette description est donc non exhaustive, néanmoins elle souligne des grandes directions d'amélioration : tendre vers une meilleure résolution et vers une meilleure visualisation de structures spécifiques. Une tendance non moins importante aspire à observer des cellules en vie dans des conditions physiologiques satisfaisantes.

1.1.2 De la microscopie à la vidéomicroscopie

L'étude de la dynamique des cellules date des premières mises en culture. L'expérience fondatrice de maintien de cellules en vie, hors de l'organisme, décrit l'excroissance d'un axone issu d'un groupe de cellules de moelle épinière de grenouille (Figure 10) [11].

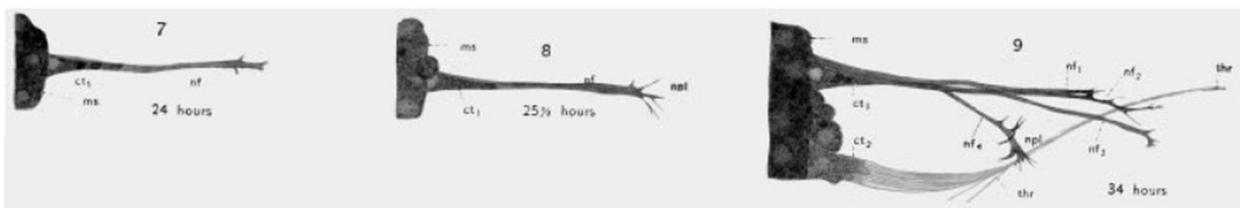


Figure 10- Développement d'un axone en culture [11].

Reproduction des figures 7 à 9 de l'article de Harrisson de 1910, texte original traduit : 7 : Apparemment une fibre (nf) pousse en dehors d'une masse de cellules (ms) 24h après l'isolation du tissu ; 8 : même fibre 25h30 ; 9 : Même fibre après 34h, 4 fibres distinctes sont maintenant visibles, les filaments de fibrine (thr) indiqués sur cette figure étaient présents aux premiers stades mais étaient omis des premiers dessins.

Les neurones sont maintenus en vie dans une goutte de lymphe. Des observations sont dessinées à intervalles de temps réguliers, mais le dessinateur a imposé ses choix. Cela est en effet souligné par la figure 9 de l'article original : des fibres additionnelles par rapport aux premiers stades sont représentées alors qu'Harrisson précise qu'elles étaient présentes aux premiers stades mais non dessinées !

³ Organisme modèle de biologie cellulaire, cet animal est relativement transparent et l'étude de sa morphologie interne permet de suivre des mécanismes tels que le développement embryonnaire et l'apoptose.

L'intérêt de suivre et d'analyser la dynamique d'évolution des cellules est donc ancien, mais a été facilité par l'amélioration des systèmes d'enregistrement. En effet, les durées caractéristiques varient de la seconde (ex : pour les flux calciques), à la minute (ex : pour les mitoses), voire à l'heure (ex : pour l'apoptose⁴)... La première avancée notable a été l'adoption du papier argentique, à partir des années 1920, qui a permis de s'affranchir de l'interprétation subjective de l'observateur lorsqu'il dessinait [1]. Ensuite, l'avènement de la microcinématographie a eu lieu avec la diffusion de caméras dans les années 1980 [12]. Enfin, l'arrivée de capteurs d'images (cf. 2.2 Généralités sur les technologies de capteur d'image) a présenté deux avantages majeurs :

- L'augmentation des possibilités d'archivage et de référencement par le stockage digital.
- L'amélioration de la manipulation des images et de leur analyse par traitement informatique (traitement d'image).

De plus, les capteurs détectent des différences de contraste invisibles à l'œil nu, qui peuvent être accrues par post-traitement. Ces techniques de résolution améliorée sont connues sous le nom de VELM (Video-Enhanced Light Microscopy)[13].

Pour observer les cellules vivantes, un système de maintien des conditions physiologiques optimales est indispensable (cf. 2.1 Culture cellulaire). Il s'agit essentiellement de :

- Maintenir la température à 37°C pour les cellules humaines.
- Réguler le pH du milieu par une teneur à 5% de CO₂ de l'air
- Limiter l'évaporation du milieu par une forte humidité.

Pour contrôler ces paramètres, des incubateurs sont installés autour de l'échantillon ou du microscope [14]. Par exemple, le vidéomicroscopie du laboratoire (Figure 11) est constitué d'un microscope inversé, d'une chambre autour de l'échantillon de régulation du CO₂ et de l'hygrométrie, le tout enfermé dans une enceinte de régulation de la température de l'air. Cette enceinte de taille importante permet de limiter les mouvements mécaniques liés à des gradients de température dans l'appareillage.

⁴ L'apoptose est l'un des processus de mort. Il s'agit de la mort cellulaire programmée ou suicide cellulaire.



Figure 11- Exemple de vidéomicroscope.

- | | |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| <i>1-Lampe pour la fluorescence</i> | <i>6-Lampe pour la visualisation en lumière blanche</i> |
| <i>2-Indicateur de l'humidité et de la teneur en CO₂</i> | <i>7- Microscope</i> |
| <i>3-Contrôleur de la platine motorisée</i> | <i>8-Caisson similaire à une étuve de culture</i> |
| <i>4- Contrôleur de l'obturateur mécanique</i> | <i>9-Table anti-vibration</i> |
| <i>5-Régulateur thermique de l'air</i> | <i>10-Ordinateur</i> |

Le vidéomicroscope est un instrument puissant, malheureusement sa diffusion est relativement faible dans les laboratoires de biologie cellulaire en raison de son coût élevé (quelques centaines de k€).

1.1.3 Défis pour l'imagerie cellulaire

Les microscopes et leur système d'enregistrement continuent d'évoluer [15]. Les améliorations s'articulent toujours autour d'une meilleure spécificité (par exemple pour visualiser seulement les protéines d'intérêt), d'un perfectionnement de la résolution, et du suivi des cellules dans les conditions les plus proches de celles de l'organisme d'origine. Or, toutes ces améliorations ont un coût élevé. C'est pourquoi les microscopes les plus performants sont de plus en plus regroupés dans des espaces spécifiques dits de « plateformes d'imagerie » et manipulés par du personnel expert. Le recours à ces instruments est donc souvent ponctuel dans un projet. En revanche, les microscopes de routine font l'objet de compromis entre différents critères tels que le prix, la résolution des différents objectifs, la qualité de la caméra d'enregistrement, la compatibilité du logiciel d'acquisition avec des logiciels d'analyse d'images,... Ces instruments de routine restent néanmoins chers (quelques dizaines de k€). Leur disponibilité est donc une contrainte forte d'organisation dans les laboratoires.

La biologie cellulaire s'est aussi développée autour de nombreux outils d'analyse spécifiques, qui très souvent nécessitent un couplage à l'optique. Par exemple, le patch clamp mesure des courants ioniques entre l'intérieur et l'extérieur de la cellule au niveau des canaux ioniques.

L'épifluorescence est souvent utilisée pour sélectionner visuellement la cellule d'intérêt (cellule transfectée fluorescente, exprimant les canaux ioniques étudiés), puis placer très précisément la pipette à la surface de sa membrane. Or cet assemblage nécessite généralement des aménagements, qui ne peuvent pas être temporaires, le temps d'une expérience. Le microscope est dans ce cas durablement mobilisé et devient un équipement dédié à une manipulation. Les expériences de couplage monopolisent donc de la place et nécessitent un investissement supplémentaire important de microscopie.

La miniaturisation des instruments peut répondre à ces problématiques d'intégration. Les développements de la microélectronique ont démontré depuis quarante ans que la réduction des dimensions, non seulement diminue les coûts, mais aussi facilite l'intégration de différentes fonctions sur le même support. Depuis une vingtaine d'années, les « laboratoires sur puce » visent à obtenir les mêmes avantages pour la chimie et la biologie [16].

1.2 Miniaturisation : le laboratoire sur puce

Le terme « laboratoire sur puce » (« Lab-on-chip ») est couramment employé pour décrire l'intégration et la miniaturisation, dans un système de quelques centimètres carrés, d'une ou de plusieurs opérations classiquement réalisées dans les laboratoires de chimie ou de biologie. L'expression « microsystème d'analyse totale » (ou Micro Total Analysis System (μ TAS) ⁵ est également utilisée pour ce type de dispositifs [17].

Les grands avantages d'un laboratoire sur puce sont [16, 18] :

- La diminution des volumes utilisés. Cela limite l'utilisation de réactifs peu disponibles ou coûteux (par exemple des molécules candidates médicaments) ou réduit les risques induits par leur manipulation pour un expérimentateur (*e.g.* dans le cas de toxines).
- La réalisation facilitée de multiples expériences en parallèle.
- L'accès facilité à des résultats par une instrumentation portable et automatisée par exemple au lit du patient (« point of care testing »).

Les applications visées par ces puces sont très diversifiées [16, 18, 19]: analyse chimique, synthèse de cristaux de protéines, séquençage de génome, recherche de nouveaux médicaments ou de techniques de délivrance de ces derniers, ingénierie tissulaire ou bien encore outils de diagnostic. Or, la plupart de ces applications nécessitent des manipulations de liquides comme leur déplacement ou leur mélange sur de petites échelles. L'étude et le

⁵ Depuis 15 ans, il s'agit du titre d'un congrès international dédié à ces problématiques au cours duquel les travaux exposés dans cette thèse ont été présentés à deux reprises.

contrôle des fluides sur des dimensions caractéristiques de l'ordre du micron, ou « microfluidique », sont donc des composantes essentielles de tout laboratoire sur puce [16]. La fabrication des éléments indispensables (pompes, valves,...) a tout d'abord exploité le silicium et les procédés de fabrication de la microélectronique, puis des technologies et matériaux dédiés ont été développés. Les principales introductions furent surtout celle des plastiques (comme le SU8, une résine photoactivable biocompatible) et celle de la chimie de surface (comme le greffage localisé de molécules par photolithographie [20] ou par électrochimie [21]).

A l'heure actuelle, le matériau phare des microsystèmes pour la chimie et la biologie est le Poly(DiMéthylSiloxane) ou PDMS. Il s'agit d'un polymère qui permet un prototypage rapide des puces [22]. Les raisons de ce succès sont nombreuses [23, 24] :

- Son procédé de mise en place par moulage est très facile à exécuter : mélange d'un monomère et de son agent de polymérisation, réticulation à température ambiante ou à de faibles températures jusqu'à 100°C.
- Des détails de l'ordre du micron peuvent être reproduits avec une grande fidélité.
- Il est élastique⁶, ce qui est particulièrement intéressant pour réaliser des pompes.
- Ses propriétés de surface hydrophobes sont facilement modifiables (par exemple avec un traitement plasma oxygène pour la rendre hydrophile). Il peut ainsi être scellé à lui-même ou à de nombreux autres matériaux tels que le verre ou le silicium pour former des assemblages composites.
- Optiquement transparent, contrairement au silicium, il est adapté à la détection d'absorbance ou de fluorescence.
- Enfin, il est considéré comme biocompatible pour des applications en biologie cellulaire. Sa non-toxicité et sa porosité aux gaz comme le CO₂, permettent de maintenir les conditions physiologiques nécessaires à la culture de cellules. Néanmoins, il a récemment été montré qu'en absorbant certaines molécules de petites tailles (comme les œstrogènes), sa présence pourrait biaiser certains comportements cellulaires par relargage de ces molécules [25].

L'histoire des puces pour la biologie a suivi celle des tendances de la recherche : les puces à ADN à l'heure de la génomique, puis les puces à protéines à l'heure de la protéomique, enfin les puces à cellules [18]. Les applications pour les cellules sont donc plus récentes et datent du milieu 2000 [26].

⁶ Dans le sens déformable facilement et de façon réversible

1.2.1 Laboratoire sur puce pour les cellules ou « cell-on-chip »

Une puce à cellules est un dispositif de faibles dimensions qui permet de manipuler et/ou d'analyser un nombre généralement important de cellules. Les puces à cellules développées aujourd'hui sont très diverses, tant par leurs applications que par leurs procédés de fabrication ou par les techniques d'analyse qu'elles utilisent. Les opérations développées sont souvent celles classiquement réalisées dans les laboratoires et pourraient être toutes regroupées dans un laboratoire sur puce idéal (Figure 12) [27] : prélever un échantillon, trier et disposer les cellules d'intérêt, les cultiver et les étudier.

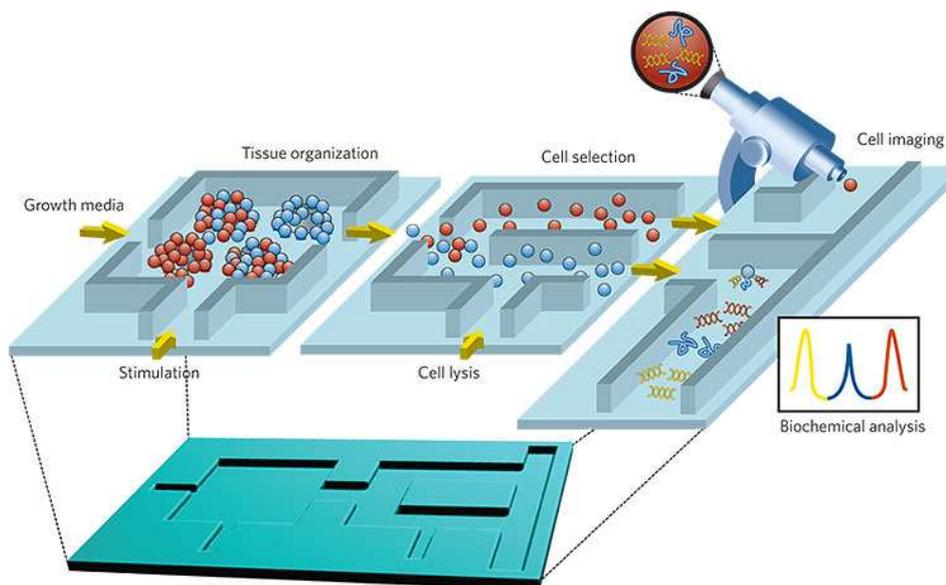


Figure 12- Laboratoire sur puce idéal pour les cellules d'après[27].
Les flèches jaunes indiquent des connections possibles entre les différents modules.

La miniaturisation apporte souvent une plus-value à ces opérations. Chacun de ces modules fait l'objet de nombreuses études. Il est donc très difficile d'être exhaustif, c'est pourquoi seulement quelques exemples seront cités :

❖ Le prélèvement

Le but d'une unité de prélèvement est d'obtenir automatiquement un échantillon avec le minimum d'interaction humaine. Un exemple intéressant est l'obtention d'un petit échantillon de sang par un réseau de micro-aiguilles transdermique pour un futur outil de diagnostic au lit du patient [28, 29].

❖ Le tri ou le positionnement des cellules d'intérêt

L'objectif de ces modules est de maîtriser exactement le type, le nombre et l'emplacement des cellules à étudier. Les méthodes peuvent être magnétique [30], optique [31, 32], fluïdique [33] ou électrique comme par exemple la diélectrophorèse⁷ [34, 35].

⁷ Le phénomène de diélectrophorèse consiste à créer un mouvement sur une particule polarisable à l'aide d'un champ électrique non uniforme

Dans le cas du tri, le but est de séparer et de compter efficacement des cellules. De nombreuses études ont tout d'abord démontré la possibilité du tri sur puce avec des microparticules [36, 37]. Les dispositifs de tri de cellules de mammifères [31, 32, 35, 36] ou de bactéries [30] sont plus récents.

Le positionnement de cellules peut être « actif » en tirant profit d'un champ magnétique, ou électrique ou bien encore d'une force fluidique [33, 34, 38] ou « passif » en favorisant leur adhésion sur des zones spécifiques (technique des « micropatterns » [39-42]).

❖ La culture cellulaire

Un premier objectif est de permettre la culture des cellules pour leur analyse ultérieure sur puce [26, 43]. Les dispositifs réalisés maintiennent souvent les conditions physiologiques dans des chambres où différents liquides sont perfusés [44-46]. Leur avantage est de pouvoir amener très localement des nutriments, des facteurs de croissance, des drogues,...et de pouvoir ainsi étudier leurs effets et ceux de leur gradient local associé. En revanche, ce flux à la surface des cellules présente deux inconvénients : les produits sécrétés par les cellules et nécessaires à leur physiologie sont emportés [44, 47], et la vitesse du liquide induit des forces de cisaillement à la surface des cellules qui modifient leur métabolisme [45].

Un deuxième objectif de la culture sur puce est la formation de culture en 3D plus proche de l'environnement *in vivo* qu'une simple surface de culture 2D. En effet, la maîtrise de la structuration de matériaux sur de faibles dimensions facilite la mise en place d'environnement en 3D pour les cellules [43, 48, 49]. De plus, cela permet un agencement de différents compartiments pour accueillir différents types de cellules [50, 51] et ainsi se rapprocher de conditions physiologiques où elles « cohabitent » dans l'espace restreint d'un organe.

❖ L'étude des cellules

Deux grands types d'études peuvent être distingués selon que l'intégrité de la cellule est préservée ou non :

- D'une part, celles après une lyse cellulaire, qui donnent accès au contenu intracellulaire. L'analyse est alors réalisée par un des nombreux laboratoires sur puce pour l'analyse de l'ADN ou de protéines [52]. Par exemple les molécules d'intérêt peuvent être séparées par électrophorèse sur puce [53, 54].

- D'autre part, celles où la viabilité de la cellule est maintenue. La miniaturisation des capteurs permet de réaliser différents types de mesures (électriques, mécaniques,...) au plus près d'une ou plusieurs cellules [27, 55]. Il peut s'agir de méthodes classiques, où la miniaturisation amène une automatisation et une multiplication des mesures, comme par exemple pour le patch clamp sur puce [56]. Alternativement il peut s'agir de la mise en place de nouveaux outils de mesures comme par exemple les mesures d'impédance sur une ou plusieurs cellules [57, 58]. Différentes équipes, relient ainsi la présence de cellules sur des électrodes à la mesure d'impédance pour suivre leur motilité ou la prolifération de la culture [59-62].

Chacun de ces modules présente des défis singuliers en terme de microfabrication, mais les contraintes suivantes sont communes à toutes les puces à cellules [26, 63]:

- La biocompatibilité des matériaux en contact avec les cellules.
- Le maintien de la stérilité et des conditions physiologiques.
- L'isolation des circuits électroniques du milieu liquide pour éviter les courants de fuite ou les courts-circuits.

Bien que de nombreuses briques de base aient été mises au point, peu d'assemblages complets ont été réalisés [64-66]. L'intégration de la préparation de l'échantillon jusqu'à son analyse dans un seul micro dispositif pose de nombreux défis [26] : celui de concentrer efficacement l'échantillon, de réaliser des jonctions efficaces entre les modules, d'assurer la fiabilité et la durabilité de chaque module simultanément...

Les puces réalisées atteignent des tailles relativement faibles (de l'ordre de quelques cm^2), mais paradoxalement pour la manipulation et la visualisation précises des échantillons, elles sont généralement placées sous des microscopes très volumineux. L'avantage de la portabilité et celui de l'intégration sont ainsi perdus. La miniaturisation de la fonction d'imagerie sur puce est donc un verrou technologique important pour conserver ces bénéfices.

1.2.2 Microsystèmes de détection optique

La miniaturisation de fonctions optiques est un vaste domaine de recherche. Par exemple, il peut s'agir de fabriquer des réseaux de petits miroirs ou de microlentilles. Ces dispositifs sont regroupés sous le nom de Systèmes Micro-Opto-Electro-Mécaniques (ou MOEMS) [67].

Dans le cadre d'applications biologiques, de nombreuses études existent pour détecter l'absorbance, la fluorescence ou la luminescence émises par des solutions dans le but d'analyser leur contenu. Il s'agit la plupart du temps d'un détecteur formé d'une ou d'un petit nombre de photodiode [68-73].

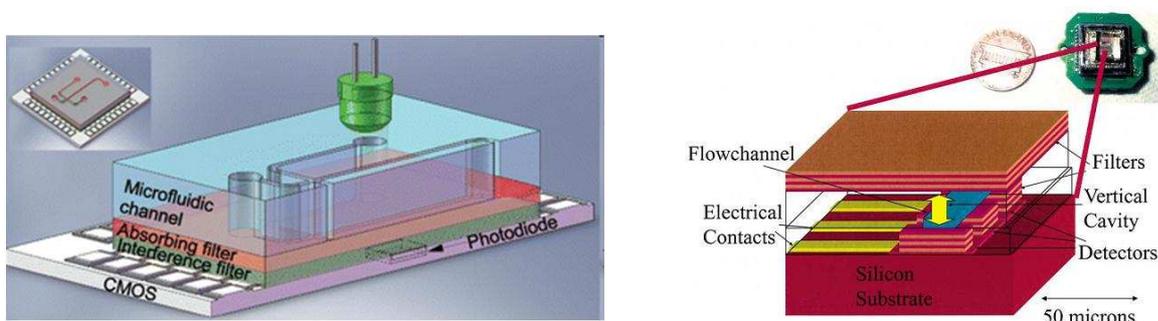


Figure 13- Dispositifs de détection de fluorescence dans une solution, à gauche à l'aide de filtre interférentiel et absorbant pour filtrer l'émission d'après[68] à droite à l'aide de filtre interférentiel pour filtrer l'excitation et l'émission [73]

Par exemple dans le cas de la détection de fluorescence, les solutions circulent dans des canaux au-dessus d'un photodétecteur recouvert d'empilements de fines couches de matériaux différents qui forment un filtre interférentiel approprié (Figure 13). Les résultats ne sont donc pas des images mais des quantités de lumières détectées à relier à la concentration de l'espèce recherchée.

Pour intégrer dans un microsystème la formation d'une image, il est nécessaire d'utiliser un capteur d'image formé de petits photodétecteurs disposés en matrice sur une surface de quelques mm². Cela a été possible grâce à l'arrivée de rétines solides à bas coût (Figure 14).

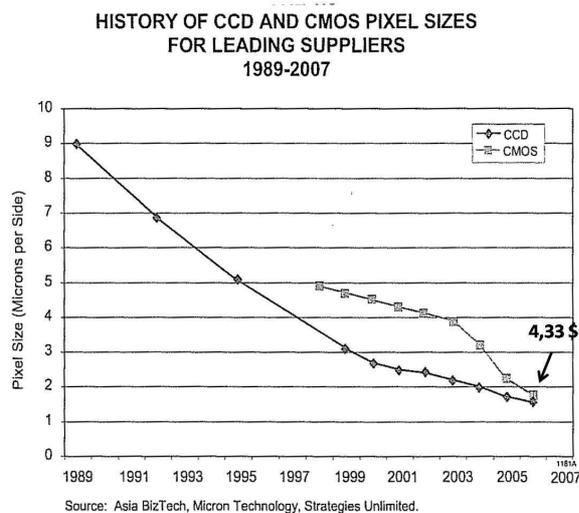


Figure 14- Evolution de la taille des pixels et prix d'un capteur en 2006 d'après[74].

Deux types de miniaturisation avec des capteurs se distinguent :

- Une miniaturisation qualifiable de « mini-microscope » : tous les composants d'un microscope classique y sont présents mais dans des dimensions réduites.
- Une miniaturisation qualifiable d'imagerie directe : l'objet est placé directement à proximité du capteur et les éléments classiques de la microscopie ont été supprimés.

Mini-microscopes

Un exemple de ces mini-microscopes a été développé par une équipe de l'université de Californie à Berkeley [75]. L'objectif est de prendre des images pour un coût très réduit pour diagnostiquer des pathologies comme la tuberculose, l'anémie falciforme ou le paludisme en zone de déserts sanitaires. Pour cela, le système s'adapte sur un téléphone portable équipé d'un capteur d'image. Il s'agit de pièces de microscopes classiques (objectif, oculaire, montures,...) choisies pour leur coût modéré (Figure 15). Les dimensions de l'assemblage sont fixes, car il ne contient qu'un seul objectif. Enfin, le dispositif est également conçu pour observer en fluorescence, grâce à un jeu de filtres placés sur le chemin optique.

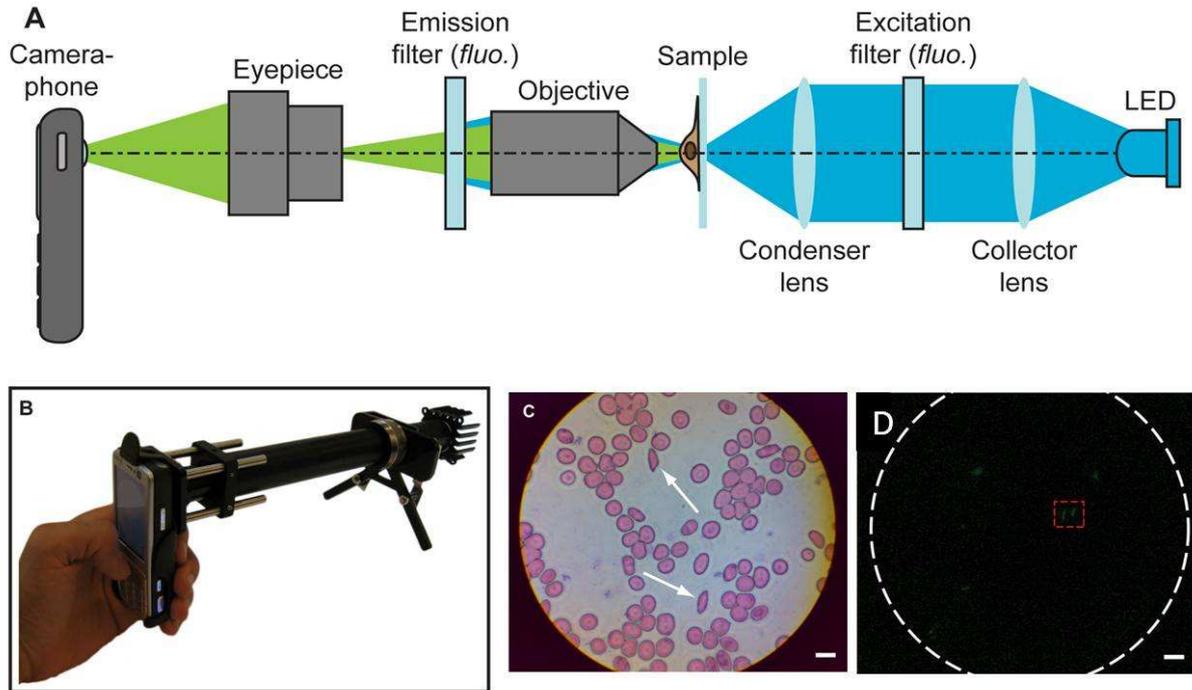


Figure 15- Microscope miniaturisé pour le diagnostic, d'après[75].

A) Schéma de principe. B) Photo du dispositif réalisé. C) Image en transmission d'un frottis sanguin d'un patient anémié falciforme (globules rouges malades indiqués par des flèches). D) Image en fluorescence de sputum d'un patient tuberculeux marqué à l'Auramine-O (Bacilles marqués en vert, un exemple est entouré en rouge). Les barres d'échelle pour C et D sont de 10 μm .

Les auteurs suggèrent que dans les pays en développement, leur mini-microscope pourrait pallier à moindre coût l'absence d'équipements ou de personnels médicaux, car ces diagnostics peuvent être réalisés uniquement à partir d'images transmises par la téléphonie, qui a, dans ces pays, une meilleure couverture que l'organisation sanitaire.

Pour le même type d'application, une équipe de l'université de Rice a développé un microscope où tous les composants ont été fortement miniaturisés (Figure 16) [76].

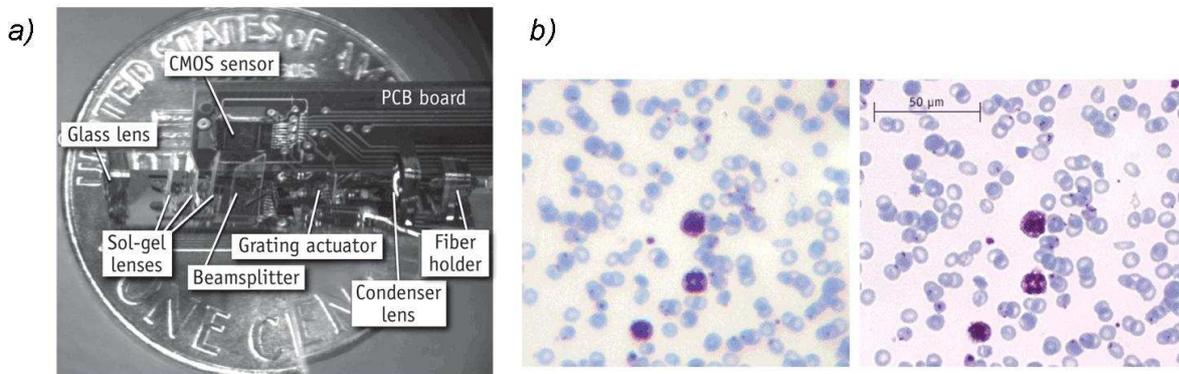


Figure 16- a) Mini-microscope. b) Frottis de sang de malade de la malaria marquée par la méthode Giemsa avec le mini-microscope (gauche) et avec un objectif Zeiss 40x, $O.N=0.95$, d'après [76]

Ce dispositif, plus petit qu'une pièce de 1 cent américaine, donne des images d'une qualité suffisante pour réaliser efficacement le diagnostic du paludisme.

Cette tendance de miniaturisation est également utilisée dans des produits commerciaux. Par exemple la société Given Imaging commercialise une mini-caméra appelée « PillCam », destinée à être avalée pour réaliser une endoscopie complète (Figure 17) [77, 78].



Figure 17- a) Schéma du brevet [77] : 21 Fenêtre optique, 22 Système optique (lentilles par exemple), 23 LED, 24 Capteur CMOS, 25 source d'énergie, 26 transmetteur, 27 antenne,
 b) PillCam sur une main,
 c) Schéma d'utilisation et fenêtre avec l' image d'endoscopie obtenue , d'après [77, 78]

Ces mini-microscopes demandent une mécanique de précision pour assurer un alignement correct des différents éléments de l'instrument. Il s'agit souvent de produits commerciaux ou destinés à réaliser des diagnostics au lit du patient ou dans des zones de désert sanitaire.

Imagerie directe

Les systèmes d'imagerie directe ou de contact, imagent par projection sur une surface sensible. Les éléments classiques tels que les lentilles, les diaphragmes... sont supprimés.

Le principe d'imagerie est compréhensible en observant un photogramme (Figure 18). Il s'agit de l'image obtenue en éclairant par une source ponctuelle des objets opaques, translucides ou transparents posés directement sur une surface sensible développée ultérieurement.



Figure 18- Photogramme d'objets posés sur du papier argentique, d'après [79]

Le fond de l'image exposé à la lumière apparaît noir. En revanche, les objets posés sur le papier argentique apparaissent blanc car ils ont arrêté le faisceau lumineux. L'imagerie de contact est donc la visualisation de l'ombre d'un objet placé très près d'un détecteur.

Dans le cas d'un capteur solide, chaque pixel intègre la quantité de lumière reçue. L'image est donc découpée en petits carrés dont la valeur dépend de l'éclairage. Le photogramme d'un objet par un capteur est alors échantillonné de même (Figure 19). La résolution de l'image obtenue dépend ainsi de la précision de l'échantillonnage, c'est-à-dire de la taille des pixels du capteur.

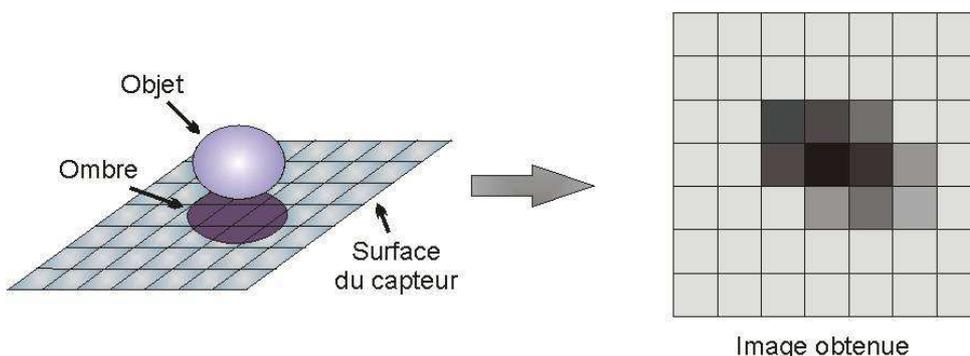


Figure 19- Schéma de principe de l'imagerie de contact à l'aide d'un capteur d'image.

Dans le cadre de la biologie, peu de dispositifs fonctionnent sur ce principe : quelques puces à ADN et quelques dispositifs pour détecter et imager des cellules. Ces derniers sont discutés dans la prochaine partie. Les puces à ADN fabriquées sur ce principe sont destinées à être lues directement sur un capteur d'images. Par exemple les spots sont déposés sur la surface sensible et l'hybridation est détectée par luminescence (Figure 20)[80]. Celle-ci est produite par une réaction catalysée par une enzyme liée au brin d'ADN à détecter. L'hybridation est ainsi détectée par un spot lumineux sur la puce.

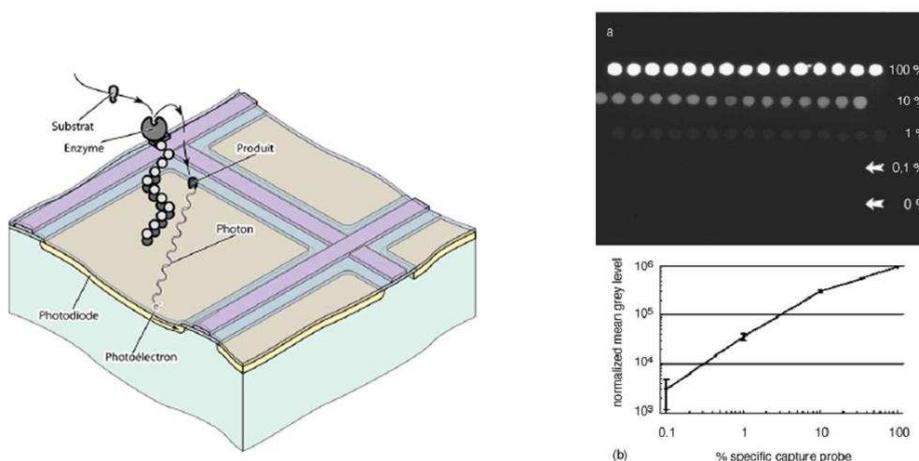


Fig. 5. Relationship between enzyme surface density and signal intensity.

Figure 20- Puce à ADN lue par contact direct sur un capteur d'image par luminescence, à gauche schéma de principe, à droite spots obtenues selon la concentration, d'après[80].

La miniaturisation de la fonction d'imagerie est destinée à faciliter la lecture d'une puce à ADN. Il s'agit de visualiser des spots lumineux et non des morphologies caractéristiques comme dans le cas de la visualisation de cellules.

1.2.3 L'imagerie directe pour les cellules

1.2.3.1 L'imagerie de contact

Seulement deux équipes, à notre connaissance, ont développé des systèmes d'imagerie de contact pour visualiser des cellules : celles du Dr Abshire à l'université du Maryland [81, 82] et la collaboration entre le Dr. Ozcan de l'université de Californie à Los Angeles et le Dr. Demirci du laboratoire commun entre le MIT et Harvard Medical school [83-87].

Imagerie de contact pour un laboratoire sur puce de suivi multiparamétrique de cellules

La première équipe, celle du Dr. Abshire de l'université du Maryland, développe différents capteurs CMOS⁸ destinés à être couplés sur un laboratoire sur puce complet. Chaque module est mis en place séparément : la mesure de l'activité électrique de neurones ou de cellules musculaires [88] ou de la capacitance de cultures de cellules [89, 90], et enfin la visualisation par imagerie de contact [81, 82]. Le couplage serait réalisé à terme dans des chambres en SU8 où la fermeture du capot serait activée électriquement (Figure 21) [88].

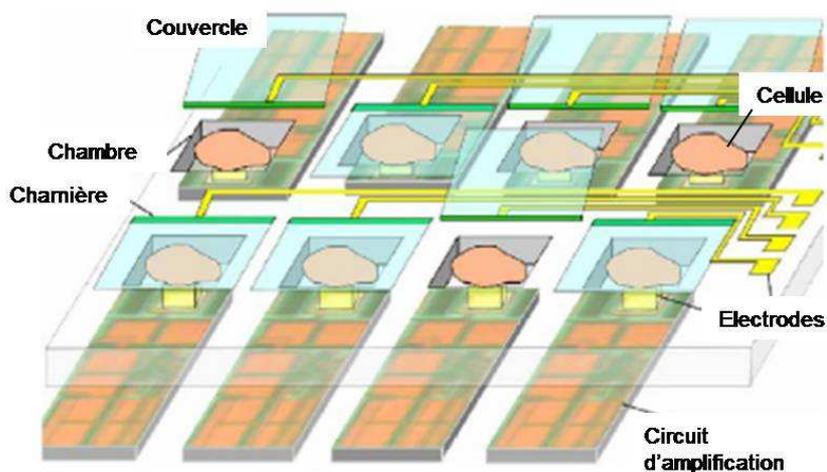


Figure 21- Schéma du laboratoire sur puce pour suivi individuel de cellules, d'après [88].

Il s'agit d'un outil intéressant pour la recherche académique. Par contre, le choix d'enfermer chaque cellule dans une chambre est surprenant. En effet, les cellules en culture communiquent entre elles à l'aide de signaux chimiques, électriques, mécaniques qui assurent le bon fonctionnement physiologique (« sociologie cellulaire »). La tendance est

⁸ Complementary Metal Oxide Semi-conductor, il s'agit d'une technologie pour former des transistors sur un substrat en silicium.

effectivement d'analyser à l'échelle de la cellule unique [39, 40] mais au sein d'une petite population de cellules.

Le capteur CMOS pour l'imagerie de contact est dessiné et fondu par le laboratoire. Les auteurs ont optimisé l'architecture d'un pixel pour cette application. Les pixels mesurent $8,4 \mu\text{m}$ par $8,4 \mu\text{m}$. Une chambre est formée d'un tube plastique collé à l'aide d'une résine photoactivable, la Loctite 3108 (Figure 22, a), qui permet également d'isoler les connectiques (Figure 22, b).

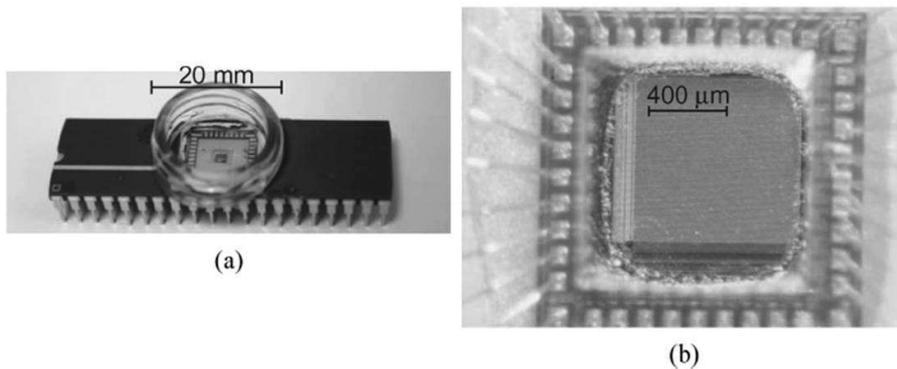


Figure 22- Dispositif d'imagerie de contact à l'aide d'un capteur CMOS conçu par les auteurs, d'après [81].

Cependant, cette colle se dissout dans l'eau. Cette solution ne peut donc être que temporaire et pose un problème de biocompatibilité non discuté dans l'article.

Les cellules marquées avec un colorant sont imagées sous la forme de points ou de taches noires (Figure 23).

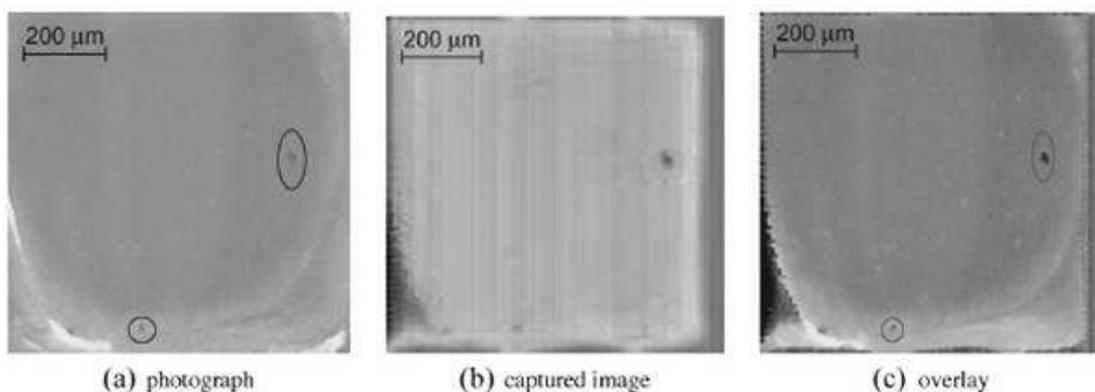


Figure 23- Cellules de muscle de bovin (BAOSMC) colorées avec du rouge neutre, d'après[81].

L'observation par le capteur (Figure 23 b) est comparée à une photographie prise par-dessus le système (Figure 23 a) et la superposition des deux résultats est correcte (Figure 23 c). La zone en bas à gauche avec « des reflets » correspond probablement à l'ombre de la résine.

Imagerie de contact pour le comptage de cellules

La deuxième équipe a pour sa part décrit un microsystème de comptage d'objets biologiques [83, 85-87]. Leur objectif est la mise en place d'un dispositif portable de diagnostic bas coût pour compter les CD4-T⁹ des malades du SIDA¹⁰, car la détection et la surveillance de cette maladie s'effectuent en dénombrant ces cellules du système immunitaire [85, 86]. L'imagerie de contact permet, d'après eux, un champ de vue plus important, une vitesse de comptage plus rapide et un coût moindre que la technologie macroscopique dédiée (cytométrie en flux). Cet objectif est très restreint dans le cadre de l'intégration de l'optique dans de nombreux laboratoires sur puce, car il ne s'agit pas de tri ou d'analyse très poussés des cellules.

Leurs dispositifs ont évolué au fil des articles (Figure 24).

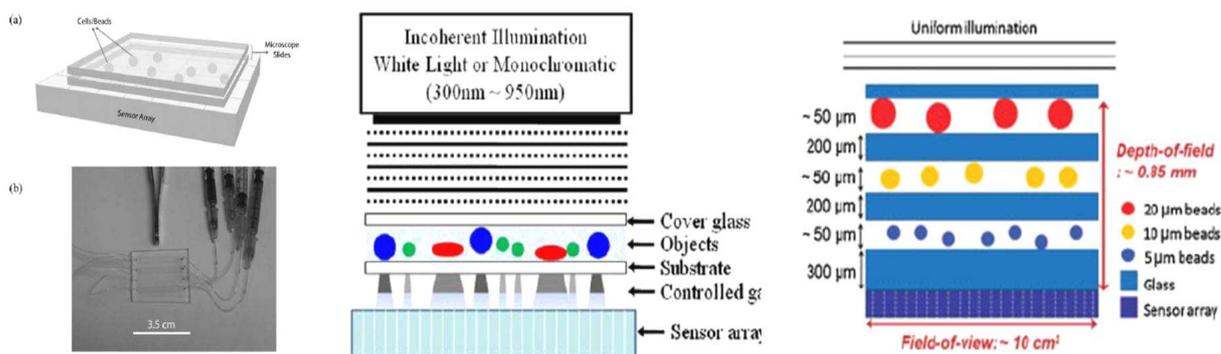


Figure 24- Schémas des différents dispositifs pour compter des objets biologiques
 a) [85], janvier 2008 b) [83], Septembre 2008 c) [87], février 2009

Le principal capteur employé est le CCD KAI-11002 de chez Kodak. Un empilement de plusieurs lamelles de verre espacées à l'aide de fines couches de PDMS est rapporté sur sa surface (Figure 24). Des chambres de comptage sont formées dans ces espacements. Le liquide n'est ainsi nullement en contact avec l'électronique, mais avec des matériaux biocompatibles (PDMS et verre). Les empilements permettent, d'après eux, l'augmentation du débit de comptage grâce à l'augmentation du nombre de surfaces observées.

Les images observées ont également évolué avec les systèmes. Avec le premier système composé d'un simple assemblage de deux lamelles de 175 µm d'épaisseur (Figure 24 a), les images sont similaires (Figure 25) à celles de l'équipe du Dr. Abshire (Figure 23). Ce sont de simples points noirs.

⁹ Les lymphocytes T CD4+ sont des cellules du système immunitaires, qui parviennent à maturation dans le thymus (d'où le T) et présentent à leur surface la protéine membranaire CD4 (cluster de différenciation 4).

¹⁰ Syndrome de l'ImmunoDéficiency Acquis

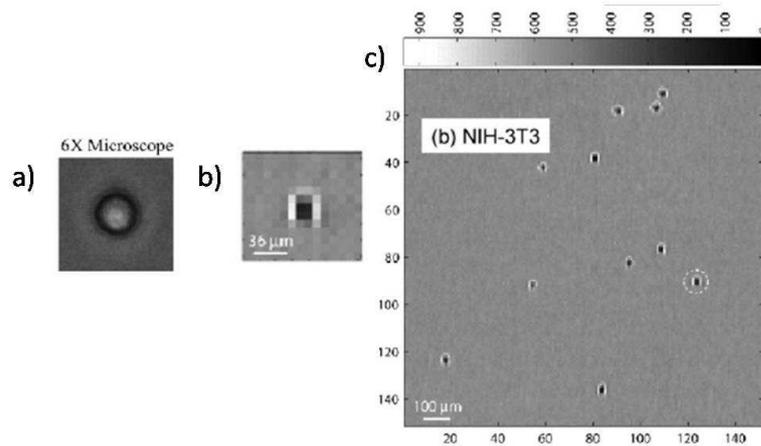


Figure 25- Cellules de souris (lignée NIH3T3) observées par microscopie (a) ou par imagerie de contact (b & c), d'après[85].

Les dispositifs suivants (Figure 24 b et c) ont exploité la visualisation par le capteur des tâches de diffraction des cellules. De nombreux paramètres ont été étudiés :

- La longueur d'onde
- La distance entre l'objet et le capteur
- Le nombre d'empilements de lamelles de verre
- Le type d'objets biologiques (cellules, mais aussi bactéries ou levures)

La Figure 26 A reprend une partie des données obtenues sur la variation d'objets biologiques (levure, bactérie, cellule).

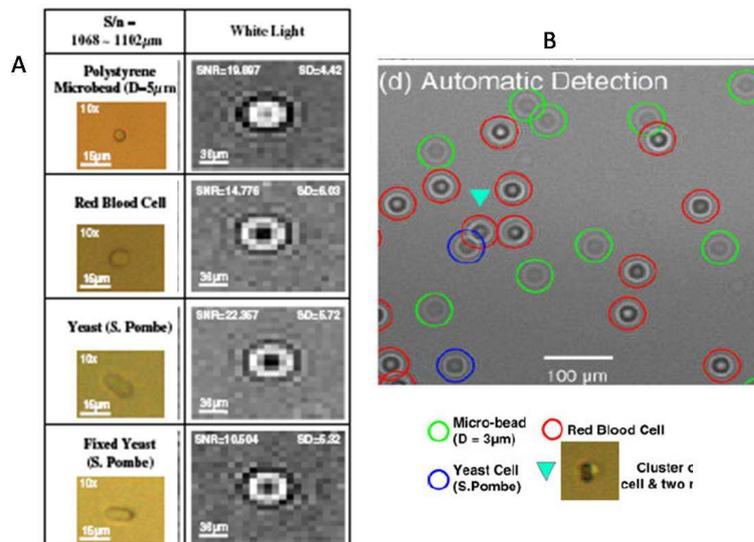


Figure 26- Tâches de diffraction d'objets biologiques, d'après [83, 87].
A) Identification de signatures, B) Détection automatisée

Selon les auteurs, la tâche de diffraction est caractéristique de l'objet biologique et de la distance entre cet objet et le capteur. Cette signature caractéristique leur permet d'identifier automatiquement les objets grâce à un logiciel développé sous Matlab (Figure 26 B).

Compréhension de l'imagerie de contact par l'état de l'art

Les deux équipes ont donné des explications différentes quant au mode d'imagerie de leur microsystème. L'équipe du Dr. Abshire réalise des simulations d'imagerie de contact par un logiciel de tracé de rayons [81]. Le cadre théorique choisi relève donc de l'optique géométrique qui est applicable ici car la taille caractéristique de la cellule (20 μm) est assez grande devant la longueur d'onde (500 nm).

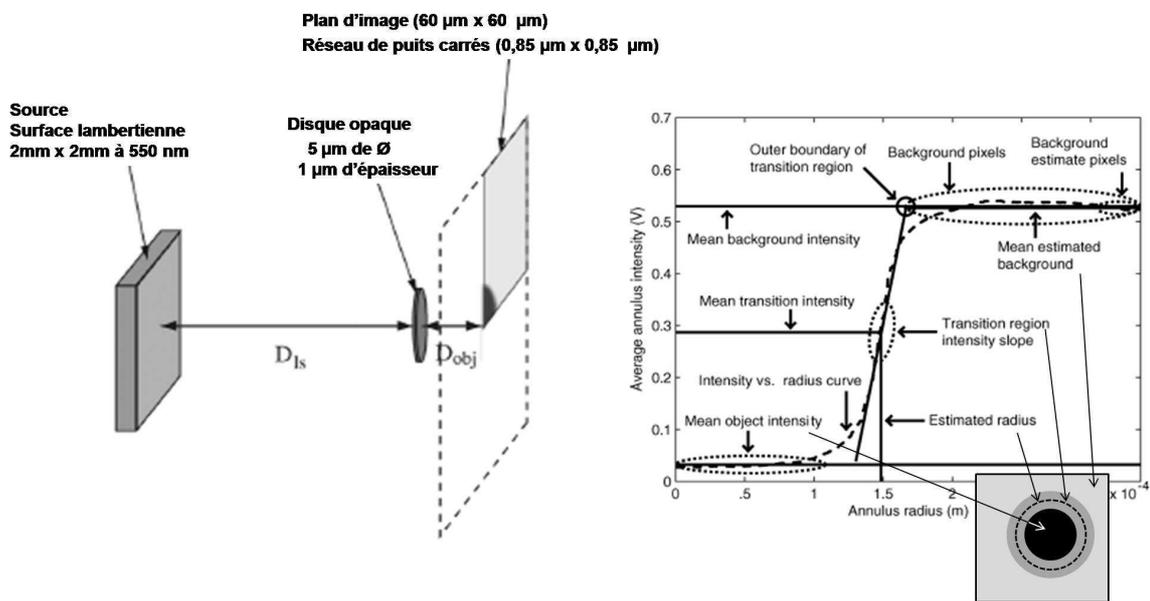


Figure 27- Simulation de l'imagerie de contact, d'après [81].

Le système d'imagerie de contact est modélisé par (Figure 27) :

- Une source lumineuse sous la forme d'une surface lambertienne, c'est-à-dire dont la valeur de l'éclairement dépend uniquement de l'angle.
- Un disque opaque de diamètre d pour représenter une cellule marquée par colorimétrie (sa transmission est alors de $T=0,166$).
- Un réseau de puits carrés pour la surface de plan d'image. Les pixels envisagés sont de petite taille (0,85 μm).

Les distances D_{ls} entre la source et l'objet, et D_{obj} entre l'objet et le plan d'image, sont envisagées comme des paramètres. La simulation calcule le contraste (entre la zone d'ombre et la zone éclairée) et le rayon moyen (comme indiqué sur la Figure 27). Les auteurs concluent que la résolution d'un système en imagerie de contact n'est pas dépendante de la diffraction et donc du critère de Rayleigh (Figure 6), mais uniquement de la distance cellule/capteur et de la taille des pixels. L'imagerie de contact fonctionne donc pour eux comme un photogramme.

En revanche, pour la collaboration UCLA & MIT, le modèle dépend de l'optique ondulatoire. L'ombre de la cellule est considérée comme une tâche de diffraction. Pour choisir le type d'approximation du phénomène de diffraction (de Fresnel ou de Fraunhofer), le nombre de Fresnel est calculé dans différentes configurations [85]. Leur système a évolué pour se placer dans la configuration de Fraunhofer ($D_{obj} \gg d^2/\lambda$) et ainsi observer plus facilement des anneaux caractéristiques.

Bilan de l'état de l'art sur l'imagerie de contact

Ces deux systèmes permettent d'observer des cellules sans objectif de grossissement. Le premier exploite le paramètre « distance objet/capteur » pour imager des ombres de cellules marquées (optique géométrique), le second l'exploite pour obtenir des tâches de diffraction caractéristiques (optique ondulatoire). De même, leurs objectifs finaux diffèrent. Le premier souhaite observer des cellules pour les étudier, le second pour les compter. Les deux obtiennent des images de tâches noires ou de tâches de diffraction qui ne fournissent pas d'information sur la morphologie classique des cellules (Figure 3). Or l'étude de cette dernière est indispensable pour discriminer différents types d'événements de la vie cellulaire. Un laboratoire sur puce pour étudier des cellules vivantes ne peut faire l'économie de visualiser correctement leur morphologie.

1.2.3.2 Le microscope optofluidique

Pour améliorer la résolution de l'imagerie de contact, l'équipe du professeur Psaltis propose de diminuer artificiellement la taille des pixels [91, 92]. Son objectif est d'obtenir des informations sur la composition du vers *C. Elegans*, ou d'algues unicellulaires.

Pour diminuer artificiellement la taille des pixels, la surface du capteur (pixels de $9,9\mu\text{m}$ de côté) est tout d'abord recouverte d'une résine (SU8) pour aplanir la surface qui possède sans doute une matrice de micros lentilles, puis recouverte de métal (aluminium ou or) et des ouvertures de $1\mu\text{m}$ de diamètre sont réalisées à l'aide d'un faisceau d'ions focalisé (FIB - Focused Ion Beam). Chacune de ces ouvertures est placée au dessus d'un pixel, et elles sont arrangées en diagonale avec un espacement en x de la taille d'un pixel et en y de 500 nm (Figure 28).

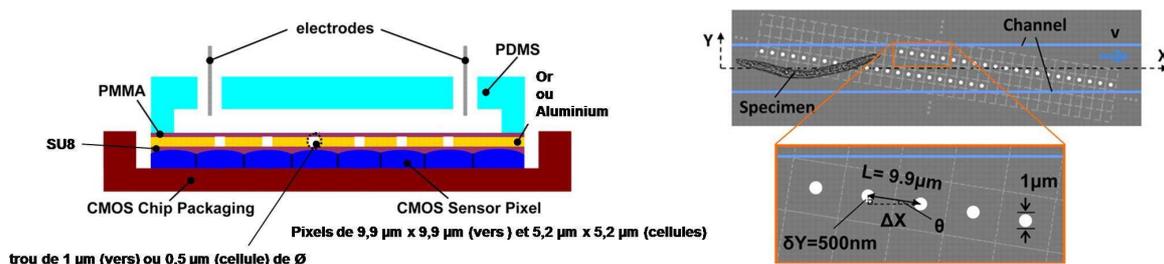


Figure 28- Schémas de principe du microscope optofluidique d'après [92].

Cet assemblage se comporte comme un microscope à sonde (« probe microscope » ou microscope à champ proche) dans lequel les positions de la sonde et de l'objet ont été inversées. L'objet se déplace ici au-dessus de sondes ou ouvertures. Chaque trou image un point de l'objet à un instant donné, et une ligne au cours du temps. Des recouvrements de 500 nm des zones imagées permettent un post-traitement des données pour reconstituer l'image de l'objet. En effet une tranche de 500 nm de large est visualisée par deux ouvertures.

Ce dispositif a été utilisé pour imager des vers (*C.elegans*) et des algues unicellulaires (*Chlamydomonas*) (Figure 29).

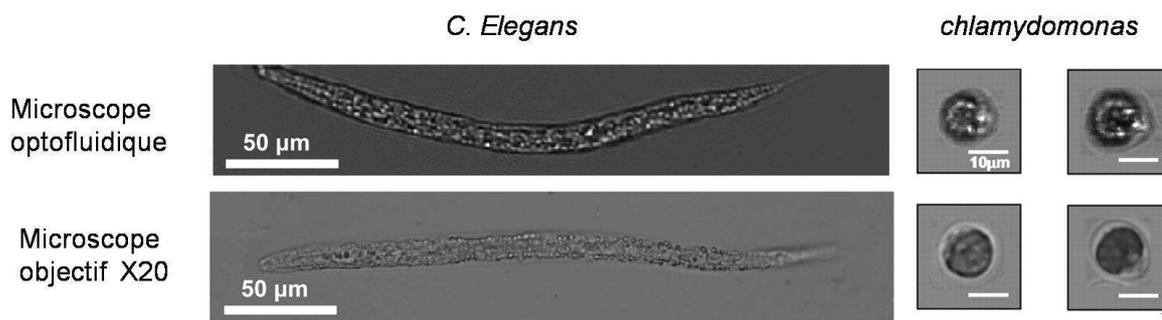


Figure 29- Images obtenues par le microscope optofluidique (ligne supérieure) et par le microscope en fond clair (ligne inférieure), d'après [92].

La résolution de ce système est principalement déterminée par la taille des ouvertures soit environ 1 μm . Elle est donc potentiellement meilleure que l'imagerie de contact limitée *a priori* par la taille des pixels, et reste similaire voire meilleure que de nombreux microscopes optiques (Figure 29).

Ce système très élégant permet donc d'atteindre des résolutions compétitives à celles des microscopes conventionnels. Néanmoins, la méthode employée nécessite que l'objet se déplace et donc un flux, ce qui exclut une utilisation simple pour des cellules adhérentes.

De plus, les auteurs soulignent que la variation de vitesse, la rotation des objets, ... peuvent perturber la reconstitution d'image. A l'heure actuelle, leur poste de traitement ne peut se réaliser dans de bonnes conditions que pour 50% des vers imagés. Il est également très probable que la méthode de fabrication complexe et risquée, à l'aide du FIB, aboutisse à un taux de perte de capteurs élevé lors de la production des trous.

1.3 Objectifs de la thèse

Aucun des systèmes d'imagerie directe de la littérature n'observe la morphologie caractéristique de cellules adhérentes bien que celles-ci représentent la majorité des cellules d'intérêt. L'objectif de ce travail est donc de développer un module d'imagerie de cellules qui pourra par la suite faire partie d'un dispositif plus complet. Il s'agit de mettre en place un microsystème d'imagerie de contact pour la visualisation et le suivi in vitro de cellules adhérentes. Les défis à relever sont nombreux et concernent principalement la mise en contact de l'électronique et du liquide du milieu de culture, la biocompatibilité des matériaux sélectionnés, la prise d'images et leur transfert à intervalles réguliers à l'aide d'un microsystème placé dans un système fermé et humide.

Pour mener à bien cette étude et atteindre l'objectif fixé, plusieurs étapes sont nécessaires :

- * Un prototype est mis au point pour visualiser à un instant donné une population cellulaire. Pour cela, les différents éléments du microsystème doivent être choisis pour protéger l'électronique du capteur vis-à-vis des milieux de culture aqueux, et assurer des conditions de survie cellulaire pendant l'observation (quelques minutes). La visualisation de cellules doit être optimisée pour être similaire à des outils classiques de microscopie (chapitre 3).*
- * Les différents composants du système optique (capteur, éclairage, caractéristiques optiques de l'échantillon et de son support) et des images qu'il fournit, sont explorés pour comprendre le mécanisme de formation de l'image (chapitre 4).*
- * Le prototype est optimisé pour fonctionner comme un vidéomicroscope. Le démonstrateur doit alors être capable de maintenir les conditions physiologiques nécessaires au suivi dans le temps (plusieurs jours) d'une population cellulaire (chapitre 5).*

2 Techniques et matériels utilisés

Du fait de l'interdisciplinarité du sujet, des grandes généralités sur la culture cellulaire et sur les capteurs d'images sont présentées dans cette partie. L'objectif est de souligner les contraintes à prendre en compte pour le développement du dispositif d'imagerie : d'une part celles imposées par les échantillons observés (les cellules) et d'autre part celles imposées par les technologies de capteurs d'images disponibles.

2.1 Culture cellulaire

La culture cellulaire est une technique de laboratoire développée au XX^{ème} siècle [4]. Ses objectifs sont de :

- disposer d'un type de cellules bien caractérisées (par exemple des cellules de poumon ou des cellules de foie)
- maintenir ces cellules en vie hors de l'organisme dont elles sont issues sur un temps suffisant pour observer les phénomènes étudiés
- permettre leur prolifération pour en disposer en nombre suffisant et en temps voulu pour les expériences.

2.1.1 Lignées cellulaires

Les cellules sont isolées des tissus par des combinaisons de méthodes chimiques (enzymes,...) et mécaniques (dissociation, centrifugation, cytométrie,...). Les cellules directement issues d'un organisme et maintenues en vie quelques jours sont dites cultures primaires. La majorité des cellules de mammifères peuvent, dans les conditions adéquates, proliférer. La prolifération de cellules issues d'une culture primaire est appelée culture secondaire. La plupart des cellules de vertébrés arrêtent de se diviser en culture par un processus appelé sénescence. Par exemple les fibroblastes humains ne se divisent que 25 à 45 fois en culture. Les cellules d'un échantillon de culture secondaire ne sont ainsi disponibles que quelques semaines.

Les cellules échappant à ce processus de sénescence sont dites « immortelles » et se divisent indéfiniment. L'immortalité peut avoir plusieurs origines. Les cellules peuvent être :

- issues d'un tissu cancéreux et naturellement immortelles
- infectées par certains virus pour les immortaliser
- modifiées par génie génétique pour les immortaliser

Ces cellules immortalisées sont appelées « lignées ». Par exemple, les RPE1 (Retinal Pigmented Epithelial cell 1) sont une lignée de cellules épithéliales de rétine d'œil humain. De nombreuses lignées cellulaires stables sont aujourd'hui disponibles. Les lignées permettent à différents chercheurs d'avoir accès aux mêmes cellules de façon quasi-uniforme. En effet, les cellules peuvent être conservées dans l'azote liquide (-196 °C) pendant une très longue période, et retrouver leur viabilité et leur propriétés une fois décongelées.

Certaines lignées cellulaires conservent *in vitro* des caractéristiques de différenciation : par exemple les cellules de cœur continuent de battre de façon synchronisée *in vitro*. Ces lignées sont donc des modèles très utiles aux biologistes même si elles diffèrent des cellules *in vivo*. La qualité de ces modèles est garantie par des banques mondiales de lignées qui commercialisent des lignées certifiées. Les plus connues sont les banques américaines ATCC

(American Type Culture Collection) et européennes ECACC (European Collection of Animal Cell Cultures). La lignée la plus célèbre et la plus utilisée, HeLa, correspond à la première lignée humaine mise en culture en 1951. Il s'agit de cellules cancéreuses d'un adénocarcinome, qui est une forme rare de cancer des glandes de l'utérus [93]. Elles ont été prélevées chez la patiente Henrietta Lacks, d'où le nom « HeLa ». Bien qu'Henrietta Lacks soit morte de son cancer en 1951, ses cellules continuent à l'heure actuelle à vivre dans des boîtes de Petri dans de très nombreux laboratoires !

2.1.2 Le maintien en culture

In vitro la plupart des cellules issues de nos organes (foie, poumons, ...) et de nos tissus (peau,...) adhèrent au substrat de culture (boîte en plastique, lamelle de verre fonctionnalisé à l'aide de protéines, ...). En revanche les cellules du système sanguin constitué d'un grand nombre de cellules en suspension, n'adhèrent pas à un support une fois mises en culture.

Les cellules sont maintenues en vie dans des conditions se rapprochant le plus possible des conditions physiologiques : une température de 37°C dans un environnement aqueux avec une osmolarité et un pH contrôlés correspondant à ceux de l'organe d'origine. Les solutions aqueuses pour cultiver les cellules sont adaptées à chaque type cellulaire. Ces milieux de culture sont des mélanges complexes de molécules. Les composants principaux sont explicités dans le tableau suivant (Figure 30) :

Principaux composants du milieu	Justification	Exemples
Carbohydrates	Source d'énergie. Leur concentration varie de 1 g/L à 4,5 g/L selon les milieux.	Le plus souvent sous forme de sucres comme le glucose.
Système tampon	Maintien du pH. La plupart des cellules requièrent un pH compris entre 7,2 et 7,4.	Equilibre entre les ions $\text{HCO}_3^-/\text{CO}_3^{2-}$ dans le milieu (apportés par NaHCO_3) et l'atmosphère contrôlée de l'étuve à 5% en CO_2
Indicateur de PH	Visualisation en cas d'acidification du milieu. Cela indique une dépravation en nutriments qui peut être le signe d'une surpopulation cellulaire ou le premier signe d'une contamination bactérienne.	Phénol rouge
Minéraux et oligo-éléments	<ul style="list-style-type: none"> •Maintien de la balance osmotique nécessaire aux cellules pour ne pas exploser ou imploser •Présence nécessaire pour l'adhérence •Co-facteurs de nombreuses réactions enzymatiques 	Sels minéraux: NaCl, KCl, CaCl_2 , MgCl_2 ,... Oligo-éléments: sélénium, zinc,...
Acides aminés	Présence nécessaire pour la vie des cellules	Arginine, cystine, histidine,...
Vitamines	Précurseurs de co-facteurs. Certaines vitamines comme la B12 sont indispensables pour la prolifération de la plupart des lignées.	B12 (cyanicobalamine), A (Rétinol) et E (tocophérol)
Sérum	Mélange complexe de protéines, lipides,... Indispensable pour la prolifération	Sérum de veau fœtal (SVF)
Antibiotiques	Limitation du risque de contamination par des bactéries	Pénicilline et streptomycine

Figure 30- Principaux composants d'un milieu de culture.

Les flasques de culture contenant les cellules sont placés dans des étuves dédiées, qui maintiennent une forte humidité pour limiter l'évaporation du milieu, la température à 37°C, et un taux de 5% de CO₂ dans l'air pour réguler le pH (système tampon NaHCO₃). Au bout de quelques jours, par divisions successives des cellules, une culture arrive à confluence. Les cellules recouvrent entièrement la surface de la flasque, et le milieu est appauvri en nutriments essentiels. Or la plupart des cellules adhérentes sont soumises à l'inhibition de contact. Lorsque la culture atteint un stade de confluence, les cellules cessent de se diviser ou se différencient (et perdent ainsi les propriétés d'intérêt de leur lignée). Régulièrement, il est nécessaire de détacher les cellules et de les diluer pour leur redonner plus de surface d'adhésion. Cette étape s'appelle un passage. Pour les séparer de leur support et des cellules voisines, il existe plusieurs méthodes basées sur l'utilisation :

- d'un grattoir (action mécanique)
- de la trypsine, une enzyme qui digère les protéines d'adhésion
- d'un chélateur de calcium, comme l'EDTA, qui empêche l'action des lectines (protéines qui permettent l'agglutination des cellules)

La combinaison trypsine/EDTA est la méthode la plus souvent utilisée. Un protocole de passage pour les cellules épithéliales de rétine d'œil, les RPE1, est présenté à la Figure 31.

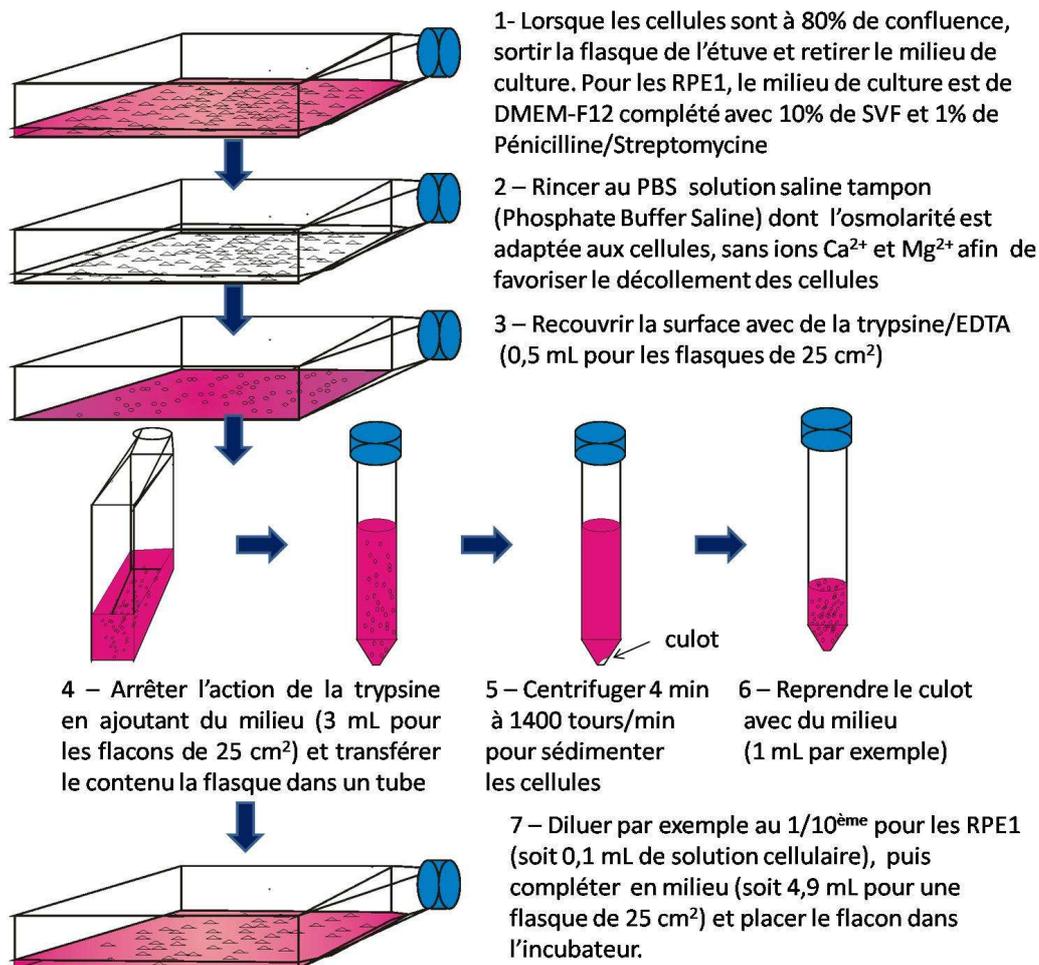


Figure 31- Protocole de passage de cellules.

Les cellules de lignées en culture se divisent en moyenne toutes les 18h à 24h. En revanche, une bactérie se divise toutes les 20 minutes. Une colonie de bactéries peut donc contaminer rapidement une culture cellulaire. Pour éviter cela, les milieux de culture sont complétés avec des antibiotiques tels que la pénicilline. De plus, la manipulation des cellules est réalisée avec des milieux additionnés d'antibiotiques dans une enceinte stérile (PSM : poste de sécurité microbiologique) et à l'aide de matériel stérile. Le matériel spécifique à la culture est vendu en conditionnement stérile ou bien doit être soumis à différents procédés de stérilisation avant utilisation :

- l'autoclavage : stérilisation à la vapeur d'eau sous pression à 120 °C. Cette technique ne convient pas aux solutions contenant des protéines qui seraient dénaturées.
- la filtration pour les liquides avec un filtre de 0,22 µm. Les bactéries, cellules et champignons sont retenus, mais pas les virus.
- le rayonnement UV à des longueurs d'onde proches de 257 nm (lampe à 254 nm). Les recoins non atteints par une énergie suffisante ne seront pas stérilisés.
- l'éthanol à 70° pour toutes les surfaces et le matériel oxydables (par exemple des pinces)

2.1.3 Traitement de surface

Les cellules adhérentes ne s'attachent pas directement sur le substrat mais via des protéines de la matrice extracellulaire. Ces protéines peuvent être présentes dans le milieu de culture et adsorbées sur la surface, ou bien sécrétées par les cellules elles-mêmes. Pour cette raison, les supports pour les cellules sont souvent traités pour favoriser l'adhésion. Par exemple, le verre ou le polystyrène peuvent subir un traitement plasma. Il est aussi possible de fonctionnaliser les surfaces avec des protéines de la matrice comme le collagène ou la fibronectine pour favoriser l'adhésion.

Au laboratoire, les lamelles de verre sont fonctionnalisées avec de la fibronectine (Sigma-Aldrich). La lamelle est tout d'abord nettoyée à l'éthanol, puis exposée à un plasma oxygène pendant 30s à 30W (pour la nettoyer et activer la surface en l'oxydant), et enfin mise en contact avec une solution de fibronectine à 10 µg/mL pendant 30 min.

A l'inverse, le verre est parfois fonctionnalisé pour empêcher les cellules d'adhérer. Un traitement anti-adhésif possible est de recouvrir la surface de Poly-L-Lysine Poly Ethylène Glycol (PLL PEG). Il a été montré que cette modification inhibe l'absorption de protéines et empêche les cellules d'adhérer pendant au moins 14 jours [94]. Pour cela, les lamelles sont nettoyées à l'éthanol, puis exposées à un plasma oxygène, pendant 30s à 30W, et enfin mises en contact avec une solution de PLL-PEG à 0,1 mg/mL (SurfaceSolution) pendant 30 min.

Les traitements adhésif et non adhésif peuvent être combinés pour définir des zones d'adhésion particulières ou micropatterns [39, 40]. Une technique pour obtenir un tel résultat

est décrite dans [41]. Il s'agit tout d'abord de fonctionnaliser la lamelle avec le PLL-PEG, puis de détruire ces molécules sur certaines zones par une exposition à une lampe UV/ozone ($15\text{mW}/\text{cm}^2$) pendant 5 min au travers d'un masque (zones opaques ou non aux UV). Les espaces de verre ainsi mis à nu peuvent être ensuite fonctionnalisés avec la fibronectine à $10\ \mu\text{g}/\text{mL}$ pendant 30 min.

2.1.4 Marquage fluorescent

Pour observer des composants intracellulaires en fluorescence (tels que le noyau, l'appareil de Golgi ou le cytosquelette), il est nécessaire de les marquer au préalable.

Voici un exemple de protocole de marquage fluorescent (Figure 32) que nous avons utilisé. Il s'agit de marquer d'une part le noyau par le Hoechst et d'autre part l'actine, une protéine du cytosquelette, par la Phalloïdine-FITC. La Phalloïdine est une toxine qui se lie à l'actine, et le FITC (Fluorescein IsoThioCyanate) est le fluorophore associé pour la visualisation.

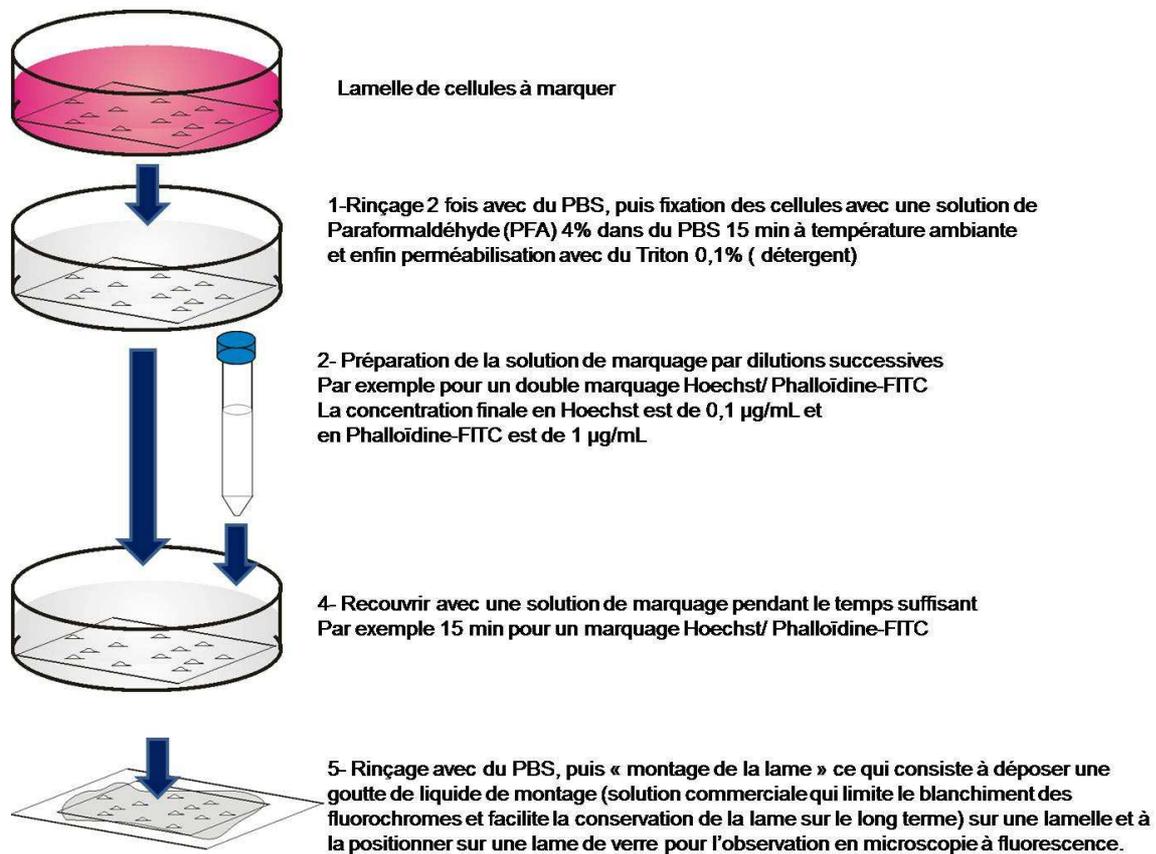


Figure 32- Protocole de fixation et de marquage immunofluorescent de cellules.

L'observation des cellules nécessite de les maintenir en vie dans des conditions physiologiques : milieu de culture à 37°C, 5% de CO₂. Le microsysteme développé doit donc être compatible avec les milieux aqueux des milieux de culture, et pour le suivi dans le temps, avec la forte humidité présente dans l'étuve. Les traitements de surface sont utiles pour favoriser spécifiquement l'adhésion des cellules. Enfin, le marquage fluorescent est utile pour contrôler avec un microscope à fluorescence la présence de cellules sur des supports opaques.

2.2 Généralités sur les technologies de capteur d'image

Un capteur d'image est un composant électronique qui convertit un rayonnement lumineux en une information électrique. Le capteur se compose d'une matrice de photosites communément appelés pixels. La dénomination « pixel » d'origine anglaise provient de la contraction de « picture » et d'« element ». Il désigne le plus petit élément d'un capteur ou d'une image. Cette discrétisation de l'espace donne accès à une information sur l'origine spatiale de la lumière et permet donc de former une reproduction de la scène observée. Une analogie peut être faite avec les grains d'argent d'une pellicule photo. Les capteurs d'image sont utilisés pour de nombreuses applications. 1 238 millions d'unités ont été vendues en 2006 pour un total de 5 995 millions de dollars [74]. Les utilisations sont aussi variées que les caméraphones (appareil photo inclus dans les téléphones portables) ou les souris d'ordinateurs ou bien encore les machines pour lecture de codes barres (Figure 33).

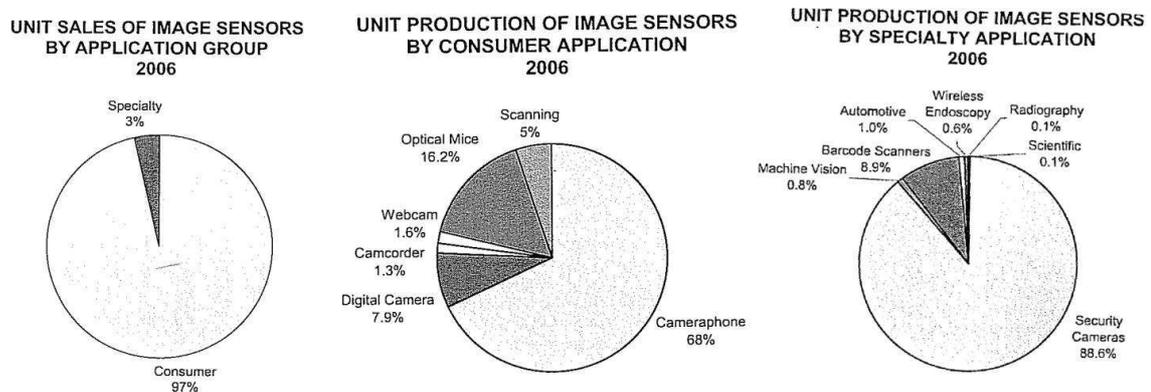


Figure 33- Marché des capteurs d'images d'après [74]

1^{er} diagramme : pourcentages de vente grand public (consumer) vs. les applications spécifiques

2^{ème} diagramme : pourcentages selon les applications pour le marché grand public

3^{ème} diagramme : pourcentages de vente par applications spécifiques

Deux technologies de fabrication des capteurs coexistent : d'un côté les « CCD » (Charge Coupled Device) exploitant des transistors MOS (Metal Oxide Semiconductor) et de l'autre les « CMOS » (Complementary Metal Oxide Semiconductor) composés de transistors du même nom. Historiquement, les premiers détecteurs des deux technologies ont été développés au même moment dans les années 1960. La technologie CCD a été mûre plus rapidement

(i.e. à la fin des années 1970) pour produire des matrices de taille suffisante pour imager. Il s'agit donc de la technologie de référence. La technologie CMOS a trouvé sa place plus tardivement dans les années 1990 sur le marché du multimédia.[74, 95].

2.2.1 Structure

Sur un capteur, chaque pixel comprend au minimum un photorécepteur et un système élémentaire pour transmettre l'information [96]. Les photorécepteurs sont basés sur l'effet photoélectrique, c'est-à-dire l'émission d'électrons lors de l'exposition à une onde électromagnétique adéquate. Le silicium est un matériau de choix pour l'imagerie, car il est sensible à un large spectre couvrant le domaine visible (de 390 à 760 nm) et le proche infrarouge (de 760 à 1100 nm). Chaque photorécepteur intègre et stocke les charges converties. Les charges (électrons) sont de nature discrète. Lors de la lecture de la charge du pixel, les électrons s'écoulent dans un circuit adapté pour former un courant (grandeur ici analogique) qui est convertie en information numérique (conversion analogique/numérique). La principale différence entre les deux technologies de capteurs d'image réside dans l'emplacement de la conversion analogique/numérique. Pour un CCD, cette opération a lieu hors de la matrice. Les pixels se comportent comme des puits recevant de l'eau (Figure 34).

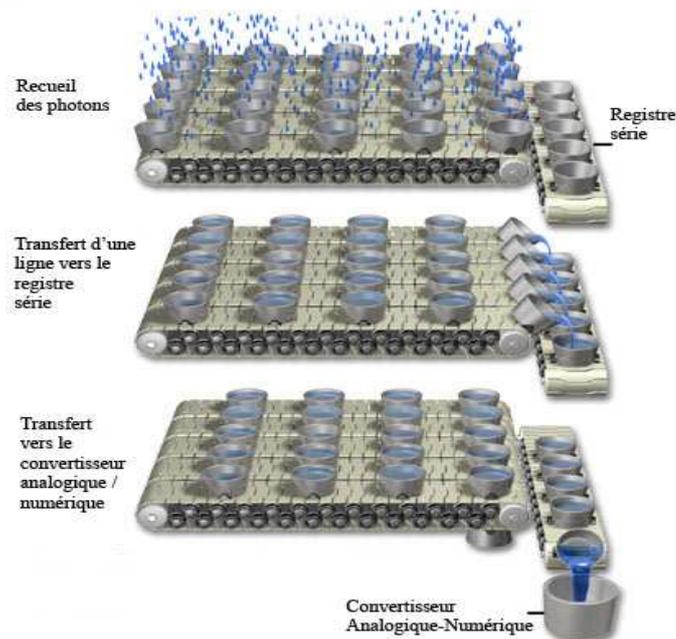


Figure 34- Schéma de fonctionnement d'un capteur CCD, d'après [97].

A la fin de l'exposition, chaque ligne de puits est transportée jusqu'à un registre série. Lui-même agit également comme un tapis roulant jusqu'à un convertisseur analogique/numérique. 3 grands types d'architecture existent pour transporter les électrons collectés (Figure 35) :

- Avec la structure dite « pleine trame », chaque ligne se transfère dans la suivante, pour être lue. Cette architecture nécessite la fermeture d'un obturateur mécanique devant le capteur entre chaque prise d'image.
- Avec l'architecture « transfert de trame », l'image est transférée dans une zone tampon similaire à la matrice sensible, puis chaque ligne est transférée jusqu'au registre série. Le temps entre deux images peut ainsi être plus court.
- Enfin avec la structure dite « interligne », les charges sont d'abord déplacées dans une zone de transfert entre chaque colonne de pixels puis séquentiellement vers le registre série. Cette dernière architecture permet de prendre des images très rapidement, mais diminue la surface disponible pour le photosite sur chaque pixel.

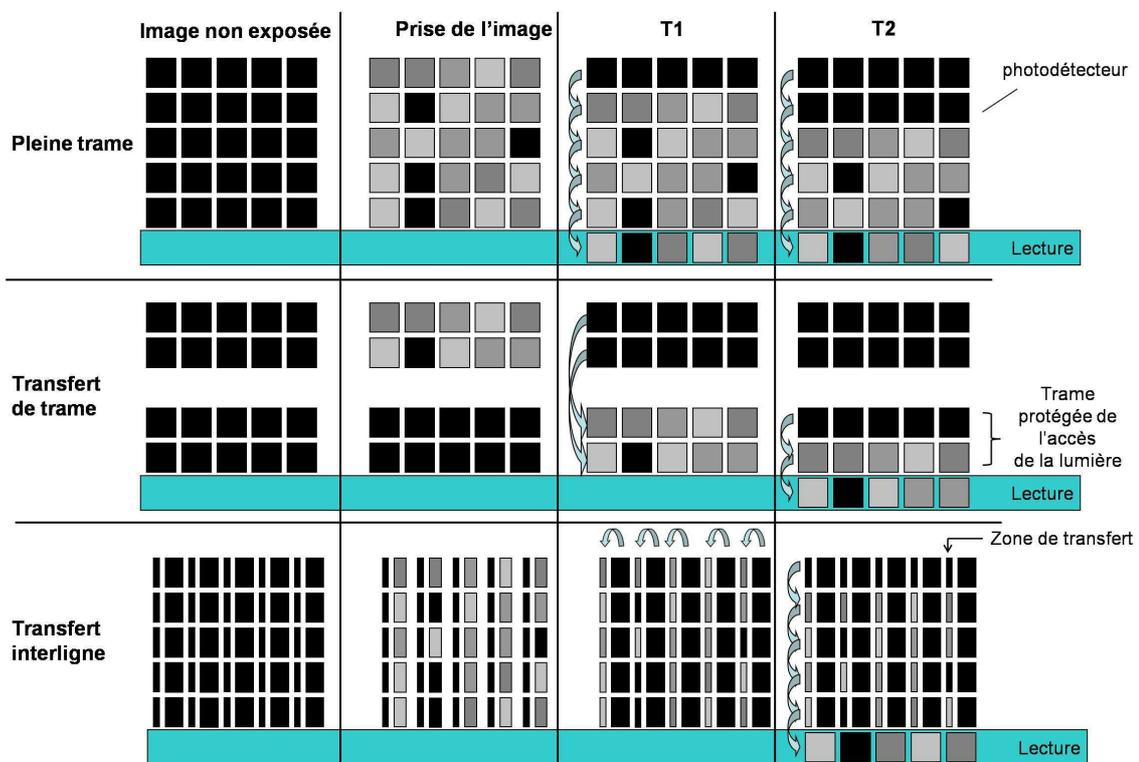


Figure 35- Les 3 grands types d'architecture de capteur CCD.

A l'inverse du capteur CCD, la conversion analogique/numérique dans un capteur CMOS a lieu dans chaque pixel. L'information transférée le long de la matrice est donc déjà digitale.

Cette différence de traitement de l'information a une conséquence directe sur le facteur de remplissage de chaque pixel. Il s'agit du pourcentage de surface occupée par la zone photosensible par rapport à la surface complète du pixel. Dans un CMOS, un convertisseur et un amplificateur dans chaque pixel rognent sur l'espace dédié à la photodétection. Le facteur de remplissage atteint 10-25% pour les meilleurs rapports, contre 90-100% pour un CCD pleine trame [98]. Un faible facteur de remplissage signifie qu'une partie importante de la lumière n'est pas captée. Pour améliorer la quantité de flux incident reçue, des microlentilles

sont désormais déposées sur les pixels de la plupart des capteurs, quelle que soit leur technologie.

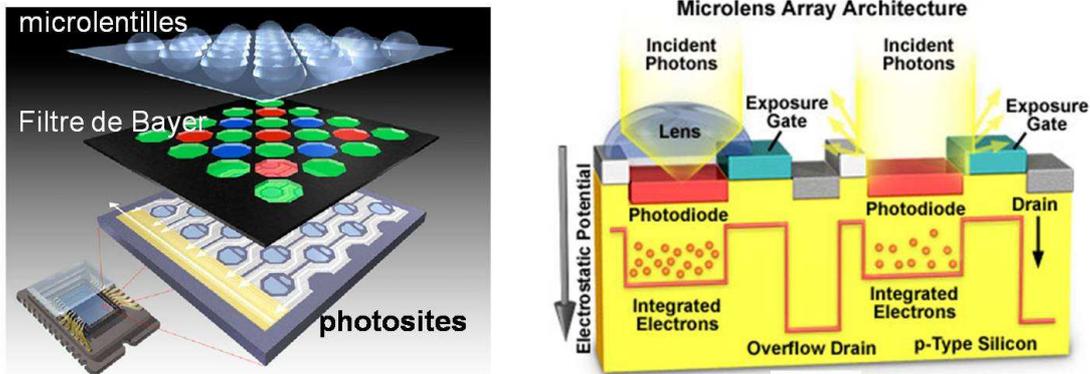


Figure 36- Architecture verticale d'une matrice d'un capteur d'image (à gauche) d'après [99] et d'un photosite avec ou sans microlentille (à droite)[100].

Enfin, les capteurs peuvent produire des images couleurs. Pour cela, une matrice de filtres de couleurs, le plus souvent en polyamide, est déposée sur les photodétecteurs avec une fréquence horizontale et verticale semblable à celle du capteur. Des groupes de 4 pixels sensibles aux couleurs primaires : rouge, verte et bleu (RGB) sont définis. L'arrangement le plus connu est celui de Bayer, un ingénieur de chez Kodak qui déposa un brevet de matrice de filtres [101]. D'après lui, comme l'œil humain est plus sensible à la luminance dans le vert, plus de pixels dans cette couleur doivent être disposés pour rendre des images interprétables par le cerveau humain. Les matrices de Bayer agencent donc par groupes de quatre pixels un rouge, un bleu et deux verts (Figure 37).

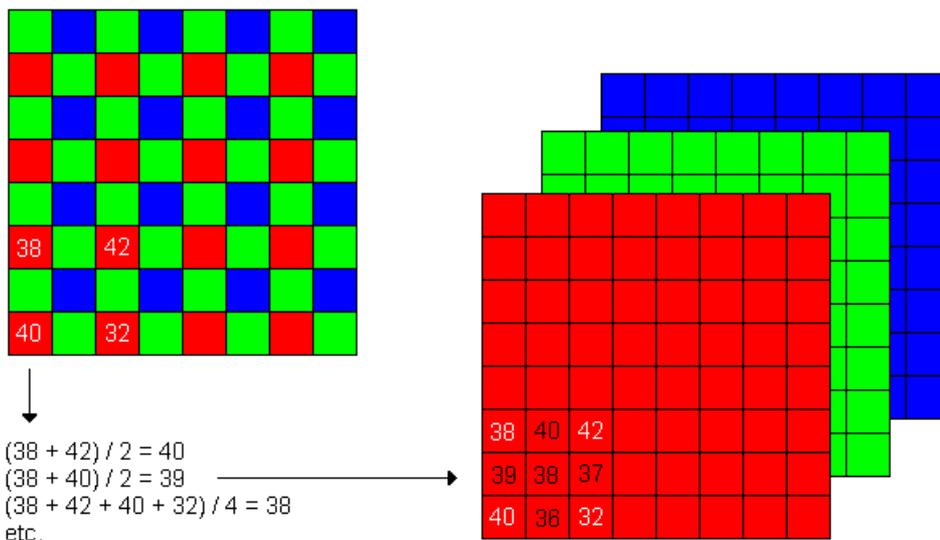


Figure 37- Principe d'un démosaïquage simple par la moyenne des pixels avoisinants.

Par conséquent, les pixels de l'image brute ne possèdent pas une valeur dans chaque couleur (Figure 37). Pour obtenir l'image finale où chaque pixel possède une valeur dans les trois couleurs, une opération dite de « démosaïquage »¹¹ est nécessaire. Les données manquantes pour chaque pixel sont interpolées à partir de celles des pixels voisins dans la même composante. De nombreux algorithmes existent pour cela. Le plus simple est une interpolation linéaire, le pixel prenant pour une composante manquante, la valeur moyenne des pixels similaires qui l'entourent (Figure 37) [102].

2.2.2 Performances

Les performances d'un capteur d'image peuvent se regrouper en plusieurs catégories de paramètres [103] :

- Géométriques (résolution, facteur de remplissage).
 - Physiques (rendement quantique, réponse spectrale)
 - Electriques (dynamique, bruit, temps de lecture)
-
- **La résolution** correspond au nombre de points de l'image pour définir un détail. Dans un système classique, plus le nombre de pixels est élevé, mieux les détails sont définis. Le nombre de pixels est classiquement augmenté en diminuant la taille des pixels à taille de matrice équivalente.
 - **Le facteur de remplissage** correspond au rapport entre l'aire photosensible et l'aire totale du pixel. La différence entre ces deux surfaces correspond à celle nécessaire pour le routage ou pour un traitement de l'information. Un taux de remplissage peu élevé signifie souvent une sensibilité plus faible.
 - **Le rendement quantique** exprime le nombre de photons qui génèrent une paire électron-trou pour un nombre de photons incidents sur le photosite. Il varie en fonction de la longueur d'onde, et de la structure exacte d'un photosite. Son maximum est classiquement de l'ordre de 40% [103].
 - **La réponse spectrale** correspond à la sensibilité du capteur en fonction de la longueur d'onde. Elle est généralement donnée pour les différents filtres pour un capteur couleur.
 - **La dynamique** correspond à la gamme d'intensité lumineuse qu'un capteur peut détecter. Elle est comprise entre le signal suffisant pour dépasser le bruit et la saturation d'un photosite.
 - **Le temps de lecture** correspond au temps de la prise d'image et de son transfert vers l'extérieur du capteur
 - **Le bruit** correspond au signal parasite présent sur les données de sortie du capteur. Différents bruits temporels peuvent être distingués tout le long de la chaîne de transformation du signal photonique en signal électrique :

¹¹ L'orthographe « démosaïquage » se rencontre aussi parfois.

- Le bruit thermique correspond à la création de paires électrons/trou dont la quantité est proportionnelle à la température. Il double toutes les dizaines de degrés.
- Le bruit de lecture est lié au transfert et la conversion des charges en signal électrique, et à son amplification (bruit en $1/f$).

De même, différents bruits spatiaux sont liés à la présence d'imperfections locales dans le substrat de silicium ou d'impuretés introduites lors du procédé de fabrication. Un nombre de pixels défectueux sur la matrice est souvent indiqué dans la fiche technique.

Le courant d'obscurité correspond aux données fournies par le capteur en absence de lumière.

Pour un dispositif classique, un bon capteur possède un rendement de détection élevé, et une forte résolution c'est-à-dire un pas géométrique de faible valeur.

Pour notre dispositif d'imagerie, les critères déterminants sont :

- * la taille d'un pixel, souhaitée la plus petite possible pour obtenir la meilleure résolution*
- * la taille de la matrice, souhaitée la plus grande possible pour obtenir le plus grand champ de vue possible.*

L'aspect CCD ou CMOS est dans notre cas peu déterminant, car nous ne sommes intéressés que par l'image finale et non par la méthode de transfert des charges inhérente à la structure.

3 Développement d'un microdispositif de visualisation de cellules adhérentes

L'objectif de ce chapitre est de décrire le développement d'un dispositif de visualisation de cellules adhérentes par imagerie de contact. Un instrument d'imagerie est un assemblage plus ou moins complexe de différents éléments optiques permettant de construire une image nette d'un objet. A l'inverse, le système d'imagerie de contact qui nous intéresse ne contient pas d'optique de grossissement et est constitué uniquement :

** d'un capteur d'image et de son électronique d'acquisition associée*

** d'une source lumineuse*

** de l'objet à visualiser. Il s'agit ici de cellules vivantes dans un milieu physiologique. Ce type d'échantillon impose des contraintes de résistance à l'humidité et de biocompatibilité du dispositif.*

Pour réaliser ce prototype, un capteur et son électronique ont tout d'abord été choisis. Le capteur a dû être protégé des liquides par des matériaux spécifiques. Puis, le prototype, complété par une source lumineuse, a été testé pour imager des cellules. Enfin, le système a été optimisé jusqu'à la visualisation de la morphologie caractéristique de cellules adhérentes.

3.1 Développement d'un prototype

3.1.1 Choix du capteur et de l'électronique

Comme précisé dans le chapitre 1 (Introduction), la résolution dans un système d'imagerie de contact dépend *a priori* de la taille des pixels. La solution privilégiée est donc un capteur avec des pixels de la plus petite taille possible. De plus, pour limiter le travail de développement d'une électronique et de l'instrumentation associée, le circuit recherché est commercial, et son contrôle par un ordinateur est facile.

Le premier système de capture d'image sélectionné, en 2005 au début du projet, a été une webcam Philips Toucam Pro II équipée d'un capteur CCD interligne SONY ICX098 [104]. Ce choix a été motivé par la grande disponibilité de ce produit et par l'intérêt porté par la communauté d'astronomes amateurs pour celui-ci. Les avantages avancés sont le faible bruit intrinsèque du capteur et la possibilité de modifier simplement la webcam pour des longues poses (protocoles disponibles sur internet). De plus, une webcam permet une prise d'image très facile via le logiciel propriétaire fourni.

Les performances du capteur ICX098 sont intéressantes pour réaliser un prototype d'imagerie de contact car les pixels du capteur mesurent 5,6 microns [104], ce qui correspondait à la taille classique des pixels dans le commerce en 2005. Le nombre de pixels correspond au format VGA (640×480 pixels, soit une matrice de 3,6 mm x 2,7 mm), qui est un format classique pour la vidéo. Ce capteur peut ainsi prendre jusqu'à 30 images par seconde. La caméra Philips Toucam Pro II est équipée d'un capteur couleur RGB et effectue le démosaïquage automatique de l'image. Par conséquent, le résultat de la webcam ne donne pas accès aux valeurs brutes de chaque pixel.

L'étui de la webcam a été démonté pour avoir accès directement au capteur et à son électronique (Figure 38). Comme le capteur est soudé au circuit imprimé, le travail de préparation du capteur a été réalisé directement sur le circuit. Lors des expériences effectuées avec cette électronique, l'évaporation du liquide déposé à la surface du capteur a été très rapide, du fait de l'effet Joule. En effet, un microcontrôleur à communication intégrée (SAA 8116 de Philips Semiconductors) est situé exactement derrière le capteur (Figure 38). A pleine puissance (30 images par seconde), il est alimenté par une tension de 3,6 V avec une intensité de 105 mA, soit une puissance maximale de 378 mW [105]. En revanche, le capteur est alimenté par 15V et 6 mA soit une puissance de 90 mW [104]. L'échauffement provient donc principalement du microcontrôleur.

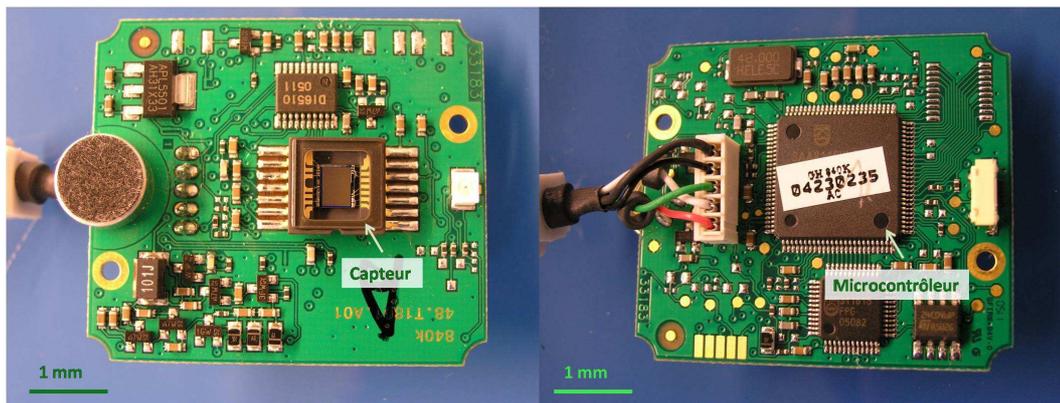


Figure 38 – Circuit électronique de la webcam Philips TouCam Pro II : recto (gauche), verso (droite).

Pour pallier ce problème d'évaporation, un essai d'éloignement du capteur a été réalisé avec l'aide M. Venceslas Rat au LETI (Figure 39). Le capteur a été dessoudé. Deux nappes de fils ont été soudées d'une part à la place du capteur sur le circuit électronique, et d'autre part à 2 barrettes de supports du capteur (connecteur femelle sécable de pas 1,27 mm fourni par Conrad (Hirschau, Allemagne)).

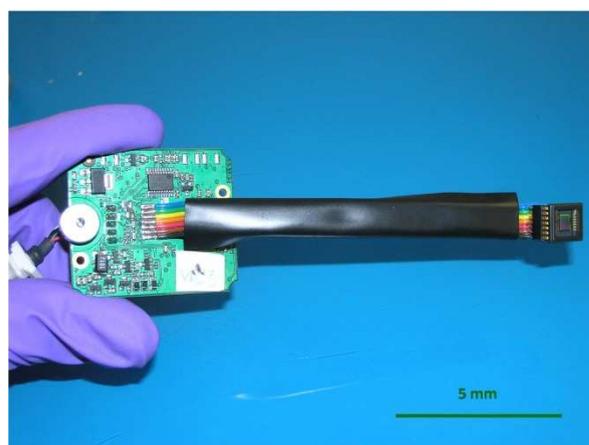


Figure 39- Capteur déporté.

L'image fournie par la webcam après cette manipulation n'est malheureusement pas exploitable. Elle ressemble à l'image générée par une vieille télévision mal réglée. Ce bruit important sur l'image s'explique par un phénomène de diaphonie dû au non-respect des règles de compatibilité électromagnétique. En effet, les différents signaux issus du capteur correspondent à des horloges de fréquences élevées (30 à 40 MHz) qui génèrent un rayonnement important. Il aurait fallu associer à chaque horloge un câble relié à la masse pour limiter ce rayonnement.

Une solution alternative a été d'acquérir chez Unibrain (Athènes, Grèce) une nouvelle électronique sur laquelle le capteur est éloigné de la carte principale (Figure 40). Ce produit « Fire-i remote CCD » est une caméra de vidéosurveillance équipée d'un capteur couleur. Une version noir et blanc n'a été commercialisée qu'à l'été 2009. La nappe d'éloignement sur cette

électronique est d'une longueur équivalente à celle de notre essai, mais elle est dédiée à ce type d'application. De plus, un circuit d'amplification est présent sur le petit circuit imprimé supportant le capteur.

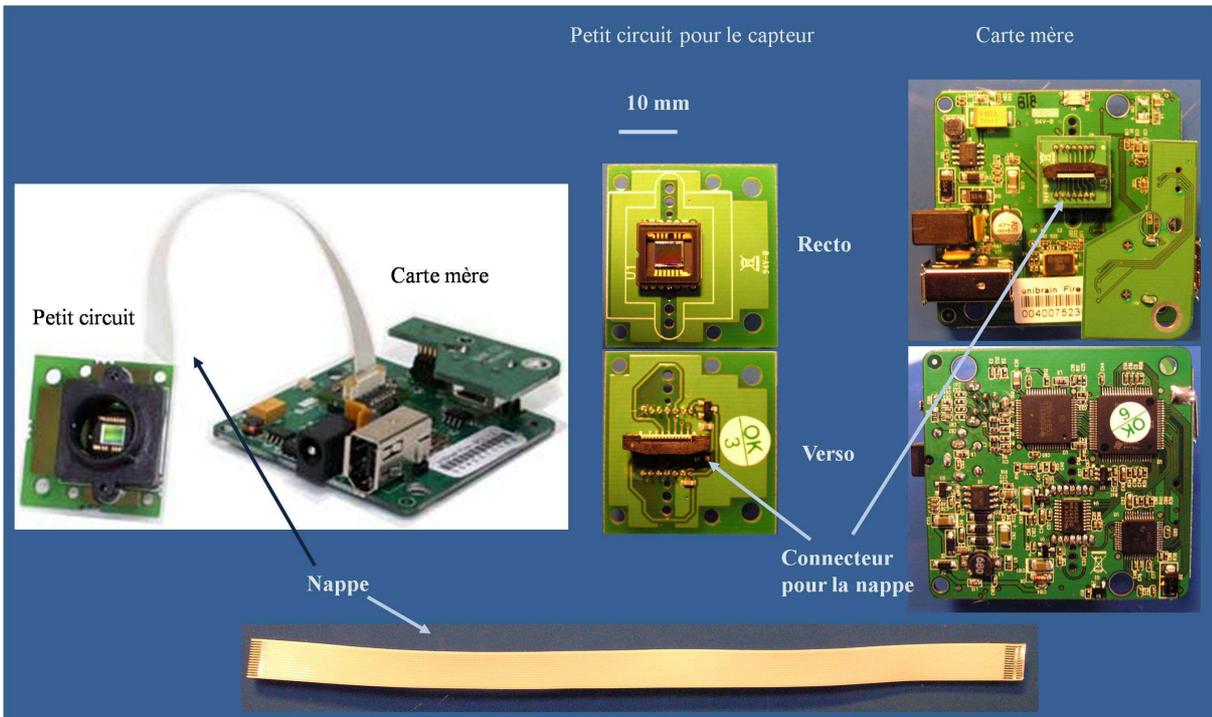


Figure 40- Photos de la caméra Fire-I remote CCD d'Unibrain.

Cette petite carte isolée du reste du circuit a permis de dessouder plus facilement le capteur d'origine sans endommager d'autres composants électroniques. Il a été ensuite possible de souder un support pour changer de capteur, lorsqu'il est endommagé au cours d'expériences. Deux types de support ont été empilés l'un sur l'autre pour enficher et retirer aisément le capteur (Figure 41) : un support dédié au capteur Sony ICX098 fourni par Andon Electronics (Rhode Island, Etats-Unis) et deux barrettes de supports de chez Conrad.

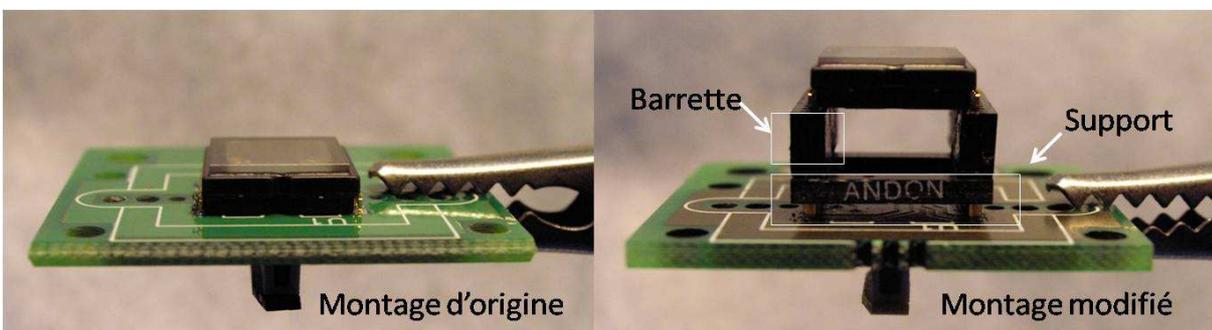
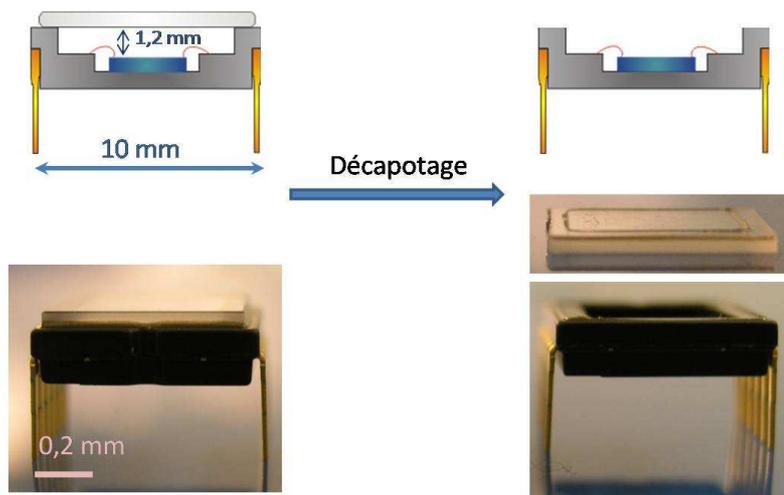


Figure 41- Petit circuit imprimé, de 3 cm de côté, de la caméra à gauche et modifié avec des supports pour le capteur à droite.

3.1.2 Préparation du capteur

3.1.2.1 Suppression de la protection supérieure

L'objectif étant de visualiser la culture cellulaire par imagerie de contact, le premier travail de préparation du capteur a consisté à retirer le capot de verre le protégeant des poussières (Figure 42). Le capot se situe à 1,2 mm au-dessus de la surface sensible du capteur et doit donc être détaché pour pouvoir déposer les cellules directement dessus.



*Figure 42- Schéma de principe du décapotage.
A gauche le capteur est recouvert d'un capot de verre.
A droite le capot a été retiré grâce à un fer à souder.*

Une première méthode pour retirer le capot a été de gratter l'interface entre le capot et le boîtier avec un scalpel. Or, la colle utilisée pour maintenir le capot étant très efficace, le travail s'est avéré fastidieux. Une deuxième méthode a consisté à utiliser une mèche fine sur une perceuse à main (Dremel® Pro mode 780) pour user le boîtier en plastique soutenant le capot. L'usure du plastique produit de nombreuses particules qui s'attachent de manière électrostatique à la surface du capteur et sont ensuite visibles sur les images produites. Comme il est difficile de protéger au préalable cette surface, cette méthode d'usure n'a pas été retenue. Néanmoins, elle s'avère pratique lorsque le capteur est attaché au circuit électronique. Il faut dans ce cas mettre en place une soufflerie au plus près du capteur pour évacuer le maximum de poussières.

La méthode finalement retenue consiste à chauffer le capteur pour décomposer la colle et faciliter la séparation entre le capot de verre et le support en plastique. Il est à noter que cette méthode nécessite d'avoir accès aux capteurs en pièces détachées, c'est-à-dire non soudés à un circuit électronique.

Pour ne pas endommager les pattes du capteur lors de sa manipulation, un support a été usiné (Figure 43). Cette pièce en aluminium permet en outre d'évacuer rapidement la chaleur appliquée sur le boîtier du capteur. Deux outils ont été testés pour chauffer le capot de verre :

- Tout d'abord, un décapeur thermique a permis d'appliquer un souffle d'air chaud. Or le flux de chaleur est difficile à localiser et le verre explose souvent, laissant des poussières de verre et/ou des traces sur le capteur.
- Ensuite, un fer à souder, qui a finalement été retenu, dont la panne est posée à plat sur le capot. Il est utilisé en combinaison avec un scalpel (Figure 43).

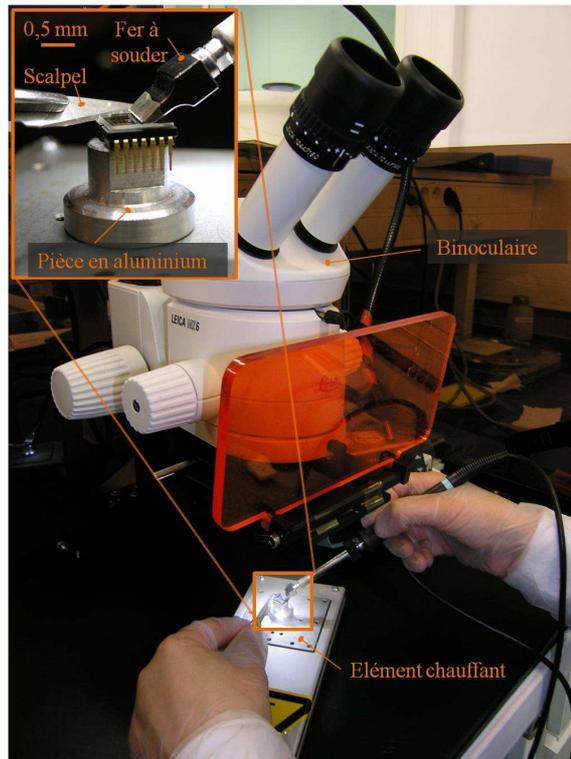


Figure 43- Mise en place du décapotage.

La meilleure configuration se situe lorsque le fer est équipé d'une panne deux fois plus large que le capteur, soit 20 mm, chauffé à 400°C. La chaleur est appliquée jusqu'à ce que la surface entre le verre et le boîtier s'irise légèrement, à l'observation sous la binoculaire. Il est alors possible d'appliquer une légère force de levier avec le scalpel pour étendre cette zone jusqu'à ce que le capot se détache. L'expérience a montré que la méthode est plus efficace si le capteur est chauffé simultanément par-dessous. La pièce en aluminium est donc placée sur une plaque chauffante (TCU4 Dr Tresky AG) à 60-70°C. Le capteur est ainsi décapoté en une dizaine de minutes.

3.1.2.2 Protection des connectiques

La zone sensible du capteur Sony ICX098 ainsi accessible est connectée par 14 fils d'or à des zones d'or plus larges sur le boîtier (Figure 44).

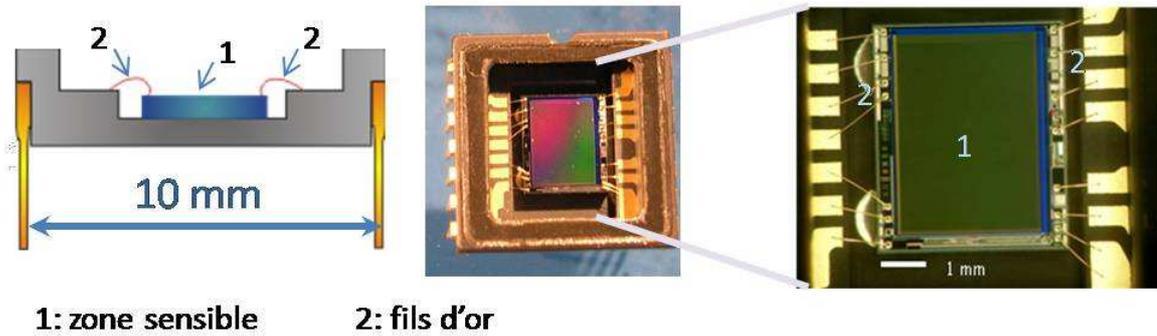


Figure 44- Schéma d'un capteur décapoté et capteur Sony ICX 098 vu du dessus.

Ces connectiques doivent être isolées des solutions de culture cellulaire. En effet, l'alimentation du capteur étant de 15V [104], si l'on met une solution aqueuse sur le capteur, de nombreuses réactions électrochimiques peuvent avoir lieu entre les fils d'or. Par exemple, l'électrolyse de l'eau (solvant du milieu de culture) se produit pour une tension supérieure à une différence de potentiel (d.d.p.) théorique de 1,23V. Cette électrolyse du solvant provoque la formation de bulles qui gênent la prise d'image, et modifie le pH et la composition du milieu. Il a aussi été observé que la durée de vie du capteur était courte dans ces conditions, probablement en raison de courts-circuits.

Pour isoler l'électronique des liquides, différents matériaux et montages ont été testés pour former une chambre. Le premier choix de matériau s'est porté sur le PDMS, pour sa biocompatibilité et la facilité de sa mise en œuvre (cf Introduction). Au laboratoire nous utilisons l'élastomère 184 de Dow Corning Sylgard (Midland, Etats-Unis). Quelques méthodes distinctes ont été testées en utilisant ce matériau. La première a été de rapporter sur la surface une chambre préfabriquée. Des expériences préliminaires à mon travail de thèse ont utilisé cette solution. Une chambre cylindrique a été formée en trouant un film de quelques millimètres d'épaisseur à l'aide d'un emporte pièce (Figure 45). Elle a ensuite été simplement rapportée sur le capteur, et remplie d'une solution aqueuse contenant des microbilles de polystyrène.

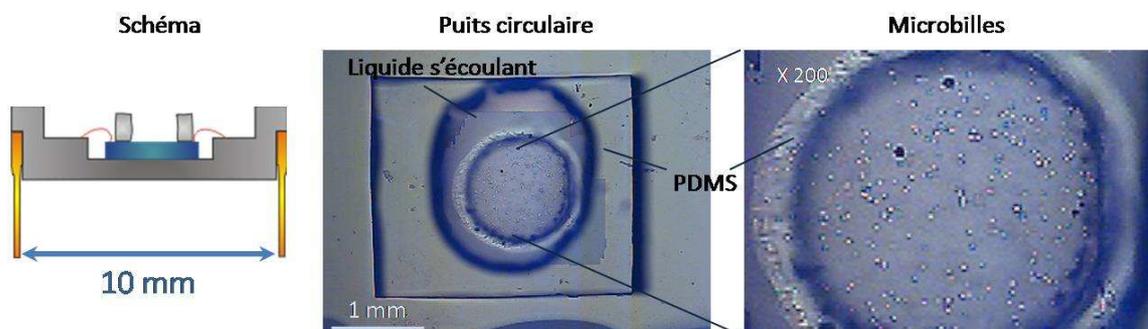


Figure 45- Chambre en PDMS rapportée sur le capteur.

Sur l'image prise par le capteur, les microbilles sont visibles si on réalise un zoom numérique. Elles apparaissent sous la forme d'objets blancs circulaires. Cependant, l'étanchéité entre la chambre et le moule n'est pas assurée et le liquide s'écoule peu à peu sur la surface (puits circulaires, Figure 45). Au début de ma thèse, il avait été envisagé d'améliorer l'adhésion en badigeonnant délicatement les bords de la chambre polymérisée avec de l'élastomère non réticulé, puis de rapporter l'ensemble sur la surface du capteur et enfin de laisser l'élastomère polymériser pour réaliser une jonction étanche. Néanmoins, l'élastomère non réticulé s'écoulait sur toute la surface. Les essais réalisés n'ont pas permis d'avoir une surface de capteur non recouverte par cette « colle ».

La méthode suivante utilisant le PDMS a consisté en la réalisation d'une chambre directement sur le capteur en recouvrant les connectiques d'or (Figure 46). Le PDMS est suffisamment isolant électriquement pour cela. En effet, la fiche technique de l'Elastomer 184 indique une résistivité de $2,9 \cdot 10^{14} \Omega \cdot \text{cm}$ et une tension de claquage de 14 kV/mm.

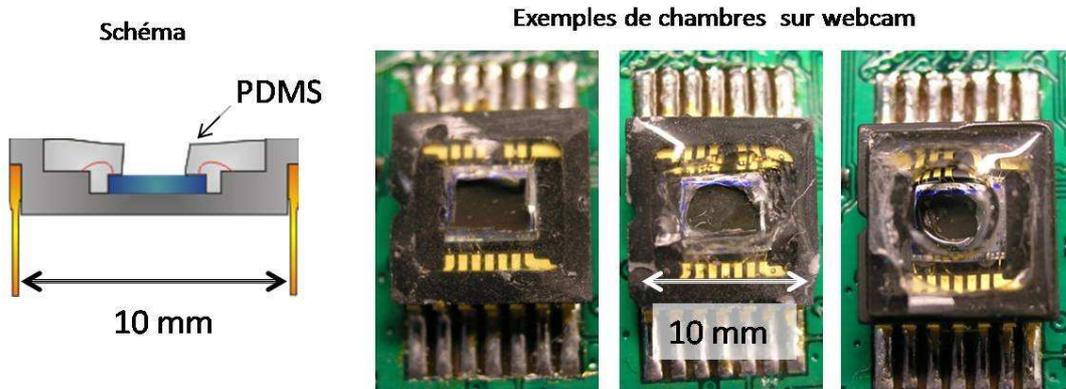


Figure 46-Chambre en PDMS réalisée directement sur le capteur.

Le mélange non polymérisé a été coulé dans le boîtier du capteur pour recouvrir toute la surface du capteur. Une chambre a ensuite pu être réalisée par une découpe délicate à l'aide d'un scalpel. La surface critique était très facilement endommagée par la lame (Figure 47), ce qui arrêta parfois le fonctionnement du capteur. Lors des essais suivants, le PDMS a été coulé autour d'un insert formant une chambre. Différents inserts ont été utilisés : un morceau de pâte Fimo durcie (plastique dur) ou une perle plastique. Les chambres ainsi formées supportent la présence de liquides.

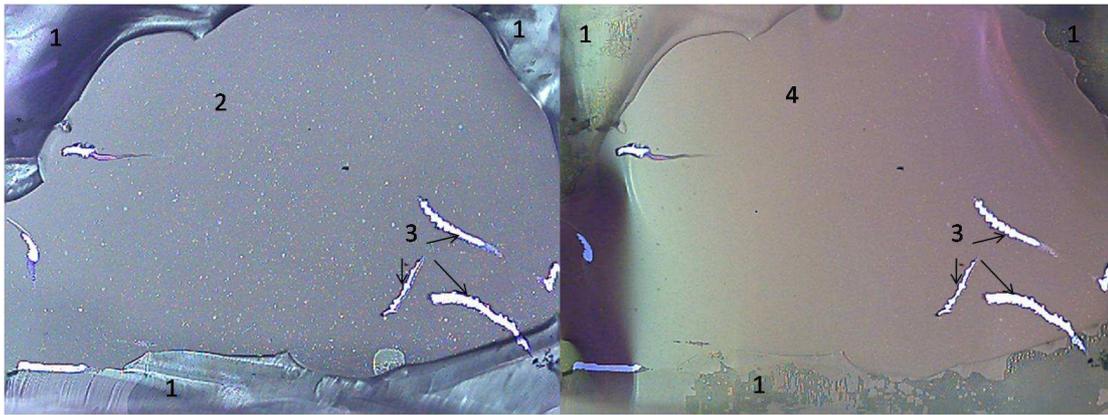


Figure 47- Images vues par le capteur préparé d'une webcam
 1 : bord de la chambre en PDMS, 2 : poussières sur le capteur,
 3 : coup de scalpel, 4 : milieu de culture dans la chambre.

Nos nombreux essais ont été infructueux et ceci de façon très aléatoire : certains capteurs ont fonctionné correctement mais pendant un temps limité, d'autres ont fourni des images recouvertes de lignes verticales et non l'image attendue, ou bien une image noire similaire à celle obtenue en l'absence de capteur. Une explication à ces écueils peut être la viscosité du PDMS. En effet, les connectiques d'or sont reliées au boîtier par simple pression mécanique, et il est probable que les contraintes liées à la réticulation du PDMS dissocient ces fils d'or de leurs attaches et endommagent ainsi le fonctionnement du capteur. Le choix d'un autre type de matériaux a donc été nécessaire. Les photo-résines biocompatibles comme le SU8 ne sont pas envisageables. En effet, après l'insolation, elles nécessitent des solvants pour retirer sélectivement la résine sur la surface. Or, ces solvants endommagent les microlentilles en polystyrène présentes à la surface du capteur (cf. 4.1Caractérisation du système optique). Le choix s'est donc porté vers des matériaux utilisés classiquement par l'industrie des semi-conducteurs pour assurer l'isolation : les glop top.

3.1.2.3 Protection des connectiques par glop top

Un « glop top » est une résine d'encapsulation dispensée sur une puce de silicium, un substrat ou des connectiques pour garantir la stabilité contre des efforts thermiques et mécaniques, et pour protéger les connections électriques. Un glop top se sélectionne non seulement pour ses propriétés d'isolation (thermique, diélectrique,...) mais également pour ses propriétés physico-chimiques (viscosité, thixotropie¹²,...) qui contraignent un mode de dépôt particulier. Par exemple, une colle très fluide pourra être déposée par des aiguilles fines, contrairement à une colle visqueuse. En effet, les glop top se déposent classiquement à l'aide d'un appareil

¹² Il s'agit de la dépendance réversible de la viscosité en fonction de la vitesse imposée au fluide. Par exemple le ketchup est très thixotrope, il ne coule que si vous lui imposez une vitesse, et dans votre assiette il "se tient" de nouveau. En "packaging", les colles thixotropes sont appréciées pour cette capacité de « tenue à vitesse de déformation nulle ».

« applicateur-doseur » (pousse-seringue pneumatique) dont l'aiguille de dépôt est choisie en fonction de la précision souhaitée.

Il est à noter que de nombreuses colles vendues portent l'appellation « biocompatible ». Or, les tests réalisés préalablement et lors de ma thèse ont montré que cette appellation est souvent usurpée. Le choix peut donc être réalisé sur l'ensemble des résines d'encapsulation et non restreint au domaine de celles dites « biocompatibles ».

Pour notre système, un glop top de couleur noire a été sélectionné pour un éventuel fonctionnement en imagerie de fluorescence (Cf. Discussion). La H70E2 (Epotek) a donc été choisie pour ses bonnes capacités d'isolation électrique ($8.10^{12} \Omega.cm$), et le fait qu'elle ne fluoresçait pas *a priori*. La méthode de dépôt par une aiguille est dans notre cas difficile. Cette résine étant visqueuse (9 000 à 15 000 cP), le diamètre des aiguilles est trop grand par rapport à l'écartement de deux fils d'or sur notre capteur (inférieur à 0,5 mm). De plus, comme il n'existe pas de barrière physique pour contraindre la colle dans la zone de choix, la précision souhaitée est difficile à atteindre. C'est pourquoi le dépôt est réalisé avec un fil de fer (fil de test de carte à puce). Une fine goutte de colle est retenue sur le bout du fil et déposée à l'endroit souhaité. L'expérience a montré que le dépôt était plus facile si le capteur était chauffé par-dessous à 60-80°C.

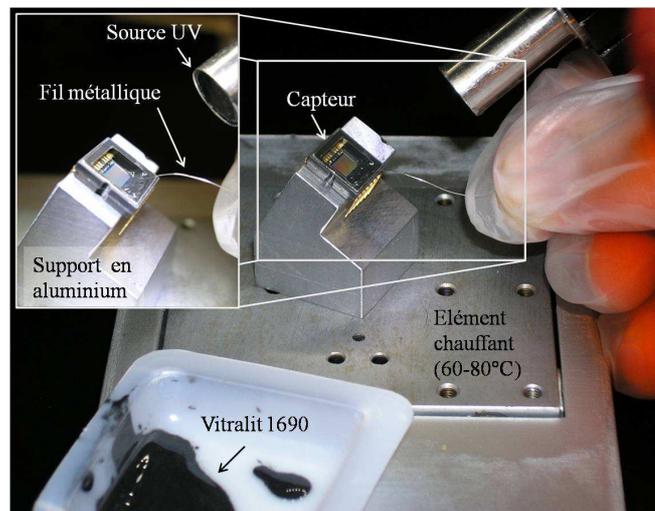
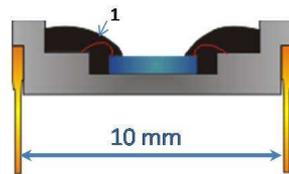


Figure 48- Dépôt de glop top UV activable.

Les essais réalisés avec cette colle ont été concluants en termes d'isolation électrique, mais la colle se répandait sur la partie sensible (thixotropie insuffisante). Une pièce en aluminium a été usinée pour maintenir le capteur incliné et favoriser ainsi l'écoulement de la colle loin de la zone sensible. Finalement, un glop top UV-photoactivable, la Vitralit 1690 (de chez Vitralit), a été sélectionné pour que la zone d'imagerie soit mieux préservée. La colle est déposée par une méthode similaire à la H70E2 sur la partie à protéger, mais son « avancée » sur le capteur est stoppée par une réticulation de 30 secondes aux UV (Figure 48). Enfin, un recuit est effectué pendant 30 min à 105°C.



1: Glop-top comme la vitalit 1690

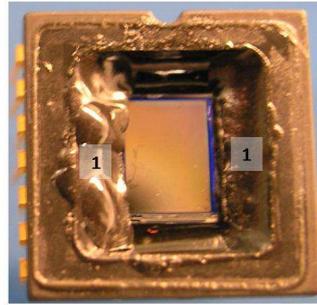


Figure 49- Capteur dont les connectiques sont recouvertes de glop top.

Les connectiques sont ainsi protégées en 70 minutes (30 min de dépôt, 10 min de montée en température du four avec la pièce et 30 min de recuit) et la zone sensible du capteur d'image reste accessible pour accueillir des cellules dans leur milieu de culture (Figure 49). Or, les matériaux en contact avec celles-ci doivent être biocompatibles.

3.1.3 Biocompatibilité des matériaux en contact avec des cellules

L'emploi de l'adjectif « biocompatible » pour un matériau ne peut pas avoir de sens général. En effet, la biocompatibilité se définit pour chaque application spécifique. Ainsi, une prothèse de hanche doit remplacer l'os mécaniquement sans induire trop d'inflammation localement, ou une seringue en plastique doit pouvoir stocker des vaccins avec le minimum d'adsorption de produit actif sur sa surface interne. Dans notre cas, les matériaux choisis pour être en contact avec les cellules ou le milieu cellulaire ne doivent pas être cytotoxiques¹³ ou génotoxiques¹⁴. Un matériau cytotoxique peut se dissoudre ou relarguer une quantité de substances suffisante pour altérer le métabolisme, la viabilité ou la vitesse de prolifération des cellules. De plus, chaque lignée cellulaire répond différemment à la présence d'un matériau donné. Un matériau peut être cytotoxique pour une lignée cellulaire et « biocompatible » pour une autre.

Dans notre cas, pour étudier la biocompatibilité, nous avons vérifié l'innocuité du matériau choisi sur la viabilité et la prolifération des cellules d'intérêt : les RPE1.

Les matériaux que l'on a testés sont :

- L'ensemble formé par le capteur et son boîtier
- Le glop-top d'isolation des connectiques

Les cellules ont été mises en contact avec ces matériaux, puis observées. Les paramètres de cytotoxicité que nous avons suivis sont :

- l'adhésion
- la morphologie
- leur vitesse de prolifération

¹³ Cytotoxique : toxique pour les cellules

¹⁴ Génotoxique : modification au niveau du génome

Biocompatibilité de l'ensemble formé par le capteur et son boîtier

Le capteur et son boîtier étant opaques, un marquage Hoechst/Phalloïdine-FITC a été réalisé pour visualiser l'adhérence des cellules à la surface du capteur (Figure 50).

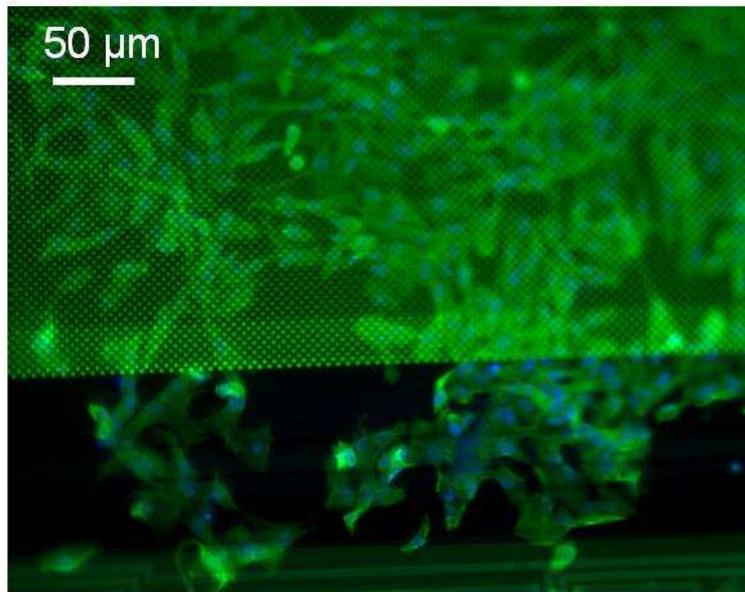


Figure 50- RPE1 marquées au Hoechst (noyaux bleus) et à la Phalloïdine-FITC (actine verte) après 16h de culture sur le capteur.

L'observation directement sur la surface est difficile car elle fluoresce également dans le vert. Néanmoins, après 16h de culture sur le capteur, les cellules possèdent une morphologie correcte. La viabilité des cellules n'est donc probablement pas altérée. De plus, les microlentilles de la surface sont certainement en polystyrène (Cf. Chapitre 4), qui est connu pour être biocompatible. En effet, il s'agit du matériau des boîtes de Petri dédiées à la culture cellulaire. Dans le cadre d'une preuve de concept ces informations nous ont paru suffisantes, mais dans le cadre d'un prototype durable il conviendrait de réaliser d'autres tests plus approfondis.

Biocompatibilité de la colle

Les 2 glop top utilisés ont été testés en présence des RPE1. Le cas de la Vitralit 1690 est détaillé. Le protocole suivant a été suivi (Figure 51) :

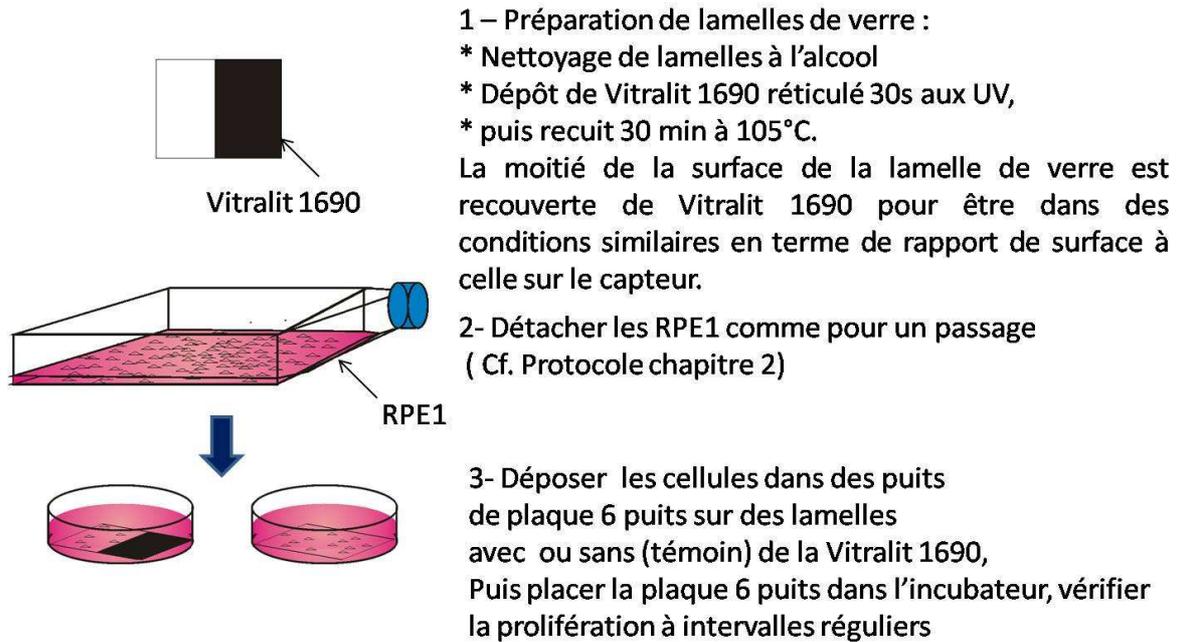


Figure 51- Protocole pour suivre la prolifération de RPE1 en présence de Vitralit 1690.

Les cellules ont été observées sur les lamelles toutes les 24h pendant 3 jours, ce qui correspond à une durée classique d'étude de la prolifération. Les résultats de l'observation sont regroupés sur la Figure 52.

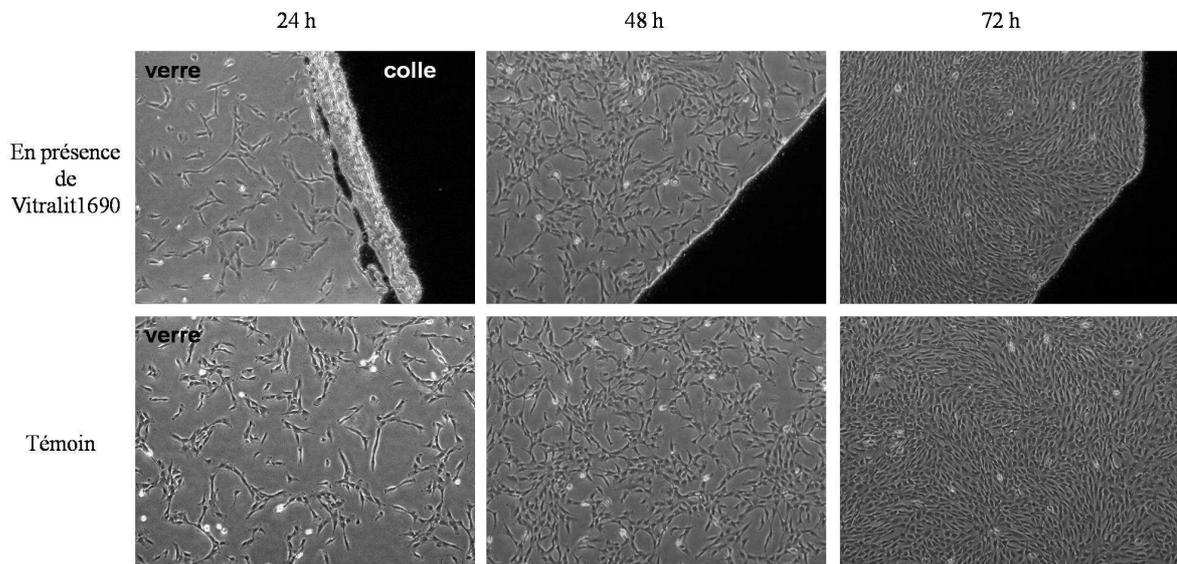


Figure 52- Prolifération de RPE1 en présence de Vitralit 1690, observées avec un microscope en contraste de phase au grossissement 4X.

Les cellules ont adhéré et possèdent une morphologie semblable sur le témoin et en présence de la colle Vitralit 1690. La prolifération est similaire dans le temps : les cellules sont à confluence au bout de 72 h en présence ou non de la colle. Qualitativement, la Vitralit 1690 ne semble donc pas avoir d'effet rédhibitoire sur la viabilité et la prolifération des cellules.

Comme la résine est opaque, il n'est pas possible, de visualiser par contraste de phase si les cellules adhèrent sur sa surface. Un marquage Hoechst du noyau et Phalloïdine-FITC du cytosquelette après 48h de culture a donc été réalisé (Cf. 2.1.4 Marquage fluorescent) pour les observer par fluorescence. Il a alors été constaté que la Vitralit 1690 fluoresce dans le vert comme le FITC, et le marquage Phalloïdine est alors difficilement observable. Par conséquent, seuls les noyaux marqués par le Hoechst sont observés.

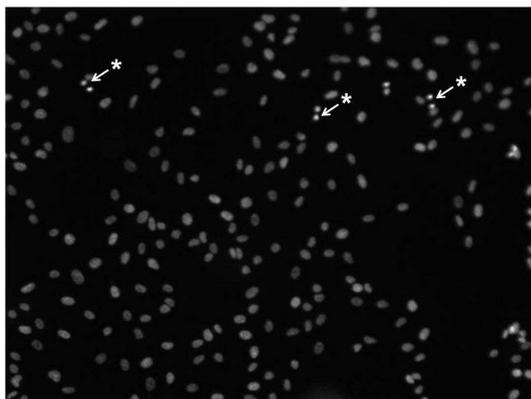
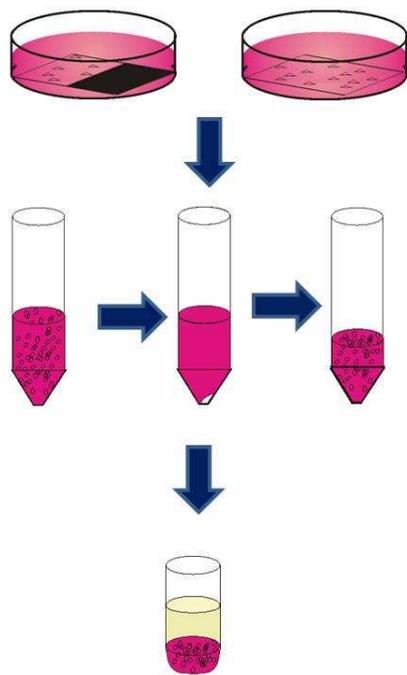


Figure 53- Images de microscopie en fluorescence X10 de noyaux de RPE1 marqués au Hoechst après 48h de culture sur le Vitralit 1690. Les cellules filles en fin de mitose sont indiquées par une étoile.

Comme les noyaux sont présents en grand nombre, les cellules ont bien adhéré à la surface de la Vitralit 1690 (Figure 53). Aucun noyau fragmenté n'a été observé, la colle est *a priori* peu génotoxique. Les noyaux très rapprochés, marqués d'une étoile sur la Figure 53, signifient probablement que les cellules sont en fin de mitose, issues d'une même cellule mère. Des noyaux un peu grumeleux ont également été visualisés, signe de cellules en début de mitose. Ces indications de mitose à la surface de la colle montrent que celle-ci ne gêne ni l'adhésion ni la prolifération. Il s'agit d'un argument de plus en faveur de l'innocuité de la Vitralit 1690.

Pour analyser, en parallèle des observations (Figure 52), une influence précise de la Vitralit 1690 sur la vitesse de prolifération, nous avons compté les cellules grâce à un cytomètre en flux Guava (Guava Easy Cite de Millipore, Etats-Unis). Il existe des kits de marquage spécifiques de la machine utilisée. Les cellules viables et les cellules apoptotiques sont marquées différemment avec le kit Via Count. Le résultat est donc un nombre initial de cellules et un pourcentage de viabilité. Le protocole suivant a été suivi (Figure 54) :



1- Détacher les cellules de chaque puits à l'aide de la trypsine/EDTA (0,6 mL pour chaque puits arrêtée par 1,2 mL de milieu).

2- Pour avoir une concentration suffisante de cellules pour le cytomètre Guava, centrifuger les cellules dans des tubes et les reprendre dans du milieu (100 μ L par exemple).

3- Introduire la suspension cellulaire dans des puits de plaque 96 puits, 10 μ L pour 90 μ L de solution de marquage Via count, incuber 15 min à 37°C avant d'introduire dans le cytomètre Guava.

Figure 54- Protocole pour compter les cellules au cytomètre Guava.

Des triplicats biologiques (3 fois les mêmes conditions de cellules en culture) et des duplicats ou triplicats techniques (2 ou 3 puits similaires de plaque 96 puits) ont été réalisés pour chaque condition (avec ou sans colle) aux temps 0h, 24h, 48h, et 72h. Pour chaque condition, 6 ou 9 mesures ont donc été réalisées. Les vitesses de prolifération des cellules mesurées étaient similaires. Néanmoins, l'écart-type obtenu est très important : de 10 à 50% et pourrait cacher un éventuel effet de la Vitralit 1690. Cet écart-type s'explique par le faible nombre de cellules comptées et par la perte non reproductible de certaines cellules lors de la trypsination et de la centrifugation. A chaque étape des cellules sont perdues. Le résultat reste donc qualitatif. De plus, comme les cellules mortes se détachent et flottent dans le milieu, le rinçage préalable à la trypsination supprime au départ la majorité de ces cellules mortes. Par conséquent, la mesure de viabilité est surtout une mesure de la viabilité pendant le processus de trypsination. Au final, les mesures effectuées au Guava n'apportent pas, dans notre cas, d'information complémentaire par rapport à l'observation au microscope. Cette technique est plus appropriée dans le cas de cellules non adhérentes, car celles-ci ne nécessitent pas d'être trypsinées au préalable.

D'autres tests existent pour mesurer la viabilité des cellules en mesurant la concentration de certains composants intracellulaires. Par exemple, un kit comme le ViaLight permet de mesurer l'ATP intracellulaire c'est-à-dire de mesurer l'activité métabolique des cellules. Les cellules sont lysées, puis mises en contact d'une solution de révélation, enfin la quantité de lumière émise est mesurée par un luminomètre. Les expériences préliminaires utilisant cette méthode n'ont malheureusement pas été concluantes. Il s'agit néanmoins, d'une méthode

éprouvée pour quantifier la cytotoxicité et qui mériterait d'être mise en place dans le cadre d'un prototype final.

Par ailleurs, les tests de clonogénicité, pour vérifier la toxicité sur une longue période de temps, méritent également d'être mentionnés. Les cellules sont exposées au matériau, puis très fortement diluées. Par divisions successives pendant 3 semaines, chaque cellule donne naissance à des « colonies » de cellules (clones de la même cellule de départ). Le nombre et la taille des colonies donnent une bonne indication de l'effet du matériau sur les cellules.

Pour conclure dans le cadre d'une preuve de concept de l'imagerie de contact, la Vitralit 1690 ne présente apparemment pas de toxicité pour la prolifération des RPE1. Cette « biocompatibilité » a été élargie aux autres lignées cellulaires utilisées dans le cadre du projet. En revanche, dans le cadre plus large du développement d'un prototype durable, des tests supplémentaires métaboliques (ATP, glucose,...) ou de clonogénicité devraient être effectués sur de nombreuses lignées cellulaires.

La préparation d'une chambre sur le capteur en isolant les connectiques avec de la Vitralit 1690 est donc suffisante pour permettre la visualisation des cellules sans trop modifier leur métabolisme.

3.1.4 Assemblage du prototype

Le système complet comprend l'électronique, le capteur préparé, une source lumineuse et des pièces mécaniques pour agencer l'ensemble des éléments. L'assemblage final nécessite donc d'une part de choisir une source lumineuse et d'autre part de fixer mécaniquement les différentes pièces.

La source lumineuse est une diode électroluminescente (Light-Emitting diode, LED) émettant dans le spectre visible (Figure 76). Contrairement à une ampoule à filament, la lumière émise par une LED est quasiment dépourvue d'infra rouges et d'ultra violets. Ce spectre d'émission est un avantage pour notre application : l'absence d'infrarouge implique que la lumière de la LED ne chauffe pas ce qu'elle éclaire, et l'absence d'ultraviolet évite l'altération de l'ADN. Pour observer les cellules en transmission, le dispositif a été équipé d'une LED blanche, dont les caractéristiques sont décrites plus en détails dans la partie 4.1. Elle est alimentée par un générateur de 5V dont la puissance est réglée par un potentiostat.

La LED, le circuit électronique et le capteur ont été agencés grâce à des boîtes en plastique. Différents assemblages ont été réalisés au cours de la thèse (Figure 55).

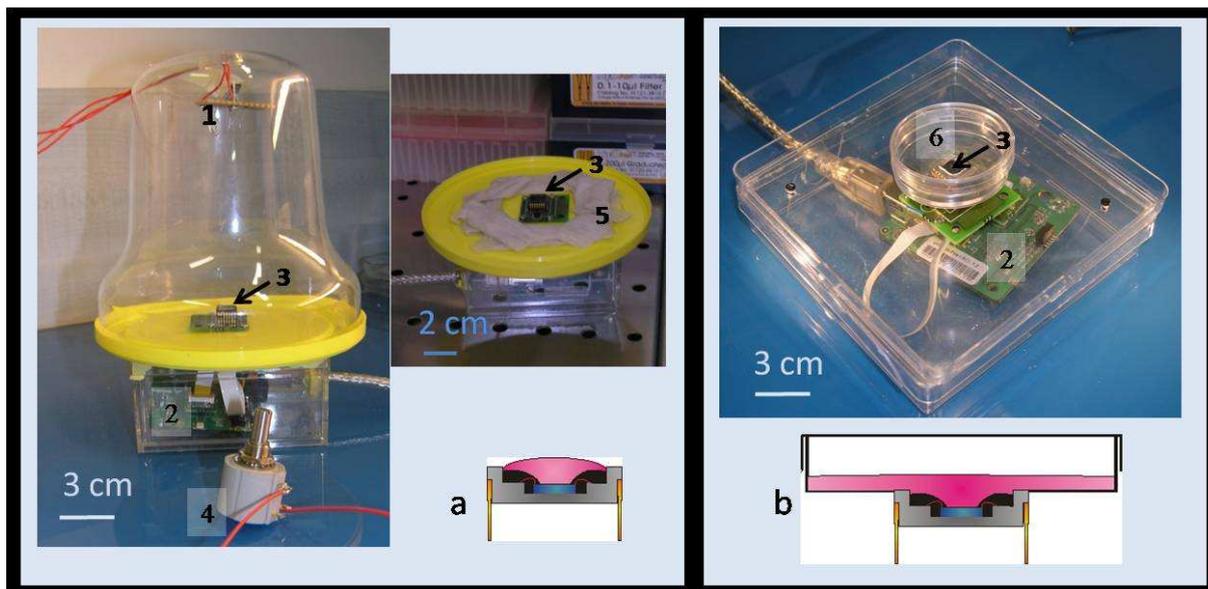


Figure 55- Deux exemples d'assemblages du microsystème.

A gauche dispositif initial. A droite dispositif ultérieur.

1- LED ; 2- Circuit électronique 3- Capteur 4-Potentiostat 5- Papier imbibé d'eau 6-Boîte de Petri
a) milieu cellulaire dans la chambre formée sur le capteur b) milieu cellulaire dans une boîte de Petri.

La boîte supérieure permet d'accrocher la LED, elle a été peinte en noire ou recouverte de papier aluminium avant utilisation, pour limiter les perturbations lumineuses extérieures. Celle retenue pour le prototype final est en plastique noir et mesure 5 cm de haut.

Sur le dispositif initial, 100 μ L de milieu cellulaire peuvent être dispersés dans la chambre formée sur le capteur (Figure 55 a). L'évaporation de ce petit volume est très rapide. Pour la limiter, du papier imbibé d'eau entoure le capteur. Cette solution n'étant pas suffisante, il a finalement été adjoint une boîte de Petri trouée sur le boîtier du capteur pour former un compartiment plus important (Cf. 5.1.2 Adaptation supplémentaire du capteur).

3.2 Visualisation de cellules

3.2.1 Dépôt de cellules directement sur la surface du capteur

Pour observer des cellules adhérentes, les conditions physiologiques doivent être maintenues au minimum le temps nécessaire à leur adhésion et dans l'idéal sur une durée permettant leur prolifération. L'ancrage dure une quinzaine de minutes sur une surface spécialement traitée pour la culture, et jusqu'à une heure sur une surface non modifiée. Comme la biocompatibilité de la surface du capteur a été montrée suffisante pour l'adhésion et la prolifération, celle-ci n'est pas modifiée. Les conditions physiologiques sont assurées pendant plusieurs heures comme décrit au chapitre 5. Les cellules sont détachées de la surface d'une flasque et déposées dans du milieu directement à la surface du capteur.

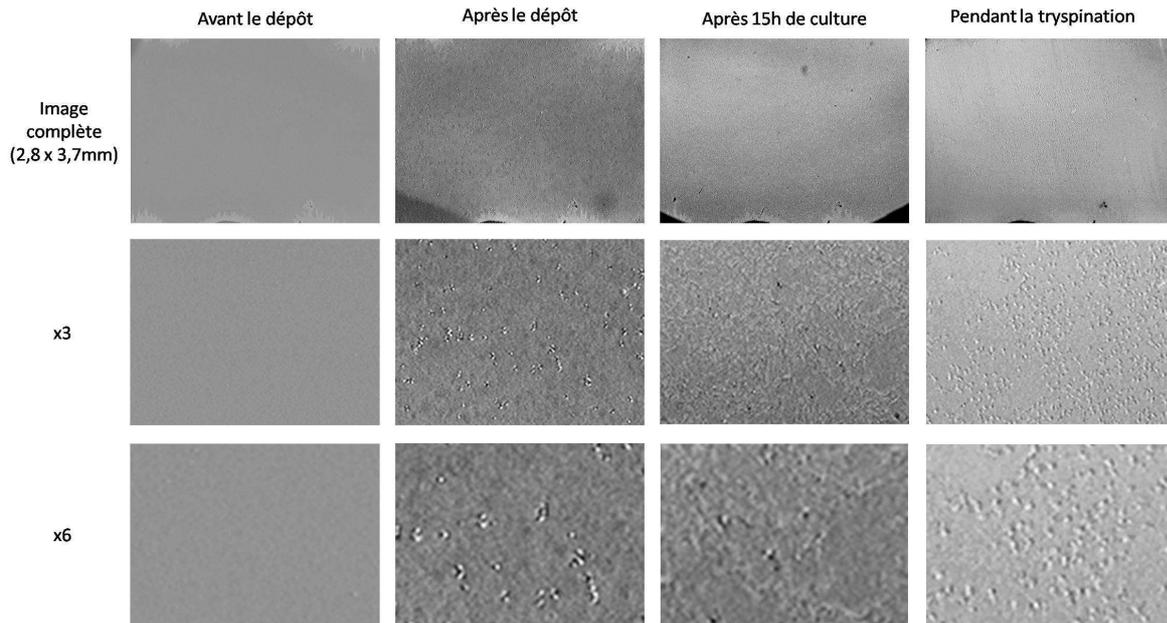


Figure 56- Images obtenues par le capteur de cellules RPE1 déposées directement sur sa surface.

Les images prises à différents instants de l'expérience sont montrées sur la Figure 56. Le contraste et la luminosité ont été modifiés pour accentuer les caractéristiques présentes sur l'image. Lors du dépôt des cellules en suspension, des ronds brillants sont présents sur l'image. Au bout de quelques heures, ces ronds sont plus petits et encore plus brillants. Après un temps suffisant pour l'adhésion (par exemple après 15h), la forme caractéristique des cellules est « discernable ». Si l'on trypsinise les cellules, on retrouve des ronds petits et brillants. Les ronds brillants et les formes distinguées correspondent donc bien à des cellules. Néanmoins, un œil averti est nécessaire pour reconnaître cette forme caractéristique lorsque les cellules sont adhérentes. La comparaison en temps réel avec la visualisation en contraste de phase n'est pas possible car le capteur est opaque. Les cellules doivent être marquées pour être suivies en épifluorescence.

3.2.2 Cellules sur une lamelle de verre

La théorie de l'imagerie de contact indique que si l'on éloigne l'objet de la surface sensible, l'ombre de celui-ci et donc son image serait plus grande [81]. Pour introduire cette distance, une lamelle de verre est insérée dans le montage (Figure 57). Les cellules sont déposées sur celle-ci au fond d'une boîte de Petri. Après adhésion, la lamelle est rapportée sur la surface du capteur pour l'observation.

Cette utilisation présente deux avantages supplémentaires dans le cadre de l'étude de l'imagerie de contact :

- Les conditions physiologiques pour la culture sont assurées de façon classique dans une boîte de Petri et dans une étuve dédiée. Il est à noter dans ce cas, que l'adhésion et l'observation sont découplées, de façon similaire aux conditions

d'entretien classique de culture cellulaire. Les cellules sont donc observées hors de l'étuve et restent en vie le temps nécessaire à l'observation (jusqu'à une vingtaine de minutes). Pour faciliter les changements de lamelle de verre, le compartiment (« boîte de Petri trouée ») n'a pas été ajouté dans ces expériences.

- La comparaison entre la visualisation des cellules par le microsystème d'imagerie et la microscopie classique est facilitée. Les cellules sur la lamelle peuvent être observées dans la boîte de Petri par les techniques traditionnelles (microscope à contraste de phase) puis à la surface du capteur.

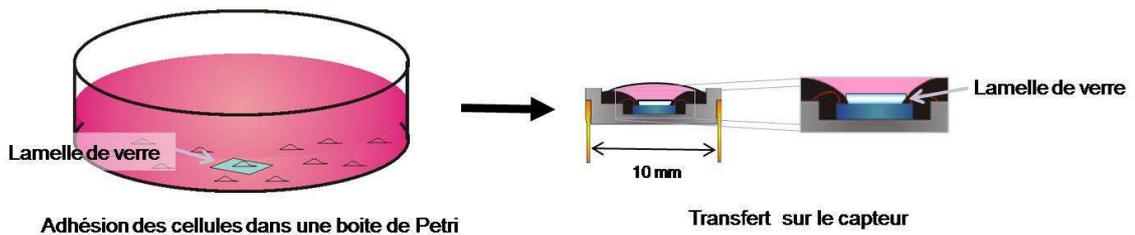


Figure 57- Introduction d'une lamelle de verre pour l'imagerie de contact

Avant l'adhésion des cellules, les lamelles doivent être au préalable découpées aux bonnes dimensions et fonctionnalisées pour favoriser l'adhésion des cellules.

Dimensions de la lamelle de verre

Les dimensions de la lamelle de verre ont été choisies pour qu'elle s'insère dans le boîtier en recouvrant la zone sensible¹⁵, tout en dépassant légèrement cette dernière, afin de faciliter la récupération de la lamelle avec des pinces sans endommager le capteur. La lamelle mesure ainsi 3 mm par 6 mm. Les lames ont été découpées à ces dimensions avec une machine de découpe ADT 7100 (Advanced Dicing Technologies) par Régis Blanc du LETI.

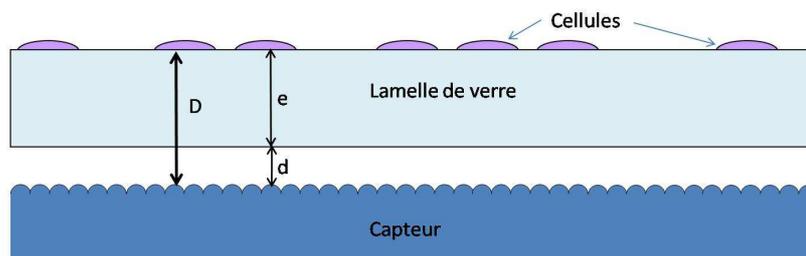


Figure 58- Schéma distance capteur/lamelle/cellule.

En revanche, l'épaisseur de la lamelle a été un paramètre étudié. En effet, lorsque les cellules adhèrent sur une lamelle de verre, la distance D (objet/capteur) peut être modifiée via

¹⁵ La surface de capteur ICX098 mesure 3,5*4,5 mm² et la partie sensible mesure 2,8*3,7 mm²

l'épaisseur e de la lamelle ou via la distance d entre la surface du capteur et la surface inférieure de la lamelle. Cette deuxième solution présente des difficultés de mise en œuvre : le mouvement de la lamelle doit être désolidarisé de celui du capteur, tout en ne gênant pas la prise d'image. La lamelle a donc simplement été posée à la surface, et la distance d a été considérée comme négligeable.

Le verre utilisé provient majoritairement de la gamme D263T de Schott (Allemagne). Il s'agit de lamelles de verre très fines. La gamme des épaisseurs testées est donnée ci-dessous (Figure 59) :

Nature de la lamelle	Epaisseur (μm)								
	50	70	100		175	210	300		
plaque de verre (D263T Schott)									
lamelle couvre-objet (D263M Schott distribué par Knittel Gläser)				150					
Quartz (Mondia Quartz, Versoud)								500	
lame de microscope (Slides Ground edges, CETI)									1000

Figure 59- Gamme des lamelles utilisées.

Traitement de surface de la lamelle de verre

Sur les lamelles de faible épaisseur, il a été remarqué que les cellules adhéraient des deux côtés de la lamelle. Or, pour étudier l'influence de la distance entre l'objet et la surface, il est préférable que les cellules adhèrent uniquement du côté supérieur de la lamelle. Différents traitements de surface ont été employés pour cela et sont décrits dans la Figure 60.

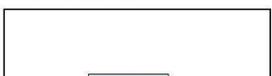
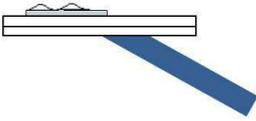
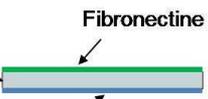
Méthode 1	Méthode 2	Méthode 3
1- Nettoyage des lamelles à l'éthanol		
2- plasma oxygène de 30s à 30W.		
<p>3- dépôt de la lamelle sur une goutte de 2 μL de PLL-PEG (0,1 mg/mL)</p>  <p>4- 30 min d'attente</p> 	<p>3- Une solution de PLL-PEG (0,1 mg/mL) est déposée sur plusieurs lamelles pendant 30 min</p>  <p>4- Les lamelles séchées sont exposées sur une lame de verre à 5 min d'UV-ozone pour détruire le PLL-PEG sur une des faces</p> 	<p>3- Les cellules sont déposées sur la lamelle au fond d'une boîte de Pétri</p> 
<p>5- La lamelle retournée est déposée sur une goutte de 2 μL de Fibronectine (10 μg/mL).</p>  <p>6- 30 min d'attente</p> 	<p>5- Une solution de Fibronectine (10 μg/mL) est déposée sur plusieurs lamelles pendant 30 min</p> 	
<p>Lamelle de verre</p>  <p>Fibronectine</p> <p>Poly-L-lysine PEG</p>	<p>La lamelle est ainsi fonctionnalisée recto et verso. Elle est rincée dans du PBS avant d'être introduite dans une boîte de Pétri pour l'adhésion des cellules.</p>	<p>4- Le « verso » de la lamelle est frottée sur un racloir à cellules pour enlever celles ayant adhéré du « mauvais » côté.</p>
 <p>Les cellules ne sont présentes que d'un seul côté de la lamelle.</p>		

Figure 60- Protocoles de fonctionnalisation de la lamelle de verre.

Les 2 premières méthodes sont dérivées des techniques de fonctionnalisation de surface décrites dans le paragraphe 2.1.3. La fibronectine est utilisée pour favoriser l'adhésion et le PLL-PEG pour l'empêcher. La première méthode (Figure 60) n'utilise que des petites gouttes de produits, qui sèchent rapidement. Elle nécessite une certaine agilité pour retourner la lamelle et éviter de « perdre » la bonne face. Les lamelles de faible épaisseur adhèrent fortement à la boîte de Petri et il n'est pas facile de les détacher sans les briser. La deuxième solution consiste à traiter simultanément les deux faces, et à tirer avantage du traitement PLL-PEG. En effet, celui-ci empêche la fonctionnalisation par la fibronectine, mais est facilement détruit par un traitement UV/Ozone. Cette méthode nécessite de traiter simultanément de nombreuses lamelles pour éviter de gaspiller la solution de fibronectine, qui a un coût élevé. La troisième solution est la plus simple à mettre en place et repose sur une simple action mécanique et non sur une fonctionnalisation préalable des surfaces.

La perte de lamelles par manipulation est similaire dans les 3 cas. Les trois méthodes ont été utilisées indifféremment pour les cellules qui adhèrent facilement (ex : RPE1, HeLa). Pour les cellules plus fragiles (ex : 16hBE, C2C12), les 2 premières méthodes sont préférables.

3.2.2.1 Images de cellules

Le contraste et la luminosité de toutes les images fournies par le capteur sont modifiés pour accentuer la lisibilité. Le capteur enregistre sur l'ensemble de la surface sensible soit 2,8 x 3,7 mm qui correspond aux 640 x 480 pixels de l'image.

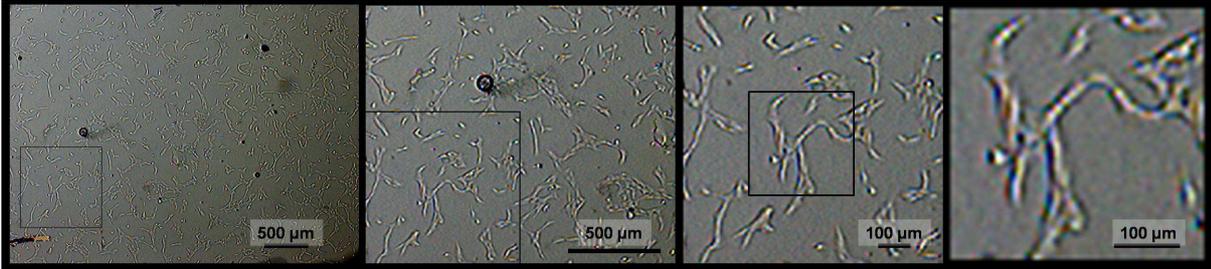


Figure 61- Image fournie par le capteur de RPE1 sur une lamelle de verre de 175 µm
De gauche à droite, série de zooms numériques.

Environ 600 cellules sont visibles sur l'image complète (Figure 61). Les cellules sont à faible confluence. Un zoom numérique permet de visualiser quelques cellules. La morphologie allongée caractéristique des RPE1 est clairement observée. Pour plus de lisibilité, les résultats suivants sont montrés sur des images où un zoom numérique a été réalisé.

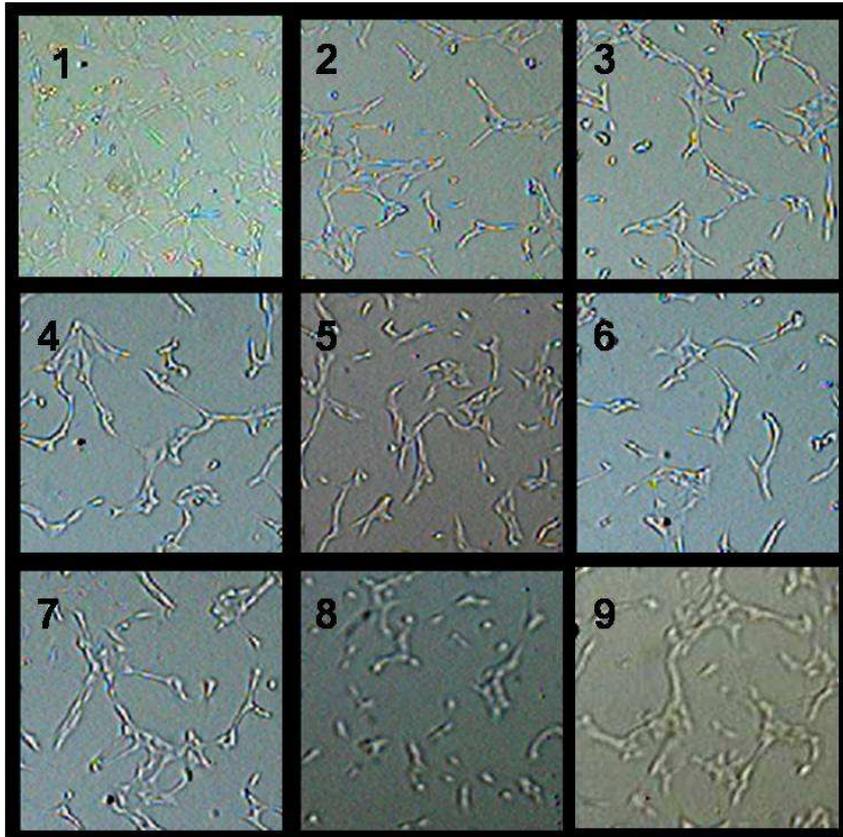


Figure 62- Zoom numérique d'images par le capteur de RPE1 (le carré fait 800 µm de côté)
avec une lamelle de :

1 : 50 µm, 2 : 70 µm, 3 : 100 µm, 4 : 150 µm, 5 : 175 µm, 6 : 200 µm, 7 : 300 µm, 8 : 525 µm, 9 : 1000 µm

La variation d'épaisseur des lamelles a un effet sur la visualisation des RPE1 sur l'image. Une impression de grandissement se dégage le long de la gamme des épaisseurs : de 50 μm , où les cellules apparaissent très petites, jusqu'à 1 mm où elles apparaissent plus grosses et floues. L'observation visuelle est satisfaisante entre 100 et 300 μm : les cellules sont clairement reconnaissables et le contraste est agréable. Les lamelles de 175 μm étant faciles à manipuler, pour la suite cette épaisseur a été considérée comme un optimum (Figure 62).

Morphologie cellulaire

Différentes lignées cellulaires ont été testées pour vérifier que notre système permet de bien distinguer des morphologies cellulaires différentes, et si l'optimum observé pour les RPE1 était différent selon les lignées cellulaires.

Le tableau suivant réunit les différentes lignées testées :

Nom	Type cellulaire	Motif d'utilisation
RPE1	Cellules humaines épithéliales de rétine d'œil	Lignée adhérent bien et s'étalant beaucoup. Cellules les plus "grandes" du laboratoire
HeLa	Fibroblastes humains issues d'un adénocarcinome	Lignée classique pour valider un microsystème pour les cellules
16HBE	Cellules humaines épithéliales de bronches	Lignée dont les cellules se regroupent en "alvéoles", pour tester si le microsystème peut distinguer les cellules dans une même alvéole

Le même effet a été observé avec toutes les lignées : les cellules apparaissent peu visibles à de faibles épaisseur de lamelles, puis contrastées pour des épaisseurs de 150 à 300 μm et enfin floues au-delà de 500 μm . Nous avons ainsi validé un optimum de visualisation et de manipulation pour une épaisseur de 175 μm .

Pour compléter l'étude de morphologie, les C2C12, lignée de myoblastes de souris qui peuvent se différencier en culture en myotubes, ont également été observées (uniquement avec cet optimum de 175 μm d'épaisseur). La différenciation nécessitant des cellules à confluence, nous avons souhaité vérifier si nous pouvions distinguer des cellules individuelles dans un tapis cellulaire à confluence avant d'observer dans le temps une différenciation.

Sur les images de différentes lignées cellulaires fournies par le capteur, la morphologie caractéristique apparaît clairement (Figure 63) :

- les formes légèrement triangulaires des HeLa,
- les cellules en « alvéoles » des 16HBE,
- les cellules peuvent être distinguées dans le tapis de C2C12 à confluence.

Notre microsystème permet donc de distinguer des morphologies cellulaires différentes. En revanche, sur toutes ces images aucune organelle, telle que le noyau, n'est observée.

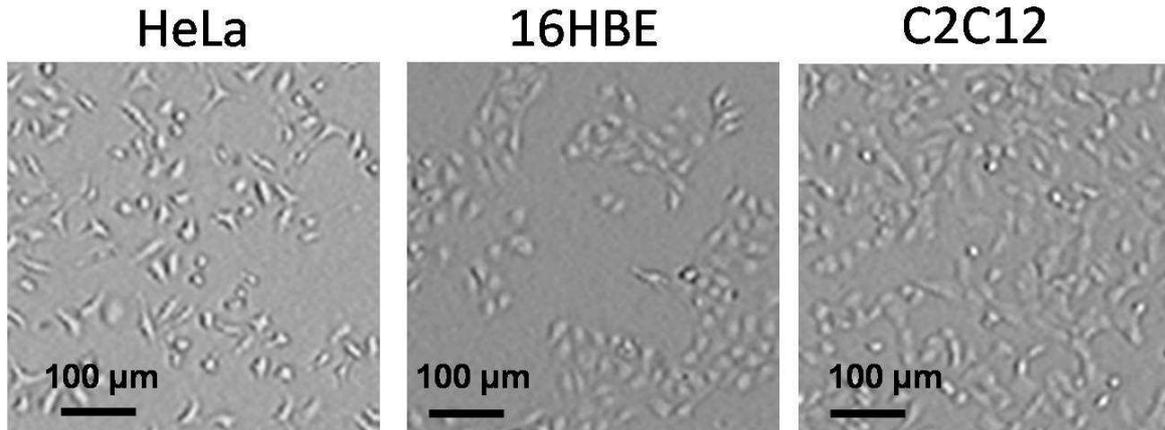


Figure 63- Zooms numériques d'images fournies par le capteur de différentes lignées cellulaires sur des lamelles de verre de 175 µm d'épaisseur.

Comparaison avec la microscopie classique à l'optimum

Pour vérifier les performances de notre système, nous avons comparé nos images de cellules adhérentes à celles de microscopes classiques en lumière blanche. Deux types de comparaisons peuvent être réalisés : « technique » ou « fonctionnelle ».

Les images obtenues ressemblent à des images formées par un microscope à transmission (microscope à contraste de phase, dont le diaphragme annulaire a été supprimé). L'image se forme ainsi, au premier abord, de façon similaire à celle d'une microscopie par transmission, ce qui permet de réaliser une comparaison « technique » entre les deux systèmes d'imagerie (Figure 64). La morphologie des cellules est observée par les deux outils d'imagerie.

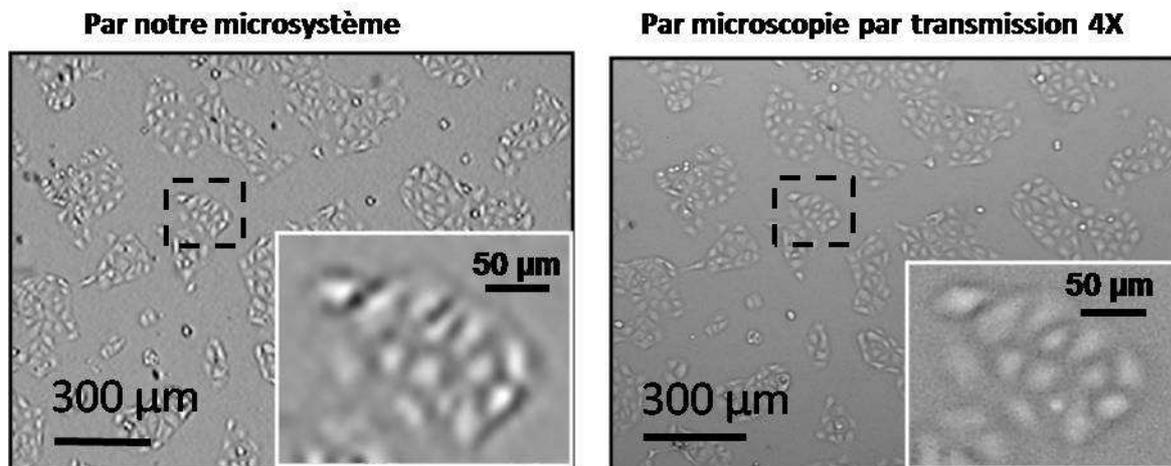


Figure 64 – Comparaison « technique » d'images de 16HBE sur une lamelle de 175 µm d'épaisseur.

Le contraste et la luminosité des deux images ont été fortement modifiés pour l'impression. Ces paramètres sont donc peu comparables. Il est à noter que l'image par transmission varie fortement en fonction du positionnement en z de l'échantillon cellulaire par rapport à

l'objectif du microscope. L'image de la Figure 64 a donc été choisie pour sa ressemblance avec l'image de notre système.

Notre microdispositif image des cellules adhérentes sans marquage. Or, cette fonction est classiquement réalisée avec un microscope à contraste de phase.

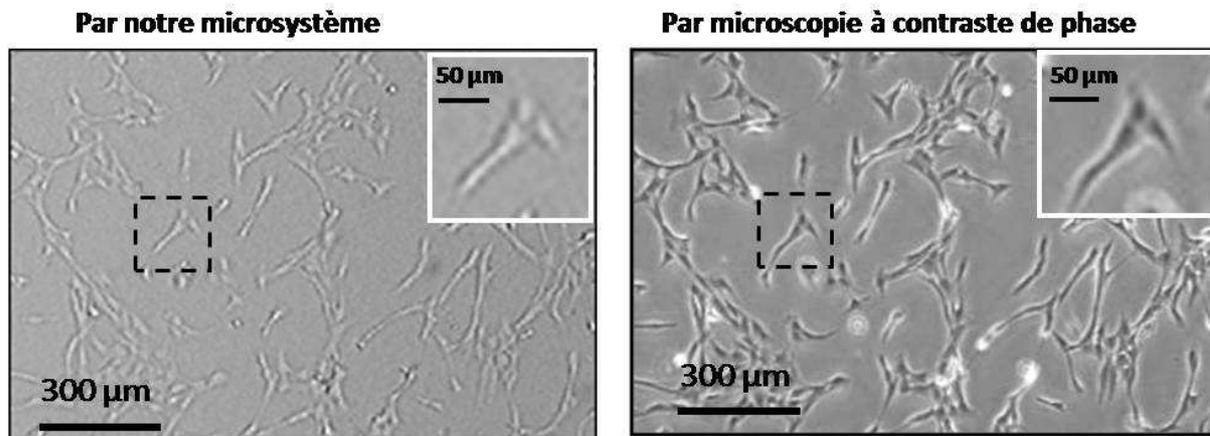


Figure 65- Comparaison « fonctionnelle » d'images de RPE1 sur une lamelle de 175 µm d'épaisseur.

Les informations de morphologie et de positionnement fournies par notre système sont similaires à celles fournies par un microscope à contraste de phase (Figure 65) : la forme allongée et la disposition des cellules dans la population sont semblables. Néanmoins, le contraste de l'image par microscopie à contraste de phase, est bien meilleur : les cellules apparaissent noires entourées d'un halo blanc, alors que sur l'image fournie par notre microsystème, elles apparaissent blanches avec un léger contour blanc.

Par ailleurs, le microscope par transmission ou le microscope à contraste de phase permettent d'imager un nombre de cellules inférieur à notre microsystème. Pour pouvoir comparer toute la zone imagée par notre dispositif, il est nécessaire de réaliser plusieurs images avec le microscope. La surface observée est plus importante avec notre dispositif. En revanche, la résolution (*i.e.* le nombre de points pour définir un contour cellulaire) est clairement plus petit avec notre dispositif qu'avec l'objectif 4X d'un microscope.

Un prototype de visualisation de cellules adhérentes par imagerie de contact a été conçu et assemblé. Le capteur a été conditionné pour supporter les liquides à l'aide de matériaux suffisamment biocompatibles pour les cellules utilisées. Les cellules ont été visualisées et l'effet de la distance objet/surface sensible a été étudié expérimentalement. Les cellules apparaissent sur les images peu visibles à de faibles épaisseurs de lamelle, puis contrastées sur des épaisseurs de 150 à 300 μm et enfin floues au-delà de 500 μm . L'augmentation de la distance entre les cellules et le capteur donne une impression de grandissement et de dégradation de la « netteté ». Un optimum pour l'observation visuelle a été trouvé pour une lamelle de verre d'épaisseur 175 μm . La morphologie des cellules est similaire à celle attendue et visualisée par un microscope.

Dans le prochain chapitre, nous souhaitons confirmer de façon plus théorique ces observations. Pour cela, nous cherchons à mieux comprendre le mécanisme de formation de l'image.

4 Appréhension du mécanisme de formation d'image

L'objectif de ce chapitre est de comprendre le mécanisme de formation de l'image par notre microsystème d'imagerie de contact.

Au préalable, il a été nécessaire de bien caractériser les différents éléments du système optique :

- * la microstructure du capteur,*
- * la forme et les indices de la lamelle, des cellules, et du milieu de culture dans la chambre*
- * l'éclairage de la LED.*

A l'aide de ces données et d'une bonne connaissance des images fournies par le capteur, il est ensuite possible de s'inscrire dans un cadre théorique pour proposer un mode de formation de l'image par le microsystème.

4.1 Caractérisation du système optique

Les éléments à déterminer du système optique sont pour chacun de ses constituants leurs dimensions et leur indice de réfraction.

4.1.1 Structure du capteur

4.1.1.1 Matrice de pixels

La constitution classique d'un capteur d'image est connue et rappelée dans la partie 2.2 « Généralités sur les technologies de capteur d'image ». Les données de la fiche technique du capteur Sony ICX098 [104] sont facilement vérifiables par une visualisation à l'aide d'un microscope optique (Figure 66). Il est possible de vérifier que :

- la puce mesure 4,6 mm par 3,97 mm
- un pixel mesure 5,6 μm de côté
- le capteur est équipé d'un filtre RGB
- la zone sensible est plus petite que le capteur, la fiche technique indique 494 par 659 pixels. Cette zone apparaît plus foncée au microscope que les pixels qui n'imagent pas (« optical black » sur la fiche technique). L'image fournie de 480 par 640 pixels affichable à l'écran a donc subi un pré-traitement.

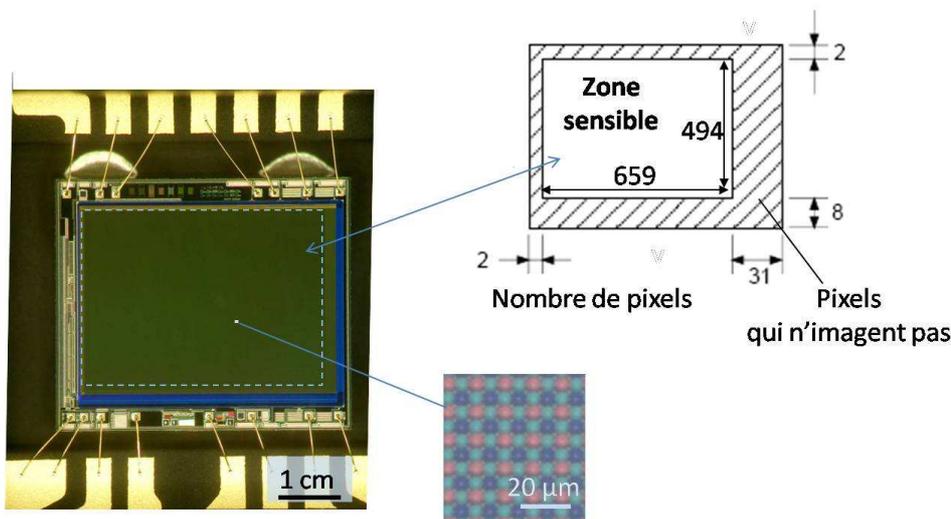


Figure 66- Image du capteur par un microscope et comparaison à un schéma de la fiche technique [104].

Néanmoins, de nombreuses données telles que la forme des microlentilles ou la taille de la zone photosensible ne sont pas indiquées. Pour les déterminer, nous avons employé différents outils de microscopie.

4.1.1.2 Microlentilles

Forme des microlentilles

Différentes techniques ont été testées sans succès pour déterminer la forme des microlentilles :

- Les méthodes optiques

Le microscope confocal ou l'interféromètre sont parfois utilisés pour caractériser des microstructures transparentes. Dans le cas de notre capteur, ces techniques ne sont pas adaptées, car d'une part le silicium sous-jacent réfléchit trop la lumière (confocal COTEC), et d'autre part l'angle des microlentilles par rapport à leur base est trop important pour l'interférométrie (MicroMap de ATOS GmbH, Allemagne ; limite indiquée par le constructeur d'un angle de 45°).

- Les méthodes de microscopie de surface à sonde

Il s'agit de techniques qui consistent à balayer la surface avec une pointe et la variation de mouvement vertical est reliée à la topographie. Le profilomètre ou le microscope à force atomique (AFM) classique ne conviennent pas. En effet, le profilomètre est un instrument intéressant pour des dimensions de l'ordre de quelques microns, mais la vitesse de balayage minimale (1 μ m/s) de l'appareil testé (Stylus Profiler de Ambios technology) n'a pas permis d'observer la forme des microlentilles. Dans le cas de l'AFM PicoPlus de Molecular Imaging, le rapport d'aspect des bords des microlentilles (*i.e.* le rapport hauteur sur largeur du creux entre deux microlentilles) était trop important pour que la pointe de l'AFM puisse pénétrer entre 2 microlentilles.

Pour observer la courbe des microlentilles, il a finalement été utilisé un AFM équipé d'une pointe spéciale pour les rapports d'aspect importants (ou High Aspect Ratio, HAR). Les mesures ont été réalisées par Roselyne Templier du LETI sur l'AFM 3100A de Veeco équipé d'une pointe AR5-NCHR-20 en mode dit « tapping » (la pointe tapote la surface et ce sont les changements de fréquence dû à la topographie qui sont enregistrés).

Les microlentilles ont une forme carrée avec des angles arrondis (Figure 67). Le pas mesuré est de 5,47 μ m, ce qui est comparable à la taille théorique de 5,6 μ m. Leur profil en z est arrondi. La hauteur mesurée varie en fonction des points de mesure entre 1,77 et 1,99 μ m (Figure 67). La médiane des mesures effectuées se situe à 1,91 μ m. Le rayon de courbure est estimé à 3 μ m par adéquation avec le cercle osculateur.

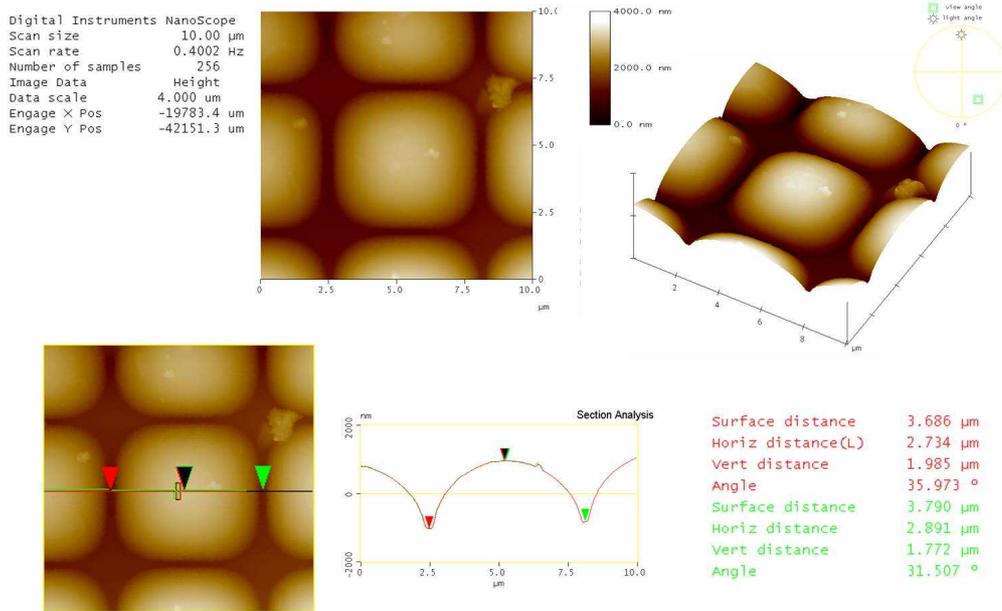


Figure 67- Image AFM des microlentilles sur la surface du capteur et analyses associées (vue 3D, vue en coupe).

Détermination de l'indice de réfraction des microlentilles

Les matériaux classiquement utilisés pour former des microlentilles sont le polystyrène et le polyimide.[110]. Pour déterminer l'indice des microlentilles, la surface du capteur a été immergée dans un milieu d'indice similaire.

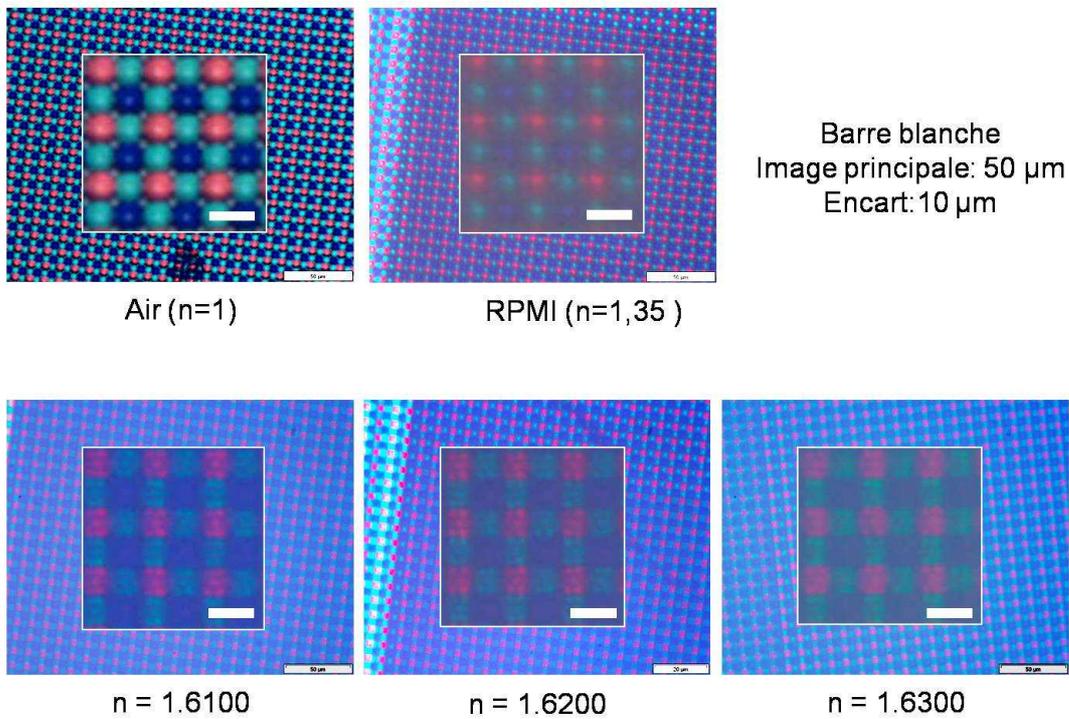


Figure 68- Images de la surface du capteur par un microscope optique équipé d'un objectif X100.

En effet, en considérant la loi de la réfraction :

$$n_1 \sin i_1 = n_2 \sin i_2$$

si à l'interface huile/surface de la microlentille n_1 égale n_2 , la lumière n'y sera pas réfractée. Le contour de la microlentille va ainsi « disparaître » et la structure sous jacente sera observée. Des observations au microscope optique avec des huiles de différents indices connus (Certified refractive index liquids. Série A, de chez Cargille Labs) ont été réalisées avec Stéphanie Bigault, chercheuse au LETI (Figure 68). Entre 2 observations, la surface a été nettoyée à l'eau tiède savonneuse.

Dans l'air ($n=1$), la forme arrondie des microlentilles est clairement visible sur l'image (Figure 68). Dans le milieu de culture RPMI ($n=1,35$), la forme ronde est un peu moins distinguable. Enfin, dans les huiles d'indice de $n=1,61$ à $n=1,63$, les microlentilles ne sont plus discernables. Le pavage du filtre de Bayer est clairement visible. L'indice de réfraction des microlentilles est ainsi d'environ 1,62, ce qui est cohérent avec l'indice du polystyrène classiquement utilisé pour les fabriquer [106]. Il s'agit donc d'une information en faveur de microlentilles en polystyrène.

Stabilité thermique des microlentilles

Comme les microlentilles sont très probablement en polystyrène, la température de réticulation de 105°C de la Vitralit 1690 peut les déformer. En effet, la gamme de température de transition vitreuse pour la famille des polystyrènes est de 100 à 115 °C [107, 108]. Pour savoir si ce recuit a effectivement un effet sur les microlentilles de notre capteur, des mesures ont été effectuées en AFM-HAR sur 2 capteurs après un passage dans l'étuve respectivement :

- d'une heure et demie pour être dans les conditions similaires à la réticulation de la Vitralit 1690 soit 2*45 min à 105 °C (15 min de montée en température de l'étuve suivi de 30 min de recuit et cela pour chaque côté isolé du boîtier),
- de trois heures pour accentuer une éventuelle tendance et pouvoir mieux l'observer.

Les hauteurs et la forme des microlentilles ont été mesurées à l'aide du logiciel WSxM de Nanotec [109]. Les hauteurs et la forme sont similaires dans les 3 cas soit environ 1,9 µm de hauteur et 3 µm de rayon de courbure. La rugosité mesurée par le logiciel d'acquisition est du même ordre de grandeur dans les 3 cas : 283,47 nm rms sans recuit, de 249,7 nm rms après 1h30 de recuit, de 282,9 nm rms après 3h de recuit. L'effet du recuit est donc *a priori* négligeable.

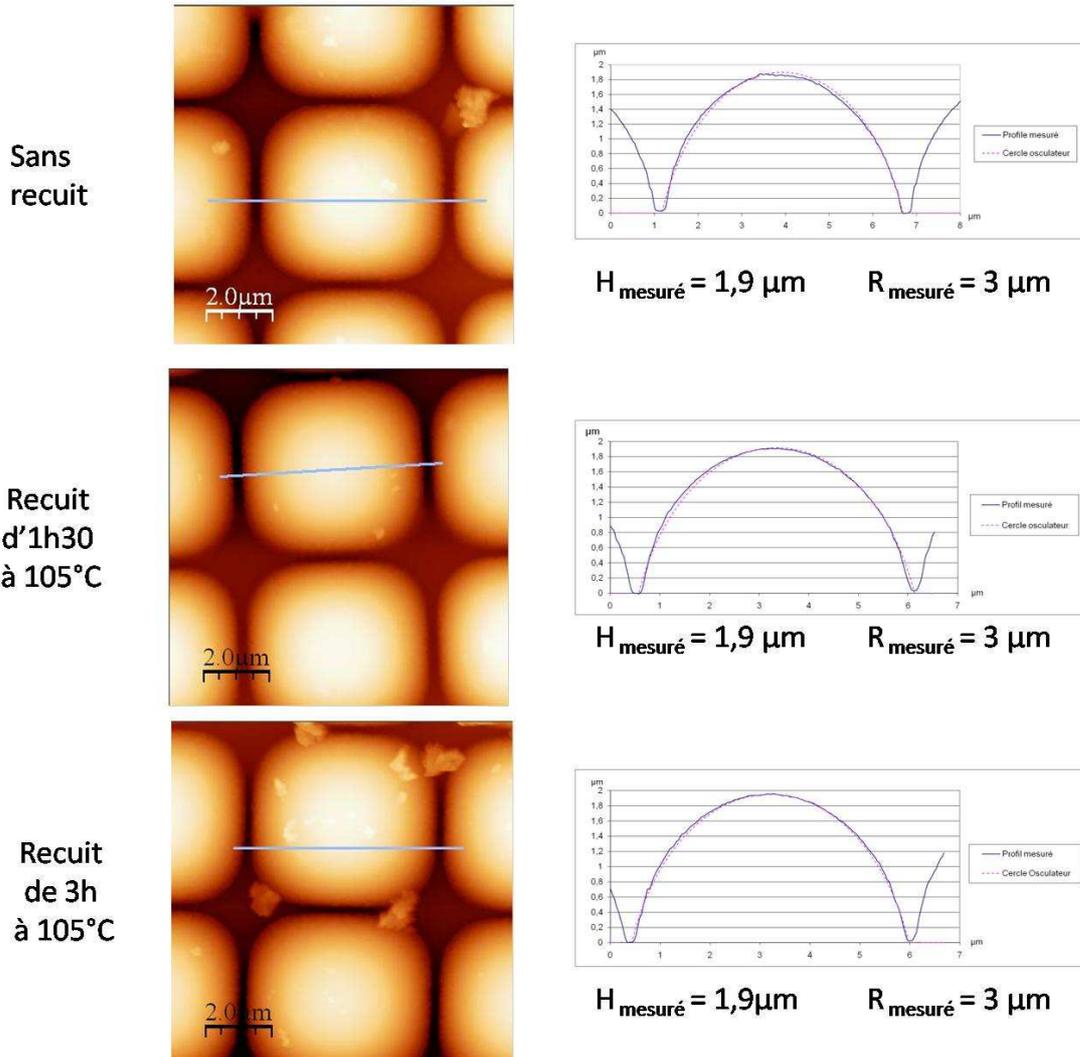


Figure 69- Caractérisation en AFM-HAR de la forme des micro-lentilles après différents temps de recuit à 105 °C.

Comme le balayage de la surface de quelques micro-lentilles par la pointe AFM dure une quinzaine de minutes, il n'a été possible de visualiser que quelques micro-lentilles par capteur. Les résultats sont similaires sur les zones imagées (2 ou 3 pour chaque cas) sauf pour les micro-lentilles à 3h de recuit. Sur une des trois zones étudiées, une micro-lentille présente une déformation sous forme de facettes (Figure 70). Il est difficile de dire si ce cas est fréquemment rencontré à la surface. Nous ne savons pas si ce profil en facettes a été causé par le procédé de recuit ou était dû à un défaut de fabrication initiale [106].

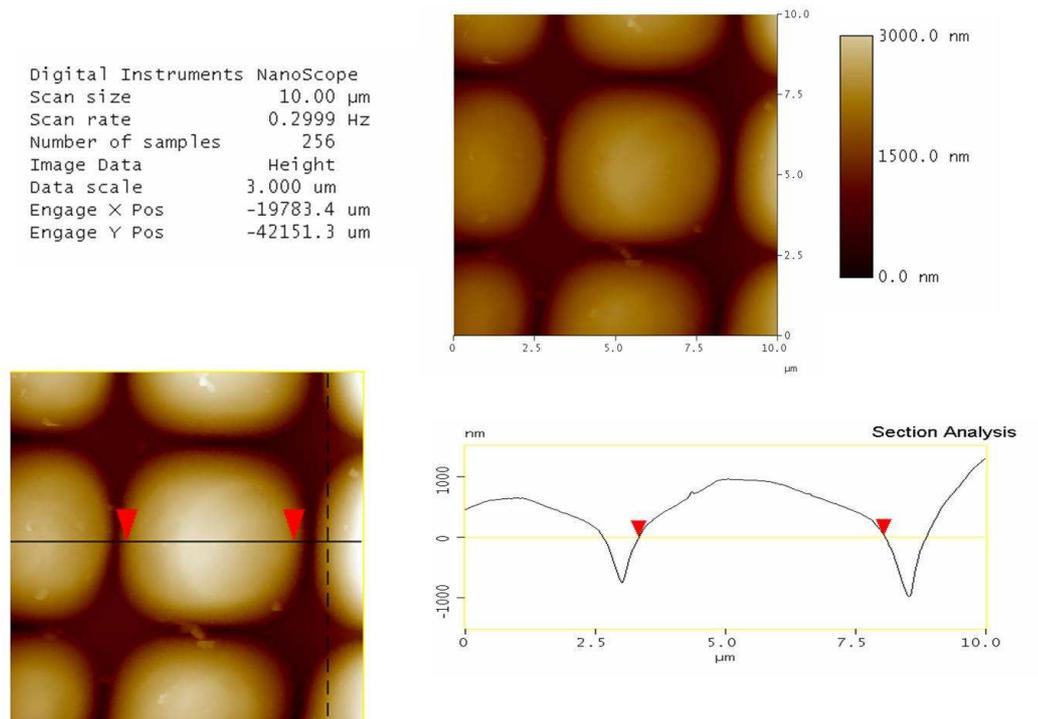


Figure 70- Microlentille facettée après 3h de cuisson.

Les mesures sur toutes les autres micro-lentilles suggèrent qu'il n'y a pas de déformation et donc que la température de transition vitreuse du polystyrène des micro-lentilles est très probablement supérieure à 105°C.

4.1.1.3 Dimensions des photodétecteurs

Pour observer les photodétecteurs, des petits coups de scalpel ont été réalisés sur la surface d'un capteur. Celui-ci a ensuite été observé avec un MEB Hitachi modèle S4000¹⁶: les premières images n'ont pas été exploitables, car le matériau de surface est d'abord peu contrasté, puis devient brillant au cours de l'observation. En effet, le polymère constituant les micro-lentilles étant diélectrique, il se charge sous le faisceau d'électrons. Une fine couche de platine (~ 5 nm) a donc été déposée pour favoriser l'observation.

¹⁶ Le microscope électronique à balayage (MEB) donne accès à la topographie de la surface d'un objet. Dans une enceinte sous vide, un faisceau d'électrons focalisés balaye la surface de l'échantillon. En fonction de la nature physico-chimique de la surface, des électrons secondaires ou rétro diffusés sont émis et des détecteurs adaptés permettent d'enregistrer des signaux proportionnels à cette émission. En utilisant ces signaux amplifiés pour alimenter un moniteur au balayage synchronisé, une image est générée dont la brillance en chaque point est proportionnelle à l'émission au point correspondant de la surface. L'image correspond ainsi à la topographie de l'échantillon lorsqu'on utilise le signal proportionnel au flux d'électrons secondaires émis.

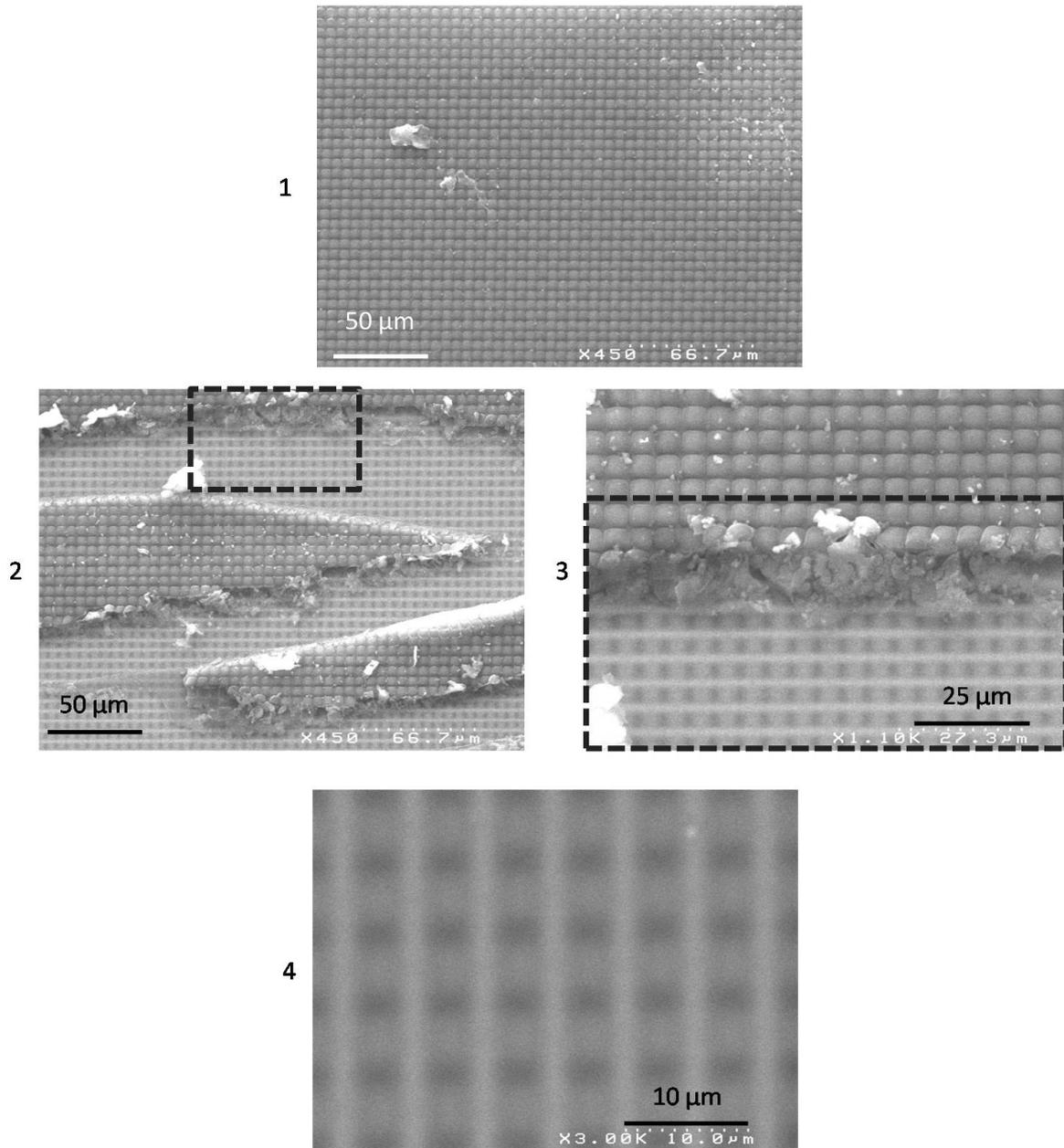


Figure 71- Images au MEB de la surface d'un capteur Sony ICX098 recouvert d'une couche nanométrique de platine pour l'observation
1- surface indemne, 2- au niveau d'un coup de scalpel, 3- zoom sur une zone de l'image 2
4- zone découverte par un coup de scalpel.

Sur les zones intactes, les microlentilles sont observables (Figure 71- 1). La taille d'un pixel est effectivement de 5,6 µm. Sur les zones dégagées par les coups de scalpel, la couche inférieure apparaît alors (Figure 71- 2 à 4). Des grandes lignes blanches sont distinguables (matériau conducteur) et également des zones plus noires (matériau peu conducteur). Une hypothèse est que ces zones noires correspondent aux photodétecteurs en silicium et les zones plus claires aux interconnexions métalliques. La taille du photodétecteur est d'environ 2,5 µm par 1,7 µm. Le facteur de remplissage hors microlentilles (rapport de surface du

photodétecteur par rapport à celle du pixel) est ainsi de $\frac{2,5 * 1,7}{5,6 * 5,6}$ soit 13% de la surface d'un pixel.

4.1.1.4 Empilement vertical au-dessus d'un photodétecteur

Comme le montrent les Figure 67 et Figure 69, le MEB et l'AFM ne donnent pas accès à l'empilement interne au-dessus d'un photodétecteur. Pour connaître celui-ci, une coupe verticale à l'aide d'un faisceau d'ions focalisés (Focused Ion Beam, FIB) a été réalisée, puis imagée au MEB.

Une comparaison avec un brevet de Sony [110] permet d'identifier les différentes couches de la structure visualisée (Figure 72).

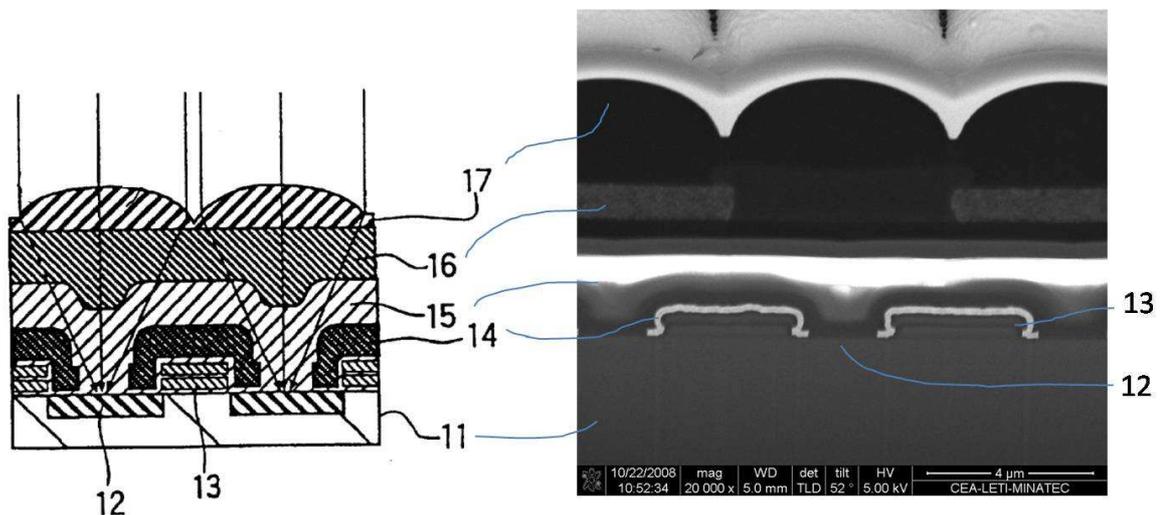


Figure 72- Comparaison d'une figure de [110] à gauche avec l'image au MEB d'une coupe FIB du capteur à droite.

11: substrat de semiconducteur; 12: zone photosensible; 13: films conducteurs; 14: film protecteur de la lumière; 15: film planarisant; 16: filtre coloré avec une forme différente de celle observée sur la coupe FIB ; 17: microlentille en polystyrène.

L'indice de réfraction des microlentilles a été déterminé précédemment autour de 1,6. Ceux des autres couches sont difficilement déterminables expérimentalement. Néanmoins, en première approximation les indices des microlentilles, des filtres et de la couche de passivation peuvent être estimés équivalents soit de 1,6 [106].

L'image MEB de la coupe réalisée avec un FIB permet également de mesurer les distances de ces différentes couches verticales au-dessus d'un photodétecteur (Figure 73).

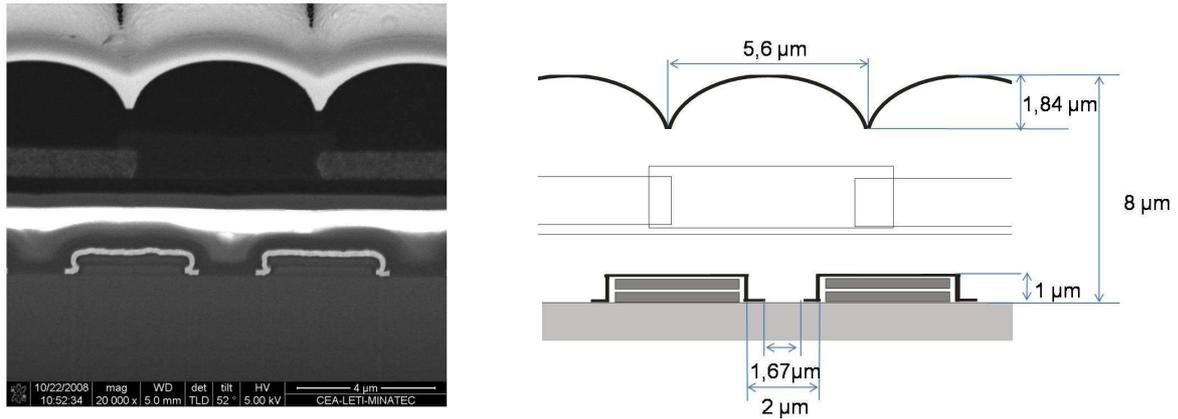


Figure 73- Distances pertinentes de l'empilement au-dessus d'un photodétecteur mesurées sur l'image MEB de la coupe réalisée au FIB.

4.1.2 Nature des lamelles de verre

Nature de la lamelle	Epaisseur (µm)								Indice de réfraction	source de l'indice	
	50	70	100	150	175	210	300	500			1000
plaque de verre D263T										1,53	fiche technique
lamelle couvre-objet				150						1,52	fiche technique
Quartz								500		1,54	typique
lame de microscope									1000	1,52	typique

4.1.3 Dimension et indices de réfraction des cellules et du milieu

Dimension et indices de réfraction des cellules

La lignée de référence lors de notre travail étant les RPE1, les informations de taille ont été collectées sur ces cellules. Les autres cellules humaines ont des dimensions du même ordre de grandeur. Hors mitose, une cellule RPE1 adhérente mesure environ 25 µm, elle s'étale sur 800 à 1000 µm² et son épaisseur varie entre 3 et 6 µm (Figure 74). La cellule est plus épaisse au niveau de son noyau [111].

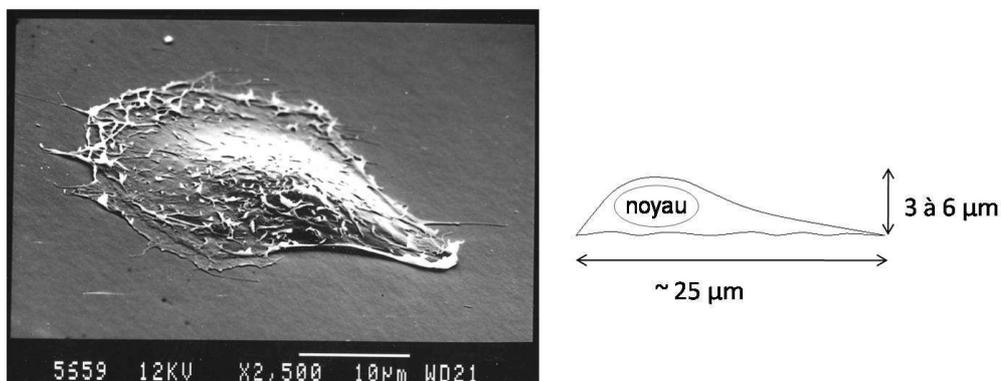


Figure 74- Cellule RPE1 sur un micro-pattern au MEB d'après [111] à droite, schéma d'une coupe de la cellule à gauche.

Pendant la mitose, cette cellule est de forme sphérique de diamètre proche de $15 \mu\text{m}^2$. Concernant l'indice de réfraction, une cellule n'est pas optiquement homogène, car les indices de ses constituants diffèrent (cytoplasme, noyau, organelles) [112]. Son indice global dépend ainsi de l'indice de ces derniers et de leur répartition. Il est compris entre 1,33 indice de l'eau et 1,40 l'indice des globules rouges [113]. De nombreuses publications tentent de caractériser d'une part l'indice de réfraction des composants cellulaires et d'autre part un indice global. Les valeurs varient selon les études et les types cellulaires. Elles sont regroupées dans le tableau suivant :

$n_{\text{cytoplasme}}$	1,35 – 1,38	[114]
$n_{\text{cytoplasme CHO}}$	1,36 – 1,375	[116]
n_{noyau}	1,38 – 1,47	[114]
$n_{\text{noyau CHO}}$	1,38 – 1,41	[116]
$n_{\text{mitochondrie et organelles}}$	1,38 – 1,41	[115]
$n_{\text{cellule MDCK}}$	1,387	[117]
$n_{\text{cellule MDCK}}$	1,383	[118, 119]

Pour la suite, nous avons considéré une valeur de 1,38 pour l'indice de réfraction d'une cellule.

Indices de réfraction et dimensions du milieu

Guillaume Colas a, lors de sa thèse au laboratoire, mesuré au réfractomètre l'indice du milieu de culture RPMI à 1,335 [112]. Dans le cadre d'une évaluation du système, nous pouvons considérer ce milieu similaire au DMEM-F12 utilisé pour la culture des RPE1.

Le milieu a les dimensions de la chambre réalisée à la surface du capteur :

- Dans la configuration avec une boîte de Petri, la distance entre la lamelle et la surface du milieu est d'environ 4 mm.
- Dans la configuration sans boîte de Petri, la distance entre la lamelle et la surface du milieu est d'environ 1 mm. Un ménisque se forme. La surface du milieu ressemble à une goutte. Comme les résultats avec ou sans ménisque sont similaires, et qu'une expérience préliminaire a montré que l'image d'une tache de feutre sur une lamelle variait de seulement 3% selon la forme du ménisque, nous en avons négligé l'effet.

4.1.4 Propriétés de la source lumineuse

Les mesures qui suivent ont été réalisées avec l'aide de Karen GILBERT et de Philippe GROSSE du LETI/DOPT. Les propriétés d'émission spatiale de la LED utilisée (Nichia NSPW500BS) ont été évaluées avec un goniomètre spectroradiomètre LCS -100 G de Spheroptics (Concord, Etats-Unis). La puissance de la LED a été mesurée selon l'angle d'observation avec un pas de mesure de $1,8^\circ$.

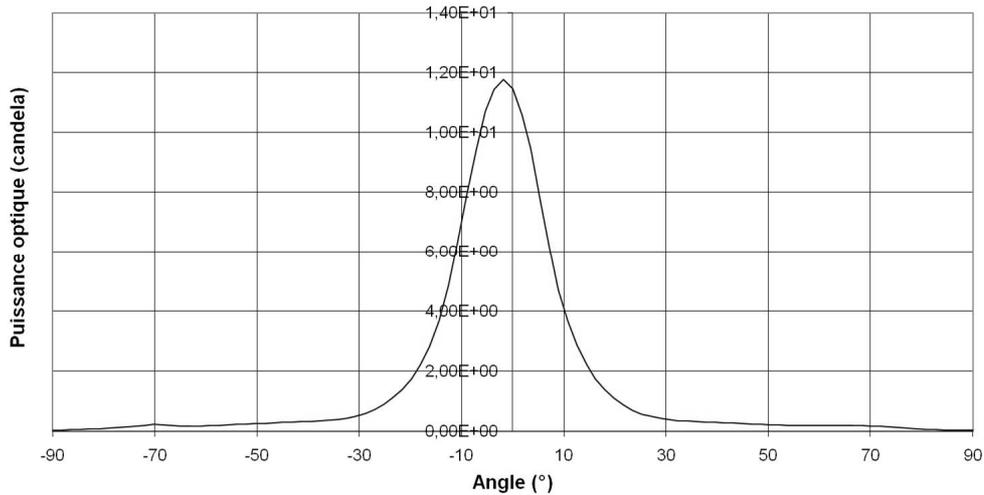


Figure 75- Courbe d'émission spatiale de la LED.

La puissance optique à mi-hauteur (*i.e.* à 50% de la puissance optique maximale) correspond aux angles $-10,8^\circ$ et $+7,2^\circ$ (Figure 75), soit 18° d'ouverture angulaire. Cette directivité est identique à celle fournie par le constructeur [120]. Nous observons que la puissance optique maximale est dirigée vers l'angle $-1,8^\circ$. Philippe Grosse nous a indiqué que les LEDs bon marché n'ont pas souvent un assemblage optimal, et donc que le pic d'émission n'est pas forcément centré sur 0° .

De même, les propriétés d'émission spectrale de la LED ont été caractérisées par l'appareil « Characterization system CCD array spectrophotometer », de la société SphereOptics. En accord avec les données de la fiche technique, la LED émet principalement dans le bleu vers 460 nm (Figure 76), mais également dans les autres teintes avec un pic dans le jaune vers 580 nm. Il s'agit ainsi d'une source polychromatique avec un rendu « blanc ».

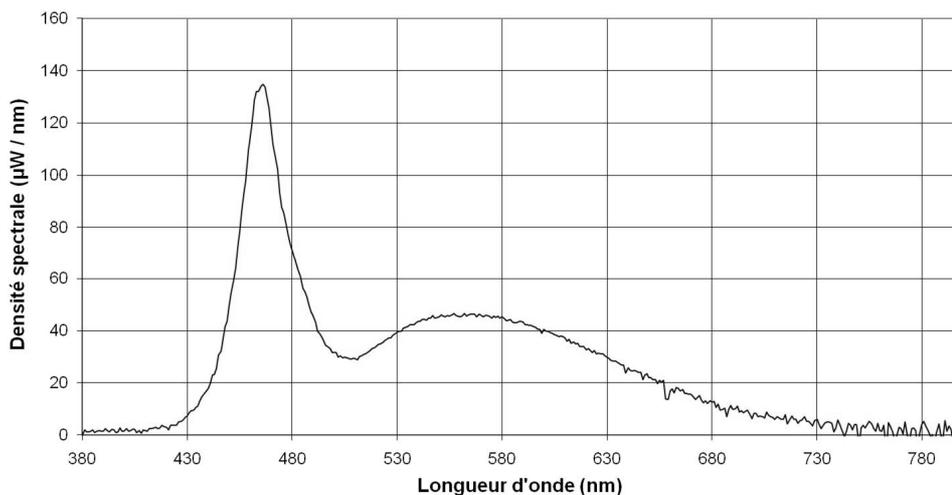


Figure 76- Courbe spectrale.

La LED est encapsulée dans un boîtier de 5 mm de diamètre et positionnée à 5 cm du capteur.

4.1.5 Schéma récapitulatif

La Figure 77 récapitule les informations collectées dans les parties qui précèdent sur le système optique.

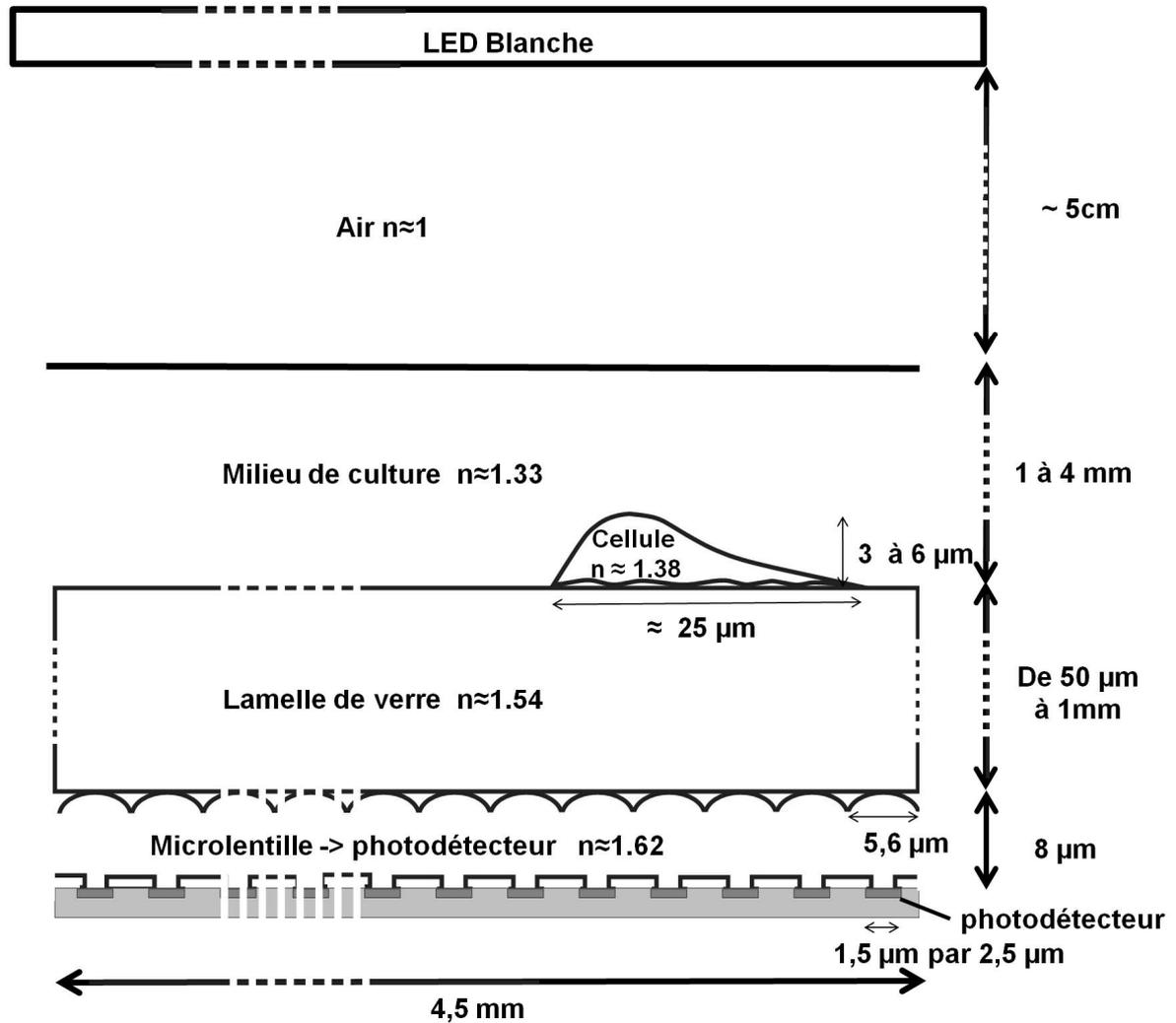


Figure 77- Schéma récapitulatif du système.

Il était difficile d'ajouter sur ce schéma, le fait que le milieu entre les microlentilles et la lamelle de verre est dans notre cas le milieu de culture $n \approx 1,33$.

4.2 Etudes des images obtenues par le microsystème

Ce paragraphe essaie de quantifier les éléments appréciés lors de la validation d'une épaisseur optimale de lamelle. Pour cela, l'influence de la lamelle de verre dans les images de RPE1 et des images de réseaux de Ronchi obtenues par le microsystème, est analysée.

4.2.1 Analyse des images de RPE1

Une série d'images de RPE1 réalisée par le microsystème a été analysée de façon plus approfondie.

Si on zoome numériquement sur une cellule, les pixels apparaissent. Il est difficile de délimiter exactement une cellule. Par exemple sur la Figure 78, les limites de la zone brillante sont délimitées à l'aide d'un trait continu et celles de la zone sombre entourant la cellule à l'aide d'un trait en pointillés. La petite zone comprend 33 pixels soit *a priori* $1000 \mu\text{m}^2$, ce qui est cohérent avec la taille. La zone la plus large englobant la zone sombre comprend 78 pixels soit près de $2400 \mu\text{m}^2$.

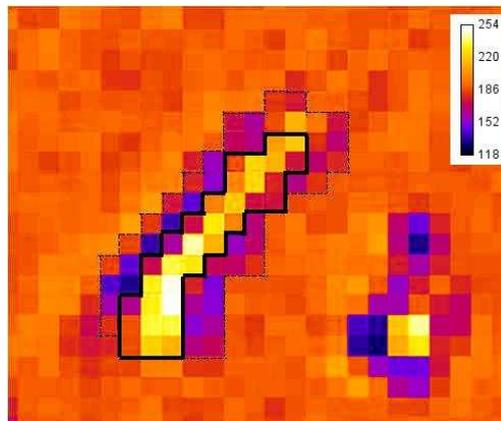


Figure 78- Zoom numérique sur une cellule RPE1 d'une image réalisée par le microsystème avec une lamelle de $175 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Une couleur par niveau de gris a été fixé. La cellule a été entourée d'un trait plein et d'un trait en pointillés. Un carré fait *a priori* $5,6 \mu\text{m}$ de côté.

Pour mieux visualiser cet effet clair/sombre, des profils en intensité le long de cellules ont été réalisés (Figure 79).

La zone sombre est visualisée par 2 pics d'intensité plus faible que la moyenne de l'image et la zone claire par un pic d'intensité supérieure à la moyenne de l'image. Le profil s'étale sur une dizaine de pixels.

Ces coupes en intensité ont été réalisées pour différentes épaisseurs de lamelle de verre. Comme les courbes possèdent une allure similaire, la moyenne des profils sera considérée pour une épaisseur. Les moyennes des profils pour les différentes épaisseurs de lamelle de verre ont été superposées. Pour plus de lisibilité, une seule courbe par épaisseur est montrée dans la Figure 80.

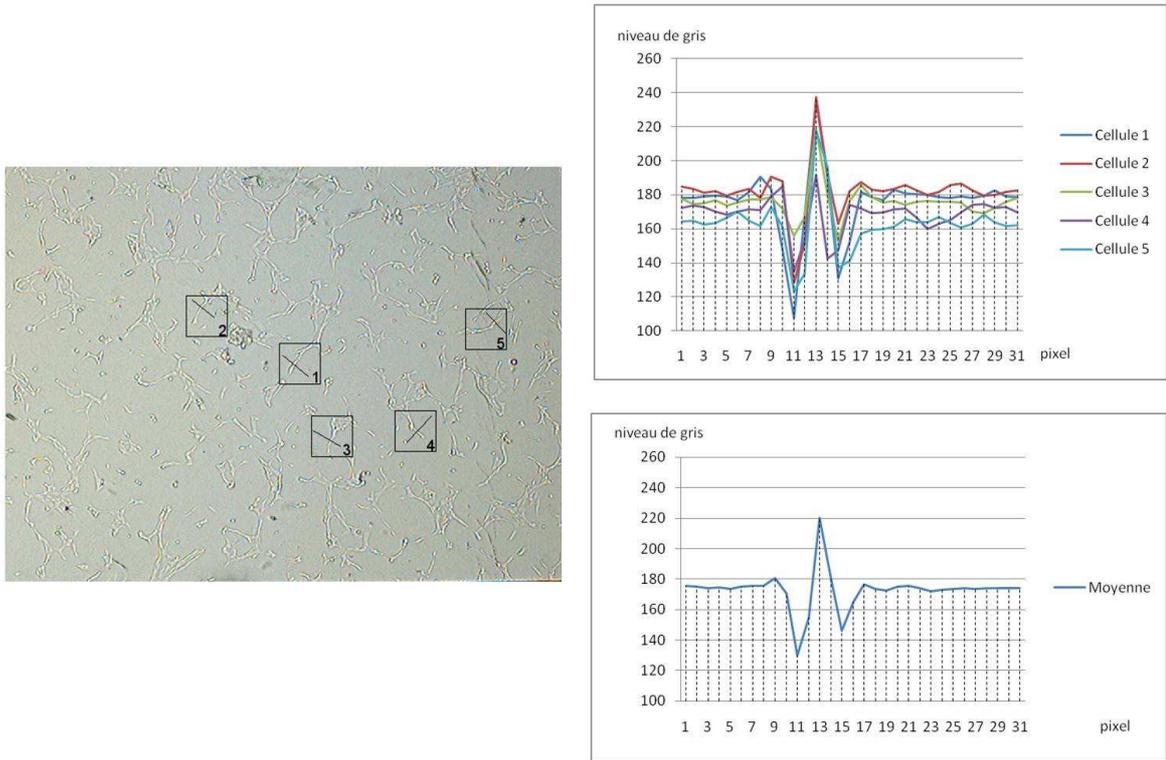


Figure 79- Image de cellules RPE1 sur une lamelle de 175 µm d'épaisseur (à gauche) ; Profils en intensité de 5 cellules (à droite en haut) mesurés selon la ligne correspondante dans l'image et courbe de la moyenne de ceux-ci (à droite en bas).

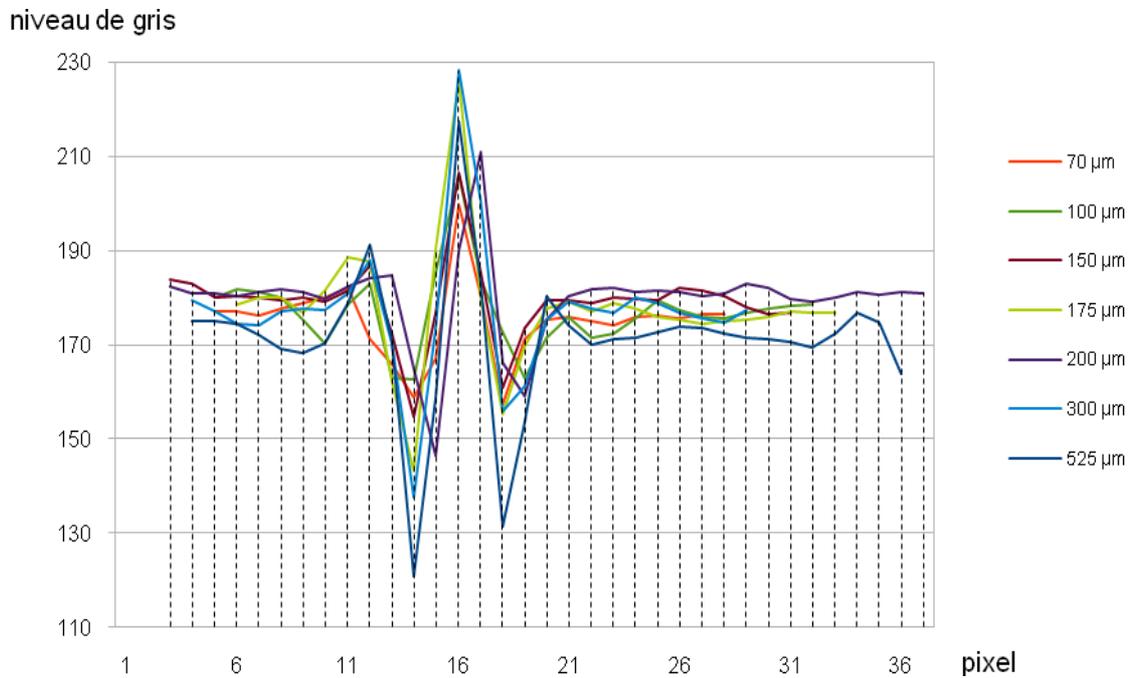


Figure 80- Superposition des moyennes des profils de cellules réalisés pour différentes épaisseurs de lamelle de verre.

Quelle que soit l'épaisseur de la lamelle de verre, les profils observés sont similaires, c'est-à-dire ils comportent deux pics « sombres » et un pic « clair » et s'étalent sur une dizaine de pixels. Il n'y donc pas *a priori* d'influence de l'épaisseur de la lamelle de verre sur la taille de l'image de la cellule obtenue par le capteur. L'impression de grandissement signalé au chapitre précédent n'est donc pas confirmée par les mesures.

4.2.2 Observation de réseaux de Ronchi

Pour vérifier cette constatation, nous avons choisi d'imager des objets de taille connue. Deux types d'objets peuvent être envisagés : des microbilles de polystyrène ou bien des réseaux de Ronchi.

Les expériences réalisées avec les microbilles n'ont pas été concluantes. En effet, pour être sûr que les billes soient à la surface de la lamelle, nous avons décidé d'évaporer le liquide dans lequel ces petites particules sont vendues. Or, lors de cette évaporation elles se sont agrégées spontanément. Il était alors difficile de savoir si les taches observées par le capteur correspondaient à une ou à plusieurs billes.

Les réseaux de Ronchi sont des trames alternant des lignes opaques et des lignes transparentes de même largeur. Un réseau est caractérisé par le nombre de paires de ligne par mm ou LP/mm (une opaque / une transparente). Des réseaux ont été achetés chez Edmund Optics et découpés de la même façon que les lamelles de verre. Pour tester des conditions similaires aux expériences avec les cellules :

- une lamelle de verre d'épaisseur connue a été introduite entre le réseau et le capteur
- le milieu interstitiel a pu être du milieu de culture

Les différentes conditions testées sont résumées par la Figure 81 :



Figure 81- Schéma des expériences avec les réseaux de Ronchi.

Sur les différentes images prises, des profils d'intensité sont enregistrés (Figure 82).

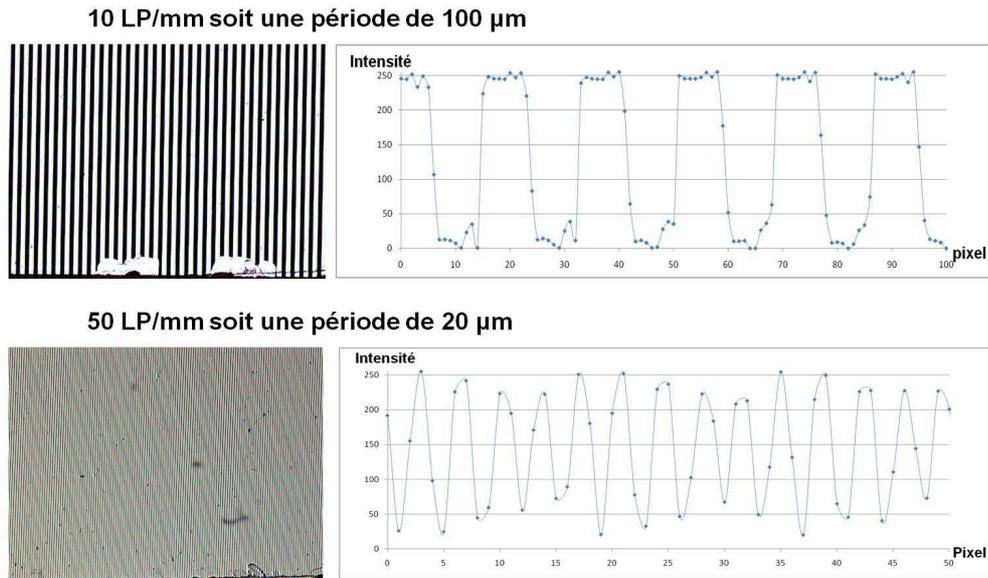


Figure 82- Image de réseau de Ronchi et profil observé pour 10 LP/mm (en haut) et pour 50 LP/mm (en bas) sur une lamelle de verre de 70 μm d'épaisseur dans l'air.

La fréquence du profil est déterminée pour les différentes conditions (épaisseur de lamelle de verre, nature du milieu interstitiel) :

- Le réseau de 10 LP/mm est bien imagé par le capteur. Le crénelage est observable sur le profil d'intensité. La période est de 18 pixels (100,8 μm) et est constante selon toutes les conditions.
- En revanche, le profil de l'image du réseau 50 LP/mm est triangulaire. L'image est donc peu résolue. La période observée est de 3,6 pixels (20,2 μm). Le nombre n'est pas entier, car une paire opaque/transparente n'est pas observée sur un nombre constant de pixels. Cette fréquence varie également peu en fonction des conditions examinées dans l'expérience.
- Pour 100 LP/mm, le crénelage n'est pas discernable du bruit de fond. Le capteur ne permet donc pas d'imager de tels détails.

Deux informations importantes peuvent être déduites de ces observations :

- l'épaisseur de la lamelle de verre n'influe pas sur la taille de l'image d'un objet
- la résolution du capteur est supérieure à 5 μm et proche de 10 μm .

Une troisième information peut être obtenue de ces expériences. Ce n'est pas la fréquence de l'objet qui varie avec l'épaisseur de la lamelle de verre, mais son contraste. Cela est frappant, si l'on prend une grande différence d'épaisseur de la lamelle de verre (Figure 83).

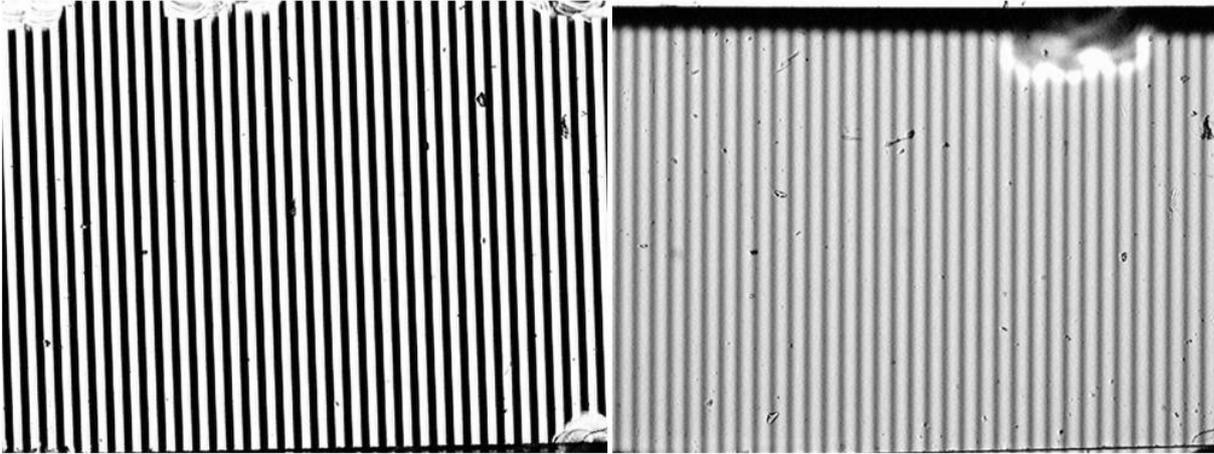


Figure 83- Image du réseau de Ronchi pour 10 LP/mm dans l'air sur une lamelle de verre d'épaisseur 175 μm (à gauche) et 1675 μm (à droite).

Sur l'image avec une épaisseur de 175 μm , la zone transparente est très blanche et la zone opaque est très noire, alors que sur l'image avec une épaisseur de 1675 μm , la zone transparente est gris clair et la zone opaque est gris foncé. La distance sur laquelle le contraste est suffisant étant importante, cela signifie que la source est peu divergente. Cette divergence a été confirmée par les mesures de caractérisations de la LED (divergence de 18°). En regardant les images de cellules, la même constatation peut être facilement réalisée (Figure 62).

4.2.3 Résolution du microsystème

Comme observé avec le réseau 50 LP/mm, il existe une limite de résolution liée à l'échantillonnage. Le théorème de Shannon énonce que la fréquence d'échantillonnage d'un signal doit être égale ou supérieure au double de la fréquence maximale contenue dans ce signal pour être correctement échantillonné.

La fréquence d'échantillonnage de notre système est de $1/5,6 \mu\text{m} = 0,18 \mu\text{m}^{-1}$. La fréquence spatiale maximum que le système échantillonne correctement est donc de $0,089 \mu\text{m}^{-1}$ ou un pas de 11,2 μm . Au sens de Shannon, l'objet « cellule » de taille caractéristique 25 μm est donc correctement échantillonné, par contre les détails intracellulaires de l'ordre du micron ne le sont clairement pas.

Il s'agit d'une limite intrinsèque à notre système optique.

4.3 Compréhension du mécanisme de formation de l'image

Comme indiqué dans l'introduction, les équipes réalisant de l'imagerie directe ne se placent pas dans le même cadre théorique. Pour l'équipe du D^r Abshire [81] il est possible de raisonner via l'optique géométrique, alors que l'équipe du D^r Ozcan [84, 85] tire partie de

l'optique physique pour observer rechercher des taches caractéristiques de diffraction ou plus récemment qualifiées d'holographie.

4.3.1 Dans le cadre de l'optique géométrique

Dans un premier temps, nous avons décidé de réfléchir dans le cadre de l'optique géométrique pour plusieurs raisons :

- Une cellule mesure environ $20\ \mu\text{m}$ soit environ 30 fois plus que les longueurs d'onde dans le visible (considéré à $\sim 600\ \text{nm}$).
- Notre source est incohérente ce qui a pour effet d'estomper les franges de diffraction que l'on pourrait observer.

Nous avons posé comme hypothèse que la cellule se comporte comme un dioptré, ce qui n'est pas le cas des travaux de l'équipe du D^r Abshire. Les profils d'intensité observés sur nos images correspondraient dans ce cas à l'image de l'« ombre » derrière cette lentille.

En effet, en considérant que les rayons lumineux issus de la source sont normaux à la surface du capteur, nous pouvons schématiser cette hypothèse par la Figure 84.

L'intensité de la lumière observée par les photodétecteurs et qui ne traverse pas la « cellule-dioptré » est notée I_0 , alors que celle qui la traverse est notée I_c .

Nous pouvons distinguer trois cas selon la position relative de la « cellule-dioptré » par rapport aux photodétecteurs du capteur notés 2a, 2b, 2c sur la Figure 84 :

2a) Si la « cellule-dioptré », notée 1, jouxte les photodétecteurs, noté 4, I_c est très légèrement supérieure à I_0 . Le contraste est alors très faible et peu détectable par nos photodétecteurs.

2b) Si le capteur est placé dans une zone proche de la distance focale, I_c dans l'axe optique de la « cellule-dioptré » est supérieure à I_0 , alors que I_c hors de cet axe correspond à la zone d'« ombre », noté 3, derrière la « cellule-dioptré ». L'intensité correspond en première approximation à un crénelage. Or, ce crénelage est de l'ordre de quelques microns. Il est donc sous-échantillonné par les photodétecteurs et visualisé de façon triangulaire comme les réseaux de Ronchi de 50LP/mm. Le signal détecté ressemblerait ainsi au profil observé pour une cellule.

2c) Si le capteur est placé très de loin de la distance focale, le contraste observé entre I_0 et I_c redevient très faible et certainement non détectable par nos photodétecteurs.

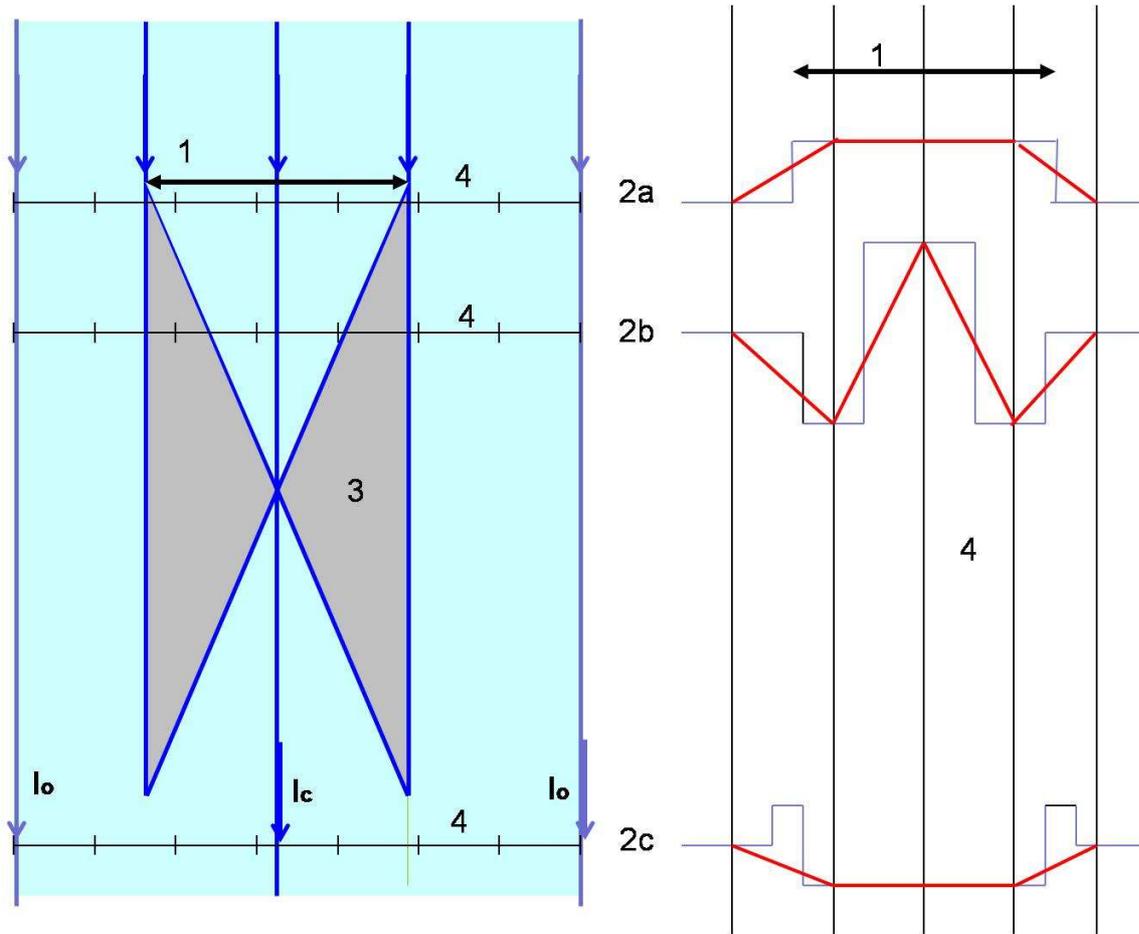


Figure 84- Schéma si l'on considère la cellule comme un dioptre

A gauche : Tracé de rayons

1- cellule ; 2- position du capteur : a) jouxtant la cellule b) proche de la distance focale de la cellule

c) loin de la distance focale de la cellule ;

3-zone d'ombre due à la focalisation par la cellule ;4-photodétecteur

A droite : coupe d'intensité selon la position relative du capteur et de la cellule

a) en bleu l'intensité théorique b) en rouge l'intensité vue par les pixels du capteur (traits verticaux).

Pour vérifier si cette hypothèse est crédible, nous avons calculé la distance focale de la cellule. Nous avons fait les simplifications suivantes :

- * nous nous plaçons dans le milieu d'indice de la lamelle de verre.
- * la forme de la cellule est approximée par une calotte.

Le schéma suivant représente cette configuration (Figure 85) :

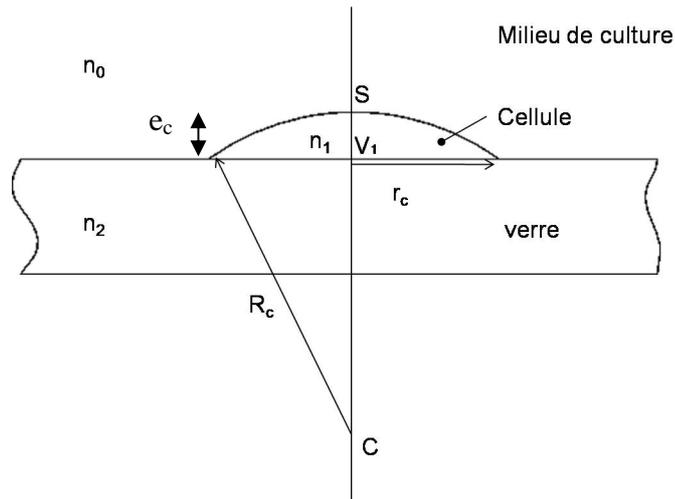


Figure 85- Schéma pour déterminer la distance focale de la « cellule-dioptre »,
avec $n_0=1,33$, $n_1=1,38$, $n_2=1,53$
 $e_c \in [3 ; 6] \mu\text{m}$ $r_c \in [10 ; 15] \mu\text{m}$.

Calcul du rayon de courbure R_c de la « cellule-dioptre » :

Par Pythagore, nous avons

$$R_c = \frac{e_c^2 + r_c^2}{2e_c} \quad \text{D'où } R_c \in [9,08 ; 43,5] \mu\text{m}.$$

Un couple de valeurs typiques pour une cellule est $r_c=12,5 \mu\text{m}$, et $e_c = 6 \mu\text{m}$, le rayon de courbure typique est alors $R_c \text{ typique} = 16 \mu\text{m}$

Vergence de la « cellule-dioptre » :

$$D_{c0/1} = \frac{n_1 - n_0}{SC}$$

Comme SC est positif, $SC = R_c$, par conséquent $D_{c0/1} \in [1150 ; 5500] \delta$, et $D_{c \text{ typique}} = 3120 \delta$.

Distance focale de la « cellule-dioptre » dans le milieu d'indice de réfraction n_1 :

$$f'_{n1} = \frac{n_1}{D_{c0/1}} \quad \text{D'où } f'_{n1} \in [251 ; 1200] \mu\text{m} \text{ et } f'_{n1 \text{ typique}} = 442 \mu\text{m}$$

Or avec les valeurs typiques

$$V_1F_{n1} = V_1S + SF_{n1} = -9 + 442 \mu\text{m} \approx 442 \mu\text{m} \text{ donc } V_1F_{n1} \approx n_1 f'_{n1}$$

Nous considérons que de même $V_1F_{n2} \approx n_2 f'_{n2}$

Position du point focal dans le verre, milieu d'indice de réfraction n_2 :

Nous avons

$$\frac{n_2}{f'_{n2}} - \frac{n_1}{f'_{n1}} = 0 \quad \text{donc } f'_{n2} = \frac{n_2}{n_1} f'_{n1}$$

Donc de même,

$$f'_{n2} = \frac{n_2}{n_1} f'_{n1} \quad \text{D'où } f'_{n2} \in [278,1330] \mu\text{m} \text{ et } f'_{n2 \text{ typique}} = 490 \mu\text{m}$$

Détermination de l'épaisseur nécessaire pour visualiser la zone ombragée sur un pixel

Pour que notre capteur observe un crénelage dû à l'ombre de la « cellule-dioptre », nous faisons l'hypothèse qu'il faut que l'ombre recouvre au moins un photodétecteur. Une cellule typique mesure 25µm de diamètre, avec des pixels de 6 µm on a 4 pixels dans 25 µm. La situation est schématisée par la Figure 86.

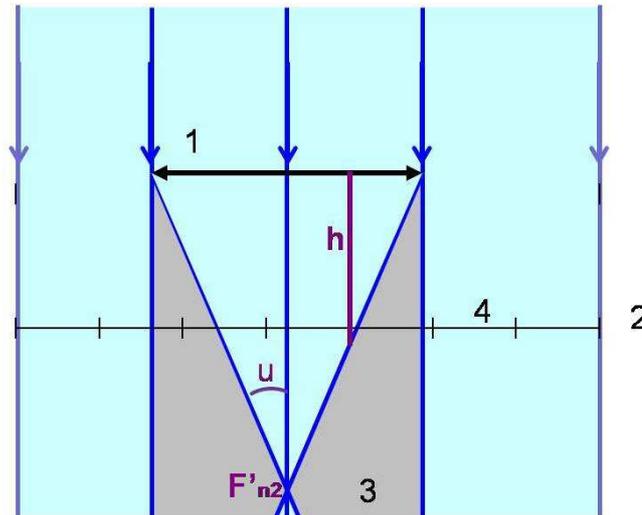


Figure 86- Schéma pour déterminer h
 1- cellule ; 2- position du capteur ;
 3-zone d'ombre due à la focalisation par la cellule , 4- photodétecteur

Nous avons, en notant le pas du pixel t_{pixel} :

$$\tan(u) = \frac{r_c}{f'_{n2}} = \frac{t_{\text{pixel}}}{h}$$

D'où

$$h = \frac{f'_{n2} t_{\text{pixel}}}{r_c} \quad \text{D'où } h \in [125 ; 595] \mu\text{m}, \text{ et } h_{\text{typique}} = 220 \mu\text{m}$$

Cette hauteur correspond à l'ordre de grandeur des épaisseurs de verre que nous utilisons. Cette hypothèse est donc plausible. Pour pouvoir la confirmer ou l'infirmer, il serait nécessaire de prendre en compte l'angle d'éclairage de la LED et la géométrie exacte de la cellule qui a été ici approximé à une calotte. Il est sans doute possible de réaliser une simulation plus réaliste à l'aide d'un logiciel de calcul optique adapté comme par exemple le logiciel TracePro.

4.3.2 Dans le cadre de l'optique physique

Une autre approche dite ondulatoire est également envisageable et nous allons étudier si c'est un phénomène de diffraction qui participe à la formation des images fournies par le capteur. Cette approche est citée dans de nombreux articles décrivant une technique dite de microscopie sans lentille (en anglais, « lens free microscopy ») ce qui est en définitive assez abusif [83-87]. En effet, il y a plus aujourd'hui de (micro)lentilles au-dessus d'un capteur d'image qu'il n'y en aura jamais dans un microscope, même le plus complexe.

Existence du phénomène de diffraction

La définition de la diffraction donnée par Mathieu *et al.* est la suivante : « *lorsque des ondes de nature quelconque, issues d'une source quasi-ponctuelle S, rencontrent un obstacle dans leur propagation, elles ne se propagent pas uniquement en ligne droite, mais contournent l'obstacle : ce sont les phénomènes de diffraction. [...] En Optique, la diffraction produit des écarts aux lois de l'Optique géométrique* » [115].

Le phénomène de diffraction est fondamental en optique. C'est lui qui limite en premier lieu la séparation des systèmes optiques (télescopes, microscopes). Ce phénomène est toujours présent mais ses conditions d'observation sont réduites. Dans la définition donnée par Mathieu, il faut une source quasi-ponctuelle et, découlant du principe de Huygens-Fresnel, il faut qu'il y ait interférence.

Existence du phénomène d'interférence dans notre configuration

Une diode électroluminescente émet des ondes sphériques, qui sont assimilables à une onde plane au niveau de la culture cellulaire. Selon Mathieu *et al.* [121], les interférences sont « *des phénomènes observables lorsque des vibrations cohérentes de même nature et de même fréquence, portées par des ondes, parviennent au même point* ». Pour que des vibrations soient cohérentes et dans la mesure où elles sont issues de la même source, il faut qu'elles aient suivi, avant de se rencontrer, des chemins dont la différence des longueurs n'excède pas la « longueur de cohérence » souvent définie par la relation suivante :

$$L_c = \frac{\lambda^2}{\Delta\lambda}$$

où L_c désigne la longueur de cohérence (en m), λ la longueur d'onde (en m) et $\Delta\lambda$ l'intervalle spectral de la source. Dans notre cas, avec une source blanche qui émet de 400 à 800 nm et en considérant que la longueur d'onde centrale est de 600 nm, on a une longueur de cohérence inférieure au micromètre (0,9 μm).

De plus, les chemins suivis par les vibrations sont des chemins optiques. Le chemin optique est défini comme le produit de l'épaisseur du milieu traversé par son indice de réfraction et est souvent noté δ :

$$\delta_i = n_i \times e_i$$

où δ_i est le chemin optique, n_i est l'indice de réfraction du milieu et e_i son épaisseur, l'indice i désignant le milieu considéré.

Si, en première approximation, on suppose qu'une cellule est représentée optiquement par un milieu d'épaisseur e_c ($3 < e_c < 6 \mu\text{m}$, soit en arrondissant $e_c \approx 10 \mu\text{m}$), d'indice de réfraction $n_c \approx 1,38$ plongé dans un milieu liquide d'indice de réfraction $n_l \approx 1,33$, la différence des chemins optiques d'une vibration lumineuse traversant une cellule et d'une vibration passant à côté est égale à $0,5 \mu\text{m}$, soit une longueur inférieure à la longueur de cohérence calculée pour tout l'intervalle spectral de la source.

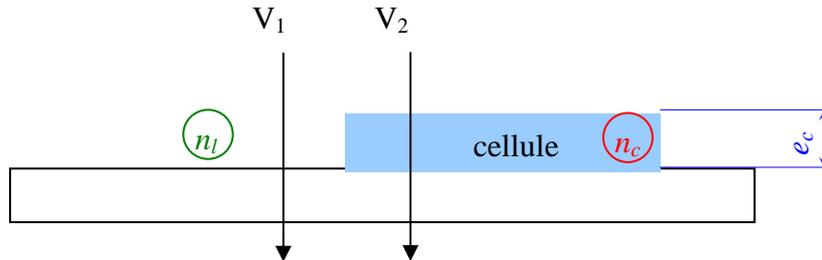


Figure 87 – Représentation schématique d'une cellule traversée par une vibration V_2 , la vibration V_1 ne la traversant pas.

Sachant par ailleurs que le capteur d'image est équipé d'une matrice de filtres (filtre de Bayer), chaque photosite reçoit de la lumière dont l'intervalle spectral est réduit : la longueur de cohérence pour chaque pixel considéré est donc supérieure à celle calculée précédemment.

Il peut donc y avoir des interférences entre des vibrations traversant la cellule et des vibrations ne la traversant pas. La configuration d'éclairage et l'objet étudié satisfont donc aux deux principaux critères permettant d'observer des phénomènes d'interférence. Il est donc plausible que l'image des cellules formée sur le capteur d'image soit engendrée par un phénomène d'interférence.

Formation d'une image

Reprenons la Figure 87 à laquelle nous ajoutons une structure de microlentilles associée à une matrice de photosites. Nous considérons, ici également, les rayons lumineux issus de la source comme normaux à la surface. Un des bords de la cellule est disposé entre 2 photosites comme en Figure 88 car cette hypothèse facilite la compréhension des phénomènes en présence.

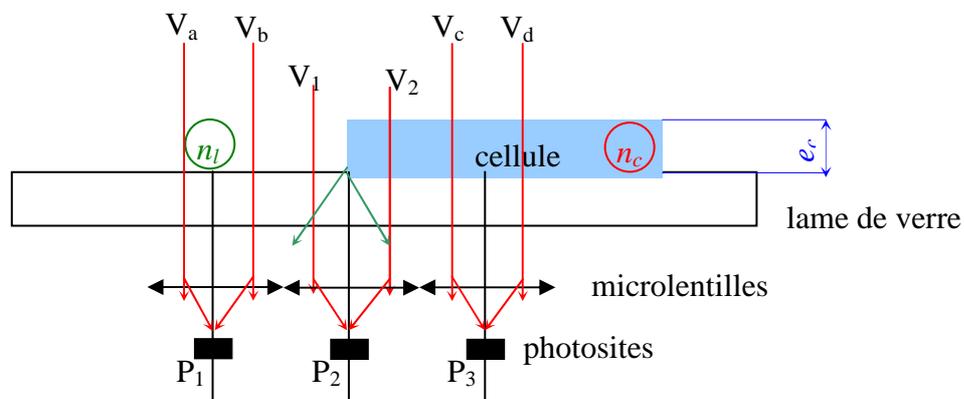


Figure 88 – Représentation schématique du système lorsqu'une cellule est représentée par un film d'épaisseur e_c et positionnée de façon particulière.

Les vibrations V_a et V_b s'ajoutent sur le même photosite, de même que les vibrations V_1 et V_2 et V_c et V_d . Seules les vibrations V_1 et V_2 ont une différence de chemin optique non nulle.

Deux vibrations complexes s'ajoutent au même point (un photosite) en amplitude et le photosite mesure une intensité, c'est-à-dire le module au carré de la somme complexe des amplitudes :

$$A_p = A_1 + A_2$$

où A_p est l'amplitude sur le photosite, et $A_{1/2}$ l'amplitude des vibrations 1 et 2 respectivement. L'intensité mesurée en considérant que les amplitudes A_1 et A_2 sont égales (la transparence d'une cellule est proche de 1), est donnée par l'expression suivante :

$$I_p = 2I_0(I + \cos(\Delta\varphi))$$

Où I_0 est l'intensité incidente et $\Delta\varphi$ est la différence de phase engendrée par la différence de chemin optique, différence de phase définie par la relation :

$$\Delta\varphi = \frac{2\pi c}{\lambda}(n_c - n_l)$$

Dans le cas des vibrations V_1 et V_2 , la différence de chemin optique est non nulle et $I_p < 4I_0$ alors que dans les autres cas, elle est nulle et $I_p = 4I_0$: on observe donc un contraste entre les pixels P_1 et P_2 , et entre les pixels P_2 et P_3 . Un contraste peut ainsi être observé du fait d'interférences.

Nous n'avons pas considéré ici directement le phénomène de diffraction mais seulement un phénomène d'interférence qui à lui seul ne permet pas d'expliquer la forme des images observées. La diffraction, représentée par les rayons de couleur verte de la Figure 88, intervient pour modifier la distribution d'amplitude dans le plan des photosites.

Or dans la plupart des cas d'école, la diffraction des ondes lumineuses est présentée par un écran opaque. Une cellule, de transparence quasi unitaire, n'est pas un écran de ce type : c'est un écran de phase dont l'effet sur l'onde lumineuse la traversant est un déphasage. Ce type d'objet diffracte la lumière au même titre que des écrans opaques. En effet, il s'agit du phénomène employé pour fournir un signal aux systèmes d'asservissement de position des lecteurs de disques optiques. Pour intégrer ce type d'objet dans les équations décrivant la diffraction, il faut considérer une transparence complexe (forme géométrique et déphasage pour chaque point de l'objet). Cela conduit à des équations un peu plus complexes dont les solutions analytiques sont moins directes que celles qu'on obtient avec des transparences réelles.

En conclusion, les deux formalismes de géométrie et ondulatoire sont applicables et complémentaires. Une modélisation plus rigoureuse devra intégrer des paramètres optiques plus complets de la cellule (par exemple le gradient d'indice de réfraction dans la cellule et sa géométrie).

Le système optique, dont nous disposons est plus complexe que nous l'avions au prime abord imaginé. En réalisant des hypothèses simplificatrices, il est difficile de trancher entre une approche uniquement dans le cadre de l'optique géométrique ou celle prenant également en compte des phénomènes d'interférences.

Des études plus approfondies tenant compte de la présence du filtre de Bayer, de l'indice du milieu interstitiel entre les microlentilles et la lamelle de verre, de l'inclinaison des rayons sur la surface objet,... seraient nécessaires pour bien maîtriser les paramètres critiques à la mise en place rapide d'un microsystème similaire ou à son amélioration.

L'amélioration pourrait être similaire à celle proposée dernièrement par l'équipe du Dr. Ozcan [84]. La source utilisée est monochromatique, et un obturateur est placé à sa sortie. La cohérence spatiale et temporelle est ainsi assurée. Ces conditions accentuent fortement le phénomène d'interférences. D'après cette équipe, il s'agit alors d'un type d'holographie.

5 Mise en place et démonstration de la vidéomicroscopie sur puce

Précédemment, le chapitre 3 a décrit le développement d'un prototype pour visualiser des cellules adhérentes à un instant donné. Nous pouvons ainsi le qualifier d'« appareil photographique de cellules ».

L'objectif de ce chapitre est de décrire l'amélioration et l'utilisation du microsystème comme caméra pour cellules, c'est-à-dire pour observer en temps réel l'évolution dynamique d'une ou de plusieurs cellules. Pour cela les conditions physiologiques cellulaires adéquates (37°C, 5% de CO₂, forte humidité) doivent être maintenues sur une longue durée de temps : jusqu'à 36h pour suivre la prolifération.

Dans ce but, le microsystème doit être amélioré : l'électronique de la caméra isolée de l'humidité, la chambre de culture cellulaire sur le capteur modifiée et enfin la température pour les cellules maintenue à 37°C.

Les événements à observer pour valider ce mode de fonctionnement sont les grandes fonctions cellulaires impliquant un changement morphologique ou un déplacement : mitose et prolifération, motilité, apoptose, différenciation. Il s'agit des événements principaux de la vie cellulaire, qui sont impliqués dans l'induction de cancers.

5.1 Modifications du prototype pour la vidéomicroscopie

Pour maintenir les conditions physiologiques pendant toute la durée de l'observation, deux possibilités peuvent être envisagées:

- Construire autour du microsystème les éléments de régulation de la température, de l'humidité et du pH [63]. L'assemblage final est donc intégré et portable, et peut ainsi être déposé sur une paillasse. En revanche, comme les cellules doivent être manipulées dans un environnement stérile, un système aussi intégré ne supprimerait pas la nécessité d'avoir accès aux autres outils classiques de la culture cellulaire tels qu'un poste de sécurité microbienne ou une centrifugeuse.
- Installer le microsystème dans une étuve classique de culture cellulaire. Cette solution transfère le contrôle des paramètres physiologiques à l'étuve dédiée et déjà optimisée pour la culture cellulaire. L'instrumentation du microsystème serait donc limitée à la prise et à l'analyse d'image. Dans le cadre d'une diffusion de ce type de microsystème dans des laboratoires de biologie cellulaire, ce choix minimise les changements d'habitude des biologistes. En effet, toutes les manipulations et même la mise en culture dans l'étuve sont effectuées de façon classique.

Cette deuxième solution a donc été choisie. En effet, le travail d'instrumentation nécessaire à la mise en place d'une « mini-étuve » autour du capteur paraît superflu pour des applications de recherche en biologie cellulaire. Les principales conséquences pour le microsystème développé sont :

- la nécessité de résister à la forte humidité de l'étuve. Le circuit électronique de la caméra doit donc être protégé.
- L'exigence de maintien des conditions physiologiques à la surface du capteur. Le milieu de culture ne doit donc pas s'évaporer et la surface du capteur doit être maintenue à 37°C.

5.1.1 Protection du circuit électronique

Deux types de protection de la carte électronique ont été utilisés. La première protection a consisté en un vernis siliconé d'une rigidité diélectrique de 90 kV/mm (vernis spécial circuit imprimé isolant, Electrofuge 200 1410 de CRC industries France) Pour l'appliquer, les supports de connexion du capteur ont été au préalable protégés avec un ruban adhésif et les circuits imprimés ont été nettoyés avec un chiffon doux imbibé d'éthanol. Le vernis a été vaporisé en couches croisées à une distance de 20-30 cm, puis séché une heure à 60° dans une étuve. Il est indiqué dans la fiche technique que la résistivité transversale diminue avec l'humidité (de $10^{15} \Omega \cdot \text{cm}$ à $10^{14} \Omega \cdot \text{cm}$ après 96h à 96% d'humidité à 25°C). Or, les conditions dans l'étuve sont de l'ordre de 70 à 80% à 37°C. Après quelques dizaines d'expériences en condition d'étuve, la caméra a rencontré des difficultés de fonctionnement. Des rejets d'oxyde

sur les circuits ont été observés, puis nettoyés avec les produits de nettoyage de flux de soudure, et une deuxième couche de vernis siliconé a permis d'allonger la durée de vie de la caméra.

Pour éviter ces problèmes de tenue dans le temps des circuits électroniques soumis à l'humidité, la caméra a été recouverte de résines époxy (Figure 89).

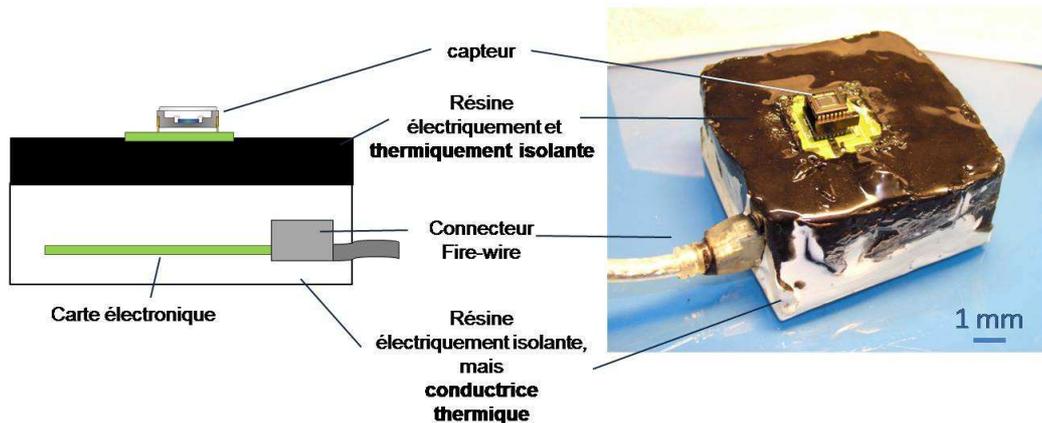


Figure 89- Caméra encapsulée avec des résines époxy dédiées.

Deux résines d'encapsulation ont été coulées dans un moule réalisé avec des feuilles en plastique, dans lequel les circuits avaient préalablement été déposés. La première résine noire (Electrolube ER 2188) est une résine dédiée à l'encapsulation de circuits, la deuxième résine blanche est similaire mais chargée pour être thermiquement conductrice (Electrolube ER 2074). Le circuit électronique proche du capteur a été encapsulé dans la résine isolante électrique, alors que la carte mère l'a été dans la résine conductrice thermique. Ainsi, la chaleur produite par la carte mère est évacuée dans la direction opposée au capteur.

5.1.2 Adaptation supplémentaire du capteur

Ajout d'une chambre

La chambre formée par le capteur préparé comme dans le chapitre 3 peut recevoir environ 100 μ L. Ce faible volume s'évapore rapidement dans les conditions d'étuve. S'il s'agit de milieu de culture, les concentrations des composants sont ainsi modifiées. C'est pourquoi il a été décidé d'adjoindre une boîte de Petri au boîtier du capteur (Figure 90). Le volume final est ainsi de 2 ou 3 mL et correspond à des conditions très classiques de culture.

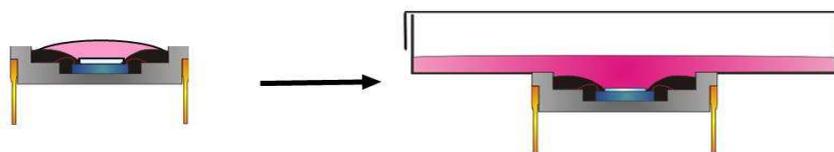


Figure 90- Schéma de l'ajout d'une boîte de Petri sur le capteur.

Pour assembler la boîte de Petri sur le capteur, une fine couche de PDMS a tout d’abord été testée mais la jonction mécanique n’était pas bien assurée. Il a donc été décidé d’utiliser une résine. Le choix s’est porté vers des résines photo-réliculables pour permettre une bonne localisation de la résine et une réticulation à l’ambiante (la boîte de Petri se déforme dès 60°C). Comme pour le capteur et le glob-top décrit précédemment (Cf. Chapitre 3), la résine sélectionnée doit être biocompatible pour les cellules. La viabilité de 7 résines a été testée en présence de RPE1. Les résines ont été déposées et réticulées sur le bord d’une boîte de Petri, puis mises en présence de cellules pendant 48h. Dans de nombreux cas, la viabilité des cellules a été engagée, puisqu’elles n’ont même pas adhéré à la surface de la boîte, comme par exemple en présence de la Masterbond (Figure 91).

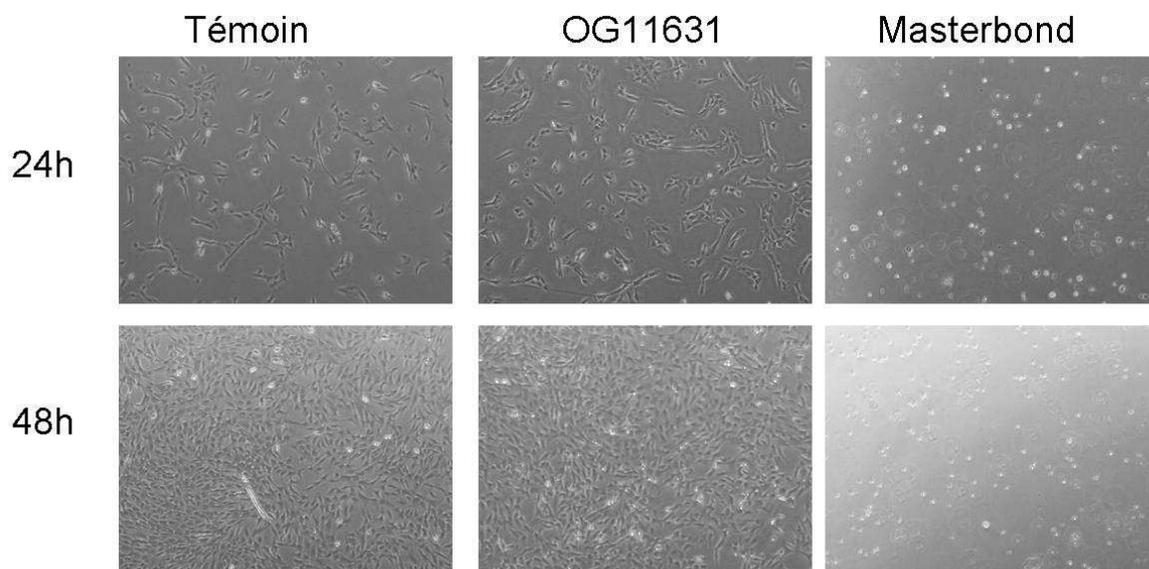


Figure 91- Suivi de prolifération de RPE1 en présence de résines réticulant aux UV.

La seule résine où l’adhérence est reproductible et similaire aux conditions témoin est l’OG11631 de chez Epotek.

Les résultats de ces tests sont résumés dans le tableau suivant :

Résine	Marque	Biocompatibilité avec les RPE1
1180M	Dymax	Non
1165M	Dymax	Non
1160M	Dymax	Non
203-At-CH	Dymax	Non
1187M	Dymax	Non
OG11631	Epotek	OUI
Masterbond15X2	Masterbond	Non

La colle finalement sélectionnée est l’OG11631. Dans le cadre d’une preuve de faisabilité, nous avons estimé ce suivi de prolifération comme suffisant. Des tests plus approfondis seraient nécessaires pour valider cette résine dans le cadre d’un prototype plus abouti.

Amélioration de la robustesse du capteur assemblé

Le capteur et la boîte de Petri ainsi assemblés peuvent accueillir une lamelle pour imager sur une longue durée. Malheureusement, les nombreuses expériences réalisées ont montré que le capteur ne restait fonctionnel qu'au mieux une centaine de minutes. En effet, des bulles ont été observées, signe d'électrolyse, et le capteur s'est ensuite souvent arrêté de fonctionner. Nous avons alors supposé, que le dépôt de colle ne couvrait pas suffisamment toutes les arrivées de tension. Pour éviter cela, le glob top a alors été déposé sur toutes les zones non sensibles dans le but de recouvrir toute tension potentielle. Cela ne s'est pas montré suffisant. Malgré des dépôts minutieux de glob top pour éviter ces écueils, de nombreux capteurs assemblés ne fonctionnaient pas plus que quelques heures. Il a finalement été décidé de recouvrir l'ensemble du capteur assemblé (à l'exception des pattes extérieures) d'un matériau isolant.

Le parylène ou xylylène est un polymère de choix. En effet, il possède une tension de claquage très élevée (268 V/ μm pour le Galxyl C employé). Il se dépose par dépôt chimique en phase vapeur (CVD, Chemical Vapor Deposition). La couche de parylène est conforme¹⁷ et uniforme (régulière et homogène) pour des couches de plus de 500 nm [122]. De plus, il est connu pour être biocompatible pour les implants comme les pacemakers et sa biocompatibilité pour les lignées cellulaires a été récemment démontrée [122, 123].

Des dépôts de 500 nm ont été réalisés dans un bâti dédié (Parylene Depositing Unit PDS 2010 SCS). Le capteur assemblé fonctionne ainsi correctement sur de longues périodes de temps. Expérimentalement, une durée de 96h a été tenue sans que le fonctionnement ne soit détérioré.

Trois points supplémentaires sont à noter :

- Tout d'abord l'indice de réfraction du parylène est de 1,63. Il est donc similaire à celui des microlentilles en polystyrène et ne modifie donc pas grandement le mode de formation de l'image.
- De plus, la couche de parylène sépare les matériaux déposés et le milieu de culture cellulaire par une couche très isolante chimiquement et connue pour être biocompatible.
- En outre, cette solution est théoriquement intéressante pour couvrir les connectiques en or et remplacer le glob-top. Cependant, dans la pratique le fin dépôt ne protège pas mécaniquement les connectiques des mouvements de la lamelle de verre, qui pourraient les détacher. Les connectiques en or sont donc dans nos derniers prototypes toujours protégés à l'aide de glob top.

¹⁷ Conforme pour « con-forme » ou « suit les formes ».

Le protocole final de réalisation d'une chambre pour la culture cellulaire à la surface du capteur CCD peut être résumé par les étapes suivantes (Figure 92) :

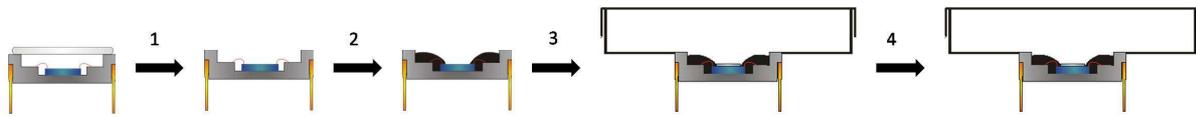


Figure 92- Récapitulatif des étapes de conditionnement du capteur CCD

1- décapotage, 2- protection des connectiques avec du glop-top, 3- Ajout d'une boîte de Petri à l'aide d'OG1131, 4-Dépôt de parylène

5.1.3 Température à la surface du capteur

Pour pallier à l'échauffement à la surface du capteur assemblé sur une webcam, il a été choisi un nouveau circuit électronique comprenant un circuit plus petit pour le capteur (Cf. chapitre 3). Ce dernier est alimenté par 90 mW [104]. Nous cherchons à savoir si la puissance du capteur placé dans une étuve à 37°C peut chauffer la surface au-delà d'une température viable pour les cellules. Il est classiquement considéré qu'à partir de 40°C des protéines chaperonnes vont être produites pour protéger les principales fonctions cellulaires, et qu'au-delà de 43-44°C la température n'est plus viable [124].

Pour mesurer la température de la surface, un thermocouple n'est pas approprié. En effet, les plus petits thermocouples disponibles sur le marché et protégés de la corrosion en milieu aqueux font plusieurs millimètres de diamètre alors que le volume disponible pour la mesure est de 4x3mm (surface du capteur) x 1mm (profondeur du boîtier). Mesurer la température à la surface du capteur n'est pas évident pour deux raisons :

- la valeur indiquée par le thermocouple sera une moyenne sur le volume disponible
- le thermocouple va jouer un rôle de radiateur thermique par sa conduction propre et évacuer une partie de la chaleur générée à la surface.

La valeur mesurée par un thermocouple serait donc difficile à interpréter dans notre cas.

Pour mesurer la présence éventuelle d'un point chaud et quantifier l'échauffement à la surface du capteur, une mesure de température utilisant le rayonnement thermique a donc été réalisée avec une caméra infrarouge (caméra Thermovision A40 de chez Flir Systems). Pour relier cette mesure à la température, il est nécessaire de connaître l'émissivité thermique de la zone observée. Des petits morceaux de papier adhésif d'émissivité connue (0,95) ont donc été collés sur la surface d'intérêt. De plus, malgré un étalonnage en température, une caméra thermique donne surtout accès à des valeurs relatives sur une surface. Par conséquent, un point de référence hors de la zone d'intérêt est également pris.

Sur notre capteur, il a été observé que la chaleur issue de la surface du capteur était uniforme. La surface chauffe en 2-3 min au-delà de la température ambiante. Pour une pièce

thermostatée à 22°C, la référence est mesurée à 24°C et la surface du capteur en régime stationnaire est de 39°C. Pour connaître la température de la surface, lorsque le microsystème est placé dans l'étuve thermostatée à 37°C en régime stationnaire, des calculs sont nécessaires. Le calcul complet de thermique du système est relativement complexe à mettre en œuvre (prise en compte des phénomènes de conduction, de convection et de rayonnement dans la géométrie du capteur). Comme l'objectif est d'obtenir un ordre de grandeur de la température à la surface du capteur en fonctionnement, un simple bilan énergétique paraît suffisant.

La quantité de chaleur dégagée par le capteur dans l'air à 22°C (référence mesurée à 24°C) est donnée par :

$$Q_{\text{capteur dans l'air à 24°C}} = \rho_{\text{air}} V_{\text{air}} C_{p_{\text{air}}} (T_{\text{capteur 1}} - T_{\text{ambiante 1}}) + \text{pertes} = 90 \text{ mW} \times \text{temps}$$

On considère les variations de ρ_{air} , ρ_{eau} , $C_{p_{\text{eau}}}$, $C_{p_{\text{air}}}$ en fonction de la température comme négligeables dans notre problème. On prend :

$$\begin{aligned} C_{p_{\text{eau}}} &= 4186 \text{ J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1} & \rho_{\text{eau}} &= 1000 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3} \\ C_{p_{\text{air}}} &= 1000 \text{ J}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{K}^{-1} & \rho_{\text{air}} &= 1,1 \text{ kg}\cdot\text{m}^{-3} \end{aligned}$$

On considère également que les pertes thermiques sont similaires à 24° ou à 37°C.

L'objectif est de calculer la gamme de température possible de la surface du capteur dans l'étuve. Comme l'eau est plus dense que l'air et possède une capacité calorifique plus importante, *i.e.* $\rho_{\text{eau}} C_{p_{\text{eau}}} \gg \rho_{\text{air}} C_{p_{\text{air}}}$, la surface du capteur sera plus chaude placée dans l'air que placée dans l'eau. Par conséquent, une estimation basse de la température à la surface du capteur est obtenue en considérant le capteur comme entièrement dans l'eau et l'estimation haute en le considérant entièrement dans l'air.

- **Estimation basse** le capteur est entièrement dans l'eau

$$Q_{\text{capteur dans l'eau à 37°C}} = Q_{\text{capteur dans l'air à 24°C}}$$

$$\text{Or, } Q_{\text{capteur dans l'eau à 37°C}} = \rho_{\text{eau}} V_{\text{eau}} C_{p_{\text{eau}}} (T_{\text{capteur 2}} - T_{\text{ambiante 2}})$$

$$\text{D'où, } \rho_{\text{eau}} V_{\text{eau}} C_{p_{\text{eau}}} (T_{\text{capteur 2}} - T_{\text{ambiante 2}}) = \rho_{\text{air}} V_{\text{air}} C_{p_{\text{air}}} (T_{\text{capteur 1}} - T_{\text{ambiante 1}})$$

Donc

$$T_{\text{capteur 2}} = \frac{\rho_{\text{air}} C_{p_{\text{air}}}}{\rho_{\text{eau}} C_{p_{\text{eau}}}} (T_{\text{capteur 1}} - T_{\text{ambiante 1}}) + T_{\text{ambiante 2}}$$

$$\text{D'où } T_{\text{capteur 2}} (\text{limite basse}) = 37 \text{ °C}$$

- **Estimation haute** le capteur est entièrement dans l'air

$$Q_{\text{capteur dans l'air à 37°C}} = Q_{\text{capteur dans l'air à 22°C}}$$

$$\text{Or, } Q_{\text{capteur dans l'air à 37°C}} = \rho_{\text{air}} V_{\text{air}} C_{p_{\text{air}}} (T_{\text{capteur 2}} - T_{\text{ambiante 2}})$$

$$\text{D'où } \rho_{\text{air}} V_{\text{air}} C_{p_{\text{air}}} (T_{\text{capteur 2}} - T_{\text{ambiante 2}}) = \rho_{\text{air}} V_{\text{air}} C_{p_{\text{air}}} (T_{\text{capteur 1}} - T_{\text{ambiante 1}})$$

$$\text{Donc } T_{\text{capteur 2}} = T_{\text{ambiante 2}} + T_{\text{capteur 1}} - T_{\text{ambiante 1}}$$

$$\text{D'où } T_{\text{capteur 2}} (\text{limite haute}) = 52 \text{ °C}$$

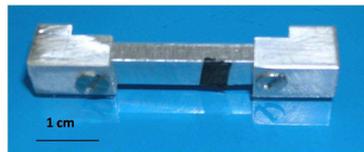
La gamme entre ces deux estimations est très large. Comme les volumes sont additifs, une hypothèse réaliste de configuration volumique peut être réalisée pour avoir une idée de la température à la surface du capteur. En supposant que la surface est 1/3 dans l'eau et 2/3 dans l'air, dans ce cas:

$$T_{\text{capteur 2}} = \frac{1}{3} (T_{\text{ambiante 2}} + T_{\text{capteur 1}} - T_{\text{ambiante 1}}) + \frac{2}{3} \left(\frac{\rho_{\text{air}} C_{p_{\text{air}}}}{\rho_{\text{eau}} C_{p_{\text{eau}}}} (T_{\text{capteur 1}} - T_{\text{ambiante 1}}) + T_{\text{ambiante 2}} \right)$$

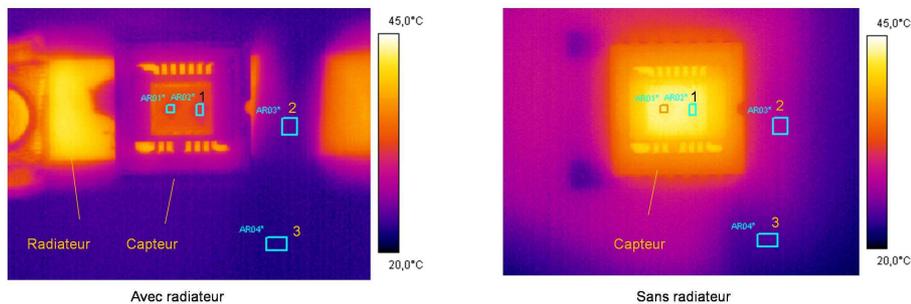
D'où $T_{\text{capteur 2}}$ (approximation) = 47 °C

Le capteur dans l'étuve est probablement autour de 47°C ce qui est une température fatale pour les cellules. Pour évacuer la chaleur produite par le capteur, un petit radiateur en aluminium a été usiné par M. Raymond Charles du LETI. Une mesure avec et sans radiateur a alors été effectuée (Figure 93).

Photo de profil du radiateur



Images de la caméra thermique



Mesures de la température dans le temps

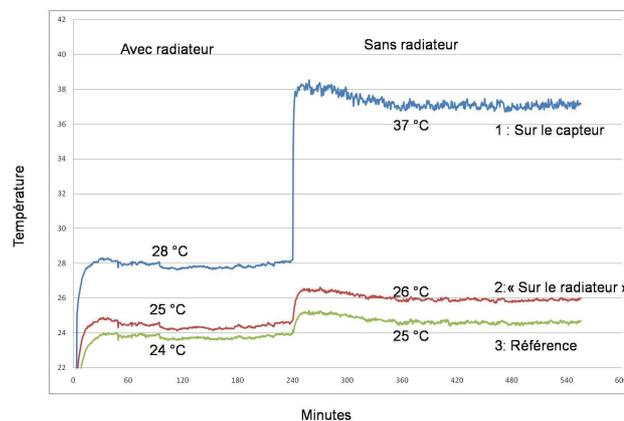


Figure 93- Mesures par la caméra thermique : en haut, images fournies par la caméra du montage avec un radiateur (à gauche), ou sans radiateur (à droite) ; en bas, températures mesurées au cours du temps sur les différents zones rectangulaires.

Avec les mêmes hypothèses que précédemment, le calcul donne en présence du radiateur, une température de surface de 39°C. Or, l'expérience avec des cellules a montré que l'ajout de ce petit radiateur n'était pas suffisant, les cellules meurent. La température est donc probablement plus élevée. Même en prenant une hypothèse plus stricte de rapport de volume de un dixième, la température serait théoriquement de 40°C. Ce simple bilan énergétique est insuffisant pour avoir une idée de la température au degré près. Il ne permet qu'une approche par estimation basse et haute de la gamme de température possible à la surface.

Pour pallier à cet échauffement non négligeable à la surface du capteur, deux solutions peuvent être envisagées. La première est de réaliser un système de régulation thermique par exemple à l'aide d'un module Peltier insérée entre le capteur et son support, la deuxième est d'éteindre la caméra entre deux prises d'images. Cette deuxième solution plus rapide à mettre en œuvre a pour l'instant été retenue.

5.2 Exemples de suivi vidéomicroscopique

Les événements à observer pour valider ce mode de fonctionnement sont les grandes fonctions cellulaires impliquant un changement morphologique ou un déplacement : mitose et prolifération, motilité, apoptose, différenciation. Il s'agit des événements principaux de la vie cellulaire, qui sont impliqués dans l'induction du cancer.

Les différentes fonctions cellulaires à étudier correspondent à des durées de temps différentes :

- La motilité, la prolifération monocellulaire (mitose) et le suivi de la mort cellulaire s'effectuent sur quelques heures.
- La prolifération d'une population et la différenciation s'étudient sur quelques jours.

Pour les expériences qui suivent, la caméra a été éteinte entre deux prises d'images.

5.2.1 Suivi de la prolifération

Le suivi de prolifération peut être sur une cellule unique (mitose) ou celle d'une population cellulaire.

Il est possible de suivre une mitose qui dure environ une heure, en enregistrant une image toutes les 3 minutes. Nos observations sur une durée de trente minutes de RPE1 adhérees sur une lamelle de verre de 175 μm , permettent de voir la cellule arrondie et plus réfringente lors de la prophase et de la métaphase (temps t), puis les deux cellules filles juste après l'anaphase ($t+11$ min), qui reprennent ensuite une morphologie caractéristique ($t+25$ min) (Figure 94).

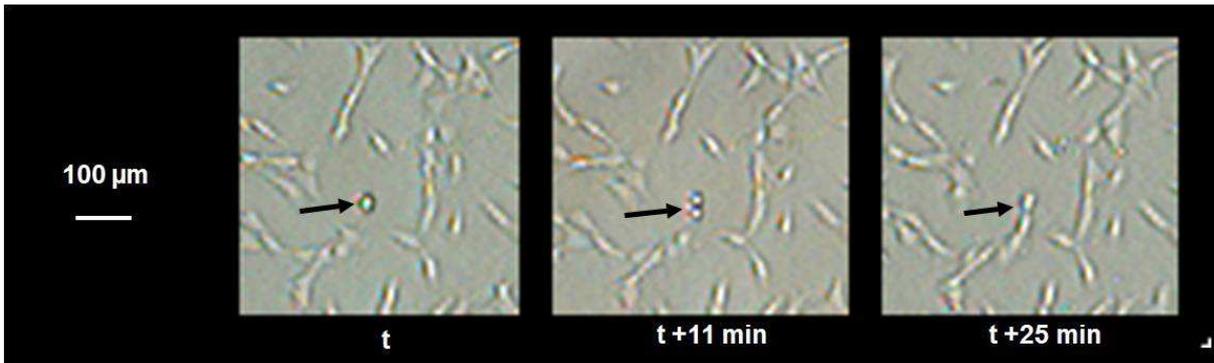


Figure 94- Suivi d'une mitose de RPE1 par notre système.

Pour suivre la prolifération d'une population cellulaire, une image est prise généralement toutes les dix minutes sur une durée variant entre 24h et 72h selon le paramètre étudié. Nos observations sur 25h permettent d'observer l'augmentation du nombre de cellules sur la lamelle (Figure 95).

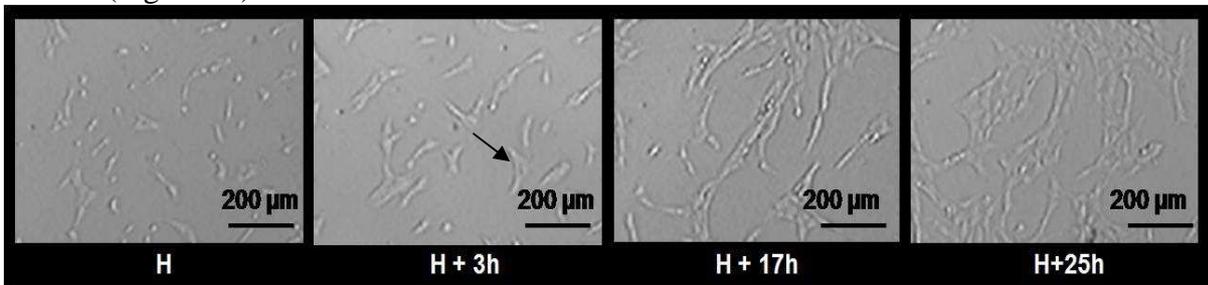


Figure 95- Suivi de la prolifération d'une population de RPE1 par notre système.

Au temps H, les cellules ont adhéré sur le substrat de verre. 3h après, certaines cellules se sont divisées (flèche). Après 17h d'observation, la majorité des cellules se sont divisées. Enfin après 25h d'observation, le tapis cellule s'est clairement densifié par rapport au temps H. Un comptage rapide permet de calculer une vitesse de doublement de l'ordre de 24h.

5.2.2 Suivi de la motilité

Notre système permet également de suivre la motilité d'une cellule. Une population de RPE1 a été observée toutes les 11 minutes pendant 12h. Pour visualiser le parcours d'une cellule entre plusieurs images, un traitement dit de « tracking » est réalisé à l'aide du module « Manual Tracking » du logiciel ImageJ (plug-in réalisé par Fabrice Cordelières de l'Institut Curie à Orsay).

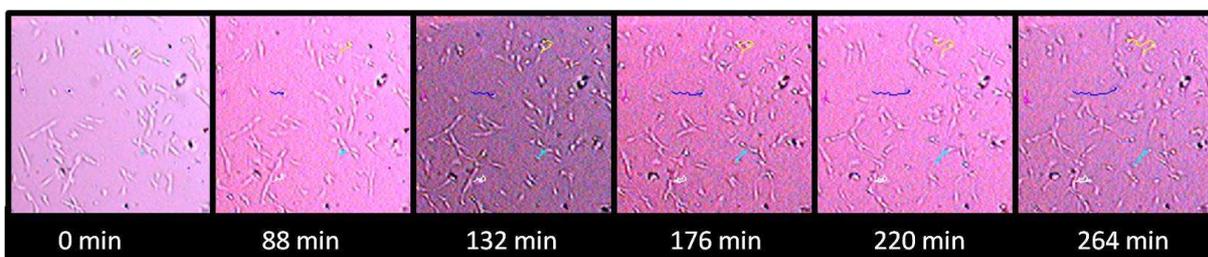


Figure 96- « Tracking » de la motilité de RPE1 sur un carré de 1000 µm de côté.

Sur la Figure 96, le tracking en bleu d'une cellule est montrée. Au bout de 264 min (soit 4h et 24 min), la cellule s'étant divisée, le tracking a été arrêté. La vitesse de déplacement de la cellule suivie est de 0,5-1,6 $\mu\text{m}/\text{min}$. Il est possible de diminuer la vitesse de prolifération et d'ainsi visualiser la motilité sur une durée plus longue, en sevrant le milieu de culture en sérum.

5.2.3 Suivi de l'apoptose

Pour visualiser la mort cellulaire, un film a été réalisé en laissant le capteur fonctionner. Comme décrit précédemment, la température à la surface du capteur ne permet plus la viabilité cellulaire. Une image a été prise toutes les 5 min pendant 24h.

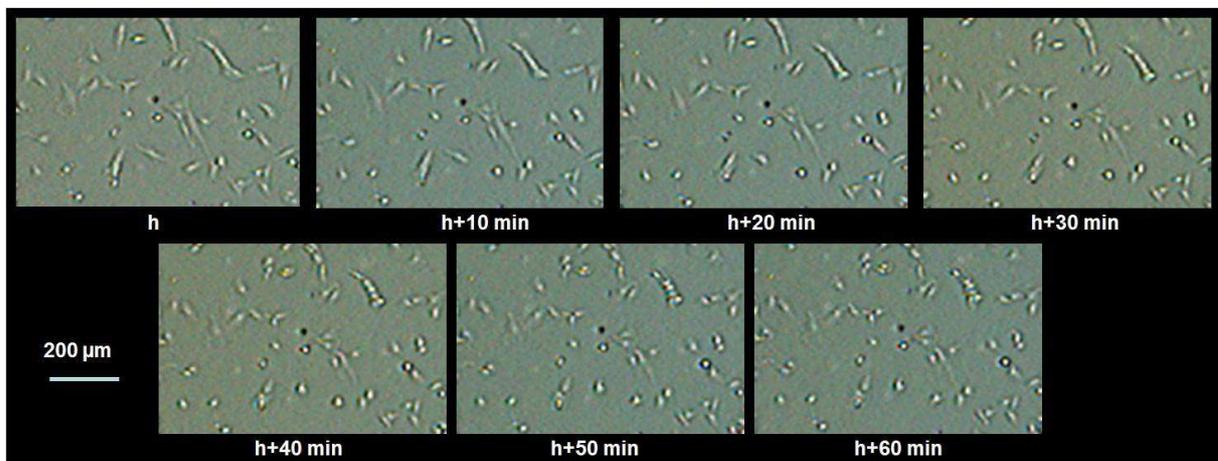


Figure 97- Suivi de l'apoptose

Les cellules s'arrondissent rapidement (Figure 97). La forme allongée caractéristique des cellules est visible au début de l'expérience (temps h). Au bout de 60 minutes, toutes les cellules se sont arrondies et sont plus brillantes. Le phénomène est bien plus rapide que dans le cas de la mort programmée des cellules ou apoptose. Si l'on souhaitait vérifier la similarité avec l'apoptose de notre observation, il pourrait être introduit dans le milieu une toxine telle que la staurosporine (à 100 nM, la totalité de la population sera morte après 48 h).

Après 20h d'observation constante de cette population, nous avons observé un changement rapide du contraste des cellules (Figure 98). La cellule ronde et brillante est remplacée par une forme noire qui ressemble à la morphologie caractéristique des cellules en bonne santé. Ce phénomène n'est actuellement pas compris.

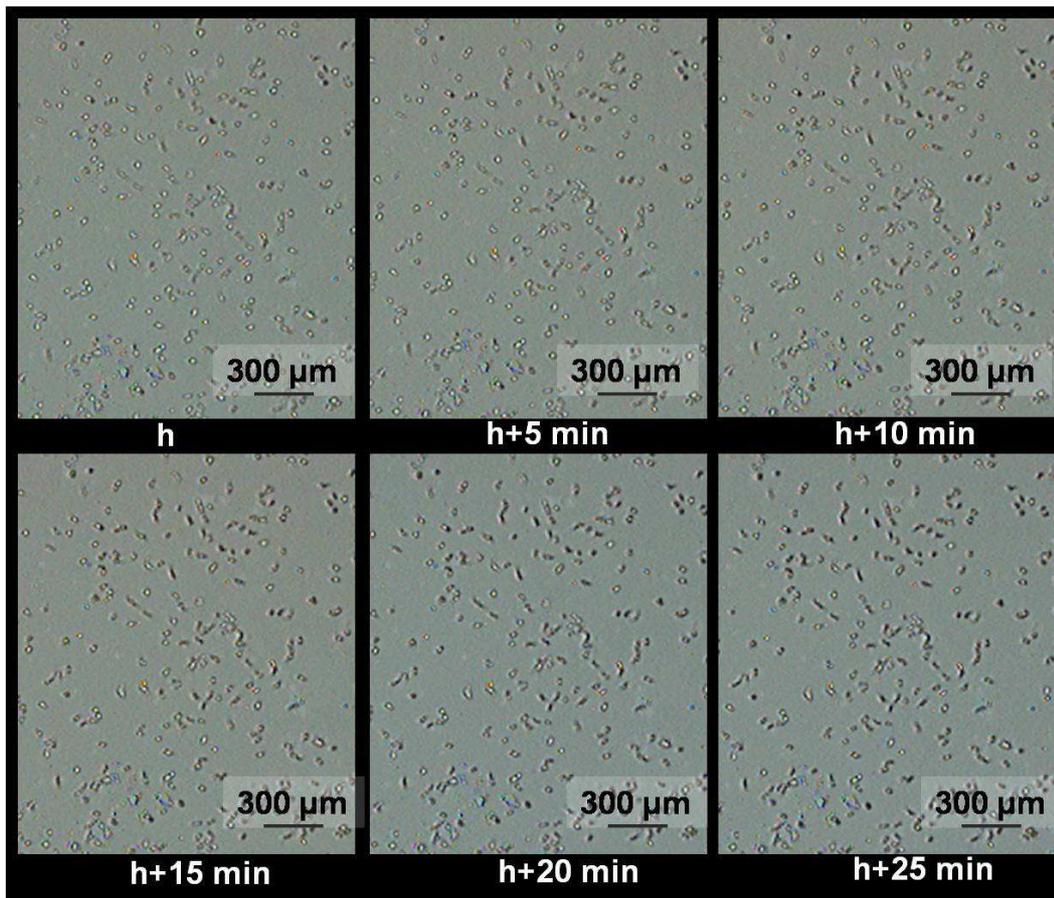


Figure 98- Changement de contraste après 20h d'observation, en une demi-heure lors du suivi de l'apoptose

Le microsysteme a été amélioré pour fonctionner comme un mini-vidéomicroscope. Pour éviter un échauffement supérieur 37°C, la caméra est arrêtée entre 2 prises d'images. Le conditionnement du capteur permet le suivi sur 72h potentiellement d'une population cellulaire. Différents évènements dynamiques ont pu être enregistrés : mitose, motilité, prolifération, apoptose. Pour compléter cette étude des grandes fonctions cellulaires impliquant un changement morphologique il serait intéressant de suivre la différenciation de cellules. Par exemples, les myoblastes de la lignée C2C12 peuvent en présence de sérum de cheval fusionner pour se différencier en myotubes (cellule très allongée)

6 Conclusion

Nous présentons un bilan de la mise au point d'un prototype d'imagerie de cellules adhérentes. Les avantages et limitations du prototype sont discutés. Puis, quelques perspectives d'évolution de ce dernier sont proposées. Enfin, des applications différentes sont envisagées.

6.1 Bilan

6.1.1 Résumé de la démarche

Un microsysteme de visualisation de cellules par imagerie de contact a été mis au point. Il intègre :

- Un substrat pour cellules sous forme d'une lamelle de verre fonctionnalisée d'une épaisseur optimisée.
- Un capteur dont la connectique est protégée par une résine isolante biocompatible.
- Une chambre formée par une boîte de Petri percée et collée au-dessus du capteur.
- Une LED pour l'éclairage, fixée à une boîte en plastique noir.
- Un circuit électronique de pilotage
- Une liaison par câble Fire-Wire vers un ordinateur et ses logiciels d'acquisition et de traitement d'image.

Pour réaliser cet assemblage, le travail a été effectué selon plusieurs axes :

- L'étude de différents matériaux pour choisir :
 - Des isolants pour la connectique du capteur, l'un assurant une protection mécanique (Vitalit 1690), le deuxième améliorant la robustesse du système (Parylène).
 - Une colle spécifique pour connecter la boîte de Petri et le boîtier du capteur (OG11631).
- L'optimisation de l'image fournie par le système optique en examinant l'effet de l'épaisseur du substrat pour cellules.
- La caractérisation de la structure du système optique utilisé et des images qu'il fournit.
- Des observations cellulaires pour valider le système :
 - De plusieurs lignées cellulaires pour observer différentes morphologies
 - Des événements de la vie cellulaire, comme des mitoses qui amènent à la prolifération, ou comme la motilité de certaines cellules.

Néanmoins, deux décisions ont été prises au début de cette thèse :

- Le choix technologique d'un capteur. Il s'agissait d'un capteur CCD à bas coût produit en grande série.
- La volonté de visualiser des cellules adhérentes.

Elles amènent des contraintes d'importance inégales. Ainsi, le temps d'adhésion des cellules est une exigence limitée, car optimisable par un traitement de surface maîtrisé par ailleurs. En revanche, le choix d'une électronique commerciale est plus contraignant. En effet, celle-ci permet une obtention aisée d'images, mais en contrepartie un prétraitement est déjà réalisé (démosaïquage en particulier). L'accès aux données brutes offrirait un meilleur contrôle des informations.

Les contraintes et les différentes variables du système peuvent être résumées par le tableau suivant. Nous avons distingué les variables que nous pouvons contrôler d'ores et déjà à celles qui devront être maîtrisées dans le futur. Ces études à envisager ont été discutées au cours du document. Les perspectives les plus prometteuses sont détaillées par la suite.

	contraintes	variables	
		maîtrisées	à maîtriser
			dans le futur
préparation du capteur	forme du boîtier et du capteur	matériau déposé pour l'isolation entre l'électronique et les liquides	
		formation d'une chambre simple	circulation microfluidique
		biocompatibilité des matériaux	
adhésion cellulaire	temps d'adhésion	fonctionnalisation de la surface	
observation	fréquence d'observation définie selon l'événement		effets de l'éclairage
		lignées cellulaires différentes	luminescence/fluorescence
optimisation de l'observation		présence d'une lamelle	nature de la surface si les cellules sont posées directement sur le capteur
		épaisseur de la lamelle	réglage de la distance capteur/lamelle
Suivi dans le temps	Tenue du capteur dans le temps en présence de liquide		observer des cellules se différencier
	Maintien des conditions physiologiques	volume de solution suffisant pour maintenir la culture sur plusieurs jours	régulation de la température
analyse d'image	taille des pixels		utiliser un capteur avec des plus petits pixels
	capteur couleur		effet du démozaïquage

6.1.2 Comparaison avec des outils d'observation de cellules

Pour pouvoir conclure sur les avantages et les limitations de notre prototype, il est utile, au préalable, de le comparer d'une part aux dispositifs d'imagerie directe pour cellules et d'autre part aux outils classiques que sont les microscopes.

Comparaison de notre microsystème avec l'état de l'art des dispositifs d'imagerie directe

Les dispositifs d'imagerie directe ont été décrits en détails dans l'introduction. Nous proposons de comparer le microsystème d'imagerie de contact que nous avons développé sur différents points, selon le tableau de la page suivante.

Il ressort de ce tableau que notre microsystème possède les pixels parmi les plus petits de l'état de l'art de l'imagerie directe. Les images sont suffisantes pour imager des cellules adhérentes et les suivre dans le temps.

Néanmoins, la résolution intrinsèque du capteur est très inférieure à celle obtenue par le microscope optofluidique [92]. Comme précisé dans l'introduction, cette technique nécessite que les cellules circulent devant le capteur et elle s'avère donc inapplicable à des cellules adhérentes.

Les deux autres équipes réalisant des microsystèmes d'imagerie de contact ont des résultats très différents. La collaboration entre UCLA et MIT permet de compter rapidement des cellules, mais aucunement de suivre dans le temps leur morphologie. Enfin, l'équipe du Dr Abshire présente des images très décevantes en termes de champ de vue et de morphologie de cellules adhérentes.

Par conséquent, le système d'imagerie directe que nous avons développé, est à l'heure actuelle le seul qui permette de caractériser la morphologie de cellules adhérentes.

Référence	Objectifs	Principe d'imagerie	Conditionnement			Capteur choisi
			Description	Biocompatible	facilité de mise en œuvre	Description
Equipe du Pr. Psaltis [91,92]	Avoir une meilleure résolution pour visualiser <i>C. elegans</i>	Balayage de l'objet devant des petits trous	*Surface « aplaniée » par 2 µm de SU8, puis 300nm d'aluminium, et 200 nm de PMMA	oui	-	Taille de pixels de 9,9 µm x 9,9 µm pour les vers et 5,2 µm x 5,2 µm pour les cellules
			* Chambre de circulation en PDMS			
Collaboration entre UCLA et MIT [83-87]	Dispositif à bas coût pour le suivi du nombre de CD4+T des malades du sida	Suivi de la figure de diffraction	PDMS entre des lamelles de verre pour construire plusieurs chambres superposées	oui	++	* Capteur 11 millions de pixels
						* Taille de pixels de 9 µm x 9 µm et 2,2 µm x 2,2 µm dans leur dernier papier [87]
Equipe du Dr. Abshire [81,82]	Développement d'un capteur pour l'intégration dans une clinique pour cellule individuelle	Imagerie de contact des cellules	* Protection des connecteurs avec la Loctite 3108, soluble dans l'eau	non	+	* Capteur 96 x 96 pixels
			* Tube en plastique collé au boîtier du capteur pour former un puits pour la culture cellulaire			* Taille de pixels de 8,4 µm x 8,4 µm
Nos travaux	Développement d'un vidéomicroscope sur puce pour l'observation et le suivi de cellules adhérentes	Imagerie de contact des cellules	* Protection des connecteurs avec le Glop top "Vitalit 1690" biocompatible	oui	+	* Capteur 480x 640 pixels
			* Boîte de Pétri trouée et collée, à l'aide de l'OG131 biocompatible, au boîtier du capteur pour former un compartiment			* Taille de pixels de 5,6 µm x 5,6 µm
			* Protection finale à l'aide d'une fine couche de parylène C			

Comparaisons de notre microsystème avec la microscopie et la vidéomicroscopie

Notre microsystème ressemble dans ses objectifs à un vidéomicroscope classique

Ses images fournissent des informations similaires à un vidéomicroscope « en lumière blanche » pour un faible grossissement comme un objectif 4X. Cependant, il permet d'observer une surface de culture plus importante. En effet, il image sur l'ensemble de la matrice de 640 par 480 pixels soit presque 10 mm². Pour imager une telle surface avec un microscope classique, l'ouverture angulaire de l'objectif devrait être très importante. Avec les objectifs 4X du laboratoire, le champ de vue est environ 5 fois plus faible. En revanche, les images fournies ne donnent pas encore accès à la structure interne des cellules. Il n'est ainsi pas compétitif vis-à-vis des résolutions atteignables avec des objectifs 20X ou 40X classiquement utilisés en microscopie.

Notre microsystème est bien plus petit et moins encombrant que les microscopes utilisés en routine dans les laboratoires de biologie cellulaire. Néanmoins, il ne permet pas de visualiser les phénomènes luminescent ou fluorescent dont les biologistes se servent fréquemment en recherche.

La comparaison entre les microscopes classiques et notre microsystème peut être résumée par le tableau suivant :

	microscopes	notre microsystème
Résolution	4X à 100X	similaire à 4X
Champ de vue	~2 mm ² pour un objectif 4X	~10 mm ²
Morphologie cellulaire	Oui	Oui
Structure intracellulaire	Oui	Non
Visualisation de phénomène luminescent ou fluorescent	Oui	Non
Coût	10-100 k€	1-10 k€
Encombrement	m ³	dm ³
Insertion dans un incubateur	Non	Oui

6.1.3 Apports de notre prototype et applications potentielles

Le premier avantage apporté par notre prototype est donc inhérent à ses dimensions : il est portable.

Comme beaucoup de systèmes d'imagerie de contact, il permet d'observer sur un grand champ. Pour observer le même champ avec une résolution similaire avec un microscope, il faudrait un objectif très coûteux. Cette augmentation de surface peut être intéressante pour visualiser des croissances de grandes cellules telles que des neurones.

Résistant à l'humidité et aux liquides, il peut être inséré directement dans une étuve de culture cellulaire, pour fonctionner comme un vidéomicroscope. Il est simple d'utilisation et pourrait remplacer des microscopes pour suivre en temps réel l'évolution d'une population de cellules et leur morphologie.

6.2 Limitations et perspectives

6.2.1 Amélioration de la résolution

La résolution de notre système dépend de la taille des pixels. Comme explicité dans le chapitre 2, elle est selon le critère de Shannon au double de la taille d'un pixel. Peu satisfaisante pour notre microsystème ($11,2 \mu\text{m}$), elle est donc potentiellement améliorable en utilisant des pixels de plus petites tailles. Les capteurs actuellement dans le commerce possèdent des pixels de $1,68 \mu\text{m}$ (capteurs CCD de chez Sony ou Sharp) voire de $1,4 \mu\text{m}$ (capteurs CMOS de chez Aptina Imaging ou Sony ou ST Microelectronics). Des travaux universitaires atteignent des taille de pixels de $0,7 \mu\text{m}$ [125, 126] ou même de $0,5 \mu\text{m}$ [127]. Selon les prévisions de la société ST Microélectronique (Figure 99), les tailles de pixels les plus petits commercialisés vers 2010 seront de $0,65 \mu\text{m}$. La résolution théorique selon Shannon serait alors de $1,3 \mu\text{m}$ soit 8 fois meilleure que pour notre système et similaire aux microscopes optiques. Cette résolution permettrait probablement d'avoir accès à la structure intracellulaire.

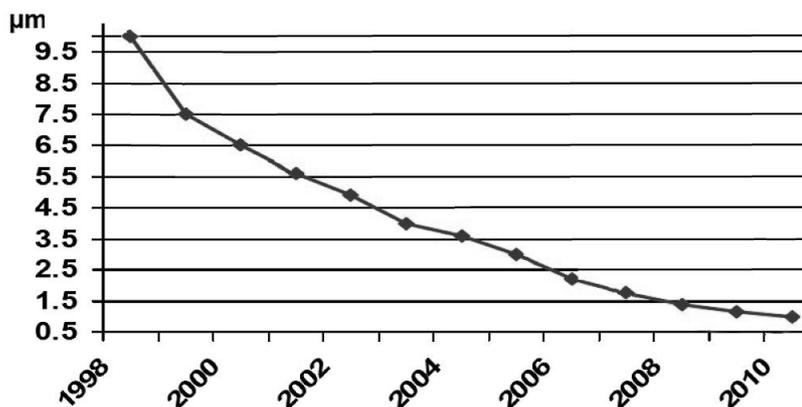


Figure 99- Evolution et prévision de la taille des pixels des capteurs d'image CMOS de ST Microelectronics [CMOS Image Sensor, Jean-Luc Jaffard, Imaging Division, ST Microelectronics, presentation for the DATE Workshop Munich ; March 14th 2008.

La diminution de taille de pixels étant motivée industriellement par le marché des caméraphones, elle s'accompagne généralement d'une diminution de la taille de la matrice de photodétecteurs. La surface sensible étant plus faible, le champ visualisé par un dispositif similaire au nôtre diminuerait alors également.

De plus, l'hypothèse d'une résolution limitée uniquement par la taille des pixels n'est probablement plus valable à de telles dimensions. En effet, la réduction de la taille des pixels en dessous de 3 μm fait apparaître des effets de diffraction dans l'empilement d'un photosite, et le signal collecté par les pixels adjacents (ou diaphotie) augmente. Le tracé de rayons est bien adapté pour des pas de pixel supérieurs à 2 ou 3 μm . Pour des pixels de pas inférieur à 2 μm , des simulations électromagnétiques, à l'aide des équations de Maxwell, sont nécessaires [128]. Il serait donc intéressant de tester des pixels de taille inférieure à 3 μm pour vérifier l'hypothèse d'une meilleure résolution avec des pixels aussi petits. Un nouveau capteur, CMOS Aptina Imaging monochrome avec des pixels de 2,2 μm , et son électronique associée ont été commandés pour cela et seront testés prochainement.

6.2.2 Visualisation de cellules en luminescence ou fluorescence

Une amélioration intéressante pour la biologie cellulaire serait de pouvoir détecter des phénomènes luminescent ou fluorescent.

Un défi similaire à la luminescence ou à la fluorescence concerne la détection par notre caméra d'un signal lumineux faible. Nos essais de détection de la luminescence sur des lignées exprimant la *luciférase renilla* ou la *luciférase firefly* ont été infructueux, car le signal détectable était probablement du même ordre de grandeur voire inférieur au bruit de la caméra (bruits thermique et de lecture).

Le défi de la détection de la fluorescence est la séparation entre la lumière d'excitation et la lumière d'émission. Les équipes présentées dans l'introduction (Figure 13) déposent des filtres très efficaces pour observer la fluorescence en transmission. Des montages alternatifs peuvent être cités :

- a) Il s'agit par exemple d'illuminer dans l'épaisseur du canal microfluidique, où circule la solution à détecter, dans une configuration similaire à un microscope macroscopique de type TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) (Figure 100a). Sur notre microsystème cette solution consisterait à fournir la lumière d'excitation par la lamelle de verre. L'encombrement du boîtier du capteur actuel rend cette possibilité difficile à réaliser.
- b) L'illumination peut être réalisée à l'aide d'un prisme comme pour un microscope à résonance de plasmons de surface (SPR) (Figure 100b). Des petits prismes de 3mm de côté peuvent être achetés, mais peu de biologistes cellulaires utilisent cette technique.
- c) La source d'excitation est placée au-dessus du photodétecteur (Figure 100c). Cette solution est élégante dans le cas d'un liquide. Dans le cas de cellules, la présence de la source serait un obstacle pour visualiser correctement la morphologie cellulaire.

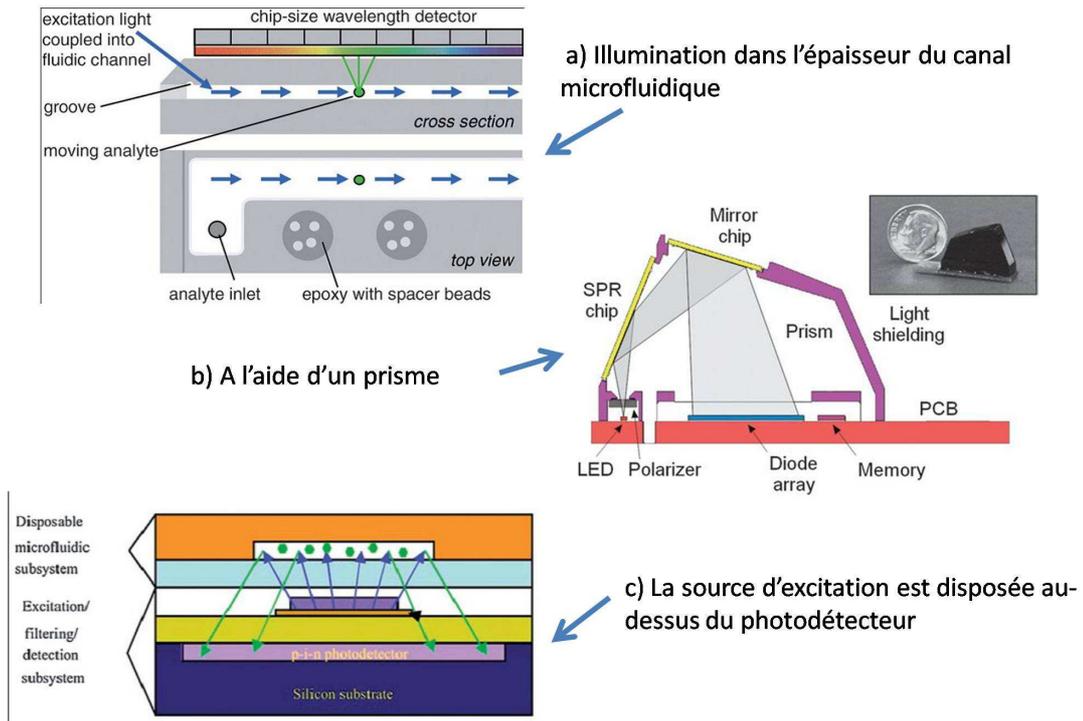


Figure 100- Schémas de dispositifs de détection de la fluorescence sur puce, d'après [129, 130].

Une équipe propose d'utiliser des filtres polarisants pour observer la fluorescence (Figure 101).

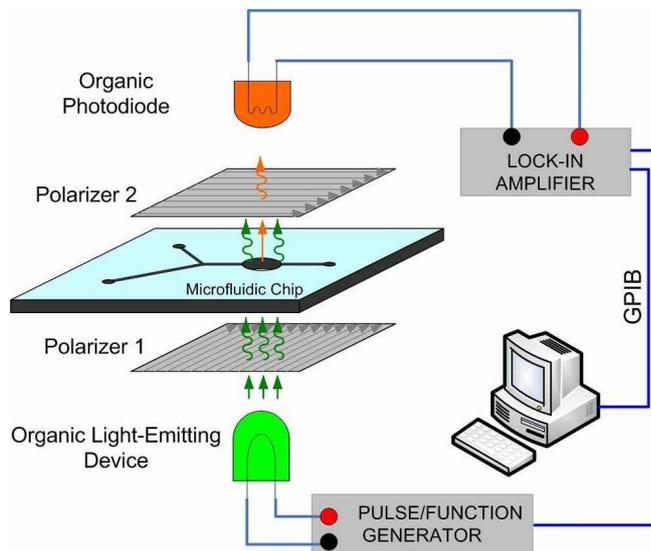


Figure 101- Schéma d'un dispositif de détection de la fluorescence sur puce grâce à des filtres polarisants[131].

Le premier filtre polarise la lumière d'excitation. La lumière absorbée par le fluorophore, puis réémise par le fluorophore est dépolarisée. Le deuxième filtre permet d'« éteindre » la lumière d'excitation à l'aide d'une polarisation croisée et polarise la lumière émise qui est détectée par le photodétecteur.

Les essais réalisés avec les filtres polarisants fins similaires à ceux de cette équipe (film polarisant de chez Edmund Optics) se sont révélés infructueux. Comme ces polariseurs fluorescent, des billes fluorescentes n'ont pas été détectées sur les images.

D'autres solutions envisageables pourraient être d'utiliser des fluorophores :

- dont la lumière d'excitation se situe dans l'UV pour être filtré par la lamelle de verre. Des LEDs dans l'UV commencent à être commercialisées. Néanmoins, le rayonnement UV détériore l'ADN des cellules, et les fluorophores correspondants sont de plus en plus évités par les biologistes cellulaires.

- avec un décalage de Stokes important comme les terres rares ou les boîtes quantiques (quantum dots), qui sont souvent toxiques pour les cellules.

6.3 Applications à d'autres domaines

Un brevet sur notre dispositif a été déposé en juin 2009. Une étude sur la vidéomicroscopie de contact est actuellement réalisée par le Bureau d'Etude Marketing (BEM) du CEA. Les fabricants de systèmes d'imagerie contactés pour cette étude ont exprimé leur intérêt pour des dispositifs miniaturisés et automatisables. L'automatisation du positionnement de l'échantillon, de la prise d'image et de l'analyse apparaît cruciale dans l'objectif de gagner du temps lors d'applications routinières et à grand débit telles que la lecture en parallèle instantanée d'une microplaque lors d'un criblage HTS ou pour la cristallographie. Certains fabricants d'automates pour les laboratoires d'analyses sont à la recherche de systèmes d'imagerie sans objectifs, automatisables et intégrables avec d'autres équipements. Un autre secteur possible concerne l'analyse de textiles techniques, plus spécifiquement pour mesurer des caractéristiques du tissu soumis à des conditions physiques ou chimiques variées, mais aussi pour détecter des croissances bactériennes sur les tissus. Enfin, une autre marque d'intérêt concerne le suivi in situ de pollens dans l'environnement.

Bibliographie

1. Fara, P., *A microscopic reality tale*. Nature, 2009. **459**(7247): p. 642-644.
2. Hooke, R., *Micrographia or Some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses*. J. Martyn and J. Allestry, Londres, 1665.
3. Callen, J.-c., *Biologie cellulaire, Des molécules aux organismes, Cours et questions de révision*. Editions Dunod, Paris, 1999.
4. Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, and Peter Walter., *Molecular Biology of the cell, Fourth Edition*. Garland Science Textbooks, London, 2002
5. Péré, J.-P., *La microscopie*. collection 128 sciences Nathan université 1994.
6. <http://www.microscopyu.com/articles/formulas/formulasresolution.html>.
7. David L.Spector, R.D.G., *Basic Methods in Microscopy, Protocol and concepts from cell: A Laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York, 2006.
8. ImageJ, <http://rsbweb.nih.gov/ij/>.
9. Lippincott-Schwartz, J. and G.H. Patterson, *Development and use of fluorescent protein markers in living cells*. Science, 2003. **300**(5616): p. 87-91.
10. Chudakov, D.M., S. Lukyanov, and K.A. Lukyanov, *Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging*. Trends in Biotechnology, 2005. **23**(12): p. 605-613.
11. Keshishian, H., *Ross Harrison's "The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement"*. Journal of Experimental Zoology Part a-Comparative Experimental Biology, 2004. **301A**(3): p. 201-203.
12. Rieder, C.L. and A. Khodjakov, *Mitosis through the microscope: Advances in seeing inside live dividing cells*. Science, 2003. **300**(5616): p. 91-96.
13. Shotton, D.M., *Video-Enhanced Light-Microscopy and its applications in cell biology*. Journal of Cell Science, 1988. **89**: p. 129-150.
14. Robert D.Goldman, D.L.S., *Live cell imaging. A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory press, New York, 2005.
15. *Microscopic marvels*. Nature, 2009. **459**(7247): p. 615.
16. Whitesides, G.M., *The origins and the future of microfluidics*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 368-373.
17. Manz, A., N. Graber, and H.M. Widmer, *Miniaturized total chemical-analysis systems - a novel concept for chemical sensing*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1990. **1**: p. 244-248.
18. Andersson, H. and A. van den Berg, *Microfluidic devices for cellomics: a review*. Sensors and Actuators B-Chemical, 2003. **92**(3): p. 315-325.
19. Hansen, C.L., et al., *A robust and scalable microfluidic metering method that allows protein crystal growth by free interface diffusion*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2002. **99**(26): p. 16531-16536.
20. Fink, T., Azioune, Dupont, Chatelain, Bornens, Piel, *Comparative study and improvement of current cell micro-patterning techniques*. Lab on a Chip, 2007. **7**(6): p. 672-680.
21. Aurelie Bouchet , E.D., Pascal Mailley , Thierry Livache, François Chatelain, Vincent Haguët *Contactless Electrofunctionalization of a Single Pore*. Small, 2009. **sous presse**.
22. Duffy, D.C., et al., *Rapid prototyping of microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane)*. Analytical Chemistry, 1998. **70**(23): p. 4974-4984.

23. McDonald, J.C. and G.M. Whitesides, *Poly(dimethylsiloxane) as a material for fabricating microfluidic devices*. Accounts of Chemical Research, 2002. **35**(7): p. 491-499.
24. Sia, S.K. and G.M. Whitesides, *Microfluidic devices fabricated in poly(dimethylsiloxane) for biological studies*. Electrophoresis, 2003. **24**(21): p. 3563-3576.
25. Regehr, K.J., et al., *Biological implications of polydimethylsiloxane-based microfluidic cell culture*. Lab on a Chip, 2009. **9**(15): p. 2132-2139.
26. Bernhard Wolf, M.B., Helmut Grothe, Christoph Stepper, Johann resseller, Thomas Weyh, *Chapter 9: Lab-on-a-Chip systems for cellular assays*. Biomems, Springer US, 2006.
27. El-Ali, J., P.K. Sorger, and K.F. Jensen, *Cells on chips*. Nature, 2006. **442**(7101): p. 403-411.
28. Gardeniers, H., et al., *Silicon micromachined hollow microneedles for transdermal liquid transport*. Journal of Microelectromechanical Systems, 2003. **12**(6): p. 855-862.
29. Mukerjee, E., et al. *Microneedle array for transdermal biological fluid extraction and in situ analysis*. 2004: Elsevier Science Sa.
30. Liu, C.X., et al., *Cell manipulation with magnetic particles toward microfluidic cytometry*. Journal of Applied Physics, 2009. **105**(10): p. 11.
31. Gaugiran, S., et al., *Optical manipulation of microparticles and cells on silicon nitride waveguides*. Optics Express, 2005. **13**(18): p. 6956-6963.
32. Wang, M.M., et al., *Microfluidic sorting of mammalian cells by optical force switching*. Nature Biotechnology, 2005. **23**(1): p. 83-87.
33. Di Carlo, D., L.Y. Wu, and L.P. Lee, *Dynamic single cell culture array*. Lab on a Chip, 2006. **6**(11): p. 1445-1449.
34. Frenea, M., et al., *Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis*. Materials Science & Engineering C-Biomimetic and Supramolecular Systems, 2003. **23**(5): p. 597-603.
35. Fuchs, A.B., et al., *Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples*. Lab on a Chip, 2006. **6**(1): p. 121-126.
36. MacDonald, M.P., G.C. Spalding, and K. Dholakia, *Microfluidic sorting in an optical lattice*. Nature, 2003. **426**(6965): p. 421-424.
37. Schrum, D.P., et al., *Microchip flow cytometry using electrokinetic focusing*. Analytical Chemistry, 1999. **71**(19): p. 4173-4177.
38. H. Chetouani, V.H., C. Jeandey, C. Pigot, A. Walther, N.M. Dempsey, F. Chatelain, B. Delinchant, G. Reyne, *Diamagnetic levitation of beads and cells above permanent magnets*. Proceedings of the 14th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers & Eurosensors '07), Lyon, France, June 10-14, 2007. **1**: p. 715-178.
39. They, M., et al., *The extracellular matrix guides the orientation of the cell division axis*. Nature Cell Biology, 2005. **7**(10): p. 947-U29.
40. They, M., et al., *Anisotropy of cell adhesive microenvironment governs cell internal organization and orientation of polarity*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006. **103**(52): p. 19771-19776.
41. Azioune, A., et al., *Simple and rapid process for single cell micro-patterning*. Lab on a Chip, 2009. **9**(11): p. 1640-1642.
42. Guillou, H., et al., *Lamellipodia nucleation by filopodia depends on integrin occupancy and downstream Rac1 signaling*. Experimental Cell Research, 2008. **314**(3): p. 478-488.

43. Kim, L., et al., *A practical guide to microfluidic perfusion culture of adherent mammalian cells*. Lab on a Chip, 2007. **7**(6): p. 681-694.
44. Paguirigan, A.L. and D.J. Beebe, *Microfluidics meet cell biology: bridging the gap by validation and application of microscale techniques for cell biological assays*. Bioessays, 2008. **30**(9): p. 811-821.
45. Tanaka, Y., et al., *Biological cells on microchips: New technologies and applications*. Biosensors & Bioelectronics, 2007. **23**(4): p. 449-458.
46. Stangegaard, M., et al., *A biocompatible micro cell culture chamber (mu CCC) for the culturing and on-line monitoring of eukaryote cells*. Lab on a Chip, 2006. **6**(8): p. 1045-1051.
47. Dufva, M. and M. Stangegaard, *Comment on "Microfluidics meets cell biology: bridging the gap by validation and application of microscale techniques for cell biological assays"*. Bioessays, 2009. **31**(2): p. 255-255.
48. Suh, K.-J.J.a.K.-Y., *A multi-layer microfluidic device for efficient culture and analysis of renal tubular cells*. Lab on a Chip, 2009(sous presse).
49. Kim, S.M., S.H. Lee, and K.Y. Suh, *Cell research with physically modified microfluidic channels: A review*. Lab on a Chip, 2008. **8**(7): p. 1015-1023.
50. Xavier Gidrol, B.F., Lamy Ghenim, Vincent Haguët, Nathalie Picollet-D'hahan and Béatrice Schaack, *2D and 3D cell microarrays in pharmacology* Current Opinion in Pharmacology, 2009. **sous presse**.
51. Keller, P.J., F. Pampaloni, and E.H.K. Stelzer, *Life sciences require the third dimension*. Current Opinion in Cell Biology, 2006. **18**(1): p. 117-124.
52. West, J., et al., *Micro total analysis systems: Latest achievements*. Analytical Chemistry, 2008. **80**(12): p. 4403-4419.
53. McClain, M.A., et al., *Microfluidic devices for the high-throughput chemical analysis of cells*. Analytical Chemistry, 2003. **75**(21): p. 5646-5655.
54. Pal, R., et al., *An integrated microfluidic device for influenza and other genetic analyses*. Lab on a Chip, 2005. **5**(10): p. 1024-1032.
55. Yotter, R.A. and D.M. Wilson, *Sensor technologies for monitoring metabolic activity in single cells - Part II: Nonoptical methods and applications*. Ieee Sensors Journal, 2004. **4**(4): p. 412-429.
56. Dunlop, J., et al., *High-throughput electrophysiology: an emerging paradigm for ion-channel screening and physiology*. Nature Reviews Drug Discovery, 2008. **7**(4): p. 358-368.
57. Jenkner, M., et al. *Cell-based CMOS sensor and actuator arrays*. 2004: Ieee-Inst Electrical Electronics Engineers Inc.
58. Kintzios, S., et al., *Development of a novel, multi-analyte biosensor system for assaying cell division: Identification of cell proliferation/death precursor events*. Biosensors & Bioelectronics, 2006. **21**(7): p. 1365-1373.
59. Brischwein, M., et al., *Electric cell-substrate impedance sensing with screen printed electrode structures*. Lab on a Chip, 2006. **6**(6): p. 819-822.
60. Linderholm, P., et al., *Two-dimensional impedance imaging of cell migration and epithelial stratification*. Lab on a Chip, 2006. **6**(9): p. 1155-1162.
61. Moore, E., et al. *Monitoring of cell growth in vitro using biochips packaged with indium tin oxide sensors*. 2009: Elsevier Science Sa.
62. Wang, L., et al., *An automatic and quantitative on-chip cell migration assay using self-assembled monolayers combined with real-time cellular impedance sensing*. Lab on a Chip, 2008. **8**(6): p. 872-878.

63. Christen, J.B. and A.G. Andreou, *Design, Fabrication, and Testing of a Hybrid CMOS/PDMS Microsystem for Cell Culture and Incubation*. Biomedical Circuits and Systems, IEEE Transactions on, 2007. **1**(1): p. 3-18.
64. Baumann, W.H., et al., *Microelectronic sensor system for microphysiological application on living cells*. Sensors and Actuators B-Chemical, 1999. **55**(1): p. 77-89.
65. Goto, M., et al., *Development of a microchip-based bioassay system using cultured cells*. Analytical Chemistry, 2005. **77**(7): p. 2125-2131.
66. Szita, N., et al., *Development of a multiplexed microbioreactor system for high-throughput bioprocessing*. Lab on a Chip, 2005. **5**(8): p. 819-826.
67. Motamedi, M.E., *MOEMS; Micro-opto-electro-mechanical systems*. SPIE, 2005
68. Richard, C., et al., *An integrated hybrid interference and absorption filter for fluorescence detection in lab-on-a-chip devices*. Lab on a Chip, 2009. **9**(10): p. 1371-1376.
69. Zhu, L., C.S. Lee, and D.L. DeVoe, *Integrated microfluidic UV absorbance detector with attomol-level sensitivity for BSA*. Lab on a Chip, 2006. **6**(1): p. 115-120.
70. Naoghare, P.K., H.T. Kwon, and J.M. Song, *An automated method for in vitro anticancer drug efficacy monitoring based on cell viability measurement using a portable photodiode array chip*. Lab on a Chip, 2007. **7**(9): p. 1202-1205.
71. Chediak, J.A., et al. *Heterogeneous integration of CdS filters with GaN LEDs for fluorescence detection microsystems*. 2004: Elsevier Science Sa.
72. Ren, K.N., et al., *Whole column fluorescence imaging on a microchip by using a programmed organic light emitting diode array as a spatial-scanning light source and a single photomultiplier tube as detector*. Lab on a Chip, 2007. **7**(11): p. 1574-1580.
73. Adams, M.L., et al., *Microfluidic integration on detector arrays for absorption and fluorescence micro-spectrometers*. Sensors and Actuators a-Physical, 2003. **104**(1): p. 25-31.
74. Unlimited, S., *Image Sensor Market Review and Forecast*. Report OM-40 4th Edition, 2007.
75. Breslauer, D.N., et al., *Mobile Phone Based Clinical Microscopy for Global Health Applications*. PLoS ONE, 2009. **4**(7): p. e6320.
76. Tkaczyk, T.S.R., Jeremy D.; Rahman, Mohammed; Christenson, Todd C.; Gaalema, Stephen; Dereniak, Eustace L.; Richards-Kortum, Rebecca; Descour, Michael R., *Multi-modal miniature microscope: 4M Device for bio-imaging applications - an overview of the system*. Proceedings of the SPIE, 2005. **5959**,(138-146).
77. *A device and system for in vivo imaging*, in *brevet mondial WO 01/6995 A2*, G. Imaging, Editor. 2001.
78. <http://www.givenimaging.com>.
79. <http://fr.wikipedia.org/wiki/Photogramme>.
80. Mallard, F., et al., *Opto-electronic DNA chip: high performance chip reading with an all-electric interface*. Biosensors & Bioelectronics, 2005. **20**(9): p. 1813-1820.
81. Ji, H.H., et al., *Contact imaging: Simulation and experiment*. Ieee Transactions on Circuits and Systems I-Regular Papers, 2007. **54**(8): p. 1698-1710.
82. Honghao, J., et al. *A CMOS contact imager for locating individual cells*. in *Circuits and Systems, 2006. ISCAS 2006. Proceedings. 2006 IEEE International Symposium on*. 2006.
83. Sungkyu Seo, T.-W.S., Anthony Erlinger and Aydogan Ozcan, *Multi-color LUCAS : Lensfree On-chip Cytometry Using Tunable Monochromatic Illumination and Digital Noise Reduction* Cellular and Molecular Bioengineering, 2008. **1**(2-3): p. 146-156.
84. Seo, S., et al., *Lensfree holographic imaging for on-chip cytometry and diagnostics*. Lab on a Chip, 2009. **9**(6): p. 777-787.

85. Ozcan, A. and U. Demirci, *Ultra wide-field lens-free monitoring of cells on-chip*. Lab on a Chip, 2008. **8**(1): p. 98-106.
86. Moon, S., et al., *Integrating microfluidics and lensless imaging for point-of-care testing*. Biosensors & Bioelectronics, 2009. **24**(11): p. 3208-3214.
87. Su, T.W., et al., *High-Throughput Lensfree Imaging and Characterization of a Heterogeneous Cell Solution On a Chip*. Biotechnology and Bioengineering, 2009. **102**(3): p. 856-868.
88. Mario, U., et al. *Cell Clinics Technology Platform for Cell-Based Sensing*. in *Life Science Systems and Applications Workshop, 2006. IEEE/NLM*. 2006.
89. Somashekar Bangalore, P. and A. Pamela, *On-Chip Capacitance Sensing for Cell Monitoring Applications*. Sensors Journal, IEEE, 2007. **7**(3): p. 440-447.
90. Prakash, S.B. and P. Abshire. *A CMOS capacitance sensor that monitors cell viability*. in *Sensors, 2005 IEEE*. 2005.
91. Heng, X., et al., *Optofluidic microscopy - a method for implementing a high resolution optical microscope on a chip*. Lab on a Chip, 2006. **6**(10): p. 1274-1276.
92. Cui, X.Q., et al., *Lensless high-resolution on-chip optofluidic microscopes for Caenorhabditis elegans and cell imaging*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008. **105**(31): p. 10670-10675.
93. Masters, J.R., *HeLa cells 50 years on: the good, the bad and the ugly*. Nature Reviews Cancer, 2002. **2**(4): p. 315-319.
94. Michel, R., et al., *Selective molecular assembly patterning: A new approach to micro- and nanochemical patterning of surfaces for biological applications*. Langmuir, 2002. **18**(8): p. 3281-3287.
95. El Gamal, A. and H. Eltoukhy, *CMOS image sensors*. Ieee Circuits & Devices, 2005. **21**(3): p. 6-20.
96. Fossum, E.R. *CMOS image sensors: electronic camera on a chip*. in *Electron Devices Meeting, 1995., International*. 1995.
97. <http://www.photo-lovers.org/sensor.shtml.fr>.
98. Casadei, B., *Conception et réalisation d'un capteur en technologie CMOS pour l'observation d'impulsions lumineuses brèves voisines de 1 ns*. Thèse soutenue à l'Université Louis Pasteur, Strasbourg I, 2003.
99. <http://www.dpreview.com/news/0301/fujisuperccd/srstructure.jpg>.
100. <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/digitalimaging/concepts/microlensarray.html>.
101. Bayer, *Color imaging array*. Brevet américain US 3,971,065, 1965.
102. Alleysson, D., *30 ans de mosaïçage*. Traitement du Signal 2004. **21**(6): p. 561-581.
103. Holst, G.C., *CCD arrays, cameras and displays*. JCD Publishing (Winter Park, Etats-Unis) and SPIE Optical Engineering Press (Bellingham, Etats-Unis), 1198.
104. *Fiche technique du capteur Sony ICX098 BQ*.
105. *Fiche technique du microcontrôleur SAA8116 de Philips Semiconductors*.
106. *Communication personnelle d'Yvon Cazaux, Chercheur au LETI/DOPT*.
107. J.Brandrup, E.H.I., *Polymer Handbook, 3rd edition*.
108. <http://www.goodfellow.com/>.
109. Horcas, I., et al., *WSXM: A software for scanning probe microscopy and a tool for nanotechnology*. Review of Scientific Instruments, 2007. **78**(1): p. 8.
110. Y. Okazaki, Y.T., *Microlens array and method of forming same and solid-state image pickup device and method of manufacturing same*. Patent US 5,997,756, 1999.
111. *Communication personnelle de Manuel Théry, Chercheur au laboratoire iRTSV/PCV*.
112. Colas, G., *Piégage et manipulation d'objets biologiques par guide d'ondes optiques, thèse soutenue à l'UJF, Grenoble I*. 2006.

113. Evans, E., K. Ritchie, and R. Merkel, *Sensitive force technique to probe molecular adhesion and structural linkages at biological interfaces*. Biophysical Journal, 1995. **68**(6): p. 2580-2587.
114. Beuthan, J., et al., *The spatial variation of the refractive index in biological cells*. Physics in Medicine and Biology, 1996. **41**(3): p. 369-382.
115. Hanli, L., et al., *Dependence of tissue optical properties on solute-induced changes in refractive index and osmolarity*. Journal of Biomedical Optics, 1996. **1**(2): p. 200-211.
116. Brunstin, A. and P.F. Mullaney, *Differential light-scattering from spherical mammalian-cells*. Biophysical Journal, 1974. **14**(6): p. 439-453.
117. W.Z. Song, C.S.L., P.H. Yap, A.Q. Liu., *Differential Mach-zender interferometer for simultaneously determining size and refractive index of living cells*. Conférence Transducers & Euroensors, Lyon, France, 10-14 juin 2007. 2: p. 2159-2162.
118. L.K. Liu, C.S.L., P.H. Yap, J.H. Ng, J.Z. Hao, S. Takahashi, A.Q. Liu, *Single living cell refractometry using FBG-based resonant cavity*. Transducers & Euroensors, Lyon, France, 10-14 juin 2007. 1: p. 851-854.
119. L.K. Chin, A.Q.L., C.S. Lim, P.H. Yap, *Multiphase flow manipulation for continuous refractive index analysis of single living cell*. Proceedings of the 11th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS), Paris, France, 7 -11 octobre 2007. 2: p. 1348-1350.
120. *Fiche technique de la LED Nichia NSPW500BS*.
121. Mathieu J.P, K Kastler, Fleury P, *Dictionnaire de physique 2ième édition*. Masson, Eyrolles., 1985.
122. Chang, T.Y., et al., *Cell and protein compatibility of parylene-C surfaces*. Langmuir, 2007. **23**(23): p. 11718-11725.
123. Mark, H.F., *Encyclopedia of polymer science and technology 3rd Edition*. Wiley Interscience, 2007.
124. Ciocca, D.R., et al., *Biological and Clinical Implications of Heat Shock Protein 27000 (Hsp27): a Review*. J. Natl. Cancer Inst., 1993. **85**(19): p. 1558-1570.
125. Fife, K., A. El Gamal, and H.S.P. Wong. *A 3MPixel Multi-Aperture Image Sensor with 0.7 micron Pixels in 0.11 micron CMOS*. in *Solid-State Circuits Conference, 2008. ISSCC 2008. Digest of Technical Papers. IEEE International*. 2008.
126. Fife, K., A. El Gamal, and H.S.P. Wong, *A Multi-Aperture Image Sensor With 0.7 micron pixels in 0.11 micron CMOS Technology*. Solid-State Circuits, IEEE Journal of, 2008. **43**(12): p. 2990-3005.
127. Fife, K., A. El Gamal, and H.S.P. Wong. *A 0.5 micron pixel frame-transfer CCD image sensor in 110 nm CMOS*. in *Electron Devices Meeting, 2007. IEDM 2007. IEEE International*. 2007.
128. Vaillant, J., et al., *Uniform illumination and rigorous electromagnetic simulations applied to CMOS image sensors*. Optics Express, 2007. **15**(9): p. 5494-5503.
129. Dandin, M., P. Abshire, and E. Smela, *Optical filtering technologies for integrated fluorescence sensors*. Lab on a Chip, 2007. **7**(8): p. 955-977.
130. Myers, F.B. and L.P. Lee, *Innovations in optical microfluidic technologies for point-of-care diagnostics*. Lab on a Chip, 2008. **8**(12): p. 2015-2031.
131. Yun, S., et al. *On-Chip Fluorescence Detection Using Organic Thin Film Devices for a Disposable Lab-on-a-Chip*. in *University/Government/Industry Micro/Nano Symposium, 2008. UGIM 2008. 17th Biennial*. 2008.

Développement d'un microsystème de visualisation et de suivi de cellules adhérentes par imagerie de contact

Un vidéomicroscope permettant un suivi en temps réel, crucial en biologie cellulaire, est souvent cher et encombrant. Mon projet de thèse vise à développer un vidéomicroscope miniaturisé. L'objectif est de permettre, à terme, une meilleure parallélisation des expériences, mais également de favoriser une intégration avec d'autres capteurs, en l'envisageant comme un élément d'un laboratoire sur puce. La voie de miniaturisation choisie est de supprimer les objectifs de grossissement pour observer les objets directement sur la surface sensible d'un capteur d'image selon un mode appelé « imagerie de contact ». Pour cela, les différents éléments du microsystème ont été choisis et conditionnés pour protéger l'électronique du capteur vis-à-vis des milieux de culture aqueux, et assurer des conditions physiologiques aux cellules d'intérêt. Puis, l'observation des cellules a été optimisée en référence aux images fournies par des microscopes classiques. Le suivi en temps réel d'événements cellulaires (mitose, motilité, apoptose,...) à l'aide de notre prototype a ensuite été démontré. Enfin, les différents composants du système optique ont été caractérisés dans le but de mieux comprendre le mécanisme de formation de l'image et de l'optimiser. La résolution de notre microsystème (11,2 μm) donne accès à la morphologie cellulaire : celle-ci est potentiellement améliorable en utilisant des pixels de plus petite taille. Une perspective intéressante pour la biologie cellulaire serait de pouvoir détecter des phénomènes lumineux ou fluorescents.

Development of a microsystem for the visualization and monitoring of adherent cells
Time-lapse microscopy is crucial in cell biology, but often expensive and it also requires lab space. My Ph.D. project aims at developing a miniaturized videomicroscope. The objective is to eventually parallelize, but also to optimize integration with other sensors on a lab-on-a-chip. The considered approach for miniaturization is to suppress objectives and to observe cells directly on the sensitive surface of an image sensor in a mode called "contact imaging". The microsystem elements have been selected and prepared to protect the sensor electronics from the aqueous culture medium, and to favour physiological conditions for the cells of interest. The observation has been optimized in reference to the images given by classical microscopy. Time-lapse monitoring of cellular events (mitosis, motility, apoptosis...) has been demonstrated with our prototype. The microsystem elements have been characterized to better understand the underlying mechanisms of image formation in order to optimize them. Our system resolution (11.2 μm) gives access to cellular morphology, and is potentially upgradable by using smaller pixels. An interesting improvement for cell biology would be the ability to detect luminescence or fluorescence.