

## **Thèse de l'Université de Lyon**

délivrée par l' ÉCOLE CENTRALE DE LYON

pour obtenir le grade de DOCTEUR

Ecole doctorale « Electronique, Electrotechnique et Automatique »

Spécialité « Bioingénierie et microsystemes »

Par

**Samia MENAD**

Thèse préparée au sein du Laboratoire Ampère

**Soutenue le 8 décembre 2014**

---

### **Assemblage permanent de micro-objets par diélectrophorèse associée à une méthode de couplage covalent**

---

Devant le jury composé de :

Rapporteur	Chantal GONDRAN	Maître de conférences - Université Joseph Fourier-Grenoble 1
Rapporteur	Franz BRUCKERT	Professeur des Universités- Grenoble INP
Examineur	Nicole JAFFREZIC	Professeur des Universités- Université Claude Bernard Lyon 1
Examineur	Thierry LIVACHE	Expert senior-CEA Grenoble
Examineur	Yann CHEVOLOT	Directeur de recherche CNRS-INL Ecole centrale de Lyon
Co-encadrante	Marie ROBIN-FRENEA	Maître de conférences-Université Claude Bernard Lyon 1, laboratoire Ampère
Co-encadrant	Naoufel HADDOUR	Maître de conférences-Ecole centrale de Lyon
Directeur de thèse	François BURET	Professeur des Universités- Ecole centrale de Lyon



## Remerciements

Mes premiers remerciements s'adressent aux Pr. Franz Bruckert et Dr Chantal Gondran qui m'ont fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie pour votre intérêt, pour le temps que vous avez consacré à la lecture de ce travail. J'associe à ces remerciements le Dr Thierry Livache ainsi que le Dr Yann Chevolut pour avoir accepté d'examiner mon manuscrit et au Pr. Nicole Jaffrezic d'avoir présidé le jury en plus d'avoir examiné mon projet. Merci à tous les membres du jury pour leurs remarques et commentaires pertinents.

J'adresse par la suite mes plus sincères remerciements à mon directeur de thèse Pr. François BURET pour sa gentillesse, et ses conseils pertinents mais aussi pour son grand sourire traduisant une pression « positive » pour finir de rédiger mon manuscrit de thèse à temps.

Un grand merci tout particulier, à mes deux co-directeurs de thèse, Marie Frénéa-Robin et Naoufel Haddour. Jour après jour, vous avez été des encadrants formidables, d'une importance inestimable pour la conduite de ce projet et pour moi-même. Je n'ai pas eu l'occasion de douter, ni de votre soutien, ni de la pertinence de vos conseils et de votre vision. Cet appui subtil mais solide, tient sans aucun doute un énorme rôle dans ce que je considère comme la réussite de ce projet, tant d'un point de vue scientifique que personnel : à aucun moment je n'ai regretté d'avoir pris la décision de me lancer dans cette aventure avec vous.

Je n'oublie pas les périodes plus difficiles que comporte nécessairement un projet de recherche, les zones de doute et les pertes ponctuelles de motivation ; je ne nie pas non plus la satisfaction que j'ai à présent à conclure ce projet pour, je l'espère, pouvoir aborder de nouvelles aventures probablement différentes. Mais, tout cela n'efface en rien le plaisir que je tire de cette expérience passée en votre compagnie au laboratoire Ampère (ECL). J'aimerais également vous remercier pour votre grande disponibilité et votre respect sans failles des délais serrés de relecture des documents que je vous ai adressés. Je m'estime très chanceuse d'avoir eu des encadrants tels que vous.

Je remercie Laure Franqueville pour ses conseils pertinents de biologiste, son écoute et pour sa contribution à la réalisation d'une petite partie du projet, ce fut un plaisir de travailler avec toi. J'associe à ces remerciements Sébastien Cecillon pour ses conseils scientifiques, sa gaité, sa bonne humeur mais aussi ses cris ainsi que pour son côté maghrébin refoulé (Il était une fois à Ampère...)

Je souhaiterais aussi adresser ma gratitude à Pierre Cremillieu et Radoslaw Mazurczyk (Radek), pour leur disponibilité et pour m'avoir formé aux techniques de salle blanche.

Je remercie aussi les anciens thésards de l'équipe « Bioelectromagnétisme et microsystèmes », Sylvain, Jérémy, Amal, Osman, Julien et David.

Durant ma thèse, j'ai eu l'occasion de faire des enseignements à l'Ecole centrale de Lyon dans le département Sciences et Techniques des Matériaux et des Surfaces. A ce titre, j'adresse mes sincères remerciements au Pr. Yves Robach pour m'avoir accordé cette opportunité d'effectuer des enseignements dans son département. Je remercie aussi toute l'équipe pédagogique avec laquelle j'ai travaillé, Emmanuelle Laurenceau, Virginie Monnier, Yann Chevotot, Isabelle Nabeth.

Je tiens également à remercier le personnel administratif du laboratoire Ampère (ECL), Fatima El Boukhrissi, Edith Bergeroux et Christian Perdu-Rouchouse et plus particulièrement Marie-christine Havgoudoukian pour leur gentillesse et patience.

Un merci particulier à mon « co-bureau » Khaled pour m'avoir supporté pendant les derniers mois de rédaction, et surtout pour son aide précieuse pour réaliser les simulations mais aussi pour sa gentillesse, les chocolats et les croissants auxquels j'avais droit.

Je remercie également Feriel pour son amitié, sa continuelle présence, et sa générosité.

Un merci tout spécial à Rédha pour sa gentillesse, SA PATIENCE, pour son aide et ses encouragements pendant les périodes de doutes.

Enfin, je ne saurais exprimer ici toute ma gratitude envers mes parents, Merci pour vos nombreux sacrifices (qui m'ont permis d'être là aujourd'hui), votre soutien et votre amour. Je remercie aussi mon frère Adel et sa femme Imène ainsi que ma nièce Sonia pour leur soutien et sympathie.

L'oublier serait une erreur fatale ☺ un grand merci pour ma petite soeurette Lamia, pour sa bonne humeur, sa gentillesse et pour tous les moments de folies et de bonheur qu'on a pu partager.

Encore un grand MERCI à tous pour m'avoir conduit à ce jour mémorable

# Table des matières

<b>TABLE DES MATIERES</b>	<b>3</b>
<b>TABLE DES SYMBOLES</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCTION GENERALE .....</b>	<b>8</b>
<b>CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART .....</b>	<b>13</b>
Partie 1 Techniques d'assemblages et méthodes de couplage permanent.....	13
1. Introduction.....	13
2. Méthodes d'assemblage.....	13
2.1.Auto assemblage .....	13
2.2.Assemblages dirigés sur support.....	15
2.2.1. Assemblages dirigés sur substrat chimiquement fonctionnalisé.....	15
2.2.1.1.Assemblages dirigés sur des motifs chimiques à contraste de charge	15
2.2.1.2.Assemblages dirigés sur des motifs chimiques à contraste d'énergie	15
2.2.1.3.Assemblages dirigés sur des motifs bio-spécifiques.....	16
2.2.2. Assemblages dirigés par motifs topographique .....	17
2.3. Assemblages par manipulation sans contact.....	18
2.3.1. Manipulation par force optique.....	19
2.3.2. Manipulation par force acoustique.....	20
2.3.3. Manipulation par force magnétique .....	22
2.3.4. Manipulation par force diélectrophorétique.....	24
2.3.5. Bilan des techniques de manipulation sans contact .....	26
3. Assemblages permanents par les techniques sans contact.....	26
3.1. Immobilisation dans une matrice .....	26
3.2.Assemblage permanent par création de liaisons bio-spécifique .....	28
3.3.Assemblage permanent par couplage chimique.....	30
3.3.1. Couplage chimique par interactions non covalentes .....	30
3.3.2. Couplage chimique par interactions covalentes .....	31
4. Positionnement de nos travaux de thèse .....	33
Partie 2 <i>Phénomènes physiques entrant en jeu</i> .....	35
5. Interactions entre particules colloïdales.....	35
5.1.Le mouvement Brownien.....	35
5.2.Les forces inter-particulaires.....	35
5.2.1. Forces de Van der Waals .....	36
5.2.2. Forces électrostatiques .....	36
5.2.2.1.Modèle de la double couche électrique.....	37
5.2.2.2.Potentiel zêta.....	39
5.3.La stabilité des solutions colloïdales .....	40
5.3.1. Les forces non DLVO.....	42
5.3.1.1.Force de solvatation .....	42
5.3.1.2.Force de répulsion de Born.....	42

6. La diélectrophorèse et les phénomènes hydrodynamiques .....	43
<b>6.1.</b> La force de diélectrophorèse .....	43
<b>6.1.1.</b> Interaction dipôle-dipôle .....	45
<b>6.2.</b> Les phénomènes hydrodynamiques .....	45
<b>6.2.1.</b> Electroosmose .....	46
<b>6.2.2.</b> Electrothermie .....	47
7. Conclusion .....	48
Références.....	49

## **CHAPITRE 2 : CARACTERISATION PHYSICO-CHIMIQUE ET ELECTRIQUE DES MICRO-OBJETS MANIPULES PAR DIELECTROPHORESE**

1. Etude des propriétés physico-chimique des micro-objets manipulés .....	56
<b>1.1.</b> Etat des solutions colloïdales .....	56
<b>1.2.</b> Mesure du potentiel zêta .....	57
<b>1.3.</b> Quantification des groupements chimiques .....	59
<b>1.3.1.</b> Quantification des groupements carboxyliques .....	59
<b>1.3.2.</b> Quantification des groupements amines .....	61
2. Caractérisation électrique des particules et des cellules .....	64
<b>2.1.</b> Caractérisation électrique des particules en polystyrène .....	64
<b>2.1.1.</b> Modèle électrique d'une particule .....	64
<b>2.1.2.</b> Principe de la mesure .....	65
<b>2.1.3.</b> Méthode expérimentale .....	68
<b>2.1.3.1.</b> Préparation des particules .....	69
<b>2.1.3.2.</b> Electrodes et montage expérimental .....	69
<b>2.1.3.3.</b> Détermination des propriétés électrique .....	70
<b>2.2.</b> Caractérisation électrique des cellules .....	78
<b>2.2.1.</b> Modèle électrique .....	78
<b>2.2.2.</b> Caractérisation électrique des cellules par électrorotation.....	79
3. Conclusion .....	81
Références.....	83

## **CHAPITRE 3 : MICROFABRICATION DES SYSTEMES D'ASSEMBLAGE**

1. Introduction .....	88
2. Microstructuration d'une fine couche de PDMS .....	91
<b>2.1.</b> Le PDMS .....	91
<b>2.1.1.</b> Modification des propriétés de surface du PDMS .....	91
<b>2.2.</b> Techniques de structuration d'une fine couche de PDMS.....	93
<b>2.2.1.</b> Structuration du PDMS photosensible.....	93
<b>2.2.2.</b> Structuration du PDMS natif .....	94
<b>2.2.2.1.</b> La technique de « Blade scratching » .....	94
<b>2.2.2.2.</b> Structuration du PDMS en utilisant une fine membrane sacrificielle	94
<b>2.2.2.3.</b> Structuration du PDMS par effet pyroélectrique .....	95
<b>2.2.2.4.</b> Bond detach lithography .....	95

2.3.	Approche innovante de structuration du PDMS .....	96
2.3.1.	Protocole .....	96
3.	Réseau d'électrodes bipolaires verticales .....	103
3.1.	Simulation du champ électrique dans le microsysteme d'électrodes verticales .....	104
3.2.	Assemblage de cellules par DEP .....	105
3.3.	Intégration d'un canal microfluidique dans le dispositif d'électrodes verticales .....	106
4.	Réseau d'électrodes quadripolaires .....	107
4.1.	Protocole de fabrication des électrodes quadripolaires .....	109
4.1.1.	Fabrication des électrodes d'ITO bipolaires .....	109
4.1.2.	Transition des électrodes bipolaires vers quadripolaires .....	110
4.2.	Caractérisation du pouvoir isolant de la fine couche de PDMS .....	111
4.3.	Détermination des paramètres d'assemblage diélectrophorétique .....	112
4.3.1.	Détermination de la fréquence optimale .....	113
4.3.2.	Détermination de la tension électrique optimale .....	113
4.4.	Calcul de la force diélectrophorétique ( $F_{DEP}$ ) .....	115
4.5.	Assemblage des particules en polystyrène 3 $\mu$ m (COOH) .....	115
5.	Conclusion .....	117
	Références .....	118
<b>CHAPITRE 4 : RESULTATS EXPERIMENTAUX</b>		
1.	Assemblage permanent de cellules eucaryotes par diélectrophorèse .....	123
1.1.	Introduction générale .....	123
1.2.	Préparation des cellules et milieu de manipulation .....	123
1.2.1.	Les cellules HEK 293 .....	124
1.2.2.	Choix du milieu diélectrophorétique .....	124
1.2.3.	Test de viabilité cellulaire : méthode d'exclusion au bleu de trypan .....	125
1.2.4.	Marquage des cellules .....	127
1.2.5.	Traitement du PDMS à la poly-L-Lysine (PLL) .....	128
1.3.	Détermination des conditions d'assemblage .....	130
1.3.1.	Conductivité du milieu et fréquence optimale d'assemblage .....	130
1.3.2.	Tension optimale.....	133
1.4.	Formation d'agrégats cellulaires .....	135
1.5.	Croissance cellules guidée par DEPn .....	137
2.	Assemblage permanent des particules en polystyrène .....	138
2.1.	Préparation des particules .....	138
2.2.	Assemblage des particules .....	140
2.2.1.	Détermination des paramètres diélectrophorétiques d'assemblage .....	140
2.2.2.	Assemblage permanent des particules en polystyrène dans un milieu KCl .....	142
2.3.	Etude de l'assemblage par la théorie de DLVO.....	144
3.	Conclusion .....	150
	Références .....	151
<b>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....</b>		
		<b>154</b>
<b>Annexes .....</b>		
		<b>158</b>

Annexe A. Quantification des groupements carboxyliques par TBO.....	158
Annexe B. Quantification des groupements amines par Orange II .....	159
Annexe C. Fabrication des électrodes quadripolaires en or.....	160
Annexe D. Fabrication de la chambre en PDMS.....	161
Annexe E. Préparation du milieu diélectrophorétique .....	162



## Liste des symboles

---

$\epsilon_0$	Permittivité relative du vide ( $8.85 \cdot 10^{-12}$ F/m)
$\epsilon_{rp}$	Permittivité relative de la particule (particule en polystyrène $\epsilon_{rp}=2.56$ )
$\epsilon_{rm}$	Permittivité relative du milieu ( $\epsilon_{rm} \approx 78$ )
$\epsilon_p$	Permittivité de la particule ( $\epsilon_p = \epsilon_0 \epsilon_{rp}$ )
$\epsilon_m$	Permittivité du milieu ( $\epsilon_m = \epsilon_0 \epsilon_{rm}$ )
$\tilde{\epsilon}_p$	Permittivité complexe de la particule
$\tilde{\epsilon}_m$	Permittivité complexe du milieu
$\sigma_{bulk}$	Conductivité du matériau constituant la particule (polystyrène $10^{-16}$ )
$\sigma_p$	Conductivité de la particule (S/m)
$\sigma_m$	Conductivité du milieu (S/m)
$r$	Rayon (m)
$Re(CM)$	Partie réelle du Facteur de Clausius-Mossotti (CM)
$D$	Coefficient de diffusion ( $m^2 \cdot s^{-1}$ )
$t$	Temps
$\eta$	Viscosité dynamique du fluide ( $Pa \cdot s^{-1}$ ) (eau $\eta_{eau} = 110^{-3}$ )
$k_B$	Constante de Boltzmann ( $(1.381e^{-23} J \cdot K^{-1})$ )
$T$	Température (Kelvin).
$A$	Constante de Hamaker (J)
$d$	Distance inter-particules (m)
$K_B$	Constante de Boltzman ( $1.381e-23 J \cdot K^{-1}$ )
$k$	Kappa ( $1/\lambda_D$ ) $m^{-1}$
$\lambda_D$	Longueur de Debye (m)
$z$	Valence de l'électrolyte
$e$	Charge d'un électron ( $1.602e-19$ C)
$N_A$	Nombre d'Avogadro ( $6.02 \cdot 10^{23}$ )
$F$	Constante de Faraday ( $9.65e4$ C.mol <sup>-1</sup> )
$R$	Constante des gaz parfaits ( $8.314472$ m <sup>2</sup> .kg.s <sup>-2</sup> .K <sup>-1</sup> .mol <sup>-1</sup> )
$h_p$	Constante de Planck ( $6.63e-34$ J.s)
$\psi_0$	Potentiel de surface
$F_i$	Force ionique
$E_t$	Composante tangentielle du champ électrique
$K_s$	Conductance surfacique (S)
$K_s^i$	Conductance due au mouvement des charges dans la couche de Stern (S)
$K_s^d$	Conductance dans la partie diffuse de la double couche (S)
$\sigma^i$	Densité de charges
$\mu^i$	Mobilité des contre-ions
$\zeta$	Potentiel zêta (V)
$c$	Concentration de l'électrolyte (mol/m <sup>3</sup> )
$D_0$	Absorbance de la molécule,
$\epsilon$	Coefficient d'extinction molaire (en L.mol <sup>-1</sup> .cm <sup>-1</sup> )
$\sigma_{cy}$	Conductivité du cytoplasme des cellules
$\epsilon_{cy}$	Permittivité du cytoplasme des cellules
$C_{mem}$	Capacité de la membrane
$G_{mem}$	Conductance surfacique de la membrane
$V$	Volume (m <sup>3</sup> )

---

## INTRODUCTION GENERALE

Durant ces dernières décennies, la miniaturisation a porté l'innovation technologique. Elle a suscité l'engouement des scientifiques dans de nombreux domaines de recherche tels que la micro et nanoélectronique, les biocapteurs, la microfluidique ainsi que la bio-ingénierie et la médecine. De nombreuses applications ont vu le jour, du fait des nouvelles propriétés acquises par les matériaux à l'échelle micro et nanométrique, et de la modification des équilibres physiques. En effet, la réduction de la taille des matériaux a pour conséquence l'augmentation du rapport surface/volume et le renforcement des interactions entre les matériaux, offrant des propriétés électriques, magnétiques, optiques et chimiques que les matériaux massifs ne possèdent pas.

Ce grand intérêt porté à la miniaturisation a engendré le développement de plusieurs techniques visant à réduire la taille des matériaux. Ces techniques sont pour la plupart des techniques de lithographie permettant la fabrication de micro et nanostructures à partir de matériaux massifs. Cette approche dite « descendante », se base sur l'utilisation de procédés parmi les plus sophistiqués existant à l'heure actuelle dans l'industrie. Malgré leur progrès continu, ces techniques impliquent une augmentation drastique des coûts en matière d'équipements et de production pour pouvoir suivre la réduction en taille des dispositifs.

Ces limitations ont motivé le développement de techniques alternatives dites ascendantes ou « bottom-up ». Elles sont basées sur l'organisation de briques de base pour former des structures définies. Ces approches présentent plusieurs avantages : d'une part, elles constituent des techniques alternatives de micro et nanofabrication pour lesquelles la résolution n'est limitée que par la taille des objets manipulés (Figure1), pouvant être aussi réduite que celle d'une molécule. D'autre part, elles permettent un meilleur contrôle de l'organisation des objets les uns par rapport aux autres au sein d'une structure. Enfin, elles permettent la manipulation d'une large gamme de micro et nano objets, des matériaux inertes aux matériaux vivants.

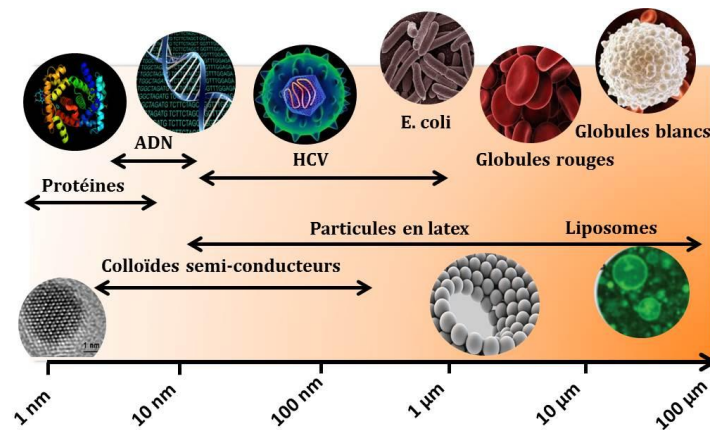


Figure 1 Taille et nature des particules pouvant servir de briques de base dans les approches d'assemblage de type « bottom-up ».

Depuis l'émergence de ces techniques ascendantes, un effort de recherche important a été consacré à la fabrication de nouveaux matériaux fonctionnels avec des propriétés spécifiques et une structure définie par assemblage de nano et micro-objets. Cette approche a trouvé des applications dans de nombreux domaines. On peut citer par exemple l'assemblage de couches de nanoparticules pour la fabrication de résistances<sup>1</sup>, l'élaboration de diodes électroluminescentes<sup>2</sup> ou encore la fabrication de cellules photovoltaïques<sup>3</sup>. Des biocapteurs très efficaces et sensibles à base d'assemblages de microparticules en polystyrène et nanoparticules conductrices<sup>4</sup> ont également été décrits dans la littérature. Par ailleurs, l'assemblage de cellules vivantes par une approche « bottom-up » peut s'appliquer à la caractérisation des interactions cellule-cellule, à l'étude de la différenciation des cellules souches, ou encore à l'étude des mécanismes de ciblage de médicaments<sup>5</sup>. Une autre application phare concerne l'ingénierie tissulaire avec la possibilité de concevoir des biomatériaux mimant la structure des tissus natifs<sup>6</sup>. En parallèle des techniques ascendantes basées sur l'emploi de *scaffolds* permettant de guider la croissance cellulaire, de nouvelles stratégies peuvent être amenées à se développer pour fabriquer des tissus à partir de cellules individuelles assemblées en agrégats qui pourront être à leur tour organisés afin de former des tissus synthétiques (Figure 2).

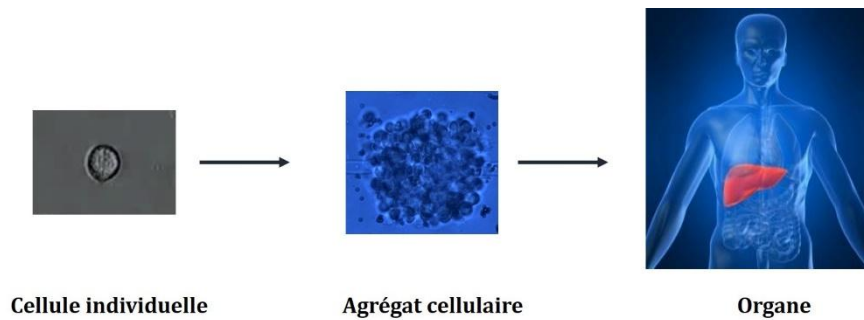


Figure 2 De la cellule unique aux tissus synthétiques

Pour réaliser ce type d'assemblages, les techniques de manipulation sans contact sont particulièrement avantageuses, dans la mesure où, par définition, elles ne nécessitent pas de contact direct entre l'outil de manipulation et l'objet manipulé, ce qui permet de limiter les problèmes de contamination et d'adhésion, surtout lors de la manipulation des nano-objets. Au rang des techniques de manipulation sans contact figurent les pinces optiques, magnétiques, acoustiques ou encore diélectrophorétiques. Ces techniques ne permettent cependant pas de former des assemblages permanents, dans la mesure où l'annulation de la force utilisée pour l'assemblage engendre la redispersion des micro ou nano-objets assemblés. Afin de lever ce verrou, elles peuvent néanmoins être combinées à des méthodes reposant sur l'emploi d'agents de couplage chimiques ou biologiques.

L'objectif de ce travail de doctorat est donc de développer une nouvelle approche combinant la manipulation sans contact - plus précisément la diélectrophorèse - et différentes approches de fonctionnalisation de surfaces pour permettre l'obtention d'assemblages permanents de particules inertes ou biologiques. Le choix d'utiliser la force diélectrophorétique sera justifié dans le manuscrit.

Les micro-objets ciblés sont d'une part des particules en polystyrène fonctionnalisées de tailles variées et d'autre part des cellules vivantes. De cet objectif global découle deux autres objectifs :

- La conception de microsystèmes faciles à fabriquer, peu coûteux et transparents, pour permettre l'assemblage diélectrophorétique des micro et nano objets.
- La mise au point de protocoles permettant d'une part le couplage chimique entre microparticules en polystyrène fonctionnalisées et d'autre part la formation d'agrégats permanents de cellules vivantes.

Ce manuscrit de thèse est composé de quatre chapitres suivis d'une conclusion générale qui sont brièvement décrits dans les paragraphes suivants :

Le chapitre 1 de ce manuscrit vise à dresser l'inventaire des techniques décrites dans la littérature pour assembler et positionner des micro-objets sur de larges surfaces, en mettant l'accent sur les méthodes de manipulation sans contact. Cet état de l'art a notamment pour objectif la mise en valeur des avantages de la diélectrophorèse comme moyen d'assemblage d'une large gamme de micro-objets. Les méthodes pouvant être combinées aux techniques de manipulation sans contact pour rendre les assemblages permanents seront ensuite passées en revue. La deuxième partie de ce chapitre abordera les phénomènes physiques entrant en jeu lors de l'assemblage de particules par diélectrophorèse.

Le chapitre 2 sera axé sur la caractérisation physico-chimique et électrique des micro-objets manipulés dans ces travaux de thèse. La caractérisation physico-chimique concernera l'étude de l'état des systèmes de particules utilisés (stabilité, mono-dispersité et état de surface). La deuxième partie du chapitre concernera la caractérisation électrique des micro-objets dans le but de déterminer leurs propriétés électriques. Ces étapes de caractérisation permettront de prédire le comportement diélectrophorétique des micro-objets sous différentes conditions de manipulation et faciliteront la mise au point des protocoles de couplage chimique.

Le chapitre 3 sera centré sur la fabrication des microsystèmes utilisés dans ces travaux de thèse. Il débutera par la présentation détaillée de la nouvelle approche développée pour la structuration d'une fine couche de PDMS, qui a été appliquée à la fabrication des microsystèmes (réseau d'électrodes quadripolaires et électrodes verticales). Des simulations de la distribution du champ électrique dans ces microsystèmes sont présentées. La possibilité d'employer ces dispositifs pour la manipulation de microparticules et de cellules a également été démontrée lors d'expériences préliminaires.

Dans le chapitre 4, nous décrirons les assemblages permanents obtenus par diélectrophorèse négative : d'une part des clusters compacts de cellules vivantes gardant leur structure après coupure du champ, et d'autre part des assemblages de microparticules liées entre elles par un agent de couplage (la Jeffamine). Une étude théorique du phénomène d'assemblage permanent des particules sera aussi présentée.

Nous donnerons pour finir quelques perspectives de développements et améliorations qui nous semblent pertinents pour la suite de ces travaux de thèse.

# Chapitre 1

## Etat de l'art

<b>Partie 1 Techniques d'assemblages et méthodes de couplage permanent</b> .....	13
1. Introduction .....	13
2. Méthodes d'assemblage .....	13
<b>2.1. Auto assemblage</b> .....	13
<b>2.2. Assemblages dirigés sur support</b> .....	15
<b>2.2.1. Assemblages dirigés sur substrat chimiquement fonctionnalisé</b> .....	15
<b>2.2.1.1. Assemblages dirigés sur des motifs chimiques à contraste de charge</b> .....	15
<b>2.2.1.2. Assemblages dirigés sur des motifs chimiques à contraste d'énergie</b> .....	15
<b>2.2.1.3. Assemblages dirigés sur des motifs bio-spécifiques</b> .....	16
<b>2.2.2. Assemblages dirigés par motifs topographiques</b> .....	17
<b>2.3. Assemblages par manipulation sans contact</b> .....	18
<b>2.3.1. Manipulation par force optique</b> .....	19
<b>2.3.2. Manipulation par force acoustique</b> .....	20
<b>2.3.3. Manipulation par force magnétique</b> .....	22
<b>2.3.4. Manipulation par force diélectrophorétique</b> .....	24
<b>2.3.5. Bilan des techniques de manipulation sans contact</b> .....	26
3. Assemblages permanents par les techniques sans contact.....	26
<b>3.1. Immobilisation dans une matrice</b> .....	26
<b>3.2. Assemblage permanent par création de liaisons bio-spécifiques</b> .....	28
<b>3.3. Assemblage permanent par couplage chimique</b> .....	30
<b>3.3.1. Couplage permanent par interactions non covalentes</b> .....	30
<b>3.3.2. Couplage permanent par interactions covalentes</b> .....	31
4. Positionnement de nos travaux de thèse .....	33
<b>Partie 2 Phénomènes physiques entrant en jeu</b> .....	35
5. Interactions entre particules colloïdales .....	35
<b>5.1. Le mouvement Brownien</b> .....	35
<b>5.2. Les forces inter-particulaires</b> .....	35
<b>5.2.1. Forces de Van der Waals</b> .....	36
<b>5.2.2. Forces électrostatiques</b> .....	36
<b>5.2.2.1. Modèle de la double couche électrique</b> .....	37
<b>5.2.2.2. Potentiel zêta</b> .....	39
<b>5.3. La stabilité des solutions colloïdales</b> .....	40
<b>5.3.1. Les forces non DLVO</b> .....	42
<b>5.3.1.1. Force de solvatation</b> .....	42
<b>5.3.1.2. Force de répulsion de Born</b> .....	42
6. La diélectrophorèse et les phénomènes hydrodynamiques.....	43
<b>6.1. La force de diélectrophorèse</b> .....	43
<b>6.1.1. Interaction dipôle-dipôle</b> .....	45
<b>6.2. Les phénomènes hydrodynamiques</b> .....	45
<b>6.2.1. Electroosmose</b> .....	46
<b>6.2.2. Electrothermie</b> .....	47
7. Conclusion .....	48
Références .....	49

## **Partie 1 : Techniques d'assemblages et méthodes de couplage permanent**

### **1. Introduction**

Un intérêt croissant est porté aujourd'hui à l'organisation en 2D ou 3D de micro et nano-objets tels que les particules, les cellules, les protéines ainsi que les molécules, pour différentes applications dans plusieurs domaines. En effet, la manipulation, l'assemblage, le positionnement et l'organisation de ces micro et nano-objets sur de larges surfaces, sont des conditions critiques et indispensables pour le développement de nombreux dispositifs fonctionnels dans le domaine de la micro-électronique et de la spintronique, dans le domaine de la bioingénierie ainsi que pour des études plus fondamentales en biologie. Ces micro-assemblages sont une étape clé dans de nombreux procédés et un sérieux défi à relever.

L'assemblage des micro et nano-objets fait partie des techniques de fabrication selon une approche ascendante dite « bottom-up » basée sur la construction de structures à partir de briques de base, ceci dans le but de développer des méthodes de fabrication simples, rapides, fiables, et à bas coût, tout en permettant d'atteindre la résolution désirée.

Dans ce premier chapitre, nous présenterons les différentes méthodes d'assemblage recensées dans la littérature et les principes qui gouvernent ces procédés. Enfin, nous positionnerons nos travaux par rapport aux différentes stratégies présentées.

### **2. Méthodes d'assemblage**

#### **2.1. Auto assemblage**

L'auto-assemblage est l'organisation autonome de composants ou d'objets sous forme de patterns ou de structures définies. C'est un phénomène que l'on retrouve dans la nature, comme pour la création d'entités biologiques complexes telles que les cellules ou les microorganismes. Ce processus est régi par différentes forces physiques (Van der Waals, hydrodynamique, ionique, capillaire, électrostatique, ...etc). De nombreuses équipes de recherche ont exploité ces interactions en essayant de contrôler une ou plusieurs de ces forces afin de diriger, assembler et positionner des particules ou des cellules sur de larges surfaces. La majorité de ces techniques sont basées sur le contrôle des phénomènes d'évaporation et l'intervention des forces capillaires. Cette méthode repose sur l'étalement d'une fine couche de suspensions de particules sur la surface d'un support. L'évaporation de la phase liquide du film étalé engendre une force de capillarité d'immersion qui attire entre elles les particules partiellement immergées dans le film. Ceci permet leur auto-assemblage sous forme d'un réseau au niveau de la ligne d'évaporation (interfaces air/liquide/solide). La présence de ce réseau accentue l'évaporation, et crée un flux convectif dans cette zone du liquide générant

une force hydrodynamique qui entraîne et dirige les particules complètement immergées vers la ligne d'évaporation (Figure 1.A.a). Ce phénomène permet la formation d'un large réseau de particules structuré sur la surface du support une fois que le liquide est complètement évaporé (Denkov et al.,1992). Cette méthode d'assemblage est employée pour la réalisation de réseaux 2D et 3D de colloïdes. La structure du réseau est contrôlée à partir de la nature et de la forme du film liquide étalé sur la surface ainsi que de la cinétique d'évaporation du liquide (Micheletto et al., 1995). En effet, il a été démontré que l'évaporation confinée et contrôlée peut être une stratégie simple et robuste pour orienter l'auto-assemblage des particules sur les surfaces (Pinedo-Rivera 2009) (Figure 1.A). La structure des réseaux obtenus peut également être influencée par plusieurs autres paramètres tels que la mouillabilité de la surface du support (Uno et al., 1998 ; Andreeva et al. 2007) (Figure 1.A.b), la concentration des colloïdes, la taille des colloïdes ainsi que l'ajout de surfactants dans la suspension colloïdale (Deegan et al., 2000).

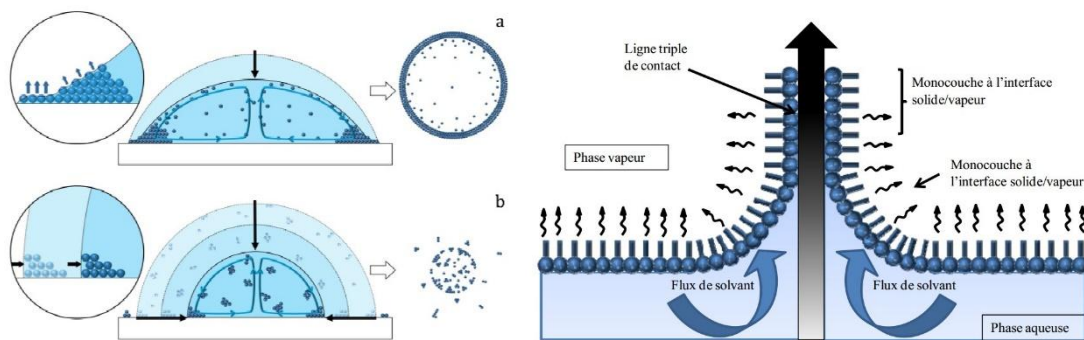


Figure 1.1 A) Schéma du mécanisme d'évaporation d'une goutte de suspension colloïdale et de la formation de motifs colloïdaux. (a) Sur une surface hydrophile. (b) Sur une surface hydrophobe la goutte s'évapore à angle de contact constant. Des agrégats se forment et se rassemblent vers le centre de la goutte par le rétrécissement de la surface de contact (Pinedo-Rivera 2009). B) Assemblage par la technique de Langmuir-Blodgett : dépôt d'une monocouche flottante à l'interface liquide/vapeur sur un solide lors du retrait de ce solide.

La technique la plus connue qui exploite ce phénomène pour auto-assembler des particules sur des surfaces est la méthode de Langmuir Blodgett. Grâce à l'action de retrait d'un substrat immergé préalablement dans la solution colloïdale qui engendre l'apparition et le recul de l'interface de contact particules/support appelée « ligne triple de contact », l'évaporation est ainsi accélérée au niveau de cette interface, ce qui permet la génération de forces capillaires qui poussent les particules vers la ligne triple (Figure 1.1.B). Cette technique permet un bon contrôle de la formation des réseaux 2D. Toutefois, il faut que la vitesse de retrait du support soit équivalente à la vitesse d'évaporation de la solution colloïdale. Ceci évite la déstructuration du réseau de particules mais rend ce procédé assez lent.



### 2.2. Assemblages dirigés sur support

Il existe deux approches différentes pour réaliser des assemblages sur support : l'utilisation de substrats fonctionnalisés avec des motifs chimiques en surface ou l'utilisation de motifs topographiques. Il est important de noter que ce sont les forces de capillarité qui régissent essentiellement ce type d'assemblage.

#### 2.2.1. Assemblages dirigés sur substrat chimiquement fonctionnalisé

##### 2.2.1.1. Assemblages dirigés sur des motifs chimiques à contraste de charge

Dans cette technique, des motifs anioniques et cationiques sont alternés sur la surface d'un substrat. Ce dernier est ensuite immergé dans une suspension de particules chargées positivement ou négativement. Les colloïdes s'adsorbent sur les régions de charges opposées par attraction électrostatique. Grâce à l'évaporation du liquide qui est présent entre les particules, celles-ci se réorganisent en un réseau compact sous l'action des forces de capillarité d'immersion. Par exemple, le groupe d'Aizenberg a utilisé la technique d'impression par microcontact pour réaliser des motifs de monocouches auto-assemblées ou SAMs (« Self-Assembled Monolayers ») sur la surface d'un substrat métallique (Figure 1.2.B). Par la suite, il a été possible d'assembler sur ces surfaces différents types de particules (cristaux de calcite, particules de polystyrène micrométriques) (Aizenberg et al., 2000). De la même manière, l'équipe de Zheng a assemblé des particules de polystyrène portant des groupements carboxyliques (négatifs) sur une surface alternant des motifs de SAMs avec des extrémités contenant des groupements positifs et des régions de polyélectrolytes chargées négativement. (Zheng et al., 2002).

##### 2.2.1.2. Assemblage dirigé sur des motifs chimiques à contraste d'énergie

Cette technique consiste à reproduire des motifs chimiques sur une surface permettant d'alterner des zones hydrophiles et des zones hydrophobes. Lorsque la suspension colloïdale est en contact avec la surface du substrat fonctionnalisé, elle s'étale sélectivement sur les zones hydrophiles si le liquide de la suspension est une phase aqueuse. Cet étalement préférentiel de la suspension sur la surface structurée favorise l'assemblage des colloïdes sur les zones présentant une affinité pour le liquide. Par exemple, le groupe de Fustin (Fustin et al., 2003) a réussi à structurer la surface d'un substrat avec des motifs hydrophiles (silicium) et hydrophobes (silane) obtenus par photolithographie et par silanisation en phase vapeur. Ils ont pu ainsi assembler des colloïdes de polystyrène de quelques nanomètres de diamètre sélectivement dans les régions hydrophiles de la surface (Figure 1.2.A), ceci en utilisant la technique de dépôt par retrait vertical du substrat immergé dans la suspension de particules.

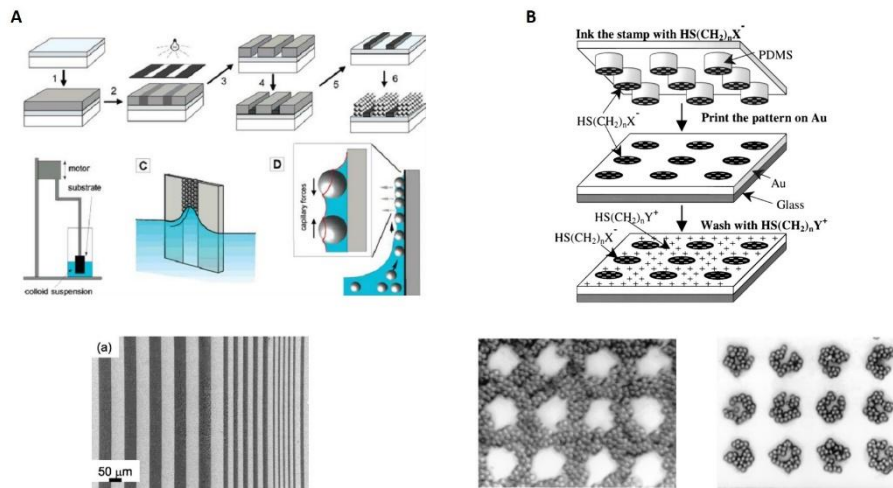


Figure 1.2 Assemblage de colloïdes sur substrat chimiquement fonctionnalisé. A) Fabrication de motifs chimiques par photolithographie et silanisation et image représentant les colloïdes assemblés (en stries noires) sur la zone fonctionnalisée (Fustin., 2003). B) Schéma du principe de fonctionnalisation chimique (structuration chimique avec charges positives et négatives sur le même substrat) par impression par microcontact d'un substrat, et images d'assemblage sélectif selon la charge des colloïdes (Aizenberg et al., 2000).

### 2.2.1.3. Assemblages dirigés sur des motifs bio-spécifiques

Cette méthode d'assemblage repose sur la fonctionnalisation de la surface des supports avec des motifs de molécules biologiques. Cette approche est plus particulièrement utilisée pour l'assemblage et l'organisation de cellules vivantes sur les surfaces (Goubko et al., 2009). Les forces qui interviennent dans cette méthode d'assemblage sont des forces d'interactions bio-spécifiques entre les récepteurs des membranes cellulaires et les biomolécules greffées sur le support. Parmi les biomolécules qui interagissent avec les membranes des cellules, les fibronectines et le collagène sont les plus utilisées pour l'assemblage des cellules sur les surfaces. Par exemple, l'équipe de Tourovskaia a employé cette méthode pour organiser des cellules sur une surface en verre structurée avec des motifs de fibronectine (Figure 1.3) (Tourovskaia et al., 2003). Ces motifs ont été obtenus grâce à un pattern en PDMS placé sur la surface du substrat en verre. Les ouvertures de ce pattern en forme de micro-puits ont permis par la suite de contrôler et de localiser l'adsorption de la fibronectine sur la surface du support en exposant cette surface à une solution de fonctionnalisation contenant la biomolécule. Une fois le pattern enlevé, les motifs de fibronectine ont été utilisés pour accrocher spécifiquement les cellules via l'interaction fibronectine/intégrine formant ainsi des assemblages contrôlés de cellules. Selon ce même principe, le groupe de Goubko a réalisé des assemblages de deux types cellulaires sur substrat en verre biofonctionnalisé. Des motifs de protéines d'adhésion ont été obtenus en utilisant comme pattern une résine photosensible structurée par photolithographie. Ces motifs ont permis d'accrocher spécifiquement le premier type cellulaire via des interactions spécifiques. Les zones non fonctionnalisées de la surface

ont été utilisées pour adsorber le deuxième type cellulaire via des interactions électrostatiques (Figure 1.B) (Goubko et al., 2009)

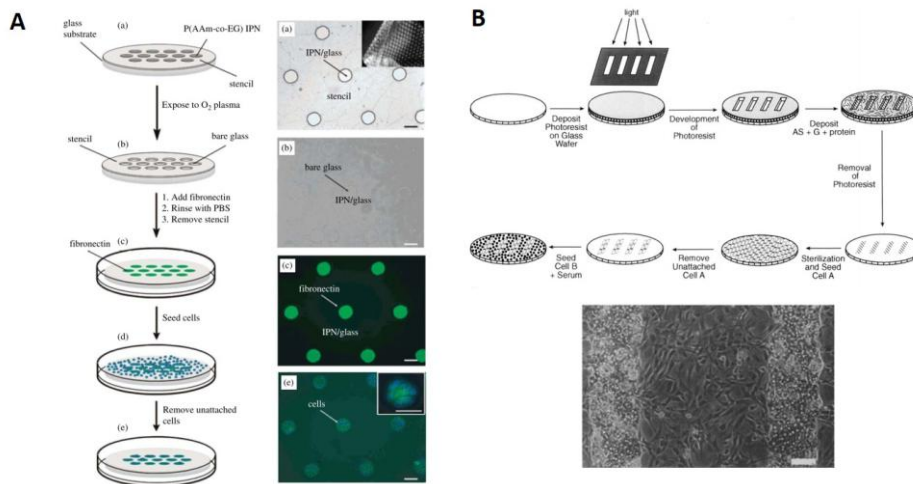


Figure 1.3 Assemblage de cellules sur substrat biofonctionnalisé. A) Assemblage de cellules vivantes sur fibronectine tapissant les fonds des puits de PDMS (Tourovskaja et al. 2003) B) Assemblage de deux types cellulaires sur substrat biofonctionnalisé (Goubko et al., 2009).

### 2.2.2. Assemblages dirigés par motifs topographiques

L'assemblage dirigé par des motifs topographiques est une technique relativement récente par rapport à celles citées précédemment. Cette technique permet la création de structures colloïdales de taille et géométrie bien définies. Cette approche est basée sur l'utilisation de substrats avec des motifs topographiques, généralement en creux, réalisés par une méthode de lithographie. Une fois la suspension colloïdale étalée sur la surface du substrat et le processus d'évaporation initié, la ligne de contact (ligne triple) balaye la surface de l'échantillon. Durant ce déplacement, la ligne de contact est localement déformée par la présence des motifs. Cette déformation génère des forces de capillarité qui entraînent les particules dans les motifs topographiques où elles sont étroitement confinées. L'assemblage dirigé par des motifs topographiques est régi par trois forces principales :

- Une force hydrodynamique qui assure le transport des colloïdes vers la ligne de contact.
- Une force de capillarité qui pousse les colloïdes situés à la ligne de contact dans les motifs et les organise au sein des motifs.
- Des forces d'interactions de Van der Waals qui, une fois le solvant entièrement évaporé, maintiennent les structures fabriquées adsorbées sur la surface du substrat.

La taille et la forme des assemblages obtenus dépendent de la géométrie des motifs topographiques et de leurs dimensions (Figure 1.4.B) (Xia et al., 2003). Sur la base de ce

principe, Rivera et son équipe ont pu organiser des nanoparticules d'or sur une surface structurée avec des puits en plaçant une particule par puit. (Rivera, 2009). (Figure 1.4.A).

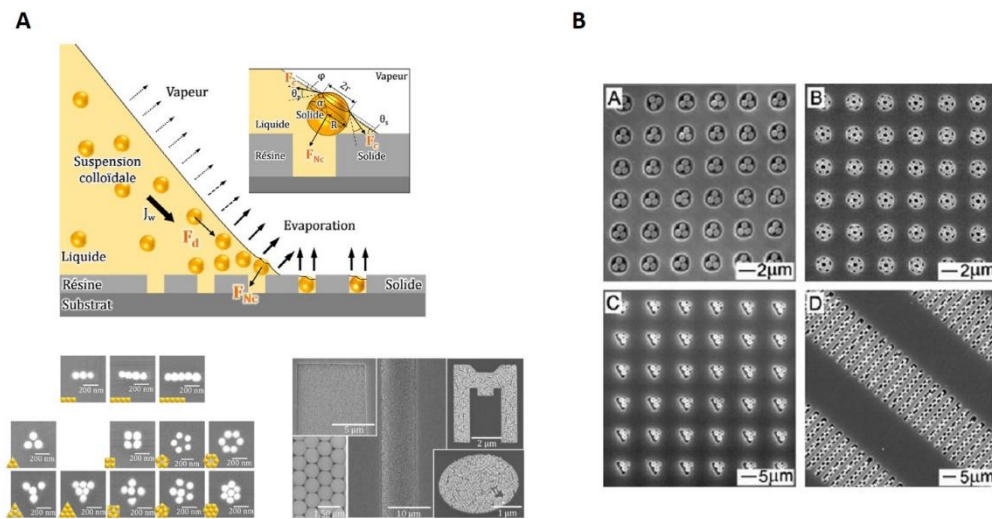


Figure 1.4 Assemblage de micro et nano-objets dirigé par motifs topographiques. A) Assemblage par évaporation et force convective de nano-objets sur support multi-puits (Rivera, 2009). B) Différentes structures d'assemblages fonction des géométries ainsi que des dimensions des motifs (Xia et al., 2003).

Toutes les méthodes d'assemblages dirigés sur support citées ci-dessus permettent de manipuler différents types de micro-objets, de réaliser des assemblages structurés ainsi que de contrôler leur positionnement. Toutefois, l'inconvénient dont souffrent ces méthodes est une adsorption très forte des particules sur la surface des supports suite à l'évaporation du liquide, ce qui rend difficile la récupération des assemblages en solution ou leur transfert sur d'autres surfaces. Afin de lever ce verrou, des techniques de manipulation sans contact ont été développées pour réaliser des assemblages directement en milieu liquide sans étape d'évaporation.

### 2.3. Assemblage par manipulation sans contact

L'assemblage par manipulation sans contact repose sur l'emploi de champs de forces électriques, magnétiques, optiques et acoustiques qui entraînent le déplacement et le confinement des micro et nano-objets dans des zones bien définies dans le volume de la suspension ou sur la surface d'un support. Ces méthodes de manipulation présentent l'avantage de ne pas nécessiter de contact mécanique direct entre l'outil de manipulation et l'objet manipulé et de réaliser les assemblages dans le liquide. Ceci permet d'écartier le problème de forte adsorption des assemblages sur le support. Les techniques de manipulation sans contact les plus utilisées et les plus citées dans la littérature sont les pinces optiques, les pinces magnétiques, les pièges acoustiques et la diélectrophorèse.

## 2.3.1. Manipulation par force optique

La pince optique repose sur l'utilisation de la force produite par un faisceau laser pour piéger une particule ou une cellule et la déplacer physiquement dans le volume d'un milieu transparent. Le piège optique résulte d'un équilibre entre une force de pression de radiation qui pousse l'objet dans la direction de propagation du faisceau et une force de rappel qui résulte d'un gradient d'intensité lumineuse et qui l'entraîne vers le centre du faisceau (Figure 1.5). Si le faisceau lumineux est mis en mouvement, l'équilibre des forces exercées sur l'objet est modifié, entraînant son déplacement au centre du faisceau. Ainsi, l'objet manipulé suit le mouvement du faisceau selon les trois axes de l'espace. Les pinces optiques sont utilisées pour manipuler des objets allant d'une taille de quelques dizaines de nanomètres à quelques micromètres. Cette technique est limitée à la manipulation d'objets transparents.

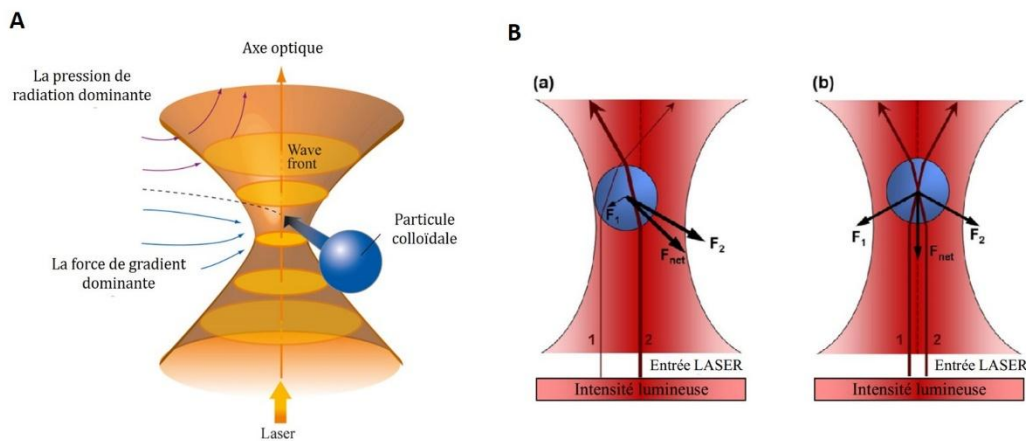


Figure 1.5 A) Principe physique de la pince optique B) a) Principe d'attraction d'un micro-objet par pince optique b) description des forces ramenant le centre du micro-objet vers le point focal (Kharboutly, 2010).

Les pinces optiques ont été utilisées pour manipuler, piéger et assembler une grande variété de micro-objets tels que des particules synthétiques (Emiliani et al., 2004) (Figure 1.6.C), des entités biologiques (Ozkan et al., 2003 ; Ferrari et al., 2005, Shi et al., 2009) (Figure 1.6.B), ainsi que des nano-objets comme des nanotubes de carbone (Plewa et al., 2004 ; Marago et al., 2007) (Figure 1.6.A). Cependant, la zone de focalisation d'un faisceau lumineux est assez réduite, ce qui limite le nombre d'objets qui peuvent être piégés par le faisceau. Par ailleurs, il existe des pinces optiques multipièges à base de plusieurs faisceaux d'irradiation qui peuvent être contrôlés et manipulés indépendamment (Ferrari et al., 2005) (Figure 1.6.B). L'intégration de plusieurs pinces optiques dans le même dispositif expérimental augmente fortement le coût de ces outils de manipulation .

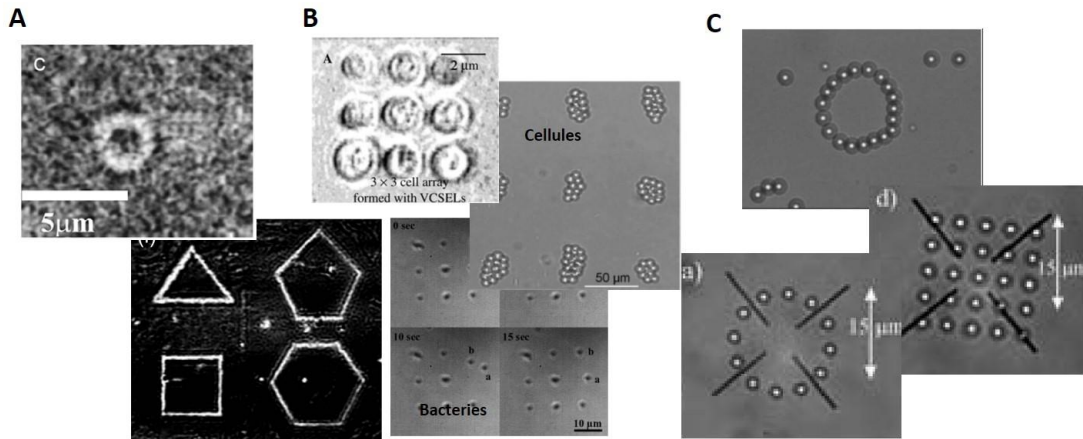


Figure 1.6 Assemblage par pince optique de différents types de micro-objets. A) Nanotubes de carbone (Plewa et al., 2004 ; Marago et al., 2007). B) Cellules biologiques (Ozkan et al., 2003 ; Shie et al., 2009 ; Ferrari et al., 2005). Particules en polystyrène (Emiliani et al., 2004).

### 2.3.2. Manipulation par force acoustique

Le principe de la manipulation par onde acoustique ou « acoustophorèse » est de générer dans une chambre de manipulation une onde acoustique stationnaire soit en utilisant comme support un substrat piézoélectrique soit en formant une cavité résonante dans un substrat mis au contact d'une source de radiation acoustique. Les particules ou cellules en suspension dans un liquide se retrouvent exposées dans cette chambre de manipulation à une onde acoustique stationnaire qui provoque le déplacement des molécules du liquide et des variations de pression dans l'espace de propagation de l'onde. De ces gradients de pression résulte une force qui agit sur les objets en suspension et provoque leur déplacement. Cette force acoustique est le résultat de deux forces de radiation. La première est la force de radiation primaire générée par la propagation de l'onde acoustique stationnaire. La deuxième est la force de radiation secondaire, appelée force de Bjerknes, et qui est due à la diffusion de l'onde acoustique incidente par les particules ou les cellules dans le liquide. Dans la plupart des applications, la force de radiation primaire est supérieure à la force secondaire de plusieurs ordres de grandeurs. En effet, la force de Bjerknes diminue rapidement avec la distance interparticules. Ainsi, la composante axiale de la force primaire d'irradiation, notée  $F_r$  (eq.1.1) agit sur les particules et les cellules dans la direction de propagation de l'onde pour les entrainer vers les nœuds ou les ventres de l'onde acoustique selon le facteur de contraste acoustique qui dépend des densités et compressibilités des objets manipulés et de leur milieu environnant (eq.1.2) (Figure 1.7.A).

$$F_r = -\left(\frac{\pi p_0^2 V_p \beta_m}{2\lambda}\right) \phi(\beta, \rho) \sin(2kx) \quad (1.1)$$

Où  $\phi(\beta, \rho)$  le facteur contraste acoustique exprimé par l'équation 1.2 :



$$\Phi(\beta, \rho) = \frac{5\rho_p - 2\rho_m}{2\rho_p + 2\rho_m} - \frac{\beta_p}{\beta_m} \quad (1.2)$$

Dans l'équation 1.2,  $\rho_p$  et  $\rho_m$  représentent respectivement les densités des particules (ou cellules) et du milieu, alors que  $\beta_p$  et  $\beta_m$  représentent leurs compressibilités.

La manipulation par force acoustique a été utilisée pour le tri et la séparation de micro-objets de tous types : particules en polystyrène, cellules vivantes, bactéries et biomolécules (Shi et al., 2009, Petersson et al., 2005) (Figure 1.7). Cette méthode de manipulation a aussi été utilisée pour la formation d'agrégats de particules et pour étudier l'influence de la concentration de l'électrolyte sur la formation des agrégats de particules de polystyrène (Ding et al., 2012, Bazou et al., 2004). Elle a également été appliquée dans le domaine de la bioingénierie pour contrôler la formation d'agrégats cellulaires (Bazou et al., 2012) et pour étudier des interactions cellulaires (Coakley et al., 2004).

Le point fort de la manipulation acoustique réside dans la possibilité de l'employer sans contrainte de taille, ni de milieu ou de marquage spécifique comme c'est le cas pour d'autres méthodes de manipulation. De plus, la force acoustique est une force de longue portée qui permet la manipulation simultanée d'un grand nombre de micro-objets. En dépit de tous ces avantages, la manipulation acoustique peut introduire des contraintes au niveau des substrats employés.

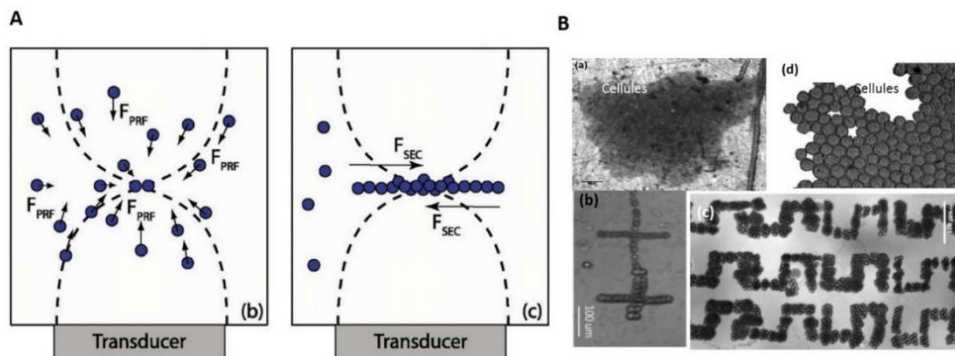


Figure 1.7 Manipulation de micro-objets par force acoustique. A) Principe de la manipulation acoustique. B) Assemblages de particules et de cellules par forces acoustiques B.a) Assemblage de cellules par onde acoustique pulsée. B.b et d) Assemblage de cellules par onde acoustique stationnaire, B.c) Assemblage de microparticules en polystyrène (Ding et al., 2012).

### 2.3.3. Manipulation par force magnétique

La manipulation magnétique ou « magnétophorèse » repose sur l'application d'un champ magnétique non uniforme pour entraîner le déplacement des particules ou des cellules immergées dans un liquide. Cette manipulation s'effectue grâce à une force magnétique qui implique une différence de susceptibilité magnétique entre le micro-objet et son milieu

environnant. La force magnétique exercée par l'application d'un champ magnétique  $B$  sur une particule de rayon  $r$  possédant une susceptibilité magnétique  $\chi_p$  dans un milieu de susceptibilité magnétique  $\chi_m$  est exprimée comme suit<sup>1</sup> :

$$F_{mag} = \frac{2\pi r^3(\chi_p - \chi_m)}{3\mu_0} \nabla |B|^2 \quad (1.3)$$

$\nabla$  est l'opérateur gradient,  $\mu_0$  est la perméabilité magnétique du vide.

Cette force magnétique peut être répulsive ou attractive en fonction du signe de la différence de susceptibilité magnétique  $\Delta\chi = \chi_p - \chi_m$ . Lorsque cette différence est positive, la force magnétique attire les objets manipulés vers les maxima du champ magnétique. Ce phénomène appelé « magnétophorèse positive » s'applique à des objets dont la susceptibilité est supérieure à celle de leur milieu d'immersion tels que les particules super-paramagnétiques et les cellules marquées magnétiquement. A l'opposé, quand la différence de susceptibilité est négative, les micro-objets auront tendance à s'éloigner des maxima pour se rejoindre dans les zones où le champ magnétique est le plus faible. Ce dernier phénomène correspond à la magnétophorèse négative et s'applique par exemple à des objets diamagnétiques immergés dans un milieu enrichi en ions paramagnétiques.

L'intensité de la force magnétique dépend également du volume des objets manipulés ainsi que de l'intensité et du gradient du champ magnétique. Plusieurs travaux décrivent l'utilisation de différentes sources de champ magnétique dans des microsystèmes pour la manipulation des particules et des cellules. Zanini et al. ont démontré par exemple que l'utilisation de micro-aimants permanents en néodyme fer bore permettait de générer des champs et des gradients de champ magnétique importants (Figure 1.8.A) (Zanini et al., 2012). Ceci leur a permis d'attirer et de trier efficacement des cellules et des bactéries faiblement marquées avec des nanoparticules super-paramagnétiques (Osman et al., 2012, Pivetal et al., 2014). Un autre travail remarquable de manipulation magnétique de cellules a été rapporté par Souza et son équipe décrivant l'assemblage et la mise en culture d'agrégats cellulaires par lévitation magnétique (Souza et al., 2010), (Figure 1.8.C). D'autres exemples de manipulation des cellules sans marquage magnétique sont décrits dans la littérature. On peut citer par exemple la manipulation de cellules érythrocytes (globules rouges) qui présentent des

---

<sup>1</sup> Cette équation s'applique dans le cas de particules paramagnétiques ou diamagnétiques, ou dans le cas de particules superparamagnétiques soumises à un champ de faible intensité. Dans le cas contraire, l'aimantation atteint le seuil de saturation et ne dépend plus du champ appliqué. La force devient alors proportionnelle au gradient de  $B$ .



propriétés magnétiques contrastant suffisamment avec celles des milieux biologiques pour pouvoir les déplacer par magnétophorèse positive (Furlani et al., 2007). La manipulation sans marquage de levures et leur positionnement régulier sur une surface par magnétophorèse négative dans un milieu enrichi en ions paramagnétiques ont également été décrits (Laforet, 2010). Par ailleurs, la manipulation magnétique a été exploitée pour réaliser des assemblages à base de microparticules magnétiques et de particules diamagnétiques (Demirörs et al., 2013). (Figure 1.8.B)

La magnétophorèse est une méthode de manipulation efficace mais qui nécessite un marquage magnétique soit des objets manipulés, soit des milieux de manipulation. Ce marquage restreint le type de particules qui peuvent être manipulées par cette méthode et peut ne pas être souhaitable suivant l'application.

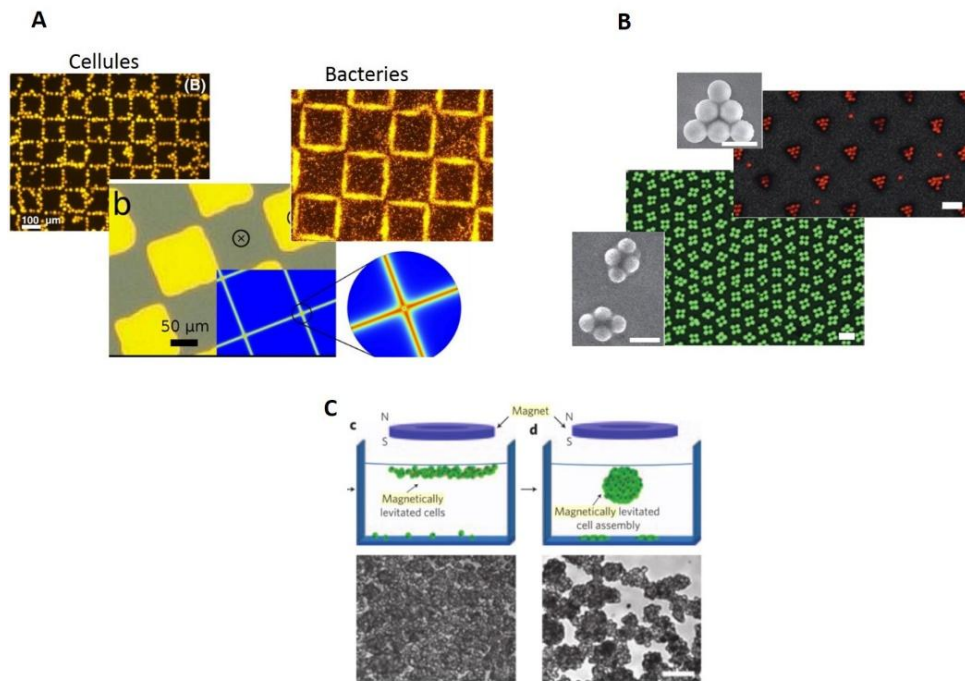


Figure 1.8 A) micro-aimant en NdFeB (Zanini et al., 2012) pour l'attraction et le tri de cellules et de bactéries respectivement (Osman et al., 2012, Pivetal et al., 2014). B) Assemblage de particules (Demirörs et al., 2013). C) Assemblage et culture de cellules par lévitation magnétique (Souza et al., 2010).

### 2.3.4. Manipulation par force diélectrophorétique

La diélectrophorèse décrit le mouvement d'un objet polarisable placé dans un champ électrique non-uniforme. La présence du champ électrique polarise l'objet et crée un moment dipolaire avec une répartition de charges opposées aux deux extrémités de l'objet. Les forces s'exerçant sur les charges induites opposées ne se compensent pas, en raison de la non-uniformité du champ, ce qui induit le déplacement de la particule. Ce déplacement se fait

grâce à la force, dite force diélectrophorétique (Pethig, 2010), dont l'expression est donnée par l'équation 1.4 ci-dessous :

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_m r^3 \operatorname{Re} [CM] |\nabla|E|^2 \quad (1.4)$$

Avec ( $r$ ) le rayon,  $\epsilon_m$  permittivité du milieu,  $E$  le champ électrique,  $\operatorname{Re} [CM]$  partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti.

Cette force agit sur les particules en fonction de leur volume ( $V$ , rayon  $r$ ), du gradient du champ électrique appliqué ( $|\nabla|E|^2$ ) et de la différence de polarisabilité entre la particule et son milieu. Cette différence de polarisabilité est fonction de la fréquence du champ électrique appliqué et de la nature des particules et du milieu de suspension. Elle est quantifiée par la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti  $\operatorname{Re}(CM)$  présenté dans l'équation suivante (1.5)

$$CM = \left( \frac{\tilde{\epsilon}_p - \tilde{\epsilon}_m}{\tilde{\epsilon}_p + 2\tilde{\epsilon}_m} \right) \quad (1.5)$$

Avec  $\tilde{\epsilon} = \epsilon - j \frac{\sigma}{\omega}$

$\tilde{\epsilon}_p$  et  $\tilde{\epsilon}_m$  représentent les permittivités complexes de la particule et du milieu respectivement,  $\sigma$  la conductivité.

Lorsque  $\operatorname{Re}(CM) > 0$ , cela signifie que la particule est plus polarisable que le milieu et la force diélectrophorétique dirige la particule dans le sens du gradient vers les zones de champ électrique maximum. Ce phénomène est appelé diélectrophorèse positive (DEPp). A contrario, quand  $\operatorname{Re}(CM) < 0$ , la particule est moins polarisable que le milieu, et la particule est repoussée à l'opposé du gradient, vers les zones de champ minimum. Ce phénomène est appelé diélectrophorèse négative (DEPn) (Figure 1.9)

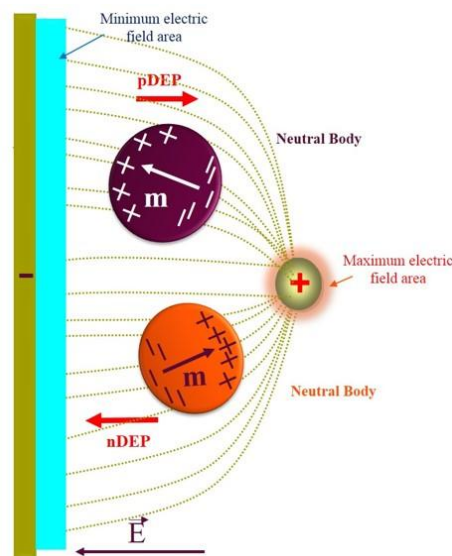


Figure 1.9 Principe général de la diélectrophorèse

Depuis la preuve d'applicabilité du principe diélectrophorétique sur des objets de faible taille à la fin des années 70 par Pohl et son application au contrôle du mouvement d'une ou plusieurs particules, c'est devenu un outil de plus en plus utilisé pour déplacer, trier, assembler, positionner des micro et nano-objets de tous types et de natures différentes (billes de polystyrène, bactéries, cellules, virus, nanotubes...) ainsi que pour étudier leurs propriétés intrinsèques (Green et al., 1999 ; Zou et al., 2008).

La diélectrophorèse a beaucoup été utilisée pour des applications dans le domaine de la microélectronique comme pour la fabrication d'un dispositif électronique à nanostructure unique par piégeage de nanoparticules d'or (Hong et al., 2006), ou l'assemblage de couches de nanoparticules d'indium pour la fabrication de résistances (Shi et al., 2003). L'application de la diélectrophorèse ne s'est pas restreinte à ces domaines, elle a aussi fait ses preuves dans les domaines de la médecine, la biologie ainsi que la bioingénierie. Elle a beaucoup été exploitée pour trier des cellules biologiques et permettre d'effectuer des études plus ciblées et précises sur un seul type cellulaire comme dans le cas du sang (Chen et al., 2014), étudier les interactions intercellulaires (Dunne et al., 2014) mais aussi la formation de tissus synthétiques mimant les tissus naturels (Yu et al., 2014), ou la construction d'un réseau neuronal (Honegger et al., 2013).

Ce document porte sur l'application du phénomène de diélectrophorèse à la réalisation d'assemblages permanents de particules et de cellules. La suite de ce chapitre sera donc en partie consacrée à sa présentation détaillée.

## 2.3.5. Bilan des techniques de manipulation sans contact

Nous avons effectué une comparaison entre les techniques de manipulation sans contact. Elle est basée sur la comparaison de la complexité du matériel expérimental nécessaire à l'utilisation de chaque technique, la capacité à manipuler différents types d'objets ainsi que l'ordre de grandeur des forces en jeu. Cette comparaison a été réalisée dans le but de faciliter le choix de la technique adaptée à nos besoins, abordé à la fin de cette partie du chapitre 1.

Techniques	Optique	acoustique	magnétophorèse	Diélectrophorèse
<b>Composants du système</b>	Laser, guide optique, condenseur	Substrat spécifique, Source de tension	Bobine, source de courant ou aimants (matériaux magnétiques doux ou aimants permanents)	Electrodes, source de tension
<b>Milieu liquide</b>	oui	oui	oui	oui
<b>Objets</b>	Transparents	Tous	Ferro-para et dia-magnétiques	Tous
<b>Ordre de grandeur de la force</b>	0.1 nN	150 pN	1 $\mu$ N	0.1 $\mu$ N

Tableau 1.1 Comparaison des différentes techniques de manipulation sans contact (Kharboutly, 2011)

## 3. Assemblages permanents par les techniques sans contact

Comme on a pu voir précédemment, les techniques sans contact sont adaptées à la formation d'assemblages de tout type de particules (particules synthétiques ou biologiques). Par contre, ces techniques présentent un inconvénient commun qui est l'incapacité à conserver les assemblages formés en l'absence des forces de manipulation. En effet, l'énergie communiquée par l'agitation thermique des molécules des liquides aux objets assemblés après l'annulation des champs de force, éloigne les objets assemblés les uns des autres entraînant la destruction des assemblages. Afin de lever ce verrou, des équipes de recherche ont combiné ces techniques de manipulation sans contact à des méthodes d'assemblage permanent telles que l'utilisation d'une matrice, l'addition d'agents de couplage ou l'utilisation de biomolécules spécifiques afin de permettre aux assemblages formés de rester étroitement liés et permanents en l'absence des forces de manipulation. Dans ce qui suit, nous présentons les différentes méthodes qui ont été associées aux techniques de manipulation pour garder les structures assemblées permanentes.

### 3.1. Immobilisation dans une matrice

L'immobilisation ou le piégeage dans une matrice est une approche qui vise à retenir physiquement ou chimiquement les micro-objets assemblés (particules synthétiques, cellules, bactéries...) dans un système de matrice sans perte de leurs propriétés intrinsèques ou leur

activité biologique dans le cas des cellules vivantes. L'approche la plus convoitée est celle du piégeage dans un hydrogel.

Un hydrogel se constitue d'un polymère hydrophile et d'un pourcentage important d'eau. Il existe deux catégories d'hydrogels : Les hydrogels réversibles qui sont aussi dit « physiques » et les hydrogels irréversibles « chimiques » (Hoffman et al., 2002). Les hydrogels sont beaucoup utilisés par l'industrie pharmaceutique dans la fabrication des revêtements des patches et des capsules contenant les principes actifs des médicaments. Par ailleurs, ils trouvent de plus en plus d'applications dans l'ingénierie tissulaire pour leur structure qui ressemble à celle des tissus naturels (Lutolf et al., 2005). En effet, leur grande teneur en eau et leur porosité permettent le transport des nutriments nécessaires aux cellules et la diffusion de leurs déchets reproduisant ainsi un environnement aqueux semblable à celui des cellules dans un organisme vivant. De plus, le caractère biocompatible des hydrogels rend possible leur implantation dans le corps humain sans qu'ils lui soient nuisibles. Plusieurs travaux de recherche ont décrit l'utilisation des hydrogels comme une matrice structurale pour immobiliser des cellules et les faire croître, ceci dans le but d'effectuer des analyses de la différenciation cellulaire ou former des implants pour la transplantation de cellules spécifiques dans un sujet (Jen et al., 1996 ; Riley et al., 2001). Dans cette dernière application, il a été montré que les cellules restaient fonctionnelles tout en étant protégées du système immunitaire.

D'autres travaux ont décrit l'utilisation des hydrogels dans des techniques de manipulation sans contact afin de rendre les assemblages obtenus permanents. L'hydrogel le plus utilisé dans ces applications est le polyéthylène glycol ou polyéthylène glycol diacrylate photosensible. Par exemple, l'équipe d'Albrecht et celle d'Abdallat ont décrit l'utilisation de cet hydrogel pour figer des assemblages de cellules obtenus par diélectrophorèse (Albrecht et al., 2006 ; Abdallat et al., 2013) (Figure 1.10. A). Yamamoto et son équipe ont exploité ce même principe pour créer un immuno-capteur constitué d'assemblages de particules en polystyrène biofonctionnalisées piégées dans l'hydrogel (Figure 1.10.B) (Yamamoto et al., 2012).

Les hydrogels présentent beaucoup d'avantages de par leur biocompatibilité, leur pouvoir de procurer un environnement adéquat à la croissance cellulaire. En revanche, ils sont très difficiles à manipuler et peuvent être difficiles à stériliser (Hoffman et al., 2002).

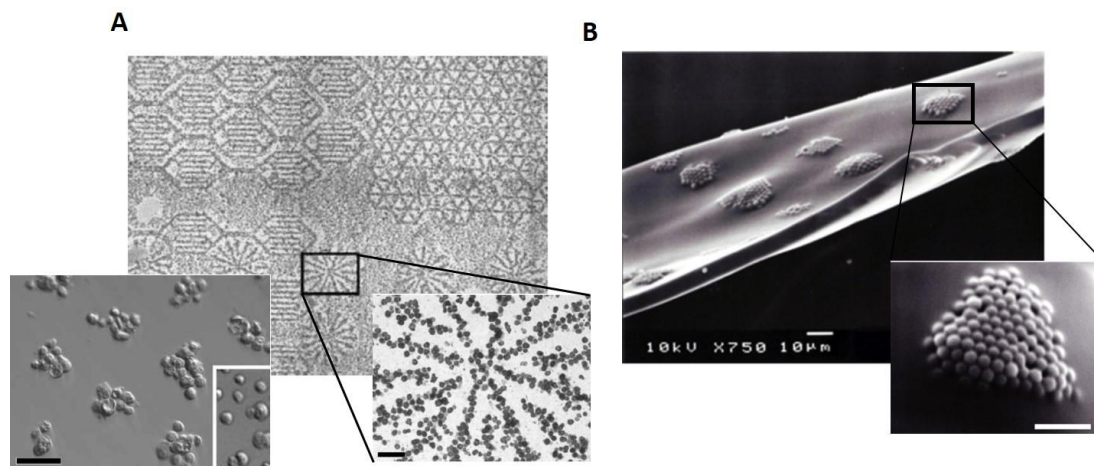


Figure 1.10 Assemblages permanents de microparticules dans de l'hydrogel PEG photosensible effectués par diélectrophorèse. A) Amas de cellules d'hépatocytes primaires de rat piégés dans un hydrogel (Albrecht et al., 2006). B) Assemblages de Particules en polystyrène piégées dans un film d'hydrogel (Yamamoto et al., 2012).

### 3.2. Assemblage permanent par création de liaisons bio-spécifiques

Un autre moyen d'assembler des micro-objets de façon permanente est d'utiliser des interactions bio-spécifiques. Ces interactions peuvent être soit des interactions ligand-récepteur, c'est-à-dire basées sur la reconnaissance moléculaire entre un récepteur et un ligand qui lui est spécifique tels que antigène/anticorps ou biotine/streptavidine, ou par la complémentarité dans le cas d'hybridation d'oligonucléotides. Cette méthode d'assemblage repose sur l'ajout d'un ligand dans le milieu une fois l'assemblage formé pour relier les cellules entre elles ou les particules préalablement fonctionnalisées avec le récepteur correspondant. Par exemple, le groupe de Biswal a réussi à assembler de manière permanente des filaments de particules super-paramagnétiques fonctionnalisées en surface avec de la streptavidine en rajoutant des PEG bis-biotinylés (portant deux groupements biotine aux extrémités) (Figure 1.11.B). Ces derniers ont joué le rôle de bras moléculaires reliant les particules assemblées entre elles en l'absence du champ magnétique (Biswal et al., 2003). Le groupe de Byrom a réalisé des assemblages similaires en utilisant des particules fonctionnalisées avec des oligonucléotides et en rajoutant un bras oligonucléotide complémentaire (Figure 1.11.C) (Byrom et al., 2014). D'autres travaux ont également décrit l'utilisation des interactions bio-spécifiques pour obtenir des assemblages cellulaires permanents par manipulation sans contact. Le groupe de Sebastian a obtenu des assemblages permanents de cellules jurkat formés par diélectrophorèse<sup>2</sup> (Figure 1.11.D) (Sebastian et al., 2007). Goubault et al. ont pu aussi réaliser des assemblages permanents de cellules du sang

<sup>2</sup> probablement en activant l'interaction spécifique entre les protéines cadhérines présentes dans la membrane cellulaire (interaction cadhérine-cadhérine)

préalablement bio-fonctionnalisées avec des biotines en les couplant avec des streptavidines (Figure 1.11.D) (Goubault et al., 2004).

Il est également possible d'utiliser les interactions bio-spécifiques pour assembler de manière permanente deux populations différentes d'objets en fonctionnalisant la surface de la première avec le ligand et celle de la deuxième avec le récepteur. Cette approche a été employée en 1999 par Velev et Kaler pour réaliser un biocapteur en couplant de manière permanente et par diélectrophorèse négative des particules en polystyrène fonctionnalisées avec un anticorps à des particules en or portant en surface l'antigène correspondant (Figure 1.11.A) (Velev., 1999).

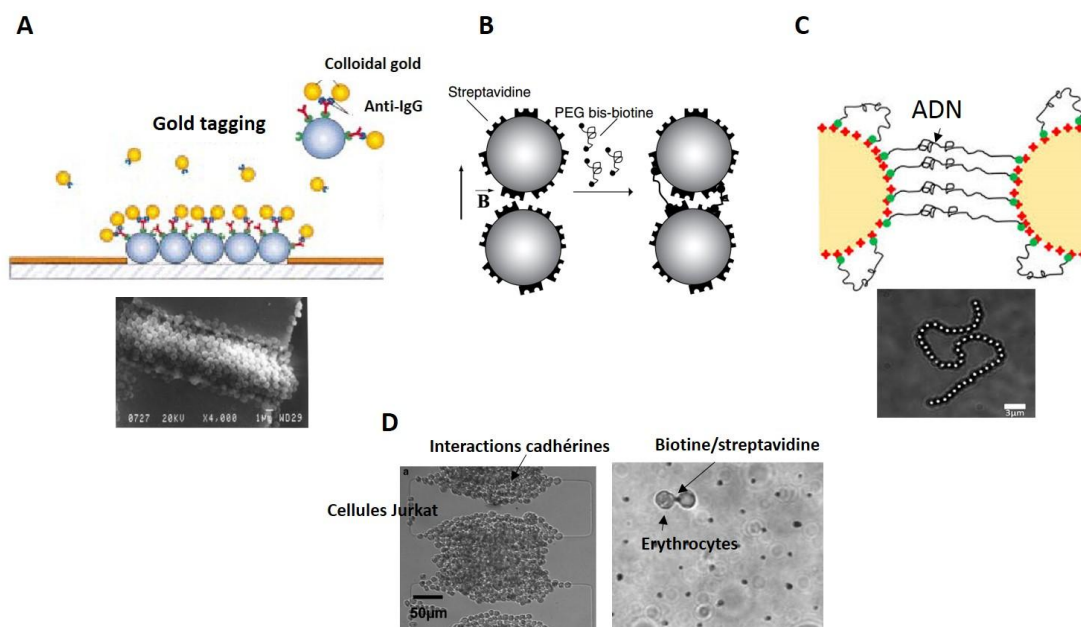


Figure 1.11 Assemblages permanents de micro-objets par manipulation sans contact et couplage par interactions bio-spécifiques. A) Assemblages diélectrophorétiques de particules en polystyrène et or et couplage par interaction anticorps/ antigène (Velev et al., 1999). B) Assemblage magnétique de particules magnétiques et couplage par interactions biotine/streptavidine (Biswal et al., 2003). C) Assemblage magnétique de particules magnétiques et couplage par interaction de complémentarité d'oligonucléotides (Byrom et al., 2014). D) Assemblage diélectrophorétique et magnétique respectivement de cellules vivantes par interaction cadhérine/ cadhérine et biotine/streptavidine (Sebastian et al., 2007 ; Goubault., 2004).

La spécificité et la cinétique rapide de formation des liaisons bio-spécifiques rendent ces interactions les plus adaptées à une application pour l'assemblage permanent sans contact de micro et nano-objets. Néanmoins, une grande partie des interactions bio-spécifiques sont très sensibles aux changements des paramètres des milieux d'assemblage tels que le pH, la température, la salinité...etc. En effet, ces interactions font intervenir des molécules biologiques (protéines, et ADN) dont la structure et la réactivité sont sensibles à ces paramètres physico-chimiques. L'interaction biotine/ streptavidine est une des interactions



bio-spécifiques les plus stables. Cette interaction résiste à des conditions de pH, de salinité et température très variables (Gonzalez et al., 1999). Sa constante d'association est de l'ordre de  $10^{14}$ - $10^{15}$  mol<sup>-1</sup>.L, ce qui correspond à une énergie de liaison de près de 30 kT (Miyamoto et al., 1993). Cette énergie de liaison est équivalente à celle obtenue avec une liaison covalente.

### 3.3.Assemblage permanent par couplage chimique

#### 3.3.1. Couplage chimique par interactions non covalentes

Les interactions non covalentes font intervenir les liaisons de Van der Waals, hydrogène ou les liaisons électrostatiques. Très peu de travaux combinant l'assemblage par manipulation sans contact et le couplage par interactions non covalentes ont été décrits dans la littérature, ceci en raison de la non spécificité et de la fragilité de ces interactions. De plus, ces liaisons sont très sensibles aux variations de pH, de température et de salinité des milieux. Il existe toutefois quelques exemples de travaux décrivant la réalisation d'assemblages de cellules et de particules par liaisons électrostatiques en utilisant un polyélectrolyte de charge opposée. Le groupe de Reyes a réussi à fixer un ensemble de cellules par diélectrophorèse sur une surface fonctionnalisée avec un poly-électrolyte chargé positivement (Reyes et al., 2011) (Figure 1.12.A). Le groupe de Letters a également décrit l'utilisation d'un polyélectrolyte mais chargé négativement, le poly acide acrylique, pour réaliser des assemblages de particules super-paramagnétiques chargées positivement (Figure 1.12.B) (Letters et al., 2005). L'utilisation des poly-électrolytes dans l'assemblage des objets souffre toutefois d'une cinétique d'interaction très lente et d'un travail d'optimisation drastique pour trouver les conditions expérimentales d'interaction.

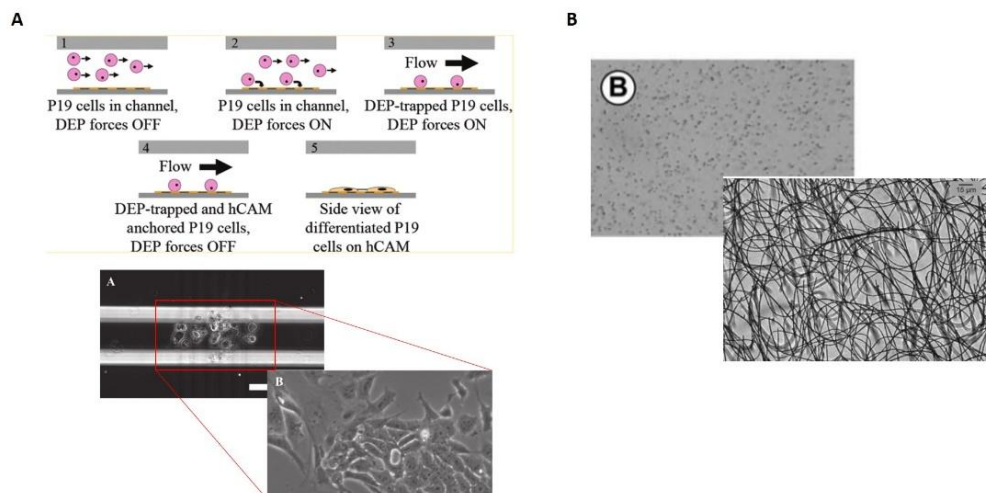


Figure 1.12 Piégeage de cellules assemblées par DEP sur un poly-électrolyte (Reyes et al., 2011), B) Assemblages irréversibles de particules magnétiques en filament par addition de polyélectrolyte PAA (Letters et al., 2005).



### 3.3.2. Couplage chimique par interactions covalentes

Une autre méthode pour la formation d'assemblages permanents de particules consiste à relier les surfaces des particules via des liaisons covalentes. Cette approche nécessite la présence sur les surfaces des particules manipulées de groupements chimiques à même de réagir avec d'autres groupements pour former des liaisons covalentes. Dans la plupart des exemples d'assemblages permanents par couplage covalent, les liaisons covalentes employées sont la liaison imine et la liaison amide. La liaison imine par exemple a été utilisée par le groupe de Suzuki pour assembler par diélectrophorèse et de manière permanente des particules de polystyrène fonctionnalisées par des groupements amines (Suzuki et al., 2004). Ainsi, en faisant réagir les groupements amines des particules aux groupements aldéhydes du glutaraldéhyde, il a été possible de relier les particules entre elles via des liaisons covalentes imines et de les utiliser dans une application aux biocapteurs (Figure 1.13.A). L'équipe de Furst a décrit également l'utilisation du glutaraldéhyde pour réaliser par manipulation magnétique des assemblages permanents de particules super-paramagnétiques fonctionnalisées avec des groupements amines (Furst et al., 1998) (Figure 1.13.B). D'autres travaux ont décrit l'utilisation de la liaison covalente amide pour assembler de façon permanente des assemblages de particules en faisant réagir un groupement ester activé avec une fonction amine. Cette méthode consiste à utiliser une longue chaîne moléculaire, le plus souvent des polyéthylènes glycols (PEG), portant des groupements amines ou esters activés aux extrémités qui se lient aux groupements chimiques complémentaires présents sur les surfaces des particules. Des assemblages permanents de particules super-paramagnétiques ont ainsi été obtenus par Suzuki et al. et par Haddour et al. en faisant réagir respectivement un diester activé, le disuccinimidyl suberate avec des particules porteuses de groupements amines (Suzuki et al., 2004) (figure 1.13 A) et une diamine, la jeffamine, avec des particules fonctionnalisées avec des esters activés (Haddour et al., 2010)(figure 1.14).

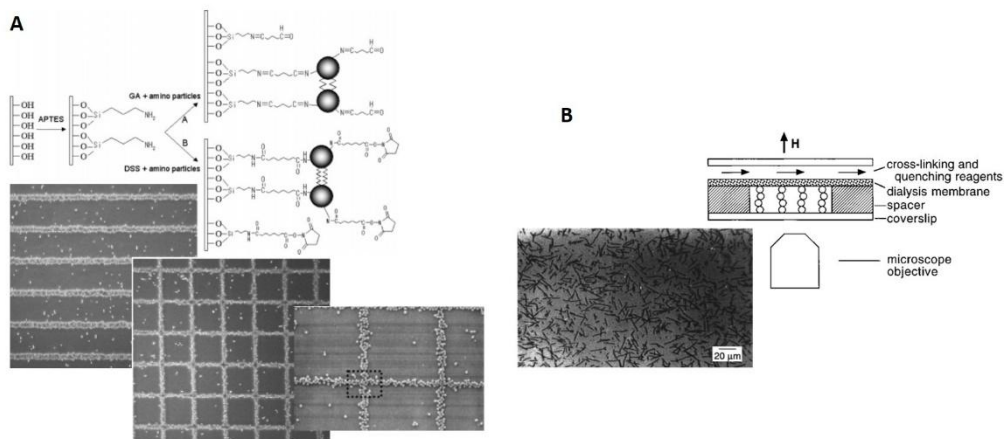


Figure 1.13 Assemblages permanents de particules par manipulation sans contact. A) Assemblage permanent de particules en polystyrène amino-fonctionnalisées par diélectrophorèse et couplage chimique par addition de glutaraldéhyde. B) Assemblage permanent de particules magnétiques amino-fonctionnalisées par manipulation magnétique et couplage chimique par addition de glutaraldéhyde (Furst et al., 1998)

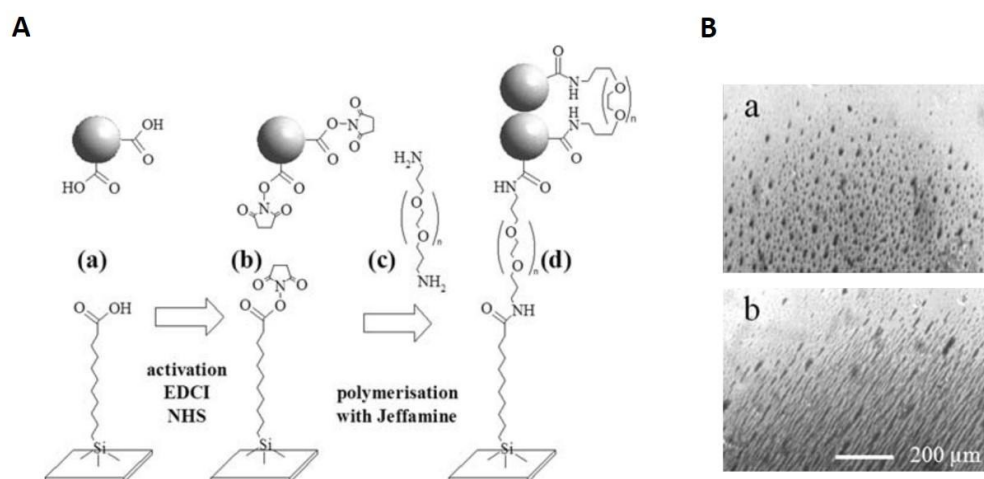


Figure 1.14 A) Etapes de l'assemblage permanent de microparticules magnétiques par manipulation magnétique et couplage par addition d'agent de couplage « Jeffamine ». a) Activation des groupements carboxyliques en esters activés, b) interaction des esters activés avec les groupements amines de la jeffamine. c) Assemblage des billes entre elles, d) greffage des assemblages de billes sur le substrat suivant le même principe d'interaction. B) Images représentant les assemblages permanents réalisés (Haddour et al., 2010).

### 4. Positionnement de nos travaux de thèse

L'objectif de ce travail de thèse est de relever un défi ambitieux qui consiste à réaliser des réseaux d'assemblages permanents de micro-objets (des cellules vivantes et des particules en polystyrène) visant le plus vaste champ applicatif possible, ceci à travers un procédé simple et générique permettant d'obtenir en un laps de temps réduit des assemblages permanents de forme et de position contrôlées sur de larges surfaces et pour un faible coût.

A partir de l'étude bibliographique réalisée, il ressort que l'utilisation des méthodes de manipulation avec contact n'est pas adaptée à un tel procédé à cause des effets d'adsorption non spécifique observés dans la manipulation d'objets micrométriques. La comparaison des méthodes de manipulation sans contact montre, quant à elle, que les pinces optiques sont des méthodes de manipulation précises mais applicables uniquement sur des particules transparentes et pour un nombre réduit d'objets avec un coût d'équipement assez cher. Cette méthode n'est donc pas la plus favorable pour l'assemblage en réseaux sur de larges surfaces de particules de différentes natures et avec de faibles coûts. La manipulation acoustique est une méthode de manipulation intéressante du fait qu'elle ne nécessite aucun marquage spécifique des milieux ni des objets manipulés. La force de manipulation offre une grande portée d'action et est également adaptée à une manipulation en réseau des objets. Toutefois, cette méthode reste encore limitée à l'heure actuelle au niveau des formes des assemblages obtenus et impose certaines contraintes sur le choix du substrat (en particulier, les substrats piézoélectriques sont relativement onéreux). La manipulation magnétique est une méthode très efficace pour assembler des micro et nano-objets. Toutefois, cette méthode requiert un marquage magnétique préalable des objets manipulés, ce qui pourrait changer les propriétés des assemblages à base de particules diamagnétiques ou de cellules biologiques.

La méthode nous semblant la plus adaptée au procédé que nous cherchons à développer est la diélectrophorèse (DEP). En effet, cette méthode de manipulation ne nécessite aucun marquage des objets et permet l'assemblage en réseau des particules et des cellules. Il est également possible avec cette méthode de manipulation de contrôler la forme et la taille des assemblages en jouant sur la structure des électrodes utilisées pour appliquer la force électrique de manipulation. De plus, l'élaboration des microsystèmes de diélectrophorèse repose sur des méthodes de microfabrication connues et maîtrisées.

Afin de rendre permanents les assemblages obtenus par cette méthode après l'annulation du champ électrique, nous avons choisi de combiner la diélectrophorèse à la méthode de

couplage la plus adaptée au procédé visé. Le piégeage dans une matrice est un moyen très intéressant pour assembler de manière permanente les structures obtenues mais leur récupération pour une éventuelle application ou caractérisation semble impossible. Après une comparaison des autres méthodes de couplage, nous avons choisi de combiner la manipulation par diélectrophorèse au couplage par interactions bio-spécifiques dans le cas des cellules. Ceci s'effectuera par interaction bio-spécifique naturelle de type cadhérine-cadhérine stimulée par le rapprochement des cellules grâce à la force diélectrophorétique. Dans le cas des microparticules, nous avons choisi de réaliser l'assemblage par diélectrophorèse négative et d'utiliser un couplage chimique covalent par addition de l'agent de couplage « Jeffamine ».

Dans la suite de ce chapitre, nous détaillerons les phénomènes physiques intervenant lors de la réalisation des assemblages par diélectrophorèse.

## Partie 2 : Phénomènes physiques entrant en jeu

### 5. Interactions entre particules colloïdales

#### 5.1. Le mouvement Brownien

Le mouvement brownien est décrit comme le mouvement désordonné et aléatoire animant une particule en suspension dans un fluide. Il résulte de l'agitation thermique, engendrant des collisions entre la particule et les molécules du fluide, de taille très inférieure (Pottier, 2012).

Pour un déplacement en 3 dimensions, la valeur moyenne du carré de la distance  $L$  de la particule au point initial varie en fonction du temps  $t$ , suivant la relation :

$$\langle L^2 \rangle = 6Dt \quad (1.6)$$

dans laquelle  $D$  est le coefficient de diffusion, donné par :

$$D = \frac{k_B T}{6\pi\eta r} \quad (1.7)$$

où  $\eta$  désigne la viscosité du fluide et  $r$  le rayon de la particule,  $k_B$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température en Kelvin.

Le coefficient de diffusion diminue rapidement lorsque le diamètre des particules augmente. Aussi, l'effet de l'agitation thermique est généralement pris en compte pour des particules de diamètre inférieur ou égal à  $1\mu\text{m}$ <sup>3</sup>. Au-delà, d'autres phénomènes tels que la sédimentation deviennent prépondérants.

#### 5.2. Les forces inter-particulaires

Les interactions colloïdales sont particulièrement importantes pour les particules de petites tailles. Ces interactions peuvent facilement l'emporter sur d'autres forces comme la force hydrodynamique ainsi que la gravité qui deviennent à leur tour dominantes lorsque les particules sont plus grosses.

Dans ce qui suit, nous présenterons dans un premier temps les forces inter-particulaires prises en compte par la théorie DLVO (du nom de ses auteurs, Derjaguin, Landau, Verwey et Overbeek), selon laquelle la stabilité des suspensions colloïdales dépend de l'équilibre entre les forces de Van der Waals attractives et les forces électrostatiques répulsives. D'autres forces, dites « non DLVO », car non prises en considération jusqu'ici par cette théorie, peuvent se révéler tout de même très importantes pour étudier la stabilité de certaines

---

<sup>3</sup> Dans l'eau, pour une particule de  $1\mu\text{m}$ ,  $D$  est de l'ordre de  $2 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$ .

suspensions. Ces dernières incluent notamment la solvation ainsi que les forces de proximité, agissant lorsque la distance séparant deux particules devient très faible.

### 5.2.1. Forces de Van der Waals

Même lorsqu'elles ne sont pas chargées, deux particules exercent l'une sur l'autre une force attractive due aux interactions électrostatiques entre leurs molécules (forces de Keesom, de Debye et de London), dénommées interactions de Van der Waals. Les interactions attractives entre molécules ont une portée très faible, puisque l'énergie attractive est proportionnelle à  $1/d^6$ ,  $d$  étant la distance entre les molécules. En revanche, les interactions attractives entre les particules, qui résultent de la sommation des attractions entre les paires de molécules, agissent à plus grande distance. Ainsi entre deux particules sphériques de rayon  $r$  séparées d'une distance  $d$ , l'énergie de ces attractions est exprimée comme suit (eq.1.8) (Grasso et al., 2002) :

$$U_{VDW} = \frac{Ar}{6d} \left[ 1 + \frac{d}{2r+d} + \frac{d}{r} \log \left( \frac{d}{2r+d} \right) \right] \quad (1.8)$$

A constante de Hamaker, dépend des propriétés des particules ainsi que de celles de leur milieu de dispersion. Elle est généralement de l'ordre de  $10^{-20}$  J (Israelachvili, 2011).

Les forces de Van der Waals sont la principale cause d'agrégation des particules dans une suspension colloïdale. Afin d'empêcher leur agrégation, la présence de forces répulsives électrostatiques est nécessaire. Lorsque ces dernières sont prépondérantes, la suspension colloïdale est stable.

### 5.2.2. Forces électrostatiques

Les forces électrostatiques sont des forces contrebalançant les forces de Van der Waals, elles sont de nature répulsive. Ces forces dépendent des charges de surface des particules, pouvant provenir par exemple de l'ionisation des groupements greffés en surface des particules voire de celle du polymère les constituant. Pour une particule immergée dans une solution électrolytique, la distribution ionique est homogène loin de la surface des particules. En d'autres termes, les co-ions et contre-ions sont dispersés de manière homogène. Cependant, à proximité de la surface de la particule, ces derniers s'organisent de façon hétérogène. En effet, les contre-ions (ions de charge opposée à celle de la surface) ont tendance à se concentrer préférentiellement à la surface des particules, alors que les co-ions (ions de charge identique à celle de la surface) sont repoussés plus loin dans la suspension. L'énergie électrostatique due à ces répulsions est déterminée par l'équation 1.9 (Campos et al., 2008) :

$$U_{EL} = 64\pi\epsilon_0\epsilon_{rm} \left(\frac{r^2}{d+2r}\right) \left(\frac{k_B T}{ze}\right)^2 \beta^2 \exp(-kd) \quad (1.9)$$

$$\text{Avec } \beta = \tanh \left[ \frac{ze\psi_0}{4kT} \right]$$

$\epsilon_{rm}\epsilon_0$  est la permittivité diélectrique du solvant ( $\epsilon_0$  étant la permittivité diélectrique du vide, égale à  $8.85 \cdot 10^{-12}$  F/m et  $\epsilon_{rm}$  la permittivité relative du solvant : dans l'eau à température ambiante  $\epsilon_{rm} \approx 78$ ),  $r$  rayon,  $d$  distance inter-particule  $T$  est la température exprimée en kelvins;  $k_B$  est la constante de Boltzmann, égale à  $1.38 \cdot 10^{-23}$  J/K,  $e$  est la charge de l'électron,  $z$  valence de l'électrolyte,  $\psi_0$  potentiel de surface,  $k = 1/\lambda_D$  avec  $\lambda_D$  longueur de Debye.

La distribution des co-ions et contre-ions à l'interface particules/électrolyte a été expliquée par le modèle de la double couche électrique.

### 5.2.2.1. Modèle de la double couche électrique

Ce phénomène de distribution ionique à la surface d'un objet immergé dans une solution ionique a été décrit par Gouy, Chapman et Stern par le modèle de la double couche électrique (EDL pour Electrical Double Layer). Dans ce modèle, on considère que les contre-ions attirés par les charges de surface forment une couche dite de « Stern ». Ces ions sont adsorbés à la surface du colloïde. Par ailleurs une deuxième couche « diffuse » est formée au-delà de celle de Stern. Elle est composée de contre-ions et de co-ions (en concentration minoritaire) mobiles sous l'effet de la compétition des effets électrostatiques et thermodynamiques (Tandon et al., 2008) (Figure 1.15). La concentration des contre-ions dans la couche diffuse est élevée à proximité de la surface du colloïde et décroît progressivement avec la distance, jusqu'à atteindre l'équilibre avec celle de la solution.

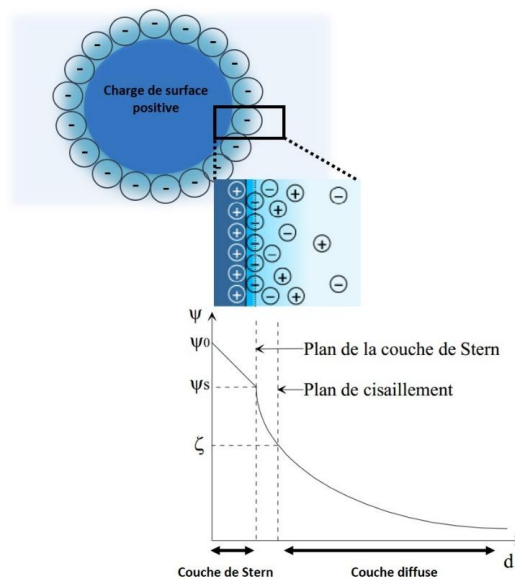


Figure 1.15 Modèle de la double couche électrique et décroissance exponentielle du potentiel électrique.

La structure de cette double couche dépend de la charge de surface des particules mais aussi de la force ionique du milieu  $F_i$ . Cette dernière se détermine grâce à l'expression suivante (1.10) :

$$F_i = \frac{1}{2} \sum c_i z_i^2 \quad (1.10)$$

Avec  $c_i$  la concentration en ions  $i$  à une distance infinie de la surface et  $z_i$  la valence de l'espèce ionique  $i$ .

La formation de la double couche tend à neutraliser le colloïde chargé et engendre une différence de potentiel entre la surface du colloïde et n'importe quel point de la solution suffisamment éloigné de cette surface. Cette différence de potentiel, de l'ordre de quelques millivolts, représente le potentiel de surface. Ce dernier peut être positif ou négatif, selon la charge du colloïde.

Selon la théorie EDL, pour une surface plane, le potentiel électrostatique décroît de manière exponentielle en partant de la surface selon l'équation 1.11, comme décrit (Figure 1.15).

$$\Psi(x) = \Psi_s \exp(-\kappa x) \quad (1.11)$$

où  $\Psi$  est le potentiel à la distance  $x$ ,  $\Psi_s$  le potentiel de la surface chargée et  $\kappa$  le paramètre de Debye Hückel ( $1/\kappa$  représente l'épaisseur de la double couche, indiquant la portée des forces électrostatiques).

Ce modèle est également applicable aux surfaces non planes. Dans le cas de particules sphériques, l'expression du potentiel électrostatique devient (eq.1.12) :

$$\Psi(r) = \frac{z_i e}{\epsilon_{rm} \epsilon_0} \exp(k(r - x)) \quad (1.12)$$

où  $x$  est la distance au centre de la sphère par rapport à laquelle est évalué le potentiel,  $r$  le rayon de la sphère,  $e$  la charge de l'électron,  $\epsilon_0$  la permittivité du vide et  $\epsilon_{rm}$  la permittivité relative du solvant.

La longueur de Debye  $\lambda_D$  dépend des propriétés du liquide, tandis qu'elle ne dépend pas des propriétés de surface telles que la charge ou le potentiel. Cette longueur est reliée à la force ionique par l'expression (1.13)

$$\lambda_D = \sqrt{\frac{\epsilon_{rm} \epsilon_0 k_B T}{2e^2 c N_A}} \quad (1.13)$$

$\epsilon_{rm} \epsilon_0$  est la permittivité diélectrique du solvant ( $\epsilon_0$  étant la permittivité diélectrique du vide, égale à  $8.85 \cdot 10^{-12}$  F/m et  $\epsilon_r$  la permittivité relative du solvant : dans l'eau à température ambiante  $\epsilon_r \approx 78$ ),  $T$  est la température exprimée en kelvins;  $k_B$  est la constante de Boltzmann, égale à  $1.38 \cdot 10^{-23}$  J/K,  $e$  est la charge de l'électron,  $N_A$  désigne le nombre d'Avogadro et  $c$  la concentration de l'électrolyte en moles/m<sup>3</sup>.

$\lambda_D$  varie en  $1/\sqrt{F_i}$  et dépend donc de la concentration de l'électrolyte, ainsi que de la valence des ions (Figure 1.16).



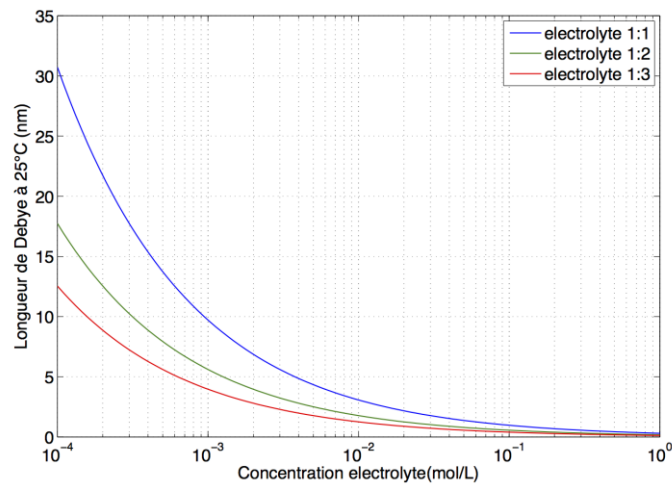


Figure 1.16 Evolution de la longueur de Debye en fonction de la concentration de l'électrolyte – comparaison d'électrolytes symétriques et non symétriques

Les interactions électrostatiques peuvent être influencées par différents paramètres, tels que :

- **La force ionique** : à faible force ionique, la couche de contre-ions entourant la particule peut s'étendre sur une distance assez importante, ce qui se traduit par l'apparition de forces de répulsion à grande distance entre les particules (dès que leurs couches de contre-ions se rencontrent). A l'inverse, pour de grandes forces ioniques, la double couche électrique est moins étendue et les particules doivent se rapprocher beaucoup plus avant de se repousser mutuellement.
- **Hétérogénéités au niveau de la charge de surface** : La charge de surface des particules colloïdales n'est pas toujours uniforme. Ces hétérogénéités peuvent d'ailleurs se situer à différents niveaux (ex : particules fonctionnalisées avec des groupements chimiques en surface constituées d'un polymère présentant des charges de surface opposées).
- **Rugosité** : les surfaces ne sont pas parfaitement lisses. Elles présentent souvent des rugosités pouvant avoir un impact sur les interactions (Bhattacharjee et al., 1998). De plus, la géométrie et la taille des particules peuvent également avoir une influence sur les forces électrostatiques.

#### 5.2.2.2. Potentiel zêta

Dans un champ électrique uniforme, une particule chargée se déplace à vitesse constante, sous l'effet du phénomène d'électrophorèse. La mobilité de la particule est liée à la constante diélectrique et à la viscosité du milieu de suspension, ainsi qu'au potentiel électrique à l'interface entre le liquide et la particule en mouvement, désigné comme étant le « potentiel zêta ». Cette interface, appelée « plan de cisaillement », se situe à la jonction entre la couche de Stern, fermement liée à la particule, et la couche diffuse qui ne l'est pas (Figure 1.15).

Le potentiel zêta dépend de plusieurs paramètres tels que la force ionique et le pH. L'influence de la force ionique sur la double couche a déjà été mentionnée au paragraphe précédent. La variation de la force ionique engendre un changement de la position du plan de cisaillement et donc de la valeur du potentiel zêta.

Le pH est le facteur influençant le plus le potentiel zêta. Son influence est maximale autour du point isoélectrique, qui correspond au pH auquel la charge devient neutre et le potentiel zêta s'annule. Par ailleurs, le potentiel zêta est généralement considéré comme un indicateur de stabilité des systèmes colloïdaux. Plus le potentiel zêta est élevé en valeur absolue, plus on se rapproche des conditions de stabilité des dispersions et inversement, plus le potentiel zêta est faible, plus on tend vers l'agrégation des particules. Une suspension présentant un potentiel zêta inférieur en valeur absolue à 10 mV est souvent instable, alors qu'une valeur supérieure à 30 mV traduit en général une bonne stabilité.

### 5.3. Stabilité des solutions colloïdales

La stabilité des suspensions colloïdales mono-dispersées a été expliquée de manière quantitative par les travaux de Derjaguin et Landau (Derjaguin, 1941) puis de Verwey et Overbeek (Verwey, 1948), leurs initiales ayant donné son nom à la théorie « DLVO ». Cette théorie se base sur l'hypothèse d'additivité des énergies potentielles d'interaction attractive de Van der Waals  $U_{vdW}$  et d'interaction répulsive électrostatique  $U_{EL}$ , dont la somme correspond au potentiel d'interaction totale  $U_{DLVO}$

$$U_{DLVO} = U_{EL} + U_{VDW} \quad (1.14)$$

L'intérêt de la théorie DLVO est de prévoir les phénomènes d'attraction ou de répulsion entre deux objets, en fonction de la distance qui les sépare. La Figure (1.17) représente l'énergie totale d'interaction ( $U_{DLVO}$ ) en fonction de la distance inter-objets ( $d$ )

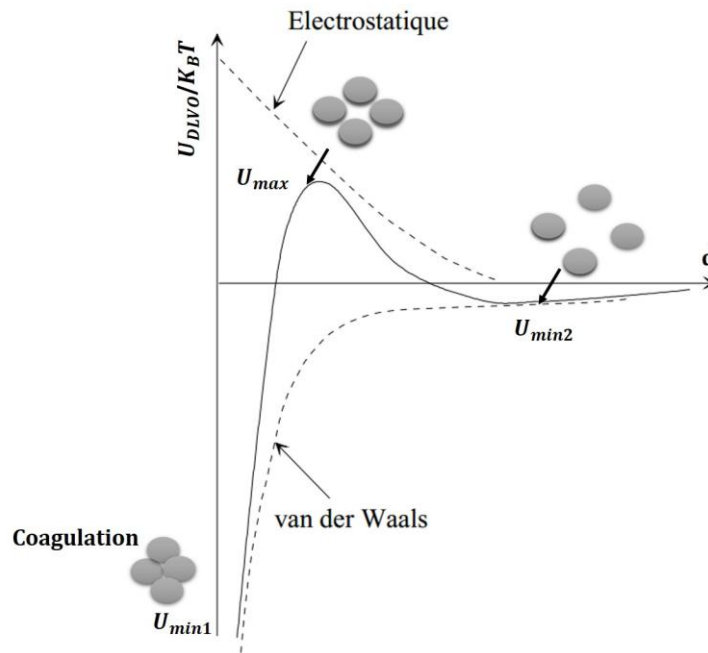


Figure 1.17 Profil de l'énergie potentielle d'interaction totale entre deux surfaces en fonction de la distance de séparation  $d$

Sur cette figure, la partie positive (en ordonnée) correspond à la répulsion et la partie négative correspond à l'attraction. Les courbes en pointillés représentent les interactions électrostatiques et de Van der Waals. La courbe en continu représente le profil DLVO issu de l'addition de ces deux interactions.

Etant donné que les interactions électrostatiques décroissent plus rapidement que celles de Van der Waals, l'attraction domine pour de grandes distances de séparation, d'où la présence d'un minimum dans le profil appelé deuxième minimum  $U_{min2}$ .

Dans le cas d'un profil DLVO correspondant à une interaction de type particule-particule, avec une particule 1 située à  $d = 0$  : dans un premier temps, la particule 2 se situant à  $d_x$ , en se rapprochant de la première, est attirée et piégée par le deuxième minimum et dans ce cas là deux situations sont envisageables : soit la particule reste piégée dans ce puits d'attraction, soit elle possède assez d'énergie pour sortir. Dans le cas où la particule échappe à ce deuxième minimum, elle subit une répulsion représentée par la barrière d'énergie d'intensité maximale  $U_{max}$ . Pour franchir cette barrière, la particule doit à nouveau avoir une énergie suffisante. Dans ce cas, une fois la barrière franchie, la particule se retrouve à une très faible distance de séparation de la première particule (Particule 1), subissant une attraction intense. Cette attraction notée  $U_{min1}$  (ou premier minimum), est théoriquement infinie et la particule ne peut pas s'y soustraire.

Le rapprochement des particules est dirigé par leur énergie cinétique : lorsque deux particules se rapprochent, si leur énergie cinétique est supérieure à la barrière d'énergie d'agrégation, ce rapprochement aura pour résultat la coagulation des particules dans le minimum primaire. Si cette énergie cinétique est au contraire insuffisante pour dépasser la barrière énergétique, alors la dispersion se trouve dans le minimum secondaire. Dans ces conditions, les agrégats formés sont facilement re-dispersables.

D'autres forces, dont l'origine et le mécanisme sont pour la plupart encore méconnus, peuvent intervenir en solution. Ces forces sont souvent décrites comme des forces non DLVO, terme qui montre que la théorie DLVO seule ne suffit plus pour les expliquer. Nous présenterons dans ce qui suit les deux forces non DLVO les plus importantes : Force d'hydratation (solvation) (Snook et al., 1979) et force de répulsion de Born. La force d'hydratation a un effet très important à des distances inter-particulaires inférieures à 5 nm, tandis que les forces de répulsion de Born ont un effet important à des distances inférieures à 1 nm.

### 5.3.1. Les forces non DLVO

#### 5.3.1.1. Force de solvation (hydratation)

Les forces de solvation dites aussi forces d'hydratation sont des forces de très courte portée. Elles sont la conséquence d'interactions répulsives entre deux surfaces polaires séparées par une couche mince d'eau ou d'autres solvants polaires. Elles décroissent de manière exponentielle par rapport à la distance inter-surfacique. Ces forces ont été observées dans une grande variété de systèmes colloïdaux et biologiques et déterminent le comportement de nombreux systèmes tels que les interactions entre les membranes biologiques et les macromolécules ainsi que la stabilité des films de savon. Ces forces à courte portée ne sont significatives que pour une distance inter-particulaire très faible.

#### 5.3.1.2. Force de répulsion de Born

Les forces de répulsion de Born sont des forces de courte portée qui ont pour origine la superposition des nuages d'électrons, superposition qui a lieu lorsque les surfaces en question sont extrêmement proches. Ces forces dépendent entre autres des caractéristiques des surfaces ainsi que du milieu où les interactions ont lieu. L'interaction de type Born peut être négligée par rapport aux interactions de la double couche électrique et de type Van der Waals pour des distances de séparation supérieures à 1 nm (Ruckenstein et al., 1976).

Toutes les dispersions colloïdales sont dans un état physique qui est susceptibles d'évoluer. Ainsi, des particules initialement dispersées dans une solution peuvent s'agréger entre elles, ou peuvent rester à l'état dispersé. Ces évolutions d'état peuvent être considérablement accélérées par des modifications des conditions chimiques telles que la variation de la concentration ionique ou celle du pH présentées précédemment, ou des conditions physiques telles que la variation de la température ou l'application d'une contrainte externe telle que la force magnétique, électrique ou autres.

### 6. La diélectrophorèse et les phénomènes hydrodynamiques

#### 6.1. La force diélectrophorétique

La diélectrophorèse a été décrite pour la première fois par Pohl en 1951. Ce terme a été employé pour désigner le déplacement d'une particule polarisée sous l'effet d'un champ électrique non uniforme continu ou alternatif (Hughes, 2000). Ce phénomène peut s'expliquer comme suit :

Une particule diélectrique soumise à un champ électrique se comporte comme un doublet électrostatique (Figure 1.18). Les forces subies par le dipôle sont comme suit (eq.1.15)

$$F_A = -qE(A) \text{ et } F_B = qE(B) \quad (1.15)$$

Dans le cas d'un champ électrique uniforme  $F_A=F_B$  et la force résultante  $F_T=F_A + F_B = 0$  est nulle. Si au contraire le champ électrique est non uniforme, les forces de Coulomb s'exerçant sur ces charges opposées ne se compensent pas ce qui induit un déplacement de la particule polarisée.

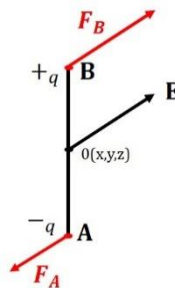


Figure 1.18 Schéma d'un doublet électrostatique

Cette force résultante qui assure le déplacement de la particule est appelée force de diélectrophorèse (DEP) (Pohl 1951). Son expression est donnée par l'équation 1.4.

Cette force de DEP agit sur les particules en fonction de leur volume ( $V$ , rayon  $r$ ), du gradient de la norme du champ électrique appliqué ( $\nabla|E|^2$ ) et de la différence de polarisabilité entre la

particule et son milieu de suspension. Cette différence est fonction de la fréquence du champ électrique appliqué ainsi que des propriétés électriques de la particule et du milieu, comme l'indique l'expression du facteur de Clausius-Mossotti (CM) (eq.1.5).

La direction de la force est imposée par  $\nabla|E^2|$  qui est défini par la géométrie des électrodes utilisées. En revanche, le sens de déplacement d'une particule soumise à la force diélectrophorétique dépend du signe de la partie réelle du facteur de Clausius Mossotti. Ainsi, lorsque la particule est plus polarisable que le milieu (soit pour  $\text{Re}(\text{CM}) > 0$ ), la force diélectrophorétique dirige la particule dans le sens du gradient vers les zones d'intensité de champ maximale. Ce régime diélectrophorétique est appelé diélectrophorèse positive (DEPp) (Figure 1.19.A). A l'inverse, lorsque la particule est moins polarisable que le milieu (soit pour  $\text{Re}(\text{CM}) < 0$ ), elle est dirigée à l'opposé du gradient, vers les zones de faible intensité de champ. Ce régime diélectrophorétique est appelé diélectrophorèse négative (DEPn) (Figure 1.19.B). Enfin, lorsque  $\text{Re}(\text{CM}) = 0$ , la force de diélectrophorèse s'annule. Ce phénomène se produit à une fréquence du champ électrique dite « fréquence de transition » (eq.1.16). Cette fréquence marque en effet un changement du régime diélectrophorétique DEPp vers DEPn ou vice versa et dépend des propriétés intrinsèques des objets manipulés ainsi que de leur milieu d'immersion (conductivité, permittivité).

$$f_x = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\left( \frac{\sigma_p^2 + \sigma_p \sigma_m - 2\sigma_m^2}{\varepsilon_p^2 + \varepsilon_p \varepsilon_m - 2\varepsilon_m^2} \right)} \quad (1.16)$$

Avec :  $\sigma_p$  et  $\sigma_m$  les conductivités de la particule et du milieu respectivement en S/m,  $\varepsilon_p$  et  $\varepsilon_m$  les permittivités de la particule et du milieu respectivement.

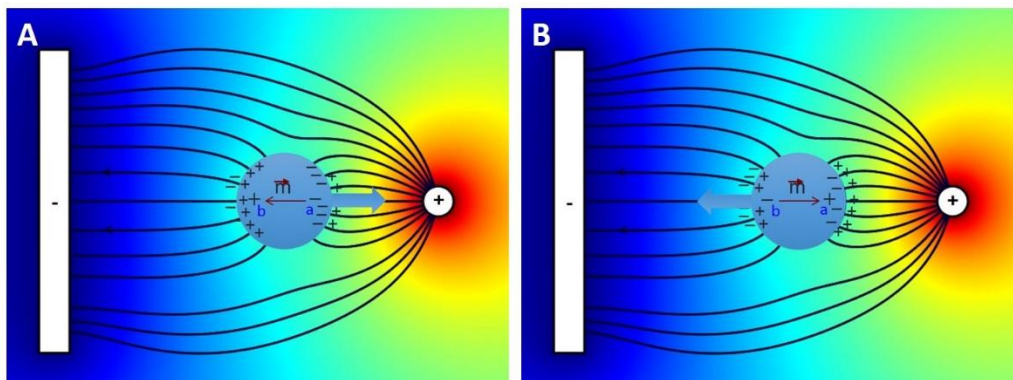


Figure 1.19 Déplacement d'une particule soumise à un champ électrique non uniforme. A) Diélectrophorèse positive (DEPp). B) Diélectrophorèse négative (DEPn)

## 6.1.1. Interaction dipôle-dipôle

L'application d'un champ électrique dans une suspension colloïdale se traduit par la formation de dipôles au sein des particules assortie d'une déformation des lignes de champ au voisinage de ces dernières. La présence d'autres particules à proximité peut conduire à la formation d'alignements (Figure 1.20)(Hughes, 2002) sous l'effet du phénomène d'interaction dipôle-dipôle (Hu et al. 1994 ; Mittal et al.,2008). Ce phénomène se manifeste lorsque l'énergie maximale d'attraction dipolaire ( $U_{Dip\_Dip}$ ) est supérieure à l'énergie thermique du milieu, c'est à dire pour  $U_{Dip\_Dip} \gg k_B T$ . avec :

$$U_{Dip\_Dip} = 4\pi\epsilon_m r^3 Re(CM)^2 E^2 \left(\frac{r}{d+2r}\right)^3 (3 \cos^2 \theta - 1) \quad (1.17)$$

Avec  $\epsilon_m$  permittivité du milieu,  $r$  le rayon,  $Re(CM)$  partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti,  $d$  distance inter-particule,  $E$  champ électrique  $\theta$  angle du dipôle électrique

L'équation 1.17 met en évidence l'influence de CM, (qui dépend en particulier du choix de la fréquence) mais également de l'intensité du champ appliqué sur la formation de chaînes.

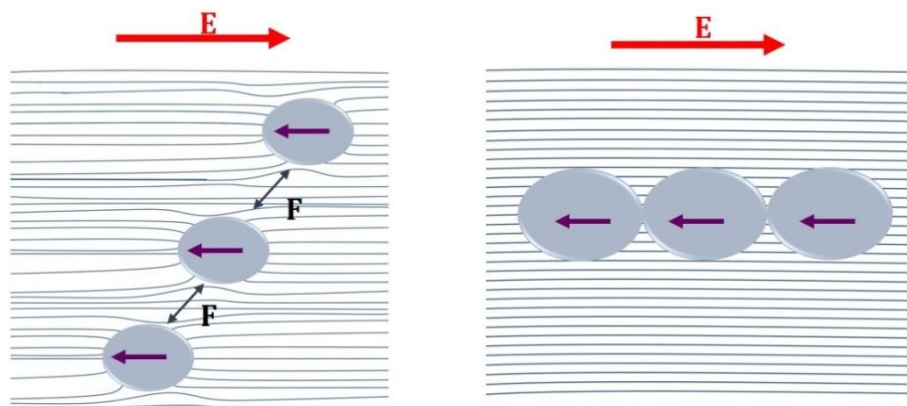


Figure 1.20 Mécanisme d'interaction dipôle-dipôle. Chaque particule est polarisée sous l'effet du champ (E) et présente un dipôle induit dont le sens dépend du signe de  $Re(CM)$ . Ce dipôle peut interagir avec celui de particules voisines, ce qui se traduit par la formation d'une chaîne.

## 6.2. Les phénomènes hydrodynamiques

La force diélectrophorétique dépend du gradient d'intensité de champ électrique. Certains phénomènes liés à l'application d'un champ électrique peuvent déjouer les effets diélectrophorétiques et ne doivent donc pas être ignorés. C'est notamment le cas de l'électroosmose et l'électrothermie.

## 6.2.1. Electrosmose

L'application d'une différence de potentiel entre deux électrodes se traduit par l'apparition de charges à leur surface. En effet, lorsque ces dernières sont immergées dans un milieu électrolytique, les contre-ions présents dans la solution forment une double couche à l'interface liquide-électrode (Figure 1.21.A) de structure comparable à celle décrite précédemment (Figure 1.15).

La composante tangentielle  $E_t$  du champ électrique non uniforme exerce une force sur les charges accumulées à l'interface liquide-électrode, ce qui engendre la mise en mouvement des ions de la couche diffuse. Ce mouvement entraîne le fluide par transfert de quantité de mouvement (Figure 1.21.B). Les vortex de fluide ainsi créés circulent toujours dans le même sens de l'extérieur vers le centre des électrodes, ce qui induit une accumulation des particules au niveau de la partie centrale des électrodes (Oh et al., 2009)(Figure 1.21.B).

L'électro-osmose dépend principalement de la conductivité de la solution et de la fréquence du signal électrique appliqué (typiquement  $f < 5$  kHz) (Honegger, 2011). Ce phénomène électrocinétique est parfois appliqué au micro-positionnement de microparticules. On peut citer à titre d'exemple les travaux de Wu et son équipe visant à positionner des bactéries au centre d'électrodes pour des mesures d'impédance (Wu et al., 2005), ou ceux de Lian et al. montrant la capacité du phénomène d'électrosmose à générer des assemblages de microparticules (Lian et al., 2006).

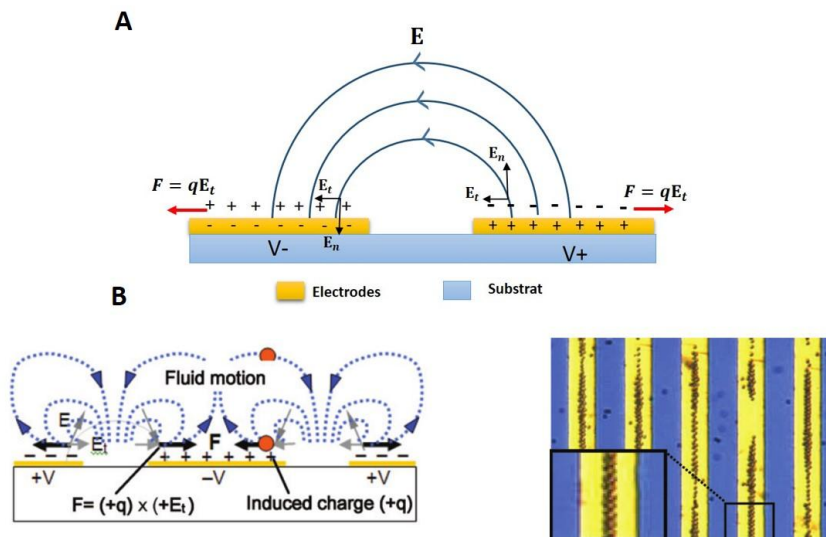


Figure 1.21 A) Mise en mouvement des charges de la double couche électrique sous l'effet de la composante tangentielle du champ électrique non uniforme. B) Mouvements du fluide engendrés par le phénomène électrosmotique et image de particules assemblées au centre des électrodes sous l'effet de l'électrosmose (Oh et al., 2009).



## 6.2.2. Electrothermie

Le phénomène d'électrothermie peut également se manifester lors d'une expérience de diélectrophorèse (Ramos et al., 1999 ; Oh et al., 2009). Ce phénomène résulte d'un gradient de température induit par le champ électrique. Lorsqu'un champ électrique  $E$  est appliqué dans un liquide de conductivité électrique  $\sigma_m$ , un échauffement est induit par effet Joule.

Par principe, dans la manipulation de micro-objets par diélectrophorèse, le champ électrique est non uniforme. Il en résulte un échauffement inhomogène qui provoque l'apparition d'un gradient de température entraînant à son tour des variations de conductivité et de permittivité dans le milieu. Ces dernières engendrent respectivement une force Coulombienne et une force diélectrique (Ramos et al. 1998). Ces deux forces produisent des effets inverses. En basse fréquence, les forces coulombiennes dominent. Elles provoquent le déplacement de la solution tel que représenté au centre de la figure 1.23.B. Par ailleurs, en haute fréquence, les forces diélectriques dominent et induisent un mouvement de fluide en sens inverse. Dans le cas où les forces se compensent, aucun déplacement de fluide n'est induit.

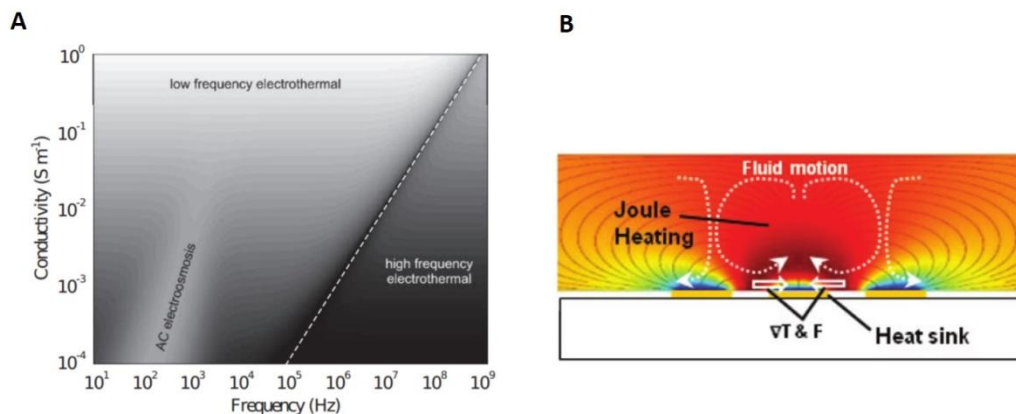


Figure 1.23 A) Cartographie d'effet prédominant entre l'électro-osmose et l'effet électrothermique en fonction de la conductivité du milieu et de la fréquence du champ électrique appliqué, la tension étant fixée à 10 V (Ramos et al. 1998). B) Effet électrothermique sur des électrodes coplanaires (Oh et al., 2009).

L'effet électrothermique est fortement dépendant de la conductivité du milieu (typiquement induisant une vitesse de fluide maximale lorsque  $\sigma_m > 10^{-2}$  S/m) et peut donner naissance à de forts flux ( $v \sim 1$  mm/s) pour toutes les fréquences utilisées comme le montre la figure 1.23.A. Dans une géométrie co-planaire, les flux de liquide seront alors des vortex centrés au-dessus des électrodes, comme représenté sur la figure 1.23.B. (Honegger, 2011 ; Oh et al., 2009).

### 7. Conclusion

Dans ce premier chapitre, nous avons passé en revue différentes méthodes permettant de réaliser un assemblage de microparticules ou de cellules vivantes suivant une approche « bottom-up ». Nous avons mis en évidence les avantages de la diélectrophorèse par rapport à d'autres techniques pour la mise en contact des particules/cellules à assembler. La description de ce phénomène nous a permis d'évoquer le lien existant entre le comportement diélectrophorétique des micro-objets manipulés et leurs propriétés électriques. La caractérisation électrique de ces micro-objets est donc un préalable à leur assemblage par diélectrophorèse, car elle nous permettra d'anticiper leur comportement en fonction des conditions expérimentales utilisées (en particulier la fréquence du champ appliqué et la conductivité du milieu de suspension). Dans le cas de la manipulation de particules diélectriques, nous proposons de conférer un caractère permanent aux assemblages réalisés en ayant recours à un couplage chimique. Aussi, le chapitre suivant sera consacré à la caractérisation des objets manipulés, en termes de propriétés électriques et physico-chimiques.

## References

- Abdallat, R. G., Tajuddin, A., Aziela, S., Gould, D. H., Hughes, M. P., Fatoyinbo, H. O., & Labeed, F. H. (2013). Process development for cell aggregate arrays encapsulated in a synthetic hydrogel using negative dielectrophoresis. *Electrophoresis*, 34(7), 1059-1067.
- Aizenberg, J., Braun, P. V., Wiltzius, P., 2000. Patterned colloidal deposition controlled by electrostatic and capillary forces. *Phys. Rev. Lett.* 84, 2997–3000.
- Albrecht, D. R., Underhill, G. H., Wassermann, T. B., Sah, R. L., & Bhatia, S. N. (2006). Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. *Nature methods*, 3(5), 369-375.
- Andreeva, L. V., Koshkin, A. V., Lebedev-Stepanov, P. V., Petrov, A. N., & Alfimov, M. V. (2007). Driving forces of the solute self-organization in an evaporating liquid microdroplet. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 300(3), 300-306.
- Bazou, D., Coakley, W.T., Meek, K.M., Yang, M., Pham, D.T., 2004. Characterisation of the morphology of 2-D particle aggregates in different electrolyte concentrations in an ultrasound trap. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 243, 97–104. doi:10.1016/j.colsurfa.2004.04.075
- Bazou, D., Castro, A., Hoyos, M., 2012. Controlled cell aggregation in a pulsed acoustic field. *Ultrasonics* 52, 842–50. doi:10.1016/j.ultras.2012.01.005
- Bhattacharjee, S., Ko, C. H., & Elimelech, M. (1998). DLVO interaction between rough surfaces. *Langmuir*, 14(12), 3365-3375.
- Biswal, S. L., & Gast, A. P. (2003). Mechanics of semiflexible chains formed by poly (ethylene glycol)-linked paramagnetic particles. *Physical Review E*, 68(2), 021402.
- Byrom, J., Han, P., Savory, M., & Biswal, S. L. (2014). Directing Assembly of DNA-Coated Colloids with Magnetic Fields To Generate Rigid, Semiflexible, and Flexible Chains. *Langmuir*
- Campos, A.F.C., Marinho, E.P., Ferreira, M.D.A., Tourinho, F.A., 2008. X-DLVO Interactions between Nanocolloidal Magnetic Particles : The Quantitative Interpretation of the pH-Dependent Phase Diagram of EDL-MF 230–235.
- Chen, C. C., Lin, P. H., & Chung, C. K. (2014). Microfluidic chip for plasma separation from undiluted human whole blood samples using low voltage contactless dielectrophoresis and capillary force. *Lab on a Chip*, 14(12), 1996-2001
- Coakley, W. T., Bazou, D., Morgan, J., Foster, G. A., Archer, C. W., Powell, K., Bishop, J. (2004). Cell-cell contact and membrane spreading in an ultrasound trap. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 34(4), 221-230.
- Deegan, R. D. (2000). Pattern formation in drying drops. *Physical Review E*, 61(1), 475.
- Demirörs, A.F., Pillai, P.P., Kowalczyk, B., Grzybowski, B. a, 2013. Colloidal assembly directed by virtual magnetic moulds. *Nature* 503, 99–103. doi:10.1038/nature12591

- Denkov, N., Velev, O., Kralchevski, P., Ivanov, I., Yoshimura, H., & Nagayama, K. (1992). Mechanism of formation of two-dimensional crystals from latex particles on substrates. *Langmuir*, 8(12), 3183-3190.
- Derjaguin, B. V. (1941). Theory of the stability of strongly charged lyophobic sols and the adhesion of strongly charged particles in solutions of electrolytes. *Acta Physicochim. USSR*, 14, 633-662.
- Dunne, L. W., Iyyanki, T., Hubenak, J., & Mathur, A. B. (2014). Characterization of dielectrophoresis-aligned nanofibrous silk fibroin–chitosan scaffold and its interactions with endothelial cells for tissue engineering applications. *Acta biomaterialia*.
- Ding, X., Lin, S.S., Li, S., Wang, L., Huang, T.J., 2012. Manipulating single particles using standing surface acoustic waves 133–135.
- Emiliani, V., Sanvitto, D., Zahid, M., Gerbal, F., Coppey-Moisan, M., 2004. Multi force optical tweezers to generate gradients of forces. *Opt. Express* 12, 3906–10
- Ferrari, E., Emiliani, V., Cojoc, D., Garbin, V., Zahid, M., Durieux, C., ... & Fabrizio, E. D. (2005). Biological samples micro-manipulation by means of optical tweezers. *Microelectronic Engineering*, 78, 575-581.
- Furlani, E.P., 2007. Magnetophoretic separation of blood cells at the microscale. *J. Phys. D. Appl. Phys.* 40, 1313–1319. doi:10.1088/0022-3727/40/5/001
- Furst, E.M., Suzuki, C., Fermigier, M., Gast, A.P., 1998. Permanently Linked Monodisperse Paramagnetic Chains. *Society* 7334–7336.
- Fustin, C. A., Glasser, G., Spiess, H. W., & Jonas, U. (2003). Site-Selective Growth of Colloidal Crystals with Photonic Properties on Chemically Patterned Surfaces. *Advanced Materials*, 15(12), 1025-1028.
- González, M., Argaraña, C. E., & Fidelio, G. D. (1999). Extremely high thermal stability of streptavidin and avidin upon biotin binding. *Biomolecular engineering*, 16(1), 67-72.
- Goubko, C. A., & Cao, X. (2009). Patterning multiple cell types in co-cultures: A review. *Materials Science and Engineering: C*, 29(6), 1855-1868.
- Goubault, C. (2004). Colloïdes magnétiques: auto-organisation et applications biologiques (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- Grasso, D., Subramaniam, K., Butkus, M., Strevett, K., Bergendahl, J., 2002. A review of non-DLVO interactions in environmental colloidal systems. *Rev. Environ. Sci. Bio/Technology* 1, 17–38. doi:10.1023/A:1015146710500
- Green, N.G., Morgan, H., n.d. Dielectrophoresis of submicrometer latex spheres. 1. Experimental results. *J. Phys. Chem. B, Mater. surfaces, interfaces Biophys.* 103, 41–50.
- Haddour, N., Chevolut, Y., Tr, M., Souteyrand, E., Cloarec, J., 2010. Use of magnetic field for addressing , grafting onto support and actuating permanent magnetic filaments applied to enhanced biodetection . doi:10.1039/b920460a
- Hoffman, a S., 2001. Hydrogels for biomedical applications. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 944, 62–73.

- Honegger, T. (2011). Electrocinétique tridimensionnelle de particules colloïdales en géométrie microfluidique et application à la manipulation de cellules (Doctoral dissertation, Université de Grenoble).
- Honegger, T., Scott, M. A., Yanik, M. F., & Voldman, J. (2013). Electrokinetic confinement of axonal growth for dynamically configurable neural networks. *Lab on a Chip*, 13(4), 589-598.
- Hong, S.H., Kim, H.K., Cho, K.H., Hwang, S.W., Hwang, J.S., Ahn, D., 2006. Fabrication of single electron transistors with molecular tunnel barriers using ac dielectrophoresis technique. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* 24, 136. doi:10.1116/1.2150227
- Hu, Y., Glass, J. L., Griffith, A. E., & Fraden, S. (1994). Observation and simulation of electrohydrodynamic instabilities in aqueous colloidal suspensions. *The Journal of chemical physics*, 100(6), 4674-4682.
- Hughes, M. P. (2000). AC electrokinetics: applications for nanotechnology. *Nanotechnology*, 11(2), 124.
- Hughes, M.P., Green, N.G., 2002. The influence of stern layer conductance on the dielectrophoretic behavior of latex nanospheres. *J. Colloid Interface Sci.* 250, 266–8. doi:10.1006/jcis.2002.8324
- Israelachvili, J. N. (2011). Intermolecular and surface forces: revised third edition. Academic press
- Jen, A. C., Wake, M. C., & Mikos, A. G. (1996). Review: Hydrogels for cell immobilization. *Biotechnology and Bioengineering*, 50(4), 357-364.
- Kharboutly, M. (2011). Modélisation, réalisation et commande d'un système de micro-manipulation sans contact par diélectrophorèse (Doctoral dissertation, Université de Franche-Comté).
- Laforet-Ast, J. (2010). Caractérisation de microparticules par méthodes diélectrophorétiques: applications aux cellules biologiques (Doctoral dissertation, Ecole Centrale de Lyon).
- Letters, P.R., Cohen, L., Bertrand, E., Robic, C., Goubault, C., Pellissier, M., Johner, A., Thalmann, F., Marques, C.M., Bibette, J., 2008. Measuring the Kinetics of Biomolecular Recognition with Magnetic Colloids 108301, 10–13. doi:10.1103/PhysRevLett.100.108301
- Lian, M., Islam, N., Wu, J., 2006. Particle Line Assembly/Patterning by Microfluidic AC Electroosmosis. *J. Phys. Conf. Ser.* 34, 589–594. doi:10.1088/1742-6596/34/1/097
- Lutolf, M.P., Hubbell, J. a, 2005. Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering. *Nat. Biotechnol.* 23, 47–55. doi:10.1038/nbt1055
- Maragò, O.M., Gucciardi, P.G., Bonaccorso, F., Calogero, G., Scardaci, V., Rozhin, a. G., Ferrari, a. C., Jones, P.H., Saija, R., Borghese, F., Denti, P., Iati, M. a., 2008. Optical trapping of carbon nanotubes. *Phys. E Low-dimensional Syst. Nanostructures* 40, 2347–2351. doi:10.1016/j.physe.2007.10.088
- Micheletto, R., Fukuda, H., & Ohtsu, M. (1995). A simple method for the production of a two-dimensional, ordered array of small latex particles. *Langmuir*, 11(9), 3333-3336
- Mittal, M., Lele, P. P., Kaler, E. W., & Furst, E. M. (2008). Polarization and interactions of colloidal particles in ac electric fields. *The Journal of chemical physics*, 129(6), 064513.

- Miyamoto, S., & Kollman, P. A. (1993). Absolute and relative binding free energy calculations of the interaction of biotin and its analogs with streptavidin using molecular dynamics/free energy perturbation approaches. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 16(3), 226-245.
- Neuman, K.C., Block, S.M., 2004. Optical trapping. *Rev. Sci. Instrum.* 75, 2787–809. doi:10.1063/1.1785844
- Oh, J., Hart, R., Capurro, J., Noh, H.M., 2009. Comprehensive analysis of particle motion under non-uniform AC electric fields in a microchannel. *Lab Chip* 9, 62–78. doi:10.1039/b801594e
- Osman, O., Zanini, L.F., Frénéa-Robin, M., Dumas-Bouchiat, F., Dempsey, N.M., Reyne, G., Buret, F., Haddour, N., 2012. Monitoring the endocytosis of magnetic nanoparticles by cells using permanent micro-flux sources. *Biomed. Microdevices* 14, 947–54. doi:10.1007/s10544-012-9673-4
- Ozkan, M., Wang, M., Ozkan, C., Flynn, R., Birkbeck, A., Esener, S., 2003. Optical Manipulation of Objects and Biological Cells in Microfluidic Devices 61–67.
- Petersson, F., Nilsson, A., Holm, C., Jonsson, H., Laurell, T., 2005. Continuous separation of lipid particles from erythrocytes by means of laminar flow and acoustic standing wave forces. *Lab Chip* 5, 20–2. doi:10.1039/b405748c
- Pethig, R., 2010. Review article-dielectrophoresis: status of the theory, technology, and applications. *Biomicrofluidics* 4, 1–35. doi:10.1063/1.3456626
- Pivetal, J., Toru, S., Frenea-Robin, M., Haddour, N., Cecillon, S., Dempsey, N.M., Dumas-Bouchiat, F., Simonet, P., 2014. Selective isolation of bacterial cells within a microfluidic device using magnetic probe-based cell fishing. *Sensors Actuators B Chem.* 195, 581–589. doi:10.1016/j.snb.2014.01.004
- Plewa, J., Tanner, E., Mueth, D.M., Grier, D.G., 2004. Processing carbon nanotubes with holographic optical tweezers *Abstract* : 12, 300–303.
- Pohl, H.A., 1978. *Dielectrophoresis*. Cambridge University Press.
- Pottier, N. (2012). *Physique statistique hors d'équilibre-Processus irréversibles linéaires*. EDP Sciences.
- Ramos, A., Morgan, H., Green, N. G., & Castellanos, A. (1998). AC electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 31(18), 2338.
- Ramos, A., Morgan, H., Green, N. G., & Castellanos, A. (1999). The role of electrohydrodynamic forces in the dielectrophoretic manipulation and separation of particles. *Journal of Electrostatics*, 47(1), 71-81.
- Reyes, D.R., Hong, J.S., Elliott, J.T., Gaitan, M., 2011. Hybrid cell adhesive material for instant dielectrophoretic cell trapping and long-term cell function assessment. *Langmuir* 27, 10027–34. doi:10.1021/la200762j
- Riley, S.L., Dutt, S., De La Torre, R., Chen, a C., Sah, R.L., Ratcliffe, a, 2001. Formulation of PEG-based hydrogels affects tissue-engineered cartilage construct characteristics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 12, 983–90.

- Rivera, T. P. (2009). Assemblage convectif de colloïdes par forces de capillarité en milieu confiné: applications en plasmonique (Doctoral dissertation, Université Joseph-Fourier-Grenoble I).
- Ruckenstein, E., & Prieve, D. C. (1976). Adsorption and desorption of particles and their chromatographic separation. *AIChE Journal*, 22(2), 276-283.
- Sebastian, A., Buckle, A., Markx, G.H., 2007. Tissue Engineering With Electric Fields : Immobilization of Mammalian Cells in Multilayer Aggregates Using Dielectrophoresis 98, 694–700. doi:10.1002/bit
- Shi, J., Ahmed, D., Mao, X., Lin, S.-C.S., Lawit, A., Huang, T.J., 2009. Acoustic tweezers: patterning cells and microparticles using standing surface acoustic waves (SSAW). *Lab Chip* 9, 2890–5. doi:10.1039/b910595f
- Shi, J., Huang, H., Stratton, Z., Huang, Y., Huang, T.J., 2009. Continuous particle separation in a microfluidic channel via standing surface acoustic waves (SSAW). *Lab Chip* 9, 3354–9. doi:10.1039/b915113c
- Shi, J., & Cui, T. (2003). Fabrication of indium resistors by layer-by-layer nanoassembly and microlithography techniques. *Solid-State Electronics*, 47(11), 2085-2088.
- Snook, i.k., megen, w. van, 1979. the solvation force between colloidal particles i.k. snook and w. van megen 74, 2–4.
- Souza, G.R., Molina, J.R., Raphael, R.M., Ozawa, M.G., Stark, D.J., Levin, C.S., Bronk, L.F., Ananta, J.S., Mandelin, J., Georgescu, M.-M., Bankson, J. a, Gelovani, J.G., Killian, T.C., Arap, W., Pasqualini, R., 2010. Three-dimensional tissue culture based on magnetic cell levitation. *Nat. Nanotechnol.* 5, 291–6. doi:10.1038/nnano.2010.23
- Suzuki, M., Yasukawa, T., Mase, Y., Oyamatsu, D., Shiku, H., Matsue, T., 2004. Dielectrophoretic Micropatterning with Microparticle Monolayers Covalently Linked to Glass Surfaces. *Langmuir* 20, 11005–11011.
- Tandon, V., Bhagavatula, S.K., Nelson, W.C., Kirby, B.J., 2008. Zeta potential and electroosmotic mobility in microfluidic devices fabricated from hydrophobic polymers: 1. The origins of charge. *Electrophoresis* 29, 1092–101. doi:10.1002/elps.200700734
- Tourovskaja, A., Barber, T., Wickes, B. T., Hirdes, D., Grin, B., Castner, D. G., ... & Folch, A. (2003). Micropatterns of chemisorbed cell adhesion-repellent films using oxygen plasma etching and elastomeric masks. *Langmuir*, 19(11), 4754-4764.
- Uno, K., Hayashi, K., Hayashi, T., Ito, K., & Kitano, H. (1998). Particle adsorption in evaporating droplets of polymer latex dispersions on hydrophilic and hydrophobic surfaces. *Colloid and polymer science*, 276(9), 810-815.
- Velev, O.D., Kaler, E.W., 1999. In Situ Assembly of Colloidal Particles into Miniaturized Biosensors. *Langmuir* 15, 3693–3698. doi:10.1021/la981729c
- Verwey, E. J. W., Overbeek, J. T. G., & Overbeek, J. T. G. (1999). Theory of the stability of lyophobic colloids. Courier Dover Publications. Falokun, C.D., Markx, G.H., 2007. Electrorotation of beads of immobilized cells. *J. Electrostat.* 65, 475–482. doi:10.1016/j.elstat.2006.11.001

- Wu, J., Ben, Y., & Chang, H. C. (2005). Particle detection by electrical impedance spectroscopy with asymmetric-polarization AC electroosmotic trapping. *Microfluidics and Nanofluidics*, 1(2), 161-167.
- Xia, Y., Yin, Y., Lu, Y., & McLellan, J. (2003). Template-assisted self-assembly of spherical colloids into complex and controllable structures. *Advanced Functional Materials*, 13(12), 907-918.
- Yamamoto, M., Yasukawa, T., Suzuki, M., Kosuge, S., Shiku, H., Matsue, T., Mizutani, F., 2012. Patterning with particles using three-dimensional interdigitated array electrodes with negative dielectrophoresis and its application to simple immunosensing. *Electrochim. Acta* 82, 35–42. doi:10.1016/j.electacta.2012.02.109
- Yu, Zhe, Xiang, G., Pan, L., Huang, L., Yu, Zhongyao, Xing, W., Cheng, J., 2004. Negative dielectrophoretic force assisted construction of ordered neuronal networks on cell positioning bioelectronic chips. *Biomed. Microdevices* 6, 311–24. doi:10.1023/B:BMMD.0000048563.58129.76
- Zanini, L.F., Osman, O., Frenea-Robin, M., Haddour, N., Dempsey, N.M., Reyne, G., Dumas-Bouchiat, F., 2012. Micromagnet structures for magnetic positioning and alignment. *J. Appl. Phys.* 111, 07B312. doi:10.1063/1.3675067
- Zou, Z., Member, S., Lee, S., Ahn, C.H., 2008. A Polymer Microfluidic Chip With Interdigitated Electrodes Arrays for Simultaneous Dielectrophoretic Manipulation and Impedimetric Detection of Microparticles 8, 527–535.
- Zheng, H., Rubner, M. F., & Hammond, P. T. (2002). Particle assembly on patterned “plus/minus” polyelectrolyte surfaces via polymer-on-polymer stamping. *Langmuir*, 18(11), 4505-4510.



# Chapitre 2

## Caractérisations physico-chimique et électrique des micro-objets manipulés par diélectrophorèse

1. Etude des propriétés physico-chimiques des micro-objets manipulés .....	56
<b>1.1.</b> Etat des solutions colloïdales .....	56
<b>1.2.</b> Mesure du potentiel zêta .....	57
<b>1.3.</b> Quantification des groupements chimiques .....	59
<b>1.3.1.</b> Quantification des groupements carboxyliques .....	59
<b>1.3.2.</b> Quantification des groupements amines .....	61
2. Caractérisation électrique des particules et des cellules .....	64
<b>2.1.</b> Caractérisation électrique des particules en polystyrène .....	64
<b>2.1.1.</b> Modèle électrique d'une particule .....	64
<b>2.1.2.</b> Principe de la mesure .....	65
<b>2.1.3.</b> Méthode expérimentale .....	68
<b>2.1.3.1.</b> Préparation des particules .....	69
<b>2.1.3.2.</b> Electrodes et montage expérimentale .....	69
<b>2.1.3.3.</b> Détermination des propriétés électrique .....	70
<b>2.2.</b> Caractérisation électrique des cellules .....	78
<b>2.2.1.</b> Modèle électrique .....	78
<b>2.2.2.</b> Caractérisation électrique des cellules par électrorotation .....	79
3. Conclusion .....	81
Références .....	83

Dans le présent chapitre, nous présenterons les méthodes de caractérisation physico-chimiques et électriques utilisées pour déterminer les propriétés des particules utilisées (particules en polystyrène et cellules HEK 293), en tenant compte des propriétés des solvants dans lesquels elles seront employées. La stabilité des particules en polystyrène sera démontrée par des mesures de granulométrie et de potentiel zêta, puis l'état de surface sera évalué qualitativement (présence de groupements de surface) et quantitativement (densité des groupements) par une technique colorimétrique utilisant les molécules Toluidine Blue Oxide (TBO) et Orange II. Nous exposerons ensuite la méthode retenue pour caractériser électriquement les particules en polystyrène, en déterminant notamment leur conductivité surfacique. Ce dernier point est particulièrement important, dans la mesure où l'intensité et le signe de la force de diélectrophorèse dépendent de ce paramètre. Le modèle électrique des cellules utilisées dans la suite de nos expériences sera également présenté. Il nous permettra de prédire le comportement diélectrophorétique des cellules dans un milieu donné.

### 1. Etude des propriétés physico-chimiques des particules en polystyrène

#### 1.1. Etat des solutions colloïdales

Avant la manipulation des microparticules en suspension, il est indispensable de connaître leur état colloïdal, en d'autres termes leur stabilité, leur dispersion en taille ainsi que leur état de surface. Ceci est très important dans le cas de nos travaux étant donné que la taille et la nature des groupements chimiques de surface des particules manipulées sous champ électrique non uniforme ont une influence directe sur le régime diélectrophorétique établi.

Nous avons souhaité réaliser des assemblages de particules de différentes tailles tout en n'employant pour une même expérience que des particules de taille et de composition identiques. Cela permet d'éviter l'apparition des deux régimes diélectrophorétique (DEPp et DEPn) en même temps, ce qui pourrait nuire au contrôle de l'assemblage. Nous avons utilisé des suspensions colloïdales constituées de particules en polystyrène du commerce présentant des groupements chimiques en surface :

- Particules en polystyrène de diamètre 3  $\mu\text{m}$  portant des groupements COOH ou  $\text{NH}_2$  (Biovalley-France)
- Particules fluorescentes de diamètres 1  $\mu\text{m}$ , 500 nm et 200 nm, présentant des groupements COOH (Invitrogen).

En général, les particules colloïdales commercialisées sont obtenues à l'issue d'un procédé de synthèse de type ascendant dit de « nucléation/croissance » (Birdi, 2008) ou descendant dit aussi communiton (Cosgrove, 2010). Les particules en polystyrène employées dans nos travaux ont été élaborées par le procédé de polymérisation en émulsion (Xia et al., 2000). Bien que cette approche de synthèse soit sensée être bien maîtrisée par les fournisseurs, il arrive que des solutions colloïdales commerciales soient fournies en présentant des problèmes de poly-dispersion, c'est-à-dire que la taille (et/ou la forme) des particules dans le système colloïdal varie. Afin de vérifier l'état de nos dispersions colloïdales, nous avons réalisé des mesures de taille par granulométrie. La distribution de taille des particules a été mesurée à l'aide d'un granulomètre (Zetasizer Nano S90, Malvern) dont la gamme de mesure est comprise entre 0.3 nm et 5  $\mu\text{m}$ . Le principe de la mesure est basé sur la diffusion dynamique de la lumière (Dynamic Light Scattering ou DLS). Cette technique mesure la diffusion des particules soumises au mouvement brownien et calcule une distribution de taille des particules au moyen de la relation de Stokes-Einstein (eq.1.7).

Les mesures effectuées ont été réalisées dans de l'eau DI avec un ratio 1/100 (solution colloïdales / eau DI). Nous avons pu constater que certaines valeurs des diamètres retrouvées sont plus importantes que celles données par le fournisseur (Tableau 2.1), ce qui n'est pas surprenant car la valeur mesurée par l'instrument correspond au diamètre hydrodynamique des particules. Celui-ci comprend à la fois la taille de la particule (telle que la mesurerait un Microscope Electronique à Balayage) mais aussi l'épaisseur de la couche diffuse, qui est, rappelons-le, d'autant plus importante que la force ionique est faible. Par ailleurs, le pourcentage de variation des tailles mesurées est nul, ce qui nous permet de conclure que les suspensions de particules utilisées dans ces travaux sont mono-dispersées dans l'eau DI.

Particules en polystyrène				
Tailles (fournisseurs)	200 nm	500 nm	1 $\mu\text{m}$	3 $\mu\text{m}$
Moyenne des tailles mesurées	224.6 nm	578 nm	1087 nm	3263 nm

Tableau 2.1 Comparaison entre les valeurs des diamètres de particules indiquées par le fournisseur et celles mesurées au granulomètre.

### 1.2. Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta, qui représente le potentiel au niveau du plan de cisaillement (voir chapitre 1, partie 5.2.2.2), est un indicateur de la répulsion ou de l'attraction électrostatique entre particules. La mesure de ce dernier nous renseigne sur l'état des suspensions colloïdales (dispersion, agrégation ou floculation). Elle a été réalisée à l'aide d'un Zetasizer (Nano ZS analyser, Malvern Instruments). Le principe physique utilisé est celui de l'électrophorèse laser Doppler (ELS)<sup>4</sup>. Nous avons effectué les mesures de potentiel pour toutes les suspensions colloïdales que nous avons envisagé d'utiliser durant nos travaux (particules en polystyrène de 3  $\mu\text{m}$  avec des groupements carboxyliques (COOH) et amines (NH<sub>2</sub>); particules en polystyrène fluorescentes de 200 nm, 500 nm, et 1  $\mu\text{m}$  avec des groupements carboxyliques). Les mesures de potentiel zêta ont été réalisées dans des milieux à un pH=6.5 où la majorité des groupements carboxyliques sont sous leur forme ionique (chargés négativement) et la majorité des groupements amines sont sous leur forme protonée (chargés positivement) (Figure 2.1). En effet, le potentiel zêta étant proportionnel à la densité de charge à la surface des particules, il peut changer en fonction du pH des milieux de suspension.

<sup>4</sup> Une suspension colloïdale est introduite dans une cellule contenant deux électrodes. Sous l'effet du champ électrique appliqué entre ces électrodes, les particules ayant une charge électrique vont migrer vers l'électrode de charge opposée à une certaine vitesse, appelée la mobilité, qui est liée à leur potentiel zêta. Cette vitesse est mesurée par laser Doppler.

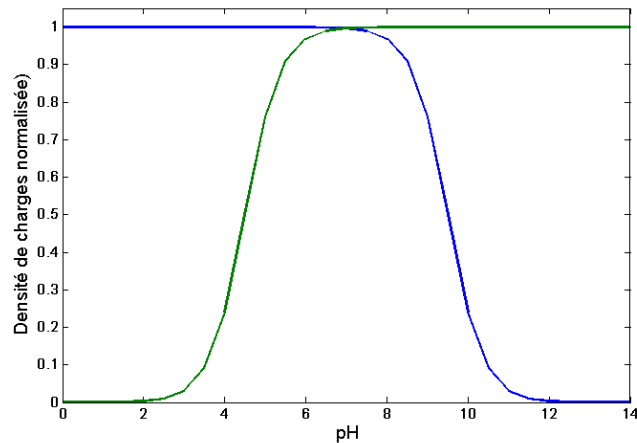


Figure 2.1 Courbe représentative de la variation de la densité de charges en fonction du pH. En bleu pour des groupements amines, en vert pour des groupements carboxyliques

Comme on peut le constater sur le Tableau 2.2, à un pH=6.5 tous les potentiels zêta sont négatifs et supérieurs en valeur absolue à 30 mV, ce qui traduit une bonne stabilité de la suspension colloïdale. De plus, les valeurs de potentiel zêta mesurées sont assez proches de celles décrites par le groupe d’Ermolina (40-75 mV) pour différentes tailles de particules en latex (40 à 2000 nm) fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques (Ermolina et al., 2005). Nous avons toutefois été surpris par la valeur de potentiel zêta des particules de 3  $\mu\text{m}$  portant des groupements amines. En effet, cette valeur est négative et inférieure en valeur absolue à 30 mV, alors que l’on pouvait s’attendre à l’obtention d’une valeur positive traduisant la protonation des groupements amines. Etant donné qu’il s’agit de particules du commerce, nous avons émis deux hypothèses : l’absence totale de groupements amines ou la présence de groupements chargés négativement en plus des groupements amines à la surface des particules. Nous avons essayé de valider ou invalider ces hypothèses en réalisant une quantification de la densité de charges de ces particules, comme abordé dans ce qui suit.

	pH	Potentiel zêta (mV)				
		200nm (COOH)	500nm (COOH)	1 $\mu\text{m}$ (COOH)	3 $\mu\text{m}$ (COOH)	3 $\mu\text{m}$ (NH <sub>2</sub> )
<b>KCl</b>	6,5	-50	-57	-91	-78	-22

Tableau 2.2 résumant les valeurs des potentiels zêta mesurées pour les différentes particules en polystyrène dans une solution de KCl à un pH=6.5

A partir de ces premiers résultats, nous pouvons tout de même conclure que les systèmes colloïdaux étudiés sont mono-disperses (d’après leur distribution de tailles) et stables (d’après les valeurs de potentiels zêta mesurées). Etant donné que les particules choisies présentent des groupements chimiques (carboxyliques ou amines) sur leurs surfaces, nous avons estimé qu’il était indispensable de confirmer leur présence mais aussi de quantifier leur densité, afin de

faciliter la mise au point du protocole de couplage chimique pour la réalisation des assemblages permanents.

### 1.3. Quantification des groupements chimiques

La détermination des groupements chimiques et la quantification de leur densité peuvent être effectuées par différentes méthodes. Parmi ces méthodes, on peut citer la fluorimétrie qui est une méthode de dosage utilisant les propriétés fluorescentes de certaines molécules (Ivanov et al., 1996 ; Janolino et al., 1992), la spectrophotométrie qui se base sur la mesure de l'absorbance ou la densité optique d'une molécule chimique donnée (Cook et al., 1997) ainsi que les méthodes de spectroscopie physico-chimiques (spectroscopie infra-rouge, spectroscopie UV-visible et spectroscopie photoélectronique X), qui permettent de déterminer la nature chimique des molécules présentes à la surface du matériau (Nissen et al., 2008 ; Zhang et al., 2014). Nous avons choisi de quantifier les groupements chimiques présents à la surface de nos particules par spectrophotométrie. En effet, les essais colorimétriques employant des marqueurs anioniques ou cationiques sont économiques et simples à mettre en place

#### 1.3.1. Quantification des groupements carboxyliques

La détermination de la densité des groupements carboxyliques (COOH) sur les surfaces des particules en polystyrène a été effectuée par des mesures spectrophotométriques en utilisant la *Toluidine Blue Oxide (TBO)* selon un protocole décrit par Tiraferri et al. (Tiraferri et al., 2012).

La TBO est un composé cationique bleu de formule chimique  $C_{15}H_{16}ClN_3S$  (Figure 2.2) présentant une masse de 305.08 g/mol et un pic d'absorption à une longueur d'onde de 630 nm. Elle est utilisée dans différents domaines d'application tels que la médecine, l'industrie du textile ainsi que les biotechnologies.

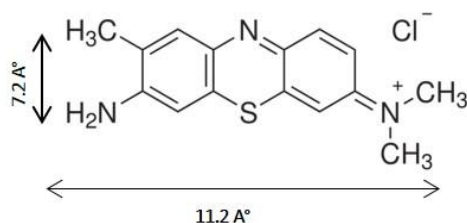


Figure 2.2 Structure de la Toluidine Blue Oxide (TBO)

Etant un composé cationique (chargé positivement), la TBO peut se lier par des interactions électrostatiques avec des groupements anioniques (chargés négativement).

Dans le cas de la quantification des groupements des particules, ces dernières sont mises dans une solution basique pH=11 contenant de la TBO dissoute dans du 1 mM NaOH. A cette valeur de pH qui est bien supérieure au pKa du couple COOH/COO<sup>-</sup> (pKa=4,5), la forme déprotonée prime sur la forme protonée et les ions carboxylates chargés négativement se retrouvent majoritaires à la surface des particules. A ce pH, la TBO est toujours chargée positivement, ce qui permet sa liaison avec les groupements de surface via l'interaction électrostatique (Figure 2.3). En plus du pH, la température et le temps de réaction influencent la cinétique d'adsorption de la TBO sur les groupements de surface. En effet, il a été montré que le rendement d'adsorption était optimal pour des températures supérieures à 40 °C et des temps de réaction de plus de 30 minutes (Alpat et al., 2008). L'adsorption de la TBO sur la surface des particules a été donc réalisée à 40 °C pendant 30 minutes. Après ce temps de réaction, les particules sont lavées avec une solution de 1 mM NaOH afin d'éliminer l'excès de TBO non liée aux groupements carboxylates (Annexe A).

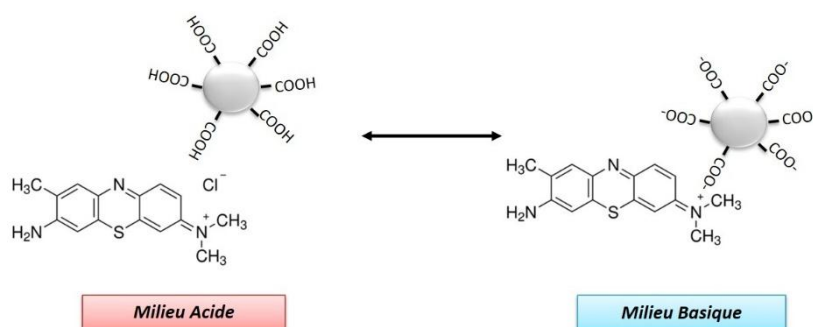


Figure 2.3 Interactions électrostatiques entre les molécules de TBO et les groupements carboxyliques sur les surfaces des particules.

Après cette étape de lavage, les particules sont dispersées dans une solution de Sodium dodecyl sulfate (SDS) à 20%. Ce surfactant anionique entraîne la désorption des molécules de TBO et leur dissolution dans la solution. Cette capacité du SDS à désorber les molécules de TBO liées aux groupements carboxyliques a déjà été démontrée dans des travaux décrits dans la littérature (Talman et al., 2006). Au lieu de l'utilisation du détergeant SDS, cette étape de désorption aurait pu être obtenue par la diminution du pH (utilisation d'un milieu acide) à des valeurs inférieures à 4.5 de manière à protoner les groupements de surface et annihiler l'interaction électrostatique. Toutefois, un pH trop acide peut entraîner la dégradation des particules, d'où notre choix d'utiliser le surfactant SDS. Ainsi, la TBO désorbée est quantifiée par des mesures de spectrophotométrie UV-visible à 630 nm effectuées sur les solutions de SDS récoltées après désorption.

La concentration en TBO ( $C$ ,  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) est déterminée à partir de la loi de Beer-Lambert:

$$D_o = \varepsilon \cdot l \cdot c \quad (2.1)$$

$D_o$  est l'absorbance de la molécule,  $\varepsilon$  est son coefficient d'extinction molaire (en  $\text{L}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ );  $l$  correspond à la largeur de la cuve de mesure et  $c$  est la concentration molaire de la solution (en  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )

Une courbe d'étalonnage est réalisée pour des concentrations de TBO comprises entre 0 et  $3.5 \times 10^{-5} \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (Annexe A). La concentration de la TBO dans la solution de SDS est ensuite convertie en densité surfacique de groupements carboxyliques ( $\Gamma$ ,  $\text{mol}\cdot\text{cm}^{-2}$ ) en utilisant la formule (eq.2.2).

$$\Gamma = \frac{cV}{S N_T} \quad (2.2)$$

$V$  est le volume de la solution de SDS;  $S$  est la surface géométrique de la particule (en  $\text{cm}^2$ ) et  $N_T$  est le nombre total de particules dans le volume de la solution. Ce calcul a été effectué en supposant qu'une molécule de TBO s'accroche à un groupement carboxylique, et que les particules sont parfaitement sphériques.

Pour les premiers tests de quantifications avec la TBO, nous avons observé de l'adsorption non spécifique de cette molécule sur les parois des tubes Eppendorf utilisés. Afin d'éviter ces problèmes d'adsorption non spécifique qui faussaient les résultats de quantification, nous avons utilisé des tubes traités au PTFE. Une fois résolus les problèmes d'adsorption non spécifique, la densité de groupements carboxyliques des trois tailles de particules (500 nm, 1  $\mu\text{m}$  et 3  $\mu\text{m}$ ) a pu être déterminée. Nous avons trouvé pour les particules de 1  $\mu\text{m}$  une densité de groupements carboxyliques de  $3,3 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ . Pour les particules de 500 nm et 3  $\mu\text{m}$ , nous avons déterminé respectivement  $0,75 \text{ nmol}/\text{cm}^2$  et  $0,14 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ , des valeurs plus faibles que celle trouvée pour les particules de 1  $\mu\text{m}$ . Ces valeurs de densité restent toutefois du même ordre de grandeur que ce que le groupe de Tiraferri (4 à  $6,5 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ ) et l'équipe de Zheng ( $11 \text{ nmol}/\text{cm}^2$ ) ont trouvé pour des macro surfaces (surfaces d'électrodes et surfaces de membranes) portant des groupements carboxyliques et caractérisées par la même méthode avec la molécule TBO (Tiraferri et al., 2012 ; Zheng et al., 2012).

### 1.3.2. Quantification des groupements amines

De la même manière que pour les groupements carboxyliques, la densité de groupements amines sur les surfaces des particules sensées être fonctionnalisées avec ces groupements selon les spécifications des fournisseurs, a été caractérisée. Dans la littérature, différentes



molécules chimiques ont été exploitées pour la quantification de groupements amines greffés à différents types de surfaces. Parmi les molécules les plus communément utilisées pour une quantification colorimétrique, on trouve l'Orange II (Zemljič et al., 2009 ; Yu et al., 2007) et le Bleu de Coomassie (Coussot et al., 2009 ; Coussot et al., 2011) (Figure 2. 4).

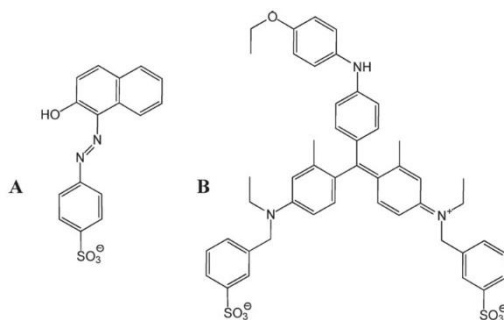


Figure 2.4 Molécules utilisées pour la quantification des groupements amines. A) Orange II, B) Bleu de Coomassie (Noel et al., 2011)

Cependant, les travaux de Noel et de son équipe ont prouvé que l'Orange II est le colorant le plus approprié pour la quantification de groupes amines, grâce à sa structure qui présente une charge négative unique et un faible encombrement stérique comparée à la structure du Bleu de Coomassie (Noel et al., 2011). Ces résultats ont orienté notre choix vers l'utilisation de l'Orange II pour la quantification des groupements amines de nos particules.

Pour cela, les particules sont dispersées dans une solution d'acide chlorhydrique à pH=3 contenant de l'Orange II diluée à 0.03 M. L'ensemble est incubé à 40 °C pendant 30 minutes sous agitation. A cette valeur de pH, la majorité des groupements amines sur la surface des particules sont protonés (chargés positivement) alors que les groupements sulfonates de l'Orange II restent sous forme ionique (chargés négativement) (Figure 2.5). La température de 40 °C permet d'augmenter l'agitation thermique des molécules et de favoriser les collisions intermoléculaires (Orange II/groupements amines). Après 30 minutes de temps de réaction, l'excès d'Orange II est éliminé par des lavages avec la solution acide (pH=3). La désorption des molécules Orange II liées aux groupements amines est ensuite effectuée en dispersant les particules dans un milieu alcalin, l'oxyde de sodium 1 M à un pH=12. Ce milieu permet la déprotonation des groupements de surface amines ce qui supprime leurs interactions électrostatiques avec les molécules d'Orange II et entraîne la désorption de ces dernières.

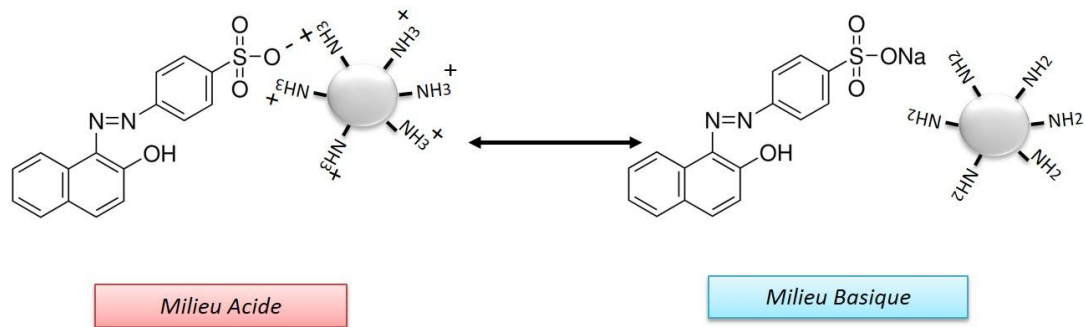


Figure 2.5 Interaction électrostatique entre la molécule d'Orange II et le groupement amine sur les surfaces des particules.

L'absorbance de cette solution est mesurée au spectrophotomètre UV-visible à la longueur d'onde d'absorbance maximale de l'Orange II ( $\lambda=484$  nm). Le calcul de la densité des groupements amines a été réalisé de la même façon que pour les groupements carboxyliques en utilisant l'équation (eq.2.2) et en supposant qu'une molécule d'Orange II interagit avec un groupement amine. La concentration de l'Orange II désorbée dans le milieu alcalin est déterminée à partir d'une courbe d'étalonnage réalisée pour des concentrations d'Orange II comprises entre 0 et  $4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Annexe B).

Cette concentration d'Orange II est ensuite convertie en densité de groupements amines correspondant à  $2,8 \text{ nmol/cm}^2$  pour les particules en polystyrène de  $3 \mu\text{m}$  que nous avons étudiées. Cette valeur de densité est du même ordre de grandeur que celle décrite par le groupe de Zheng pour une surface de graphite fonctionnalisée avec des groupements amines ( $1,2 \text{ nmol/cm}^2$ ). Bien que la valeur du potentiel zêta mesuré pour ces particules soit négative, ce résultat confirme la présence d'une grande densité de groupements chargés positivement correspondant probablement aux groupements amines protonés. Afin de vérifier clairement la présence de ces groupements amines, nous avons procédé à une caractérisation de la surface de ces particules par spectroscopie infrarouge (PMIRAS). Malheureusement, les résultats obtenus par cette méthode n'étaient pas exploitables en raison d'un bruit de fond important causé par le signal du polystyrène. Ayant des doutes sur la qualité de surface de ce lot de particules, nous avons abandonné leur utilisation dans la réalisation d'assemblages permanents.

La caractérisation physico-chimique des micro-objets nous renseigne sur l'état de stabilité des solutions colloïdales et sur l'état de surface des particules. Ces données physico-chimiques sont insuffisantes pour prédire le comportement diélectrophorétique des particules. Pour cela,

il est impératif de compléter leur caractérisation par une étude de leurs propriétés électriques (conductivité électrique et conductance de surface).

### 2. Caractérisation électrique des particules et des cellules

Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous avons manipulé deux types de micro-objets : des particules en polystyrène de différentes tailles et des cellules eucaryotes vivantes (lignée embryonnaire de rein humain HEK 293), de diamètre moyen 10  $\mu\text{m}$ . Dans ce qui suit, nous présenterons essentiellement les travaux conduits afin de caractériser électriquement les particules diélectriques. La détermination des propriétés électriques des cellules HEK-293 ayant déjà fait l'objet d'autres travaux dans l'équipe (thèse de Amal El-Gaddar encours)<sup>5</sup>, nous décrirons plus succinctement la technique employée pour leur caractérisation à la fin de ce chapitre.

#### 2.1. Caractérisation électrique des particules en polystyrène

##### 2.1.1. Modèle électrique d'une particule

Une microbille constituée d'un polymère (ex : polystyrène) peut être considérée électriquement comme une sphère homogène dont les propriétés électriques dépendent du matériau. Cependant, pour des dimensions inférieures à quelques micromètres, la conductivité surfacique  $\sigma_{surface}$  des particules domine sur celle du matériau (Hughes et al., 1999 ; Green et al., 1999). En d'autres termes, la conductivité de la particule dépendra de sa conductance surfacique  $K_s$  mais aussi de son rayon ( $r$ ), comme résumé par l'équation ci-dessous (eq.2.3)

$$\sigma_p = \sigma_{bulk} + \frac{2K_s}{r} \quad (2.3)$$

(où  $\sigma_{bulk}$  représente la conductivité du matériau constituant la particule (négligeable dans le cas du latex),  $K_s$  est la conductance de surface, et  $r$  désigne le rayon de la particule (Hughes et al., 1999 ; Green et al., 1999).

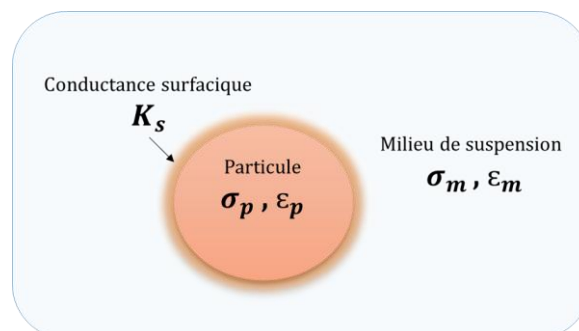


Figure 2.6 Schéma représentant les propriétés électriques d'une particule ainsi que celles de son environnement externe.

<sup>5</sup> Thèse en cours, soutenance prévue en 2015

### 2.1.2. Principe de la mesure

En 1999, Green et Morgan ont étudié de façon détaillée la réponse diélectrophorétique de particules en latex fluorescentes de tailles sub-micrométriques en fonction de la composition de l'électrolyte (milieu de suspension), de sa conductivité, de la fréquence du champ appliqué, ainsi que de la taille des particules. Leur méthode consistait à observer l'évolution de la « fréquence de transition »  $f_0$  - marquant le passage du régime de DEPp au régime de DEPn - en fonction de la conductivité de l'électrolyte : à cette fréquence, les particules ne se déplacent plus. Le champ non uniforme employé pour ces expériences était généré à l'aide d'un ensemble de quatre électrodes, de forme « polynomiale » (Huang et al., 1991). Les particules sont attirées vers le bord des électrodes sous l'effet de la DEPp, tandis qu'elles sont concentrées au centre de l'espace inter-électrodes sous l'effet de la DEPn, ce qui permet de bien distinguer les deux régimes (Figure 2.7). Compte-tenu du fait que la partie réelle du facteur de Claussius-Mossoti (eq.1.5) s'annule à la fréquence  $f_0$ , il est possible de remonter à la valeur de la conductivité surfacique (eq.2.3) du matériau par identification paramétrique à partir des relevés expérimentaux.

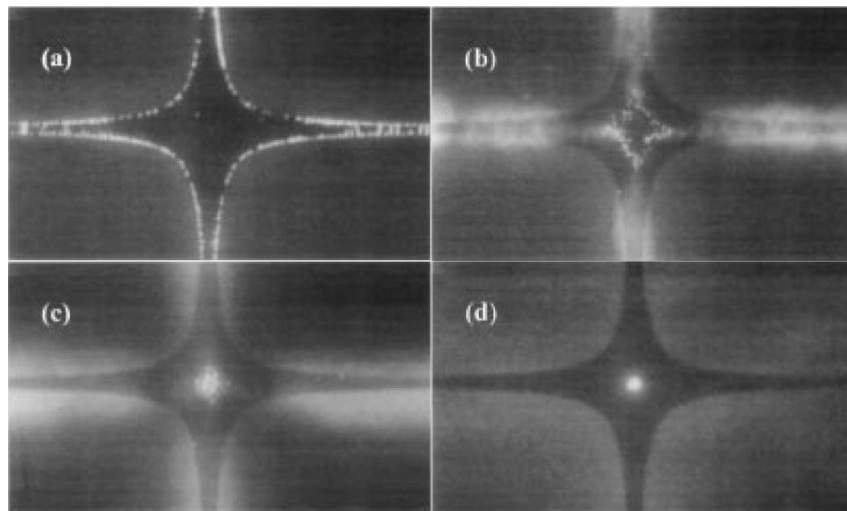


Figure 2.7 Images de particules en latex de 557nm soumises à un champ électrique non uniforme collectées au centre d'électrodes polynomiales, a)DEPp, b) état de transition, c et d) DEPn (Green., 1999)

La même année, Hughes et Morgan ont utilisé la même méthode de caractérisation que Green et ses collaborateurs (Hughes et al., 1999) afin d'analyser (i) le comportement diélectrophorétique de particules en latex fluorescentes de taille 216 nm portant des groupements COOH, et de le comparer avec (ii) celui des mêmes particules après activation, (iii) après greffage de protéines et (iv) après ajout d'anticorps. Ils ont pu confirmer que le comportement électrocinétique des particules dépendait de la conductance surfacique des particules  $K_s$  et ont pu identifier les contributions respectives de deux termes distincts décrits

précédemment par Lyklema (Lyklema et al., 2005) : une conductance due au mouvement des charges dans la couche de Stern (notée  $K_S^i$ ), et une seconde due au mouvement des charges dans la partie diffuse de la double couche (notée  $K_S^d$ ) :

$$K_S = K_S^i + K_S^d \quad (2.4)$$

La conductance de la couche de Stern est liée à la densité de charges dans cette partie de la double couche  $\sigma^i$  ainsi qu'à la mobilité  $\mu^i$  des contre-ions (soit  $K^+$  pour des particules COOH dans du KCl) :

$$K_S^i = \sigma^i \mu^i \quad (2.5)$$

$K_S^d$  est décrite quant à elle par l'équation :

$$K_S^d = \frac{(4F^2 c z^2 D (1 + 3m/z^2))}{RTk} \left( \cos h \left[ \frac{zF\zeta}{2RT} \right] - 1 \right) \quad (2.6)$$

où  $D$  est le coefficient de diffusion des ions,  $z$  la valence des contre-ions,  $F$  la constante de Faraday,  $R$  la constante des gaz parfaits,  $T$  la température (K),  $\zeta$  le potentiel zêta (V),  $c$  la concentration de l'électrolyte ( $\text{mol/m}^3$ ),  $k$  l'inverse de la longueur de Debye (donnée par l'équation 2.7),  $m$  paramètre sans dimension décrivant la contribution du flux électroosmotique des ions à  $K_S^d$ , exprimé par l'équation 2.8.

$$k = \sqrt{\left( \frac{2czF^2}{\varepsilon RT} \right)} \quad (2.7)$$

$$m = \left( \frac{RT}{F} \right)^2 \frac{2\varepsilon m}{3\eta D} \quad (2.8)$$

où  $\eta$  est la viscosité du milieu.

Les travaux de Hughes ont permis d'extraire les valeurs de  $K_S^i$  et du potentiel zêta des particules caractérisées à partir du tracé des fréquences de transition en fonction de la conductivité du milieu de suspension.

Leur méthode permet d'extraire la conductance de la couche de Stern ainsi que le potentiel zêta en utilisant les équations de  $K_S^i$  et de  $K_S^d$  données plus haut. Si l'on peut considérer que  $K_S^i$  ne dépend pas de la conductivité, cela n'est en revanche pas le cas de  $K_S^d$ , dont la valeur augmente avec la concentration de l'électrolyte. Pour une solution de KCl, la conductivité peut être déduite de la concentration molaire  $c$  de l'électrolyte par la relation suivante (extraite des travaux de Mittal et vérifiée par la mesure) :

$$\sigma_m = \frac{15C}{1+0.548\sqrt{C}} \quad (2. 9) \text{ (Mittal et al., 2008)}$$

En utilisant cette relation ainsi que l'équation 2.6, il est possible de tracer  $K_s^d$  en fonction de la conductivité (Figure 2.8), pour une valeur de potentiel zêta donnée :

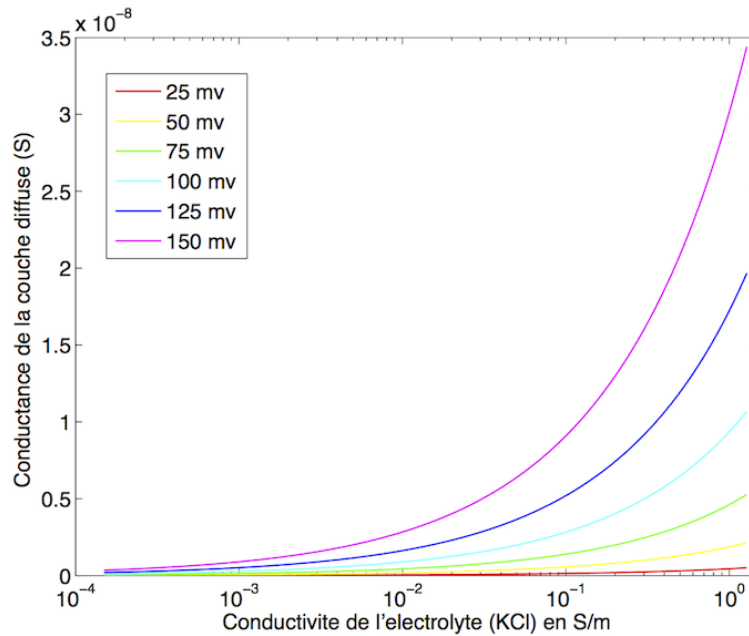


Figure 2.8 Tracé de  $K_s^d$  en fonction de la conductivité, pour différentes valeurs de zêta.

Néanmoins, lorsque la conductivité varie dans une plage de valeurs limitée (comme c'est le cas dans nos expériences), le potentiel zêta peut être considéré comme globalement constant. Aussi, dans la méthode proposée par Hughes,  $K_s^i$  et le potentiel zêta sont déduits du relevé de  $f_0=f(\text{concentration})$ .  $K_s^d$  peut ensuite être calculé pour une conductivité donnée à partir de l'équation 2.6. Il est alors possible d'en déduire la valeur de  $S_p$  pour cette conductivité, et de prédire le comportement diélectrophorétique des particules dans ce milieu (c'est-à-dire l'évolution de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence).

Afin de tester cette méthode, nous avons développé sous Matlab un programme permettant l'extraction des valeurs de  $K_s^i$  et du potentiel zêta par identification paramétrique. Nous l'avons dans un premier temps appliqué aux données mesurées par Hughes (Hughes et al.,1999) pour des particules en latex de diamètre 216 nm (nanoparticules portant en surface des groupements COOH, et fluoresçant dans le rouge).

En tenant compte des N points de mesure, on cherche à minimiser la somme des erreurs quadratiques entre les fréquences de transition mesurées et théoriques :

$$\sum_{i=1}^N (f_{0\_mesurée} - f_{0\_théorique})^2 \quad (2.10)$$

La fréquence de transition théorique est calculée à partir de l'équation 1.16, dans laquelle  $S_p$  est exprimée en fonction de  $K_s^d$ , déduite des équations 2.6 et 2.9.

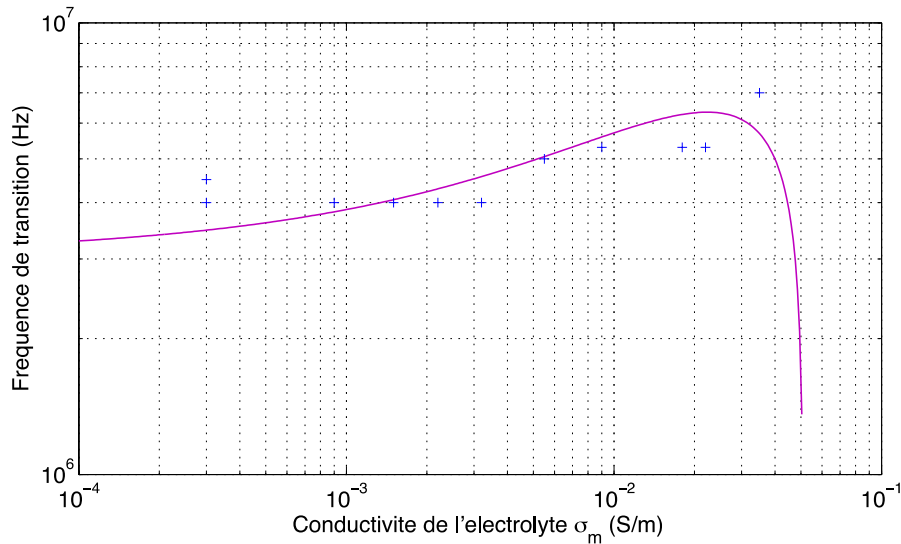


Figure 2.9 Variation de la fréquence de transition en fonction des conductivités du milieu pour les particules en latex de diamètre 216 nm (nanoparticules portant en surface des groupements COOH, et fluoresçant dans le rouge).

Les valeurs extraites sont semblables à celles obtenues par Hughes ( $z\eta = 90$  mV et  $K_s^i = 1$  nS). Les travaux de Green et de Hughes seront complétés par ceux d'Ermolina et Morgan en 2005 (Ermolina et al., 2005).

### 2.1.3. Méthode expérimentale

En résumé, cette méthode de caractérisation consiste à déterminer la variation des fréquences de transition d'un type de particule en fonction de la conductivité du milieu de suspension dans lequel elles se trouvent. A partir de ces données, une courbe est établie (Figure 2.9). A l'aide de ce tracé, les propriétés électriques des particules ( $K_s$  puis par déduction  $\sigma_p$ ) sont déterminées. La connaissance de ces propriétés nous permettra de tracer par la suite le spectre diélectrophorétique, c'est à dire l'évolution de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence du champ, et ce pour différentes valeurs de conductivité de l'électrolyte. Ceci sera très utile à la définition de conditions optimales pour réaliser les assemblages. La démarche expérimentale suivie, adaptée des travaux de Hughes et de Morgan, est détaillée ci-après.

### 2.1.3.1. Préparation des particules en polystyrène

Nous avons utilisé des particules en polystyrène de différentes tailles, des billes de 3  $\mu\text{m}$  avec des groupements carboxyliques (Biovalley, France), ainsi que des micro et nano particules de 1  $\mu\text{m}$ , 500  $\mu\text{m}$  et 200  $\mu\text{m}$  fluorescentes fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques (Invitrogen). Afin d'être dans les mêmes conditions expérimentales que celles de Green, nous avons utilisé des solutions de KCl dont les conductivités varient dans une gamme comprise entre 0 et  $10^{-2}$  mS/m. 1  $\mu\text{l}$  de solution colloïdale est diluée dans 1 ml de milieu KCl. Les particules ne subissent pas de lavages, afin d'éviter leur agrégation durant l'étape de centrifugation. Ce ratio volumique de 1/1000 (particules/milieu KCl) n'affecte pas la conductivité du milieu de suspension choisi (les conductivités ont été contrôlées au conductimètre InLab®751 METTLER-Toledo ).

### 2.1.3.2. Electrodes et montage expérimental

- Electrodes

Des électrodes quadripolaires en or ont été utilisées pour effectuer la caractérisation électrique des particules en polystyrène (Figure 2.11). Elles ont été fabriquées par un procédé standard de photolithographie et gravure chimique humide (Annexe C) avec un espace inter-électrodes de 40  $\mu\text{m}$ .

- Montage expérimental

Le montage expérimental présenté dans cette section est celui qui a été utilisé pour ces expériences de caractérisation électrique des particules mais aussi pour les travaux d'assemblage des cellules et de microparticules, qui seront présentés au chapitre 4. Le banc expérimental est constitué de trois parties distinctes (Figure 2.10) :

- **Instruments de génération et de contrôle des paramètres électriques** Les signaux électriques appliqués aux électrodes sont produits à l'aide d'un générateur de signaux arbitraires pouvant délivrer des signaux du continu à 80 MHz (Agilent®33250A). Les tensions appliquées sont contrôlées à l'oscilloscope (Agilent® DSO6034A-bande passante 300 MHz).
- **Outils d'observation** : Deux microscopes ont été utilisés pour les observations et le suivi en temps réel des expériences : un microscope droit (Nikon Eclipse LV150) et un microscope à fluorescence (Axio Imager Zeiss) dans le cas de manipulation de micro-objets fluorescents. Ces deux microscopes sont respectivement équipés d'une caméra



Nikon DS-Fi2 et AxioCam HS (Zeiss), l'acquisition étant assurée par les logiciels NIS BR et AxioVision.

- **Système de contrôle microfluidique** : Des contrôleurs d'écoulement sont aussi disponibles et utilisés lors des assemblages dans des systèmes microfluidiques (OB1 Elveflow, MFCS Fluigent).



Figure 2.10 Installation optique et électrique pour les expérimentations

### 2.1.3.3. Détermination des propriétés électriques

Pour la détermination des fréquences de transition, un joint en silicone a été déposé autour des électrodes pour former une micro-chambre, puis rempli de solution contenant les particules à caractériser. La même opération a été réalisée pour chaque taille de particules pour différentes conductivités de milieu, en prenant soin de laver et sécher le dispositif entre deux expériences. De plus, pour chaque conductivité testée, l'expérience a été répétée 3 fois. Les deux régimes fréquentiels (DEPn et DEPp) sont obtenus en appliquant un balayage en fréquence de 1 kHz à 80 MHz tandis que la tension est maintenue constante (10 Vpp). La fréquence de transition obtenue pour chaque conductivité a pu ainsi être relevée (Figure 2.11). Nous avons observé que l'application d'une tension supérieure à 10 Vpp se traduisait par l'apparition de mouvements fluidiques pouvant affecter la trajectoire des particules (Ramos et al., 1998). Afin d'éviter ces effets électrothermiques, nous avons limité la tension à cette valeur.

Après l'application de la tension, le déplacement diélectrophorétique des particules était rapide, avec un temps de réponse qui diminuait avec l'augmentation du diamètre des particules. Lorsque les particules subissent la DEPp, elles sont collectées au bord des électrodes (Figure 2.11.A), et lorsque les particules sont sous le régime DEPn, ces dernières sont repoussées des maxima de champ électrique et recueillies au centre des électrodes (Figure 2.11.C) conformément aux observations de Green et al. (Figure 2.8).

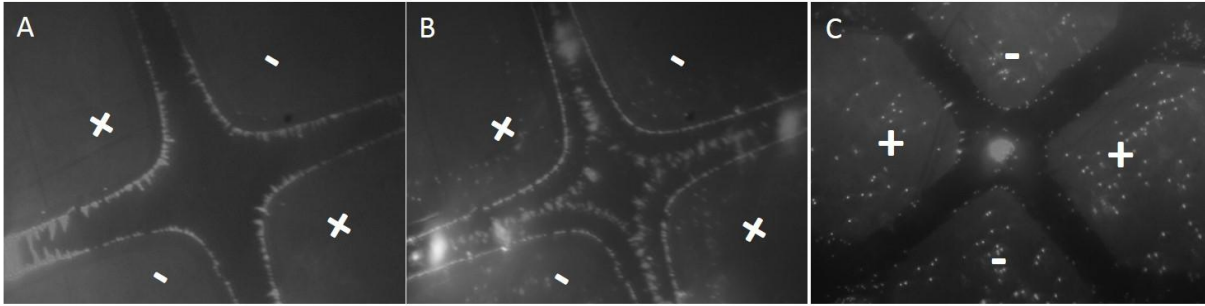


Figure 2.11 Comportement diélectrophorétique des particules en polystyrène de 500 nm fluorescentes avec des groupements carboxyliques en surface dans de l'eau DI ( $\sigma_m=0$  S/m), soumises à une tension de 10 Vpp. A) DEPp (100 kHz), B) Début de DEPn (1MHz), C) DEPn (5MHz).

Au cours des expériences, la détermination des fréquences de transition a été difficile à réaliser. En effet, leurs mesures ont été réalisées en considérant un ensemble de particules et non une particule unique. De plus, on pouvait parfois observer une sorte d'hystérésis dans le comportement des particules manipulées. En plus de ces difficultés, la détermination des fréquences de transition  $f_0$  des billes dont la taille était supérieure à 1  $\mu\text{m}$  était particulièrement délicate en variant la conductivité du milieu KCl dans une gamme comprise entre 0 et  $10^{-2}$  mS/m. En effet,  $f_0$  décroît lorsque la taille des particules augmente, comme résumé sur la figure suivante (Figure 2.12), extraite de l'étude conduite par Ermolina (Ermolina et al., 2005):

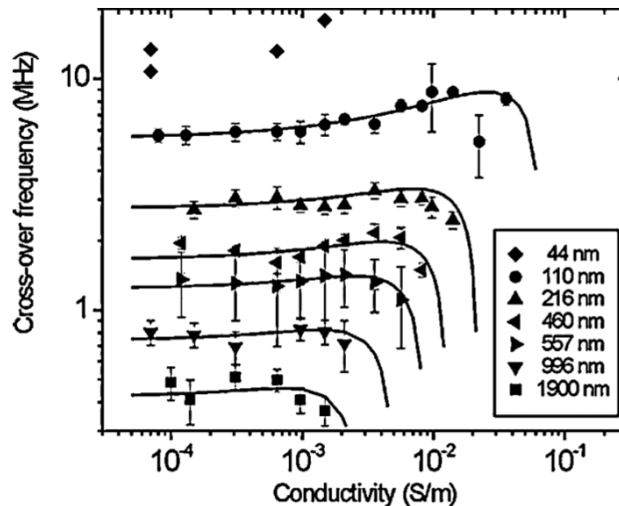


Figure 2.12 Evolution de la fréquence de transition en fonction de la conductivité de l'électrolyte, pour des micro et nanoparticules de latex portant des groupements COOH en surface, de diamètres compris entre 44 nm et 1900 nm (Ermolina et a., 2005).

Dans la gamme de conductivités étudiée, la fréquence de transition des particules de 3  $\mu\text{m}$  se situe autour de 20 kHz, c'est-à-dire proche des basses fréquences auxquelles il devient

difficile de distinguer les effets diélectrophorétiques et électroosmotiques. Au-delà de quelques micromètres, la conductivité des particules devient indépendante de la conductivité de leur milieu de suspension (Ermolina et al., 2005 ; Arnold et al., 1987).

Enfin, la mesure des très basses conductivités peut s'avérer délicate, ce qui peut apporter un biais supplémentaire aux résultats.

Malgré ces difficultés, nous avons tout de même essayé d'extraire les paramètres des billes de 200 nm en employant la méthode de Hughes. La figure ci-après présente les résultats obtenus. Nous obtenons après identification les valeurs suivantes :  $K_s^i = 0.8$  nS et  $\zeta = 90$  mV.

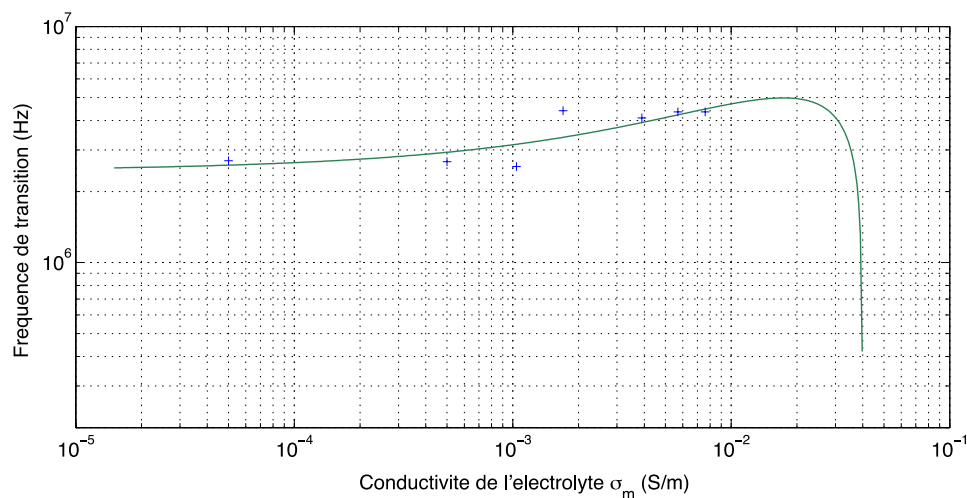


Figure 2. 13 Détermination des valeurs de  $K_s^i$  et  $\zeta$  pour les particules de 200 nm. Les points expérimentaux (croix bleues) représentent la valeur moyenne obtenue sur 3 mesures.

Ces résultats sont proches de ceux obtenus par Hughes pour des particules de même taille et de même nature (Figure 2.9). Cependant, la mesure du potentiel  $\zeta$  à l'aide du Zetasizer conduisait à l'obtention d'une valeur de 50 mV. Cette mesure a été effectuée pour plusieurs conductivités dans la plage étudiée et nous avons ainsi pu vérifier que la valeur du potentiel  $\zeta$  restait constante.

La figure (2.14), montre la dépendance de la fréquence de transition à la valeur du potentiel  $\zeta$ ,  $K_s^i$  étant maintenue constante à 0.8 nS. On constate que ce paramètre détermine la pente de la caractéristique et qu'une légère variation de cette dernière peut traduire une variation importante du potentiel  $\zeta$ . Par conséquent, compte-tenu des difficultés rencontrées pour réaliser les mesures, nous avons jugé préférable de nous en remettre à la mesure donnée par le Zetasizer pour déterminer le potentiel  $\zeta$ .

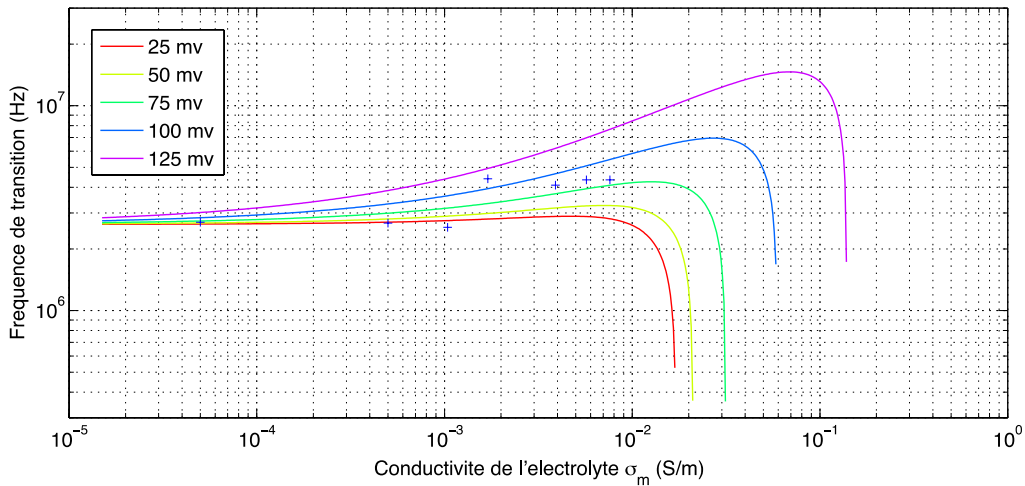


Figure 2.14 Evolution de la fréquence de transition avec la conductivité de l'électrolyte, pour différentes valeurs du potentiel zêta (cas de particules de 200 nm de diamètre, tracés effectués pour  $K_s^i = 0.8$  nS).

La figure suivante (2.15) nous montre que la mesure de la fréquence de transition à très faible conductivité (par exemple dans KCl  $\sigma_{KCl} \approx 0$ ) devrait être un bon moyen de déterminer  $K_s^i$ . En effet, la variation de la fréquence de transition avec  $K_s^i$  est assez marquée.

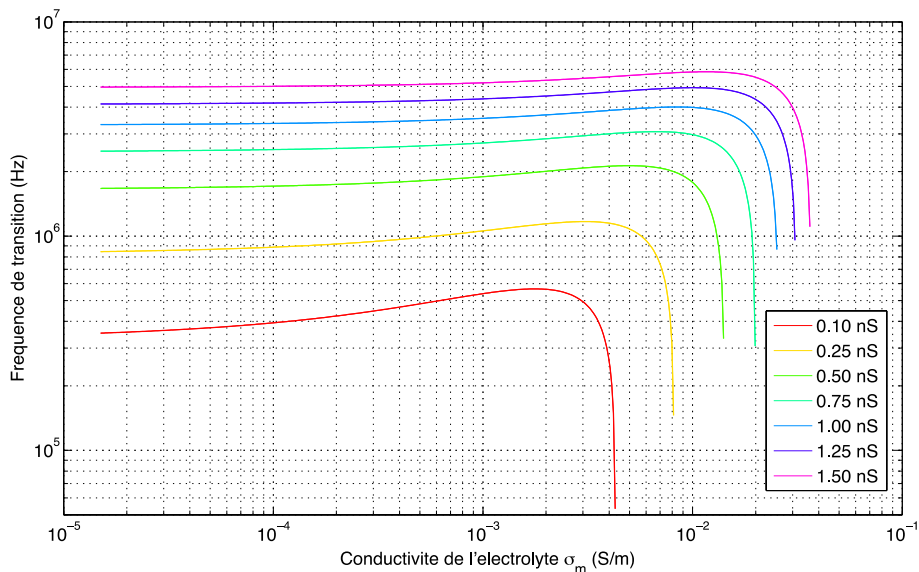


Figure 2.15 Evolution de la fréquence de transition avec la conductivité de l'électrolyte, pour différentes valeurs de  $K_s^i$  (cas de particules de 200 nm de diamètre, tracés effectués pour zêta=50 mV).

Aussi, nous avons choisi d'adapter la méthode en mesurant séparément les deux paramètres recherchés ( $K_s^i$  et le potentiel zêta).

Le paragraphe suivant décrit en détail la méthode suivie. Nous présentons dans un premier temps de façon détaillée la caractérisation des billes de polystyrène de 3  $\mu\text{m}$  fonctionnalisées

avec des groupements carboxyliques en surface. La même méthode a été appliquée pour les autres tailles de particules. Tous les résultats sont résumés dans le tableau 2.3.

Afin de déterminer la conductance surfacique, nous avons commencé par déterminer la fréquence de transition des billes de polystyrène dans de l'eau Déionisée. Le protocole suivi est le même que celui décrit précédemment (méthode de Green et Hughes). En maintenant la tension appliquée aux électrodes à 10 Vpp, la plage de fréquences [1kHz-10MHz] a été balayée. Le comportement diélectrophorétique des particules est représenté sur la Figure 2.16.

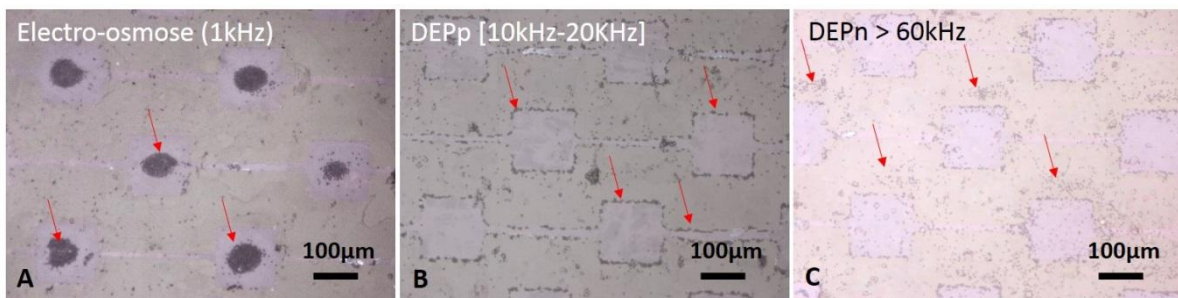


Figure 2.16 Comportement diélectrophorétique des particules de polystyrène de 3 µm fonctionnalisées avec des groupements carboxyliques dans de l'eau DI, sous l'effet du champ électrique à différentes fréquences. A) Electroosmose, B) DEPp et C) DEPn.

**Aux fréquences inférieures à 2 kHz :** les particules sont entraînées vers le centre des électrodes où elles s'accablent, (Figure 2.16.A), sous l'effet des vortex créés au-dessus des électrodes, ce qui correspond au phénomène d'électroosmose (Chapitre 1).

**Fréquences comprises dans la plage [10kHz-20kHz] :** Les particules sont dirigées par diélectrophorèse positive (DEPp) vers les zones de champ électrique maximum, se trouvant sur les bords des électrodes (Figure 2.16.B).

**Fréquences comprises dans la plage [20kHz-60kHz] :** dans cet intervalle de fréquences, les particules ne sont plus soumises à la diélectrophorèse ni à un autre phénomène électrocinétique. Nous nous situons autour de la fréquence de transition.

**Fréquences > 60kHz :** les particules sont repoussées vers les zones de faible intensité de champ électrique par diélectrophorèse négative (DEPn) (Figure 2.16.C)

Il était difficile de définir précisément une valeur de fréquence de transition. Un intervalle a donc été défini. Les calculs qui suivent sont basés sur les valeurs extrêmes de cet intervalle.

Comme cela a été expliqué précédemment, la conductivité des particules dépend de la conductance de surface qui est la somme de deux contributions : celle de la conductance de

Stern et celle de la couche diffuse. Dans un milieu KCl de conductivité très faible  $\sigma_m \approx 0$ , la conductance de la couche diffuse  $K_s^d$  peut être négligée, celle-ci étant proportionnelle à  $c^{1/2}$  (équations 2.6 et 2.7). Ainsi, la conductance de la couche de Stern  $K_s^i$  peut être directement déduite de l'équation 2.3.

En utilisant l'équation 1.5 avec  $\varepsilon_0 = 8.85 \times 10^{-12}$ ,  $\varepsilon_p = 2.56 * \varepsilon_0$ ,  $\varepsilon_m = 78 * \varepsilon_0$ ,  $\sigma_m \approx 0$ , la conductivité des particules  $\sigma_p$  dans un milieu KCl très peu conducteur ( $\sigma_m \approx 0$ ) peut être déduite des valeurs de la fréquence de transition mesurées, comprises entre 20 kHz et 60kHz. Nous en déduisons que  $\sigma_p$  est comprise entre  $1.2 \times 10^{-4}$  et  $3.64 \times 10^{-4}$  S/m. Par ailleurs, en utilisant l'équation 2.3 avec  $\sigma_{bulk} = 0$  et  $K_s^d = 0$ , la conductance de la couche de Stern  $K_s^i$  est comprise entre  $9 \times 10^{-11}$  et  $2.73 \times 10^{-10}$  S. Ces résultats sont en concordance avec les résultats de Suzuki et al. 2004 pour des particules en latex avec des groupements  $NH_2$ . Cependant, lorsque la conductivité du milieu est plus importante ( $\sigma_{KCl} = 5.7$  mS/m), la conductance de la couche diffuse  $K_s^d$  n'est plus négligeable. En tenant compte de la valeur du potentiel zêta (-78mV) des particules mesuré précédemment, la valeur de  $K_s^d$  a été calculée à partir des équations (2.6, 2.7, 2.8), ce qui conduit à  $K_s^d = 3.64 \cdot 10^{-10}$  S. Etant donné que la valeur de la conductance de la couche de Stern est supposée ne pas varier dans la plage de conductivités considérées (d'après la méthode décrite par Hughes et al., 1999), selon l'équation 2.4, la valeur finale de la conductance de surface  $K_s$  dans la solution de KCl est comprise entre  $4.54 \times 10^{-10}$  et  $6.37 \times 10^{-10}$  S. La valeur résultante de la conductivité des particules  $\sigma_p$  dans la solution de KCl est comprise entre  $6.05 \times 10^{-4}$  et  $8.49 \times 10^{-4}$  S/m.

Les autres particules, de tailles 200 nm, 500 nm et 1  $\mu$ m, ont été caractérisées en suivant les mêmes étapes. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau qui suit :

## Chapitre 2 : Caractérisations physico-chimique et électrique des micro-objets manipulés par diélectrophorèse

Particules en polystyrène 200nm (COOH) $f_{0DI} = [2,6 - 2,7]$ MHz						
Paramètre	$\sigma_m (10^{-3} \text{ S/m})$	$K_s^d (\text{S})$	$K_s^i (\text{nS})$	$K_s (\text{nS})$	$\sigma_p (\text{S/m})$	Pzeta mV
Eau DI	$\approx 0$	Négligeable	0.78-0.81	0.78 - 0.81	$1.56 \times 10^{-2} - 1.6 \times 10^{-2}$	-50
KCl	5,7	$1.33 \times 10^{-10}$	0.78-0.81	0.91 - 0.94	$1.83 \times 10^{-2} - 1.89 \times 10^{-2}$	
Particules en polystyrène 500nm (COOH) $f_{0DI} = [1,56 - 1,65]$ MHz						
Eau DI	$\approx 0$	Négligeable	1.16-1.23	1.16 - 1.23	$0.93 \times 10^{-2} - 0.98 \times 10^{-2}$	-57
KCl	5,7	$1.77 \times 10^{-10}$	1.16-1.23	1.33 - 1.4	$1.07 \times 10^{-2} - 1.13 \times 10^{-2}$	
Particules en polystyrène 1 $\mu\text{m}$ (COOH) $f_{0DI} = [160 - 200]$ kHz						
Eau DI	$\approx 0$	Négligeable	0.24-0.3	0.24 - 0.3	$0.9 \times 10^{-3} - 1.3 \times 10^{-3}$	-91
KCl	5,7	$5,15 \times 10^{-10}$	0.24-0.3	0.75 - 0.81	$3.0 \times 10^{-3} - 3.3 \times 10^{-3}$	
Particules en polystyrène 3 $\mu\text{m}$ (COOH) $f_{0DI} = [20 - 60]$ kHz						
Eau DI	$\approx 0$	Négligeable	0.09-0.27	0.09 - 0.27	$1.2 \times 10^{-4} - 3.64 \times 10^{-4}$	-78
KCl	5,7	$3.64 \times 10^{-10}$	0.09-0.27	0.45 - 0.6	$6.05 \times 10^{-4} - 8.4 \times 10^{-4}$	

Tableau 2.3 Propriétés électriques des particules de polystyrène de différentes tailles dans l'eau DI et dans une solution de KCl de conductivité  $5.7 \times 10^{-3} \text{ S/m}$ .

Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Ermolina et Morgan, indiquant une diminution des fréquences de transition avec l'augmentation de la taille des particules (voir plus haut) :

Particules en polystyrène (nm)	1900	996	460	216
Fréquence de coupure (Hz)	$350 \cdot 10^3$	$800 \cdot 10^3$	$1,9 \cdot 10^6$	$3 \cdot 10^6$

Tableau 2.4 Fréquences de transition obtenues pour des particules en polystyrène de différentes tailles, suspendues dans un milieu de conductivité  $\sigma_m = 10^{-3} \text{ S/m}$  (Ermolina et al., 2005).

En effet, l'augmentation de la taille se traduit par une diminution de la conductivité surfacique (terme inversement proportionnel à  $r$  dans l'équation 2.3) et par conséquent de  $\sigma_p$ . Or d'après l'équation 1.16, si  $\sigma_p$  diminue,  $f_0$  diminue également.

Les valeurs des conductances de surface obtenues expérimentalement ont également été comparées avec celles de la littérature. Ainsi, les valeurs des conductances surfaciques obtenues par les équipes de Hughes, Ermolina et Suzuki sont présentées dans le tableau 2.5. On observe que les valeurs des conductances surfaciques que nous obtenons sont du même ordre de grandeur que celles de la littérature.



## Chapitre 2 : Caractérisations physico-chimique et électrique des micro-objets manipulés par diélectrophorèse

Particules Polystyrène latex		200 nm	500 nm	3 $\mu\text{m}$
$K_s$ (nS)	Nos travaux	<b>0.91-0.94</b>	<b>1.16-1.23</b>	<b>0.09 - 0.27</b>
	Littérature	<b>0.85 -0.9</b>	<b>1.15</b>	<b>0.09-0.24</b>
		Hughes 2002 /Ermolina 2005	(Ermolina 2005)	(Suzuki 2004)

Tableau 2.5 Comparaison des conductances de surface (pour  $\sigma_m \approx 0$ ) des particules en polystyrène de différentes tailles déterminées par les méthodes de la littérature et celle présentée dans ce chapitre.

Ces résultats nous ont permis de tracer l'évolution de  $\text{Re}(\text{CM})$  dans les deux milieux (eau DI et KCl), représentée sur la figure 2.17. Ces graphes permettent de prédire le comportement diélectrophorétique des particules de polystyrène à chaque fréquence choisie.

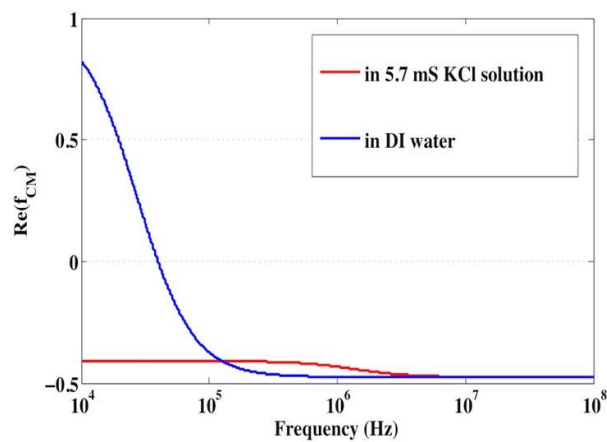


Figure 2.17 Variation moyenne de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti des particules de polystyrène de 3  $\mu\text{m}$  avec des groupements carboxyliques sur leurs surfaces dans de l'eau DI et dans une solution de KCl ( $\sigma_{\text{KCl}}=5.7$  mS/m) respectivement.

Pour les particules de diamètre 3  $\mu\text{m}$  dans l'eau DI, la valeur de  $\text{Re}(\text{CM})$  diminue avec la fréquence et change de signe. Conformément aux résultats présentés sur la figure (2.17), au-delà de 60 kHz, les particules passent de la diélectrophorèse positive (DEPp) à la diélectrophorèse négative (DEPn). Par ailleurs, dans la solution de KCl, la partie réelle du facteur de CM est négative sur toute la gamme de fréquences comprises entre 10 kHz et 100 MHz. Dans ce cas, quelle que soit la fréquence choisie, les particules seront soumises à la DEPn. Ces résultats montrent la possibilité de réaliser des assemblages par DEPn, ce qui répond parfaitement aux objectifs de notre travail.

Comme pour les particules, nous avons aussi besoin des propriétés électriques des cellules pour prédire leur comportement diélectrophorétique. Nous n'avons pas procédé à la caractérisation des cellules mais comme indiqué plus haut, ce travail a déjà été effectué par



Amal El Gaddar, citée précédemment. Nous présentons dans ce qui suit un bref aperçu de la méthode utilisée ainsi que du modèle électrique considéré.

### 2.2. Caractérisation électrique des cellules

#### 2.2.1. Modèle électrique

Une cellule biologique présente une structure complexe formée de plusieurs compartiments (membrane plasmique, cytoplasme, organites,...) de propriétés électriques différentes. D'un point de vue électrique, cette structure peut être décrite à l'aide d'un modèle multicouches (multi-shell) dans lequel chaque couche est caractérisée par ses propriétés diélectriques propres (conductivité et permittivité / capacité spécifique et conductance spécifique), comme celui développé par Irimajiri (Irimajiri et al., 1979) considérant les différents compartiments de la cellule comme une succession de couches concentriques (Falokun 2007). Ce modèle ne sera pas détaillé dans ce manuscrit. Nous présenterons le modèle électrique le plus communément utilisé qui est le modèle simple couche ou « single-shell ». Selon ce dernier, une cellule est constituée d'une membrane entourant un cytoplasme, tous deux considérés comme électriquement homogènes. Le modèle « single-shell » fait ainsi référence à la structure présentée sur la figure (2.18.A). La cellule est alors composée par le cytoplasme (conductivité  $\sigma_c$ , permittivité  $\epsilon_c$ ) entourée de sa membrane (épaisseur  $d$ , conductivité  $\sigma_{mem}$ , permittivité  $\epsilon_{mem}$ ). Étant donné que les membranes sont de faible épaisseur ( $2 \text{ nm} < d < 8 \text{ nm}$ ) (Gascoyne 2004), leurs propriétés diélectriques sont généralement exprimées par unité de surface en donnant leur capacité spécifique membranaire  $C_{mem} = \epsilon_m/d$  et conductance spécifique  $G_{mem} = \sigma_m/d$  (Figure 2.18.B). Cette dernière valeur est très faible, compte-tenu du caractère isolant de la membrane. Par ailleurs, Le cytoplasme des cellules est classiquement composé de nombreux ions ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Na}^{+2}$ ,  $\text{HCO}^{-3}$ ), protéines, acides nucléiques et autres molécules. Il est généralement modélisé comme un diélectrique avec pertes, dont la permittivité relative et la conductivité varient respectivement dans les gammes de 50-200 et 0,1-10 S/m (Markx et al., 1999).

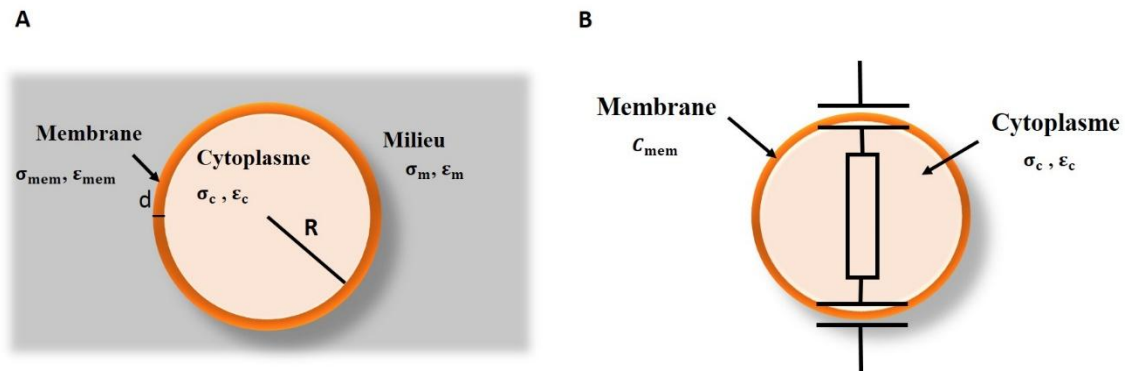


Figure 2.18 A) Modèle « Single shell » B) Modèle électrique d'une cellule biologique

La méthode la plus communément utilisée pour caractériser des cellules individuelles est l'électrorotation, une technique introduite par Zimmermann dans les années 80.

### 2.2.2. Caractérisation électrique des cellules par électrorotation

L'électrorotation traduit le mouvement d'une particule en rotation sous l'effet d'un champ électrique. Ce phénomène est obtenu lorsque la particule est placée dans un champ électrique tournant (Figure 1.19) dont la fréquence est suffisamment élevée pour induire un déphasage spatial entre le dipôle induit et le champ tournant (Goater et al., 1999 ; Jones, 2005). Ce déphasage se traduit par un couple s'exerçant sur la particule. Il est décrit par l'équation suivante (Markx et al., 1999):

$$\Gamma = -4\pi\epsilon_m r^3 \text{Im}[Re(CM)]E^2 \quad (2.11)$$

Avec  $\Gamma$  le couple (N/m), et  $\text{Im}[Re(CM)]$  la partie imaginaire du facteur de CM (eq.1.5).

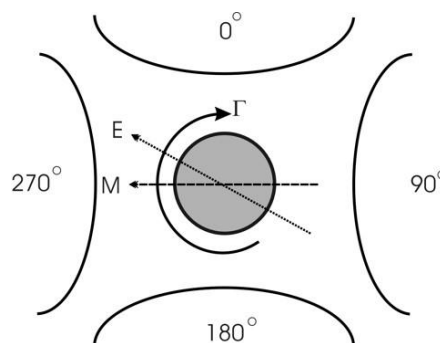


Figure 1.19 Système d'électrodes employées pour l'électrorotation : les tensions appliquées à deux électrodes adjacentes sont déphasées de 90°. En fonction du déphasage entre le moment dipolaire induit (M) et le champ électrique (E), le couple ( $\Gamma$ ) met la particule en mouvement dans le sens inverse ou identique à celui du champ électrique appliqué (Hughes, 2000).

La technique d'électrorotation permet en effet de remonter à la signature diélectrophorétique d'un type cellulaire. Par ailleurs, l'expérience d'électrorotation permet la caractérisation de la

## Chapitre 2 : Caractérisations physico-chimique et électrique des micro-objets manipulés par diélectrophorèse

structure interne de la cellule et est suffisamment sensible pour détecter la présence de parasites (Gascoyne et al., 1997) ou même différencier des sous populations de cellules (Yang et al., 1999).

Les propriétés des cellules biologiques peuvent être extraites à partir du spectre d'électrorotation (Zimmerman et al., 2008 ; El-Gaddar et al., 2013). Celui-ci correspond au tracé de l'évolution de la vitesse de rotation en fonction de la fréquence du champ tournant et est obtenu expérimentalement (Figure 2.20). L'évolution fréquentielle de la partie imaginaire du facteur de CM peut être directement déduite de celle de la vitesse de rotation (Markx et al., 1999). Cette méthode a d'ailleurs été utilisée par Zimmermann ainsi que par Amal El Gaddar pour déterminer les propriétés électriques des cellules HEK-293 utilisées dans ces travaux de thèse. Ces propriétés sont :  $C_{mem} = 8.5 \cdot 10^{-3} \text{ F.m}^{-2}$ ,  $G_{mem} = 0 \text{ S.m}^{-2}$ ,  $\epsilon_{cyt} = 71 \cdot \epsilon_0$ ,  $\sigma_{cyt} = 0.533 \text{ S/m}$ .

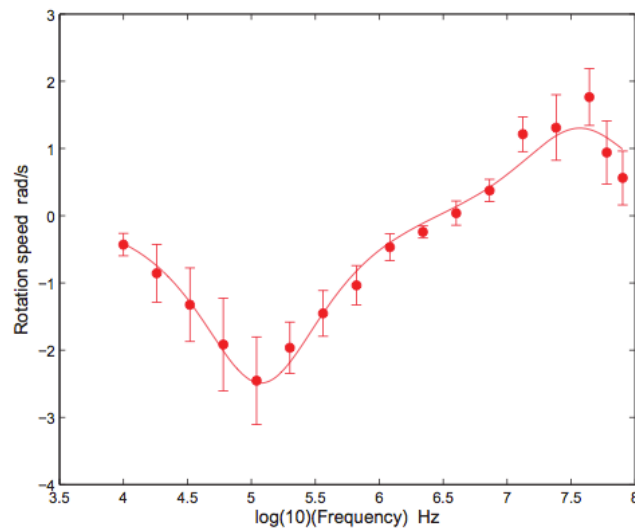


Figure 2.20 Spectre d'électrorotation de cellules HEK dans un milieu de conductivité 50mS/m (thèse d'Amal El-Gaddar)

### 3. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié dans un premier temps la stabilité des différents systèmes colloïdaux étudiés, composés de particules en polystyrène de différentes tailles et présentant des groupements carboxyliques ou amines en surface. L'état colloïdal de ces systèmes a été démontré par des mesures de taille des particules par granulométrie qui ont révélé une monodispersité des particules avec un pourcentage de variation nul. Par la suite, des mesures du potentiel zêta ont été entreprises. Les valeurs des potentiels zêta mesurées, supérieures en valeur absolue à 50 mV, démontrent la stabilité des suspensions de particules sauf pour les particules de 3  $\mu\text{m}$  avec des groupements amines dont le potentiel mesuré était négatif et inférieur à 30 mV. Les groupements chimiques fonctionnels carboxyliques et amines greffés aux particules ont été mis en évidence et quantifiés par la méthode colorimétrique en utilisant les molécules de TBO et l'orange II.

La caractérisation physico-chimique des microparticules est importante. En effet, elle permet de déterminer la stabilité des particules dans leurs milieux de suspension et renseigne sur l'état de surface de ces dernières. Cette étude apporte de l'aide pour l'établissement des protocoles d'assemblage permanents par addition d'agent de couplage chimique en nous permettant d'estimer les concentrations d'agent à utiliser. Cependant, elle reste insuffisante pour déterminer les paramètres diélectrophorétiques optimaux (fréquences et tensions électriques) pour la réalisation des assemblages. Pour cela, nous l'avons complétée par une caractérisation électrique.

Nous nous sommes plus attardés sur la caractérisation électrique des particules que sur celle des cellules étant donné que cette dernière avait déjà été réalisée par une doctorante de notre équipe de recherche. Ceci ne nous a pas empêché de présenter un aperçu du principe de caractérisation électrique des cellules basé sur l'électrorotation.

Concernant la détermination des propriétés électriques des particules, nous nous sommes basés sur la méthode développée par Green et son équipe. Cette méthode nous a semblé simple par son principe mais elle s'est avérée limitée pour les plus grosses particules et nécessite une détermination très fine et précise des fréquences de transition. Nous en avons tout de même conservé le principe mais en apportant des modifications qui ont été présentées dans le corps du chapitre. Enfin, nous avons pu extraire les propriétés électriques des particules qui nous permettront de déterminer leur comportement diélectrophorétique pour un milieu et une fréquence donnés et de définir les paramètres d'assemblage. Cependant, par manque de temps nous n'avons pas utilisé toutes les particules présentées dans ce chapitre 2.

## Chapitre 2 : Caractérisations physico-chimique et électrique des micro-objets manipulés par diélectrophorèse

---

Au chapitre 3, nous employons les particules de 3  $\mu\text{m}$  pour valider le fonctionnement des micro-systèmes conçus. Au chapitre 4, nous décrivons l'assemblage permanent par DEPn et couplage chimique de particules de 1  $\mu\text{m}$ -(COOH), puis la formation d'agrégats et de patterns obtenus avec les cellules HEK-293.

Les micro-objets ayant été caractérisés, nous avons maintenant besoin d'un système d'électrodes pour les manipuler. Dans le chapitre qui suit, nous présenterons les micro-systèmes utilisés à cet effet, la méthode développée pour les fabriquer ainsi que les tests effectués.

### References

- Arnold, W.M., Schwan, H.P., Zimmermann, U., 1987. Surface Conductance and Other Properties of Latex Particles Measured by Electrorotation. *J. Phys. Chem* 91, 5093–5098.
- Alpat, S. K., Özbayrak, Ö., Alpat, Ş., & Akçay, H. (2008). The adsorption kinetics and removal of cationic dye, Toluidine Blue O, from aqueous solution with Turkish zeolite. *Journal of hazardous materials*, 151(1), 213-220
- Birdi, K. A. S. (Ed.). (2008). *Handbook of surface and colloid chemistry*. CRC Press.
- Cosgrove, T. (Ed.). (2010). *Colloid science: principles, methods and applications*. John Wiley & Sons.
- Cook, A. D., Pajvani, U. B., Hrkach, J. S., Cannizzaro, S. M., & Langer, R. (1997). Colorimetric analysis of surface reactive amino groups on poly (lactic acid-co-lysine): poly (lactic acid) blends. *Biomaterials*, 18(21), 1417-1424.
- Coussot, G., Perrin, C., Moreau, T., Dobrijevic, M., Le Postollec, A., & Vandenamee-Trambouze, O. (2011). A rapid and reversible colorimetric assay for the characterization of aminated solid surfaces. *Analytical and bioanalytical chemistry*, 399(3), 1061-1069.
- Coussot, G., Nicol, E., Commeyras, A., Desvignes, I., Pascal, R., & Vandenamee-Trambouze, O. (2009). Colorimetric quantification of amino groups in linear and dendritic structures. *Polymer International*, 58(5), 511-518.
- El-Gaddar, A., Frénéa-Robin, M., Voyer, D., Aka, H., Haddour, N., Krähenbühl, L., 2013. Assessment of 0.5 T static field exposure effect on yeast and HEK cells using electrorotation. *Biophys. J.* 104, 1805–11. doi:10.1016/j.bpj.2013.01.063
- Ermolina, I., Morgan, H., 2005. The electrokinetic properties of latex particles: comparison of electrophoresis and dielectrophoresis. *J. Colloid Interface Sci.* 285, 419–28. doi:10.1016/j.jcis.2004.11.003
- Falokun, C. D., & Markx, G. H. (2007). Electrorotation of beads of immobilized cells. *Journal of electrostatics*, 65(7), 475-482.
- Gascoyne, P., Pethig, R., Satayavivad, J., Becker, F. F., & Ruchirawat, M. (1997). Dielectrophoretic detection of changes in erythrocyte membranes following malarial infection. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1323(2), 240-252
- Gascoyne, P. R., & Vykoukal, J. V. (2004). Dielectrophoresis-based sample handling in general-purpose programmable diagnostic instruments. *Proceedings of the IEEE*, 92(1), 22-42.
- Goater, A. D., & Pethig, R. (1999). Electrorotation and dielectrophoresis. *Parasitology*, 117(07), 177-189.
- Green, N.G., Morgan, H., 1999. Dielectrophoresis of Submicrometer Latex Spheres. 1. Experimental Results. *J. Phys. Chem. B* 103, 41–50. doi:10.1021/jp9829849
- Huang, Y., & Pethig, R. (1991). Electrode design for negative dielectrophoresis. *Measurement Science and Technology*, 2(12), 1142.

- Hughes, M.P., Green, N.G., 2002. The influence of stern layer conductance on the dielectrophoretic behavior of latex nanospheres. *J. Colloid Interface Sci.* 250, 266–8. doi:10.1006/jcis.2002.8324
- Hughes, M., Morgan, H., Flynn, M., 1999. The Dielectrophoretic Behavior of Submicron Latex Spheres: Influence of Surface Conductance. *J. Colloid Interface Sci.* 220, 454–457. doi:10.1006/jcis.1999.6542
- Irimajiri, A., Hanai, T., Inouye, A., 1979. A dielectric theory of “multi-stratified shell” model with its application to a lymphoma cell. *J. Theor. Biol.* 78, 251–269.
- Ivanov, V. B., Behnisch, J., Holländer, A., Mehdorn, F., & Zimmermann, H. (1996). Determination of Functional Groups on Polymer Surfaces Using Fluorescence Labelling. *Surface and interface analysis*, 24(4), 257-262.
- Janolino, V. G., & Swaisgood, H. E. (1992). A spectrophotometric assay for solid phase primary amino groups. *Applied biochemistry and biotechnology*, 36(2), 81-85.
- Jones, T. B., & Jones, T. B. (2005). *Electromechanics of particles*. Cambridge University Press
- Lyklema, J. (2005). *Fundamentals of interface and colloid science: soft colloids*(Vol. 5). Academic press.
- Markx, G. H., & Davey, C. L. (1999). The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology*, 25(3), 161-171.
- Mittal, M., Lele, P.P., Kaler, E.W., Furst, E.M., 2008. Polarization and interactions of colloidal particles in ac electric fields. *J. Chem. Phys.* 129, 064513. doi:10.1063/1.2969103
- Nissen, K. E., Stuart, B. H., Stevens, M. G., & Baker, A. T. (2008). Characterization of aminated poly (ethylene terephthalate) surfaces for biomedical applications. *Journal of applied polymer science*, 107(4), 2394-2403.
- Noel, S., Liberelle, B., Robitaille, L., De Crescenzo, G., 2011. Quantification of primary amine groups available for subsequent biofunctionalization of polymer surfaces. *Bioconjug. Chem.* 22, 1690–9. doi:10.1021/bc200259c
- Ramos, A., Morgan, H., Green, N. G., & Castellanos, A. (1998). AC electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 31(18), 2338.
- Suzuki, M., Yasukawa, T., Mase, Y., Oyamatsu, D., Shiku, H., Matsue, T., 2004. Dielectrophoretic Micropatterning with Microparticle Monolayers Covalently Linked to Glass Surfaces. *Scanning* 11005–11011.
- Talman, R. Y., & Atun, G. (2006). Effects of cationic and anionic surfactants on the adsorption of toluidine blue onto fly ash. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 281(1), 15-22.
- Tiraferrri, A., & Elimelech, M. (2012). Direct quantification of negatively charged functional groups on membrane surfaces. *Journal of Membrane Science*, 389, 499-508.
- Xia, Y., Gates, B., Yin, Y., & Lu, Y. (2000). Monodispersed colloidal spheres: old materials with new applications. *Advanced Materials*, 12(10), 693-713.

- Yu, D. G., Lin, W. C., & Yang, M. C. (2007). Surface modification of poly (L-lactic acid) membrane via layer-by-layer assembly of silver nanoparticle-embedded polyelectrolyte multilayer. *Bioconjugate chemistry*, 18(5), 1521-1529.
- Zemljič, L. F., Strnad, S., Šauperl, O., & Stana-Kleinschek, K. (2009). Characterization of amino groups for cotton fibers coated with chitosan. *Textile Research Journal*, 79(3), 219-226.
- Zhang, Z., Pfefferle, L., & Haller, G. L. (2014). Comparing characterization of functionalized multi-walled carbon nanotubes by potentiometric proton titration, NEXAFS, and XPS. *Chinese Journal of Catalysis*, 35(6), 856-863.
- Zheng, M. (2012). *Conception et développement d'une cathode utilisant la laccase de Trametes versicolor* (Doctoral dissertation, Université Pierre et Marie Curie-Paris VI).
- Yang, J., Huang, Y., Wang, X., Wang, X. B., Becker, F. F., & Gascoyne, P. R. (1999). Dielectric properties of human leukocyte subpopulations determined by electrorotation as a cell separation criterion. *Biophysical Journal*, 76(6), 3307-3314.
- Zimmermann, D., Kiesel, M., Terpitz, U., Zhou, a, Reuss, R., Kraus, J., Schenk, W. a, Bamberg, E., Sukhorukov, V.L., 2008. A combined patch-clamp and electrorotation study of the voltage- and frequency-dependent membrane capacitance caused by structurally dissimilar lipophilic anions. *J. Membr. Biol.* 221, 107–21. doi:10.1007/s00232-007-9090-4



# Chapitre 3

## Microfabrication des systèmes d'assemblage

1. Introduction .....	88
2. Microstructuration d'une fine couche de PDMS .....	91
<b>2.1. Le PDMS</b> .....	91
<b>2.1.1. Modification des propriétés de surface du PDMS</b> .....	91
<b>2.2. Techniques de structuration d'une fine couche de PDMS</b> .....	93
<b>2.2.1. Structuration du PDMS photosensible</b> .....	93
<b>2.2.2. Structuration du PDMS natif</b> .....	94
<b>2.2.2.1. La technique de « Blade scratching »</b> .....	94
<b>2.2.2.2. Structuration du PDMS en utilisant une fine membrane sacrificielle</b> .....	94
<b>2.2.2.3. Structuration du PDMS par effet pyroélectrique</b> .....	95
<b>2.2.2.4. Bond detach lithography</b> .....	95
<b>2.3. Approche innovante de structuration du PDMS</b> .....	96
<b>2.3.1. Protocole</b> .....	96
3. Réseau d'électrodes bipolaires verticales .....	103
<b>3.1. Simulation du champ électrique dans le microsystème d'électrodes verticales</b> .....	104
<b>3.2. Assemblage de cellules par DEP</b> .....	105
<b>3.3. Intégration d'un canal microfluidique dans le dispositif d'électrodes verticales</b> .....	106
4. Réseau d'électrodes quadripolaires .....	107
<b>4.1. Protocole de fabrication des électrodes quadripolaires</b> .....	109
<b>4.1.1. Fabrication des électrodes d'ITO bipolaires</b> .....	109
<b>4.1.2. Transition des électrodes bipolaires vers quadripolaires</b> .....	110
<b>4.2. Caractérisation du pouvoir isolant de la fine couche de PDMS</b> .....	111
<b>4.3. Détermination des paramètres d'assemblage diélectrophorétique</b> .....	112
<b>4.3.1. Détermination de la fréquence optimale</b> .....	113
<b>4.3.2. Détermination de la tension électrique optimale</b> .....	113
<b>4.4. Calcul de la force diélectrophorétique (<math>F_{DEP}</math>)</b> .....	115
<b>4.5. Assemblage des particules en polystyrène 3<math>\mu</math>m (COOH)</b> .....	115
5. Conclusion .....	117
Références .....	118

Dans ce chapitre, nous présentons la conception et la réalisation des microsystèmes que nous avons développés pour l'assemblage diélectrophorétique des cellules et des particules. Nous commencerons par une brève introduction sur les configurations d'électrodes répertoriées dans la littérature. Puis deux grands volets seront abordés : le premier sera dédié à la description d'une nouvelle approche de structuration de fines couches de PDMS inspirée de la *Bond-detach lithography*. Une brève comparaison avec les techniques de la littérature sera également présentée. Le second volet portera sur la conception et la réalisation de dispositifs intégrant des électrodes verticales (« top-bottom ») et quadripolaires, à partir de la technique de structuration de membranes en PDMS mise au point.

Des simulations du champ électrique généré dans les microsystèmes seront aussi présentées. Pour finir, nous validerons le fonctionnement des dispositifs fabriqués par des tests préliminaires de manipulation de microparticules et de cellules.

### 1. Introduction

De nombreux exemples de microsystèmes visant l'assemblage de micro-objets par diélectrophorèse sont décrits dans la littérature. Ces microsystèmes ont pu être développés grâce aux avancées remarquables de la microfabrication. En effet, c'est la possibilité de fabriquer des électrodes avec des géométries variées et des dimensions réduites, de l'ordre du micromètre, générant des champs électriques de forte intensité à partir de faibles tensions, qui a permis l'essor de la diélectrophorèse.

D'après la littérature, il apparaît que différentes configurations d'électrodes sont utilisées dans les dispositifs de manipulation diélectrophorétique. Quelques exemples de configurations d'électrodes sont présentés dans la figure 3.1. Parmi ces configurations, on trouve les électrodes planes qui peuvent être parallèles (Yang et al., 2006), interdigitées (Qiu et al., 2002), en quinconce (Crews et al., 2007), polynomiales (Morgan et al., 1999) inclinées (Kralj et al., 2006) ou courbées (Han et al., 2009) (Figure 3.1.A). Ces électrodes planes sont le plus souvent utilisées pour réaliser plusieurs assemblages de particules ou de cellules (un réseau d'assemblages) sur une large surface. Elles sont également obtenues à l'issue d'un procédé de fabrication simple intégrant une étape de photolithographie suivie d'un lift-off ou de gravure afin de structurer une couche conductrice déposée sur un substrat de verre ou de silicium.

Les électrodes quadripolaires constituent une autre configuration d'électrodes planes, le plus souvent utilisées dans le cadre de la caractérisation électrique des particules ou des cellules par électrorotation (Arnold et al., 1987 ; Hughes 1998 ; Jones et al., 1991). Elles sont cependant rarement utilisées à des fins d'assemblage sur de larges surfaces, dans la mesure où la fabrication d'un réseau d'électrodes quadripolaires s'avère complexe et nécessite plusieurs étapes de photolithographie (Frénéa et al., 2003) (Figure 3.1.E). Il existe toutefois un intérêt à utiliser les électrodes quadripolaires pour l'assemblage en réseau. En effet, cette configuration d'électrodes permet une distribution optimale de l'intensité du champ électrique appliqué avec une bonne séparation entre les zones de champ minimum et maximum. Ceci offre une cartographie optimale du champ électrique pour focaliser et assembler les particules par diélectrophorèse négative. Ainsi, une simplification du processus de fabrication d'un réseau d'électrodes quadripolaires permettrait d'élargir le champ d'applications de cette configuration d'électrodes à l'assemblage par diélectrophorèse des cellules et des particules.

Pour toutes ces configurations d'électrodes, les électrodes sont coplanaires. Ceci rend la distribution spatiale du champ électrique dans la solution sensible à la distance aux électrodes, ce dernier s'atténuant avec l'éloignement des électrodes.

Dans le but d'améliorer la distribution du champ électrique dans les microsystèmes de manipulation, des équipes de recherche ont développé de nouvelles configurations d'électrodes dites « verticales ». Ces dernières sont obtenues en mettant en vis-à-vis des électrodes planes de manière à obtenir des paires d'électrodes alignées verticalement. Différentes configurations d'électrodes verticales ont été développées, telles que les paires d'électrodes planes superposées ou électrodes 3D (Figure 3.1.B,F-G ) (Yamamoto et al., 2012) ou la mise en vis-à-vis de deux plaques conductrices structurées avec une couche isolante, appelées aussi électrodes bipolaires verticales (Albrecht et al., 2006 ; Abdallat et al., 2013 ). (Figure 3.1.B,H-I).

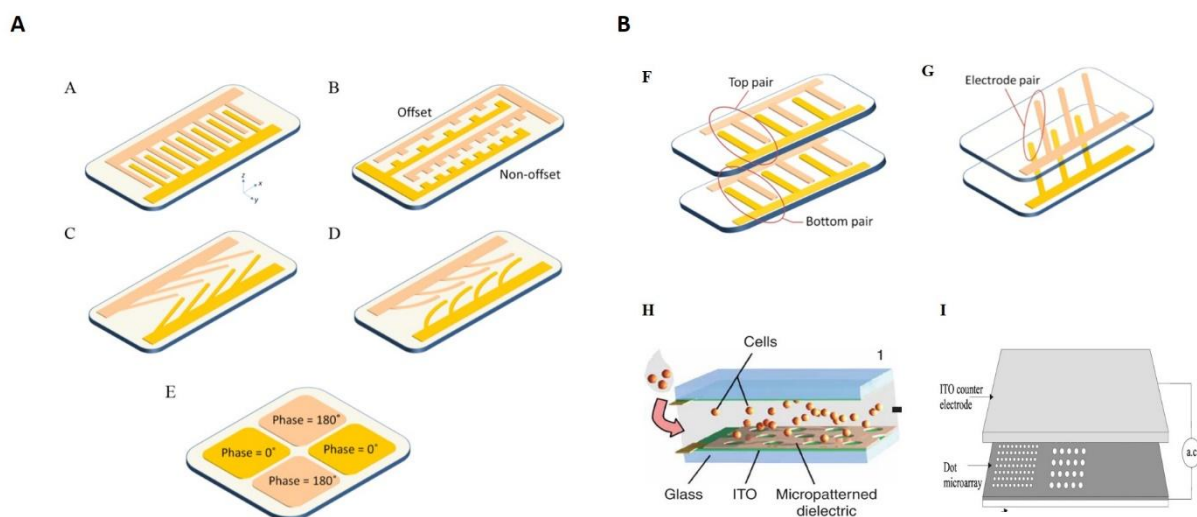


Figure 3.1 Différentes configurations d'électrodes. A) Electrodes planes. a. interdigitées, b. en quiconque, c. inclinées, d. courbées, e. quadripolaires (Khoshmanesh et al., 2011). B) Electrodes verticales F-G) électrodes planes superposées 3D (Khoshmanesh et al., 2011). H-I) superposition de substrats conducteurs structurés avec une couche isolante (bipolaires verticales) (Albrecht et al., 2006 ; Abdallat et al., 2013 ).

Dans le cadre de nos travaux de thèse, nous avons voulu réaliser des dispositifs transparents, simples à fabriquer, peu onéreux et performants, qui nous permettraient de réaliser des assemblages de particules ou de cellules contrôlés en termes de forme et de localisation spatiale. Afin de répondre à ce besoin, nous nous sommes intéressés à deux types de configurations d'électrodes : quadripolaires et bipolaires verticales.

Parmi les différentes méthodes de fabrication d'électrodes bipolaires verticales décrites dans la littérature, celles qui nous ont paru les plus simples sont celles employées par le groupe d'Albrecht et le groupe d'Abdallat.

La méthode de fabrication utilisée par Albrecht et son équipe consiste à effectuer des ouvertures par photolithographie sur une fine couche de résine isolante (Su-8) préalablement étalée sur une surface conductrice (ITO) (Figure 3.1.B.H). Une deuxième lame d'ITO est déposée par-dessus la première en les séparant par une entretoise qui sert aussi de chambre de remplissage. La fine couche de résine structurée permet de modifier la cartographie du champ électrique entre les deux surfaces conductrices en le rendant non uniforme. Ceci engendre l'apparition d'un gradient de champ électrique qui permet d'attirer et d'assembler des cellules par diélectrophorèse positive (DEPp) au niveau des ouvertures (Albrecht et al., 2006).

Quelques années plus tard, l'équipe de Fatoyinbo et d'Abdallat a présenté une nouvelle méthode de fabrication d'un dispositif constitué d'un ensemble d'électrodes verticales, appelé « Dot electrode micro-array » (Fatoyinbo et al., 2008 ; Abdallat et al., 2013). Le principe de cette méthode consiste à structurer sur une première surface des microélectrodes en or par photolithographie et gravure chimique et à déposer au-dessus une lame d'ITO, les deux surfaces étant séparées par un joint. Un champ électrique non uniforme est ainsi généré entre les deux couches conductrices, permettant l'assemblage de particules et de levures par diélectrophorèse négative au centre des ouvertures (dots) formées dans l'or (DEPn) (Figure 3.1.B,H-I).

Ces deux méthodes de fabrication d'électrodes verticales sont relativement simples à mettre en œuvre. La fabrication des « Dot electrodes micro-array » requiert tout de même une étape de photolithographie et de gravure d'un métal. L'approche présentée par l'équipe Albrecht est plus simple à réaliser mais repose sur l'utilisation de la résine SU8 qui ne résiste pas aux étapes de nettoyage avec des solvants classiques tels que l'isopropanol et l'acétone.

Afin de s'affranchir de ces inconvénients, nous avons développé une nouvelle méthode de réalisation de réseaux d'électrodes verticales, simple, peu coûteuse et ne nécessitant pas de manipulation en salle blanche (une simple hotte à flux laminaire peut suffire). Le principe de cette technologie se rapproche de celui d'Albrecht. Dans notre cas, la fine couche de résine est remplacée par une fine couche isolante de PDMS microstructurée. Les ouvertures sont effectuées au niveau de la fine couche de PDMS grâce à la technique de « Bond-detach lithography » développée par le groupe de Thangawng (Thangawng et al., 2007). Cette technique repose sur l'utilisation d'un tampon en PDMS préalablement fabriqué avec des motifs répliquant les ouvertures désirées et qui permet de structurer la fine couche. Grâce à cette approche de microstructuration d'une fine couche de PDMS par « Bond-detach lithography », nous avons pu développer une approche innovante pour la fabrication d'une

puce contenant un réseau d'électrodes quadripolaires ou un réseau d'électrodes verticales. Le détail de la technique mise au point est expliqué dans ce qui suit.

### 2. Microstructuration d'une fine couche de PDMS

#### 2.1. Le PDMS

Le Polydimethylsiloxane (PDMS) est un polymère organo-minéral de la famille des polysiloxanes (Figure 3.2). Il est composé d'une succession de groupements siloxanes (Si-O) dont chaque atome de silicium accueille deux groupements méthyles (-CH<sub>3</sub>) (Brown 1999). Il se présente sous forme d'un liquide visqueux qu'on mélange à un agent réticulant (durcisseur). Après polymérisation thermique, le PDMS présente une structure flexible et fortement hydrophobe. Le PDMS est un polymère de référence utilisé dans différents domaines tels que la fabrication des systèmes micro-electromechaniques (MEMS) (Judy et al., 2001), les dispositifs microfluidiques (Yuen et al., 2011) ainsi que dans la fabrication des biopuces (Sia et al., 2003). C'est un elastomère peu coûteux, transparent (Schneider et al., 2009) et diélectrique présentant une importante résistivité ( $\rho=1,2.10^{14}\Omega .cm$ ).

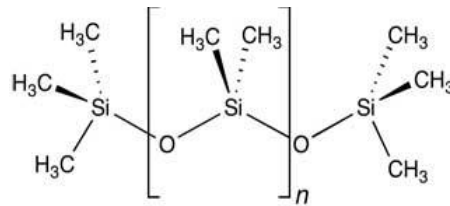


Figure 3.2 Le Polydimethylsiloxane : Structure chimique développée

Le PDMS présente une configuration stable lorsque tous les groupements méthyles de son unité de base sont en position trans (Figure 3.2). L'angle de valence élevé de la liaison Si-O-Si (143°), la distance interatomique Si-O (1.63Å) élevée et l'absence de substituant sur l'atome d'oxygène conduisent à une chaîne flexible et mobile. La flexibilité et la mobilité de la chaîne donnent aux gaz une solubilité et une perméabilité dans le polymère. D'autre part, la présence de groupements apolaires et hydrophobes confère à la chaîne une bonne tenue thermique. Par ailleurs, le PDMS est biocompatible, imperméable à l'eau et non toxique pour les cellules vivantes (Shafiee et al., 2009). Ses propriétés diélectriques ainsi que sa bonne adhésion aux supports en font un matériau de choix pour la microfluidique. Il peut par ailleurs être facilement structuré grâce aux techniques de « soft lithography ».

#### 2.1.1. Modification des propriétés de surface du PDMS

Après polymérisation thermique, le PDMS se transforme en film semi-rigide. Il est possible de modifier ses propriétés de surface par différents traitements tels que la création de groupements Si-OH par traitement plasma ou l'ajout de polyélectrolytes qui enrichissent la surface du PDMS en groupements cationiques, etc.

L'activation de la surface du PDMS en utilisant un traitement plasma à oxygène génère des terminaisons (Si-OH) rendant la surface du PDMS plus hydrophile. Ceci permet ensuite le collage du PDMS à la surface d'autres matériaux (silicium, verre, ...). Ce collage est réalisé de manière covalente et assure ainsi une bonne étanchéité des microdispositifs. Le traitement plasma permet le remplacement d'une partie des groupements méthyles à la surface du PDMS par des groupements hydroxyles (-OH) sous l'action des radicaux oxygénés pour former des silanols (Si-OH) (Figure 3.3). Ainsi, la mise en contact de deux surfaces traitées au plasma à oxygène entraîne la formation de liaisons de type (Si-O-Si) liant les deux surfaces de manière covalente.

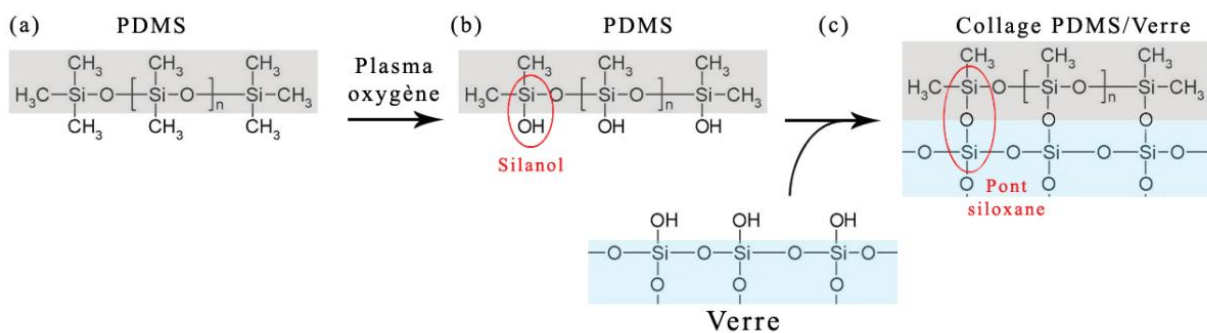


Figure : 3.3 Principe schématique de collage par plasma O<sub>2</sub> entre le PDMS et le verre. Les groupements méthyles CH<sub>3</sub> en surface du PDMS (a) sont remplacés par des groupements hydroxyles (-OH) sous l'effet du plasma oxygène (b). Le traitement de surface permet alors le collage covalent (pont siloxane) de PDMS sur verre (c) (Brun. 2011).

Après le traitement plasma, la surface du PDMS peut présenter une affinité envers certaines des particules ou des cellules manipulées, entraînant des problèmes d'adsorption non spécifique. Il est possible de prévenir l'adsorption non spécifique en traitant la surface du PDMS avec de l'albumine de serum bovin (BSA). En effet, la BSA se fixe au PDMS par interactions électrostatiques et permet de passiver la surface en bloquant les sites d'adsorption non spécifique (Wong et al 2009). Par ailleurs, il est possible de favoriser l'adsorption des particules ou l'adhésion des cellules qui ne présentent pas d'affinité envers les surfaces de PDMS en traitant les surfaces avec des polyélectrolytes chargés. Dans le cas des cellules par exemple, qui ont une charge de surface négative à pH physiologique, leur adhésion à la surface du PDMS est favorisée par la fonctionnalisation des surfaces avec un polyélectrolyte chargé positivement tel que la Poly-lysine (Blattler et al 2006 ; Lee and Voros 2005, Wu,

2009). Ce traitement de surface permet de modifier les charges à la surface du PDMS et d'attirer les cellules par attraction électrostatique.

Toutes ces propriétés expliquent l'intérêt porté à l'utilisation du PDMS dans les procédés de microfabrication et le développement de techniques de patterning pour sa structuration

### 2.2. Techniques de structuration d'une fine couche de PDMS

Plusieurs techniques de structuration d'une fine couche de PDMS ont été développées durant la dernière décennie. Certaines utilisent le PDMS photosensible, pendant que les autres le manipulent sous sa forme native. Les différentes approches sont résumées dans ce qui suit :

#### 2.2.1. Structuration du PDMS photosensible

Les premières approches de structuration consistaient à rendre le PDMS photosensible en le mélangeant à des agents photosensibles, ceci afin de lui conférer des propriétés similaires à celles des résines photosensibles dont la structuration s'effectue par des techniques standards de photolithographie. Par exemple, l'équipe de Lotters en 1997 a réussi à structurer par photolithographie des fines couches de PDMS composite en mélangeant le PDMS à un photoinitiateur chimique, le DMAP (2,2-dimethoxy 2-phenylacetophenon) (Lötters et al., 1997). Quelques années plus tard, les équipes de Bhagat et Jothimuthu, ont proposé une nouvelle recette de PDMS photosensible à base d'un mélange de PDMS et de benzophenone préalablement dissout dans du xylène (Bhagat et al., 2007 ;Jothimuthu et al., 2009). Comme on peut le constater sur la figure 3.4, la structuration du PDMS photosensible par photolithographie ne permet pas d'avoir une bonne résolution des structures désirées et des résidus de PDMS persistent après le développement. Par ailleurs l'utilisation de produits chimiques tels que le xylène peut être néfaste pour la santé des utilisateurs.

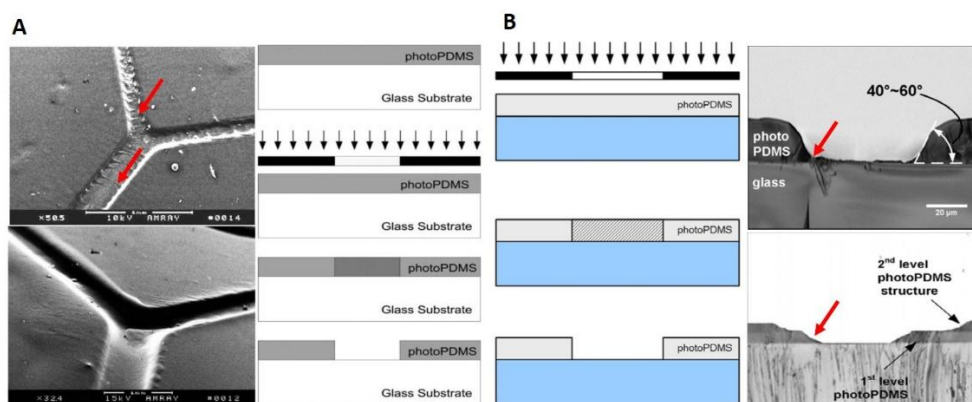


Figure 3.4 Structuration par photolithographie standard de fines couches de PDMS photosensible (A. Bhagat et al., 2007 ; B. Jothimuthu et al., 2009).



### 2.2.2. Structuration du PDMS natif

#### 2.2.2.1. La technique de « Blade scratching »

Cette méthode de structuration consiste à remplir avec du PDMS des motifs d'un moule en résine préalablement fabriqué. Avant l'étape de cuisson et de réticulation, l'excès de PDMS est raclé à l'aide d'une lame, d'où l'appellation « Blade scratching » (Ryu et al., 2004). Cette action mécanique permet de garder le PDMS à l'intérieur des motifs et d'éliminer l'excès (Figure 3.5). Le procédé est simple à mettre en œuvre, mais présente plusieurs inconvénients, parmi lesquels la non uniformité de la surface des motifs obtenus. D'autre part, cette méthode présente une limite en termes d'épaisseur des motifs obtenus. En effet, elle est adaptée à des motifs présentant des épaisseurs de l'ordre du micromètre et plus.

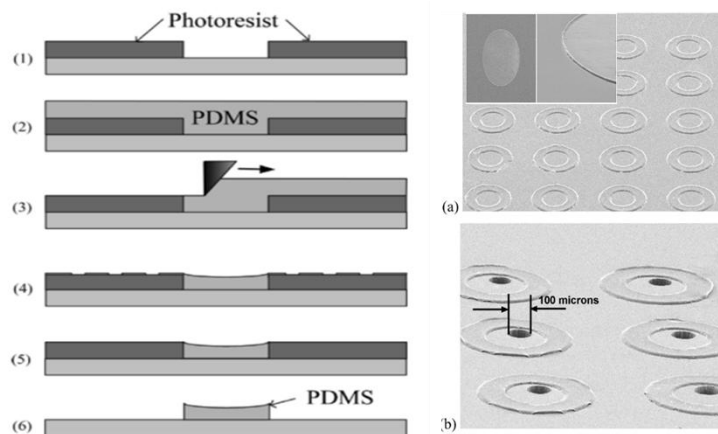


Figure 3.5 : Principe général de structuration de PDMS natif par « Blade scratching » (Ryu et al., 2004)

#### 2.2.2.2. Structuration du PDMS en utilisant une fine membrane sacrificielle

Une nouvelle méthode de structuration du PDMS a été développée par les équipes de Tong et Park (Tong et al., 2008, Park et al., 2009). Le point commun des deux technologies est l'utilisation d'une membrane sacrificielle pour la structuration d'une fine couche de PDMS natif. Tong et son équipe ont utilisé le C-pyralène tandis que l'équipe de Park a utilisé une résine photosensible. Le principe est de réaliser un moule contenant les empreintes des structures désirées. Par la suite un mélange PDMS/réticulant est versé dans le moule. Après réticulation, la fine membrane sacrificielle en C-pyralène ou en résine est éliminée par lift-off, laissant une réplique inversée en PDMS collée au substrat (Figure 3.6). Bien que les surfaces des motifs obtenus soient plates et contrôlées, cette approche est complexe car elle requiert plusieurs étapes de fabrication. De plus, le procédé de Tong est limité à l'obtention de motifs ayant des épaisseurs supérieures à 4  $\mu\text{m}$ .

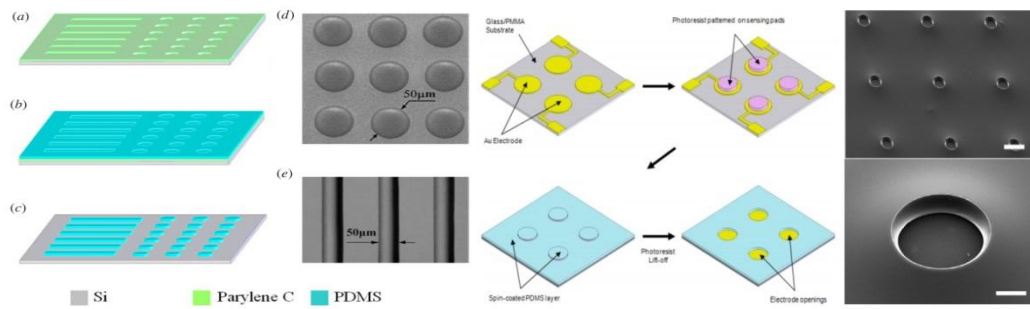


Figure 3.6 : Principe général de la structuration d'une fine couche de PDMS natif utilisant une fine membrane sacrificielle. A) Structuration par lift-off d'une couche de Parylène C (Tong et al., 2008). B) Structuration par lift-off d'une couche de résine photosensible (Park et al., 2009).

### 2.2.2.3. Structuration par effet pyroélectrique

Grilli et son équipe ont développé un procédé original de structuration du PDMS. Ce dernier est basé sur la modulation spatiale de la mouillabilité du substrat de niobate de lithium sous l'effet pyroélectrique (Figure 3.7). Une fine couche de PDMS a été déposée sur un substrat de niobate de lithium puis un traitement thermique a été appliqué au substrat. Ce traitement provoque la réticulation de zones périodiques sur le film de PDMS conduisant à des motifs en PDMS stables et fiables. L'application de ce procédé est limité à l'utilisation de substrats polaires.

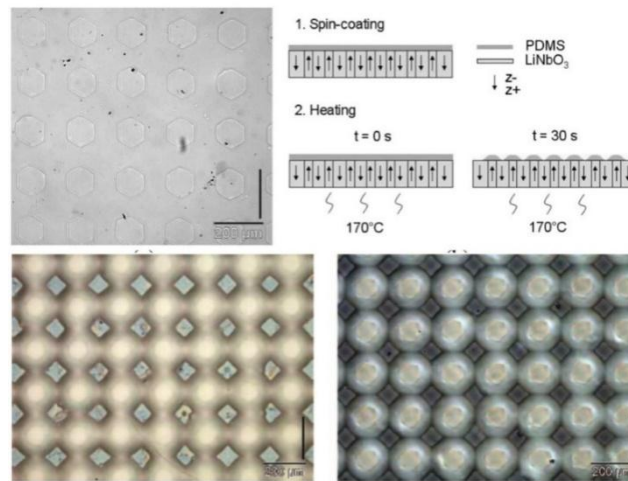


Figure 3.7 : Principe général de structuration d'une fine couche de PDMS par modulation spatiale de la mouillabilité d'un substrat de niobate de lithium sous l'effet pyroélectrique (Grilli et al., 2008)

### 2.2.2.4. Bond-detach lithography

La « bond-detach lithography » s'affranchit des limites des techniques citées précédemment. La méthode consiste à utiliser un tampon en PDMS, pour structurer une fine couche de PDMS préalablement déposée sur un substrat. Après traitement du tampon et de la fine membrane au plasma à oxygène, les surfaces de ces derniers sont mises en contact. Grâce aux ponts

siloxanes créés entre les deux parties, les surfaces se collent de manière irréversible (Figure 3.8). Le décollage du tampon entraîne le détachement des parties de la fine couche collées, laissant des ouvertures dans la membrane de PDMS. Cette technique de structuration d'une fine couche de PDMS a été utilisée sur des substrats opaques et non conducteurs tels que le silicium et le téflon (Thangawng et al., 2007).

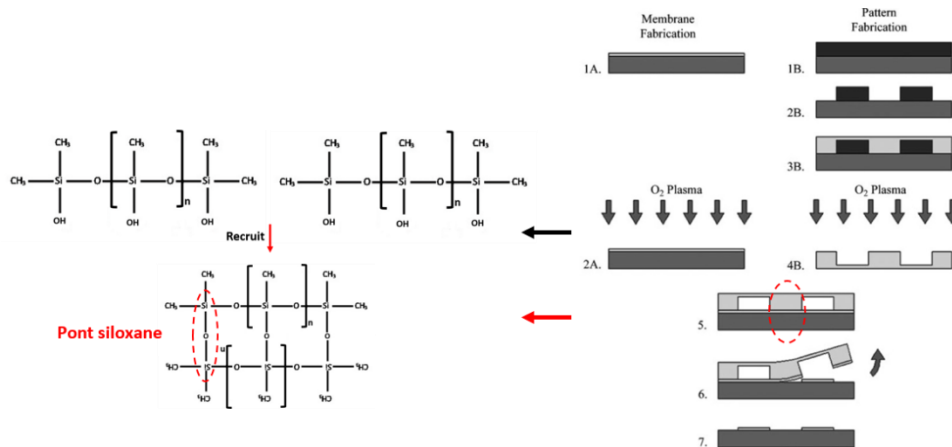


Figure 3.8 : Principe de la technologie « Bond-detach lithography » BDL développée par (Thangawng et al., 2007)

Dans un premier temps, nous avons exploité la technologie développée par Thangawng pour fabriquer des électrodes verticales et un réseau d'électrodes quadripolaires en réalisant des ouvertures sur une fine couche de PDMS préalablement étalée sur une lame d'ITO conductrice. L'application directe du protocole de la « bond-detach lithography » tel qu'il a été décrit par Thangawng n'était pas adaptée aux surfaces d'ITO. Cela est probablement dû aux propriétés de surface de ce matériau. Pour cette raison, des modifications ont été introduites dans le protocole. Le collage plasma a été supprimé et substitué par une autre méthode de collage qui se base sur une fusion entre le tampon et la fine couche de PDMS. Cette fusion est obtenue par un phénomène de diffusion par gradient de concentration de l'agent réticulant à l'interface de collage entre les deux parties.

Nous présentons dans ce qui suit l'approche que nous avons développée ainsi que les principales étapes de fabrication des microsystèmes contenant des réseaux d'électrodes verticales et quadripolaires utilisés lors de nos travaux d'assemblage par diélectrophorèse.

### 2.3.Approche innovante de structuration du PDMS

#### 2.3.1. Protocole

Le principe de notre technologie de structuration de la fine couche de PDMS se divise en trois principales étapes. La première consiste à fabriquer un tampon en PDMS répliquant les

structures des ouvertures qu'on désire obtenir sur la fine couche. La seconde étape est l'étalement d'une fine couche de PDMS sur le substrat. La dernière est le collage du tampon à la fine couche par fusion des deux parties partiellement réticulées et le pelage du tampon qui permet de détacher les parties indésirables.

La réticulation partielle des deux parties (Tampon de PDMS et fine couche) avant le collage, ainsi que la création d'un gradient de réticulant (Crosslinker) entre les deux parties sont les conditions clés de notre procédé (Figure 3.9). Les différentes étapes de ce procédé sont détaillées ci-dessous :

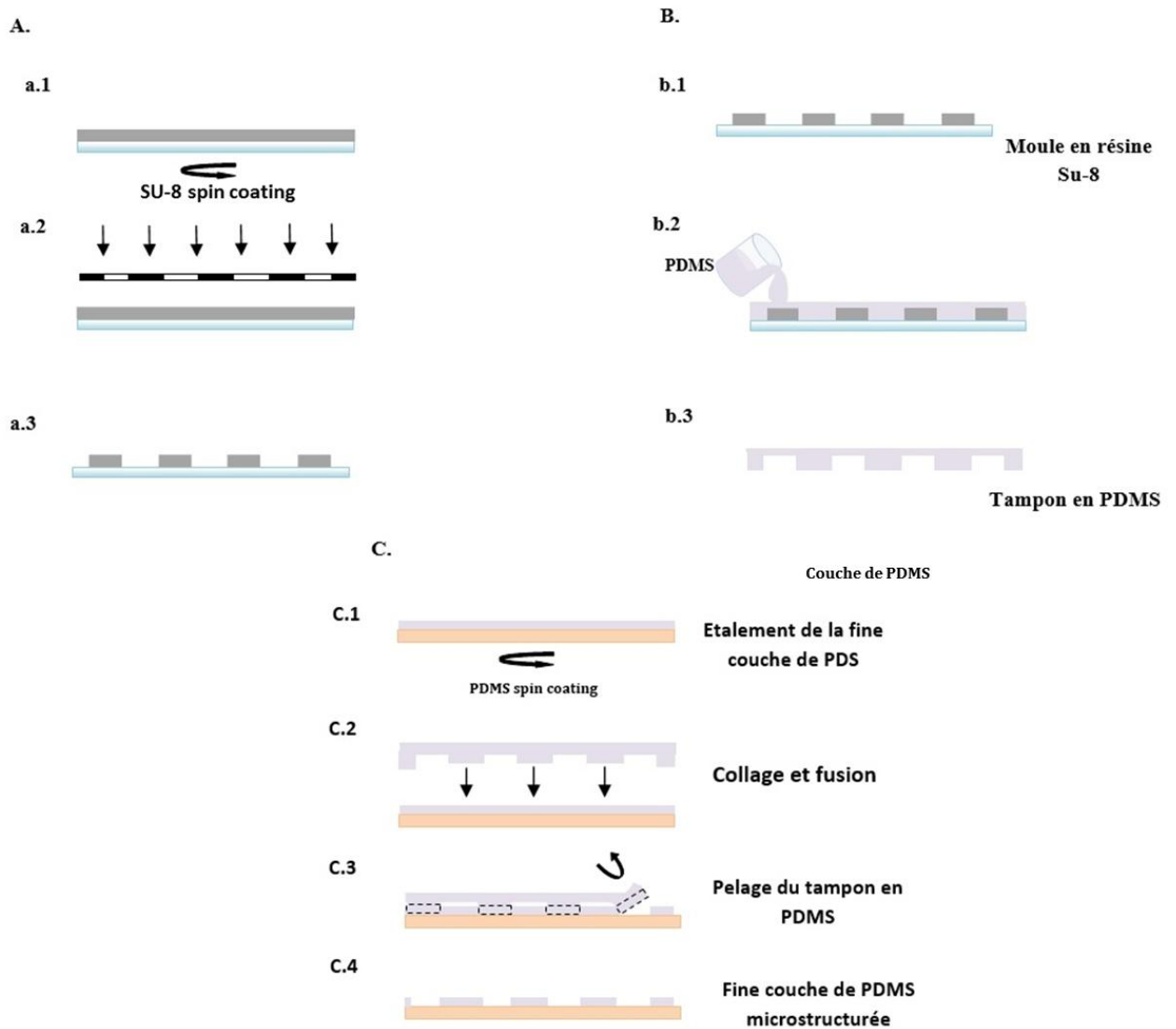


Figure 3. 9 : Etapes détaillées du procédé de structuration d'une fine couche de PDMS

## ❖ Fabrication du moule en résine SU-8 (*Master mold*) (A)

La fabrication du tampon en PDMS nécessite un moule appelé *Master*. Ce dernier est fabriqué à l'aide d'une résine SU-8 photosensible négative. Le procédé de fabrication nécessite une étape de photolithographie et une étape de révélation de la résine (Figure 3.9.A) dont les conditions sont résumées dans le tableau (3.1).

Pour la photolithographie, un masque en plastique est utilisé (Figure 3.9. a2). Les parties insolées restent sur le support après la révélation alors que les zones non insolées se dissolvent dans le révélateur. Cela permet l'obtention d'un moule en résine SU-8 avec des ouvertures (Figure 3.9. a3). Ces moules sont stables dans le temps et sont réutilisables.

PARAMÈTRES		
<b>CONDITIONS D'UTILISATION</b>	<b>Nettoyage</b>	Bains Acétone puis éthanol, séchage (N <sub>2</sub> )
	<b>Dépôt</b>	Etape 1 : 500 rpm/8sec Etape2 : 3000 rpm/60sec
	<b>1<sup>er</sup> recuit</b>	1 min (65°C), 2 min (95°C)
	<b>Insolation UV</b>	10 sec (100% 240 mJ/cm <sup>2</sup> ) masque en plastique
	<b>2<sup>eme</sup> recuit</b>	1 min (65°C), 2 min 30sec (95°C)
	<b>Développement</b>	45 sec dans Propylène glycol methyl ether acetate (PGMEA)

Tableau 3.1 : Protocole de photolithographie de la résine négative SU-8 sur lames ITO

## ❖ Fabrication du Tampon de PDMS (B)

Un mélange de PDMS et d'agent réticulent (10 :1 w/w) (Sylgard 184 Kit Dow Corning) est préparé puis versé sur le master afin d'en former une réplique inversée après sa polymérisation à 80 °C durant 1h (Figure 3.9.B et 3.10). Après cette étape de recuit partiel, les tampons sont démoulés et stockés à 4 °C, afin de ralentir le phénomène de réticulation. C'est l'un des points clés de notre procédé de structuration.

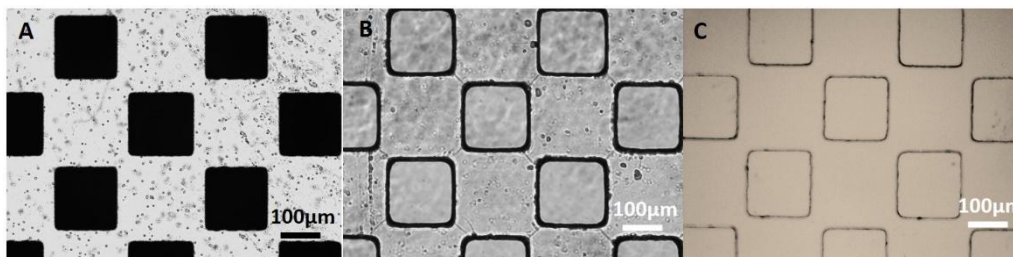


Figure 3.10 : Fabrication du moule en résine SU-8 (*Master mold*) et du tampon de PDMS. A) Masque en plastique. B) moule en SU-8 après révélation. C) Tampon en PDMS apres recuit et démoulage.

### ❖ Structuration de la fine couche de PDMS (C)

- c1) dépôt de la fine couche de PDMS

Le dépôt de la fine membrane de PDMS est réalisé par enduction centrifuge (spin coating) sur le substrat (à 4500 rpm durant 1 min) d'un mélange de PDMS liquide (prépolymère)/agent réticulant (5/1 : w/w) dilué dans l'héptane (1/4 : w/w) (Figure 3.9.c1). Un semi recuit est effectué ensuite à 80 °C pendant 2 min et 30 secondes. Cette cuisson partielle permet d'amorcer le phénomène de réticulation. Le substrat recouvert de PDMS est ensuite stocké à 4 °C afin de ralentir la réticulation. Pour déterminer ces conditions de travail, nous avons étudié l'évolution de l'épaisseur de la fine couche en fonction de plusieurs paramètres expérimentaux. En effet, le contrôle de l'épaisseur de la fine couche de PDMS est très important. Cette épaisseur définit le pouvoir isolant de la couche ainsi que la résolution de la technique de tamponnage.

Cette approche de recouvrement des surfaces par une fine couche de PDMS a été testée dans un premier temps sur un substrat de verre par Sylvain Toru et Mathieu Brun (deux anciens doctorants de l'équipe « Bio-électromagnétisme et Microsystèmes »). Ils ont caractérisé l'épaisseur de la fine couche en fonction de la dilution du mélange PDMS/réticulant dans de l'héptane ainsi que la vitesse de rotation utilisée dans l'enduction centrifuge. Les résultats de ces études sont présentés sur les figures 3.11 et 3.14. Nous avons entrepris les mêmes tests sur des substrats d'ITO et les épaisseurs obtenues sont bien différentes de celles trouvées sur les substrats de verre. Nous avons donc repris l'étude de l'étalement de la fine couche de PDMS sur la surface des substrats d'ITO et de verre en fonction de la dilution PDMS/heptane et pour différentes vitesses de rotation.

- C1(a) Variation des épaisseurs en fonction du ratio PDMS/heptane

Pour étudier la variation de l'épaisseur de la fine couche en fonction du pourcentage de dilution du mélange PDMS/réticulant (5/1 : w/w) dans l'héptane, des solutions à différents pourcentages de dilution (10%, 20%, 30%, et 50%) ont été préparées puis étalées sur des substrats d'ITO. Avant l'étalement de la fine couche de PDMS, les substrats sont nettoyés, séchés puis un bout de film adhésif est collé au bord de chaque substrat. L'étalement est ensuite réalisé par enduction centrifuge à une vitesse de 4500 rpm pendant 1 min. Ces paramètres sont maintenus constants pour cette étude. Après le dépôt, les substrats sont recuits à 80 °C pendant 2 minutes 30 secondes. Une fois refroidi, le film adhésif est décollé, ce qui permet d'avoir une ouverture (partie non recouverte de PDMS) sur le substrat, qui permet de mesurer l'épaisseur de la couche déposée en utilisant un profilomètre (Dektak 3030).

L'expérience a été réalisée trois fois pour chaque dilution et pour chaque type de substrat (verre et ITO).

Pour les deux types de substrats, l'épaisseur augmente quand la dilution du mélange (5 :1 PDMS/réticulant) dans l'heptane diminue. Cependant, l'intervalle de variation de l'épaisseur de la fine couche est très différent entre les deux substrats. Sur le verre, l'épaisseur des fines couches de PDMS est de l'ordre de quelques micromètres [1-6  $\mu\text{m}$ ], tandis que sur l'ITO, pour les mêmes conditions de préparation, les épaisseurs varient dans un intervalle de quelques centaines de nanomètres [100-600nm] (Figure 3.11).

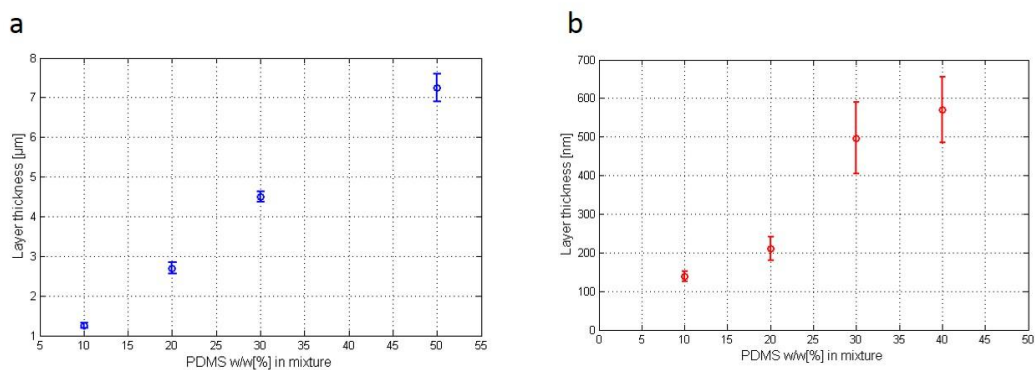


Figure 3.11 : Variation de l'épaisseur de la fine couche de PDMS en fonction du pourcentage de dilution (PDMS/réticulant) dans l'heptane. a) substrat en verre, b) substrat hétérogène (verre+ ITO)

Cette différence d'épaisseur est probablement due à des différences de tensions de surface des substrats utilisés. Afin d'expliquer ce phénomène, une étude de mouillabilité a été réalisée. Nous avons effectué des mesure d'angle de contact à l'eau déionisée sur les trois différentes surfaces (verre, ITO, et fine couche de PDMS). Comme on peut le constater sur la figure 3.12, le PDMS natif (94,3°) et l'ITO (81,43°) présentent un fort caractère hydrophobe, comparé au verre (39,1°)



Figure 3.12 : Images d'angles de contact à l'eau des trois différentes surfaces : A) Substrat en verre, B) surface d'ITO, C) fine couche de PDMS

Cette différence des propriétés de surface expliquerait les résultats d'épaisseur décrits précédemment. En effet, le caractère hydrophobe de l'ITO et du PDMS donne plus d'affinité au PDMS dilué dans l'heptane envers la surface d'ITO. Cette affinité est sensée faciliter



l'étalement du mélange PDMS sur cette surface d'ITO, ce qui permet l'obtention de couches plus fines que celles déposées sur le verre. A cause du caractère relativement hydrophile des surfaces en verre, le mélange a moins d'affinité envers cette surface et l'étalement est plus difficile, ce qui donne des couches plus épaisses (Figure 3.13).

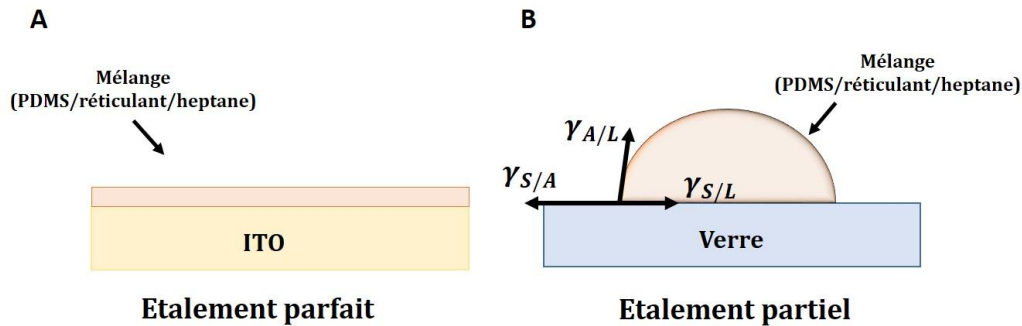


Figure 3.13 : Étalement du mélange PDMS /réticulant/heptane : A) étalement parfait sur l'ITO, B) étalement partiel sur le verre.

- C1(b) Variation des épaisseurs en fonction de la vitesse de rotation

Pour étudier l'effet de la vitesse de rotation de l'enduction centrifuge sur l'épaisseur des fines couches étalées, un mélange PDMS/réticulant (5/1 : w/w) dilué dans l'heptane à 20% (w/w) a été étalé sur des substrats en verre et en ITO à trois différentes vitesses (3000, 4500, 6000 rpm). La préparation des substrats a été réalisée de la même manière que pour l'étude précédente. Après l'étape d'étalement puis de cuisson à 80 °C pendant 2 minutes et 30 secondes, les épaisseurs des fines couches ont été mesurées au profilomètre.

On a pu constater que pour les substrats en verre, la vitesse de rotation avait peu d'effet sur l'épaisseur de la fine couche alors que pour les substrats en ITO, l'effet de la vitesse de rotation est plus visible (Figure 3.14). En augmentant la vitesse de rotation de l'enduction centrifuge sur l'ITO, il a été possible de réduire l'épaisseur de la fine couche de 500 nm à 200 nm (Figure 3.14.b). Toutefois, à partir d'une vitesse de rotation de 4500 rpm, l'épaisseur de la couche ne varie plus. Nous avons donc choisi cette vitesse de rotation pour préparer les couches les plus fines de manière reproductible.



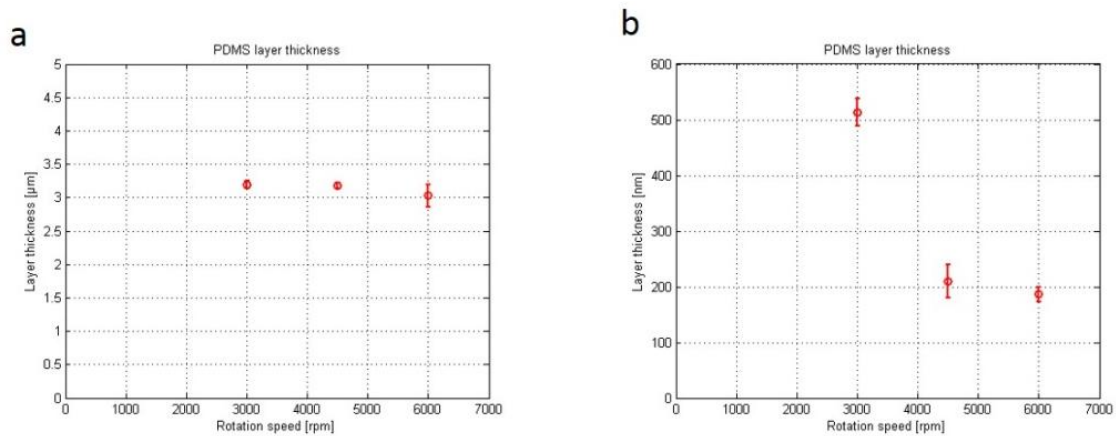


Figure 3.14 : Variation de l'épaisseur de la fine couche de PDMS (20% (PDMS/réticulant) 80%Heptane) en fonction de la vitesse de rotation durant 1min. a) substrat en verre, b) substrat en ITO

Ces mêmes tests ont été réalisés sur un substrat hétérogène constitué d'électrodes en ITO sur un substrat en verre et les résultats obtenus sont identiques à ceux trouvés sur les substrats d'ITO. Ceci nous a permis de conclure que sur une zone où des électrodes en ITO occupent une grande partie de la surface d'un substrat en verre, ce sont les propriétés de surface de l'ITO qui dominant sur celles du verre.

Après étude de l'évolution de l'épaisseur de la fine couche en PDMS sur nos supports, les conditions retenues sont les suivantes : étalement d'un mélange PDMS/réticulant (5/1 : w/w) dilué dans l'heptane avec un rapport massique 1/4 à 4500 rpm durant 1 minute.

- c.2) Alignement du tampon PDMS sur la fine couche et collage par réticulation

Le tampon est déposé sur la fine couche de PDMS recouvrant le substrat (Figure 3.9.c2). L'alignement s'effectue sous binoculaire. Avant de mettre le tampon PDMS en contact avec la fine couche, une goutte d'éthanol est déposée. Celle-ci permet de lubrifier l'interface (tampon/fine couche) et de faciliter le déplacement du tampon à la surface de la fine couche. La pellicule d'éthanol évite également le collage des deux surfaces durant l'alignement. Une fois le tampon aligné, un recuit à 80 °C pendant toute une nuit est réalisé. Cette cuisson permet l'évaporation de l'éthanol ainsi que la reprise de la réticulation à l'interface de contact. Le gradient de réticulant créé entre le tampon (10:1 PDMS/réticulant) et la fine couche (5:1 PDMS/réticulant) permet le passage de l'agent réticulant de la zone où il est le plus concentré (tampon) vers celle où il est le moins concentré (fine couche de PDMS) et sous l'effet de la chaleur les parties en contact fusionnent pour ne former qu'un seul bloc (Figure 3.15). Le collage ne nécessite pas d'appliquer une pression supplémentaire, le poids du tampon est suffisant pour assurer le contact.

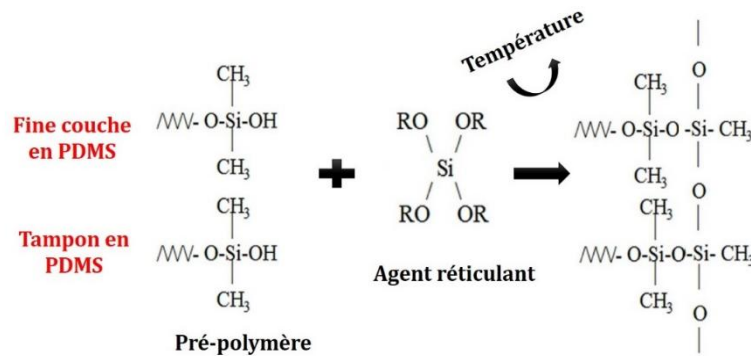


Figure 3.15 : Phénomène de réticulation entre le tampon et la fine couche en PDMS

- c.3) Décollage du tampon et élimination des parties indésirables de la fine couche

Le tampon est décollé du substrat à la main. Cette action mécanique permet d'arracher les parties indésirables de la fine couche de PDMS, ce qui permet de réaliser des ouvertures (Figure 3.9.c3 et c4). Initialement, les motifs carrés sur le tampon de PDMS avaient des dimensions de 150×150 µm. Cependant, les dimensions des ouvertures obtenues sont plus larges. Ceci est probablement dû à la déformation des bords des motifs du tampon lors de la fusion des deux parties. Ce même phénomène a été observé par le groupe de Thangawng.

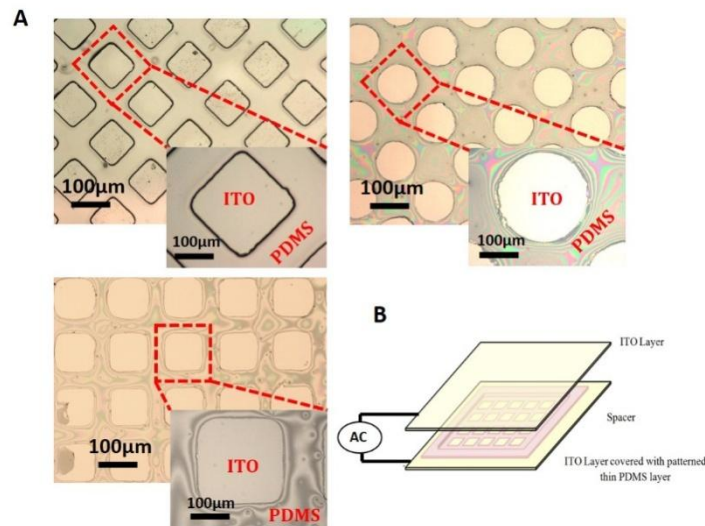
Nous avons utilisé cette technologie de structuration de fines couches en PDMS pour la fabrication des microsystemes dédiés à la manipulation par diélectrophorèse. Nous présentons dans ce qui suit les étapes de fabrication des microsystemes constitués de réseaux d'électrodes verticales et quadripolaires. Des simulations de cartographie de champ électrique pour chaque dispositif seront également présentées. Enfin, le potentiel d'utilisation de ces microsystemes pour des expériences d'assemblage par diélectrophorese négative et/ou positive de particules et de cellules sera démontré.

### 3. Réseau d'électrodes bipolaires verticales

Nous avons utilisé la technologie de structuration des fines couches en PDMS pour réaliser un microsysteme constitué d'électrodes verticales. Les électrodes sont fabriquées à partir d'un substrat d'ITO<sup>6</sup> (indium Tin Oxyde). Les substrats utilisés sont des lames de verre uniformément recouvertes d'ITO (25 mm × 25 mm × 1.1 mm substrat en verre, 120-160nm épaisseur ITO, 8-12 Ω/carré, Sigma Aldrich, France). Le procédé consiste à étaler une fine couche de PDMS sur une première lame d'ITO puis à réaliser des ouvertures par tamponnage. Différents motifs de tampons ont été utilisés pour la réalisation de ces ouvertures (Figure

<sup>6</sup> L'ITO (Indium Tin Oxide) est un oxyde conducteur transparent composé de In<sub>2</sub>O<sub>3</sub> et SnO<sub>2</sub>

3.16). Au-dessus de cette première lame, une deuxième lame d'ITO exempte de fine couche est posée en plaçant un joint en PDMS entre les deux lames pour former une chambre de remplissage permettant de contenir les solutions de particules ou de cellules (Figure 3.16.B).



### 3.1.Simulation des champs électriques obtenus dans les microsystemes d'électrodes verticales

Afin de vérifier la cartographie du champ électrique dans les dispositifs réalisés et de situer les zones d'intensité de champ maximale et minimale, des simulations ont été réalisées en utilisant le module AC/DC du logiciel Comsol Multiphysics 4.3b (Comsol Multiphysics®). Les simulations par éléments finis 3D ont été réalisées sur une portion de  $250 \mu\text{m} \times 250 \mu\text{m}$  du dispositif contenant des ouvertures carrées ( $150 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$ ), en tenant compte de la présence d'eau au-dessus. La distance centre à centre entre deux ouvertures voisines est de  $250 \mu\text{m}$ . Pour la définition des conditions aux limites, les symétries du problème sont exploitées et le potentiel est défini au niveau des parties correspondant à l'ITO. Les électrodes sont considérées comme infiniment fines.

Les résultats de simulation de la distribution spatiale de l'intensité du champ électrique sont présentés sur la figure 3.17. On peut constater que la cartographie du champ électrique présente deux zones distinctes. Le bleu foncé représente les zones où l'intensité du champ électrique est minimale. Sur le dispositif, ces zones correspondent aux surfaces d'ITO recouvertes de la fine couche de PDMS. Les surfaces représentées en rouge définissent quant à elles les zones où l'intensité du champ électrique est maximale. Ces zones correspondent aux ouvertures réalisées dans la fine couche et qui donnent accès à la surface de l'ITO. Cette

cartographie du champ électrique nous permet d'avoir une idée sur la localisation des assemblages de particules ou de cellules lorsqu'elles sont manipulées par les forces diélectrophorétiques. A priori, si elles sont soumises à la DEPn, elles devraient se diriger et s'assembler sur les parties recouvertes de PDMS et si elles sont manipulées par DEPP, elles devraient se concentrer au-dessus des ouvertures.

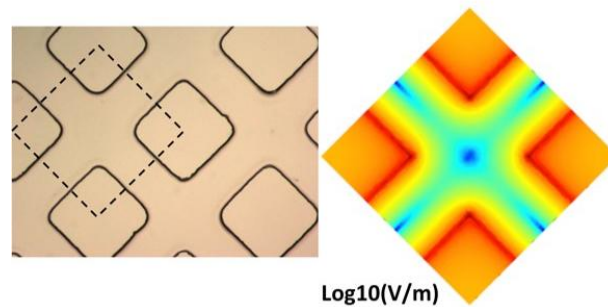


Figure 3.17 Images de la membrane de PDMS structurée sur une surface d'ITO et tracé de l'intensité du champ électrique au niveau de la surface inférieure du dispositif (Voltage appliqué =10 V<sub>pp</sub>, fréquence=10 kHz, hauteur du spacer =800 μm, côté du carré=150 μm, conductivité du milieu  $\sigma_m=50$  mS/m).

Ces résultats théoriques ont été confrontés à des résultats expérimentaux en réalisant des manipulations par diélectrophorèse de cellules dans le dispositif.

### 3.2 Assemblage de cellules par DEP

Afin de démontrer la capacité du dispositif à assembler des cellules par diélectrophorèse, des cellules HEK 293 ont été transférées dans un milieu peu conducteur<sup>7</sup> (milieu contenant du dextrose et du PBS, de conductivité  $\sigma_m=50$  mS/m et d'osmolarité 300 mOsm), puis injectées dans la chambre de remplissage du dispositif. Par la suite, une tension de 10 V<sub>pp</sub> a été appliquée entre les deux lames d'ITO. Dans un premier temps, une fréquence de 10 kHz a été utilisée pour la manipulation des cellules. A cette fréquence, les cellules sont repoussées sur les parties recouvertes de PDMS, ce qui correspond aux zones d'intensité minimum de champ électrique. Par ailleurs, lors de l'augmentation de la fréquence à 250 kHz, le comportement diélectrophorétique des cellules change. Ces dernières sont repoussées sous l'effet de la DEPP vers les ouvertures non recouvertes par le PDMS, là où l'intensité du champ électrique est maximale (Figure 3.18.B).

---

<sup>7</sup> Les détails relatifs aux propriétés et étapes de mise au point des tampons utilisés seront donnés au chapitre suivant.

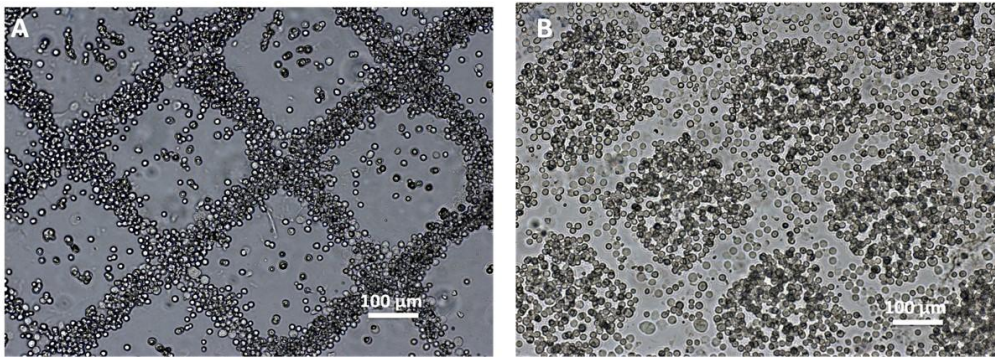


Figure 3.18 Assemblage de cellules HEK 293 par diélectrophorèse dans un milieu contenant du dextrose (50mS/m, 300 mOsm/L) sous l'effet d'un champ électrique non uniforme (tension appliquée : 10Vpp). **A)** DEPn (10 kHz), **B)** DEPP (250 kHz).

Ces résultats expérimentaux sont en bonne concordance avec ceux de la simulation et confirment le bon fonctionnement du dispositif ainsi que le pouvoir isolant de la fine couche de PDMS.

### 3.3. Intégration d'un canal microfluidique entre les électrodes verticales

Afin d'élargir le champ d'applications de nos dispositifs d'électrodes verticales, nous avons cherché à intégrer un canal microfluidique dans ces derniers. Celui-ci permettra d'acheminer vers les zones de manipulation de plus faibles volumes de solutions de cellules ou de particules en flux et de manière contrôlée. Le canal microfluidique est réalisé en plusieurs étapes à travers un procédé de photolithographie représenté sur la Figure 3.19.A.

La première étape consiste à réaliser un moule de 50 µm d'épaisseur et de 1 mm de largeur par photolithographie en utilisant une résine sèche négative (film sec Eternal E 9220, épaisseur 50 µm). Pour cela, le substrat de verre (lame de microscope) est d'abord rincé à l'éthanol puis séché à l'azote. Par la suite, le film de résine est laminé sur le substrat de verre puis insolé aux UV (25 mW/cm<sup>2</sup>) pendant une durée de 5 secondes à travers un masque en plastique portant la géométrie du canal à réaliser. Après recuit (20 secondes à 105 °C), les parties non insolées sont éliminées par un lavage dans une solution de carbonate de sodium (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Les lames sont ensuite rincées à l'eau déionisée puis séchées à l'azote. La seconde étape consiste à couler un mélange PDMS/agent réticulant (10/1 : w/w) sur le moule en résine. Le dépôt de ce mélange est réalisé par induction centrifuge à l'aide d'une tournette à 500 rpm pendant 6 secondes, ceci afin d'obtenir une épaisseur contrôlée pour la couche de PDMS, d'environ 800 µm. En effet, l'épaisseur de cette couche de PDMS est un paramètre important car elle détermine la profondeur du canal microfluidique qui séparera les deux lames d'ITO superposées. Par ailleurs, cette épaisseur impactera aussi l'intensité du champ



électrique appliqué entre ces deux lames. Une fois le canal microfluidique démoulé, un poinçon usiné au laboratoire est utilisé pour ouvrir la partie supérieure du canal au contact de la lame du dessus.

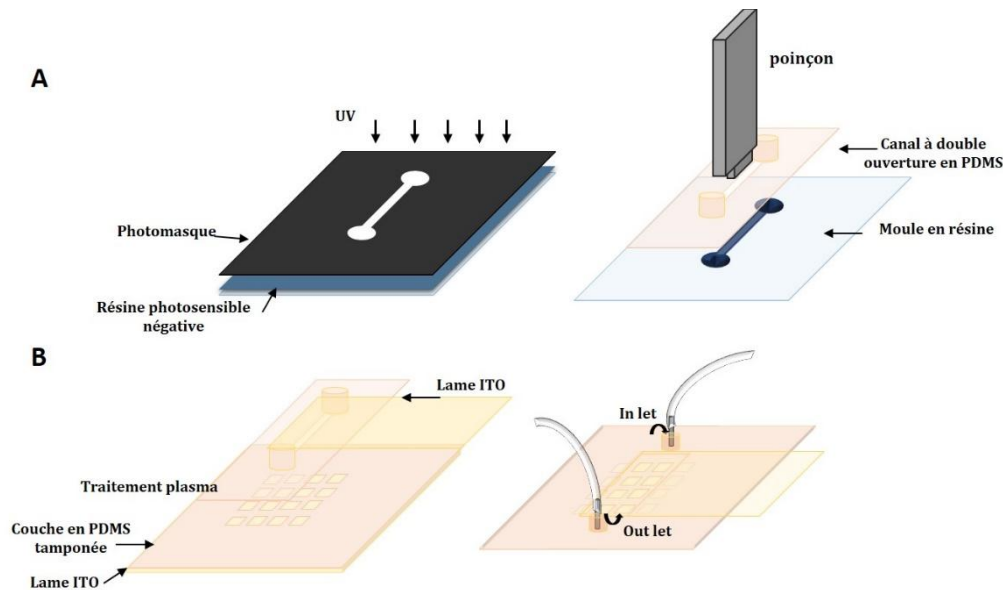


Figure 3.19 Représentation schématique des étapes de fabrication du canal en PDMS

Ainsi, un canal à double ouverture est obtenu et une entrée et sortie à ses extrémités sont percées avec un emporte-pièce. Ceci permet d'insérer par la suite les connectiques microfluidiques qui assureront l'entrée et la sortie des fluides. Par la suite, les trois parties du dispositif (lame ITO recouverte d'une fine couche de PDMS tamponnée, canal à double ouverture et lame d'ITO supérieure) ont été traitées par plasma d'air pendant 2 minutes et 30 secondes. Ce traitement permet de coller les différentes parties entre elles grâce aux ponts siloxanes (Si-O-Si) en plaçant le canal entre les deux lames (Figure 3.19.B).

L'intégration du canal au dispositif s'est avérée simple et réversible grâce à l'utilisation de la fine couche de PDMS qui joue un double rôle. D'une part dans la création des électrodes et d'autre part comme couche d'accroche pour le canal en PDMS. En d'autres termes, il sera possible de décoller le canal et de récupérer les substrats même après un collage au plasma.

#### 4. Réseau d'électrodes quadripolaires

La principale difficulté dans les procédés classiques de fabrication des puces à haute densité d'électrodes quadripolaires est le respect de l'alternance des polarités. Le procédé utilisé pour l'obtention de ce type de puce implique généralement le recours à des techniques d'interconnexion tridimensionnelle conduisant à l'emploi de plusieurs étapes de photolithographie successives. Dans l'exemple de la Figure 3.20, les électrodes sont

alimentées grâce à un réseau de pistes enterrées sous une couche d'isolant (Figure 3.20). La fabrication débute dans un premier temps par la réalisation d'un réseau d'électrodes parallèles interdigitées en utilisant une photolithographie standard. La deuxième étape consiste à déposer une couche d'un matériau isolant. Le  $\text{SiO}_2$  est l'isolant le plus couramment utilisé dans ce procédé mais il peut être substitué par du  $\text{Si}_3\text{N}_4$ . Cette couche d'isolant est déposée soit par pulvérisation cathodique soit par dépôt par vaporisation chimique (CVD) (Fréna et al., 2003 ; Huang et al., 2001). Dans un second temps, des ouvertures sont effectuées dans la couche isolante au-dessus des pistes conductrices. La réalisation de ces ouvertures nécessite une seconde étape de photolithographie suivie d'une gravure humide dans un bain d'attaque chimique comme  $\text{NH}_4\text{F}/\text{HF}$  pour le  $\text{SiO}_2$  (Figure 3.20.B). L'ensemble de la plaque est recouvert ensuite d'une nouvelle couche conductrice. Le métal déposé comble les ouvertures préalablement réalisées et permet d'assurer la connection entre les pistes d'alimentation enterrées sous la couche d'isolant et les électrodes définies après une dernière étape de photolithographie et de gravure (Figure 3.20.A).

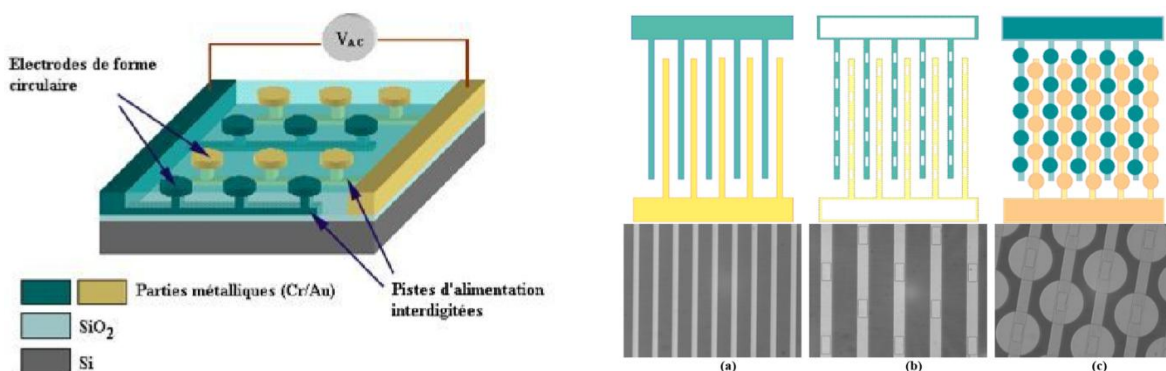


Figure 3.20 A) description schématique d'un microsystème fabriqué en utilisant un process « multicouches » B) Principales étapes de fabrication d'un réseau d'électodes quadripolaires (Frénéa, 2003)

Ce type de procédé de fabrication est long, complexe et implique l'accès à de nombreux équipements de salle blanche.

Afin de s'affranchir de tous ces inconvénients, nous avons développé une nouvelle approche de réalisation de réseaux d'électrodes quadripolaires, simple, peu coûteuse et ne nécessitant pas de manipulations en salle blanche. Cette méthode consiste à réaliser des électrodes quadripolaires en partant d'électrodes bipolaires interdigitées. La transition de la configuration bipolaire vers quadripolaire est réalisée grâce à la fine couche de PDMS microstructurée déposée sur les électrodes bipolaires.

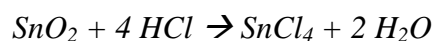
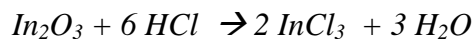
### 4.1. Protocole de fabrication des électrodes quadripolaires

La technologie de fabrication de la puce contenant un réseau d'électrodes quadripolaires compte deux principales étapes : la fabrication d'électrodes interdigitées en quinconce, puis la transition d'un système bipolaire à un système quadripolaire en utilisant une fine couche de PDMS microstructurée

#### 4.1.1. Fabrication d'électrodes interdigitées en quinconce

Les électrodes d'ITO sont fabriquées par photolithographie standard associée à une gravure chimique humide. Afin de graver les électrodes dans l'ITO, la photolithographie est effectuée à l'aide d'une résine SU-8 photosensible (négative). Cette résine sert de couche protectrice durant la gravure chimique humide. Comme il s'agit d'une résine négative, un masque négatif est utilisé (Figure 3.21.A), ce sont donc les parties insolées qui restent après l'étape de révélation (Figure 3.21.B). Durant le procédé, les recuits sont progressifs afin d'éviter les craquelures ainsi qu'une éventuelle détérioration de la résine. Les conditions expérimentales employées dans ce protocole sont résumées dans le tableau 3.1.

Après l'étape de révélation, la gravure humide est réalisée dans un mélange d'acides nitrique et chlorhydrique ( $\text{HNO}_3/\text{HCl}$  1:4 v/v) sous agitation durant 2 minutes et 45 secondes. La solution de gravure attaque les parties d'ITO non protégées par la résine. Les réactions impliquées dans ce procédé de gravure sont les suivantes (Lee et al., 2010) :



Les lames sont ensuite rincées dans de l'eau déionisée puis séchées avec un flux de diazote ( $\text{N}_2$ ). L'étape suivante consiste à dissoudre la résine qui a servi de couche protectrice durant la gravure. Pour ce faire, les lames sont plongées pendant 45 secondes dans un dissolvant (Remover PG, Micro-Chem), puis rincées à l'eau déionisée et séchées au diazote (Figure 3.21.C)



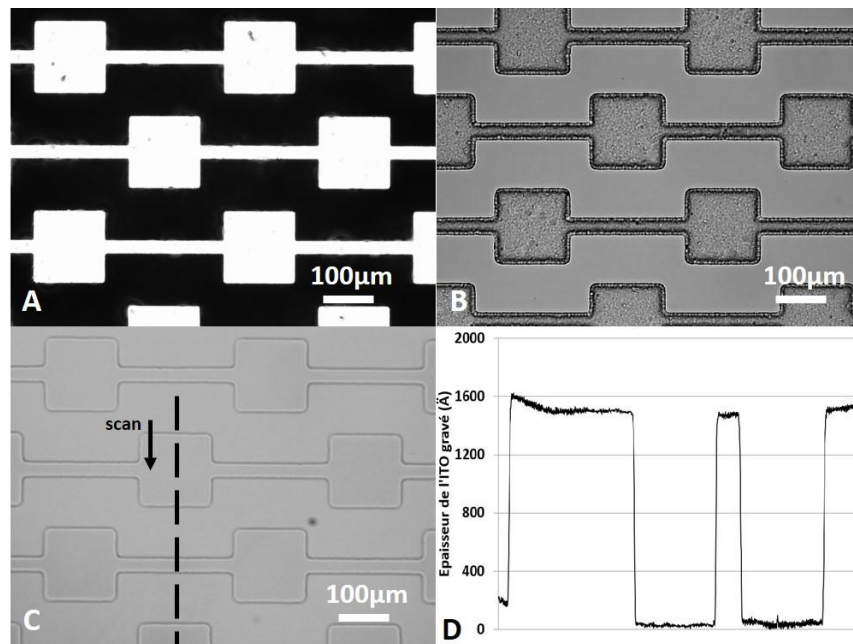


Figure 3.21 Gravure des électrodes d'ITO interdigitées par Photolithographie et gravure chimique humide. A) Masque négatif en plastique, B) pattern de résine SU8 après révélation, C) électrodes ITO interdigitées après gravure humide, D) profil de mesure de l'épaisseur des électrodes obtenues après gravure chimique humide

Une fois la gravure terminée, une mesure de l'épaisseur des électrodes obtenues est effectuée au profilomètre. Le profil présenté dans la figure 3.21. D, montre une épaisseur d'électrode homogène de 150 nm équivalente à l'épaisseur de dépôt d'ITO annoncée par le fournisseur. Nous concluons que l'utilisation de la gravure à l'acide chlorhydrique conduit à des profils de gravure très homogènes.

#### 4.1.2. Transition des électrodes bipolaires vers des électrodes quadripolaires en utilisant une fine couche de PDMS microstructurée

Le procédé de fabrication des réseaux d'électrodes quadripolaires consiste à recouvrir les électrodes en ITO bipolaires fabriquées précédemment, d'une fine couche de PDMS qui joue le rôle de membrane isolante, sur laquelle des ouvertures sont réalisées suivant le protocole décrit à la partie 2.3 de ce chapitre.

En résumé, une fois les électrodes bipolaires fabriquées, une fine couche de PDMS est étalée sur la surface des électrodes. Cette dernière est recuite partiellement. En parallèle, un tampon en PDMS répliquant les motifs carrés des électrodes ITO interdigitées est fabriqué. Ce tampon est aligné au-dessus des électrodes bipolaires recouvertes de la membrane de PDMS (Figure 3.22.c). Après un recuit durant toute une nuit, les parties en contact fusionnent. Le tampon est ensuite retiré manuellement, ce qui permet de former des ouvertures dans le PDMS au niveau des zones carrées. Grâce à ce processus, les zones d'interconnection restent

recouvertes de PDMS isolant, tandis que les carrés d'ITO sont découverts, ce qui permet d'avoir une nouvelle configuration d'électrodes dite «quadripolaire » (Figure 3.22)

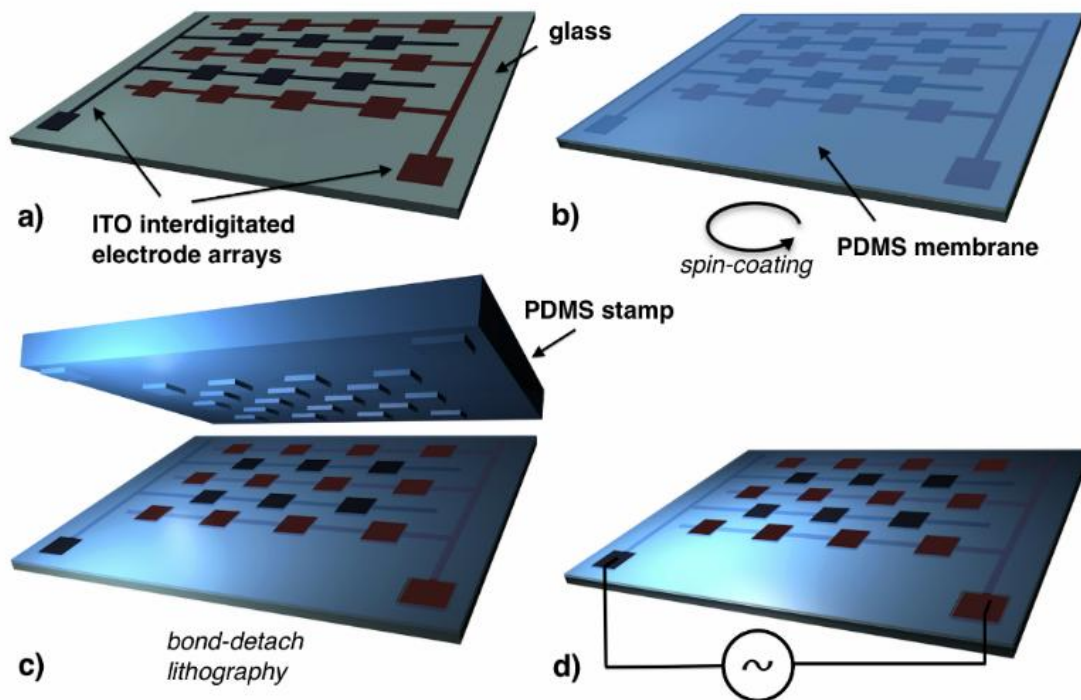


Figure 3.22 Schéma des différentes étapes technologiques de fabrication permettant la transition d'un réseau d'électrodes bipolaires vers un réseau d'électrodes quadripolaires. a) Fabrication des électrodes interdigitées en ITO par gravure humide, b) dépôt de la fine couche de PDMS par spin-coating, c) « bond-detach lithography », d) réseau d'électrodes quadripolaires.

### 4.2. Caractérisation du pouvoir isolant de la fine couche de PDMS

Des simulations de la distribution de l'intensité du champ électrique avant et après dépôt de la fine couche ont été effectuées en utilisant le module AC/DC du logiciel Comsol Multiphysics 4.3b (Comsol Multiphysics®). Les simulations ont été réalisées sur une portion du dispositif ( $800 \mu\text{m} \times 800 \mu\text{m}$ ) contenant des électrodes carrées ( $150 \mu\text{m} \times 150 \mu\text{m}$ ) raccordées entre elles par des interconnexions de  $30 \mu\text{m}$  de largeur. La distance centre à centre entre deux électrodes carrées voisines est de  $400 \mu\text{m}$ . La distribution spatiale de l'intensité du champ électrique est présentée sur la figure 3.23.

- **Avant dépôt de la fine couche de PDMS** (Configuration bipolaire) : On peut constater sur la figure 3.23 (A.a2) que le champ électrique atteint son maximum (zones en rouge) aux bords des électrodes et des interconnexions. Les aires trapézoïdales en bleu correspondent aux zones de champ minimum. C'est donc en ces zones que se rassembleront les particules sous l'effet de la DEPn.

- **Après dépôt de la fine couche de PDMS** (configuration quadripolaire) : Après dépôt de la fine couche, la distribution du champ électrique a été modifiée. Les zones de champ maximum correspondent exclusivement aux bords des électrodes carrées, tandis que les zones d'intensité minimale se situent à présent dans la partie centrale de l'espace inter-électrodes (Figure 3.23, B.b2) avec une nouvelle cartographie de potentiel (Figure 3.23, a3 et b3).

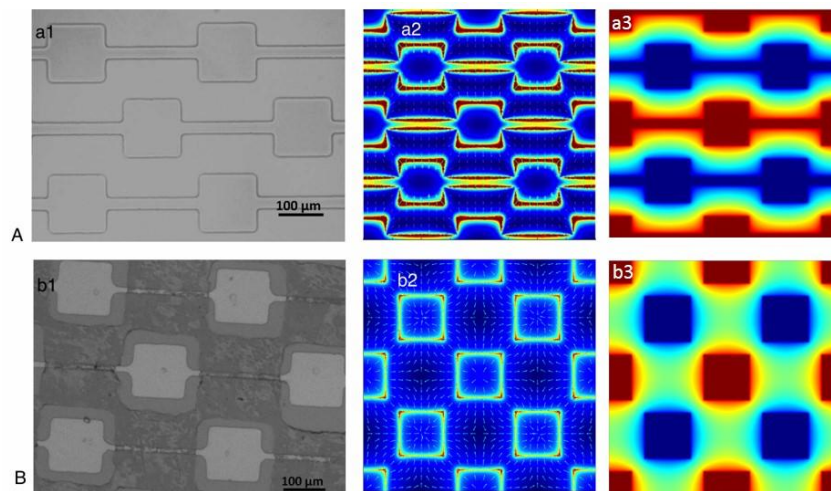


Figure 3.23 Simulation (Comsol) de l'influence de la fine couche structurée de PDMS sur la distribution du champ électrique ainsi que sur la répartition du potentiel.

Ces simulations nous ont permis de montrer qu'il était possible de changer la configuration des électrodes (de bipolaires vers quadripolaires) en utilisant le pouvoir isolant d'une fine couche de PDMS. Afin de confirmer ces résultats théoriques, des tests d'assemblage de particules en polystyrène par diélectrophorèse négative ont été effectués.

### 4.3. Détermination des paramètres d'assemblage diélectrophorétique

Avant de procéder à l'assemblage des particules par DEPn, il est indispensable de déterminer les paramètres diélectrophorétiques à appliquer tels que la fréquence et la tension du signal servant à produire le champ électrique. Le spectre diélectrophorétique (tracé de la variation de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti  $\text{Re}(\text{CM})$  en fonction de la fréquence) nous indique les intervalles de fréquences pour lesquels l'effet dominant est la DEPn ou la DEPP. Selon les propriétés électriques des particules déterminées au chapitre 2 et les conditions d'assemblage choisies (milieu KCl,  $\sigma_m=5.7$  mS/m), nous avons tracé  $\text{Re}(\text{CM})=f(\text{fréquence})$  (Figure 2.17). Dans ces conditions, la partie réelle du facteur CM reste négative et ne change pas de signe : quelle que soit la fréquence choisie dans l'intervalle considéré ( $>10$  kHz), les particules de  $3 \mu\text{m}$  ne seront soumises qu'à la DEPn.

### 4.3.1. Détermination de la fréquence optimale

Afin de choisir la fréquence optimale pour laquelle les particules peuvent former des structures étroitement assemblées dans la solution de KCl, nous avons comparé des assemblages obtenus à différentes fréquences. Un intervalle de fréquences [1-100 kHz] a été balayé pendant que la tension et la conductivité du milieu KCl ont été maintenues constantes ( $10 V_{pp}$ ,  $\sigma_m=5.7$  mS/m). A des fréquences relativement basses [1-5kHz] les particules subissent le phénomène d'électroosmose. Dès l'application du champ électrique, les particules s'amassent au centre des électrodes sous l'effet de vortex créés par l'interaction du champ électrique non uniforme avec les charges de la double couche à la surface des électrodes. La formation d'assemblages par électroosmose est une possibilité, mais à ces fréquences l'électrolyse de l'eau peut provoquer des dégagements gazeux pouvant perturber la stabilité des assemblages ainsi que leur visualisation.

L'application d'une fréquence de 30 kHz engendre le déplacement des particules vers les zones de faible intensité de champ électrique grâce à la force de DEPn. Comme on peut le remarquer sur la figure 3.24, l'assemblage commence dès l'application de la tension et les structures sont formées au bout d'une courte durée (2 min). Cette fréquence semble donc particulièrement adaptée à la formation des agrégats de particules.

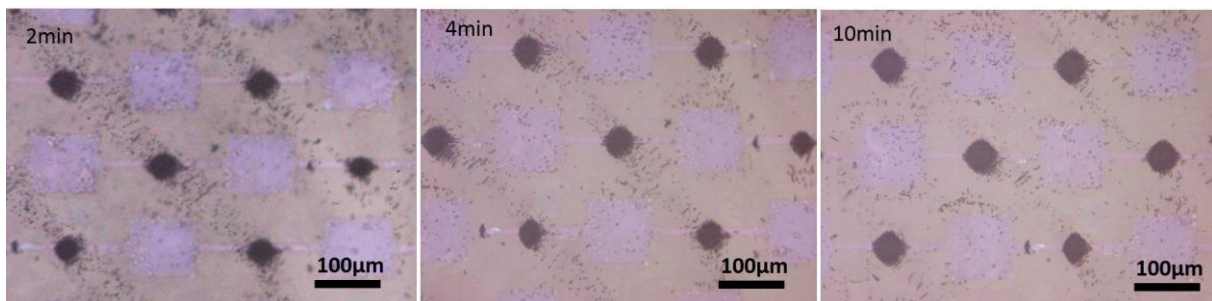


Figure 3.24 Influence du temps d'exposition au champ électrique non uniforme ( $10V_{pp}$  et  $f=30kHz$ ) sur la formation des assemblages de particules de  $3 \mu m$  (COOH) par diélectrophorèse négative dans un milieu KCl ( $\sigma_m = 5.7$  mS/m).

### 4.3.2 Détermination de la tension électrique optimale

Nous avons également cherché à étudier l'effet de la tension électrique appliquée sur la formation des assemblages. L'objectif de cette étude est de déterminer la tension électrique à appliquer pour réaliser des structures de particules fortement assemblées en un temps le plus court possible.

Nous avons donc testé l'influence de la tension appliquée sur la structure finale des assemblages de particules en polystyrène  $3\mu m$  (COOH). Trois valeurs de tension ont été



testées (4, 7 et 10  $V_{pp}$ ), tandis que la fréquence d'assemblage a été maintenue constante ( $f=30$  kHz). Les résultats de ces tests sont présentés figure 3.25. Les comparaisons ont été faites après 2, 4 et 10 min d'assemblage.

A faible tension (4  $V_{pp}$ ) : les assemblages ne commencent à prendre forme qu'au bout de 10 min d'exposition. Cependant, leurs formes restent irrégulières, avec des distances inter-particules importantes. A 7  $V_{pp}$ , au bout de 2 min d'exposition on arrive à obtenir des résultats meilleurs que ceux obtenus à 4  $V_{pp}$  après 10 min d'exposition. Toutefois, les structures ne sont réellement formées qu'après 10 min d'exposition. Sous l'effet d'une tension de 10  $V_{pp}$ , des assemblages bien structurés et étroitement assemblés sont obtenus après moins de 2 minutes d'exposition.

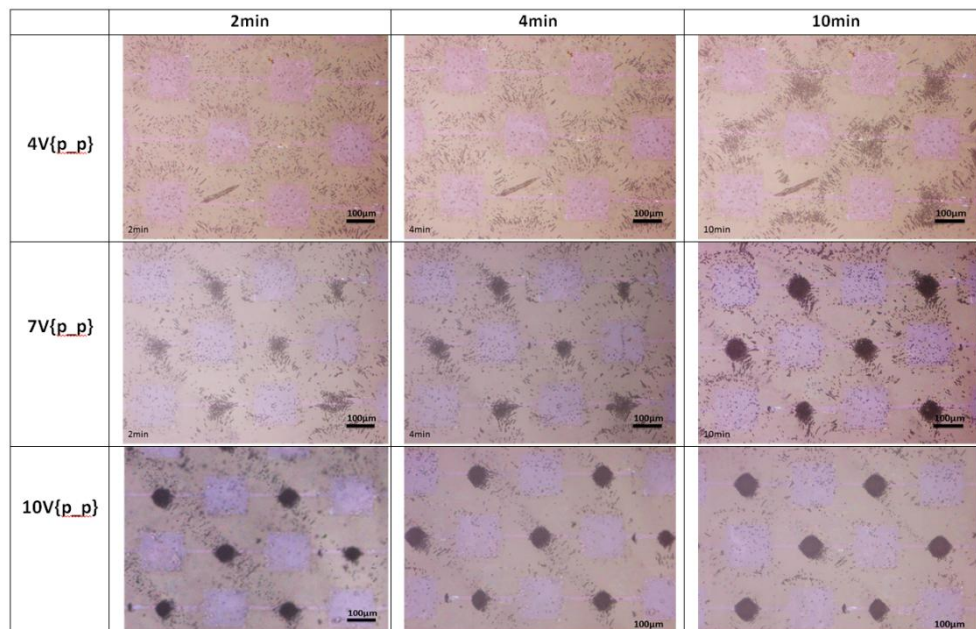


Figure 3.25 Influence de la tension électrique appliquée sur la cinétique de formation des assemblages de particules de 3  $\mu\text{m}$  (COOH) par diélectrophorèse négative dans une solution de KCl ( $\sigma_m=5.7$  mS/m) à 30 kHz

Cette étude de l'influence de la tension et de la fréquence appliquées sur l'assemblage des particules en polystyrène de 3  $\mu\text{m}$  (COOH) par DEPn nous a permis de définir une tension ainsi qu'une fréquence pour l'assemblage de 10  $V_{pp}$  et 30 kHz respectivement.

### 4.4. Calcul de la force diélectrophorétique ( $F_{DEP}$ )

La force diélectrophorétique a été simulée à l'aide de Comsol Multiphysics®, en utilisant la valeur de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti obtenue à 30 kHz (fréquence d'assemblage). L'équation utilisée pour le calcul de la force est l'équation 1.4.

La simulation a été réalisée pour les deux configurations d'électrodes (bipolaires et quadripolaires), à 1.5  $\mu\text{m}$  au-dessus de la surface des électrodes (distance correspondant au rayon d'une particule) et en prenant comme conditions les paramètres suivants :  $V_{pp} = 10\text{ V}$ ,  $f = 30\text{ kHz}$ ,  $\sigma_m = 5.7\text{ mS/m}$ ,  $\sigma_p = 0.56\text{ S/m}$ ,  $\epsilon_m = 78\epsilon_0$ ,  $\epsilon_p = 2.65\epsilon_0$ . Les flèches bleues représentent la direction de la force en chaque point de l'espace. On constate notamment que les particules sont focalisées vers le centre de l'espace inter-électrodes sous l'effet de la DEPn dans le cas des électrodes quadripolaires.

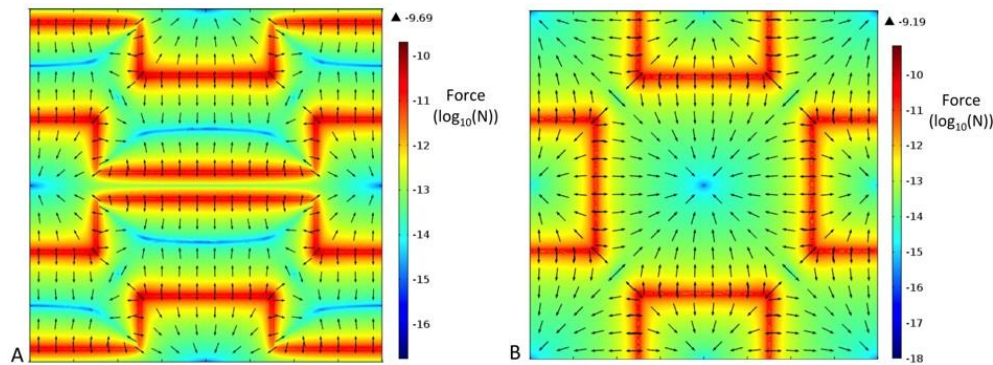


Figure 3.26 Simulation 3D par éléments finis (Comsol Multiphysics®) de la force diélectrophorétique agissant sur les particules en polystyrène de 3  $\mu\text{m}$  (COOH) à 1.5  $\mu\text{m}$  au-dessus des électrodes, ( $V_{pp} = 10\text{V}$ ,  $f = 30\text{ kHz}$ ,  $\sigma_m = 5.7\text{ mS/m}$ ,  $\sigma_p = 0.56\text{ S/m}$ ,  $\epsilon_m = 78\epsilon_0$ ,  $\epsilon_p = 2.65\epsilon_0$ ). A) Configuration bipolaire, B) Configuration quadripolaire.

Une fois les paramètres d'assemblage optimisés et la force diélectrophorétique estimée, nous avons réalisé l'assemblage des particules en polystyrène 3  $\mu\text{m}$  (COOH) par DEPn (10  $V_{pp}$ , 30 kHz) dans la puce avant et après ajout et structuration de la fine couche de PDMS.

### 4.5 Assemblage des particules de 3 $\mu\text{m}$ en polystyrène (COOH)

Comme on peut le constater sur la figure 3.27, en l'absence de fine couche de PDMS, les particules sont assemblées dans les zones trapézoïdales au niveau des espaces inter électrodes (Figure 3.27.A). En présence de la fine couche (Figure 3.27. B), elles sont au contraire repoussées vers les zones de faible intensité de champ, au centre de l'espace inter-électrodes, comme cela a été démontré par les résultats des simulations. Cette nouvelle configuration d'électrodes permet d'avoir des assemblages réguliers, de forme et de taille identiques. Ces résultats expérimentaux sont en parfaite concordance avec les simulations et confirment le

pouvoir isolant de la fine couche de PDMS. Cette dernière permet la transition d'une configuration bipolaire vers une configuration quadripolaire, simplifiant ainsi considérablement la fabrication de larges réseaux d'électrodes quadripolaires.

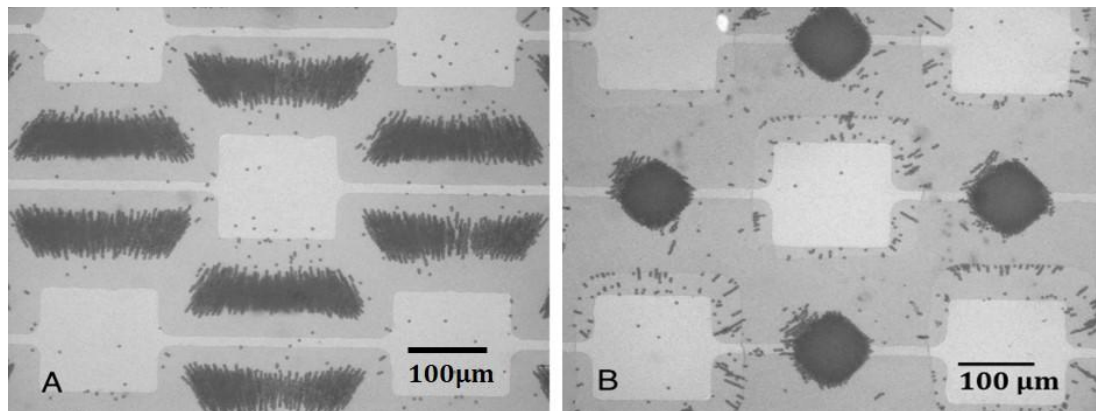


Figure 3.27 : Assemblage de microparticules de taille 3  $\mu\text{m}$  (COOH) en polystyrène par diélectrophorèse négative, A) en absence de PDMS, B) après ajout de la fine couche de PDMS.

### 5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une nouvelle approche, simple à mettre en place et à faible coût, pour la structuration de microélectrodes en utilisant une fine membrane de PDMS. Cette technique repose sur la réalisation d'ouvertures sur un film de PDMS en utilisant un tampon en PDMS. L'approche est inspirée de la méthode de « Bond-Detach lithography ». Elle s'en démarque toutefois dans la mesure où elle n'utilise pas le collage plasma entre le tampon et la fine couche, mais elle exploite la fusion entre deux surfaces de PDMS partiellement réticulées. Cette approche de structuration d'électrodes a été valorisée par son utilisation pour la fabrication d'une part, d'un réseau d'électrodes quadripolaires transparentes et d'autre part, d'un système microfluidique intégrant des électrodes verticales. Nous avons pu entreprendre l'ensemble des étapes de la conception à la fabrication des dispositifs selon des protocoles simples ne nécessitant pas l'accès à une salle blanche.

Nous avons par ailleurs testé ces systèmes et montré qu'ils pouvaient être employés pour la manipulation de cellules et de particules par DEP. Nous pouvons noter que les matériaux employés dans la fabrication de ces dispositifs sont biocompatibles, ce qui rend possible leur utilisation pour des applications biologiques. Au chapitre suivant, nous chercherons à optimiser les assemblages de cellules et de particules obtenus, en cherchant en particulier à les rendre permanents.



### References

- Abdallat', R.G., Tajuddin, A.S.A., Gould, D.H., Hughes, M.P., Fatoyinbo, H.O., Labeed, F.H., 2013. Process development for cell aggregate arrays encapsulated in a synthetic hydrogel using negative dielectrophoresis 1059–1067. doi:10.1002/elps.201200459
- Albrecht, D. R., Underhill, G. H., Wassermann, T. B., Sah, R. L., & Bhatia, S. N. (2006). Probing the role of multicellular organization in three-dimensional microenvironments. *Nature methods*, 3(5), 369-375.
- Arnold, W.M., Schwan, H.P., Zimmermann, U., 1987. Surface Conductance and Other Properties of Latex Particles Measured by Electrorotation. *J. Phys. Chem* 91, 5093–5098.
- Bhagat, A.A.S., Jothimuthu, P., Papautsky, I., 2007. Photodefinable polydimethylsiloxane (PDMS) for rapid lab-on-a-chip prototyping. *Lab Chip* 7, 1192–7. doi:10.1039/b704946c
- Blättler, T. M., Pasche, S., Textor, M., & Griesser, H. J. (2006). High salt stability and protein resistance of poly (L-lysine)-g-poly (ethylene glycol) copolymers covalently immobilized via aldehyde plasma polymer interlayers on inorganic and polymeric substrates. *Langmuir*, 22(13), 5760-5769.
- Brown, R. (Ed.). (1999). *Handbook of polymer testing: physical methods* (Vol. 50). CRC press.
- Crews, N., Darabi, J., Voglewede, P., Guo, F., Bayoumi, A., 2007. An analysis of interdigitated electrode geometry for dielectrophoretic particle transport in micro-fluidics. *Sensors Actuators B Chem.* 125, 672–679. doi:10.1016/j.snb.2007.02.047
- Ermolina, I., Morgan, H., 2005. The electrokinetic properties of latex particles: comparison of electrophoresis and dielectrophoresis. *J. Colloid Interface Sci.* 285, 419–28. doi:10.1016/j.jcis.2004.11.003
- Fatoyinbo, H.O., Broche, L.M., Kai, F., Hughes, M.P., n.d. Quasi-three dimensional “ dot ” electrode micro-array for quantifying dielectrophoretic forces on concentrated biological particles 1–21.
- Frénéa, M., Faure, S.P., Le Pioufle, B., Coquet, P., Fujita, H., 2003. Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis. *Mater. Sci. Eng. C* 23, 597–603. doi:10.1016/S0928-4931(03)00055-9
- Grilli, S., Vespini, V., Ferraro, P., 2008. Surface-charge lithography for direct PDMS micro-patterning. *Langmuir* 24, 13262–5. doi:10.1021/la803046j
- Grilli, S., Ferraro, P., 2008. Dielectrophoretic trapping of suspended particles by selective pyroelectric effect in lithium niobate crystals. *Appl. Phys. Lett.* 92, 232902. doi:10.1063/1.2943319
- Han, K. H., Han, S. I., & Frazier, A. B. (2009). Lateral displacement as a function of particle size using a piecewise curved planar interdigitated electrode array. *Lab on a Chip*, 9(20), 2958-2964.
- Huang, Y., Rubinsky, B., 2001. Microfabricated electroporation chip for single cell membrane permeabilization. *Sensors Actuators A Phys.* 89, 242–249. doi:10.1016/S0924-4247(00)00557-4
- Hughes, M. P. (1998). Computer-aided analysis of conditions for optimizing practical electrorotation. *Physics in medicine and biology*, 43(12), 3639.

- Jones, T. B. (2003). Basic theory of dielectrophoresis and electrorotation. *Engineering in Medicine and Biology Magazine, IEEE*, 22(6), 33-42.
- Jothimuthu, P., Carroll, A., Bhagat, A.A.S., Lin, G., Mark, J.E., Papautsky, I., 2009. Photodefinable PDMS thin films for microfabrication applications. *J. Micromechanics Microengineering* 19, 045024. doi:10.1088/0960-1317/19/4/045024
- Judy, J.W., 2001. Microelectromechanical systems ( MEMS ): fabrication , design and 10, 1115–1134.
- Khoshmanesh, K., Nahavandi, S., Baratchi, S., Mitchell, A., Kalantar-zadeh, K., 2011. Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems. *Biosens. Bioelectron.* 26, 1800–14. doi:10.1016/j.bios.2010.09.022
- Kralj, J. G., Lis, M. T., Schmidt, M. A., & Jensen, K. F. (2006). Continuous dielectrophoretic size-based particle sorting. *Analytical chemistry*, 78(14), 5019-5025.
- Lee, S., & Vörös, J. (2005). An aqueous-based surface modification of poly (dimethylsiloxane) with poly (ethylene glycol) to prevent biofouling. *Langmuir*, 21(25), 11957-11962.
- Lee, K.Y., Shin, H.J., Han, D.C., Son, S., Kim, S.-W., Lee, Y.-S., Lee, D.K., 2010. Fabrication of Transparent Semiconducting Indium Zinc Tin Oxide Thin Films and Its Wet Chemical Etching Characteristics in Hydrochloric Acid. *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* 532, 141/[557]–147/[563]. doi:10.1080/15421406.2010.497060
- Lötters, J. C., Olthuis, W., Veltink, P. H., & Bergveld, P. (1997). The mechanical properties of the rubber elastic polymer polydimethylsiloxane for sensor applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 7(3), 145.
- Morgan, H., Hughes, M. P., & Green, N. G. (1999). Separation of submicron bioparticles by dielectrophoresis. *Biophysical journal*, 77(1), 516-525.
- Oh, J., Hart, R., Capurro, J., Noh, H.M., 2009. Comprehensive analysis of particle motion under non-uniform AC electric fields in a microchannel. *Lab Chip* 9, 62–78. doi:10.1039/b801594e
- Park, J., Kim, H. S., & Han, A. (2009). Micropatterning of poly (dimethylsiloxane) using a photoresist lift-off technique for selective electrical insulation of microelectrode arrays. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 19(6), 065016.
- Qiu, Z., Markarian, N., Khusid, B., & Acrivos, A. (2002). Positive dielectrophoresis and heterogeneous aggregation in high-gradient ac electric fields. *Journal of applied physics*, 92(5), 2829-2843.
- Ryu, K.S., Member, Student, Wang, X., Shaikh, K., Liu, C., Member, Senior, 2004. A Method for Precision Patterning of Silicone Elastomer and Its Applications 13, 568–575.
- Schneider, F.; Draheim, J.; Kamberger, R.; Wallrabe, U. Process and Material Properties of Polydimethylsiloxane (PDMS) for Optical MEMS. *Sensors and Actuators A: Physical* 2009, 151, 95–99.
- Shafiee, H.; Caldwell, J. L.; Sano, M. B.; Davalos, R. V. Contactless Dielectrophoresis: a New Technique for Cell Manipulation. *Biomedical microdevices* 2009, 11, 997–1006.

- Sia, S.K., Whitesides, G.M., 2003. Review Microfluidic devices fabricated in poly ( dimethylsiloxane ) for biological studies 3563–3576. doi:10.1002/elps.200305584
- Thangawng, A.L., Swartz, M. a, Glucksberg, M.R., Ruoff, R.S., 2007. Bond-detach lithography: a method for micro/nanolithography by precision PDMS patterning. *Small* 3, 132–8. doi:10.1002/sml.200500418
- Tong, J., Simmons, C. a, Sun, Y., 2008. Precision patterning of PDMS membranes and applications. *J. Micromechanics Microengineering* 18, 037004. doi:10.1088/0960-1317/18/3/037004
- Wang, Y., Chen, W. P., Cheng, K. C., Chan, H. L. W., & Choy, C. L. (2005). Effect of AC-Powered Water Electrolysis on the Structural and Optical Properties of Indium Tin Oxide Thin Films. *Journal of the American Ceramic Society*, 88(4), 1007-1009.
- Wong, I., & Ho, C. M. (2009). Surface molecular property modifications for poly (dimethylsiloxane)(PDMS) based microfluidic devices. *Microfluidics and nanofluidics*, 7(3), 291-306.
- Wu, M.-H., 2009. Simple poly(dimethylsiloxane) surface modification to control cell adhesion. *Surf. Interface Anal.* 41, 11–16. doi:10.1002/sia.2964
- Yamamoto, M., Yasukawa, T., Suzuki, M., Kosuge, S., Shiku, H., Matsue, T., Mizutani, F., 2012. Patterning with particles using three-dimensional interdigitated array electrodes with negative dielectrophoresis and its application to simple immunosensing. *Electrochim. Acta* 82, 35–42. doi:10.1016/j.electacta.2012.02.109
- Yang, L., Banada, P.P., Chatni, M.R., Seop Lim, K., Bhunia, A.K., Ladisch, M., Bashir, R., 2006. A multifunctional micro-fluidic system for dielectrophoretic concentration coupled with immunocapture of low numbers of *Listeria monocytogenes*. *Lab Chip* 6, 896–905. doi:10.1039/b607061m
- Yuen, P.K., Su, H., Goral, V.N., Fink, K. a, 2011. Three-dimensional interconnected microporous poly(dimethylsiloxane) microfluidic devices. *Lab Chip* 11, 1541–4. doi:10.1039/c0lc00660b

# Chapitre 4

## Résultats expérimentaux

1. Assemblage permanent de cellules eucaryotes par diélectrophorèse .....	123
1.1. Introduction générale .....	123
1.2. Préparation des cellules et milieu de manipulation .....	123
1.2.1. Les cellules HEK 293 .....	124
1.2.2. Choix du milieu diélectrophorétique .....	124
1.2.3. Test de viabilité cellulaire : méthode d'exclusion au bleu de trypan .....	125
1.2.4. Marquage des cellules .....	127
1.2.5. Traitement du PDMS à la poly-L-Lysine (PLL) .....	128
1.3. Détermination des conditions d'assemblage .....	130
1.3.1. Conductivité du milieu et fréquence optimale d'assemblage .....	130
1.3.2. Tension optimale .....	133
1.4. Formation d'agrégats cellulaires .....	135
1.5. Croissance cellules guidée par DEPn .....	137
2. Assemblage permanent des particules en polystyrène .....	138
2.1. Préparation des particules .....	138
2.2. Assemblage des particules .....	140
2.2.1. Détermination des paramètres diélectrophorétiques d'assemblage .....	140
2.2.2. Assemblage permanent des particules en polystyrène dans un milieu KCl .....	142
2.3. Etude de l'assemblage par la théorie de DLVO .....	144
3. Conclusion .....	150
Références .....	151

Dans ce qui suit, nous présenterons les assemblages réalisés en exploitant les dispositifs dont les étapes de conception et de fabrication ont été présentées au chapitre 3.

Le chapitre est divisé en deux parties. Dans la première partie, nous présenterons la formation d'agrégats cellulaires permanents par diélectrophorèse négative en utilisant le réseau d'électrodes quadripolaires, tout en décrivant le choix des paramètres d'assemblage ainsi que les tests effectués pour contrôler la viabilité des cellules. Nous montrerons qu'il est possible de conserver la structure de l'agrégat après coupure du champ électrique, sans toutefois recourir à l'emploi d'agents de couplages.

Nous montrerons également qu'il est possible de guider la croissance cellulaire en fonctionnalisant la surface du dispositif PDMS avec de la poly-L-lysine.

La seconde partie de ce chapitre sera dédiée aux résultats d'assemblage permanent par diélectrophorèse négative et couplage chimique de particules en polystyrène. Dans un premier temps, nous présenterons la démarche suivie pour la réalisation des assemblages ainsi que les difficultés identifiées lors des expériences. Enfin, nous nous appuierons sur la théorie DLVO pour fournir des éléments permettant d'expliquer le mécanisme d'assemblage.

### 1. Assemblage permanent de cellules eucaryotes par diélectrophorèse négative

#### 1.1. Introduction générale

L'assemblage de cellules par DEP peut être réalisé en exploitant l'un des deux régimes : DEPn ou DEPp. Les travaux d'assemblage permanent par DEPp rapportés dans la littérature sont essentiellement basés sur une biofonctionnalisation des surfaces d'assemblage (fibronectine, Poly-D-lysine), sur lesquelles les cellules peuvent adhérer et rester ainsi immobilisées après la coupure du champ électrique. (Gray et al., 2004 ; Ho et al., 2006). Sebastian et ses collaborateurs ont produit des assemblages permanents en exploitant le phénomène naturel d'adhésion entre cellules dont le rapprochement était induit par DEPp (Sebastian et al., 2007). La possibilité de récupérer les agrégats obtenus après coupure du champ n'a cependant pas été démontrée. Il est également possible d'assembler les cellules par DEPn (Matsue et al., 1997; Yu et al., 2004; Abdallat et al., 2013). Cependant, à notre connaissance, en dehors des travaux basés sur l'emploi de matrices type hydrogel, aucune étude ne décrit la formation par DEPn d'agrégats de cellules permanents et potentiellement récupérables en vue d'une utilisation ultérieure. L'emploi de la DEPn offre toutefois l'avantage de minimiser les éventuels dommages engendrés par le champ électrique au niveau des cellules, dans la mesure où ces dernières sont dirigées vers les zones de faible intensité de champ (Puttaswamy et al., 2010). De plus, elles peuvent être assemblées en clusters compacts en utilisant des configurations d'électrodes adaptées, telles que les électrodes quadripolaires qui génèrent un champ électrique nul au centre de l'espace inter-électrodes (Huang and Pethig., 1991; Frénéa et al., 2003).

Dans ce qui suit, nous présentons les travaux sur l'assemblage de cellules HEK 293 par DEPn en utilisant le microsysteme constitué d'un réseau d'électrodes quadripolaires décrit au chapitre 3. Notre objectif est d'une part de former des agrégats cellulaires vivants et permanents sans addition d'agent de couplage, d'autre part d'avoir la possibilité de les récupérer après coupure du champ électrique et de les recultiver dans leur milieu de culture. Par ailleurs, nous avons souhaité étudier la possibilité de guider la croissance des cellules sur la surface d'assemblage en combinant la DEPn à une fonctionnalisation à la Poly-L-Lysine des surfaces de PDMS.

#### 1.2. Préparation des cellules et milieu de manipulation

Les manipulations ont été réalisées sur des cellules adhérentes HEK 293 vivantes, dérivées de cellules de rein d'embryon humain. Cette lignée fait l'objet d'une description détaillée dans l'article de (Graham et al., 1977). D'après la littérature, cette lignée cellulaire est très

employée pour la recherche (Wang et al., 2009 et Vaillier et al., 2014). Elle a déjà été utilisée en particulier par d'autres doctorants de notre équipe, pour étudier par exemple le phénomène d'endocytose ou le tri cellulaire à l'aide de microaimants (Osman et al., 2012), ainsi que l'influence d'un champ magnétique statique sur des cellules (El-Gaddar et al., 2013)

### 1.2.1. Les cellules HEK 293

Les cellules HEK 293 ont été fournies par CelluloNet (CelluloNet. BioSciences Gerland-Lyon Sud. France). Elles sont cultivées dans un milieu de culture contenant du DMEM sans calcium ni magnésium (Dulbecco's Modified Eagle's Medium without  $\text{Ca}^{+2}$  et  $\text{Mg}^{+2}$ ) complété par 10% de FBS (Fetal Bovine Serum), 1% d'acide aminés essentiel et 0.1% de pyruvate de sodium. Les cellules sont cultivées dans des flasques commerciaux T<sub>75</sub> (PAA) dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO<sub>2</sub>. A 80% de confluence, les cellules sont rincées avec du PBS 10x (Phosphate Buffered Saline), puis détachées avec de la trypsine. L'action de la trypsine est inhibée en rajoutant du milieu de culture. Une fois les cellules détachées, la suspension est centrifugée (5min à 230×g), puis les cellules sont remises en suspension dans un milieu adapté pour leur manipulation par diélectrophorèse, peu conducteur et isotonique.

Un milieu peu conducteur, donc pauvre en ions, est dit *hypotonique*. Dans un tel milieu, afin d'équilibrer les pressions osmotiques de part et d'autre de la membrane, les cellules se gorgent d'eau jusqu'à éclatement (Figure 4.1). Pour atteindre cet équilibre (milieu dit *isotonique*), l'osmolarité de la solution peut être ramenée à sa valeur physiologique, située autour de 300 mOsm/L, par ajout de sucrose.

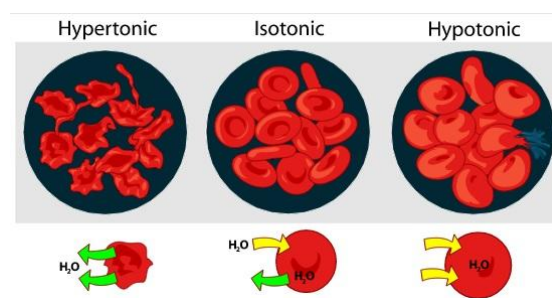


Figure 4.1 Représentation de l'état des globules rouges (hématies) dans différents milieux (Université de Buffalo).

### 1.2.2. Choix du milieu diélectrophorétique

Le milieu diélectrophorétique choisi doit, d'une part, permettre la survie des cellules et d'autre part présenter des caractéristiques électriques adaptées au régime de DEP choisi. Nous rappelons en effet que le facteur de CM dépend des propriétés des cellules mais aussi de celles de leur milieu de suspension. Bien que la manipulation de cellules par DEPn ait déjà été

démontrée dans des milieux conducteurs (Glasser et Fuhr, 1998; Seger et al, 2004), l'utilisation de tampons de faible conductivité est largement plus répandue car elle permet d'éviter les tourbillons de flux provoqués par les effets électrothermiques (Sebastian et al., 2007) ainsi que les échauffements induits par effet Joule, pouvant nuire à la viabilité des cellules voire détériorer les électrodes. De plus, le potentiel transmembranaire induit par le champ électrique est abaissé lorsque la conductivité du milieu extracellulaire est faible (Glasser and Fuhr., 1998; Ivorra et al., 2010). Le risque d'électroporation et de lyse cellulaire est donc réduit. Ainsi, l'utilisation de milieu de culture DMEM pur ( $\sigma_m > 1,2$  S/m) est peu recommandée. Pour nos expériences, les cellules HEK 293 ont été manipulées dans une solution tampon isotonique. Cette dernière est constituée d'eau DI à laquelle du PBS a été ajouté jusqu'à obtenir une conductivité de 50 mS/m. L'osmolarité a ensuite été ajustée à 300 mOsm/L par ajout de dextrose (5%). Le pH mesuré est de 7,4, ce qui correspond à la valeur physiologique (Annexe E).

Avant de manipuler les cellules dans le milieu diélectrophorétique peu conducteur (50 mS/m), il est nécessaire d'effectuer des lavages afin d'éliminer efficacement le milieu de culture. Les étapes de lavage ne sont pas sans conséquences sur la viabilité des cellules, la centrifugation ainsi que le changement de milieu pouvant induire un stress pour les cellules (Attwell et al., 1979). Deux étapes de lavages en utilisant le milieu diélectrophorétique semblent être le bon compromis pour limiter les étapes de centrifugation et obtenir une conductivité électrique de l'ordre de 50 mS/m (soit celle du milieu diélectrophorétique).

### 1.2.3. Test de viabilité cellulaire : méthode d'exclusion au bleu de trypan

Etant donné que l'on travaille avec des cellules vivantes dans un milieu ( $H_2O$ +PBS, dextrose 5%) différent de leur milieu de croissance, il est impératif de mesurer l'impact de ce milieu sur leur viabilité. Pour cela, nous avons eu recours à un test de viabilité par coloration en utilisant le bleu de trypan. Lors des expériences d'assemblage, les cellules seront maintenues pendant environ 15 minutes à température ambiante dans le tampon diélectrophorétique. Le test de viabilité a été réalisé sur une durée d'une heure, soit 4 fois la durée réelle d'exposition des cellules au milieu diélectrophorétique, afin de vérifier au mieux l'évolution temporelle de la viabilité des cellules.

Des cellules HEK 293 ont été cultivées dans leur milieu de croissance (DMEM). À 80 % de confluence, elles ont été détachées, lavées puis resuspendues dans le tampon diélectrophorétique à température ambiante. Des prélèvements ont été effectués à 0, 5, 10, 15,



30, 45, 60 minutes, puis un comptage a été réalisé en utilisant une cellule de Neubauer, après ajout de bleu de trypan.

Le bleu de trypan est un colorant communément employé pour colorer les cellules mortes. En effet, ce colorant soluble dans l'eau pénètre les membranes endommagées des cellules mortes et confère à leur cytoplasme une couleur bleue, ce qui permet de les distinguer des cellules vivantes. Le taux de viabilité des cellules dans le tampon diélectrophorétique a été comparé aux résultats d'un test témoin, dans lequel les cellules ont été laissées dans leur milieu de culture, à température ambiante.

A partir des résultats de comptage cellulaire après test d'exclusion au bleu trypan, représentés dans l'histogramme ci-dessous (Figure 4.2), on peut constater que le taux de viabilité des cellules exposées au tampon diélectrophorétique baisse très légèrement par rapport à celui des cellules dans leur milieu de culture. Néanmoins, il ne baisse pas en dessous des 83% tout au long de la durée de l'expérience (Figure 4.2). Cette différence ne peut pas être uniquement attribuée à la composition du milieu, elle peut être partiellement expliquée par le stress engendré par les étapes de centrifugation.

Le test de viabilité au bleu de trypan différencie les cellules vivantes et mortes mais ne nous renseigne pas sur l'état morphologique ni physiologique des cellules vivantes. Pour cela, un test au MMT aurait pu être réalisé. Par manque de temps et n'ayant pas ce produit à disposition, nous avons opté pour un contrôle simple de l'état des cellules. Les cellules exposées durant 1 h au tampon diélectrophorétique (5% dextrose) ont été récupérées, resuspendues dans du milieu de culture puis cultivées dans un flasque commercial placé à l'incubateur pendant toute une nuit, en conditions optimales de croissance (5 % CO<sub>2</sub>, 37 °C). L'état des cellules a été comparé à celui des cellules témoins non exposées au dextrose et cultivées dans les mêmes conditions. Les observations représentées sur la figure 4.3 nous indiquent qu'il n'y a pas de différence significative entre l'état des cellules témoins (Figure 4.3.B) et celui des cellules exposées au dextrose (Figure 4.3.A). Ces dernières s'étalent et adhèrent au support et se lient entre elles pour former un tapis cellulaire.

En parallèle à ces tests, nous avons essayé de cultiver les cellules dans le tampon diélectrophorétique sous les mêmes conditions de croissance (5% CO<sub>2</sub>, 37°C). Au bout d'une heure d'incubation, il apparaissait que la plupart des cellules étaient restées rondes et n'avaient pas adhéré à la surface en présence du tampon diélectrophorétique. Après 2 h d'incubation supplémentaire, de nombreux débris cellulaires étaient observés, la plupart des cellules étaient

mortes. Ces tests nous ont permis de vérifier que les cellules toléraient une exposition de durée limitée au tampon diélectrophorétique (Dextrose 5%) pour leur manipulation et que ce milieu ne convenait pas à leur adhérence ni à leur croissance. Le remplacement de ce tampon diélectrophorétique par du milieu de culture après assemblage est donc essentiel au développement normal des cellules (Ho et al., 2006).

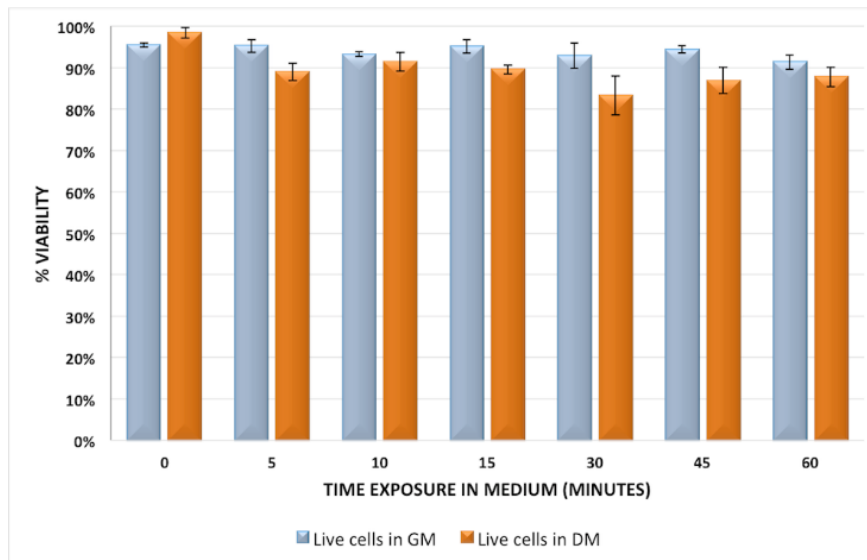


Figure 4.2 Pourcentage de viabilité des cellules HEK 293 en fonction de la durée d'exposition dans deux milieux différents. En bleu : milieu diélectrophorétique (5 % dextrose), en orange : milieu de culture (à température ambiante).

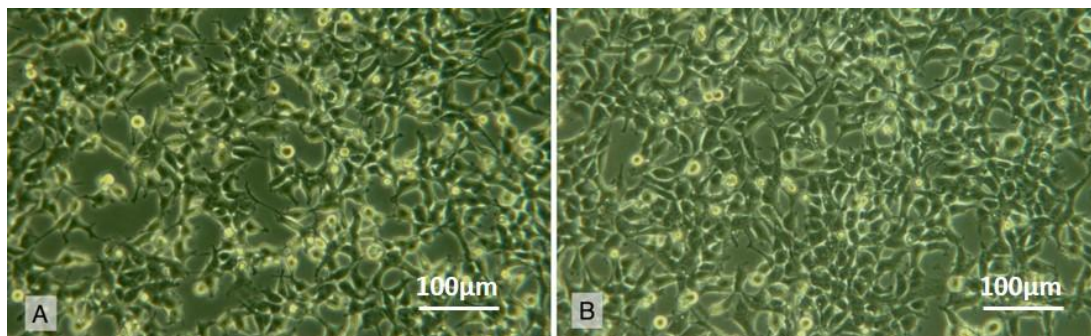


Figure 4.3 Cellules HEK 293 placées pendant 1h à température ambiante dans A) le milieu de culture DMEM, B) le tampon diélectrophorétique (5% dextrose), puis remises en culture dans du DMEM sous 5% CO<sub>2</sub> et à 37°C (photos prises après une nuit d'incubation).

### 1.2.4. Marquage des cellules

Les cellules ont été marquées avec un fluorophore afin de faciliter les observations en 3D des agrégats au microscope à fluorescence (Carl Zeiss AxioImager équipé d'une caméra AxioCam HSm). Nous avons utilisé un marqueur fluorescent orange CellTracker™ (Invitrogen,UK). Le fluorophore diffuse librement à travers la membrane cellulaire puis, une fois à l'intérieur, les groupements chlorométhyle ou bromométhyle de la molécule réagissent

avec des groupes thiol dans la cellule grâce à l'enzyme glutathion S-transférase, enzyme ubiquitaire présente naturellement dans cette dernière. Le produit généré est ainsi piégé à l'intérieur de la cellule. Le marqueur est transféré aux cellules filles durant les divisions cellulaires.

### 1.2.5. Traitement du PDMS à la poly-L-Lysine

Nos travaux de manipulation des cellules par DEPn visent deux objectifs, qui s'avèrent tous deux intéressants pour des applications en ingénierie tissulaire : le premier est de former des agrégats de cellules permanents et pouvant éventuellement être déplacés en vue d'une utilisation ultérieure, tandis que le deuxième est de permettre l'adhésion et la croissance guidée des cellules sur la surface du microsystème utilisé (réseau d'électrodes quadripolaires). Pour ce second objectif, une étape de fonctionnalisation de la surface du dispositif a dû être ajoutée. Sur ce dernier, les zones vers lesquelles sont dirigées les cellules soumises à la DEPn correspondent au centre de l'espace inter-électrodes.

Nous avons vu dans le chapitre précédent que ces zones étaient recouvertes d'une fine couche de PDMS, permettant le passage d'un réseau d'électrodes bipolaires à un ensemble d'électrodes quadripolaires (Figure 4.6). Pour ces raisons, nous avons testé l'adhésion des cellules HEK 293 sur le PDMS. Des cellules ont été cultivées sur un substrat recouvert d'une fine couche de PDMS sous les conditions de croissance optimales (milieu de culture, 5 % de CO<sub>2</sub>, 37 °C). Après 24 H d'incubation, nous avons pu vérifier que les cellules n'adhéraient pas au PDMS. *A contrario*, elles s'agrègent et forment des amas qui restent en suspension (Figure 4.5.A).

Il est connu que l'adhésion et la prolifération de différents types de cellules sur les biomatériaux dépendent de la charge de surface des matériaux. Le PDMS est un polymère chargé négativement, ce qui engendre des effets de répulsion électrostatique avec les sites anioniques présents à la surface des cellules. Par ailleurs, il existe d'autres méthodes de traitement des surfaces pour améliorer l'adhérence des cellules tels que le revêtement au collagène ou à la fibronectine (Liu et al., 2007) qui peuvent aussi être utilisés.

Nous avons ainsi testé la culture de cellules HEK 293 sur une surface de PDMS fonctionnalisée avec de la PLL. A cet effet, un substrat en ITO recouvert d'une fine couche de PDMS de 200 nm (semblable à celle couvrant la surface des dispositifs) a été fonctionnalisé avec de la PLL 24 heures avant la mise en culture des cellules. Un test témoin a été effectué

en parallèle sur des cellules cultivées dans un flasque commercial à surface traitée pour la culture de cellules.

Un volume de 500  $\mu\text{l}$  de poly-L-lysine a été déposé sur la lame recouverte de PDMS. Après 10 minutes d'incubation, 3 lavages ont été réalisés au PBS, suivi d'un séchage à température ambiante. La fonctionnalisation ainsi que le stockage des lames ont été réalisés sous hotte, dans des conditions stériles, afin d'éviter les contaminations pouvant nuire à la croissance des cellules.

Des cellules HEK 293 ont été cultivées sur ce substrat fonctionnalisé avec de la poly-L-lysine en respectant les conditions de culture standard (milieu de culture, 5 % de  $\text{CO}_2$ , 37 °C). Après 24 H d'incubation, les cellules avaient la même apparence (Figure 4.5.B) que celles du témoin, cultivées sur un flasque commercial (Figure 4.5.C) : elles présentaient une forme aplatie caractéristique de cellules s'étalant sur le substrat et commençaient à former un tapis cellulaire (Figure 4.5.B).

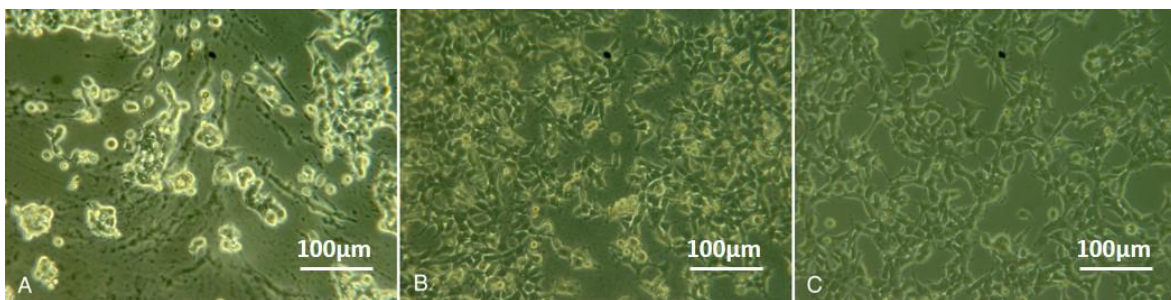


Figure 4.5 Cellules HEK 293 cultivées) sur différents substrats. A) PDMS natif, B) PDMS traité à la poly-L-Lysine, C) flasque commercial. Pour ces trois expériences, les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM, sous 5 % de  $\text{CO}_2$  à 37 °C.

La fonctionnalisation du PDMS avec de la poly-L-lysine enrichit ce dernier en charges positives se liant par des interactions électrostatiques. Les sites cationiques de la PLL forment des liaisons électrostatiques avec les sites anioniques des membranes des cellules, ce qui les maintient à la surface du matériau et favorise leur adhésion (Figure 4.6).

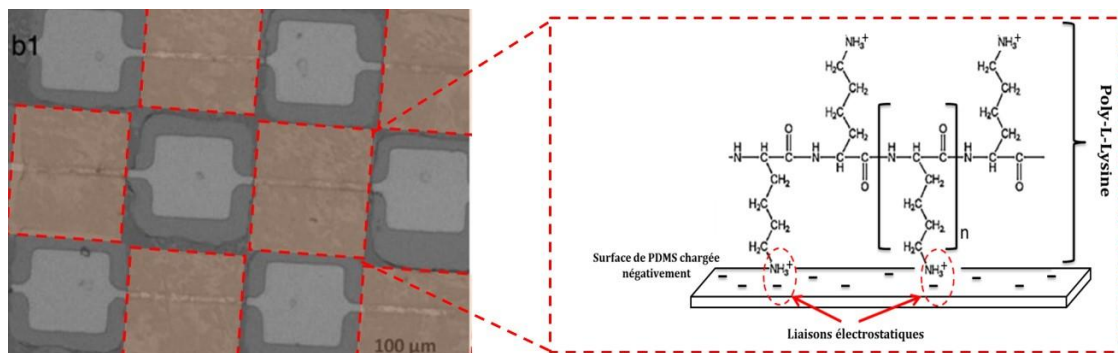


Figure 4.6 Fonctionnalisation de la surface de PDMS par greffage électrostatique de polyelectrolyte (Poly-L-lysine)

Ces résultats démontrent que le PDMS natif n'est pas favorable à la croissance ni à l'adhésion cellulaire, ce qui est conforme aux résultats montrés par Peterson et al., 2005 pour un autre type de cellules. Ces résultats démontrent également qu'une fonctionnalisation à la poly-L-lysine augmente significativement l'adhésion des cellules à ce dernier. Ce résultat rejoint les conclusions de Wu et ses collaborateurs qui ont constaté le même effet en utilisant des cellules chondrocytes (Wu. 2009). Pour permettre la croissance guidée de cellules HEK 293 par diélectrophorèse négative, le microsystème d'assemblage a été traité avec de la Poly-L-Lysine (Figure 4.6) afin de permettre aux cellules constituant le pattern d'adhérer au PDMS.

### 1.3. Détermination des conditions d'assemblage

Cette partie vise à justifier le choix des conditions de manipulation employées pour permettre l'assemblage des cellules par DEPn (conductivité du milieu, amplitude et fréquence des signaux électriques appliqués notamment).

#### 1.3.1. Conductivité du milieu et fréquence optimale d'assemblage

La valeur de la conductivité du milieu de suspension influence le comportement diélectrophorétique des cellules (Chapitre 2). Ce dernier peut être prédit en traçant la variation de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence du champ électrique. Afin de choisir une conductivité adaptée pour réaliser les assemblages de cellules HEK 293 par DEPn, nous avons comparé les tracés de  $\text{Re}(CM)$  en fonction de la fréquence pour différentes conductivités comprises dans l'intervalle [0-100 mS/m].

Les propriétés diélectriques des cellules HEK 293 (Tableau 4.1) ont déjà été caractérisées par électrorotation et rapportées dans la littérature par Zimmermann et al. en 2008 ainsi que par notre équipe (El-Gaddar et al., 2013). En utilisant le modèle d'Irimajiri (4.1) donnant la permittivité complexe d'une cellule en fonction de ces paramètres, il est possible de calculer la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti pour chaque point de fréquence et d'obtenir ainsi les spectres diélectrophorétiques théoriques des cellules HEK-293 pour différentes conductivités (Figure 4.7).

$$\tilde{\epsilon}_p = \frac{(C_{mem} + \frac{G_{mem}}{j^* \omega})r \times (\epsilon_0 \epsilon_{rcy} + \frac{\sigma_{cy}}{j \omega})}{(C_{mem} + \frac{G_{mem}}{j \omega})r \times (\epsilon_0 \epsilon_{rcy} + \frac{\sigma_{cy}}{j^* \omega})} \quad (4.1)$$

Cell line	$C_{mem}(\text{mF/m}^2)$	$G_{mem}(\text{S/m}^2)$	$\sigma_{cy}(\text{mS/m})$	$\epsilon_{cy}$
<b>HEK 293</b>	8,5	0	533	71

Tableau 4.1 Propriétés électriques des cellules HEK-293.  $C_{mem}$  et  $G_{mem}$  désignent respectivement la capacité et la conductance surfacique de la membrane.  $\sigma_{cy}$  et  $\epsilon_{cy}$  sont la conductivité et permittivité du cytoplasme des cellules (Zimmermann et al., 2008 ; El-Gaddar et al., 2013).

A partir de la Figure 4.7, nous pouvons vérifier que, conformément à la théorie, la valeur du facteur de Clausius-Mossotti varie entre -0,5 et 1 et que pour toutes les conductivités, les cellules peuvent subir la DEPP ou la DEPn en fonction de la fréquence choisie. Cependant nous avons privilégié le choix d'un milieu le moins conducteur possible, tout en faisant en sorte d'avoir une valeur de  $\text{Re}(\text{CM})$  maximale pour la DEPn (soit -0.5), à des fréquences supérieures à 10-20 kHz. En effet, nous ne souhaitons pas travailler en dessous de ces fréquences afin d'éviter d'autres phénomènes électrocinétiques tels que l'électroosmose ou l'électrolyse.

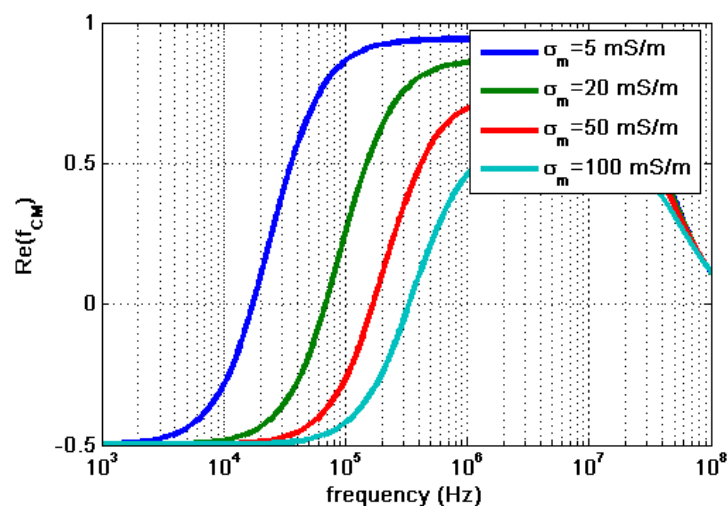


Figure 4.7 Spectres diélectrophorétiques des cellules HEK 293 tracés pour différentes conductivités.

Le choix de la conductivité 50 mS/m nous a paru adapté : à cette valeur, les cellules subissent la DEPn pour des fréquences inférieures à 150-200 kHz, intervalle correspondant à la fréquence de transition à laquelle  $\text{Re}(\text{CM})$  change de signe. La valeur maximum (négative) de  $\text{Re}(\text{CM})$  peut être obtenue en appliquant un signal de fréquence 10 kHz. La Figure 4.8.B illustre l'assemblage des cellules par diélectrophorèse négative dans l'espace inter-électrodes pour  $\sigma_m = 50 \text{ mS/m}$ , lorsque le signal appliqué aux électrodes quadripolaires est



d'amplitude  $10 V_{pp}$  et de fréquence  $10 \text{ kHz}$ . Elle a été obtenue avec Comsol, en utilisant les modules AC/DC et particle tracing<sup>8</sup>.

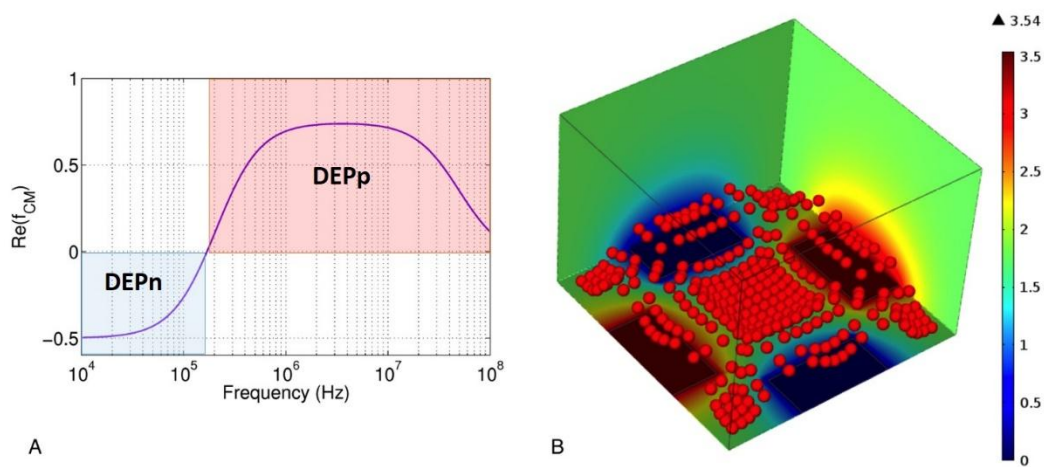


Figure 4.8 Simulation de la réponse diélectrophorétique des cellules HEK 293 suspendues dans un milieu dextrose 5% ( $\sigma_m=50 \text{ mS/m}$ ). A) Evolution de la partie réelle du facteur de clausius-Mossotti en fonction de la fréquence (tracé réalisé sous Matlab) B) Simulation par éléments finis 3D de la distribution du potentiel électrique et de l'assemblage des cellules par DEPn pour un signal d'amplitude  $10 V_{pp}$  et de fréquence  $10 \text{ kHz}$ .

Comme on peut le constater sur la Figure 4.8.B, avec l'application d'un signal d'amplitude  $10 V_{pp}$  et de fréquence  $10 \text{ kHz}$ , les cellules sont assemblées au centre de l'espace inter-électrodes. Au cours de ce processus, les cellules sont légèrement surélevées au-dessus des électrodes grâce à la force de diélectrophorèse négative. Ceci permet de limiter les éventuels risques d'adhésion cellulaire aux électrodes lors du processus d'assemblage.

Le régime de DEP privilégié pour l'assemblage est la DEPn, dans la mesure où ce phénomène permet de former des clusters compacts de cellules, le minimum de champ étant situé en un seul point (ce qui n'est pas le cas du maximum). Par ailleurs, les cellules sont exposées à des intensités de champ électrique beaucoup plus faibles. Nous pouvons cependant noter que, sans ce dernier point, il serait plus recommandé d'utiliser la DEPp, car celle-ci se produit aux fréquences plus élevées. Or, le potentiel transmembranaire induit diminue avec la fréquence : pour un champ électrique donné, le potentiel transmembranaire induit est plus faible lorsque la fréquence augmente, ce qui permet de limiter les risques d'électroporation voire de lyse cellulaire. D'après Kotnik (Kotnik et al., 2000), l'évolution du potentiel transmembranaire induit en fonction de la fréquence est de type passe-bas du premier ordre :

$$V = 1.5 \times E \times R \cdot \cos \theta \cdot \frac{1}{1 + j\omega\tau_m}$$

<sup>8</sup> Cette simulation tient compte de la force de trainée visqueuse, de la force de diélectrophorèse et de la force de gravité, mais elle néglige l'influence de la présence des particules sur la cartographie de champ électrique.

avec :

$$\tau_m = \frac{R \cdot (\epsilon_{\text{memb}} / e)}{\frac{2\sigma_{\text{cyt}} \cdot \sigma_m}{\sigma_{\text{cyt}} + 2\sigma_m} + \frac{R}{e} \sigma_{\text{memb}}}$$

R : rayon de la cellule

$\epsilon_{\text{memb}}$  : permittivité de la membrane

e : épaisseur de la membrane

$\sigma_{\text{cyt}}$  : conductivité du cytoplasme

$\sigma_m$  : conductivité du milieu extra-cellulaire

$\sigma_{\text{memb}}$  : conductivité de la membrane

En estimant l'épaisseur de la membrane à 5 nm environ, nous obtenons une valeur de  $\tau_m$  de l'ordre de  $5 \times 10^{-6}$ . Au-delà d'une fréquence  $f = 1/(2\pi\tau_m) \approx 32$  kHz, le potentiel transmembranaire induit décroît lentement.

Dans notre cas, la fréquence appliquée étant de l'ordre de 10 kHz, la valeur du champ électrique conduisant à la formation de pores dans la membrane cellulaire (se produisant, d'après la littérature, pour un potentiel transmembranaire induit de l'ordre de 1 V) est estimée à  $1/(1.5 \times R)$  soit environ 1 kV/cm.

D'après les simulations de champ présentées au chapitre précédent, l'intensité du champ électrique au centre de l'espace inter-électrodes est très inférieure à cette valeur, ce qui nous permet de conclure que les cellules ne sont pas soumises au risque d'électroporation lors de l'assemblage par DEPn.

### 1.3.2. Tension optimale

Le choix de la tension optimale a été réalisé après des expériences d'assemblage des cellules par DEPn à différentes tensions (4, 7 et 10  $V_{pp}$ ) et comparaisons des structures finales des assemblages obtenus après 2, 4, 7 et 10 minutes d'exposition au champ électrique (Figure 4.9). Nous avons constaté qu'en appliquant une faible tension (4  $V_{pp}$ ), la collecte des cellules au centre de l'espace inter-électrodes s'effectuait lentement et qu'après 10 minutes d'exposition au champ électrique, les cellules parvenaient à atteindre l'espace inter-électrodes sans toutefois former d'agrégat. L'application d'une tension électrique de 7  $V_{pp}$  a permis la formation d'assemblages de cellules bien distincts au bout de 10-15 minutes d'exposition au



champ électrique, mais une fois le champ électrique coupé, la majorité des cellules formant l'agrégat se détachaient et se redispersaient dans le milieu.

L'application d'une tension de 10 V<sub>pp</sub> a permis la formation d'agrégats de cellules au bout de 7 minutes. De plus, les agrégats exposés plus de 10 minutes au champ électrique demeuraient intacts après coupure du champ, et les cellules les constituant restaient étroitement liées.

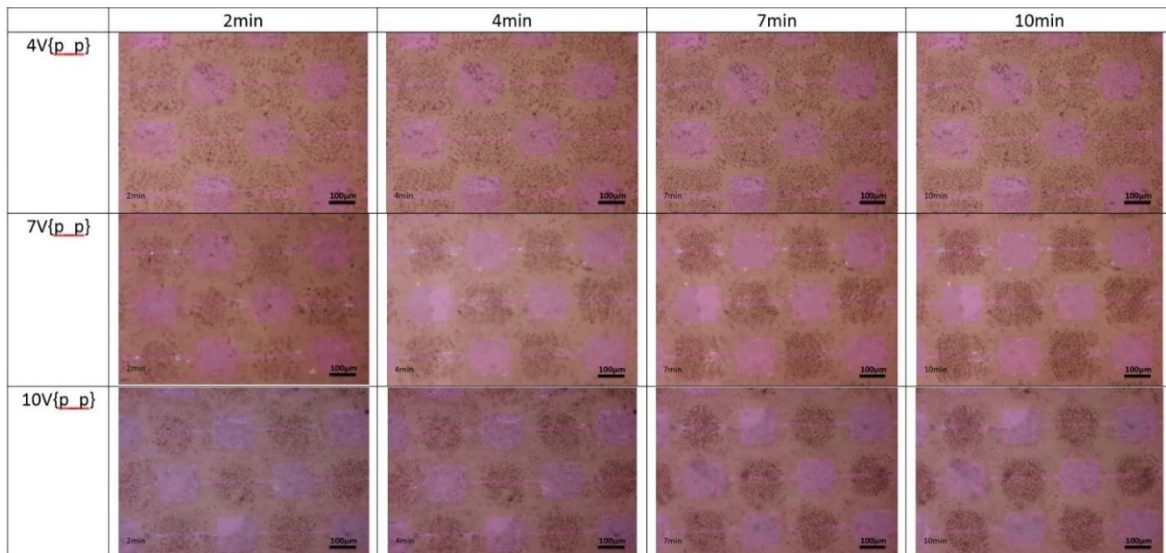


Figure 4.9 Assemblage des cellules HEK 293 par DEPn dans un tampon dextrose 5% ( $\sigma_m=50$  mS/m) sous différentes tensions électriques et pour une fréquence constante de 10 kHz.

Nous avons exploité ces conditions d'assemblage pour la formation d'agrégats cellulaires d'une part et d'autre part pour la formation d'un pattern cellulaire adhérent sur les parties du dispositif recouvertes de PDMS fonctionnalisées avec de la Poly-L-Lysine. Pour ces deux types d'expériences, nous avons utilisé le microsystème constitué d'un réseau d'électrodes quadripolaires. Une chambre est délimitée au-dessus du réseau d'électrodes à l'aide d'un espaceur en PDMS, puis remplie de 100 µl de suspension cellulaire (cellules HEK placées dans le milieu diélectrophorétique) à l'aide d'une micropipette. Une lamelle de verre déposée sur le dessus permet de clore cette microchambre (Figure 4.10) (Annexe D). La tension et la fréquence sont appliquées et contrôlées grâce au montage présenté au chapitre 2.

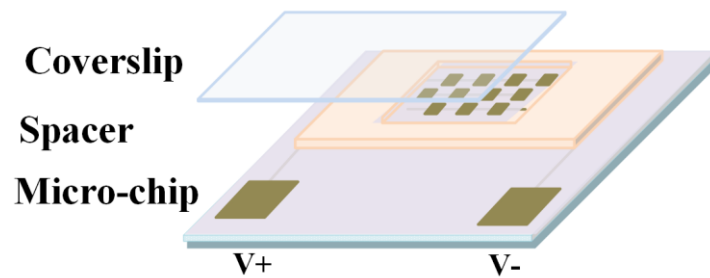


Figure 4.10 Dispositif expérimental utilisé pour l'assemblage des cellules.

### 1.4. Formation d'agrégats cellulaires

La possibilité de former des agrégats cellulaires facilement récupérables en vue d'une utilisation extérieure (pour l'étude de leurs caractéristiques électriques par exemple) a été démontrée en utilisant le dispositif d'électrodes quadrupolaires non fonctionnalisés à la poly-L-Lysine. De plus, comme cela a été indiqué par les simulations (Figure 4.8.B), l'application de la DEPn permet de prévenir l'adhésion non spécifique des cellules sur les électrodes.

Les agrégats cellulaires ont été obtenus en appliquant les paramètres d'assemblage définis précédemment (milieu dextrose 5%  $\sigma_m=50$  mS/m,  $10V_{pp}$ , 10 kHz). Sous ces conditions, les cellules subissent la force de DEPn qui les repousse vers les zones de faible champ électrique, localisées au centre de chaque groupe d'électrodes quadrupolaires (Figure 4.11.A). Afin de déterminer les dimensions des agrégats formés, nous avons utilisé des cellules HEK 293 préalablement marquées selon le protocole décrit dans la Partie 1.2.4. La taille des agrégats obtenus a été mesurée en capturant des images à différents plans en Z. L'image reconstituée (Figure 4.11.B) montre que tous les agrégats étaient réguliers, de tailles et de formes semblables avec des dimensions caractéristiques  $150 \times 150 \times 50 \mu\text{m}$ .

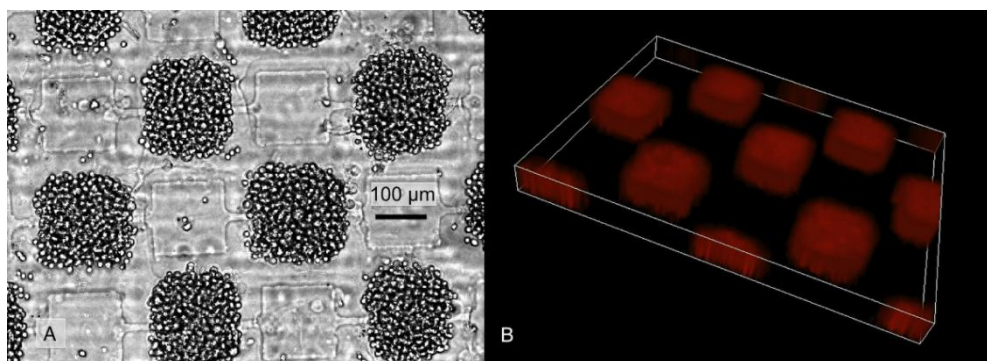


Figure 4.11 Formation des agrégats de cellules HEK 293 par DEPn. A) agrégation des cellules HEK 293 dans le tampon diélectrophorétique 5% dextrose,  $\sigma_m=50\text{mS/m}$ , fréquence 10 kHz,  $10 V_{pp}$ . B) Reconstruction 3D des images obtenues à l'aide du module Z-stack du logiciel AxioVision (Zeiss).

Comme précisé précédemment, l'assemblage était effectif au bout de quelques minutes, mais une coupure du champ électrique avant 10 minutes induisait une redispersion des cellules dans le milieu. Au-delà de 10-15 minutes, les agrégats restaient assemblés malgré la coupure du champ électrique. Afin de contrôler la viabilité des agrégats, le microsystème a été immergé dans une boîte de Pétri contenant du milieu de culture. L'introduction du milieu de culture à l'intérieur du dispositif a dilué le tampon diélectrophorétique et provoqué le déplacement des agrégats hors de leur zone d'assemblage. Tout en demeurant assemblés, ces derniers se sont dispersés à la surface du dispositif (Figure 4.11.A). Le mécanisme de formation d'agrégats cellulaires « permanents » par diélectrophorèse n'est pas décrit dans la littérature. Nous supposant que l'effet de l'attraction mutuelle entre dipôles induits au sein de cellules voisines (« pearl chaining », Pohl et al., 1971 ; Chia et al., 1975) crée un rapprochement entre les cellules, ce qui favorise probablement l'attachement de ces dernières entre elles grâce aux molécules d'adhésion « CAM » (*Cell Adhesion Molecules*) se trouvant sur leurs membranes, plus précisément les cadhérines (thèse El-Gaddar).

Par ailleurs, Pontani et son équipe ont étudié le rôle de la force mécanique dans le mécanisme d'adhésion cellulaire en utilisant un système biomimétique. Ils ont conclu que l'intervention d'une force externe permettait de surmonter la répulsion électrostatique et favoriser le contact entre les protéines d'adhésion membranaires (Pontani et al., 2012). Cela nous amène à supposer que la force diélectrophorétique et la force d'interaction cellule-cellule induites par le champ électrique non uniforme pourraient contribuer à renforcer les interactions cellule-cellule. Ceci pourrait être confirmé par des études de la cinétique de liaison des cadhérines sous l'effet de la diélectrophorèse.

Afin d'obtenir une première estimation de la viabilité des cellules au sein des agrégats, les agrégats de cellules ont été incubés dans du milieu de culture (DMEM) sur un substrat traité poly-L-lysine. Après incubation durant une nuit dans les conditions normales de croissance (37 °C et 5 % CO<sub>2</sub>), des pseudopodes se sont formés autour de l'agrégat, comme on peut l'observer sur la figure (4.12.B). Leur présence témoigne de la viabilité d'au moins une partie des cellules constituant l'agrégat. Ces protubérances membranaires indiquent que les cellules adhèrent au substrat, ce qui suppose qu'elles restent vivantes pendant toute la période d'incubation.

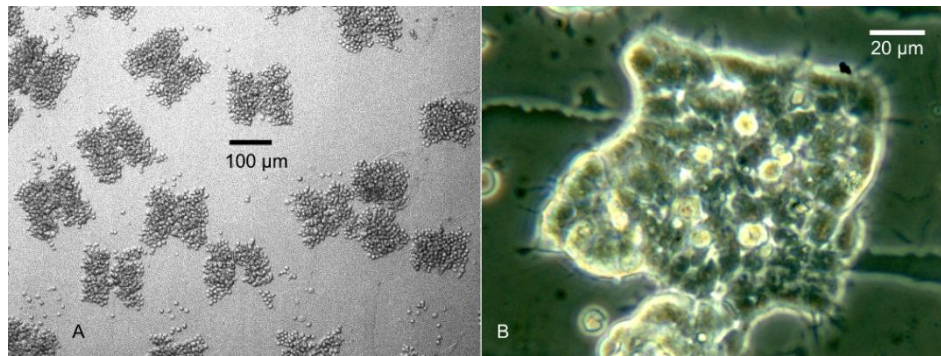


Figure 4.12 A) Assemblages permanents des cellules HEK 293 après coupure du champ électrique et transfert dans du milieu de culture (DMEM). B) Pseudopodes formés autour de l'agrégat cellulaire après une nuit d'incubation en conditions normales de culture (37 °C et 5 % de CO<sub>2</sub>).

### 1.5. Croissance cellulaire guidée par DEPn

Afin d'étudier la possibilité de créer des patterns de cellules vivants en combinant l'adhésion cellulaire sur des substrats fonctionnalisés et l'emploi de la DEPn, des cellules HEK 293 ont été assemblées à l'aide d'un réseau d'électrodes quadripolaires dont la surface a été traitée avec de la PLL (Figure 4.13).

L'assemblage diélectrophorétique a été effectué dans des conditions identiques à celles décrites ci-dessus (tampon diélectrophorétique 5% dextrose,  $\sigma_m = 50$  mS/m, fréquence 10 kHz, 10 V<sub>pp</sub>). Toutefois, la durée d'exposition au champ électrique a été réduite à 5 minutes dans le but de rassembler les cellules au centre des espaces inter-électrodes sans former des agrégats permanents. Quelques minutes après la coupure du champ électrique, les cellules sédimentent et se posent sur les surfaces d'assemblage (Figure 4.13 t=0). Par la suite, le microsystème a été déplacé dans une boîte de Pétri contenant du milieu de culture (DMEM) puis placé dans l'incubateur à 37 °C sous 5 % de CO<sub>2</sub>. Après 5 h d'incubation, les cellules commencent à s'aplatir et s'allonger, du fait de leur adhésion au substrat fonctionnalisé et entre elles (Figure 4.13 t=5h et t=6h). On remarque sur la Figure 4.13 que, les cellules adhèrent en suivant le motif prédéfini par l'effet de la diélectrophorèse négative.

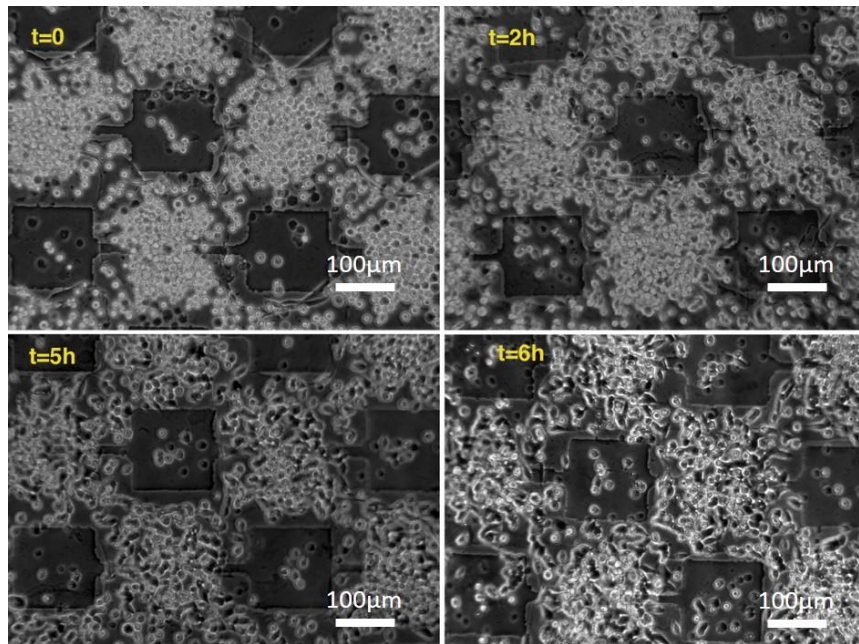


Figure 4.13 Croissance du pattern cellulaire formé par diélectrophorèse négative en fonction du temps (0, 2, 5 et 6 heures) sur la surface de PDMS fonctionnalisée à la poly-L-Lysine sous les conditions de croissance (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) après coupure du champ électrique et immersion du dispositif dans du milieu de culture.

Dans ce qui précède, nous avons montré qu'il était possible d'obtenir des agrégats de cellules permanents en employant la force de diélectrophorèse, sans toutefois recourir à une fonctionnalisation des cellules manipulées. Dans ce qui suit, nous nous intéressons à la formation d'assemblages permanents de particules de latex. Nous montrerons que ceci est notamment possible en recourant cette fois-ci à l'utilisation d'agents de couplage chimique.

### 2. Assemblage permanent des particules en polystyrène

Dans le chapitre 1, nous avons présenté les différentes méthodes de couplage covalent qui ont déjà été associées à la diélectrophorèse. Pour l'assemblage de particules en polystyrène de 1 µm portant des groupements carboxyliques, nous avons choisi de combiner l'assemblage par diélectrophorèse négative avec le couplage chimique covalent par addition d'un agent chimique : la Jeffamine<sup>9</sup>. Les assemblages ont été réalisés dans le microsystème constitué d'un réseau d'électrodes quadripolaires présenté au chapitre 3.

#### 2.1. Préparation des billes

La liaison de la Jeffamine avec les groupements carboxyliques ne peut se réaliser qu'après activation de ces derniers. Les acides carboxyliques ont été activés avec une solution aqueuse contenant de l'eau DI mélangée à de l'EDCI<sup>10</sup> et du NHS<sup>11</sup>. L'activation a été effectuée à

<sup>9</sup> O,O'-Bis(2-aminopropyl) polypropylene glycol-block-polyethylene glycol-block-polypropylene glycol

<sup>10</sup> 1-[3-(Diméthylamino)propyl]-3-éthylcarbodiimide méthiodide

<sup>11</sup> N Hydroxysuccinimide



35 °C sous agitation durant 24 h. La température augmente l'agitation thermique des molécules EDCI et NHS, ce qui favorise leur rapprochement avec les groupements carboxyliques des particules, pendant que l'agitation mécanique évite la sédimentation des particules, ceci afin d'assurer une activation homogène.

La réaction d'activation se fait en présence d'un excès de EDCI/NHS par rapport au nombre de moles des groupements carboxyliques sur les surfaces des particules, afin d'assurer un état de saturation des groupements. Le mécanisme de la réaction est détaillé sur la Figure 4.14. L'addition de EDCI sur le groupement carboxylique forme un premier ester activé (ester EDCI) puis le NHS vient réagir alors sur l'ester EDCI pour former un deuxième ester activé plus stable (ester NHS). Après la période d'incubation, les particules sont lavées avec de l'eau DI afin d'éliminer l'excès de l'EDCI et NHS dans le milieu. Les particules avec des groupements ester activés sont récupérées dans de l'eau DI. Le groupement N-Hydroxysuccinimide de l'ester formé est un bon groupe partant face à un groupement amine. Il est alors possible de greffer un groupement fonctionnel pourvu d'une fonction amine. Dans notre cas, nous avons utilisé la chaîne moléculaire diamine « la Jeffamine 1,900 » (Figure 4.15) qui servira de lien rattachant deux groupements de deux particules voisines.

Le taux d'activation des groupements carboxyliques a été quantifié par spectrophotométrie en utilisant la toluidine Bleu O. Cette quantification se base sur la détermination des groupements carboxyliques non transformés en esters activés. Le protocole expérimental est le même que celui décrit au chapitre 2. Nous avons retrouvé un taux d'activation de 50 %, ce qui correspond à l'activation d'un groupement sur deux.

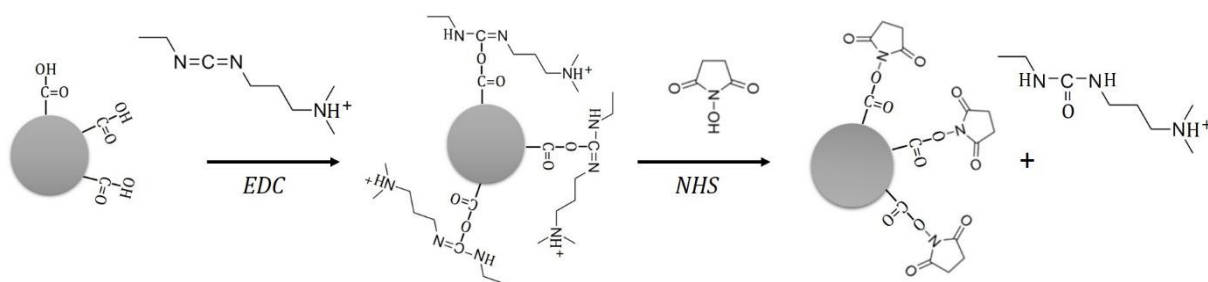


Figure 4.14 Schéma illustrant l'activation des groupements carboxyliques par la méthode carbodiimide avec EDCI/NHS (Sam et al., 2010 ; Haddour et al., 2010)

Avant de procéder à l'addition de la Jeffamine et à l'assemblage de ces particules par diélectrophorèse, nous avons tout d'abord déterminé les paramètres optimaux (fréquence et conductivité du milieu d'assemblage) pour la réalisation de ces assemblages.

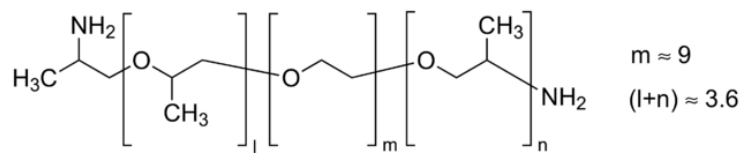


Figure 4.15 Structure de la Jeffamine 1,900

### 2.2. Assemblage des particules

#### 2.2.1. Détermination des paramètres diélectrophorétiques d'assemblage

Dans un premier temps, nous avons tenté d'assembler les particules en polystyrène de  $1\ \mu\text{m}$  portant des groupements ester activés dans de l'eau DI. Afin de déterminer la fréquence optimale, nous avons tracé le spectre diélectrophorétique des particules pour la condition  $\sigma_m = 0$  en utilisant leurs propriétés déterminées au chapitre 2 et résumées dans le tableau suivant :

Particules en polystyrène $1\ \mu\text{m}$ (COOH)				
	$\sigma_m$ (mS/m)	$K_s^i$ (nS)	$K_s$ (nS)	$\sigma_p$ (S/m)
<b>Eau DI</b>	0	0.24-0.3	0.24-0.3	$0.9 \times 10^{-3} - 1.3 \times 10^{-3}$
<b>KCl</b>	5,7	0.24-0.3	0.75-0.81	$3.0 \times 10^{-3} - 3.3 \times 10^{-3}$

Tableau 4.2 Propriétés électriques des particules en polystyrène de  $1\ \mu\text{m}$  dans deux milieux de conductivités différentes.

Le spectre diélectrophorétique représentant la variation de la partie réelle du facteur de Clausius Mossotti en fonction de la fréquence est tracé sur la Figure 4.16.A. Deux courbes ont été tracées, ceci en raison de la fréquence de transition qui ne correspond pas à une valeur très précise, mais dont la valeur se trouve dans un certain intervalle (chapitre 2). La conductivité de la particule est donc elle-même comprise entre deux valeurs, pour lesquelles deux tracés sont obtenus. A partir du spectre moyen, nous avons choisi de réaliser l'assemblage en appliquant un signal de fréquence 500 kHz et d'amplitude  $10\ \text{V}_{pp}$ . D'après le tracé, à cette fréquence, l'amplitude de la force de DEPn est maximale.

Pour réaliser l'assemblage de particules, de la Jeffamine dissoute dans de l'eau DI a été ajoutée à la suspension colloïdale. Après homogénéisation, un volume de  $100\ \mu\text{l}$  a été déposé dans la chambre en PDMS (Figure 4.10), avant application directe du signal électrique ( $10\ \text{V}_{pp}$ , 500 kHz). Dès l'application du champ électrique, les particules subissent la diélectrophorèse négative et sont repoussées vers les zones de faible intensité de champ se trouvant au centre de l'espace inter-électrodes (Figure 4.16).

L'assemblage a commencé dès l'application de la tension. Après 20 min d'exposition, le champ électrique a été annulé. Quelques secondes après, les particules se sont re-dispersées. L'expérience a été répétée dans les mêmes conditions (eau DI, même signal appliqué aux électrodes) pour différentes concentrations de Jeffamine avec différentes durées d'exposition au champ électrique (de 20 min à 1h 30 min), mais aucun assemblage permanent n'a pu être obtenu.

Les variations de la concentration de la Jeffamine ont été réalisées à partir d'une concentration seuil estimée par rapport à la quantité de groupements carboxyliques activés présents sur les particules dans le milieu d'assemblage (1 Jeffamine pour 2 groupements ester activé).

La variation du temps d'exposition au champ électrique et de la concentration de l'agent de couplage ne nous ayant pas permis de réaliser des assemblages permanents, nous avons cherché à réaliser d'autres tests en modifiant la conductivité du milieu d'assemblage.

Ceci peut se réaliser en rajoutant un sel. Nous avons choisi d'utiliser un sel monovalent, le chlorure de potassium KCl. Le fait que le sel employé soit monovalent permet notamment de simplifier certains calculs effectués lors de l'étude théorique de l'assemblage.

Nous avons tracé différents spectres diélectrophorétiques pour différentes conductivités et donc différentes concentrations en KCl. Nous avons constaté qu'à partir d'une conductivité de 3 mS/m, la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti était négative au-delà de 10 kHz, et variait entre 0 et -0.5. Nous avons choisi une conductivité un peu plus élevée ( $\sigma_m=5.7$  mS/m), déjà utilisée pour réaliser les assemblages non permanents de particules en polystyrène de 3  $\mu\text{m}$ -(COOH) (chapitre 3).

Le spectre diélectrophorétique obtenu pour cette conductivité ( $\sigma_m=5.7$  mS/m) est représenté sur la figure 4.16.B. Dans ces conditions expérimentales, le régime de DEPn se manifeste dans tout l'intervalle de fréquences. Afin d'éviter de travailler aux fréquences basses et hautes auxquelles des phénomènes d'électroosmose et d'électrothermie ont pu être observés, nous avons choisi une fréquence moyenne d'assemblage de 500 kHz.



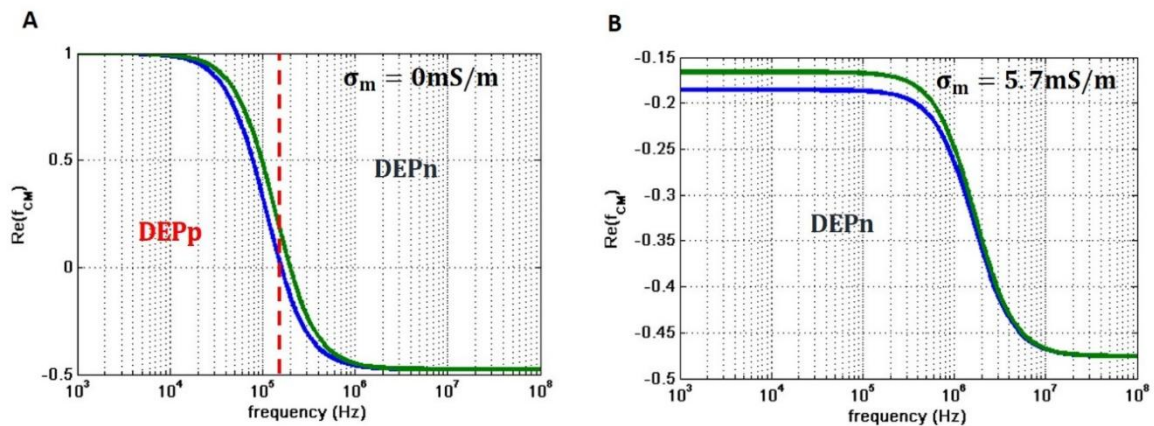


Figure 4.16 Spectre diélectrophorétique représentant la variation de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence pour des particules de polystyrène de 1  $\mu\text{m}$  portant des groupements carboxyliques en surface dans deux milieux différents. A) Eau dé-ionisée  $\sigma_m=0$  mS/m B) milieu KCl  $\sigma_m=5,7$ mS/m.

### 2.2.2. Assemblage permanent des particules en polystyrène dans un milieu contenant du KCl

Comme pour les expériences décrites précédemment, de la Jeffamine dissoute dans de l'eau DI a été rajoutée aux particules en suspension. L'addition de la Jeffamine n'affecte pas la conductivité du milieu, ceci a été contrôlé par des mesures au conductimètre. Les particules ont ensuite été exposées à un champ non uniforme généré à l'aide d'un signal sinusoïdal d'amplitude 10  $V_{pp}$  et de fréquence 500 kHz. La Figure 4.17 nous permet d'observer leur regroupement dans les zones de champ minimum sous l'effet de la DEPn.

Une expérience témoin a également été réalisée. Elle consistait à réaliser l'assemblage de particules en polystyrène de 1  $\mu\text{m}$  dont les groupements étaient esters activés, en l'absence de Jeffamine dans le milieu (Figure 4.17.B).

En présence de Jeffamine (Figure 4.17.A), en plus des assemblages obtenus au centre des espaces inter-électrodes, nous avons observé la présence de filaments formés sur les bords des électrodes par DEPp. Ceci est probablement dû au changement des charges de surfaces de certaines particules qui deviennent positives. En effet, étant donné que la Jeffamine est mise en contact avec les particules avant application de la tension, certaines molécules de Jeffamine peuvent déjà se lier aux groupements ester activés. Ce changement d'état de surface peut engendrer une modification du comportement diélectrophorétique des particules. Comme expliqué aux chapitres précédents, le comportement diélectrophorétique dépend de la conductance de surface  $K_s$  qui dépend à son tour de la distribution des charges au niveau de la couche de Stern et de la couche diffuse.

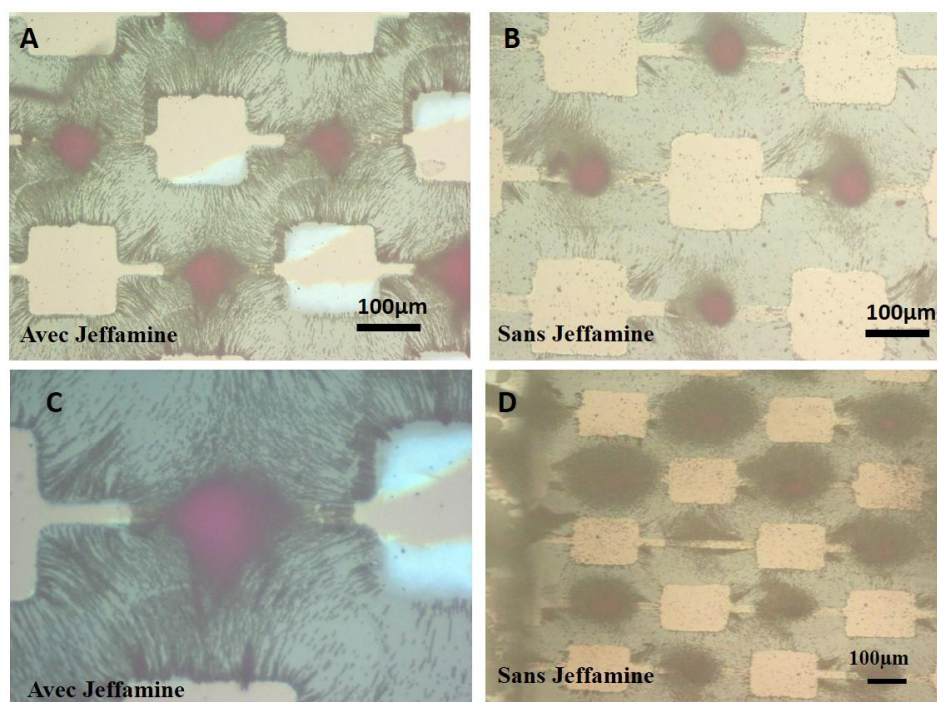


Figure 4.17 A) Particules en polystyrène de 1 µm avec des groupements ester activés sous champ électrique non uniforme en présence de Jeffamine. B) Particules en polystyrène de 1 µm avec des groupements ester activés sous champ électrique non uniforme en absence de Jeffamine. C) Assemblage permanent des particules assuré par la présence de Jeffamine, comme en témoigne la persistance des structures après coupure du champ électrique. D) Redispersion des particules dans le milieu après annulation du champ électrique en raison de l'absence de Jeffamine.

Lorsque le champ électrique est annulé et cela après 20 minutes d'exposition, on remarque que les assemblages réalisés en absence de Jeffamine se redispersent (Figure 4.17.D), contrairement aux assemblages réalisés en présence de cette dernière (Figure 4.17.C). La redispersion des particules après coupure du champ électrique en absence de l'agent de couplage confirme que c'est la Jeffamine qui assure le couplage permanent.

Etant donné que les groupements N-Hydroxysuccinimide de l'ester formé sont très labiles et sont de bons groupes partants face à des groupements amines, ces groupements sont remplacés par les groupements amines des extrémités de la Jeffamine. Dans l'idéal, les deux extrémités amines d'une molécule de Jeffamine se lient de manière covalente sur deux particules différentes, ce qui maintiendra les particules assemblées (Figure 4.18). Cependant, il est possible dans certains cas que les extrémités de la Jeffamine soient liées à deux groupements de la même particule, ou que certaines particules voisines se retrouvent saturées en Jeffamine, ce qui provoquera une répulsion entre elles. Ceci est une des raisons de la présence de particules individuelles après la coupure du champ.

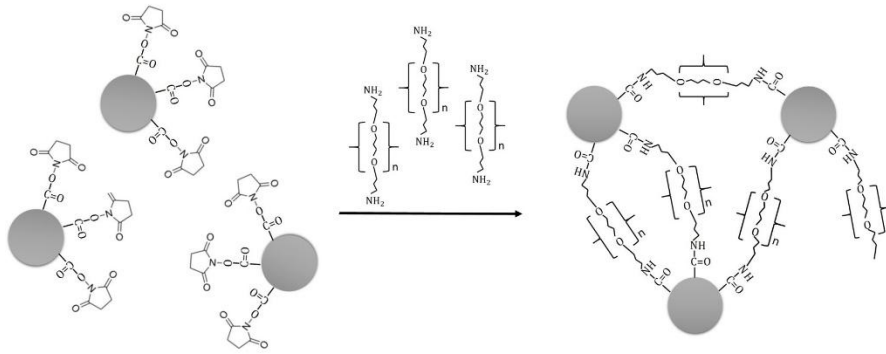


Figure 4.18 Schéma représentant la formation des assemblages permanents assurés par la Jeffamine.

Afin de confirmer que nous étions bien en présence d'assemblages permanents dans lesquels les particules sont liées par des liaisons covalentes, un volume de 10  $\mu\text{l}$  de SDS à 20% a été rajouté à l'intérieur de la chambre contenant les assemblages puis le tout a été exposé aux ultrasons. Etant donné que les particules sont fluorescentes et afin de bien observer les assemblages permanents, nous avons réalisé des observations au microscope à fluorescence. Les résultats sont présentés sur la figure 4.19. Ces derniers révèlent la présence d'assemblages qui sont restés étroitement liés et dont la taille est presque équivalente à celle des assemblages avant action du SDS et des ultrasons. Ces résultats nous laissent conclure que les particules sont étroitement liées par des liaisons covalentes grâce à l'agent chimique, la Jeffamine.

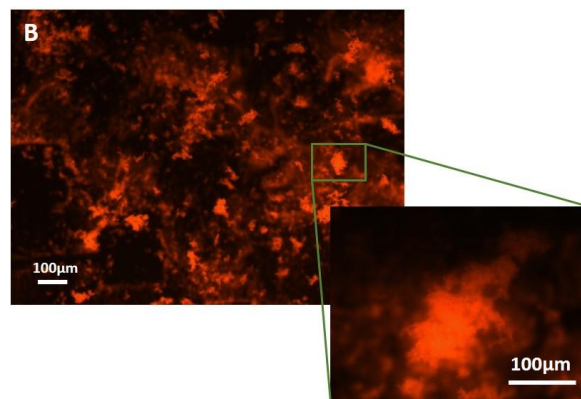


Figure 4.19 Image de microscopie à fluorescence d'assemblages permanents de particules en présence de SDS et après action mécanique.

### 2.3. Etude de l'assemblage par la théorie de DLVO

Afin de décrire théoriquement le processus d'assemblage étudié ici, nous avons utilisé la théorie DLVO, qui permet d'étudier la stabilité des colloïdes. Cette théorie prend en compte deux types d'interactions existant entre les surfaces des particules colloïdales, déjà évoquées au chapitre 1 : l'attraction de van der Waals, et la répulsion électrostatique.

L'énergie potentielle d'interaction totale ( $U_{DLVO}$ ) est la somme des énergies d'interactions attractives de VDW ( $U_{VDW}$ ) et répulsives électrostatiques ( $U_{EL}$ ) (eq. 1.12) Elle est présentée en fonction de la distance de séparation entre les particules (Figure 4.20.C).

Pour calculer la contribution électrostatique  $U_{EL}$ , le modèle développé par Campos et son équipe (eq.1.7) est utilisé (Campos et al.,2008). Ce dernier exige la connaissance de la densité de charge  $Q$  (eq 4.1), du potentiel de surface  $\psi_0$  (eq.4.2) et du potentiel zêta ( $\zeta$ ) des particules ainsi que de la longueur de Debye (eq1.11).

$$Q = \frac{\epsilon_m \lambda_D k_B T}{e} \left[ \exp\left(\frac{e\zeta}{2k_B T}\right) - \exp\left(-\frac{e\zeta}{2k_B T}\right) + \frac{4}{Kr} \cdot \frac{\exp(e\zeta/2k_B T) - 1}{\exp(e\zeta/2k_B T) + 1} \right] \quad (4.1)$$

$$\psi_0 = \frac{Q}{(\lambda_D \epsilon_m)} \quad (4.2) \text{ (Ohsawal et al., 1986).}$$

Avec  $Q$  : densité de charge (C/m<sup>2</sup>),  $\psi_0$  potentiel de surface (V),  $\epsilon_m = \epsilon_r \epsilon_0$  permittivité du milieu,  $\lambda_D$  Longueur de Debye (m<sup>-1</sup>),  $k_B$  constante de Boltzman ( $k_B = 1.381 \times 10^{-23}$  J.K-1),  $\zeta$  potentiel zeta (V),  $r$  le rayon d'une particule (m),  $T$  température en Kelvin.

Concernant l'énergie potentielle d'interaction de van der Waals, l'expression telle que définie au chapitre 1 (eq.1.6) est utilisée. Elle exige quant à elle de connaître la constante de Hamaker, qui dépend des propriétés des particules ainsi que de celles de leur milieu de dispersion tels que l'indice de réfraction ( $n_p = 1.58$ ,  $n_m = 1.3$ ), la permittivité des particules et celle du milieu ( $\epsilon_p = 2.26 \times 10^{-11}$  et  $\epsilon_m = 6.90 \times 10^{-10}$  respectivement), et le rayon des particules (0.5  $\mu$ m).

Cette étude est réalisée pour deux conditions expérimentales différentes, correspondant à l'emploi d'un milieu à base d'eau DI et de KCl ( $\sigma_{eau} = 0$  mS/m et  $\sigma_{KCl} = 5.7$  mS/m) respectivement. Les propriétés du système influencées par la variation de la conductivité (ou concentration) du milieu ont été calculées pour les deux conditions expérimentales. Leurs valeurs sont résumées dans le tableau 4.3.

Pour des raisons liées au calcul, nous n'avons pas utilisé la conductivité de l'eau DI  $\sigma_{eau} = 0$  mS/m, mais nous avons tout de même effectué l'étude pour une conductivité faible  $\sigma_{KCl} = 0.5$  mS/m, inférieure à celle à laquelle le couplage chimique a fonctionné. Par ailleurs, dans la gamme de conductivités comprises entre 0.5 et 13 mS/m, la valeur du potentiel zêta mesurée ne variait pas. Pour cette raison, nous avons utilisé la même valeur (-0.91mV) pour les deux cas étudiés.

	Concentration en KCl (moles/m <sup>3</sup> )	longueur de Debye (m <sup>-1</sup> )	Densité de charge (C/m <sup>2</sup> )	Potentiel de surface (V)
$\sigma_{KCl}=0.5\text{mS/m}$	0.033	$52\times 10^{-9}$	$-0.19\times 10^{-2}$	-0.14
$\sigma_{KCl}=5.7\text{mS/m}$	0.38	$15\times 10^{-9}$	$-0.64\times 10^{-2}$	$-1.9 \cdot 10^{-3}$

Tableau 4.3 Résumé des propriétés du système colloïdal constitué de particules en polystyrène de 1  $\mu\text{m}$  avec des groupements carboxyliques en surface dans les deux conditions de conductivités  $\sigma_{KCl}=0.5\text{mS/m}$  et  $5.7\text{mS/m}$  respectivement.

Sur la base de ces calculs, les énergies électrostatiques et de Van der Waals ont pu être tracées en fonction de la distance inter-particules (Figure 4.20). Les énergies indiquées sont des valeurs exprimées par rapport à l'énergie thermique ( $k_B T$ ). A partir de ces tracés, nous pouvons constater que pour les deux conditions expérimentales, l'énergie d'attraction en fonction de la distance inter-particules est très faible et ne varie pas. Autrement dit, les interactions de VDW ne sont pas influencées par le changement de la conductivité du milieu (Figure 4.20.B). A l'opposé, le profil de l'énergie électrostatique est fonction de la conductivité du milieu, il dépend de la concentration ionique dans le milieu (Figure 4.20.A).

D'après le profil DLVO (Figure 4.20.C), nous constatons que l'énergie totale d'interaction  $\left(\frac{U_{DLVO}}{k_B T}\right) \gg 1$  et tend vers des valeurs positives, ce qui explique que l'agitation thermique est insuffisante pour dépasser la barrière de l'énergie de répulsion qui est beaucoup plus importante.<sup>12</sup> Les interactions électrostatiques répulsives prennent le dessus dans les deux conditions expérimentales. Les particules subissent une répulsion entre elles à partir d'une distance inter-particulaire représentée par les flèches rouge et bleu sur la Figure 4.20.C.

Plus la conductivité du milieu augmente (c'est-à-dire plus la concentration ionique augmente), plus la distance inter-particules à partir de laquelle les forces de répulsion s'exercent diminue. Ceci s'explique par la compression de la double couche et la diminution de son épaisseur représentée par la longueur de Debye (tableau 4.3) qui passe de 52 nm dans le milieu KCl de conductivité  $\sigma_m=0.5\text{mS/m}$  à 15 nm dans le milieu KCl le plus concentré en ions ( $K^+$  et  $Cl^-$ ) avec une conductivité de  $\sigma_m=5.7\text{mS/m}$ . Cette réduction de la longueur de Debye ( $\lambda_D$ ) permet le rapprochement entre les particules en réduisant la distance à partir de laquelle les forces de répulsion commencent à agir. Dans notre cas, les profils DLVO montrent que la distance de séparation inter-particules passe de 250 nm dans le milieu KCl à  $\sigma_m=0.5 \text{ mS/m}$  à moins de 70 nm dans le milieu KCl à  $\sigma_m=5.7 \text{ mS/m}$ .

<sup>12</sup> 10 est l'énergie théorique maximale fournie par l'agitation thermique à un système.

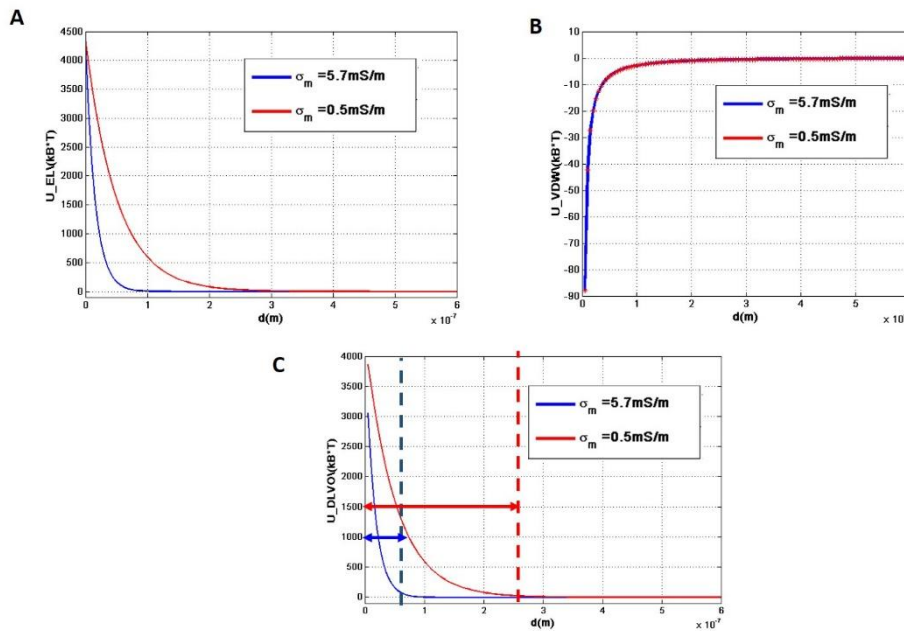


Figure 4.20 Tracés représentant les énergies potentielles d'interaction dans le système contenant des particules en polystyrène de 1  $\mu\text{m}$  avec des groupements carboxyliques en surface en fonction de la distance inter-particules pour deux conditions expérimentales différentes  $\sigma_m = 0.5 \text{ mS/m}$  et  $5.7 \text{ mS/m}$  respectivement. A) énergie d'attraction de Van der Waals (VDW), B) énergie électrostatique (EL), C) énergie d'interaction totale (DLVO).

Ces résultats indiquent que le fait d'augmenter la concentration du milieu réduit la distance inter-particules, ce qui favorise le rapprochement des particules et devrait effectivement faciliter le couplage chimique. Mais la distance obtenue reste encore grande pour permettre à la Jeffamine 1,900 Sigma de se lier à deux particules distancées de quelques dizaines de nanomètres étant donné que nous avons estimé sa longueur moyenne à environ 7 nm. Nous avons déduit cette longueur de chaîne de Jeffamine, en nous basant sur les longueurs des chaînes PEG (PolyEthylène Glycol) décrites dans les spécifications des fournisseurs de ce produit. En effet, la Jeffamine étant une chaîne PEG avec aux extrémités des groupements amines, il est possible de comparer le nombre de motifs éthylène glycol de la Jeffamine à celui d'un PEG pour avoir une estimation de la longueur de la chaîne. La Jeffamine 1,900 que nous avons employée présente 12 à 13 motifs éthylène glycol dans sa structure. Pour ce même nombre de motifs dans un PEG, la longueur de la chaîne est estimée à 7 nm<sup>13</sup>.

Cependant, dans le cadre de nos travaux, cette approche demeure incomplète car au cours des assemblages par diélectrophorèse négative, les particules sont soumises à un champ électrique, ce qui signifie qu'elles subissent aussi l'énergie d'interaction dipôle-dipôle

<sup>13</sup> <http://www.piercenet.com/product/smpegn-series>



électrique donc, il est possible d'aller au-delà de la simple théorie DLVO, en ajoutant à l'énergie  $U_{DLVO}$  l'énergie d'attraction dipolaire électrique  $U_{dip-dip}$ .

Avant d'additionner ces énergies, nous avons tout d'abord tracé le profil de cette énergie électrique  $U_{dip-dip}$  en fonction de la distance inter-particules (Figure 4.21.A). Cette énergie a été calculée selon l'équation 1.14 (Hu et al.,1994 ; Mittal et al., 2008). La dérivée de cette énergie nous a permis de tracer le profil de la force dipolaire en fonction de la distance inter-particules (eq.4.3)(Figure 4.21.B) dans les conditions d'assemblage avec une fréquence de 500 kHz et un champ électrique de  $1 \times 10^5$  (V.m-1).

$$F_{dip-dip} = -\nabla U_{dip-dip} \quad (4.3) \text{ (Mittal et al., 2008)}$$

Afin de simplifier le calcul de cette force dipolaire, nous avons considéré le cas d'un système d'électrodes parallèles simple produisant un champ électrique uniforme d'intensité  $1 \times 10^5$  V/m. Nous avons examiné la dépendance de la force dipolaire au changement des conditions du milieu, plus précisément à la variation de la conductivité du milieu (variation de la concentration de KCl) pour un angle  $\theta=0$  pour lequel la force d'interaction est maximale. Nous avons constaté que la force d'interaction dipôle-dipôle électrique diminuait lorsque la conductivité du milieu augmentait. Ce phénomène est cohérent avec les résultats obtenus par Mittal (Mittal et al., 2008). Les forces d'interaction dipôle-dipôle obtenues sont faibles, de l'ordre du pico-Newton.

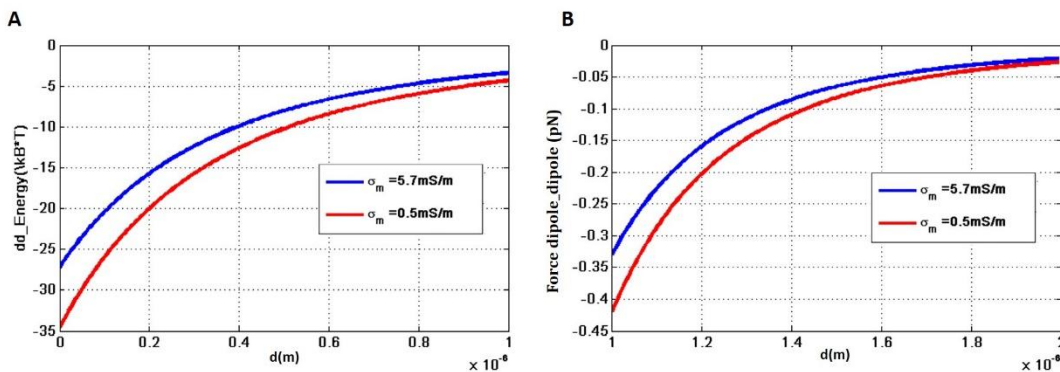


Figure 4.21 A) tracé de l'énergie d'interaction dipôle-dipôle électrique, B) tracé de la force d'interaction dipôle-dipôle électrique des particules en polystyrène de  $1 \mu\text{m}$  avec des groupements carboxyliques sur leurs surfaces pour deux conditions expérimentales différentes ( $\sigma_{KCl} = 0.5 \text{ mS/m}$  et  $5.7 \text{ mS/m}$ ).

L'énergie d'interaction dipôle-dipôle électrique  $U_{dip-dip}$  a été additionnée à l'énergie  $U_{DLVO}$

$$U_{Totale} = U_{DLVO+Dip-Dip} = U_{DLVO} + U_{dip-dip} \quad (4.4)$$

Le profil de l'énergie totale en fonction de la distance inter-particule est presque identique à celui de l'énergie DLVO seule, en raison des faibles valeurs de l'énergie attractive dipôle-dipôle électrique (Figure 4.22).

Cette étude que nous avons menée pour expliquer l'assemblage permanent est incomplète car la force diélectrophorétique est aussi impliquée dans le phénomène de rapprochement des particules. Elle peut participer de manière significative au rapprochement des particules afin de permettre à l'agent de couplage de se lier aux groupements des différentes particules pour assurer l'assemblage. De plus, nous avons simplifié le raisonnement en considérant un système d'électrodes coplanaires parallèles, différent de notre système d'électrodes quadripolaires. Par manque de temps, cette étude théorique n'a pas été menée jusqu'au bout, mais elle reste tout de même une ébauche prometteuse pour expliquer cette approche d'assemblage par DEP et couplage chimique.

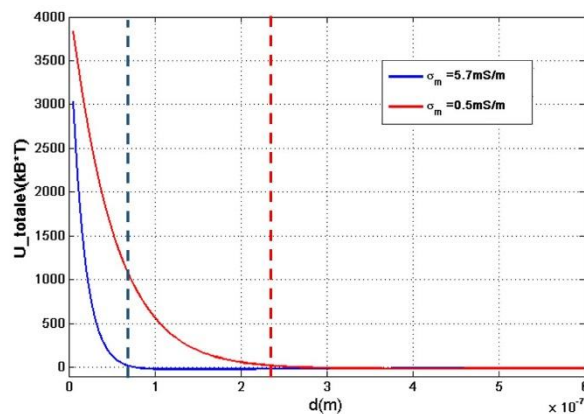


Figure 4.22 Tracé de l'énergie d'interaction totale regroupant l'énergie DLVO et l'énergie dipôle-dipôle électrique.

Par ailleurs, nous avons pu constater que l'association d'une méthode de couplage chimique à la diélectrophorèse demande un travail minutieux d'optimisation des conditions d'assemblage (composition du milieu, conductivité, concentration ionique) car la diélectrophorèse est généralement effectuée dans des milieux de faibles conductivités contrairement à l'assemblage par force magnétique pour lesquels le problème ne se pose pas. Ceci signifie qu'il n'est pas toujours possible d'appliquer les protocoles établis pour l'assemblage magnétique pour réaliser des assemblages par diélectrophorèse.



### 3. Conclusion

Nous avons présenté dans ce chapitre l'assemblage permanent de cellules vivantes et de particules en polystyrène, en utilisant le microsysteme constitué d'un réseau d'électrodes quadripolaires.

La première partie a été dédiée à l'assemblage par DEPn de cellules vivantes, sous forme d'agrégats compacts et de patterns cellulaires adhérant à la surface de PDMS fonctionnalisée avec de la poly-l-lysine. Dans un premier temps, nous avons prouvé la double fonction de la fine couche de PDMS constituant le dispositif. Elle joue le rôle d'isolant pour changer la configuration des électrodes, de bipolaire à quadripolaire (chapitre 3), mais elle sert aussi de support biocompatible pour l'adhésion du pattern cellulaire après sa structuration. La méthode d'agrégation cellulaire présentée peut être applicable à une large gamme de cellules animales. L'utilisation de techniques d'ingénierie de surface permettant l'adhérence sélective de cellules pourrait augmenter son utilité. Des preuves de la viabilité des cellules ont été présentées, ces dernières sont très qualitatives et basées sur des observations. Ainsi, d'autres études biologiques et physiologiques sont encore nécessaires pour évaluer la viabilité à long terme des structures assemblées.

Concernant l'assemblage permanent des particules en polystyrènes, nous avons présenté notre nouvelle approche combinant la dielectrophorèse à une méthode chimique basée sur l'addition d'agent chimique « la Jeffamine » pour rendre les assemblages permanents. Nous avons commencé par présenter les étapes de pré-assemblage et de préparation des particules, puis la difficulté de réaliser ce type d'assemblage dans des conditions de faible conductivité. Enfin, une ébauche d'une étude théorique expliquant ce phénomène d'assemblage a été proposée. A partir de cette étude, nous avons pu démontrer que l'assemblage par DEP et couplage chimique requiert une bonne connaissance des propriétés du système colloïdal manipulé mais aussi celle du milieu utilisé.

### Références

- Abdallat, R. G., Tajuddin, A. S. A., Gould, D. H., Hughes, M. P., Fatoyinbo, H. O., & Labeed, F. H. (2013). Process development for cell aggregate arrays encapsulated in a synthetic hydrogel using negative dielectrophoresis, 1059–1067. doi:10.1002/elps.201200459
- Attwell, D., Cohen, I., & Eisner, D. (1979). Membrane potential and ion concentration stability conditions for a cell with a restricted extracellular space. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*, 206(1163), 145-161.
- Chia-lun, J. H., & Barnes, F. S. (1975). A simplified theory of pearl chain effects. *Radiation and environmental biophysics*, 12(1), 71-76.
- El-Gaddar, A., Frénéa-Robin, M., Voyer, D., Aka, H., Haddour, N., Krähenbühl, L., 2013. Assessment of 0.5 T static field exposure effect on yeast and HEK cells using electrorotation. *Biophys. J.* 104, 1805–11. doi:10.1016/j.bpj.2013.01.063
- Frénéa, M., Faure, S. P., Le Pioufle, B., Coquet, P., & Fujita, H. (2003). Positioning living cells on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis. *Materials Science and Engineering: C*, 23(5), 597–603. doi:10.1016/S0928-4931(03)00055-9
- Fuhr, G., Glasser, H., Müller, T., & Schnelle, T. (1994). Cell manipulation and cultivation under ac electric field influence in highly conductive culture media. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1201(3), 353-360.
- Glasser, H., & Fuhr, G. (1998). Cultivation of cells under strong ac-electric field differentiation between heating and trans-membrane potential effects. *Bioelectrochemistry and bioenergetics*, 47(2), 301-310.
- Gray, D. S., Tan, J. L., Voldman, J., & Chen, C. S. (2004). Dielectrophoretic registration of living cells to a microelectrode array. *Biosensors and Bioelectronics*, 19(12), 1765–1774. doi:10.1016/j.bios.2004.03.016
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., & Nairn, R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *Journal of General Virology*, 36(1), 59-72.
- Huang, Y., Pethig, R., 1991. Electrode design for negative dielectrophoresis. *Meas. Sci. Technol.* 2, 1142.
- Ho, C.-T., Lin, R.-Z., Chang, W.-Y., Chang, H.-Y., & Liu, C.-H. (2006). Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap. *Lab on a chip*, 6(6), 724–34. doi:10.1039/b602036d
- Ivorra, A., Villemejeane, J., & Mir, L. M. (2010). Electrical modeling of the influence of medium conductivity on electroporation. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 12(34), 10055-10064.
- Khetani, S.R., Bhatia, S.N., 2006. Engineering tissues for in vitro applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* 17, 524–31. doi:10.1016/j.copbio.2006.08.009
- Kotnik, T., & Miklavcic, D. (2000). Second-order model of membrane electric field induced by alternating external electric fields. *Biomedical Engineering, IEEE Transactions on*, 47(8), 1074-1081.

- Liu, W.F., Chen, C.S., 2007. Cellular and multicellular form and function. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59, 1319–28. doi:10.1016/j.addr.2007.08.011
- Matsumoto, N., & Uchidab, I. (1997). Rapid micropatterning of living cells by repulsive dielectrophoretic force, *42*(1), 3251–3256.
- Menad, S., El-Gaddar, A., Haddour, N., Toru, S., Brun, M., Buret, F., & Frenea-Robin, M. (2014). From bipolar to quadrupolar electrode structures: an application of bond-detach lithography for dielectrophoretic particle assembly. *Langmuir: the ACS journal of surfaces and colloids*. doi:10.1021/la5005193
- Osman, O., Zanini, L. F., Frénéa-Robin, M., Dumas-Bouchiat, F., Dempsey, N. M., Reyne, G., ... & Haddour, N. (2012). Monitoring the endocytosis of magnetic nanoparticles by cells using permanent micro-flux sources. *Biomedical microdevices*, *14*(5), 947-954.
- Peterson, S. L., McDonald, A., Gourley, P. L., & Sasaki, D. Y. (2005). Poly (dimethylsiloxane) thin films as biocompatible coatings for microfluidic devices: cell culture and flow studies with glial cells. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, *72*(1), 10-18.
- Pohl, H. a, Crane, J.S., 1971. Dielectrophoresis of cells. *Biophys. J.* 11, 711–27. doi:10.1016/S0006-3495(71)86249-5
- Pontani, L.-L., Jorjadze, I., Viasnoff, V., Brujic, J., 2012. Biomimetic emulsions reveal the effect of mechanical forces on cell-cell adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109, 9839–44. doi:10.1073/pnas.1201499109
- Puttaswamy, S. V., Sivashankar, S., Chen, R.-J., Chin, C.-K., Chang, H.-Y. and Liu, C. H. (2010), Enhanced cell viability and cell adhesion using low conductivity medium for negative dielectrophoretic cell patterning. *Biotechnology Journal*, 5: 1005–1015. doi: 10.1002/biot.201000194
- Sam, S., Touahir, L., Salvador Andresa, J., Allongue, P., Chazalviel, J. N., Gouget-Laemmel, A. C., ... & Djebbar, S. (2009). Semiquantitative study of the EDC/NHS activation of acid terminal groups at modified porous silicon surfaces. *Langmuir*, *26*(2), 809-814.
- Sebastian, A., Buckle, A., Markx, G.H., 2007. Tissue Engineering With Electric Fields : Immobilization of Mammalian Cells in Multilayer Aggregates Using Dielectrophoresis 98, 694–700. doi:10.1002/bit
- Vaillier, C., Honegger, T., Kermarrec, F., Gidrol, X., & Peyrade, D. (2014). Comprehensive Analysis of Human Cells Motion under an Irrotational AC Electric Field in an Electro-Microfluidic Chip. *PLoS one*, *9*(4), e95231.
- Wang, L., Lu, J., Marchenko, S. A., Monuki, E. S., Flanagan, L. A., & Lee, A. P. (2009). Dual frequency dielectrophoresis with interdigitated sidewall electrodes for microfluidic flow-through separation of beads and cells. *Electrophoresis*, *30*(5), 782-791.
- Wheelock, M. J., & Johnson, K. R. (2003). Cadherin-mediated cellular signaling. *Current opinion in cell biology*, *15*(5), 509-514.

- Wu, M.-H. (2009). Simple poly(dimethylsiloxane) surface modification to control cell adhesion. *Surface and Interface Analysis*, 41(1), 11–16. doi:10.1002/sia.2964
- Wu, M.-H., Huang, S.-B., Lee, G.-B., 2010. Microfluidic cell culture systems for drug research. *Lab Chip* 10, 939–56. doi:10.1039/b921695b
- Yu, Zhe, Xiang, G., Pan, L., Huang, L., Yu, Zhongyao, Xing, W., Cheng, J., 2004. Negative dielectrophoretic force assisted construction of ordered neuronal networks on cell positioning bioelectronic chips. *Biomed. Microdevices* 6, 311–24. doi:10.1023/B:BMMD.0000048563.58129.76
- Zimmermann, D., Kiesel, M., Terpitz, U., Zhou, a, Reuss, R., Kraus, J., Schenk, W. a, Bamberg, E., Sukhorukov, V.L., 2008. A combined patch-clamp and electrorotation study of the voltage- and frequency-dependent membrane capacitance caused by structurally dissimilar lipophilic anions. *J. Membr. Biol.* 221, 107–21. doi:10.1007/s00232-007-9090-4

### CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux de recherche présentés dans ce manuscrit avaient pour objectif de développer une nouvelle approche combinant la manipulation par diélectrophorèse et une méthode de couplage permanent pour assembler de manière irréversible des cellules et des particules synthétiques sur de larges surfaces.

Dans le premier chapitre, nous avons présenté et comparé différentes méthodes de manipulation de micro et nano-objets avec ou sans contact, mettant en jeu des forces (capillaires, hydrodynamiques, diélectrophorétique, optiques, acoustiques, magnétiques, mécanique...). Cette étude comparative s'est essentiellement basée sur la capacité des méthodes de manipulation à contrôler la taille et la forme des assemblages, la possibilité de leur mise en réseau et la nature des objets qu'elles peuvent manipuler. Ceci nous a permis d'opter pour l'utilisation de la diélectrophorèse. Par ailleurs, nous avons aussi présenté les différentes méthodes de couplage associées aux techniques de manipulation sans contact pour rendre les assemblages permanents. Nous avons pu ainsi mettre en évidence l'intérêt de développer une nouvelle approche d'assemblage permanent de micro et nano-objets de différentes natures combinant la diélectrophorèse et une méthode de couplage.

La deuxième partie de ce chapitre présentait les fondements théoriques des principes mis en application par la suite dans la manipulation diélectrophorétique des particules et des cellules. Cette partie nous a notamment permis d'introduire le phénomène de diélectrophorèse négative qui entraîne le déplacement des micro-objets vers les minima de champ électrique et de mettre en évidence les paramètres influençant la force de manipulation diélectrophorétique (la taille des micro-objets manipulés, leurs charges de surface ainsi que la composition du milieu utilisé). Ceci nous a confirmé qu'une connaissance de toutes ces propriétés faciliterait la détermination des paramètres diélectrophorétiques nécessaires à la réalisation des assemblages.

Le deuxième chapitre avait pour principal objectif de présenter les travaux de caractérisation physico-chimique et électrique des micro-objets manipulés dans cette thèse (particules et cellules). La caractérisation physico-chimique s'est basée essentiellement sur l'étude des propriétés de surface des particules en polystyrène dans le but de confirmer leur monodispersité et de quantifier les groupements chimiques présents sur leurs surfaces. Concernant la caractérisation électrique, elle a été réalisée pour déterminer les propriétés électriques des particules (conductance de surface et conductivité électrique pour un milieu de conductivité

donnée). Toutes ces propriétés ont été exploitées pour prédire le comportement diélectrophorétique des micro-objets et établir les protocoles d'assemblage. Elles ont également servi à alimenter des modèles théoriques que nous avons confrontés aux résultats expérimentaux.

Dans le troisième chapitre, une introduction sur les différentes géométries d'électrodes a été présentée, à partir de laquelle l'intérêt d'utiliser des structures d'électrodes quadripolaires et verticales pour la manipulation des micro-objets a été mis en avant. Nous avons présenté une nouvelle approche de structuration d'une fine couche de PDMS dérivée de la « Bond-detach lithography » et nous l'avons appliquée à la fabrication des microsystemes de manipulation. Cette nouvelle approche a permis la réalisation de deux microsystemes, l'un composé d'un réseau d'électrodes quadripolaires et l'autre constitué d'électrodes verticales. Les microsystemes développés présentent l'avantage d'être transparents, très peu coûteux et faciles à utiliser. Des simulations de la distribution du champ électrique montrent que la mise en réseau d'ensembles d'électrodes quadripolaires est favorable à la réalisation d'assemblages compacts de cellules et de particules. De plus, les électrodes verticales constituent une alternative prometteuse aux électrodes coplanaires, en permettant éventuellement l'exploitation de nouveaux effets 3D. Le caractère fonctionnel des microsystemes fabriqués a été démontré par la réalisation d'assemblages de microbilles de 3  $\mu\text{m}$  et de cellules HEK 293.

En réunissant des conditions expérimentales qui permettent de soumettre les micro-objets (particules en polystyrène et cellules HEK 293) à la DEP négative, nous avons pu les assembler en un réseau d'agrégats, comme montré au chapitre 4. Les assemblages cellulaires ont pu conserver leur caractère permanent, probablement grâce aux interactions naturelles bio-spécifiques de type cadhérine-cadhérine. Les assemblages de particules ont été rendus quant à eux permanents par une méthode de couplage chimique qui repose sur l'activation des groupements carboxyliques en surface pour greffer entre les particules et de manière covalente un agent de couplage, la Jeffamine. Une étude théorique préliminaire mais toutefois prometteuse des forces assurant l'assemblage des particules a également été présentée. Nous avons également testé avec succès le dispositif d'électrodes verticales en réalisant des assemblages de cellules par DEPn et DEPp.

Deux objectifs majeurs ont ainsi été atteints au terme de cette thèse:

- ❖ La conception et la fabrication de microsystemes transparents, peu onéreux avec un principe de fabrication très simple, capables d'assembler une large variété de micro-

objets en les plaçant dans des zones parfaitement délimitées sur un substrat par diélectrophorèse.

- ❖ La possibilité de combiner la diélectrophorèse à d'autres méthodes de couplage pour garder les assemblages permanents après la coupure du champ électrique.

De multiples axes de recherche peuvent potentiellement être développés dans le prolongement de ce travail de thèse. Parmi les champs d'études qui peuvent être approfondis, nous pouvons mentionner les aspects suivants :

**Aspect biologique** : Des indications concernant la viabilité des cellules dans les assemblages permanents ont été fournies. Ces résultats sont très qualitatifs et basés sur des observations au microscope. D'autres études biologiques et physiologiques sont encore nécessaires pour évaluer la viabilité à long terme des structures assemblées. Par ailleurs, des études de mécano-transduction pourraient également être menées afin d'expliquer les mécanismes impliqués dans l'adhésion cellule-cellule, rendant possible la formation d'agrégats cellulaires permanents.

**Aspects microfluidique** : Une meilleure intégration des canaux microfluidiques aux dispositifs de manipulation pourrait donner naissance à différentes applications de ces dispositifs tels que la réalisation de micro-incubateurs pour cultiver les agrégats cellulaires ou de puces à cellules appliquées à du screening moléculaire. L'intégration de canaux microfluidiques ouverts avec des dimensions micrométriques aux électrodes verticales serait tout à fait possible en employant des méthodes existantes d'intégration reposant sur l'utilisation de PDMS photosensible<sup>14</sup> ou sur des techniques d'Embossing<sup>15</sup>. L'intégration des électrodes quadripolaires dans un canal microfluidique en PDMS pourra quant à elle se faire très facilement par collage plasma entre la fine couche de PDMS et le microcanal, suivant une technique très utilisée au laboratoire<sup>16</sup>.

**Aspect chimique** : D'autres méthodes de couplage chimique peuvent être testées tels que l'utilisation d'hydrogels, d'agents réticulants « glutaraldéhyde », de polymères photosensibles ou de polymères électro-polymérisables.

---

<sup>14</sup> T. Honegger, K. Berton, T. Pinedo-Rivera, D. Peyrade Design and realization of a microfluidic system for dielectrophoretic colloidal Handling, *Microelectronic Engineering* 86 (2009) 1401–1403.

<sup>15</sup> A. Plecis, Y. Chen, Fabrication of microfluidic devices based on glass–PDMS–glass technology, *Microelectronic Engineering* 84 (2007) 1265–12693.

<sup>16</sup> Pivetal, J., Toru, S., Frenea-Robin, M., Haddour, N., Cecillon, S., Dempsey, N.M., Dumas-Bouchiat, F., Simonet, P., 2014. Selective isolation of bacterial cells within a microfluidic device using magnetic probe-based cell fishing. *Sensors Actuators B Chem.* 195, 581–589. doi:10.1016/j.snb.2014.01.004

*Aspect théorique* : L'étude théorique de l'assemblage permanent utilisant la simple théorie de DLVO à laquelle nous avons rajouté l'énergie d'interaction dipôle-dipôle électrique pourrait être affinée et complétée en prenant en compte les autres forces non DLVO ainsi que la force de diélectrophorèse. Par ailleurs, l'expression de la force d'interaction particule-particule pourrait être affinée en tenant compte du nombre de particules impliquées<sup>17</sup>.

---

<sup>17</sup> Moncada-Hernandez, H., Nagler, E., & Minerick, A. R. (2014). Theoretical and experimental examination of particle-particle interaction effects on induced dipole moments and dielectrophoretic responses of multiple particle chains. *Electrophoresis*.



## Annexes

### Annexe A : Quantification des groupements carboxyliques par toluidine bleu oxide

#### I. Protocole

- Prélèvement d'un volume de solution colloïdale contenant entre 500 et 1000  $\mu\text{g}$  de billes de polystyrène latex fonctionnalisées avec des groupements carboxylique COOH en surface.

##### 1. Lavage

Les billes sont placées dans un volume de 500  $\mu\text{l}$  d'eau DI.

Centrifugation pendant 10 min ( $T^\circ=24^\circ\text{C}$ , 10000 rpm).

Elimination du surnageant. Seul le culot contenant les billes est conservé.

*Remarque : 3 lavages doivent être effectués afin d'éliminer tout le tampon de stockage de la solution colloïdale.*

##### 2. Incubation en présence de TBO

Au bout du troisième lavage, le culot est récupéré et mis à incubation dans 1 ml de TBO (1mM NaOH+ 0.1 % TBO).

Laisser incuber pendant 15 min sous agitation à 1300 rpm, à une température  $T=40^\circ\text{C}$ .

Centrifugation pendant 3 min à 10000 rpm

Eliminer le surnageant et ne garder que le culot.

Le culot est lavé dans 1 ml de (1mM NaOH) sous agitation (5 min à 10000 rpm) à une température  $T=40^\circ\text{C}$ .

*Remarque : Plusieurs lavages doivent être effectués, jusqu'à ce que le surnageant soit clair.*

##### 3. Elution de la TBO

Après le dernier lavage, les billes sont récupérées et mises à incubation sous agitation dans 1 ml de 20% SDS pendant 30 min à 1300 rpm, à une température de  $T=40^\circ\text{C}$ .

##### 4. Quantification des molécules de TBO éluées dans le SDS

Cette étape consiste en une mesure d'absorbance à une longueur d'onde  $\lambda=630$  nm en utilisant un UV-spectromètre.

#### II. Courbe d'étalonnage de la TBO

La courbe d'étalonnage de la TBO a été réalisée pour des concentrations de TBO diluée dans du SDS à 20% comprises entre 0 et  $3 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

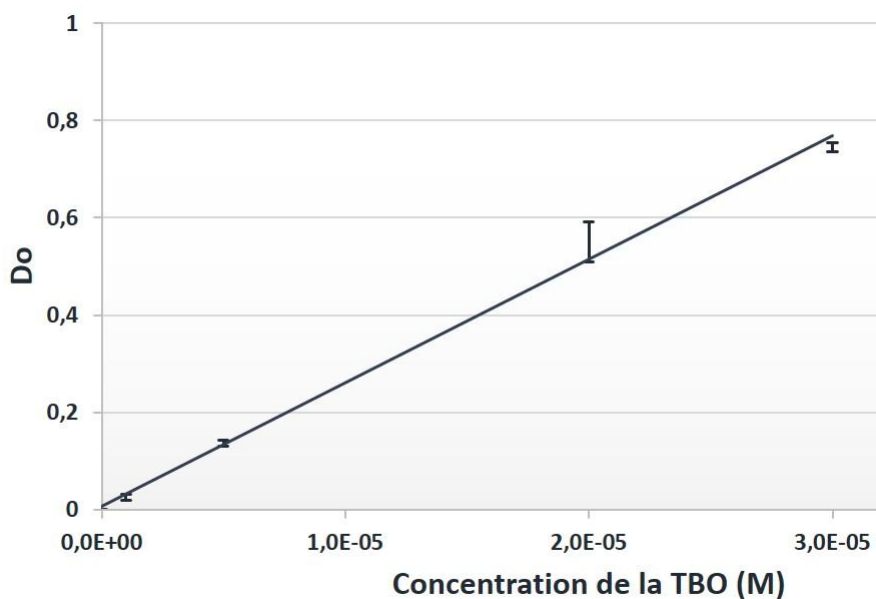


Figure 1. Courbe d'étalonnage de l'absorption en fonction de la concentration de la Toluidine bleu oxyde

## Annexe B : Quantification des groupements amines par Orange II

### I. Protocole

- Lavage des billes à l'eau ultra pure 3X.
- Incubation dans 1.5 ml de solution de marquage (14mg/ml, pH=3) pendant 30 min à 40°C.
- Centrifugation
- Plusieurs lavages avec une solution acide (H<sub>2</sub>O pure + 1 M HCl = pH 3)
- Incubation des billes marquées dans 1 ml d'une solution alcaline (H<sub>2</sub>O pure + 1M NaOH =pH 12)
- Centrifugation
- Récupération du surnageant et ajustement de ce dernier à un pH=3 avec ajout de 1% v/v 12.3 M HCl
- Mesure de l'absorbance à une longueur d'onde de 484 nm.

### II. Courbe d'étalonnage de l'Orange II

La courbe de calibration de l'Orange II a été réalisée pour des concentrations d'Orange II comprises entre 0 et  $4 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$

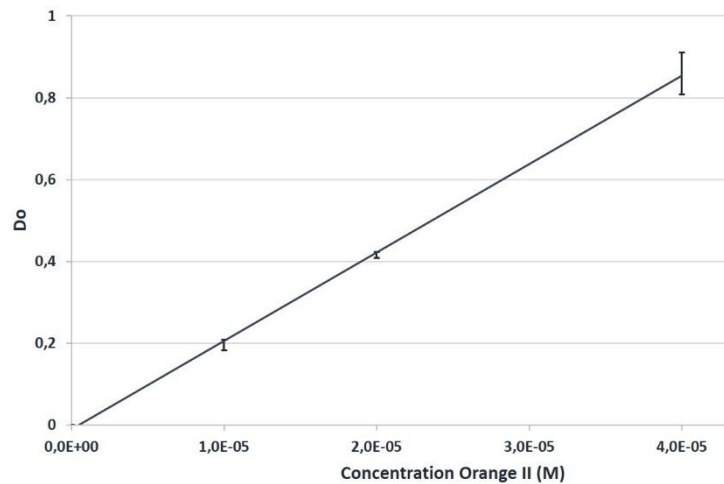


Figure 2. Courbe d'étalonnage de l'absorbance en fonction de la concentration de l'Orange II

### **Annexe C : Fabrication des électrodes quadripolaires en or pour la caractérisation électrique des particules en polystyrène.**

La fabrication des électrodes quadripolaires en or a été réalisée par photolithographie standard et gravure humide chimique. Dans ce type de fabrication, la résine est utilisée comme couche sacrificielle. Nous avons utilisé une résine réversible<sup>18</sup> de type AZ5214.

Des wafers en verre recouverts d'une fine couche d'or précédée d'une couche de titane qui assure l'accroche de l'or sur le verre ont été utilisés.

#### **I. Photolithographie**

- Les substrats ont été nettoyés dans des bains acétone puis d'éthanol
- Séchage à l'azote
- Dépôt de la résine AZ5214 par spin coating 30 sec à 4500 rpm
- Insolation aux UV à travers un photomasque pendant 5sec
- Cuisson 1min 30 à 110 °C
- Développement dans un bain de développeur AZ726MIF pendant 30 sec

#### **II. Gravure chimique humide**

- Elimination des zones d'or non recouvertes de résine en utilisant une solution de gravure
- Lavage et rinçage à l'eau DI
- Elimination du titane en utilisant une solution de gravure à base d'acide fluorhydrique.
- Rinçage abondant dans de l'eau DI afin d'éviter toute trace de HF.

<sup>18</sup> Résine qui a la propriété de changer de polarité suite à une étape de recuit dit d'inversion

- Séchage à l'azote.

Un schéma général du procédé est présenté dans ce qui suit (Figure 3).

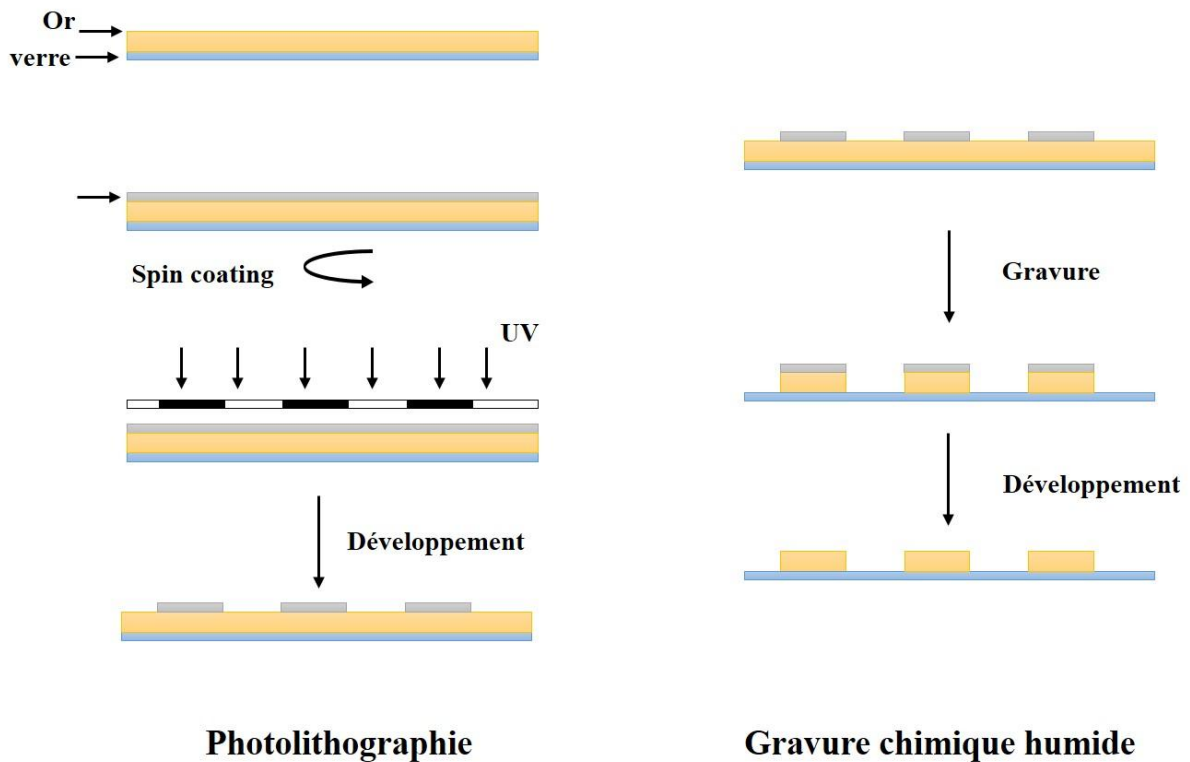


Figure 3. Etapes de fabrication des électrodes quadripolaires en or par photolithographie et gravure chimique humide.

#### **Annexe D : Fabrication de la chambre en PDMS pour réaliser les assemblages**

La fabrication de la chambre consiste à étaler par spin coating à 500 rpm, un mélange (10 :1) PDMS/ réticulant sur une lame de microscope préalablement nettoyée. Un recuit rapide sur une plaque chauffante à 110°C pendant 2 min est réalisé. Après refroidissement, l'espaceur est découpé à l'aide d'un cutter.

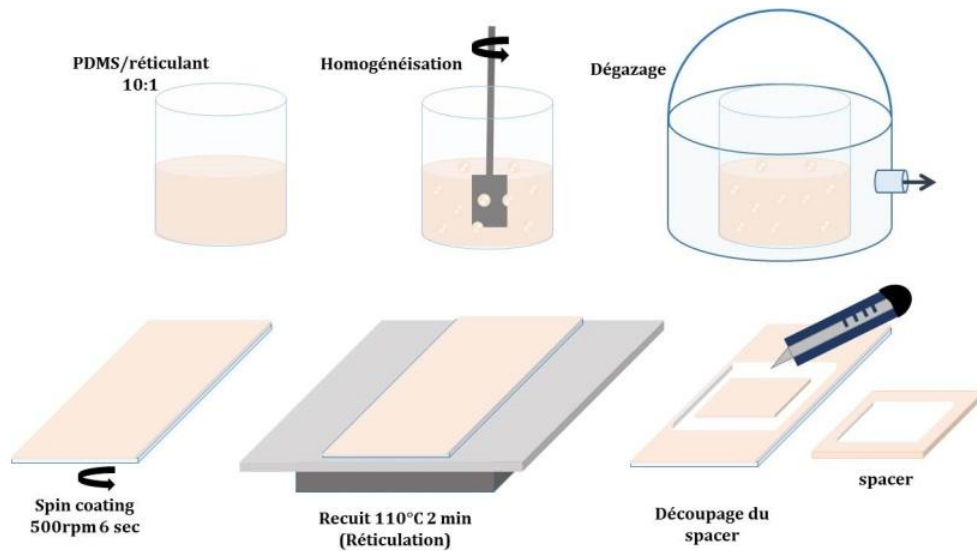


Figure 4 : Etapes de fabrication de la chambre d'assemblage

### Annexe E : Préparation du milieu diélectrophorétique 5% dextrose

Une solution avec une conductivité de 50mS/m est préparée en mélangeant de l'eau DI à un volume de PBS. Par la suite, 1g de dextrose est dissout dans un tube falcon en rajoutant la solution préparée précédemment jusqu'à obtenir un volume de 25ml.

Cette solution finale doit être stérile afin d'éviter d'éventuelles contaminations qui peuvent affecter la croissance des cellules. En raison de la présence du dextrose, la solution ne pourrait pas être stérilisée à l'autoclave. Pour cela nous l'avons filtrée en utilisant des filtres à pores étroits 0.2  $\mu\text{m}$ .

## Résumé

La réalisation de micro et nanomatériaux avec des propriétés contrôlées nécessite le développement de nouvelles voies d'élaboration dites ascendantes « ou Bottom-up ». Les travaux présentés dans ce manuscrit visent à maîtriser la formation d'agrégats de particules colloïdales et de cellules, avec des applications potentielles dans les domaines des biocapteurs, de la microélectronique, de l'optique et de l'ingénierie tissulaire. L'approche proposée pour assembler les particules en structures organisées se base sur l'emploi de la diélectrophorèse, reposant sur l'application d'un champ électrique non-uniforme. L'un des inconvénients de cette technique tient au caractère réversible des assemblages ainsi formés, l'annulation du champ électrique entraînant la redispersion des colloïdes. Afin d'apporter une solution à ce problème, il est possible de recourir à un couplage chimique pour maintenir la cohésion des structures formées dans le milieu liquide. Afin de mieux maîtriser le comportement diélectrophorétique et les réactions chimiques exploitées, des travaux de caractérisation électrique et chimique des particules manipulées ont été réalisés. D'autre part, différents types de microélectrodes ont été étudiées pour la génération du champ électrique nécessaire à l'assemblage. Une nouvelle filière technologique a été développée pour la réalisation de microélectrodes transparentes en ITO et leur intégration en système microfluidique, basée sur l'exploitation du pouvoir isolant d'une fine couche de PDMS micro-structurée. La méthode a été appliquée à la fabrication de microélectrodes « verticales » puis à la réalisation de matrices d'électrodes quadripolaires. Ces dernières ont permis d'obtenir des assemblages permanents de particules de polystyrène fluorescentes présentant des groupements carboxyliques en surface, en combinant l'emploi de la diélectrophorèse négative et l'utilisation d'un agent de couplage chimique (Jeffamine). Des agrégats de cellules HEK 293 ont également été réalisés par diélectrophorèse négative. Nous avons démontré qu'il était possible, sous certaines conditions, de préserver le caractère permanent des agrégats cellulaires après coupure du champ.

Mots clefs : Diélectrophorèse, fonctionnalisation de surface, couplage chimique, assemblages permanents de particules, agrégats cellulaires, caractérisation électrique, caractérisation chimique, approche « bottom-up ».

### Abstract

The design of micro and nanomaterials with controlled properties requires the development of new bottom-up assembly approaches. The work presented in this manuscript aims to control the formation of aggregates of colloidal particles and cells, with potential applications in the fields of biosensors, microelectronics, optics and tissue engineering. The proposed approach for assembling colloids into organized structures is based on the use of dielectrophoresis, a phenomenon observed when polarizable particles are placed in a non-uniform electric field. One of the drawbacks of this technique is the reversibility of the assemblies thus formed, the cancellation of the electric field causing the redispersion of the colloids. As a solution to this problem, we proposed to use a coupling agent to maintain the cohesion of the structures formed in the liquid medium. In order to better control the dielectrophoretic behavior and the chemical reactions exploited, electrical and chemical characterizations of the manipulated particles were carried out. Moreover, different types of microelectrodes have been studied for the generation of the electric field required for the assembly. A new approach has been developed for the fabrication of transparent micro patterned ITO microelectrodes and their integration in microfluidic systems, based on the exploitation of a thin micro-structured PDMS membrane used as an insulating layer. The method has been applied to the fabrication of "vertical" microelectrodes and of quadrupolar electrode arrays. The latter were used to obtain permanent assemblies of carboxylic acid functionalized, fluorescent, polystyrene particles, by combining negative dielectrophoresis with the use of a chemical coupling agent (Jeffamine). HEK 293 cell aggregates were also produced by negative dielectrophoresis. We have demonstrated that it was possible, under certain conditions, to preserve the permanent character of the cell aggregates after field removal.

Keywords : Dielectrophoresis, surface functionalization, chemical coupling, permanent particle assemblies, cell aggregates, electrical characterization, chemical characterization, bottom-up approach.

## AUTORISATION DE SOUTENANCE

Vu les dispositions de l'arrêté du 7 août 2006,

Vu la demande du Directeur de Thèse

Monsieur F. BURET

et les rapports de

Madame C. GONDRAN  
Enseignant Chercheur HDR - Département de Chimie Moléculaire - UMR CNRS 5250  
Laboratoire des Biosystèmes Electrochimiques et Analytiques  
Institut de Chimie Moléculaire de Grenoble - FR CNRS 2607  
Université Joseph Fourier  
BP 53, 38041 Grenoble Cedex 9

Et de

Monsieur F. BRUCKERT  
Professeur - Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique  
LMGP, Grenoble INP - Minatec - 3, parvis Louis Néel - CS 50257 - 38016 Grenoble cedex 1

**Mademoiselle MENAD Samia**

est autorisée à soutenir une thèse pour l'obtention du grade de **DOCTEUR**

**Ecole doctorale ELECTRONIQUE, ELECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE**

Fait à Ecully, le 24 novembre 2014



---

## **Assemblage permanent de micro-objets par diélectrophorèse associée à une méthode de couplage covalent.**

La réalisation de micro et nanomatériaux avec des propriétés contrôlées nécessite le développement de nouvelles voies d'élaboration dites ascendantes « ou Bottom-up ». Les travaux présentés dans ce manuscrit visent à maîtriser la formation d'agrégats de particules colloïdales et de cellules, avec des applications potentielles dans les domaines des biocapteurs, de la microélectronique, de l'optique et de l'ingénierie tissulaire. L'approche proposée pour assembler les particules en structures organisées se base sur l'emploi de la diélectrophorèse, reposant sur l'application d'un champ électrique non-uniforme. L'un des inconvénients de cette technique tient au caractère réversible des assemblages ainsi formés, l'annulation du champ électrique entraînant la redispersion des colloïdes. Afin d'apporter une solution à ce problème, il est possible de recourir à un couplage chimique pour maintenir la cohésion des structures formées dans le milieu liquide. Afin de mieux maîtriser le comportement diélectrophorétique et les réactions chimiques exploitées, des travaux de caractérisation électrique et chimique des particules manipulées ont été réalisés. D'autre part, différents types de microélectrodes ont été étudiées pour la génération du champ électrique nécessaire à l'assemblage. Une nouvelle filière technologique a été développée pour la réalisation de microélectrodes transparentes en ITO et leur intégration en système microfluidique, basée sur l'exploitation du pouvoir isolant d'une fine couche de PDMS micro-structurée. La méthode a été appliquée à la fabrication de microélectrodes « verticales » puis à la réalisation de matrices d'électrodes quadripolaires. Ces dernières ont permis d'obtenir des assemblages permanents de particules de polystyrène fluorescentes présentant des groupements carboxyliques en surface, en combinant l'emploi de la diélectrophorèse négative et l'utilisation d'un agent de couplage chimique (Jeffamine). Des agrégats de cellules HEK 293 ont également été réalisés par diélectrophorèse négative. Nous avons démontré qu'il était possible, sous certaines conditions, de préserver le caractère permanent des agrégats cellulaires après coupure du champ.

Mots clefs : *Diélectrophorèse, fonctionnalisation de surface, couplage chimique, assemblages permanents de particules, agrégats cellulaires, caractérisation électrique, caractérisation chimique, approche « bottom-up ».*

---

## **Permanent particle assembly thanks to dielectrophoresis combined with a chemical covalent coupling method.**

The design of micro and nanomaterials with controlled properties requires the development of new bottom-up assembly approaches. The work presented in this manuscript aims to control the formation of aggregates of colloidal particles and cells, with potential applications in the fields of biosensors, microelectronics, optics and tissue engineering. The proposed approach for assembling colloids into organized structures is based on the use of dielectrophoresis, a phenomenon observed when polarizable particles are placed in a non-uniform electric field. One of the drawbacks of this technique is the reversibility of the assemblies thus formed, the cancellation of the electric field causing the redispersion of the colloids. As a solution to this problem, we proposed to use a coupling agent to maintain the cohesion of the structures formed in the liquid medium. In order to better control the dielectrophoretic behavior and the chemical reactions exploited, electrical and chemical characterizations of the manipulated particles were carried out. Moreover, different types of microelectrodes have been studied for the generation of the electric field required for the assembly. A new approach has been developed for the fabrication of transparent micro patterned ITO microelectrodes and their integration in microfluidic systems, based on the exploitation of a thin micro-structured PDMS membrane used as an insulating layer. The method has been applied to the fabrication of "vertical" microelectrodes and of quadrupolar electrode arrays. The latter were used to obtain permanent assemblies of carboxylic acid functionalized, fluorescent, polystyrene particles, by combining negative dielectrophoresis with the use of a chemical coupling agent (Jeffamine). HEK 293 cell aggregates were also produced by negative dielectrophoresis. We have demonstrated that it was possible, under certain conditions, to preserve the permanent character of the cell aggregates after field removal.

Keywords : *Dielectrophoresis, surface functionalization, chemical coupling, permanent particle assemblies, cell aggregates, electrical characterization, chemical characterization, bottom-up approach.*