Intégration d'une méthode d'actuation électrocinétique sur biocapteur plasmonique

Quentin Avenas

▶ **To cite this version:**

Quentin Avenas. Intégration d'une méthode d'actuation électrocinétique sur biocapteur plasmonique. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université de Lyon; Université de Sherbrooke (Québec, Canada), 2018. Français. NNT : 2018LYSEI122 . tel-02115316

HAL Id: tel-02115316
https://theses.hal.science/tel-02115316

Submitted on 30 Apr 2019

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

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

N° d'ordre NNT : **2018LYSEI122**

THESE de DOCTORAT de L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de
L'Institut National des Sciences Appliquées de Lyon

En cotutelle internationale avec
L'UNIVERSITE DE SHERBROOKE
au sein de la
Faculté de Génie, Département de génie électrique et génie informatique

Ecole Doctorale N° 160
Electronique, Electrotechnique et Automatique (EEA)

Spécialité / discipline de doctorat :
Génie électrique

Soutenue publiquement le 20/12/2018, par :
Quentin AVENAS

Intégration d'une méthode d'actuation électrocinétique sur biocapteur plasmonique

---

Devant le jury composé de :

CANVA, Michael	Professeur, LN2	Co-encadrant
CHARETTE, Paul	Professeur, Université de Sherbrooke	Co-directeur de thèse
FRENEA-ROBIN, Marie	MCF HDR, UCBL/INSA Lyon	Co-encadrante
HAGHIRI-GOSNET, Anne-Marie	Directrice de recherche CNRS, C2N	Rapporteure
PEYRADE, David	Directeur de recherche CNRS, LTM	Examinateur
SARRY, Frédéric	Professeur, Université de Lorraine	Rapporteur
SOUIFI, Abdelkader	Professeur, INSA Lyon	Directeur de thèse

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

MEMBRES DU JURY (Université de Sherbrooke)

Paul CHARETTE
Directeur

Abdelkader SOUIFI
Co-directeur

Maxime DARNON
Rapporteur

Anne-Marie HAGHIRI-GOSNET
Evaluatrice

Frédéric SARRY
Evaluateur

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Département FEDORA – INSA Lyon - Ecoles Doctorales – Quinquennal 2016-2020

SIGLE	ECOLE DOCTORALE	NOM ET COORDONNEES DU RESPONSABLE
CHIMIE	**CHIMIE DE LYON** **http://www.edchimie-lyon.fr** Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage **secretariat@edchimie-lyon.fr** INSA : R. GOURDON	M. Stéphane DANIELE Institut de recherches sur la catalyse et l'environnement de Lyon IRCELYON-UMR 5256 Équipe CDFA 2 Avenue Albert EINSTEIN 69 626 Villeurbanne CEDEX **directeur@edchimie-lyon.fr**
E.E.A.	**ÉLECTRONIQUE, ÉLECTROTECHNIQUE, AUTOMATIQUE** **http://edeea.ec-lyon.fr** Sec. : M.C. HAVGOUDOUKIAN **ecole-doctorale.eea@ec-lyon.fr**	M. Gérard SCORLETTI École Centrale de Lyon 36 Avenue Guy DE COLLONGUE 69 134 Écully Tél : 04.72.18.60.97 Fax 04.78.43.37.17 **gerard.scorletti@ec-lyon.fr**
E2M2	**ÉVOLUTION, ÉCOSYSTÈME, MICROBIOLOGIE, MODÉLISATION** **http://e2m2.universite-lyon.fr** Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : H. CHARLES **secretariat.e2m2@univ-lyon1.fr**	M. Philippe NORMAND UMR 5557 Lab. d'Ecologie Microbienne Université Claude Bernard Lyon 1 Bâtiment Mendel 43, boulevard du 11 Novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX **philippe.normand@univ-lyon1.fr**
EDISS	**INTERDISCIPLINAIRE SCIENCES-SANTÉ** **http://www.ediss-lyon.fr** Sec. : Sylvie ROBERJOT Bât. Atrium, UCB Lyon 1 Tél : 04.72.44.83.62 INSA : M. LAGARDE **secretariat.ediss@univ-lyon1.fr**	Mme Emmanuelle CANET-SOULAS INSERM U1060, CarMeN lab, Univ. Lyon 1 Bâtiment IMBL 11 Avenue Jean CAPELLE INSA de Lyon 69 621 Villeurbanne Tél : 04.72.68.49.09 Fax : 04.72.68.49.16 **emmanuelle.canet@univ-lyon1.fr**
INFOMATHS	**INFORMATIQUE ET MATHÉMATIQUES** **http://edinfomaths.universite-lyon.fr** Sec. : Renée EL MELHEM Bât. Blaise PASCAL, 3e étage Tél : 04.72.43.80.46 Fax : 04.72.43.16.87 **infomaths@univ-lyon1.fr**	M. Luca ZAMBONI Bât. Braconnier 43 Boulevard du 11 novembre 1918 69 622 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.26.23.45.52 **zamboni@maths.univ-lyon1.fr**
Matériaux	**MATÉRIAUX DE LYON** **http://ed34.universite-lyon.fr** Sec. : Marion COMBE Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.87.12 Bât. Direction **ed.materiaux@insa-lyon.fr**	M. Jean-Yves BUFFIÈRE INSA de Lyon MATEIS - Bât. Saint-Exupéry 7 Avenue Jean CAPELLE 69 621 Villeurbanne CEDEX Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.85.28 **jean-yves.buffiere@insa-lyon.fr**
MEGA	**MÉCANIQUE, ÉNERGÉTIQUE, GÉNIE CIVIL, ACOUSTIQUE** **http://edmega.universite-lyon.fr** Sec. : Marion COMBE Tél : 04.72.43.71.70 Fax : 04.72.43.87.12 Bât. Direction **mega@insa-lyon.fr**	M. Jocelyn BONJOUR INSA de Lyon Laboratoire CETHIL Bâtiment Sadi-Carnot 9, rue de la Physique 69 621 Villeurbanne CEDEX **jocelyn.bonjour@insa-lyon.fr**
ScSo	**ScSo*** **http://ed483.univ-lyon2.fr** Sec. : Viviane POLSINELLI Brigitte DUBOIS INSA : J.Y. TOUSSAINT Tél : 04.78.69.72.76 **viviane.polsinelli@univ-lyon2.fr**	M. Christian MONTES Université Lyon 2 86 Rue Pasteur 69 365 Lyon CEDEX 07 **christian.montes@univ-lyon2.fr**

*ScSo : Histoire, Géographie, Aménagement, Urbanisme, Archéologie, Science politique, Sociologie, Anthropologie

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Résumé

Cette thèse porte sur le développement d'un capteur plasmonique intégrant une fonction d'actuation des objets visés. L'objectif est de passer outre la limite de diffusion rencontrée à basse concentration en piégeant les particules sur la surface de détection. La stratégie adoptée est de structurer le film d'or servant à la détection de manière à pouvoir l'utiliser pour mettre en mouvement le fluide et les molécules par le biais de champs électriques. Le transfert de masse est réalisé par diélectrophorèse et électroosmose, deux effets électrocinétiques mis en œuvre par des électrodes servant à la fois d'actuateur et de capteur plasmonique.

Un état de l'art exhaustif et des simulations multiphysiques ont permis de concevoir un prototype de capteur intégré constitué d'électrodes interdigitées en or permettant la détection plasmonique. Le dispositif proposé a été obtenu par microfabrication en salle blanche puis caractérisé avant l'étude de ses performances.

Une première phase de tests sur un système modèle, des billes de polystyrène dans de l'eau, a permis d'apporter la preuve de concept du fonctionnement du capteur, qui est effectivement capable de piéger rapidement les objets visés à sa surface afin de les détecter. Les mécanismes de transfert de masse ont été expliqués et la preuve de l'amélioration de la limite de détection par un facteur supérieur à 100 a été apportée.

Dans un second temps, les performances du capteur appliqué à des objets biologiques ont été évaluées. Celui-ci piège efficacement des levures et des protéines, mais aucune amélioration n'a été observée dans le cas de la détection spécifique de l'hybridation entre deux brins d'acide désoxyribonucléique (ADN). Les causes de ce résultat ont été discutées et comprises et deux solutions différentes ont été explorées : l'adaptation de la fréquence d'opération et l'optimisation de la géométrie des électrodes. Ainsi, cette étude a permis de souligner la problématique de la mise en œuvre d'effets électrocinétiques dans des milieux biologiques et de réfléchir aux pistes pertinentes pour sa résolution.

Mots-clés : Biocapteur ; Résonance de plasmon de surface (SPR) ; Diélectrophorèse (DEP), Electroosmose (ACEO) ; Limite de détection ; Transfert de masse ; Electrodes interdigitées ; Acide désoxyribonucléique (ADN)

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Abstract

Title: Integrating an electrokinetic actuation method on a plasmonic biosensor

This thesis focuses on the development of an integrated plasmonic sensor capable to perform mass transport on targeted objects. The goal is to overcome the diffusion limit by trapping particules directly on the sensing surface. The adopted strategy was to structure the gold layer used for plasmonic detection in order to use the so-fabricated structures to set the fluid and the molecules in motion by applying electric fields in the fluid. The mass transfer is realized through dielectrophoresis and electroosmosis, those two electrokinetic effects being operated by electrodes acting as sensor and actuator at the same time.

An exhaustive state of the art as well as multiphysical simulations allowed us for designing a prototype for an integrated sensor consisting in gold interdigitated electrodes enabling plasmoninc sensing. The proposed device was obtained through microfabrication in clean room facilities and was characterized before the study of its performances.

A first sequence of tests on a model system – polystyrene microbeads in water – brought the proof of concept we needed to validate the correct operation of the sensor, which is indeed capable of quickly trapping targeted objects on its surface and detecting them. The mass transfer mechanisms were explained and we showed the enhancement of the limit of detection by a factor greater than 100.

In a second phase, performances of the sensor applied to biological objects were evaluated. It can effectively trap yeasts and proteins but no enhancement has been observed while detecting DNA hybridization events. Causes for this result were discussed and understood and two different solutions were explored: the adaptation of the operating frequency and the optimization of the electrodes geometry. Thus, this study highlighted the problematic of operating electrokinetic effects in biological media and suggested relevant leads towards its resolution.

Keywords: Biosensor ; Surface plasmon resonance (SPR) ; Dielectrophoresis (DEP) ; Electroosmosis (ACEO) ; Limit of detection : Mass transfer : Interdigitated electrodes : Deoxyribonucleic acid (DNA)

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

"*If we knew what it was we were doing, it would not be called research, would it?*"

Paroles attribuées à Albert Einstein

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

REMERCIEMENTS

Rendons-nous à l'évidence, ce travail n'est pas que le mien. Beaucoup de personnes, consciemment ou non, ont porté ce projet avec moi. Préparons-nous donc à un déluge de remerciements.

En premier lieu, je remercie bien évidemment ceux qui sont à l'origine de ce projet. Kader, Paul, Michael : non contents de m'avoir donné l'opportunité de me lancer dans cette aventure, vous m'avez accompagné de son début à sa fin. Chacun de vous a su m'apporter une expertise complémentaire des autres et a œuvré à la réussite de cette thèse.

Une immense partie de ma gratitude va à Julien, sans qui les résultats n'auraient pas été les mêmes. Ta passion pour les sciences (si si, ça se voit) et ton enjouement pour le projet m'auront été d'une aide précieuse, au-delà même de la mise à disposition de certains des équipements du LCF. J'en profite pour remercier Karen : grâce à vous deux, je me suis senti un peu moins itinérant et un peu plus chez moi sur le plateau de Saclay !

Milles mercis à Marie : non seulement tu as accepté de participer à l'encadrement de ce projet en cours de route (chose déjà peu commune), mais en plus tu l'as fait avec brio. Ce fut un réel plaisir de travailler avec toi. Tant que j'y suis, toutes mes excuses pour ma propension à rusher les livrables dans les derniers jours avant les deadlines. Promis, je ferai des efforts à l'avenir. Je te souhaite beaucoup de réussite avec tes prochain(e)s doctorant(e)s (coucou Marion et Marina : ne faites pas comme moi et prenez soin d'elle) et dans ta carrière en général.

Merci à mes collègues de l'INL : Simon et Nicolas, malheureusement partis trop tôt, ainsi que Rémi et Charles qui m'ont accompagné jusqu'à la fin. Le 6ème étage du bâtiment Blaise Pascal était éclairé de votre présence (on vous avait pourtant bien cachés tout au fond du couloir).

J'adresse un immense merci à toutes les personnes rencontrées au LN2 : Marina pour avoir été une amie formidable et m'avoir fait rencontrer tant de gens, Pierre, François, Cyril et Salim pour votre participation proactive et votre esprit d'initiative quant aux 5a8 et autres réunions scientifiques, Yann pour avoir été un super pote ainsi qu'un conseiller scientifique officieux, Frédéric pour nos sessions d'escalade, Kevin pour m'avoir fait découvrir le plaisir du karaoké, Marine pour avoir été une super prof de chimie, Olivier pour m'avoir fait la surprise de revenir à Sherbrooke après deux ans.

Il me faut aussi remercier l'ensemble du laboratoire Ampère pour m'avoir aussi chaleureusement adopté. Merci à Marie et Julie qui m'ont pris sous leur aile de la

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

meilleure des façons. Je souhaite plein de bonheur à Cécile, j'en connais une à qui tu as rendu un fier service. Johan, Arbi, Marion, Julien, Seb, Meriem et Anjali : merci à vous d'avoir supporté mes blagues très subtiles toutes ces années (le dab résonant restera à jamais dans les annales).

Je remercie évidemment mes amis lyonnais : Megan, Manon et Léonard, avec qui j'ai redécouvert la BU.

Je ne saurais remercier assez celle qui rend ma vie meilleure chaque jour. Julie, non seulement tu as été ma plus grande source de motivation, mais tu as été d'un soutien indéfectible. En plus d'être docteur, je suis chanceux. Merci.

Gauthier, tu as su me donner de la combattivité et de l'esprit d'initiative. Arthur, tu m'as accueilli à chaque fois qu'il le fallait avec le sourire. Je suis fier de vous avoir comme frères, merci d'être là depuis le tout début.

Enfin, je remercie mes parents. Papa, maman, vous êtes tous les deux des exemples de courage, de persévérance, et vous me donnez tant depuis toujours. Vous m'avez aidé et appris à surmonter les difficultés. Chaque moment avec vous est un bonheur. Merci pour tout.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

TABLE DES MATIERES

Résumé i

Abstract ii

Table des illustrations v

Chapitre 0 : Introduction générale 1

0.1 De l'importance du développement des biocapteurs 1

0.2 L'intérêt du transfert de masse pour les biocapteurs 2

0.3 Problématique, objectifs et organisation du manuscrit 4

0.4 Les acteurs du projet 6

Chapitre 1 : Etat de l'art 9

1.1 Principe, applications et limites des biocapteurs plasmoniques 9

1.1.1 Introduction aux biocapteurs 9

1.1.2 Biocapteur à résonance de plasmon de surface 11

1.1.3 L'imagerie SPR et ses applications de biodétection 13

1.1.4 Pourquoi ajouter une fonction d'actuation ? 17

1.2 Comment manipuler les cibles en milieu liquide ? 19

1.2.1 Technologies d'actuation sur dispositif microfluidique 19

1.2.2 Manipulation directe des cibles par électrophorèse et diélectrophorèse 20

1.2.3 Manipulation indirecte par flux électrohydrodynamique 25

1.2.4 Application des effets électrocinétiques aux objets biologiques 28

1.3 Effet de la polarisation sur la résonance de plasmon de surface 34

1.3.1 L'interface solide/liquide et la double-couche ionique 34

1.3.2 L'effet de la polarisation des électrodes sur l'EDL et sur le métal 36

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

1.3.3 Les réactions électrochimiques 38

1.4 Conclusion 39

Chapitre 2 : Conception, modélisation et fabrication du capteur 41

2.1 Introduction 41

2.2 Conception du dispositif : 42

2.2.1 Présentation du banc expérimental 42

2.2.2 Choix d'électrodes coplanaires interdigitées 45

2.2.3 Principe du capteur-actuateur 48

2.2.4 Calculs et simulations : méthodologie 49

2.3 Fabrication du dispositif 56

2.3.1 Microfabrication 56

2.3.2 Caractérisation du dispositif 61

2.3.3 Fonctionnalisation de surface 65

2.4 Conclusion 68

Chapitre 3 : Fonctionnement et performances du capteur sur un système modèle 70

3.1 Introduction 70

3.2 Utilisation du capteur 71

3.2.1 Installation sur le banc expérimental 71

3.2.2 Acquisition et traitement des données 72

3.2.3 Influence de la polarisation des électrodes sur la résonance plasmonique : précautions d'usage 74

3.3 Preuve de concept 77

3.3.1 Réactifs et protocoles expérimentaux 77

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

3.3.2 Preuve de concept : concentration des billes sur les électrodes 79

3.3.3 Dynamique de l'accumulation des particules 80

3.4 Etude des effets électrocinétiques à proximité de la surface 83

3.4.1 Influence de la taille des objets 83

3.4.2 Déplacement de l'équilibre DEP/ACEO 85

3.5 Evaluation des performances 91

3.5.1 Etude préliminaire de la limite de détection : efficacité du dispositif dans un fluide au repos 92

3.5.2 Optimisation de la quantité d'objets capturés : utilisation du capteur sous flux 95

3.5.3 Comparaison des limites de détection sous flux 99

3.6 Conclusion 101

Chapitre 4 : Application aux objets biologiques 102

4.1 Un objet modèle : les levures 102

4.1.1 Analyse des images SPR de levures soumises à un champ électrique alternatif 103

4.1.2 Interprétation de l'accumulation des levures sur les bords 106

4.2 Application à des protéines : BSA 109

4.2.1 Protocole expérimental et résultats 109

4.2.2 Discussion sur le comportement du dispositif sur des objets biologiques de petite taille 112

4.3 Utilisation en tant que biocapteur spécifique : le cas de l'hybridation ADN/ADN 114

4.3.1 Protocole : fonctionnalisation de surface 115

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

4.3.2 Évaluation des performances pour l'hybridation ADN/ADN 115

4.3.3 Discussion sur les contraintes sur le milieu d'hybridation : l'influence de la conductivité 120

4.4 Comment adapter le capteur aux milieux conducteurs ? 123

4.4.1 Choisir un mode opératoire différent : comment adapter la fréquence pour induire un brassage électroosmotique dans des milieux conducteurs ? 123

4.4.2 Optimisation de la géométrie de l'échantillon : influence de la largeur de gap 127

4.5 Conclusion 133

Chapitre 5 : Conclusion 135

5.1 Conclusions générales 135

5.2 Perspectives 138

Bibliographie 141

Annexe A I

Utilisation d'électrolytes spécifiques, le cas de la D-histidine I

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Table des illustrations

Figure 0.1 : Schéma de principe d'un biocapteur. 2

Figure 0.2 [5] : Comparaison de la limite de résolution théorique (en RIU : Refractive Index Units) et des résultats reportés par différents groupes : a) Stemmler et al. [6], b) Thirstrup et al. [7], c) Piliarik et al. [8], d) Nenninger et al. [9], e) Chinowsky et al. [10], f) Biacore 3000 (GE Healthcare, USA), g) Wu et al. [11], h) Bardin et al. [12], i) Piliarik et al. [13]....5

Figure 1.1 : À gauche : représentation schématique d'un montage de détection SPR. À droite : illustration du principe de détection d'une interaction. Lorsqu'un analyte interagit avec un ligand en se fixant sur la surface, cela provoque une variation de l'indice optique Δn dans le diélectrique qui conduit à un décalage de l'angle de résonance. 12

Figure 1.2 : Utilisation d'un capteur SPR en tant que biocapteur. 12

Figure 1.3 : Illustration du procédé expérimental de greffe de nanoparticules d'or sur les brins d'ADN. 17

Figure 1.4 : Schéma de principe des forces électrophorétiques s'appliquant sur une particule chargée. 20

Figure 1.5 : À gauche : polarisation d'une particule sphérique. Les charges s'accumulent à l'interface entre le matériau diélectrique et le milieu liquide. À droite : champ électrique non uniforme et DEP. La particule subit une force dépendant de la distribution spatiale du champ. Dans cet exemple, le matériau est plus facilement polarisable que le liquide et la résultante est dirigée vers le maximum de champ (ici vers la droite). 22

Figure 1.6 : Principe de l'induction d'un flux par électro-osmose. (a) Des cations s'accumulent contre la surface de l'électrode polarisée négativement. De même avec les anions sur la surface polarisée positivement. La composante horizontale du champ électrique induit un mouvement longitudinal des charges présentes en solution. (b) Ces charges entraînent l'ensemble du fluide par contrainte visqueuse et produisent donc un flux hydrodynamique dans le liquide. 25

Figure 1.7 : Utilisation de l'électro-osmose en AC. Lorsque l'orientation du champ change, le signe de la couche ionique change aussi, ce qui donne un flux qui a toujours la même orientation....26

Figure 1.8 : À gauche : illustration de la mise en mouvement des particules par électroosmose et du piégeage par diélectrophorèse. À droite : géométrie des électrodes interdigitées utilisées....27

Figure 1.9 : À gauche : géométrie des électrodes utilisées par Wong et al. À droite : le mouvement de la double-couche (bleu foncé) entraîne le reste du fluide (bleu clair) vers le centre de l'électrode. Les molécules d'ADN sont alors entraînées vers le centre de l'électrode par le flux, où elles sont piégées par la force DEP (rouge). 29

Figure 1.10 : Courbe de vitesse pour différentes positions sur l'électrode (position suivant l'axe x, dirigé vers le centre d'une électrode et d'origine l'arête), dans un électrolyte de conductivité $\mathbf{2.1 \cdot 10 - 3}\ \boldsymbol{S.m - 1}$ 30

Figure 1.11 : schéma de principe de la double-couche électrique d'après le modèle de Stern. Les plans intérieur et extérieur de Helmholtz et le plan de glissement sont notés IH, OH et S respectivement. La charge du plan de glissement est caractérisée par le potentiel ζ. 35

Figure 1.12 : Evolution de l'énergie d'excitation d'un plasmon en fonction du potentiel appliqué à la surface métallique. La courbe du haut correspond à un film d'or, celle du bas à un film d'argent.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Les flèches indiquent PZC pour chaque système. L'électrolyte est une solution de $NaClO4$ à 0.5 M. 36

Figure 1.13 : Influence de la polarisation de l'électrode en or sur ses propriétés optiques. La différence de potentiel est indiquée par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl. 37

Figure 1.14 : Variations angulaires de la SPR dans de l'eau pure : (a) en fonction du temps, V = ± 1.5V (b) en fonction du voltage, V = ± 1.5V, avec oxydation. (c) en fonction du voltage, V = ± 0.8 V, pas d'oxydation. La flèche indique la direction temporelle du processus. 38

Figure 1.15 : Variations angulaires de la SPR pour de l'eau pure en fonction du temps, pour différentes fréquences, à V = ± 1.5 V. 39

Figure 2.1 : Représentation schématique d'un capteur SPR (film d'or plan) placé sur le banc expérimental. 42

Figure 2.2 : Photographie du banc d'imagerie SPR expérimental et mise en évidence des principaux éléments le constituant. 43

Figure 2.3 : a) Vue d'ensemble du bloc cuve et détail des différentes pièces le constituant. b) Support situé en face du prisme (dimensions en mm). c) Feuille de Mylar (90 µm d'épaisseur) plaquée contre la cuve. d) Exemple d'échantillon d'or plan sur lame de verre plaqué contre le Mylar mécaniquement par l'ensemble {prisme ; support} et constituant la cuve fluidique. 44

Figure 2.4 : Classification de dispositifs DEP selon la configuration géométrique des électrodes, d'après Khoshmanesh et al. : (A) Parallèle ou interdigitée (B) Crénelée (C) Oblique (D) Incurvée (E) Quadripolaire (F) Micropuits (G) Matricielle (H) Extrudée..... 45

Figure 2.5 : a) Design de l'échantillon microstructuré conçu pour cette thèse. Les zones noires représentent les zones couvertes de métal (Ti/Au), le reste correspond au verre nu. Les 3 zones de couleurs différentes représentent respectivement la zone servant à faire le contact électrique avec le circuit en amont (en jaune), la zone servant au transfert de masse (orange) et une zone structurelle servant de lien entre les deux (en gris). b) Agrandissement de la zone microstructurée servant au transfert de masse et à la détection : mise en évidence des branchements électriques et de l'électrode de contrôle ainsi que du sens du flux. 47

Figure 2.6 : Modèle géométrique utilisé pour les simulations COMSOL..... 50

Figure 2.7 : Maillage du modèle généré par COMSOL..... 50

Figure 2.8 : a) Distribution du potentiel et lignes de champ électrique dans le volume modélisé. b) Gradient de champ électrique calculé sur la base du champ obtenu précédemment..... 52

Figure 2.9 : Champ de vitesse induit par électroosmose. Les flèches rouges indiquent la direction du fluide. 54

Figure 2.10 : Schématisation de l'enchaînement des étapes du procédé de microfabrication. A gauche (flèche bleue) : procédé utilisé pour la quasi-totalité des échantillons. A droite (flèche violette) : procédé utilisé pour la puce multigaps décrite au Chapitre 4..... 60

Figure 2.11 : Photographie d'un échantillon à la fin du procédé de microfabrication..... 61

Figure 2.12 : Images prises en microscope optique d'un échantillon à la fin du procédé de microfabrication par gravure chimique (l'échantillon montré ici a été utilisé pour attirer différents objets d'où les défauts apparents qui sont en fait des dépôts de billes). a) Vue en agrandissement 5X de la zone couverte par les microélectrodes. b) Agrandissement 50X sur le bord d'une électrode. c) Vue en agrandissement 5X sur le coin d'un peigne d'électrodes. d) Agrandissement 20X du bout d'une électrode. 62

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 2.13 : Exemple typique de la résonance de plasmon de surface obtenue avec les échantillons fabriqués. 63

Figure 2.14 : a) Schématisation de la surface fonctionnalisée. Les brins d'ADN représentés sont simples. b) Séquences ADN (simple brin) utilisées et lieu d'hybridation. 65

Figure 2.15 : Mécanisme réactionnel de la formation d'une SAM de thiols sur or 66

Figure 2.16 : Mécanisme réactionnel de la formation d'une liaison covalente entre le thiol et le PDC 67

Figure 2.17 : Mécanisme réactionnel de la réticulation de la neutravidine sur un groupement thiocyanate 68

Figure 3.1 : Représentation schématique du dispositif installé sur le banc expérimental. 71

Figure 3.2 : Photographies du banc expérimental. a) Echantillon installé et serré mécaniquement entre le prisme et le support recouvert de la feuille de Mylar. Agrandissement et mise en évidence de la cuve fluidique. b) Vue d'ensemble du circuit fluidique. 72

Figure 3.3 : Evolution du signal SPR lors de la polarisation des électrodes en basses fréquences (0,04 Hz, 0,5 Vpp). 74

Figure 3.4 : Fréquence d'opération minimale, en-dessous de laquelle le signal SPR est perturbé par des modifications de l'état de surface et devient difficilement interprétable, en fonction de l'amplitude de la tension appliquée dans l'eau ultrapure et le PBS 2X. 76

Figure 3.5 : Comparaison des résultats observés lors du piégeage de billes de 1 µm sur les électrodes sous tension (20 Vpp, 5 kHz) a) en microscopie optique et b) en imagerie SPR. 79

Figure 3.6 : Observation en SPRI de la dynamique d'accumulation des billes PS 200 nm dans de l'eau ultrapure sur les électrodes lors de l'imposition d'une tension (1 kHz, 20 Vpp) sur celles-ci. 82

Figure 3.7 : Variations de réflectivité sur la largeur d'une électrode (un bord est à 0 µm, l'autre est à 200 µm) après 30 s d'application d'une tension sinusoïdale (1 kHz, 20 Vpp) sur deux solutions de billes PS de tailles différentes (200 nm, 1 µm). 84

Figure 3.8 : Comparaison de la force de traînée s'exerçant sur les billes de a) 200 nm et c) 1 µm. Comparaison de la force diélectrophorétique (échelle log) s'exerçant les billes de b) 200 nm et d) 1 µm. Résultats obtenus par simulations COMSOL, centrés sur une demi-électrode pour voir clairement les variations des forces au voisinage de l'arête. 85

Figure 3.9 : Représentation 3D de la position des billes (200 nm) sur la largeur de l'électrode 30 s après le début de l'application de la tension : les variations d'indice de réfraction sur toute la largeur de l'électrode sont affichées en fonction de l'amplitude appliquée pour 3 fréquences (500 Hz, 1 kHz, 2 kHz). 88

Figure 3.10 : Partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti des billes de 200 nm dans de l'eau pure, en fonction de la fréquence (curseur à 1 kHz). 89

Figure 3.11 : Vitesse électroosmotique calculée à une distance de 50 µm du bord de l'électrode. 90

Figure 3.13 : Profils de distribution des billes (200 nm) sur la largeur d'une électrode après 30 s d'application de la tension, pour les fréquences 500 Hz, 1 kHz et 2 kHz. 91

Figure 3.14 : Exemple de cinétique du signal SPR mesuré pendant l'injection d'une solution de billes de polystyrène (200 nm) diluées 300 fois. Les deux courbes ont été obtenues sur le même

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

échantillon, pendant la même expérience, au même moment. (1) Injection des billes (2) Application d'une tension sinusoïdale (2 kHz, 20 Vpp) (3) Coupure de la tension.....92

Figure 3.15 : Variations de signal mesurées pour les différentes solutions diluées. Le seuil de détection d'un capteur SPR classique est ajouté en pointillés. 94

Figure 3.16 : Séquence d'images illustrant la dynamique de l'accumulation des billes sur une électrode lors de l'application d'une tension (2 kHz, 20 Vpp) sur une solution de billes 200 nm diluée 1000 fois et injectée à un débit de 30 µl/min. 96

Figure 3.17 : Bilan des trois forces (diélectrophorèse, force de traînée induite par électroosmose, force de traînée induite par le flux entrant) s'exerçant sur une bille située de part et d'autres du centre d'une électrode, sous forme de schéma. 97

Figure 3.18 : Variations de réflectivité mesurées sur une ROI centrale sur une électrode lors de tentatives de capture de billes sans flux et sous flux.....99

Figure 3.19 : Variations de signal mesurées pour les différentes solutions diluées. Le seuil de détection d'un capteur SPR classique est ajouté en pointillés. 100

Figure 4.1 : Images SPR acquises en présence d'une solution aqueuse contenant des levures sur les électrodes. a) Image de la puce après injection des levures et application de la tension, accompagnée d'agrandissements de l'électrode encadrée en bleu : b) Avant injection (t = -1 s) c) Après injection mais avant application de la tension (t = 2 min 9 s) d) Après application de la tension (t = 3 min).....103

Figure 4.2 : a) Observation en microscopie optique lors de l'application des effets électrocinétiques sur une solution d'eau pure contenant des levures. c) Même image mais avec l'éclairage du microscope augmenté pour distinguer les objets présents sur les électrodes. b) et d) Agrandissements respectifs des zones encadrées sur les images a) et c). 105

Figure 4.3 : Évolution de la partie réelle du facteur Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence. Curseur à 5 kHz, la fréquence utilisée pour attirer les levures sur les électrodes. 106

Figure 4.4 : Résultats des simulations COMSOL montrant les forces engendrées par l'application d'une tension sinusoïdale (20 Vpp, 5 kHz) sur une solution de levures dans de l'eau pure. L'électrode est représentée par le rectangle couleur or, les centres des gaps (axes de symétrie en pointillés rouges) se situent à -175 µm et 175 µm sur l'axe horizontal. a) Champ de force de DEP, échelle logarithmique. b) Champ de force de traînée induite par le flux électroosmotique, échelle logarithmique. c) Somme des champs de force engendrés par DEP et ACEO, échelle logarithmique. d) Même résultat que c), mais les régions où la force de DEP est supérieure à la force de traînée ont été mises en évidence (magenta). 107

Figure 4.5 : Comparaison des signaux mesurés sur l'électrode de contrôle et les électrodes actives lors de l'injection de BSA concentrée à 20 µg/ml dans de l'eau, sous application d'une tension (1 kHz, 10 Vpp). 111

Figure 4.6 : Images SPR de la puce obtenues a) avant injection de la BSA b) 15 minutes après le début de l'injection. 112

Figure 4.7 : Différence de signal observée sur les électrodes 15 minutes après l'injection de BSA concentrée à 20 µg/mL, sous l'action des effets électrocinétiques (10 Vpp, 1 kHz). 112

Figure 4.8 : Images obtenues par SPR d'un capteur fonctionnalisé et spotté a) avant injection de l'ADN cible et b) 12 min après injection de l'ADN cible. 116

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Figure 4.9 : Signal SPR mesuré sur les plots complémentaires lors de l'injection d'ADN à t = 0 min. 117

Figure 4.10 : Exemple de cinétique d'hybridation ADN/ADN dans du PBS 0.1X. 118

Figure 4.11 : Influence de l'application de tensions sur l'hybridation entre les cibles et les sondes ADN dans du PBS 0.1X : signal mesuré sur l'électrode de contrôle et les électrodes actives pendant l'application de différentes tensions électriques sur celles-ci. 119

Figure 4.12 : Vitesse électroosmotique à une distance d = 50 µm du bord de l'électrode, en fonction de la conductivité (échelle log) du milieu considéré et de la fréquence (échelle log) appliquée, pour une tension de 1 V. 125

Figure 4.13 : Fréquence optimale (assurant une vitesse électroosmotique maximale) en fonction de la conductivité du milieu. 127

Figure 4.14 : Design de la puce multigaps, avec zoom sur la zone active du capteur où se trouvent les peignes d'électrodes servant au transfert de masse et à la détection. 128

Figure 4.15 : Variations de signal mesurées en fonction du gap des électrodes concernée lors de l'application d'une tension sinusoïdale (1 kHz, 10 Vpp) sur une solution de billes PS 200 nm dans de l'eau pure. 130

Figure 4.16 : Vitesse électroosmotique dans de l'eau pure à une distance de 30 µm du bord de l'électrode, avec une tension appliquée de 10 Vpp pour 3 fréquences différentes, en fonction de la largeur du gap interélectrodes. 132

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

CHAPITRE 0 : INTRODUCTION GENERALE

Ce chapitre préliminaire vise à situer le projet de recherche dans le contexte global des biocapteurs, de manière à introduire la problématique de cette thèse. Il détaillera par ailleurs l'organisation du manuscrit ainsi que le cadre dans lequel les travaux présentés ont été réalisés.

0.1 De l'importance du développement des biocapteurs

Pour le diagnostic de maladies, une des approches les plus employées est la détection de biomarqueurs spécifiques [1]. Le vieillissement de la population dans les sociétés occidentales et l'explosion des flux humains imposant aujourd'hui d'améliorer notre système de prévention des maladies, des efforts de recherche considérables sont déployés afin de proposer des alternatives aux méthodes classiques de détection, qui sont souvent longues et coûteuses. Le test ELISA (de l'anglais *enzyme-linked immunosorbent assay*) pour le VIH (Virus de l'immunodéficience humaine), par exemple, comprend au moins trois étapes de chimie à effectuer sur l'échantillon de sang avant de pouvoir passer à l'étape finale de détection par fluorescence.

En outre, d'après de récentes études, le marché global des biocapteurs est supposé passer de 15.96 G$ en 2016 à 27.06 G$ en 2022 [2,3]. Les mêmes sources prévoient une croissance du marché des techniques de détection *label-free* (i.e. sans marquage préalable des molécules cibles) de 1.22 G$ en 2015 à 2.13 G$ en 2020.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Considérons l'exemple du génie génétique : la multiplication des applications de ce domaine fait de la détection des molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN) un segment important de ces marchés. Or aujourd'hui, la détection d'ADN doit être précédée d'un procédé long et coûteux de multiplication du matériel génétique (polymerase chain reaction ou PCR) car les capteurs actuels ne sont pas assez sensibles pour détecter une séquence d'ADN à sa concentration initiale dans un échantillon de sang.

Des progrès considérables ont été réalisés ces dernières années sur la sensibilité des biocapteurs utilisés, mais ils sont toujours limités par les problématiques de diffusion des molécules cibles dans l'échantillon. Ce projet de recherche propose d'étudier et d'intégrer une méthode de transfert de masse sur un biocapteur pour surmonter cette difficulté.

0.2 L'intérêt du transfert de masse pour les biocapteurs

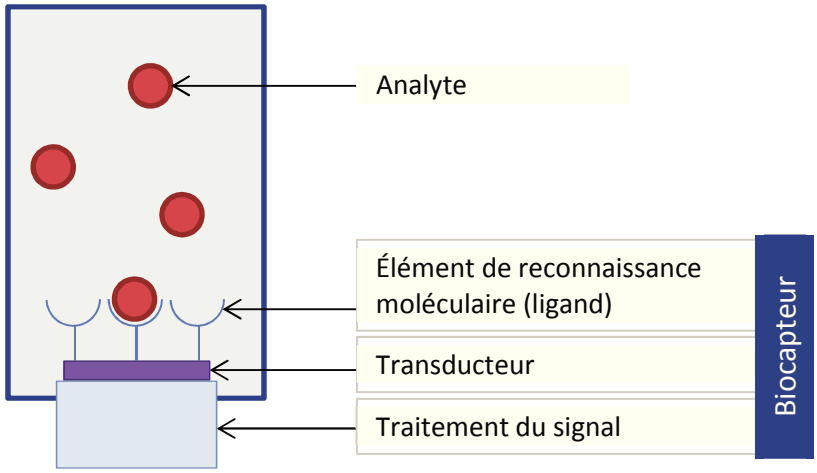


Figure 0.1 : Schéma de principe d'un biocapteur.

Un biocapteur est une structure tripartite, illustrée sur la Figure 0.1, composée de :

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

- Un élément de reconnaissance moléculaire, ou sonde (parfois appelé ligand), dont le rôle est de réagir avec la molécule cible que l'on veut détecter (l'analyte).
- Un transducteur, sur lequel est fixé le ligand. Il convertit l'évènement d'interaction entre le ligand et l'analyte en un signal physique plus facilement mesurable et interprétable.
- Un système de traitement du signal en sortie du transducteur, permettant l'acquisition et l'enregistrement de la mesure.

Pour pouvoir être détectés, les analytes doivent interagir avec les ligands immobilisés sur le transducteur et, pour cela, doivent se déplacer dans le liquide pour atteindre la surface de détection : c'est le transport de masse. Par analogie avec les transferts thermiques, la diffusion et la convection de matière sont les deux phénomènes classiquement utilisés pour décrire le transfert de masse en mécanique des fluides.

Les performances d'un biocapteur sont ainsi régies par (entre autres) :

- La vitesse de diffusion des cibles vers la surface de détection
- La vitesse d'interaction entre les analytes et les ligands

Dans certains cas, le facteur limitant est la vitesse de diffusion des cibles vers la surface de détection ; on parle alors de limite de diffusion [4]. Lorsque la surface de détection est de taille réduite, ce qui est le cas pour beaucoup de biocapteurs actuels, le temps de détection peut ainsi devenir extrêmement long à faibles concentrations.

A cet égard, il est donc particulièrement intéressant d'être capable d'améliorer le transfert des cibles vers les sondes. La caractéristique que l'on cherche à améliorer ici est la limite de détection du capteur : la concentration minimale d'analytes nécessaire pour que le capteur les détecte. Cette caractéristique n'est pas fixe, elle est par nature

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

associée au temps requis pour que les analytes soient captés. Ce temps est fonction de la distance à parcourir et du coefficient de diffusion des cibles dans l'électrolyte.

0.3 Problématique, objectifs et organisation du manuscrit

Depuis le début des travaux sur les biocapteurs, le réflexe naturel des chercheurs et ingénieurs a été de s'employer à améliorer la limite de détection et la sensibilité intrinsèques des capteurs en travaillant sur l'élément de transduction. La Figure 0.2 est issue des travaux de Piliarik et Homola [5] et donne, à titre d'exemple, les sensibilités atteintes expérimentalement par différents groupes de recherche (voir références [6–13]) en regard de la limite de résolution théorique qu'ils calculent pour un type de capteurs : les capteurs à résonance de plasmon de surface (SPR).

La SPR est une technique particulièrement adaptée à la détection d'interactions biomoléculaires. C'est une méthode *label-free* très sensible, versatile et qui permet des analyses en temps réel [14]. En outre, le Laboratoire de biophotonique de l'UdeS a développé une très forte expertise autour de cette technologie. Pour cette raison, c'est la méthode de détection sur laquelle se basent les dispositifs développés pour ce projet de thèse.

Comme la Figure 0.2 le montre, on s'approche aujourd'hui des performances optimales en ce qui concerne le mécanisme de transduction des capteurs SPR. La limite de diffusion est donc devenue l'un des principaux facteurs limitant l'amélioration des capteurs dans les prochaines années. L'une des stratégies émergentes visant à faire tomber cette barrière, et qui devrait permettre un bond technologique dans les

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

prochaines années, est la manipulation des cibles pour les concentrer sur l'élément de détection.

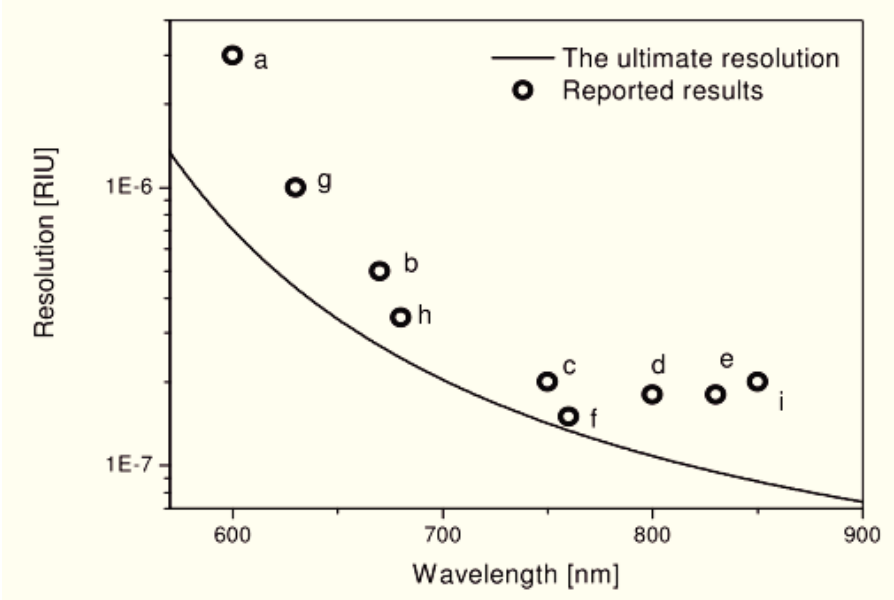


Figure 0.2 [5] : Comparaison de la limite de résolution théorique (en RIU : Refractive Index Units) et des résultats reportés par différents groupes : a) Stemmler et al. [6], b) Thirstrup et al. [7], c) Piliarik et al. [8], d) Nenninger et al. [9], e) Chinowsky et al. [10], f) Biacore 3000 (GE Healthcare, USA), g) Wu et al. [11], h) Bardin et al. [12], i) Piliarik et al. [13]

La problématique centrale de ce projet est donc la suivante : comment intégrer une méthode de transfert de masse à un capteur SPR pour en améliorer la limite de détection ?

Cette problématique donne lieu à plusieurs sous-objectifs que viennent compléter les travaux présentés ici. Dès lors, nous nous attacherons à :

- Déterminer quelle méthode d'actuation est la plus adaptée à la technologie de détection utilisée (SPR). Le Chapitre 1 répond à cette question en présentant un état de l'art des solutions envisageables.
- Démontrer la faisabilité, en termes de fabrication mais aussi d'utilisation, de la solution retenue. Le Chapitre 2, qui détaille la conception et le processus de

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

fabrication du prototype proposé, ainsi que le début du Chapitre 3 qui présente ses modalités d'utilisation, remplissent tous deux cet objectif.

- Apporter une preuve de concept de la pertinence du prototype conçu par le biais de l'évaluation de ses performances sur un système modèle. C'est la finalité du Chapitre 3.
- Evaluer l'applicabilité du dispositif proposé à différentes espèces biologiques. C'est l'objet du Chapitre 4.
- Discuter les contraintes limites de l'utilisation des effets électrocinétiques sur un capteur SPR et explorer/proposer des pistes permettant de s'affranchir de ces contraintes. Le Chapitre 4 apportera des éléments de réponse à ces interrogations.
- Comprendre comment les effets de transfert de masse mis en œuvre interagissent dans le cadre des différents systèmes étudiés. Du fait de la multiplicité des paramètres à prendre en compte, cette question sera traitée tout au long du manuscrit.

0.4 Les acteurs du projet

La mise au point d'un biocapteur fait intervenir plusieurs domaines scientifiques : la chimie et la science des matériaux, pour utiliser des matériaux adaptés aux biomolécules que l'on veut détecter, la microfabrication et la microfluidique pour pouvoir réaliser des biopuces, et enfin le domaine physique adapté à la technique de détection : il peut s'agir d'optique, de mécanique, de thermique ou d'électronique suivant la méthode choisie.

Le Laboratoire Nanotechnologies & Nanosystèmes (LN2) est une Unité Mixte Internationale dont les tutelles sont le CNRS, l'Université de Sherbrooke, l'Université de Lyon et l'Université Joseph Fourier de Grenoble. Avec une équipe de recherche

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

axée notamment sur les BioMEMS (Biomedical MicroElectroMechanical Systems), le LN2 a la chance de rassembler les différentes compétences nécessaires au développement d'un biocapteur.

Les travaux des professeurs Paul Charette et Michael Canva, directeurs de recherche au sein du laboratoire de biophotonique de l'Université de Sherbrooke, se sont focalisés ces dernières années sur la SPR et ses applications aux biotechnologies. Leurs problématiques de recherche sont diverses et vont de la théorie [15] à l'application sur biopuce [16], en passant par l'étude de nouvelles structures plasmoniques [17]. Ainsi, le laboratoire a une très bonne vision d'ensemble du domaine des biocapteurs SPR.

Abdelkader Souifi, professeur à l'INSA Lyon et chercheur au sein de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL), est aussi co-directeur de ce projet de thèse en cotutelle. Ses activités de recherche dans l'équipe Dispositifs Électroniques lui assurent une expertise certaine dans l'intégration de nouvelles fonctions électroniques sur puce.

Marie Frenea-Robin et Julien Marchalot, Maîtres de conférences au laboratoire Ampère, ont apporté leur expérience et leur connaissance des effets électrocinétiques, notamment la diélectrophorèse et l'électroosmose qui constituent comme on le verra plus tard le cœur de ce projet.

Enfin, Julien Moreau, Maître de conférences à l'Institut d'Optique Graduate School dont les travaux portent sur la biophotonique, a accepté d'apporter son aide (qui s'est notamment matérialisée par une mise à disposition de certains équipements du Laboratoire Charles Fabry) et sa précieuse expertise sur les dispositifs plasmoniques et vient donc compléter l'équipe des personnes impliquées dans ce projet.

La collaboration franco-québécoise associant le LN2, l'INL, Ampère et le LCF a ainsi permis le rassemblement des expertises nécessaires à la bonne conduite de ce projet de recherche, qu'il s'agisse de la technique de détection (SPR), de la transformation en

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

biocapteur (fonctionnalisation de surface) ou de la méthode de concentration des biomolécules (électronique et microfluidique).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

CHAPITRE 1 : ETAT DE L'ART

La problématique de ce projet de thèse fait intervenir plusieurs domaines physiques et les questions soulevées par ce travail combinent des notions liées à l'optique, la microfluidique, la biochimie et l'électromagnétisme. Les connaissances qu'il faut mobiliser pour appréhender le projet dans son ensemble sont donc variées et, à cet égard, la suite de ce chapitre consiste en un état de l'art des technologies existantes qui visera par ailleurs à :

- Démontrer l'intérêt de l'intégration d'une fonction d'actuation sur un biocapteur plasmonique.
- Décrire les méthodes connues de manipulation de biomolécules et justifier le choix de celles qui seront retenues.
- Donner les prérequis scientifiques nécessaires à la compréhension des phénomènes physiques mis en œuvre et étudiés.

1.1 Principe, applications et limites des biocapteurs plasmoniques

1.1.1 Introduction aux biocapteurs

L'histoire des biocapteurs démarre dans les années 1960 avec les travaux de Leland C. Clark sur la détection du glucose dans le sang. Depuis, de tels dispositifs ont trouvé de multiples applications dans les domaines de la médecine, des biotechnologies, de l'agriculture, de l'agro-alimentaire, du militaire et de l'environnement. Si les utilisations sont désormais variées, la structure tripartite

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

ligand/transducteur/traitement continue à constituer le schéma classique dans la conception d'un biocapteur.

La diversité des applications et des analytes implique le développement de plusieurs types de biocapteurs [18], qui peuvent être :

- Mécanique : la présence d'analytes sur le transducteur fait varier la masse de celui-ci, ce qui modifie sa fréquence de résonance.
- Électrochimique : la présence d'analytes est détectée par ampérométrie, conductimétrie ou potentiométrie dans la solution.
- Électronique : par contraste avec les méthodes électrochimiques, ici c'est la variation de potentiel électrique à la surface d'un semi-conducteur qui est mesurée.
- Thermique : l'interaction entre l'analyte et le ligand dégage de la chaleur, ce qui change la température du milieu.
- Optique : les analytes peuvent être détectés par fluorescence, microscopie, méthodes interférentielles ou résonance de plasmon de surface.

Parmi les méthodes de détection optique, la SPR offre une excellente sensibilité et la possibilité de mesures en temps réel [19]. En outre, la fabrication d'un dispositif de détection SPR peut être résumée simplement au dépôt d'une couche mince métallique (quelques dizaines de nanomètres d'épaisseur) sur une lame de verre. C'est donc une méthode performante et facile à mettre en œuvre, et par conséquent elle est très largement utilisée pour la détection d'interactions biomoléculaires, que ce soit dans les laboratoires de recherche ou dans les laboratoires médicaux.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

1.1.2 Biocapteur à résonance de plasmon de surface

Un plasmon de surface est une excitation collective des électrons se propageant à l'interface entre un diélectrique et un métal. Le vecteur de l'onde est orienté perpendiculairement au plan d'incidence (c'est une onde Transverse-Magnétique (TM)) et sa propagation hors de l'interface est évanescente [20]).

Un plasmon de surface peut être excité en dirigeant le faisceau d'une onde lumineuse sur une surface métallique à travers un dispositif de couplage. Dans le cadre de ce projet, c'est la méthode la plus simple à mettre en place qui est utilisée : celle du prisme. Dans cette configuration, appelée configuration de Kretschmann, l'onde incidente traverse un prisme (qui constitue un milieu optiquement plus dense que l'air) avant d'atteindre le film métallique, de façon à ce que l'onde évanescente à l'interface prisme/métal puisse interagir avec le film et exciter un plasmon de surface à l'interface métal/diélectrique. Ce couplage n'a lieu que dans des conditions bien précises appelées conditions de couplage.

Les conditions de couplage ne peuvent être vérifiées que pour un certain angle θ_{SP} : pour cet angle-là, l'onde incidente excite le plasmon de surface et n'est donc pas réfléchie, d'où la présence d'une raie dans le faisceau réfléchi comme on peut le voir sur la Figure 1.1.

Les plasmons de surface sont extrêmement sensibles aux variations des indices de réfraction du métal ou du diélectrique. Ainsi, un changement d'indice optique du milieu diélectrique ε_d ou du métal ε_m induit un changement de la constante de propagation du plasmon k_{SP}, qui conduit lui-même à un changement de la condition de couplage. L'angle pour lequel la résonance a lieu est alors différent.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

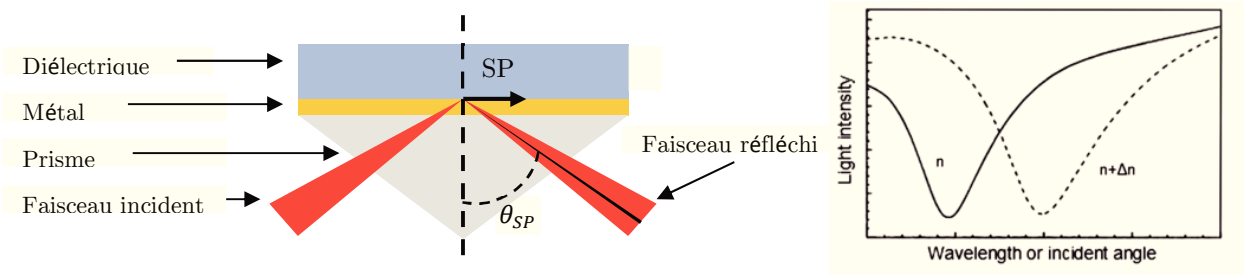


Figure 1.1 : À gauche : représentation schématique d'un montage de détection SPR. À droite : illustration du principe de détection d'une interaction. Lorsqu'un analyte interagit avec un ligand en se fixant sur la surface, cela provoque une variation de l'indice optique Δn dans le diélectrique qui conduit à un décalage de l'angle de résonance.

C'est sur ce principe qu'est basé le fonctionnement d'un dispositif SPR en tant que biocapteur (voir Figure 1.2) : les ligands sont immobilisés à l'interface solide/liquide (métal/diélectrique). Si des analytes interagissent avec ces ligands, alors l'indice de réfraction local dans le diélectrique est modifié, et en effectuant un balayage en angle ou en longueur d'onde, il est possible d'observer cette variation qui se répercute sur la condition de couplage. En effectuant ces mesures en fonction du temps, il est donc possible de suivre des interactions intermoléculaires en temps réel.

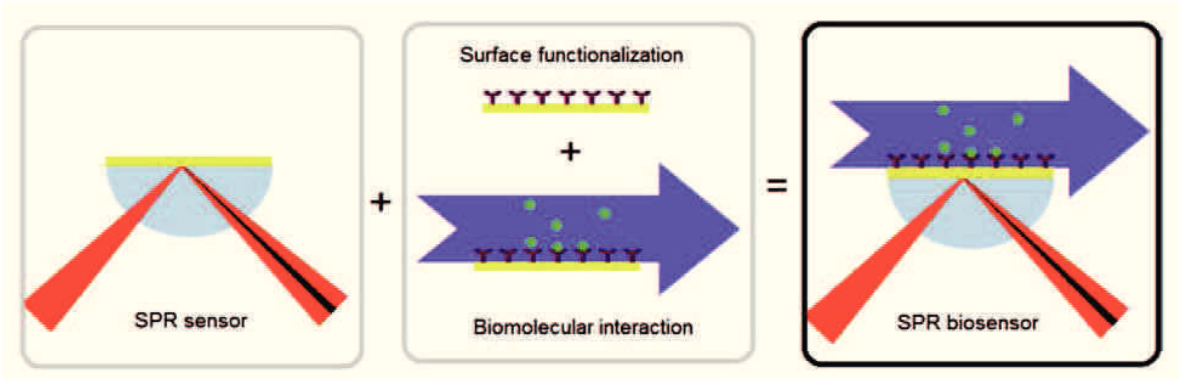


Figure 1.2 : Utilisation d'un capteur SPR en tant que biocapteur.

L'amplitude de l'onde évanescente diminue exponentiellement dans la direction perpendiculaire à l'interface, restreignant par là-même la profondeur de détection du capteur à quelques centaines de nanomètres d'épaisseur au-dessus du métal pour les longueurs d'onde dans le visible [21]. La condition de couplage n'est par conséquent

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

influencée que par les variations qui ont lieu dans cette zone, et seules les interactions proches de la surface du métal sont ainsi détectées. La SPR est donc une méthode d'analyse pertinente pour l'étude d'interactions entre biomolécules, dont beaucoup ont une taille compatible avec cette technique de détection surfacique. Par ailleurs, elle est aussi adaptée à des objets plus gros, comme des cellules de quelques µm de diamètre, notamment pour l'étude de leurs propriétés surfaciques [22,23].

Le biocapteur idéal devrait être capable de détecter des interactions entre des molécules non marquées au préalable. L'utilisation de marqueurs rend en effet le procédé global plus long et plus coûteux. Or, les techniques de détection sans marquage, ou *label-free*, sont souvent moins sensibles que celles avec marquage. En outre, un capteur idéal devrait aussi être totalement spécifique (c'est-à-dire qu'on veut détecter seulement l'analyte ciblé et pas autre chose), capable de faire des analyses *in situ*, facile à produire, réutilisable, peu coûteux, et simple à utiliser [24].

De par leur sensibilité, leur structure et leur principe de fonctionnement, les biocapteurs SPR remplissent la plupart de ces critères. Ils restent cependant moins sensibles que la détection par marquage fluorescent pour les très faibles concentrations, d'où l'intérêt de nos travaux qui visent à attirer activement les molécules cibles vers la surface du capteur. La spécificité, quant à elle, dépend de la fonctionnalisation chimique de surface et non de la méthode de transduction.

1.1.3 L'imagerie SPR et ses applications de biodétection

L'imagerie SPR (SPRI) est une technique qui consiste à illuminer toute la surface du capteur plasmonique plutôt qu'un point, à angle et longueur d'onde fixes. Les variations locales d'indice de réfraction dans le diélectrique sont alors visibles sur l'image de l'intensité réfléchie, collectée par une caméra CCD. En permettant de préparer les échantillons sous forme de plots (ou « spots ») constituant des matrices

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

de quelques dizaines de lignes et colonne, cette technologie a constitué une véritable rupture dans l'utilisation de la SPR en décuplant le rendement de cette technique.

1.1.3.1 Détection et analyse des propriétés des cellules

Outre son utilité pour la simple détection de cellules (les bactéries *Salmonella enteritidis* et *Listeria monocytogenes* peuvent être détectées en quelques minutes à des concentrations descendant jusqu'à 10^6 cellules/ml dans du PBS [25]), l'imagerie SPR dispose de plusieurs avantages pour l'étude de leurs propriétés physiologiques et surfaciques. D'une part cette technologie offre de bonnes résolutions spatiale et temporelle : dès lors, on peut l'employer pour étudier les interactions entre des cellules et un substrat, et les dynamiques cellulaires qui en découlent, que celles-ci se manifestent spatialement [26,27] ou chimiquement [28]. D'autre part, la SPR est une technique non invasive, ce qui rend possible son utilisation pour la transduction d'événements se produisant à l'intérieur des cellules [29,30] ou même pour le *tracking* de structures intracellulaires comme les mitochondries [31].

L'imagerie SPR est une des activités principales du Laboratoire de Biophotonique de l'UdeS et a engendré la publication de plusieurs travaux, tous utiles à l'étude des cellules et de leurs mécanismes. L'augmentation de la profondeur de pénétration du plasmon dans le diélectrique [32,22] par exemple, est utile pour le suivi en temps réel de l'activité intracellulaire. L'amélioration de la résolution spatiale, que cela soit fait par post-traitement du signal [33] ou par une modification structurelle du capteur [34], est aussi un axe de travail du laboratoire qui devrait permettre des gains de performance significatifs pour l'imagerie SPR.

Dans le cadre des travaux présentés ici, nous utiliserons la levure de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) en tant que cellule modèle pour évaluer l'efficacité du transport de masse dans les dispositifs étudiés.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

1.1.3.2 Détection de protéines

Dans le domaine de la détection et de l'analyse des protéines, la SPR rencontre un intérêt grandissant. D'une part, la sensibilité de la SPR est particulièrement intéressante pour parvenir à détecter les interactions entre ces macromolécules [35], bien plus petites que des cellules. D'autre part, le marquage des protéines cibles, nécessaire pour la détection par fluorescence par exemple, peut entraîner des changements dans la structure de ces molécules, dont la fonctionnalité dépend directement de la conformation [36].

Dès les années 2000, des travaux sur des matrices de plots permettant l'analyse d'interactions complexes entre protéines (sur des ensembles de plus de deux protéines par exemple) ont été réalisés sur des biopuces analysées en SPRI [37–39]. Cette technique est très pertinente pour la découverte de médicaments, puisque la SPR permet des mesures en temps réel, donnant ainsi accès aux constantes cinétiques des réactions étudiées [40,41].

Dans le cadre de ce projet de thèse, l'albumine de sérum bovin (BSA) sera utilisée comme protéine modèle pour attester de la pertinence de la stratégie adoptée. Cette molécule, issue d'un peptide long d'environ 600 acides aminés et dotée d'une masse moléculaire de 66.5 kDa, est détectable par un capteur SPR standard à des concentrations descendant jusqu'à 0.1 ng/ml [42]. En outre, elle présente l'avantage d'être stable, facilement productible et purifiable, ce qui justifie son utilisation comme modèle ou standard dans beaucoup de travaux de recherche, dont ceux présentés ici.

1.1.3.3 Détection d'événements d'hybridation ADN/ADN

L'hybridation d'un brin simple d'acide désoxyribonucléique (ss-ADN) avec son complémentaire (c-ADN) est une réaction très spécifique. Pour détecter une séquence spécifique d'ADN, on utilise donc des brins constitués de la séquence complémentaire comme ligands que l'on immobilise à la surface d'un biocapteur. Si une réaction est

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

détectée, cela signifie qu'il y a eu hybridation et donc que la séquence initiale d'ADN est présente dans l'échantillon.

Les biocapteurs SPR sont particulièrement adaptés à la détection d'hybridations ADN/ADN : les brins sondes sont immobilisés sur la surface métallique et l'échantillon est ensuite placé sur cette surface. S'il y a hybridation, l'indice de réfraction est localement modifié et cette variation est détectée par le capteur.

Les premiers travaux sur la détection de l'hybridation de brins d'ADN par SPR sont publiés dans les années 1990 [43]. Ils sont motivés par la non-nécessité de marquage préalable des cibles et pour la plupart facilités par l'apparition concomitante des premiers instruments de mesure SPR commerciaux. Ils montrent que la SPR peut être utilisée efficacement pour étudier les interactions entre molécules d'ADN, et plus particulièrement que cette méthode de détection sans prétraitement des cibles est rapide, sensible et spécifique.

Plus récemment, l'imagerie SPR a permis d'étudier ces interactions avec une limite de détection (i.e. concentration minimale en cibles de la solution pour qu'une réaction soit détectable) de 10 nM pour des brins d'une longueur de 16 bases [44] et de 2nM pour des brins constitués de 1500 nucléotides [45] (le temps donné pour l'hybridation dans ces expériences variant de 30 minutes à 1 heure).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

1.1.4 Pourquoi ajouter une fonction d'actuation ?

Afin d'améliorer les performances obtenues et abaisser la limite de détection pour l'amener au niveau du pM, He et al. ont greffé des nanoparticules d'or sur les brins sondes d'ADN [46]. Dans leur expérience, ils utilisent une méthode de type « sandwich » en deux étapes d'accroche :

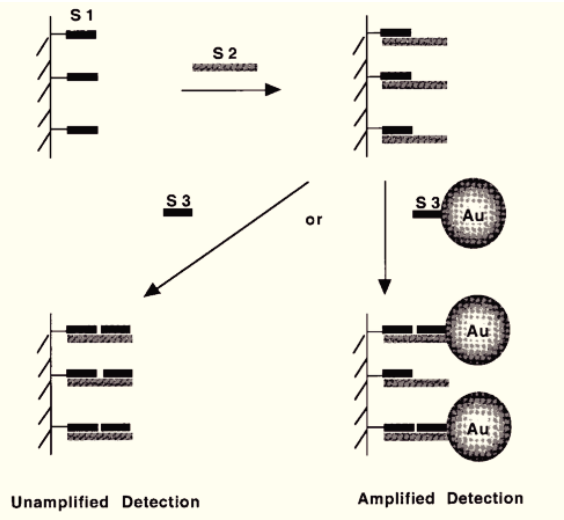


Figure 1.3 : Illustration du procédé expérimental de greffe de nanoparticules d'or sur les brins d'ADN.

- Une première sonde est fixée à la surface, elle est complémentaire de la première moitié du brin cible.
- La surface ainsi fonctionnalisée est exposée à la solution contenant les cibles, puis rincée de manière à ce que les brins hybridés restent et les autres disparaissent.
- Enfin, ce système est mis en présence d'autres sondes qui, elles sont marquées par des nanoparticules d'or, et sont complémentaires de la deuxième moitié du brin cible.

Ainsi, si les cibles sont présentes dans la solution, elles s'hybrident avec les premières sondes, avant de s'hybrider avec les deuxièmes : la surface est alors fonctionnalisée avec une couche contenant des nanoparticules d'or. Si les cibles ne sont pas présentes en solution, rien ne se passe et seules les premières sondes restent à la surface.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

La présence de nanoparticules d'or à la surface multiplie par 18 le décalage du pic de SPR puisque, par rapport aux molécules d'ADN, les particules d'or présentent plusieurs avantages :

- Elles sont plus denses
- Elles ont un indice de réfraction plus élevé
- Elles induisent probablement une interaction électromagnétique avec la surface

Les auteurs atteignent alors une limite de détection de 10 pM pour des brins d'une longueur de 24 bases. La limite de détection du biocapteur SPR est ainsi divisée par 100. Cependant, cette méthode nécessite un traitement post-hybridation. Cette étape supplémentaire induit un délai d'attente et un coût plus élevés.

D'autres techniques, similaires à la fois dans la méthode et le résultat, existent et permettent d'améliorer le signal détecté pour augmenter la sensibilité du capteur. La plupart d'entre elles utilisent un pré- ou post-traitement des ligands ou des analytes, comme c'est le cas dans l'expérience de He et al. [46] décrite ci-dessus. En plus de complexifier et de rendre plus coûteux le procédé global de détection, le marquage des molécules peut modifier la cinétique des interactions moléculaires et rendre plus difficile leur analyse.

La solution proposée par notre projet de recherche permet de s'affranchir de ce problème. Elle consiste à utiliser la surface de détection elle-même pour agir à distance sur les molécules cibles et les faire migrer plus rapidement vers la surface à travers l'électrolyte – le transducteur jouant alors le rôle d'actuateur.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

1.2 Comment manipuler les cibles en milieu liquide ?

1.2.1 Technologies d'actuation sur dispositif microfluidique

L'utilisation de capteurs aux dimensions micrométriques et de volumes d'analyse réduits impose l'emploi de technologies microfluidiques pour agir sur les échantillons. Plusieurs méthodes existent pour manipuler des molécules dans des dispositifs microfluidiques [47] :

- L'induction d'ondes acoustiques de surface sur le substrat permet de perturber le flux laminaire habituel des dispositifs microfluidiques et ainsi de fournir un mélange plus rapide [48]. L'efficacité de cette méthode a été démontrée en 2010 par Alan Renaudin au sein du LN2 [16]. Cela nécessite cependant d'intégrer un matériau piézoélectrique au substrat.

- L'utilisation de différences de température entre plusieurs fluides que l'on veut mélanger permet d'améliorer le mélange entre ces deux fluides [49]. Dans le cadre de ce projet, un seul fluide est présent sur le détecteur, mais on pourrait imaginer chauffer différentes zones de la surface pour améliorer la diffusion. L'intégration d'une fonction de contrôle de la température sur le substrat SPR semble cependant compliquée dans la mesure où le signal mesuré par SPR est extrêmement sensible aux variations de température.

- L'application de champs électriques directement sur des cibles chargées ou polarisables permet de manipuler celles-ci via les phénomènes d'électrophorèse [50] et de diélectrophorèse (DEP) [51], dont les principes sont détaillés dans la partie suivante. Ces méthodes sont applicables aux objets biologiques (qui sont tous polarisables, et pour beaucoup, chargés) et à priori intégrables sur un substrat SPR puisque la couche métallique peut servir d'électrode.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

- L'application de champs électriques sur le fluide – et non sur les cibles – peut mettre celui-ci en mouvement. Les phénomènes mis en jeu sont ainsi qualifiés d'électrohydrodynamiques et sont expliqués dans les parties suivantes. De la même manière que pour l'électrophorèse et la diélectrophorèse, ces méthodes sont intégrables sur un substrat SPR. Pour cette raison, c'est la solution qui a été retenue, avec la diélectrophorèse, pour mener à bien le projet.

1.2.2 Manipulation directe des cibles par électrophorèse et diélectrophorèse

La manipulation de biomolécules par des champs électriques est connue et pratiquée depuis le milieu des années 1960 et les premiers travaux visant à étudier la mobilité des particules concernées lorsqu'elles sont exposées à un champ électrique [52–54].

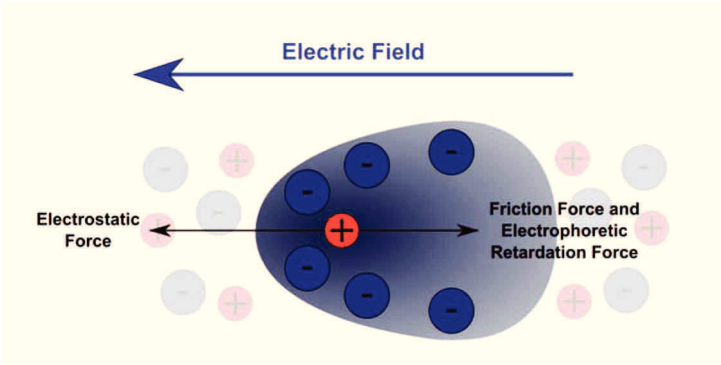


Figure 1.4 : Schéma de principe des forces électrophorétiques s'appliquant sur une particule chargée.

1.2.2.1 Électrophorèse

L'électrophorèse désigne le phénomène se produisant lorsqu'une particule chargée est placée dans un champ électrique spatialement uniforme. 3 forces, résumées sur la Figure 1.4 [55], s'exercent alors sur la particule :

- La force électrostatique, donnée par $F_{el} = qE$ où q est la charge de la particule et E l'amplitude du champ électrique
- La force de frottement exercée par le fluide sur la particule F_f

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

- La force de retard électrophorétique F_{ret} qui est la force s'appliquant sur les ions contenus dans la couche ionique présente à la surface de la particule. Selon la théorie de la double couche de Helmholtz, un solide présentant une charge surfacique que l'on plonge dans un liquide attire des ions de charge opposée à sa surface. Le champ électrique exerce une force sur ces ions, partiellement transmise à la particule par contrainte visqueuse.

La mobilité électrophorétique d'une particule est alors définie par $\mu_e = \frac{v}{E}$ où v est la vitesse atteinte par la particule lorsque le champ E lui est appliqué. L'une des applications historiques de l'électrophorèse est la séparation de molécules d'ADN : en les faisant avancer à travers une matrice de gel d'agarose ou polyacrylamide en leur imposant une force électrophorétique, celles-ci vont plus ou moins loin en fonction de leur taille [50].

1.2.2.2 Diélectrophorèse

La diélectrophorèse désigne la mise en mouvement d'une particule polarisable par l'action de l'application externe d'un champ électrique spatialement non uniforme. Ce phénomène dépend des propriétés diélectriques de la particule dans un fluide donné[56]. Il se décompose en deux mécanismes, illustrés sur la Figure 1.5 [56], qui se produisent immédiatement dès l'application du champ électrique :

- La particule est d'abord polarisée sous l'action du champ électrique.
- La non-uniformité spatiale du champ implique que la résultante de son action sur la particule est non nulle.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

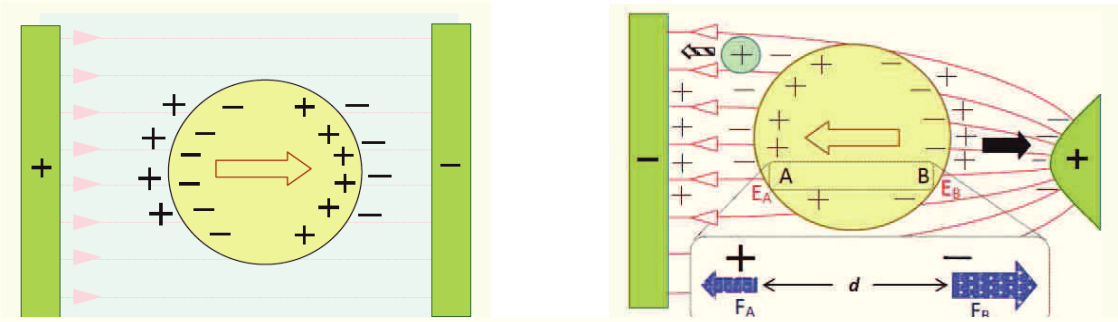


Figure 1.5 : À gauche : polarisation d'une particule sphérique. Les charges s'accumulent à l'interface entre le matériau diélectrique et le milieu liquide. À droite : champ électrique non uniforme et DEP. La particule subit une force dépendant de la distribution spatiale du champ. Dans cet exemple, le matériau est plus facilement polarisable que le liquide et la résultante est dirigée vers le maximum de champ (ici vers la droite).

La force s'exerçant sur une particule sphérique de rayon r s'exprime par :

$$< \overrightarrow{F_{DEP}} > = 2\pi\varepsilon_m r^3 Re[f_{CM}]\nabla E_{eff}^2 \qquad \textbf{Équation 1.1}$$

Où $Re(f_{CM})$ est la partie réelle du facteur de Clausius-Mosotti (qui s'écrit $f_{CM} = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}$ avec ε_p^* la permittivité complexe de la particule et ε_m^* celle du milieu), r est le rayon de la particule sphérique et E_{eff} la valeur efficace du champ électrique.

La force DEP dépend donc du volume de la particule, de la polarisabilité de l'objet et de celle du milieu, ainsi que du gradient de champ électrique. Cette force peut agir sur la particule de deux manières différentes :

- Si $Re(f_{CM}) > 0$, la DEP est positive et le mouvement de la particule se fait vers les zones où le champ est plus élevé.
- Si $Re(f_{CM}) < 0$, la DEP est négative et le mouvement de la particule se fait vers les zones où le champ est plus faible.

Le principe de la diélectrophorèse repose sur la présence de gradients de champ dans le fluide et fonctionne donc en courant alternatif (AC) ou continu (DC). En effet, le mouvement de la particule ne dépend pas du signe de la polarisation des électrodes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Elle est souvent utilisée avec un champ alternatif car les fréquences élevées (au-dessus de quelques kHz) permettent d'éviter des problèmes d'hydrolyse. En outre, utiliser un champ alternatif permet de s'affranchir des effets électrophorétiques et de jouer sur la fréquence si besoin.

En effet, les paramètres ε_p^* et ε_m^* dépendent de la fréquence du champ auquel le système est exposé. Ainsi, suivant la fréquence utilisée, la quantité $Re(f_{CM})$ peut être positive ou négative et il en va de même pour la DEP elle-même. La fréquence pour laquelle la DEP passe de positive à négative est appelée *crossover frequency* en anglais ; en l'absence d'appellation équivalent officielle en français, elle sera donc désignée par l'expression *fréquence de transition,* notée f_c .

1.2.2.3 La diélectrophorèse et le cas complexe des biomolécules

Si la diélectrophorèse est facilement modélisable pour une particule sphérique simple, son application aux biomolécules est moins systématique. Là encore, le cas de l'ADN sert d'exemple typique pour illustrer la complexité de l'application des effets électrocinétiques à des objets biologiques. La taille variable de ces molécules, le nuage de contre-ions dû à leur charge intrinsèque, et le fait que leur conductivité change suivant leur conformation, sont autant de raisons qui font que les résultats des travaux sur l'ADN et la DEP venant de différents groupes de recherche sont difficilement comparables. Cependant, quelques grandes lignes du comportement des molécules d'ADN sous DEP peuvent être tracées.

En 1990, Washizu et Kurosawa sont les premiers à manipuler de l'ADN avec la DEP. Ils parviennent à piéger une molécule entre deux électrodes espacées de 60 µm, produisant une force électrique de $10^6\ V/m$ avec une fréquence variant entre 40 kHz et 2 MHz [57]. Ils montrent notamment que la molécule est étirée par le champ (alors qu'une molécule de taille supérieure à 150bp – c'est-à-dire la longueur de persistance de l'ADN – est naturellement repliée sur elle-même dans le liquide) et qu'elle peut

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

ainsi être mesurée pour en déduire le nombre de paires de bases qui la constituent. Ils observent aussi qu'à 40 kHz, la molécule s'oriente perpendiculairement au champ tandis qu'à partir de 0.1 MHz elle s'oriente parallèlement à lui. En 1998, le même groupe estime le diamètre du nuage de contre-ions à 20 nm, tandis que le diamètre moyen d'une molécule d'ADN est de 2 nm [58]. Ces travaux pionniers démontrent l'efficacité de la DEP pour la manipulation d'ADN dans le but de l'analyser.

Dans les années 2000, il est observé que l'utilisation de basses fréquences permet de piéger la molécule d'ADN sans l'étirer, et que l'efficacité du piège diminue en augmentant la fréquence (pour des fréquences comprises entre 5 Hz et 2 kHz) [59,60]. Ces résultats corroborent des travaux effectués en 2003 qui montrent que l'étirement de la molécule d'ADN dépend de la fréquence utilisée [61].

En 1998, la diélectrophorèse négative de l'ADN est observée pour des fréquences supérieures à 20 MHz dans un système à 4 électrodes [62]. Des calculs utilisant un modèle ellipsoïdal pour l'ADN donnent le même ordre de grandeur pour la fréquence de transition, estimée à 6 MHz [63].

Concernant l'influence de la longueur de la molécule d'ADN, la théorie permet de comprendre que plus celle-ci est courte, plus l'efficacité du piège est faible. En effet, plus une particule est petite :

- Plus le mouvement brownien est fort [64].
- Moins la force de DEP est importante (car proportionnelle au volume).

Si l'ensemble des travaux réalisés montrent que la DEP est une méthode efficace pour piéger des molécules d'ADN, l'influence de plusieurs facteurs tels que la fréquence du signal, la taille de la molécule et l'évolution de la polarisabilité de la particule dépendamment de l'environnement sont encore mal comprises.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

En outre, la force de DEP ne s'exerce qu'entre deux électrodes et son action est donc majoritairement observable à proximité de ces structures. Or, l'un des objectifs de ce projet de recherche est d'intégrer la méthode d'actuation au capteur. Dès lors, la question suivante se pose : comment amener les molécules contenues dans le fluide suffisamment près de la surface du dispositif afin de pouvoir les piéger par DEP ?

1.2.3 Manipulation indirecte par flux électrohydrodynamique

La solution proposée consiste à mettre l'ensemble du fluide en mouvement de manière à apporter aux molécules un mouvement supplémentaire de convection. Cette mise en mouvement peut se faire en utilisant des champs électriques, et met alors en jeu des phénomènes dits électrohydrodynamiques.

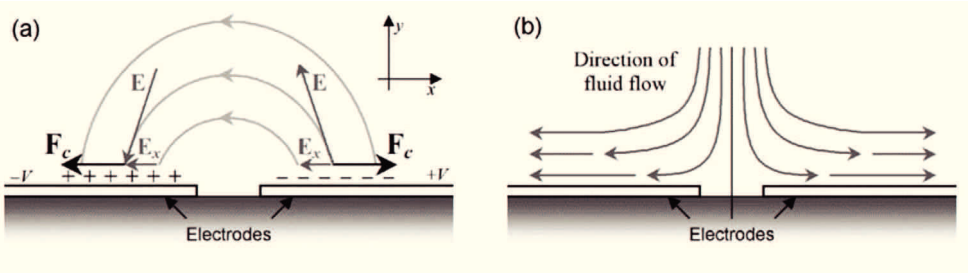


Figure 1.6 : Principe de l'induction d'un flux par électro-osmose. (a) Des cations s'accumulent contre la surface de l'électrode polarisée négativement. De même avec les anions sur la surface polarisée positivement. La composante horizontale du champ électrique induit un mouvement longitudinal des charges présentes en solution. (b) Ces charges entraînent l'ensemble du fluide par contrainte visqueuse et produisent donc un flux hydrodynamique dans le liquide.

Des mesures expérimentales, simulations numériques et analyses théoriques sur l'induction de flux électrohydrodynamiques par polarisation de microélectrodes sont réalisées au début des années 2000 par le groupe de Green [65–67]. Le phénomène utilisé est l'électro-osmose (ACEO) : la mise en mouvement de la couche de contre-ions située contre la surface des électrodes par action du champ électrique produit par ces électrodes. Le principe de ce phénomène est illustré sur la Figure 1.6 [65].

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

La symétrie du système est telle qu'elle permet l'utilisation d'un courant alternatif (voir Figure 1.7 [68]). La tension employée varie entre 0 et 2.5 V et la fréquence entre 0.1 et 100 kHz. Les résultats de Green *et al.* montrent que la vitesse du fluide augmente avec la tension et diminue lorsque la conductivité de l'électrolyte augmente. La vitesse du fluide en fonction de la fréquence a un profil en cloche et tend vers 0 pour les très basses et très hautes fréquences.

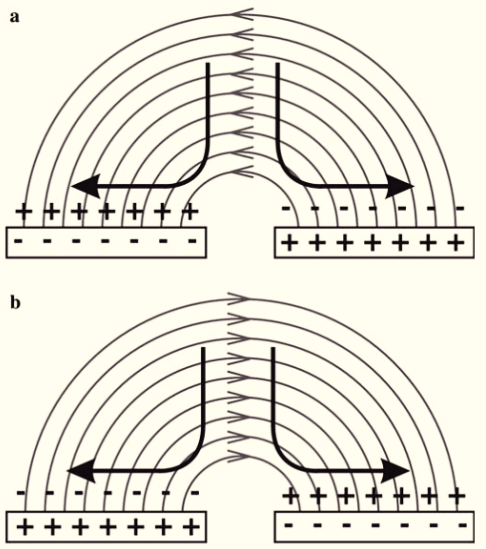


Figure 1.7 : Utilisation de l'électro-osmose en AC. Lorsque l'orientation du champ change, le signe de la couche ionique change aussi, ce qui donne un flux qui a toujours la même orientation.

Se basant sur leurs travaux, Hoettges *et al.* réalisent des microélectrodes interdigitées permettant d'améliorer le fonctionnement des biocapteurs en utilisant ces forces électrohydrodynamiques et en les combinant à la force diélectrophorétique de la façon suivante :

- L'électroosmose crée un flux à la surface des électrodes, qui dirige le fluide depuis l'arête d'une électrode vers son intérieur et crée des vortex par entraînement du fluide.
- La diélectrophorèse attire les particules vers les arêtes des électrodes, zones où le gradient de champ est le plus élevé.

En choisissant les bons paramètres de champ (fréquence basse de 1 kHz, 10 V pic à pic pour un gap de 150 µm), les particules, en l'occurrence des bactéries, des billes de latex et des cellules de levure, sont ainsi immobilisées entre le centre d'une électrode et son arête (voir Figure 1.8 [69]).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

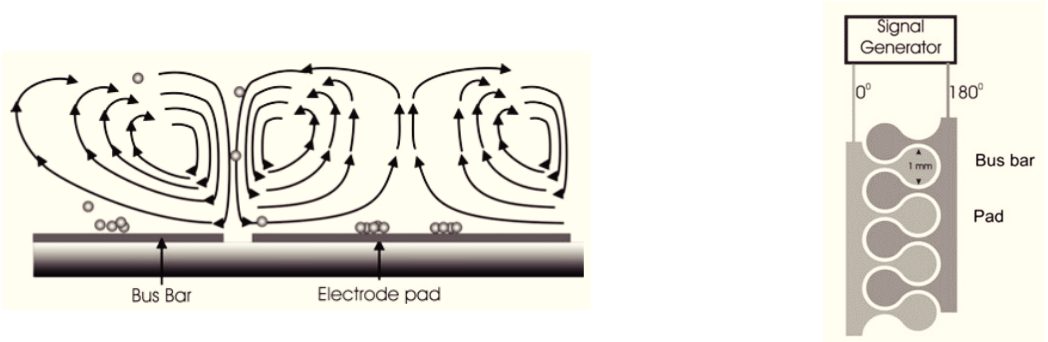


Figure 1.8 : À gauche : illustration de la mise en mouvement des particules par électroosmose et du piégeage par diélectrophorèse. À droite : géométrie des électrodes interdigitées utilisées.

Le comportement des particules dépend de la taille des vortex : s'ils sont plus petits que le rayon des électrodes, alors les particules sont piégées sur la surface, sinon elles sont remises en circulation dans le fluide. Les auteurs montrent que l'effet des vortex est présent jusqu'en haut de la chambre microfluidique (100 µm) : cette technique permet donc d'agir sur les particules où qu'elles soient dans le fluide.

Un autre effet hydrodynamique associé à l'application d'un champ électrique dans un liquide est l'effet électrothermique. Le passage d'un courant dans le fluide induit en effet des échauffements locaux de celui-ci par effet Joule, provoquant alors des variations des conductivité et permittivité électriques. Le liquide est alors mis en mouvement du fait de l'interaction entre le champ électrique et les gradients de permittivité et conductivité, qui provoque des vortex fluidiques similaires à ceux obtenus par ACEO. Ce phénomène intervient plutôt dans les milieux conducteurs et lors de l'utilisation de fréquences élevées (à partir de la centaine de kHz). Son efficacité pour la concentration de molécules a déjà été prouvée, par exemple en réalisant le piégeage et la détection de protéines dans du PBS [70,71]. Son influence par rapport aux autres effets électrocinétiques sera négligeable dans la majeure partie du cadre des travaux présentés ici et, de fait, plus de précisions dont la méthodologie de calcul seront données sur l'ETE au Chapitre 2.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

1.2.4 Application des effets électrocinétiques aux objets biologiques

D'autres travaux reprenant le même principe, mais avec des géométries d'électrodes pouvant être différentes (interdigitées ou circulaires), ont été conduits et appliqués à différentes espèces biologiques. Ils permettent d'analyser l'influence de différents paramètres sur l'efficacité du transfert de masse :

- La **géométrie des électrodes** :
    - Hübner *et al.* utilisent une géométrie d'électrodes interdigitées et arrondies (voir le Tableau 1.1 pour un résumé des géométries) et appliquent cette solution à différents objets, dont des billes de latex, des molécules d'albumine et des molécules d'ADN [72]. Ils observent que ces dernières sont systématiquement collectées sur les arêtes des électrodes et proposent deux explications pour cela : le fait que leur grande longueur en fait des dipôles puissants sur lesquels la force DEP est donc très élevée, et le fait que des contre-ions soient concentrés à la surface des molécules, ce qui renforce aussi le dipôle. L'article précise le temps requis pour concentrer les différentes particules : 2 secondes (sauf pour les molécules d'ADN pour lesquelles ce temps n'est pas donné).
    - Wong *et al.*, en utilisant des électrodes à la géométrie circulaire, parviennent aussi à concentrer des bactéries et des molécules d'ADN de façon localisée c. Contrairement à l'expérience décrite précédemment [72], ils observent que les molécules d'ADN se concentrent au centre de l'électrode, et non sur les arêtes. En outre, leur dispositif (voir Figure 1.9 [46]) ne piège ces molécules que si la tension moyenne est non nulle : la DEP ne suffit donc pas pour les capturer, leur dispositif nécessite la mise en œuvre de l'électrophorèse. Les auteurs expliquent cela par les

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

plus grandes dimensions de leur structure, qui impliquent des gradients de champ plus faibles et donc une force DEP moins élevée. Le fait que les molécules d'ADN utilisées soient courtes diminue également l'influence de la DEP, fait confirmé dans une expérience ultérieure utilisant la même structure sur des molécules d'ADN deux fois plus grandes, pour lesquelles la force DEP suffit à les concentrer [68].

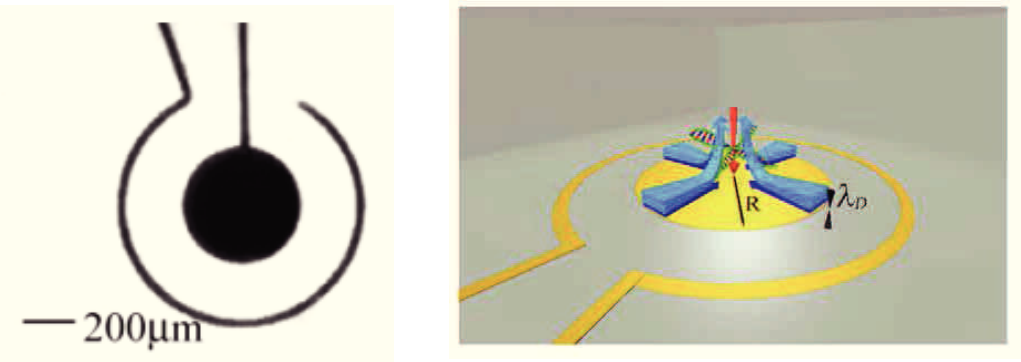


Figure 1.9 : À gauche : géométrie des électrodes utilisées par Wong et al. À droite : le mouvement de la double-couche (bleu foncé) entraîne le reste du fluide (bleu clair) vers le centre de l'électrode. Les molécules d'ADN sont alors entraînées vers le centre de l'électrode par le flux, où elles sont piégées par la force DEP (rouge).

  - Barik *et al.* utilisent un substrat d'or nanoporeux et montrent que leur dispositif permet de diviser par 1000 le temps de diffusion nécessaire aux particules (billes de plastique et albumine de sérum bovin (BSA)) pour arriver sur la surface de détection [73]. De tous les systèmes utilisant la diélectrophorèse et l'électro-osmose pour effectuer du transfert de masse, c'est le seul qui utilise une méthode de détection basée sur les phénomènes plasmoniques (en l'occurrence, des effets nanoplasmoniques dûs aux nanotrous du film d'or).

- La **fréquence** du champ électrique : celle-ci influe sur la force DEP d'une part et sur la vitesse du flux induit par électroosmose d'autre part. L'effet de la fréquence sur la DEP a été détaillé en partie 1.2.2. Son influence sur la vitesse

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

électroosmotique est différente : la courbe vitesse = f(fréquence) a une allure en cloche (voir Figure 1.10 [66]). Ces résultats sont cohérents avec ceux obtenus par Lei et al. [74] qui observent que la vitesse du fluide tend vers 0 pour les fréquences basses (< 100 Hz) et hautes (> 2 kHz) et qui affirment que la vitesse maximale est atteinte pour une fréquence intermédiaire. La vitesse du flux induit par la polarisation est un paramètre important puisqu'il influe sur l'efficacité de la capacité de concentration du dispositif. Il sera donc à optimiser durant nos travaux.

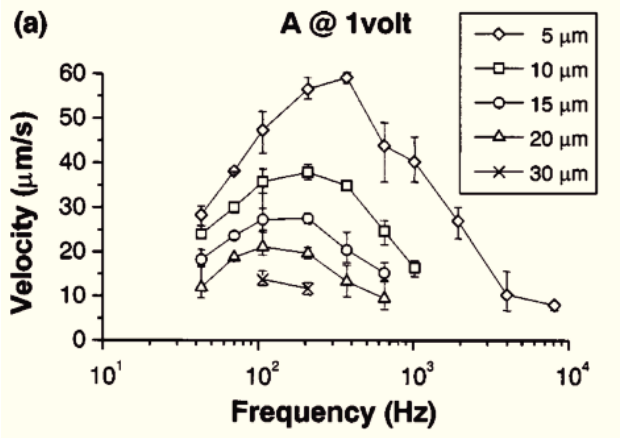


Figure 1.10 : Courbe de vitesse pour différentes positions sur l'électrode (position suivant l'axe x, dirigé vers le centre d'une électrode et d'origine l'arête), dans un électrolyte de conductivité $2.1 \cdot 10^{-3}\ S.m^{-1}$

- Le **gap** entre les électrodes : plus celui-ci est grand, moins le gradient de champ est élevé à polarisation fixée. La force DEP est alors plus faible. La force DEP dépend du gradient du champ au carré tandis que la force EHD dépend linéairement du champ. En augmentant le gap, l'influance de la force DEP diminue donc plus vite que celle de la force EHD, et les particules sont plus difficilement piégées. Les travaux de Hoettges *et* al.[69] montrent la validité de ce raisonnement : pour un gap très petit, les particules sont piégées sur les arêtes des électrodes, là où le gradient de champ est fort. En augmentant le gap, les particules sont piégées non plus sur les arêtes mais sur la surface des

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

électrodes, de plus en plus près du centre de celles-ci au fur et à mesure que le gap grandit.

- La **conductivité** de l'électrolyte : plus elle est élevée, plus le flux généré a une vitesse faible. C'est le résultat auquel parviennent Hoettges *et al.* en testant des électrolytes de conductivité variant entre 1 et $100\,mS \cdot m^{-1}$. Cela corrobore l'hypothèse de Green et al. [66] selon laquelle une augmentation de la conductivité du milieu décale le pic de vitesse du flux EHD vers les hautes fréquences.

- L'**amplitude** de la tension : plus elle est élevée, plus la vitesse du flux est grande [74]. Elle est cependant limitée par les phénomènes électrochimiques qui peuvent avoir lieu à basse fréquence si la différence de potentiel est trop élevée. Lei et al. préconisent moins de 5 V_{pp} en AC et moins de 2 V en DC, sans toutefois justifier ce choix [74] (on peut cependant supposer que celui-ci a été fait en fonction des matériaux constituant les électrodes, de la taille du gap inter-électrodes et des fréquences qu'ils utilisent).

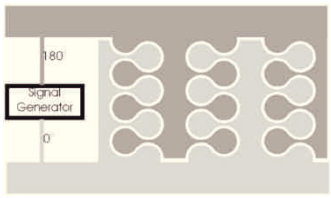
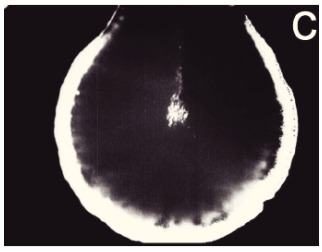
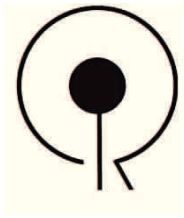
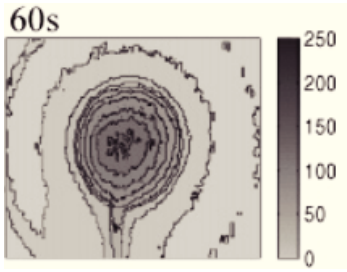
- La **taille** de l'objet visé. Plus elle est grande :

    - Plus sa mobilité est faible, et plus il est piégé facilement [74].

    - Plus la force DEP s'exerçant sur l'objet est grande [68,75] ; pour rappel, la force DEP s'exerçant sur une particule sphérique est proportionnelle au cube du rayon de cette particule. Les travaux de Lei *et al.* avec des électrodes à la géométrie similiaire viennent appuyer ces résultats [74].

Le tableau suivant résume les technologies qui ont été évoquées dans cette partie de l'état de l'art en les illustrant et en précisant certains paramètres expérimentaux.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Résumé des technologies de concentration électrocinétique de (bio)particules (1/2)		
Design & Références	Capture des particules	Paramètres expérimentaux
[69,72]  Electrodes interdigitées. Diamètre d'un pad : 300 µm Gap : 100 µm Fabrication : Photolithographie et gravure humide sur un film de 100 nm d'or sur lame de microscope en verre (couche d'accroche de 10 nm en titane)	 Albumine : au centre et sur les arêtes (photo) Billes de latex et virus (influenza) : au centre de l'électrode ADN : sur les arêtes	Fréquences : 500 Hz – 10 kHz Amplitude (pp) : 10 V Offset : 0 V Force électrique : 100 kV/m Conductivité du milieu : non précisée Détection : fluorescence
[68,75]  Circulaire. Diamètre de l'électrode intérieure : 450 µm Gap : 200 µm Épaisseur du cercle extérieur : 40 µm Fabrication : Photolithographie et lift-off sur un film de 300 nm d'or sur lame de microscope en verre (couche d'accroche de 20 nm en chrome)	 Billes latex 200 nm : au centre Bactéries (Escherichia Coli) : au centre ADN (phage lambda, 48 kbp) : au centre ss-ADN (20 bp) : au centre (photo)	Fréquences : 100 Hz – 100 kHz Amplitude (pp) : 4 V Offset : 0 V Force électrique : 10 kV/m Conductivité du milieu : 0.2 mS/m (15 mS/m pour l'ADN) Détection : fluorescence

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

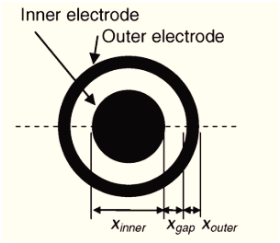
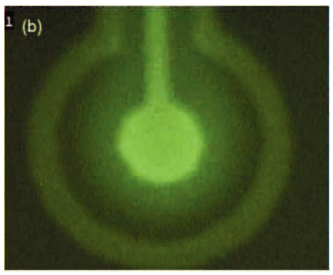
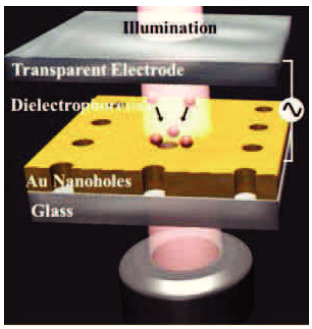
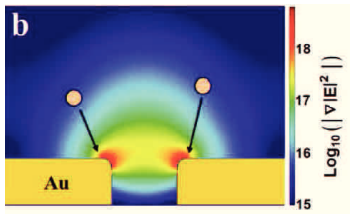
Résumé des technologies de concentration électrocinétique de (bio)particules (2/2)		
Design & Références	Capture des particules	Paramètres expérimentaux
[74]  Circulaire. x_{inner} : 150 μm x_{gap} : 50 μm x_{outer} : 100 μm Photolithographie et gravure sur un film de 200 nm d'or sur lame de microscope en verre (couche d'accroche de 30 nm en chrome).	 ADN (phage lambda, 48 kbp) : au centre ss-ADN (20 bp) : uniforme sur l'électrode centrale (photo)	Fréquence : 200 Hz Amplitude (pp) : 2 V Offset : 1 V (pour ADN simple brin seulement) Force électrique : 40 kV/m Conductivité du milieu : non précisée Détection : fluorescence
[73]  Nanopores. Diamètre : 140 nm Périodicité : 600 nm *Nanoimprint* et *stripping* pour le substrat SPR. Substrat de verre revêtu d'ITO pour l'électrode supérieure.	 Billes de polystyrène (190 nm) : sur les arêtes des trous (image) BSA : répartition non précisée	Fréquence : 1 kHz Amplitude (pp) : 10 V Offset : 0 V Force électrique : 350 kV/m Conductivité du milieu : 0.28 mS/m Détection : plasmons de surface

Tableau 1.1 : Résumé des technologies de transfert de masse servant à concentrer différents objets (biologiques ou non) sur un capteur.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

1.3 Effet de la polarisation sur la résonance de plasmon de surface

L'intégration de la méthode d'actuation choisie au biocapteur SPR suppose d'utiliser le même substrat pour effectuer l'actuation et la détection. Si la rapidité d'une mesure SPR permet d'effectuer l'analyse sans que les électrodes soient polarisées, certaines possibilités (par exemple celle de modifier la conformation des molécules d'ADN en les soumettant à un champ électrique [76]) justifient l'utilisation simultanée de la SPR et du dispositif actuateur. Il est donc nécessaire de comprendre comment la polarisation des électrodes influe sur les propriétés des plasmons de surface.

Lorsqu'un champ électrique est appliqué à une interface métal/liquide, trois phénomènes se produisent, qui peuvent influencer la réponse plasmonique : le déplacement des charges dans le métal, le déplacement des charges dans l'électrolyte, et les réactions électrochimiques qui peuvent avoir lieu à l'interface.

1.3.1 L'interface solide/liquide et la double-couche ionique

Lorsqu'un métal est en contact avec un électrolyte, la distribution des charges dépend de plusieurs paramètres : l'adsorption de molécules d'eau ou de cations hydratés, la chimisorption d'anions ou de molécules organiques, et les propriétés électroniques du solide.

La double-couche électrique (EDL) désigne la zone d'interface dans l'électrolyte qui comprend deux couches parallèles chargées [56] :

- La couche la plus proche du solide, couche dense de Helmholtz ou encore couche de Stern, qui est constituée des ions adsorbés chimiquement sur la surface. Elle est délimitée par des plans imaginaires appelés « plan intérieur de Helmholtz » pour le plan constitué par la surface de l'électrode, et « plan extérieur de

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Helmholtz » ou « plan de Stern » pour le plan constitué par l'interface électrolyte/couche de Stern. Le potentiel en solution à cette distance de l'électrode est appelé potentiel de Stern.

- La couche la plus éloignée, couche diffuse ou couche de Gouy-Chapman, permettant d'écranter la charge de la couche dense de Helmholtz. Les ions y sont attirés par les forces de Coulomb ou y parviennent par agitation thermique et, par opposition à la première couche, sont donc des ions libres qui se déplacent dans le fluide et peuvent être remplacés, d'où le nom de « couche diffuse ». Le plan de glissement sépare la part du fluide mobile de celle qui reste attachée à la surface du métal, comme illustré sur la Figure 1.11 [77].

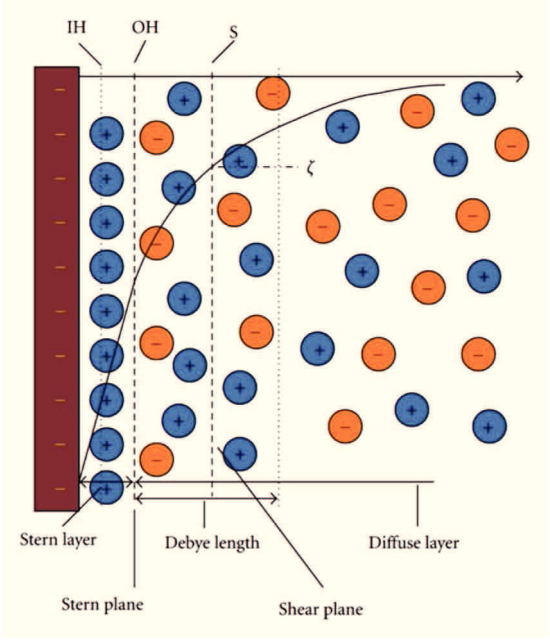


Figure 1.11 : schéma de principe de la double-couche électrique d'après le modèle de Stern. Les plans intérieur et extérieur de Helmholtz et le plan de glissement sont notés IH, OH et S respectivement. La charge du plan de glissement est caractérisée par le potentiel ζ.

L'épaisseur caractéristique de l'EDL est la longueur de Debye, notée κ^{-1}, qui est la distance séparant le plan de glissement de la surface de l'électrode. Cette longueur est proportionnelle au carré de la concentration ionique C de l'électrolyte.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

1.3.2 L'effet de la polarisation des électrodes sur l'EDL et sur le métal

Le fait de polariser les électrodes change l'organisation des particules chargées dans l'EDL et celle-ci s'en retrouve modifiée, que ce soit au niveau de sa composition, de la répartition du potentiel ou de ses dimensions [78], [79]. Les propriétés optiques de la zone de l'électrolyte en contact direct avec le métal sont donc modifiées, et la SPR étant sensible à ces variations, cela a une influence sur le signal mesuré.

Cette réorganisation de l'EDL modifie en outre la charge surfacique présente sur l'électrode et la façon dont le champ électrique interagit avec le matériau. En particulier, la répartition des électrons libres est influencée sur une distance de 1 Å [80] : le champ électrostatique est donc écranté dès la première couche atomique.

Kötz *et al.* montrent effectivement qu'il y a dépendance entre l'énergie d'excitation du plasmon et le potentiel appliqué au film utilisé pour la SPR [81] (Figure 1.12).

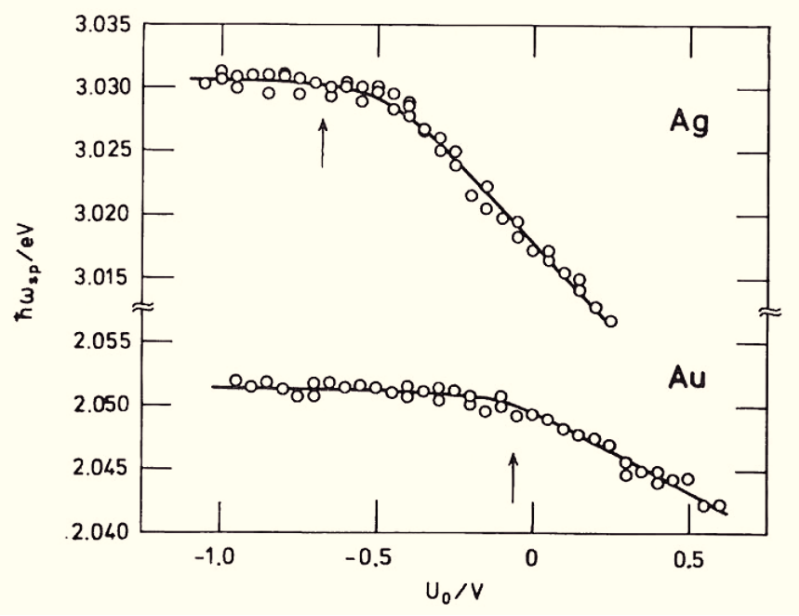


Figure 1.12 : Evolution de l'énergie d'excitation d'un plasmon en fonction du potentiel appliqué à la surface métallique. La courbe du haut correspond à un film d'or, celle du bas à un film d'argent. Les flèches indiquent PZC pour chaque système. L'électrolyte est une solution de $NaClO_4$ à 0.5 M.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

En particulier, ils observent que cette dépendance n'est significative que lorsque le potentiel appliqué est supérieur au point de charge nulle (PZC, potentiel pour lequel la densité surfacique de charges est nulle sur le métal) de l'électrode par rapport à l'électrolyte. L'influence de l'adsorption des anions est négligeable dans leurs travaux puisque des électrolytes différents donnent le même résultat.

Heaton *et al.* reprennent l'expérience pour étudier l'influence de la polarisation des électrodes pendant une expérience d'hybridation ADN/ADN [82]. Ils calculent notamment l'évolution des parties imaginaire et réelle de la permittivité diélectrique du métal (or) en fonction du potentiel appliqué, et observent tout comme leur prédécesseur que ce potentiel n'a une influence notable sur les propriétés optiques du matériau que lorsqu'il est supérieur au PZC du système (voir Figure 1.13). En comparant différents électrolytes, ils montrent d'ailleurs que plus le PZC d'un système est petit, plus l'influence de la polarisation est forte.

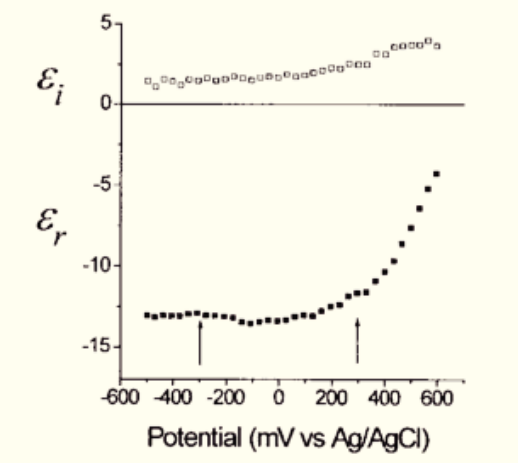


Figure 1.13 : Influence de la polarisation de l'électrode en or sur ses propriétés optiques. La différence de potentiel est indiquée par rapport à une électrode de référence Ag/AgCl.

En outre, ils parviennent à effacer cette dépendance en recouvrant le film d'or d'une monocouche auto-assemblée (SAM). Cela semble indiquer que la perturbation du signal SPR est due en majeure partie à la modification des propriétés optiques de l'électrolyte plutôt qu'à celles du métal. Or les auteurs semblent considérer que la constante diélectrique de l'électrolyte reste constante pendant la polarisation. Il est

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

dès lors légitime de questionner la pertinence de la méthodologie de calcul proposée et de s'interroger sur le rôle de l'électrolyte dans le décalage de l'angle de résonance plasmonique.

1.3.3 Les réactions électrochimiques

Lioubimov *et al.* ont également étudié le décalage du pic de SPR induit par un potentiel électrique oscillant appliqué sur un film d'or placé dans différents électrolytes [83]. En comparant les résultats obtenus en opérant à des potentiels inférieur et supérieur au potentiel d'oxydation, ils observent que le décalage de la SPR est bien plus important lorsque des phénomènes d'oxydation sont à l'œuvre (Figure 1.14). Les résultats montrent aussi que ce décalage dépend de la fréquence utilisée. Plus la fréquence est élevée, moins le décalage observé est grand (voir Figure 1.15, attention à l'ordre qu'ils ont utilisé pour les fréquences, qui n'est pas intuitif). Cela indique que la composante dynamique des phénomènes en jeu est importante.

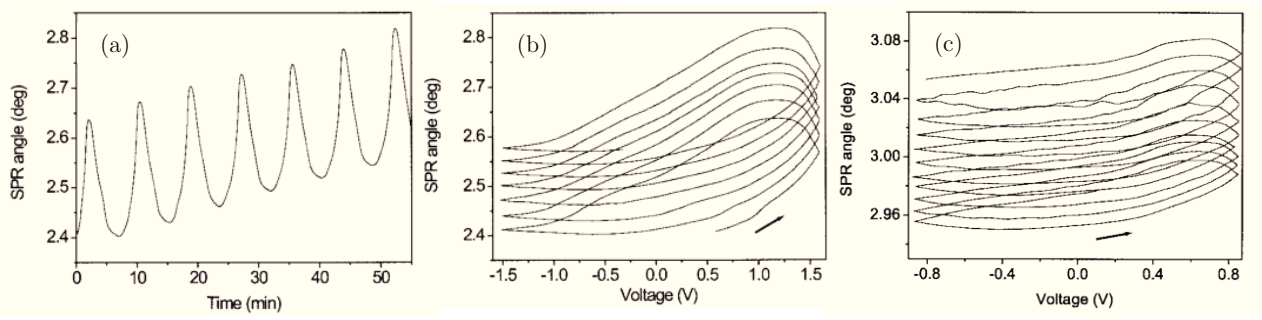


Figure 1.14 : Variations angulaires de la SPR dans de l'eau pure : (a) en fonction du temps, V = ± 1.5V (b) en fonction du voltage, V = ± 1.5V, avec oxydation. (c) en fonction du voltage, V = ± 0.8 V, pas d'oxydation. La flèche indique la direction temporelle du processus.

Les auteurs ont développé un modèle afin de prévoir l'influence de la polarisation sur le plasmon et prennent en compte les variations de densité électronique dans le métal et l'oxydation du film, en faisant abstraction de la double-couche de Helmholtz. Ce choix est justifié par la concordance de leurs résultats théoriques et expérimentaux.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Leur modèle prend en compte la dynamique du processus d'oxydation et permet ainsi d'expliquer la dépendance en fréquence du signal électrique.

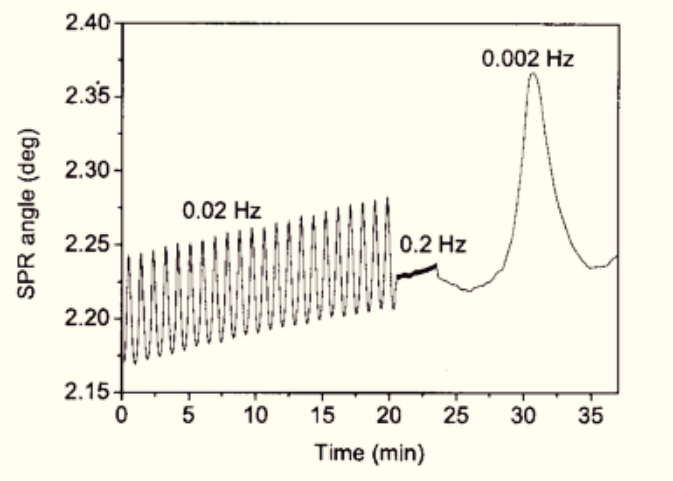


Figure 1.15 : Variations angulaires de la SPR pour de l'eau pure en fonction du temps, pour différentes fréquences, à $V = \pm 1.5$ V.

Les différents travaux parus sur le sujet montrent donc la forte influence de la polarisation du métal sur la résonance de plasmon de surface, que ce soit du fait des changements conséquents au sein de l'électrolyte ou bien dans le métal lui-même. C'est une donnée importante à prendre en compte et elle est considérée comme une contrainte dans le cadre de ce projet, puisqu'elle interdit l'utilisation de fréquences trop basses qui provoqueraient des perturbations du signal.

1.4 Conclusion

La motivation principale de nos travaux présentés ici est l'amélioration de la limite de détection des biocapteurs actuels.

Si l'augmentation de la sensibilité des transducteurs permet d'arriver à ce résultat, une autre approche est proposée dans le cadre de ce projet de recherche. Complémentaire de la première, elle consiste à intégrer une fonction d'actuation aux biocapteurs existants, c'est-à-dire à les rendre capable de réaliser un transfert de masse

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

en manipulant les molécules cibles pour les amener au plus près de l'élément de transduction.

Le type de biocapteur utilisé ici est un capteur optique à résonance de plasmon de surface. La sensibilité et la diversité des analyses réalisables par cette technique de détection en font une méthode adaptée à l'étude des interactions biomoléculaires.

La technologie d'actuation choisie consiste à utiliser un champ électrique pour mettre en mouvement le fluide de la solution analysée (par électroosmose) et piéger les analytes sur la surface de détection (par diélectrophorèse). Plusieurs structures, résumées dans le Tableau 1.1, permettent d'utiliser ces deux phénomènes conjointement.

A la lumière de l'état de l'art, la problématique peut alors être précisée : Comment les phénomènes d'électroosmose et de diélectrophorèse peuvent-ils être utilisés conjointement pour manipuler les biomolécules en solution via des électrodes intégrées au capteur SPR dans le but d'en abaisser la limite de détection ?

Ainsi, il s'agit maintenant de concevoir une structure de capteur permettant d'utiliser conjointement la SPR et les effets électrocinétiques et de fabriquer un prototype avant de pouvoir étudier son efficacité. C'est le sujet du chapitre suivant.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

CHAPITRE 2 : CONCEPTION, MODELISATION ET FABRICATION DU CAPTEUR

2.1 Introduction

Nous avons montré dans le Chapitre 1 l'intérêt d'intégrer une fonction de transfert de masse à un capteur plasmonique, tout en établissant un état de l'art des solutions adoptées par les groupes de recherche travaillant sur les effets électrocinétiques et la concentration active de particules. Ce deuxième Chapitre vise à expliquer la conception du dispositif, ce qui comprend notamment les méthodes de calcul et de simulation, et détailler son procédé de fabrication.

Dans une première partie, les contraintes s'appliquant au capteur et les avantages de la configuration choisie seront présentés. Les différentes méthodes de calcul et de simulation permettant d'anticiper l'efficacité du capteur en amont de sa fabrication seront aussi détaillées. Le procédé de fabrication, le résultat en découlant et sa caractérisation, ainsi que le procédé de fonctionnalisation de surface utilisé seront donnés dans un deuxième temps.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

2.2 Conception du dispositif :

2.2.1 Présentation du banc expérimental

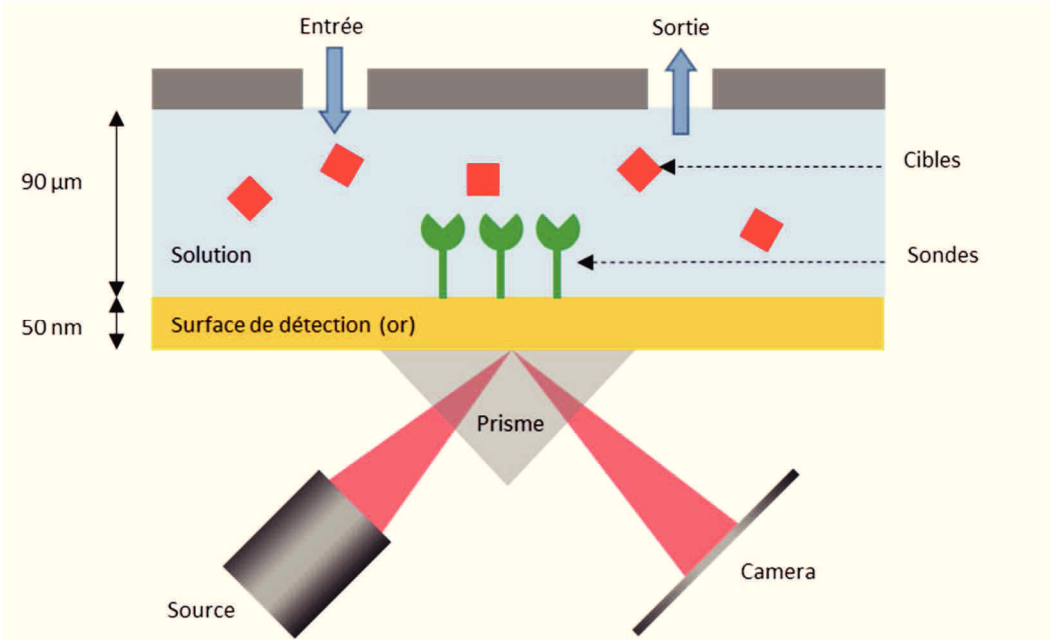


Figure 2.1 : Représentation schématique d'un capteur SPR (film d'or plan) placé sur le banc expérimental.

L'une des premières contraintes du capteur est d'être facilement utilisable sur un banc expérimental de SPR, dont le principe est illustré à nouveau en Figure 2.1. Le banc utilisé pour les expériences de détection est illustré schématiquement en Figure 2.1, et présenté en photographie en Figure 2.2.

Il est constitué de :

- Une source lumineuse reliée à un polariseur qui permet de sélectionner la longueur d'onde de travail et/ou de réaliser les balayages en longueur d'onde ;
- Une caméra pour l'imagerie, placée dans l'axe du rayon réfléchi ;
- Deux bras motorisés permettant de contrôler la position de ces équipements et de réaliser notamment les balayages en angle ;

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

- Le support pour le capteur, intégrant la cuve fluidique régulée en température et réglable en hauteur et position latérale, placé entre la caméra et la source lumineuse ;
- Un caisson permettant d'isoler le tout des perturbations extérieures.

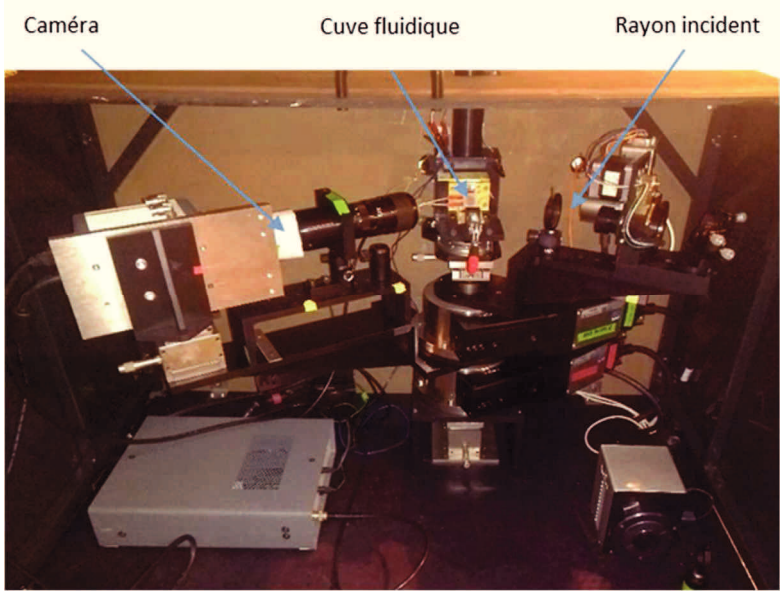


Figure 2.2 : Photographie du banc d'imagerie SPR expérimental et mise en évidence des principaux éléments le constituant.

Contrairement à beaucoup de dispositifs microfluidiques, la cuve n'est ici pas réalisée avec un matériau polymère tel que le PDMS mais par le biais d'une feuille de Mylar (voir Figure 2.3) dans laquelle est pratiquée une ouverture de la forme désirée. Cette feuille fait 90 µm d'épaisseur et est prise en sandwich entre l'échantillon et le support dans lequel se situent les entrée et sortie fluidiques. L'ouverture pratiquée dans la feuille de Mylar constitue ainsi une cuve circulaire de 90 µm de haut et approximativement 10 mm de diamètre. L'avantage de cette méthode par rapport à une cuve PDMS se trouve dans l'absence de nécessité de réaliser un bonding préalable à l'utilisation de l'échantillon.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

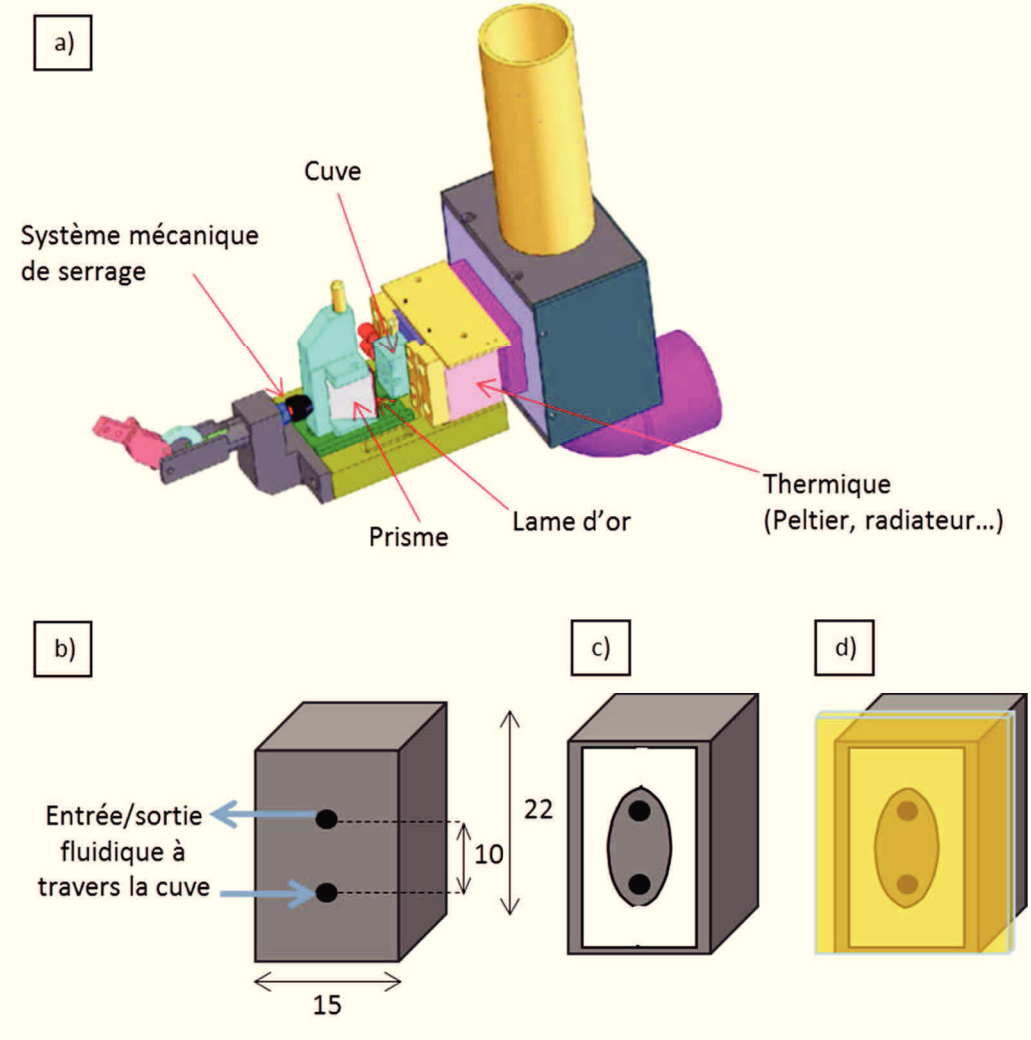


Figure 2.3 : a) Vue d'ensemble du bloc cuve et détail des différentes pièces le constituant. b) Support situé en face du prisme (dimensions en mm). c) Feuille de Mylar (90 µm d'épaisseur) plaquée contre la cuve. d) Exemple d'échantillon d'or plan sur lame de verre plaqué contre le Mylar mécaniquement par l'ensemble {prisme ; support} et constituant la cuve fluidique.

Lors de la conception de notre dispositif, une configuration 2D, c'est-à-dire basée sur des électrodes coplanaires, a été retenue. Cela a permis d'imaginer un capteur aux dimensions identiques aux dispositifs commerciaux existants (de simples lames de microscope sur lesquelles une couche d'or a été évaporée) et donc d'appréhender rapidement les problématiques de l'application finale.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

2.2.2 Choix d'électrodes coplanaires interdigitées

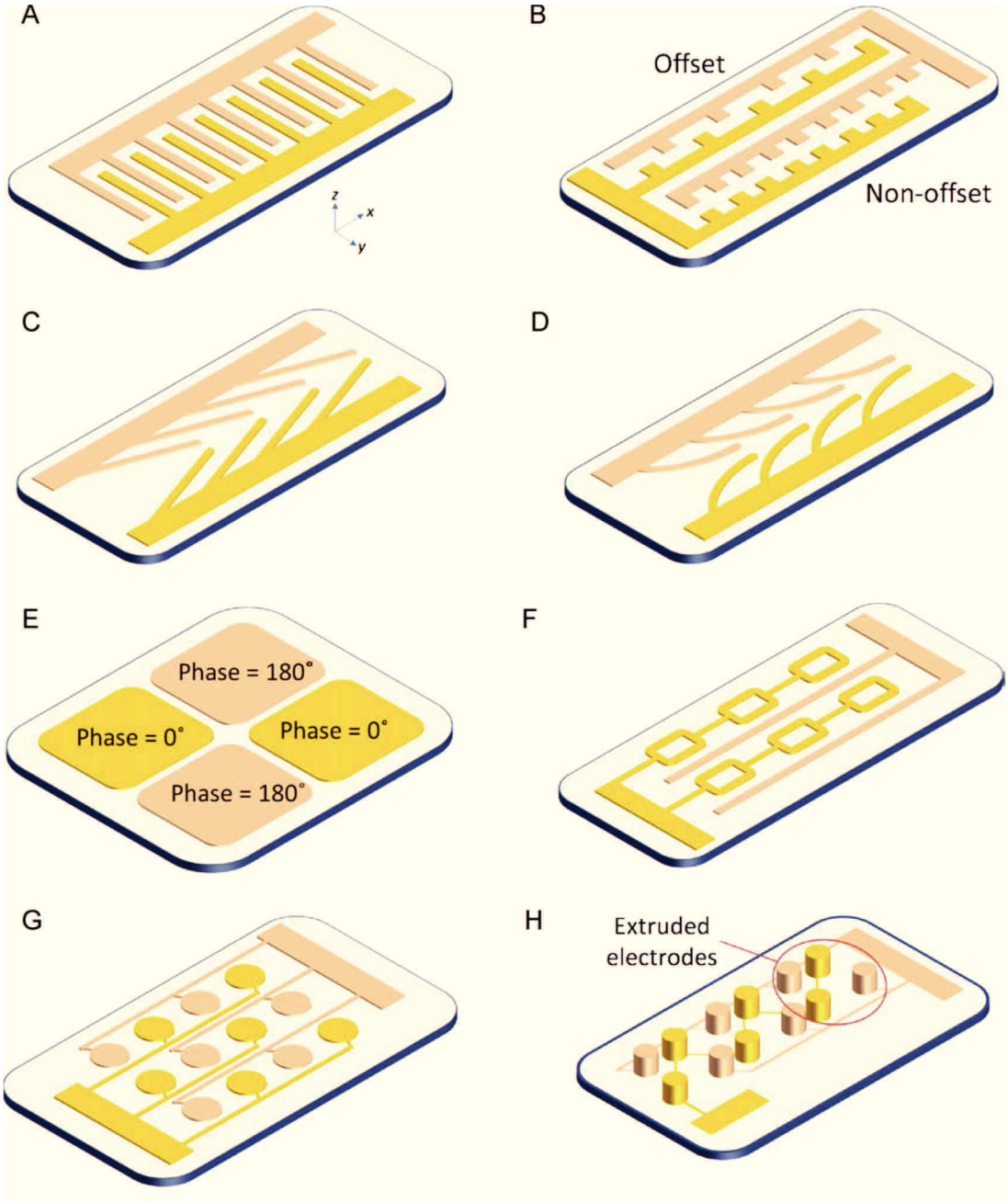


Figure 2.4 : Classification de dispositifs DEP selon la configuration géométrique des électrodes, d'après Khoshmanesh et al. : (A) Parallèle ou interdigitée (B) Crénelée (C) Oblique (D) Incurvée (E) Quadripolaire (F) Micropuits (G) Matricielle (H) Extrudée

Khoshmanesh et al. [84] donnent une classification des différentes électrodes utilisées pour l'application d'effets électrocinétiques selon leur géométrie. Les variétés les plus communes d'électrodes 2D sont présentées en Figure 2.4. Si chacune a ses avantages,

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

ce sont les électrodes interdigitées (ou parallèles) qui ont été retenues ici, pour les raisons suivantes données par Khoshmanesh [84]:

- Leur procédé de fabrication est relativement simple ;
- Elles permettent d'appliquer les effets électrocinétiques sur l'intégralité de la surface de détection et donc d'agir sur une portion maximale du volume analysé ;
- Elles sont utilisables même lorsque le fluide présent dans la cuve est en mouvement et jusqu'à des débits plus élevés que les autres géométries ;
- Elles permettent, même en appliquant des tensions relativement faibles, d'exposer les particules à des champs électriques importants.

Un autre avantage du choix de cette géométrie est sa symétrie, qui facilite la modélisation, les calculs et donc la phase d'étude théorique. Enfin, cette configuration d'électrodes est couramment utilisée pour la détection d'espèces biologiques par conductimétrie : si ce n'est pas l'objectif du projet présenté ici, cela ouvrira la voie vers un dispositif capable de réaliser des mesures multiphysiques par la suite.

Les dimensions des électrodes ont été choisies selon plusieurs critères :

- La force DEP étant proportionnelle au gradient du champ électrique au carré, la réduction des dimensions permet d'utiliser des tensions plus faibles pour obtenir une force DEP de même amplitude à la même distance relative.
- La littérature fait état (voir Chapitre 1) d'une majorité d'électrodes d'une largeur de quelques centaines de µm espacées par des *gaps* (intervalles) de l'ordre de la centaine de µm. Les dimensions adoptées ici correspondent à ces ordres de grandeur typiques en permettant d'obtenir des champs relativement intenses (de l'ordre de 10^5 V/m) en appliquant seulement quelques volts entre les électrodes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

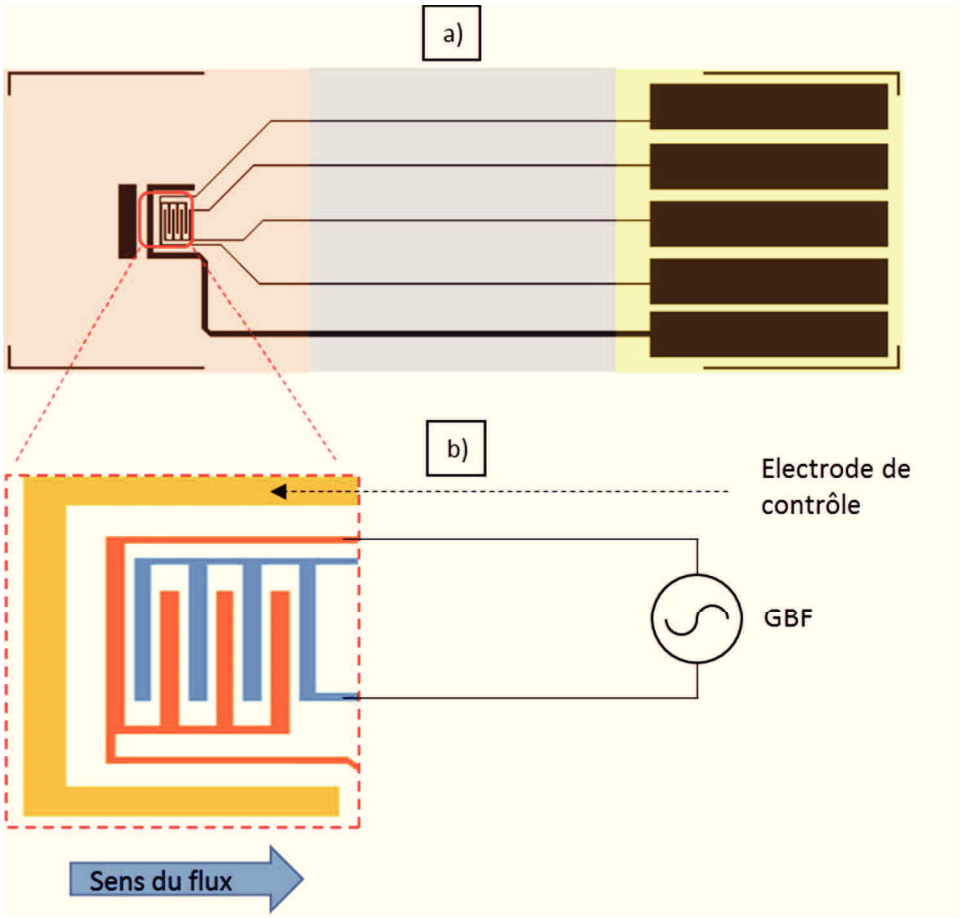


Figure 2.5 : a) Design de l'échantillon microstructuré conçu pour cette thèse. Les zones noires représentent les zones couvertes de métal (Ti/Au), le reste correspond au verre nu. Les 3 zones de couleurs différentes représentent respectivement la zone servant à faire le contact électrique avec le circuit en amont (en jaune), la zone servant au transfert de masse (orange) et une zone structurelle servant de lien entre les deux (en gris). b) Agrandissement de la zone microstructurée servant au transfert de masse et à la détection : mise en évidence des branchements électriques et de l'électrode de contrôle ainsi que du sens du flux.

- L'utilisation de motifs aux dimensions supérieures à la centaine de µm est contrainte par l'imagerie SPR (il est difficile d'obtenir des images nettes de zones plus petites). En outre, cela permet d'employer des masques souples (masques acétates) lors de l'étape de photolithographie. Ceux-ci sont plus de cent fois moins chers que les masques de photolithographie classiques et

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

s'obtiennent beaucoup plus rapidement, offrant ainsi la possibilité de tester une grande variété de designs différents.

Enfin, l'aire contenant les microélectrodes est déterminée par la taille de la cuve présente sur le banc expérimental

Le design du dispositif choisi consiste donc en deux peignes d'électrodes interdigitées rectangulaires parallèles. Celles-ci font 200 µm de large et sont espacées par des gaps de 150 µm de large. Elles sont situées dans une zone réduite de la lame de verre de microscope servant de support (voir Figure 2.5). Elles sont entourées d'une électrode dite « de contrôle » servant de référence pour les mesures SPR.

Ces électrodes sont reliées par des pistes en or à des *pads* de contact servant à faire les connexions électriques (voir Figure 2.5). La largeur de ceux-ci a été définie en fonction des connexions utilisées : celles-ci sont réalisées par le biais de simples pinces crocodiles, plus simples d'utilisation que des connexions à base de soudure par exemple (l'échantillon étant beaucoup manipulé lors de son installation sur le banc, les soudures – fragiles – ont tendance à se rompre lors de l'installation).

2.2.3 Principe du capteur-actuateur

La stratégie adoptée lors de la conception de notre dispositif consistait à utiliser les mêmes électrodes pour effectuer à la fois le transfert de masse et les mesures SPR. L'idée de se servir du même élément pour réaliser à la fois l'actuation et la détection est relativement nouvelle : comme on l'a vu dans l'état de l'art, la technique de détection employée est souvent indépendante des électrodes servant au transfert de masse. Cela étant, certains groupes de recherche ont déjà proposé cette idée, par exemple Li et al. [70], qui utilisent des électrodes interdigitées (non symétriques) pour mettre en œuvre l'effet électrothermique afin d'attirer les particules visées sur lesdites électrodes et les détecter par impédimétrie toujours en utilisant les mêmes électrodes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Si la méthode de détection qu'ils utilisent est différente (électrique et non optique), le double rôle de l'élément transducteur/actuateur induit des problématiques similaires, par ailleurs évoquées dans la dernière partie de l'état de l'art :

- L'application de champs électriques dans la suspension modifie localement les propriétés de celles-ci, ce qui peut provoquer des variations de signal pourtant non imputables à la détection des objets visés,
- La modification de l'état de surface des électrodes provoque elle aussi des variations dans le signal mesurées, bien plus importantes que dans le cas précédent et irréversibles.

Apporter une réponse définitive à ces questions au moment de la phase de conception est difficile pour ne pas dire impossible. C'est pourtant un point crucial du projet et nous les avons adressées expérimentalement, ce qui a donné lieu à différentes précautions d'emploi qui seront détaillées dans la première partie du Chapitre 3.

2.2.4 Calculs et simulations : méthodologie

2.2.4.1 Bilan des forces

Lors de l'application d'une tension sur les électrodes et donc de l'apparition d'un champ électrique dans le fluide, les objets présents dans la suspension sont soumis à plusieurs forces :

- La force de gravité
- Le mouvement brownien
- La force DEP
- La force de traînée provoquée par le champ de vitesse induit par ACEO
- La force de traînée provoquée par le champ de vitesse induit par ETE
- La convection naturelle provoquée par les différences de température dans le fluide

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Lorsqu'un champ électrique est appliqué sur la suspension, les autres forces déjà présentes naturellement (gravité, mouvement brownien, convection) deviennent négligeables par rapport à celles provoquées par les différents effets électrocinétiques que sont la DEP, l'ACEO et l'ETE [85].

2.2.4.2 Modèle géométrique COMSOL

La modélisation et les calculs de potentiel, de champ électrique, de champ de vitesse dans le fluide, de force diélectrophorétique, de flux électroosmotique et de force électrothermique ont été réalisés avec le logiciel COMSOL Multiphysics (version 5.3a) et ses modules "Electric Currents", "Fluid Flow" et "Heat Transfer".

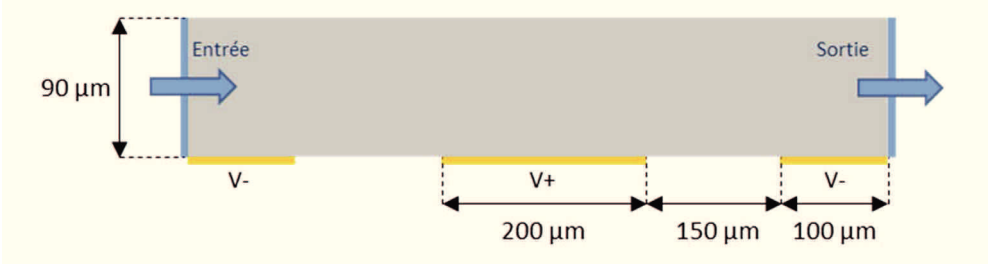


Figure 2.6 : Modèle géométrique utilisé pour les simulations COMSOL.

Le modèle est réalisé en 2D et consiste en un rectangle reprenant la dimension verticale de la cuve fluidique (90 µm) et comprenant une électrode plus les deux demi-électrodes l'entourant (voir Figure 2.6). Les électrodes ayant une épaisseur (50 nm) négligeable devant la hauteur de la cuve, leur modèle consiste en un segment sur la partie

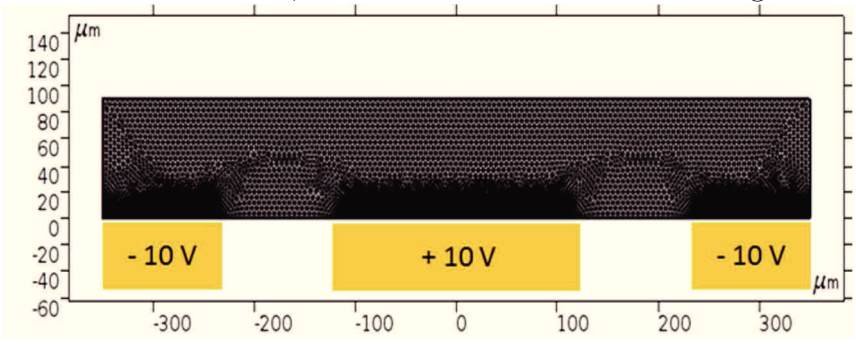


Figure 2.7 : Maillage du modèle généré par COMSOL

inférieure de la cuve. Les dimensions réelles sont utilisées pour la largeur (200 µm) des électrodes et le gap (150 µm) les séparant. Une fois la géométrie créée, le maillage est

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

généré (maillage triangulaire libre). Comme on peut le voir sur la Figure 2.7, celui-ci est affiné à proximité des électrodes : puisque c'est là où se trouvent les plus grands gradients de champ électrique, donc là où se produisent les plus grandes variations de force DEP, ACEO et ETE.

La frontière verticale de gauche est ouverte et définie comme une entrée pour le module « Fluid Flow », de même que la frontière verticale de droite qui est définie comme une sortie, avec des vitesses imposées nulles. Dans le module « Electric Currents », toutes les frontières ont la condition aux limites « Charge nulle » sauf celles correspondant aux électrodes. Dans le module « Heat Transfer », toutes les frontières ont une température fixe définie à 293 K.

En pratique c'est une tension alternative qui est appliquée sur les électrodes. La fréquence restant constante dans le temps, les calculs ont été effectués en régime stationnaire. Ainsi, la convention adoptée est que l'électrode centrale porte la tension positive tandis que les demi-électrodes l'entourant portent la tension négative. En réalité cette répartition alterne mais :

- La force DEP dépend du gradient du champ efficace au carré
- La vitesse ACEO dépend du carré du potentiel appliqué
- La vitesse ETE dépend du champ électrique au carré

Ces trois grandeurs sont donc indépendantes du sens de la différence de potentiel. Par conséquent, le signe de la différence de potentiel peut bien être fixé dans le cadre de ces simulations. Les quantités citées ci-dessus sont aussi dépendantes de la fréquence : elles ont donc été définies manuellement comme des variables dans le modèle COMSOL, prenant en compte la fréquence entrée comme paramètre.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

2.2.4.3 Calcul du potentiel et du champ électrique

Une tension de +/- 10 V est paramétrée sur les électrodes, pour une fréquence de 1 kHz (il s'agit des paramètres les plus couramment utilisés lors des expérimentations présentées aux Chapitres 3 et 4). Le module AC/DC calcule le potentiel au sein du domaine d'étude en résolvant l'équation de Laplace ($\nabla^2 V = 0$) et en déduit directement le champ électrique via l'équation $\mathbf{E} = -\nabla V$ (Figure 2.8). Le gradient du champ électrique au carré est calculé à partir de ce résultat.

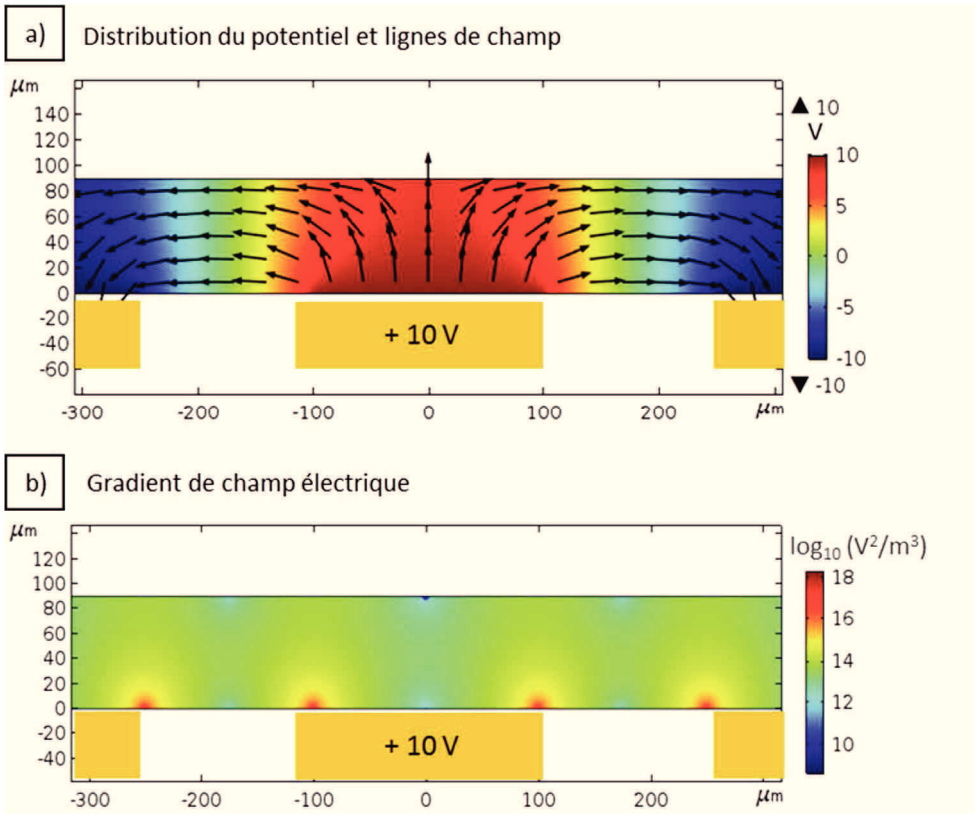


Figure 2.8 : a) Distribution du potentiel et lignes de champ électrique dans le volume modélisé. b) Gradient de champ électrique calculé sur la base du champ obtenu précédemment.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

2.2.4.4 Calcul de la force de DEP

La force diélectrophorétique dépend des propriétés diélectriques des objets visés, elle ne peut donc pas être calculée sans les prendre en compte. Dans les chapitres suivants, elle sera calculée via l'équation suivante, déjà expliquée au Chapitre 1 :

$$< \overrightarrow{F_{DEP}} > = 2\pi\varepsilon_m r^3 Re[CM] \nabla E_{eff}^2 \qquad \textbf{Équation 2.1}$$

Le calcul est effectué en entrant manuellement l'équation dans COMSOL, sur la base du champ électrique obtenu à l'étape précédente et en tout point du volume. Dans le cas présent, les résultats de simulation montrent bien que le gradient de champ électrique est maximal vers l'arête des électrodes : des objets dont les propriétés électriques à la fréquence considérée sont telles que la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti est positive seront donc attirés (par DEP positive) vers ces arêtes.

Le calcul exact de la force DEP nécessite d'entrer en paramètres le rayon et la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti des objets dans le milieu considéré. A cet égard, tous les calculs de partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti ont été effectués à l'aide du logiciel MyDEP, développé au laboratoire Ampère dans le cadre de la thèse de Jonathan Cottet [86]. Grâce à une base de données regroupant les caractéristiques diélectriques de différents objets (billes, levures, autres cellules), cet outil permet d'accéder notamment au facteur de CM très rapidement, en fonction du milieu et des fréquences considérées.

2.2.4.5 Calcul du flux induit par ACEO

Morgan et Green détaillent dans leur livre la méthode de calcul de la vitesse électroosmotique à la surface de l'électrode [87]. Elle est obtenue à partir de l'équation suivante :

$$< u_x > = \frac{1}{8} \frac{\varepsilon_m \varphi_0^2 \Omega^2}{\eta x (1+\Omega^2)^2} \qquad \textbf{Équation 2.2}$$

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

où ε_m est la permittivité diélectrique du milieu, φ_0 est le potential appliqué, η est la viscosité dynamique du fluide, x est la distance entre le point considéré et le centre du gap interélectrodes et Ω est une pulsation sans dimension donnée par $\Omega = 1/2\pi\kappa x(\varepsilon_m/\sigma_m)\omega$ où κ est l'inverse de la longueur de Debye, σ_m est la conductivité du milieu et ω est la pulsation du champ appliqué. Pour ce calcul, la conductivité à prendre en compte est la conductivité du milieu en présence des objets suspendus :

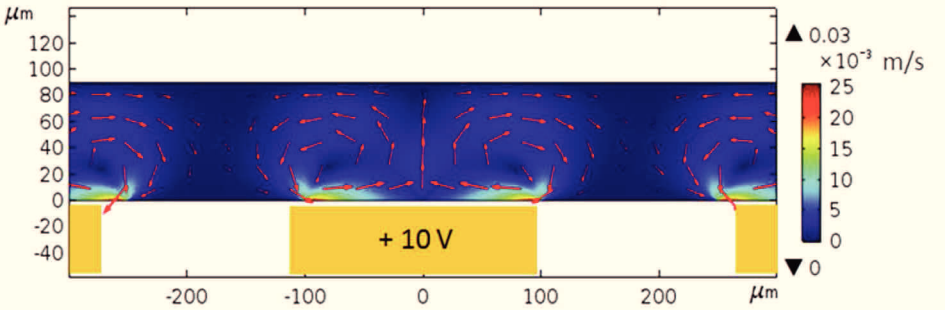


Figure 2.9 : Champ de vitesse induit par électroosmose. Les flèches rouges indiquent la direction du fluide.

celle de l'eau pure, qui vaut 5.5*10^{-6} S/m avant toute manipulation, a été mesurée à 4*10^{-4} S/m après dilution d'une solution de billes par exemple.

Le module "Fluid Flow" de COMSOL permet ensuite de calculer le flux induit par électroosmose dans tout le volume en résolvant l'équation de Navier-Stokes. Le calcul du champ de vitesse a été réalisé ici pour de l'eau pure dans le cas d'une tension appliquée de 10 Vpp à 1 kHz (voir résultat Figure 2.9). On observe notamment la présence des vortex fluidiques évoqués dans l'état de l'art, avec un maximum de vitesse autour des arêtes des électrodes.

Pour obtenir la force correspondante, il faut alors calculer la force de traînée que ce champ de vitesse impose, qui dans le cas d'une sphère est donnée par l'équation :

$$\boldsymbol{F_d = 6\pi\eta R v} \qquad \textbf{Équation 2.3}$$

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

où η est la viscosité dynamique du fluide, R est le rayon de la particule et v la vitesse du fluide. Ces calculs seront détaillés au Chapitre 3 puisqu'ils dépendent des objets considérés.

2.2.4.6 Calcul du flux induit par ETE

Les calculs déterminant le champ de vitesse induit par l'effet électrothermique suivent la méthodologie développée par Oh et al. [85]. L'échauffement du fluide par effet Joule est d'abord obtenu via l'équation :

$$k\nabla^2 T + \sigma_m E^2 = 0 \qquad \textbf{Équation 2.4}$$

où k est la conductivité thermique du milieu, σ_m sa conductivité électrique et T la température en kelvin. Les dépendance des permittivité et conductivité électriques du milieu à la température T sont décrites par les coefficients :

$$\alpha = \frac{1}{\varepsilon_m}\frac{\nabla \varepsilon_m}{\nabla T} \qquad \textbf{Équation 2.5}$$

$$\beta = \frac{1}{\sigma_m}\frac{\nabla \sigma_m}{\nabla T} \qquad \textbf{Équation 2.6}$$

Ceux-ci valent respectivement -0.4 K^{-1} et 2 K^{-1} pour l'eau pure [85]. Leur évolution en fonction de la concentration en sels est assez mal connue mais semble relativement constante [88] et ces coefficients ne varient pas en fonction de la conductivité dans les calculs faits par Oh et al. [85]: en première approximation il a été décidé de garder ces coefficients constants lorsque des simulations ont été effectuées pour le PBS par exemple.

On peut alors calculer la force électrothermique volumique :

$$\langle \overrightarrow{F_{ETE}} \rangle = 0.5\varepsilon_m \nabla T \vec{E}^2 \Pi(\omega) \qquad \textbf{Équation 2.7}$$

où $\Pi(\omega) = \left(\frac{\alpha-\beta}{1+(\omega\tau)^2} - \frac{\alpha}{2}\right)$ est une grandeur sans dimension qui dépend de la pulsation ω et du temps de relaxation des charges $\tau = \frac{\varepsilon_m}{\sigma_m}$. Cette force est ensuite appliquée en tant que force volumique sur le fluide (ajout d'un terme dans l'équation de Navier-

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Stokes) et, les gradients de température et de champ électrique ayant été calculés au préalable, cela permet d'obtenir le champ de vitesse du fluide induit par ETE. Tout comme pour l'ACEO, la force s'exerçant sur les objets est donc la force de traînée induite par ce champ de vitesse.

2.3 Fabrication du dispositif

Cette partie est dédiée à la présentation des techniques de fabrication des échantillons utilisés lors de nos travaux. Le procédé décrit ci-après a été éprouvé sur la plateforme Nanolyon de l'INL ainsi que dans les installations du LN2. Il a été employé pour 90 % des échantillons produits et est résumé sur le schéma de la Figure 2.10.

2.3.1 Microfabrication

2.3.1.1 Nettoyage des substrats et dépôt des couches métalliques

Le susbtrat utilisé pour les échantillons est une lame de microscope en verre de type BK7, de la marque Fischerbrand. Ses dimensions sont de 75x25x1 mm. La première étape du procédé consiste en un nettoyage de ces lames pour assurer une homogénéité maximale lors du dépôt des métaux. Ce nettoyage se fait en plusieurs étapes et à température ambiante :

- Agitation de l'échantillon dans un bain d'eau savonneuse : 10 min
- Bain d'acétone sous ultrasons pendant : 10 min
- Bain d'isopropanol sous ultrasons : 10 min
- Bain d'eau DI : 10 min

Après nettoyage et séchage, les substrats sont placés dans un évaporateur à canon à électrons (EVA 300). Les vides primaire puis secondaire (10^{-6} mbar) sont faits pendant la nuit et l'étape de dépôt commence le lendemain : le porte-échantillon est d'abord

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

mis en rotation pour assurer une homogénéité maximale de la couche déposée, puis une première couche de 3 nm de titane est évaporée à une vitesse de 0.01 nm/s avant de réaliser le dépôt de la couche d'or (48 nm) à une vitesse de 0.1 nm/s.

Les échantillons sont ensuite inspectés pour vérifier l'absence de défauts sur le dépôt puis passés au profilomètre pour confirmer l'épaisseur déposée. Ils sont alors prêts pour subir les étapes de microstructuration.

2.3.1.2 Microstructuration des couches métalliques

La structuration des couches de Ti et Au sous forme de microélectrodes se fait par un procédé classique de photolithographie suivi d'une étape de gravure chimique.

Les lames de verres métallisées sont tout d'abord enduites d'une résine photosensible. La résine utilisée (AZ 5214) est une résine réversible, ici utilisée en tant que résine positive. Celle-ci est étalée sur les échantillons à l'aide d'un spincoater (ou « tournette ») à une vitesse de rotation de 3500 RPM pendant 30 secondes. Les substrats ainsi enduits subissent ensuite une étape de recuit d'une durée de 1 min 30 s à 110 °C qui sert à favoriser l'adhérence de la résine sur l'or.

Vient alors l'étape d'insolation : celle-ci est réalisée grâce à l'UV-KUB (modèle 2), un système de photolithographie pour prototypage rapide consistant en un simple cube dont le plafond est un tapis de LED UV. Les encoches présentes sur les coins du masque (voir Figure 2.5) permettent de réaliser l'alignement par rapport à la lame de verre. Le photomasque en question est un masque souple commandé auprès de la société CIRLY qui imprime directement les masques à l'encre sur des feuillets transparents. Le contact est assuré par une lame de verre immaculée déposée sur le masque qui est ainsi pris en étau entre l'échantillon et la lame supérieure. L'insolation UV dure 4 secondes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Le développement de la résine est ensuite réalisé sans post-recuit à l'aide du solvant AZ 726 MIF, adapté à la résine AZ 5214. L'échantillon est plongé et remué dans un bain de ce solvant à température ambiante pendant 1 minute, puis il est observé au microscope pour vérifier la bonne qualité du procédé à ce stade, notamment les dimensions des électrodes.

L'ouverture des couches métalliques est finalement réalisée par gravure chimique, avec du Gold-Etch pour l'or puis du Ti-Etch pour le titane. Ces étapes ne sont pas chronométrées : les épaisseurs considérées étant très faibles, la gravure se fait en quelques secondes et une simple vérification visuelle suffit à confirmer leur bonne réalisation.

Enfin, les échantillons sont nettoyés à température ambiante dans un bain d'acétone sous ultrasons pendant 10 minutes pour faire disparaitre toute trace de résine, puis à l'isopropanol et enfin à l'eau. A ce stade le procédé de fabrication microélectronique est terminé.

Certains échantillons, dits « multigaps », présentés au Chapitre 4, ont été réalisés différemment puisqu'ils comprenaient des dimensions (gaps interélectrodes de 10 µm) incompatibles avec la technologie des masques souples. Il a donc fallu réaliser l'étape de photolithographie à l'aide du système de lithographie laser µPG 101 (Heidelberg Instruments). Pour la même raison (petits motifs), la méthode du lift-off est plus adaptée que celle de la gravure chimique pour réaliser les ouvertures dans les couches métalliques. Pour ces échantillons seulement, le procédé a donc été modifié :

- La résine est étalée directement après le premier nettoyage des substrats de verre, puis recuite
- Elle est ensuite insolée par lithographie laser et développée
- Les couches métalliques sont évaporées sur la résine structurée
- Le lift-off est effectué par développement de la résine (AZ 726 MIF)

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

- Les échantillons sont nettoyés comme les autres à la fin du procédé

Les produits et paramètres utilisés pour ce procédé sont identiques à ceux mentionnés plus haut. Les deux procédés et leurs étapes sont illustrés sur la Figure 2.10.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

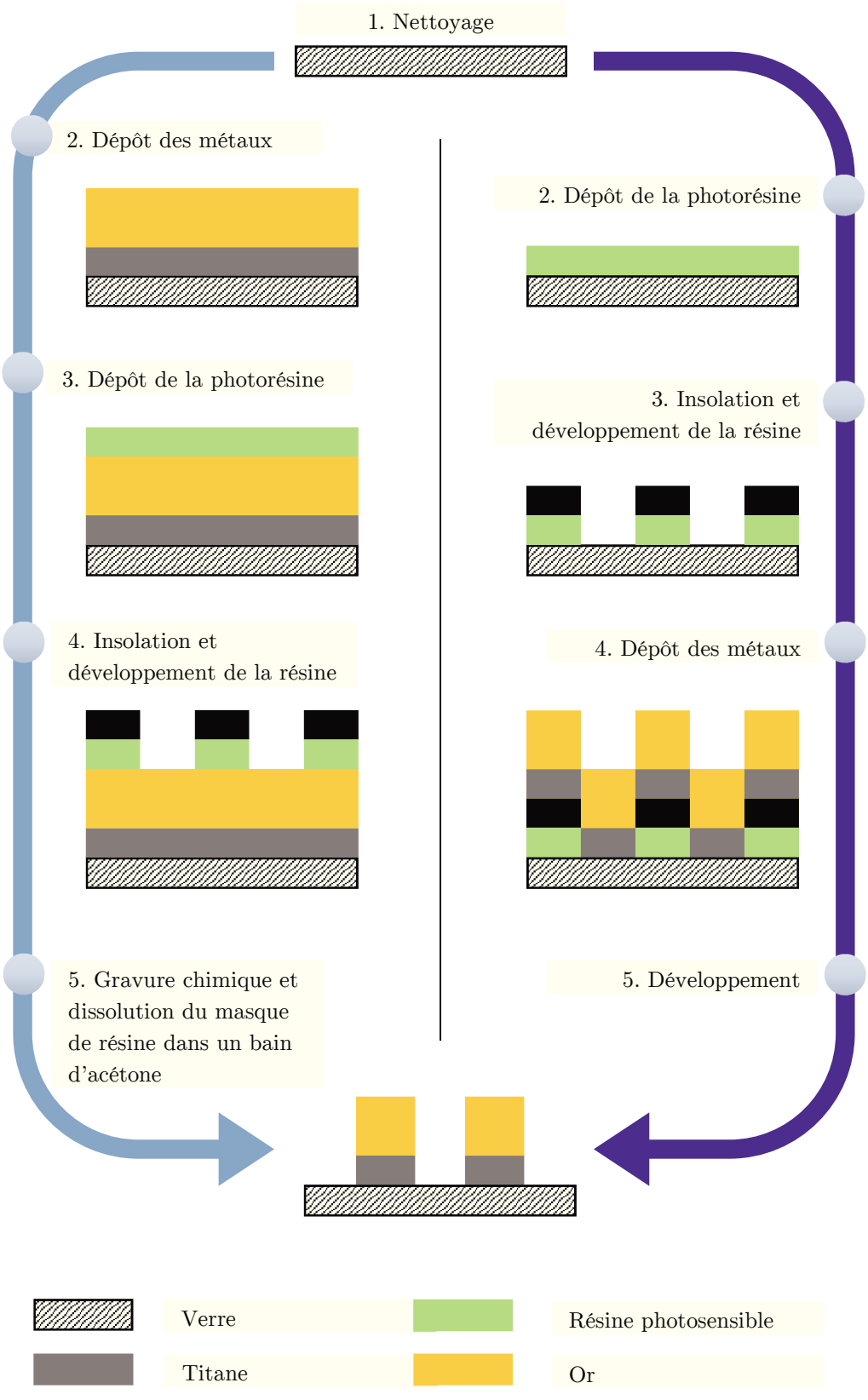


Figure 2.10 : Schématisation de l'enchaînement des étapes du procédé de microfabrication. A gauche (flèche bleue) : procédé utilisé pour la quasi-totalité des échantillons. A droite (flèche violette) : procédé utilisé pour la puce multigaps décrite au Chapitre 4.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

2.3.2 Caractérisation du dispositif

Le dispositif obtenu après les différentes étapes de microfabrication consiste donc en une lame de microscope en verre servant de substrat à une couche de métal microstructurée. La photographie présentée sur la Figure 2.11 montre les *pads* de contact (à gauche) reliés par des pistes aux peignes d'électrodes de la zone « active » de la puce. Le résultat est relativement propre pour un procédé de fabrication de type prototypage rapide. L'épaisseur des couches de métaux a été mesurée par profilométrie sur plusieurs échantillons à différentes reprises au cours de ce projet et vaut en moyenne 50 ± 1 nm, ce qui est en accord avec les paramètres appliqués lors du dépôt

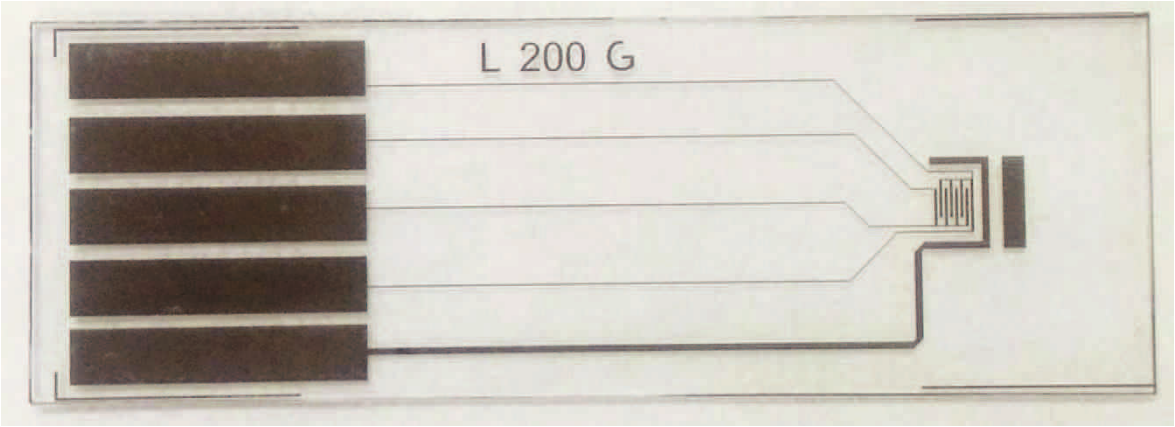


Figure 2.11 : Photographie d'un échantillon à la fin du procédé de microfabrication.

de la couche de titane (3 nm) et d'or (48 nm). La qualité du signal SPR étant de toute façon fortement dépendante des épaisseurs déposées, une nappe plasmonique au début de chaque expérimentation permet de vérifier la qualité du dépôt.

2.3.2.1 Caractérisation électrique

La première vérification d'usage à effectuer sur tous les échantillons est la qualité du circuit électrique. Pour que le dispositif fonctionne comme prévu, il ne faut pas de court-circuit entre les électrodes ou entre les différentes pistes. Cela se contrôle simplement à l'ohmmètre en s'assurant que la résistance entre deux pads de contact qui ne sont pas censés être reliés est bien infinie.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

2.3.2.2 Caractérisation par microscopie optique

Les dimensions des électrodes obtenues à la fin du procédé de fabrication ont été mesurées en microscopie optique. Leur largeur s'établit en moyenne à 204 µm tandis que le gap interélectrodes a une taille moyenne de 147 µm. La dispersion est plutôt faible (écart-type d'environ 2 µm sur l'ensemble des échantillons réalisés avec un même masque) au regard des dimensions des structures.

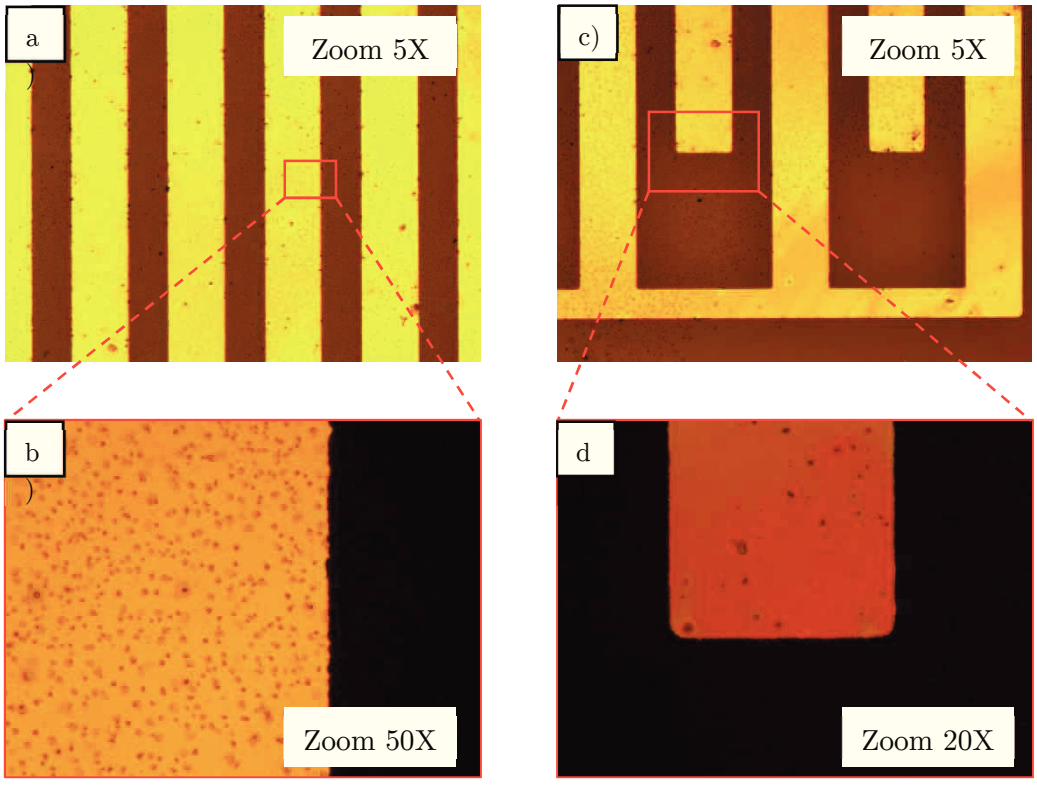


Figure 2.12 : Images prises en microscope optique d'un échantillon à la fin du procédé de microfabrication par gravure chimique (l'échantillon montré ici a été utilisé pour attirer différents objets d'où les défauts apparents qui sont en fait des dépôts de billes). a) Vue en agrandissement 5X de la zone couverte par les microélectrodes. b) Agrandissement 50X sur le bord d'une électrode. c) Vue en agrandissement 5X sur le coin d'un peigne d'électrodes. d) Agrandissement 20X du bout d'une électrode.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

L'observation au microscope (Figure 2.12) permet en outre de vérifier la qualité de la structuration : si les bords et les coins des électrodes ne sont pas aussi nets qu'après un procédé de lithographie plus classique (masque verre/chrome et photolithographie contact), le résultat est relativement propre eu égard aux techniques employées et, surtout, il est suffisant pour l'application visée.

2.3.2.3 Caractérisation plasmonique

Le contrôle de la qualité de la résonance SPR se fait au début de chaque expérience. Il nécessite l'installation de l'échantillon sur le banc expérimental et l'introduction d'un liquide (eau) au-dessus de la surface d'or. Les conditions de résonance étant très fortement dépendantes des propriétés des matériaux et de leurs dimensions, cette étape est celle aboutissant aux résultats les plus dispersés.

Ce contrôle s'effectue en réalisant un balayage angulaire à longueur d'onde fixe ou, inversement, un balayage en longueur d'onde à angle fixe. Dans notre cas l'angle est fixé et le balayage est effectué sur la longueur d'onde : cette méthode a l'avantage de ne pas produire de déplacement mécanique sur le banc expérimental.

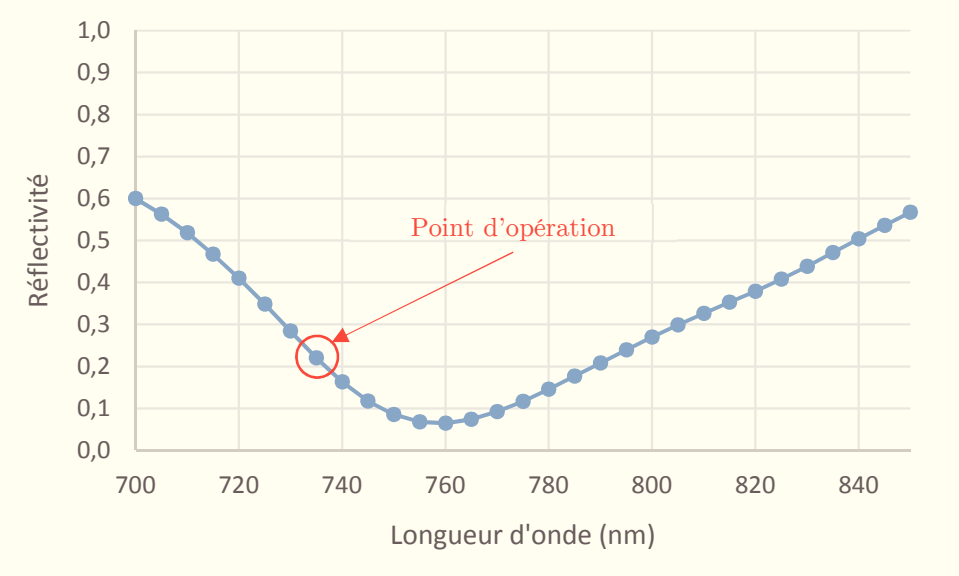


Figure 2.13 : Exemple typique de la résonance de plasmon de surface obtenue avec les échantillons fabriqués.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

La courbe de réflectivité ainsi obtenue permet de vérifier la bonne qualité de la résonance SPR. Pour un capteur plasmonique idéal, la réflectivité passe de 1 à 0 au niveau de la résonance. Ces valeurs ne sont jamais atteintes en pratique, mais certains dispositifs commercialisés atteignent une résonance se traduisant par une évolution de la réflectivité de 0.8 à 0.1. En outre, cette étape sert à déterminer le point d'opération (couple angle/longueur d'onde) utilisé pendant l'expérience, en le plaçant stratégiquement là où la pente est maximale de façon à optimiser la sensibilité.

Un exemple typique de la courbe de réflectivité obtenue sur les dispositifs fabriqués selon le procédé décrit plus haut est donné en Figure 2.13. Ce résultat a été obtenu en se plaçant à un angle fixe de 25° et en opérant un balayage en longueur d'onde de 700 nm à 840 nm par pas de 5 nm. La résonance se produit aux alentours de 760 nm, occasionnant une baisse de la réflectivité qui passe d'environ 0.6 à 0.05. Cette qualité de résonance est suffisante tel que montré au chapitre suivant.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

2.3.3 Fonctionnalisation de surface

L'étude des performances du capteur proposé sur un cas de biodétection spécifique se base sur la réaction d'hybridation entre deux brins d'ADN. A cet égard, il est nécessaire de fonctionnaliser la surface métallique avant l'expérience, c'est-à-dire qu'il faut attacher les simples brins d'ADN sonde sur cette surface.

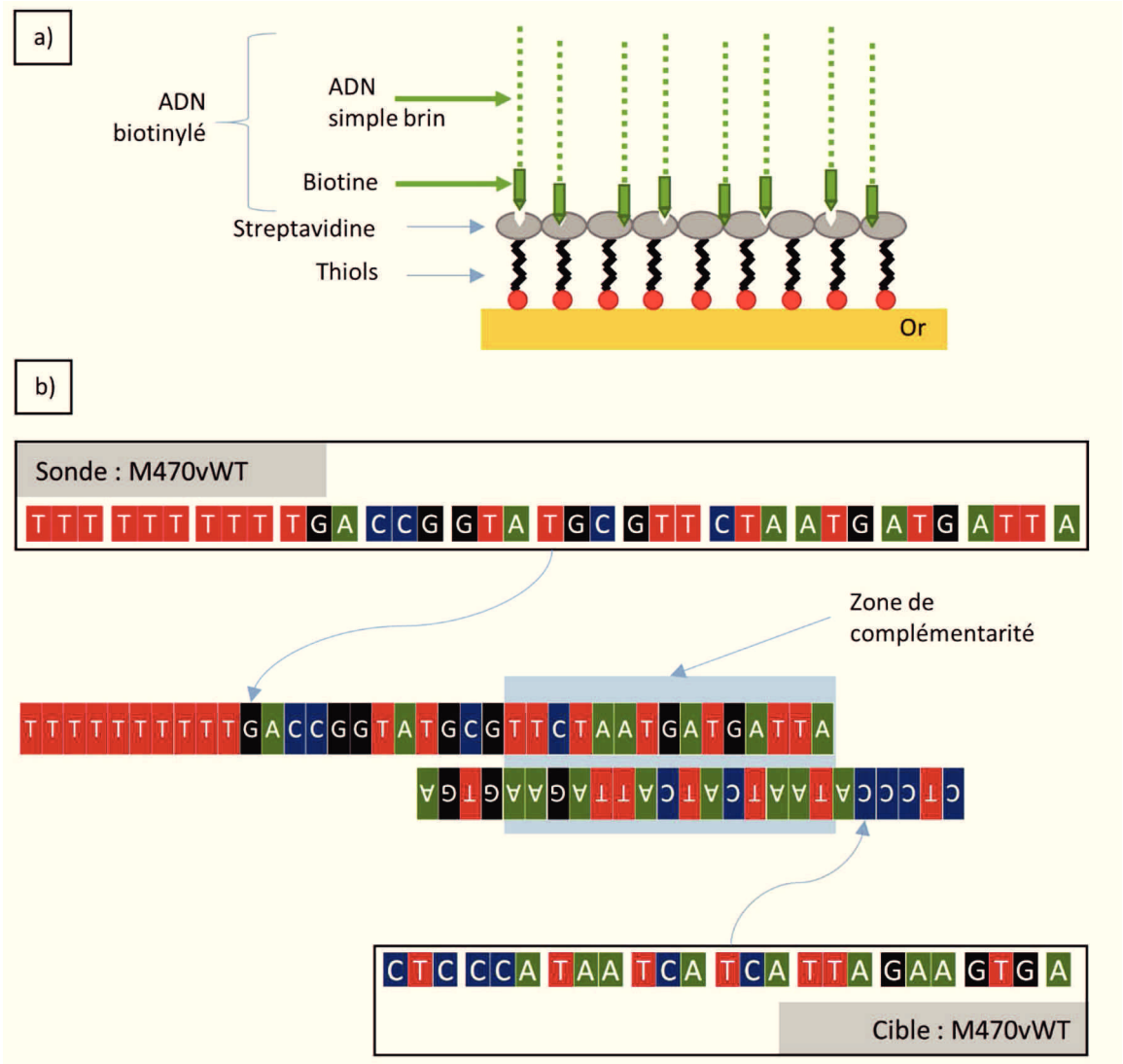


Figure 2.14 : a) Schématisation de la surface fonctionnalisée. Les brins d'ADN représentés sont simples. b) Séquences ADN (simple brin) utilisées et lieu d'hybridation.

Le procédé de fonctionnalisation utilisé ici a été développé au sein du laboratoire [89,90] et ses principales étapes sont décrites ci-après :

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

1) Nettoyage des échantillons : les échantillons sont d'abord nettoyés avec un plasma O_2 (0.6 mbar, 10 min) suivi d'un bain dans une solution aqueuse de peroxyde d'hydrogène à 25 % (70 °C, 15 min). Ils sont ensuite rincés à l'eau pure, séchés, et trempés dans un bain d'éthanol pur pendant 1h.

2) Fonctionnalisation thiols/or : Les échantillons sont plongés dans une solution de cystéamine dissoute dans de l'éthanol (0.3 mg/ml) pendant 12h à l'abri de la lumière puisque celle-ci dégrade la cystéamine. La cystéamine étant un aminothiol, la surface d'or est recouverte d'une monocouche (SAM) de thiols à la fin de cette étape (Figure 2.15). Les échantillons sont ensuite rincés à l'éthanol puis à l'eau puis séchés.

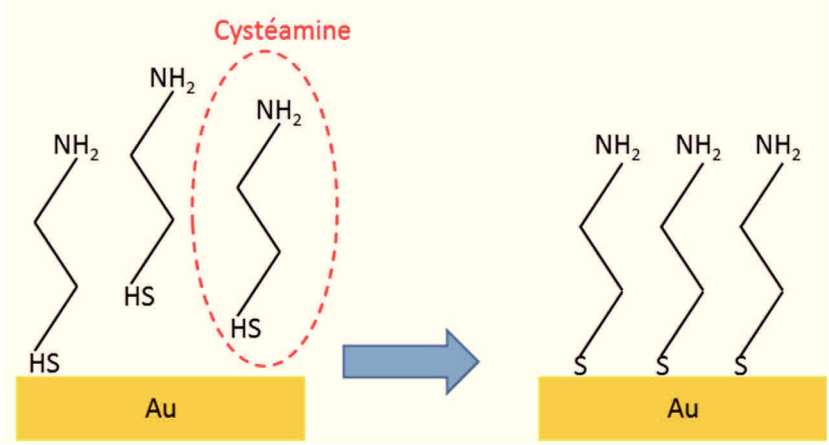


Figure 2.15 : Mécanisme réactionnel de la formation d'une SAM de thiols sur or

3) Accroche PDC/thiols : La molécule de 1,4 phenylenediisothiocyanate (PDC) sert de liaison entre le thiol et l'avidine via ses deux groupements fonctionnels thiocyanates (Figure 2.16). Pour éviter que les deux groupements thiocyanate de la molécule ne se fixent aux thiols et faire en sorte qu'il en reste un et un seul de libre pour la liaison avec l'avidine, la réaction doit être la plus rapide possible et la solution doit donc être saturée en PDC. Ainsi, un mélange composé à 10 % de pyridine et à 90 % de diméthylformamide (DMF), un solvant organique couramment utilisé pour les réactions chimiques, est préparé pour y dissoudre le PDC à une concentration de 4 mg/ml. Les échantillons sont alors recouverts de la solution de PDC ainsi réalisée

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

pendant 2 h dans le noir. Ils sont ensuite nettoyés avec du DMF, de l'éthanol, puis de l'eau pure et séchés.

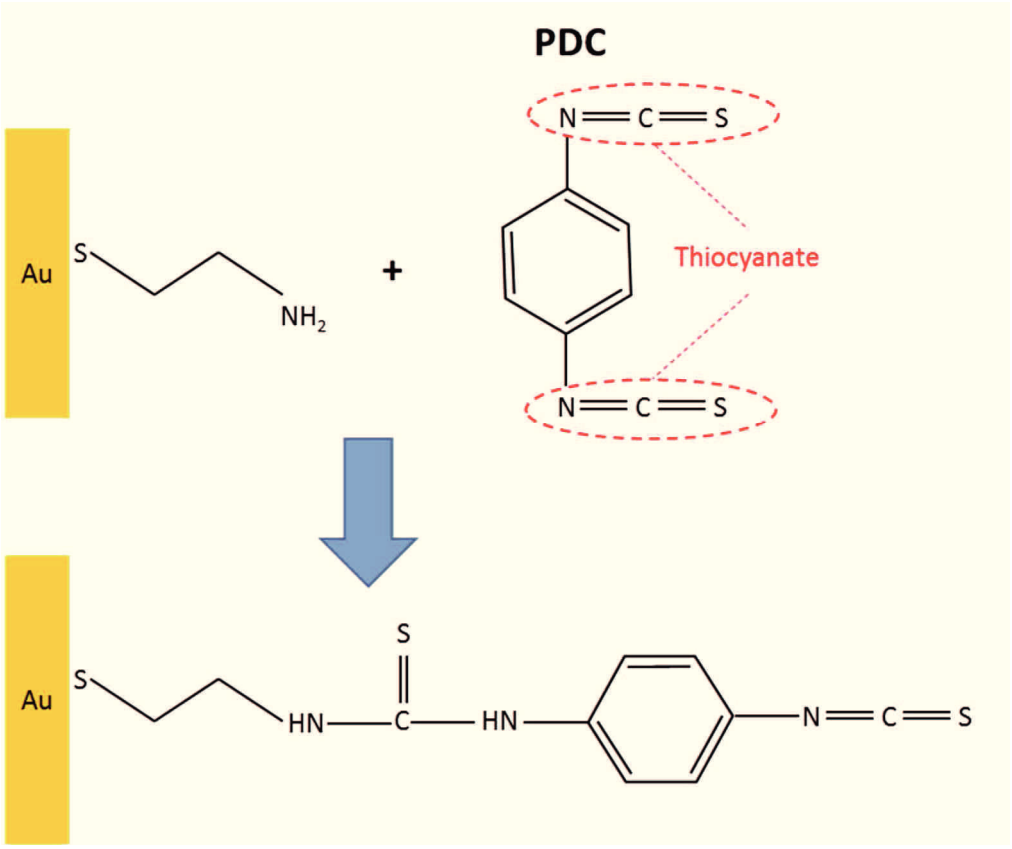


Figure 2.16 : Mécanisme réactionnel de la formation d'une liaison covalente entre le thiol et le PDC

4) Accroche avidine/PDC : Les échantillons sont recouverts d'une solution de neutravidine (250 µg/ml) pendant 40 min. Les molécules de neutravidine s'accrochent alors aux groupements thiocyanates (Figure 2.17). Les échantillons sont ensuite nettoyés à l'aide d'une solution tampon de pH 9, puis rincés avec la solution tampon puis avec de l'eau pure et séchés.

5) Accroche ADN biotinylé / avidine : Les brins d'ADN biotinylé (sondes) sont ensuite dilués à 7 M dans du PBS 1X et sont immobilisés (quasi-immédiatement, du fait de la liaison avidine/biotine très forte) sur la surface d'or, soit uniformément, soit sous forme de plots de quelques dizaines de µm de diamètre par spotting. A ce stade, la surface est dite fonctionnalisée (Figure 2.14a) et le capteur est spécifique : seuls des

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

brins d'ADN complémentaires des brins sondes pourront s'hybrider à ceux-ci et donc modifier l'indice de réfraction au voisinage de la surface du capteur, provoquant ainsi une variation mesurable (si leur concentration est suffisamment élevée) du signal. Les

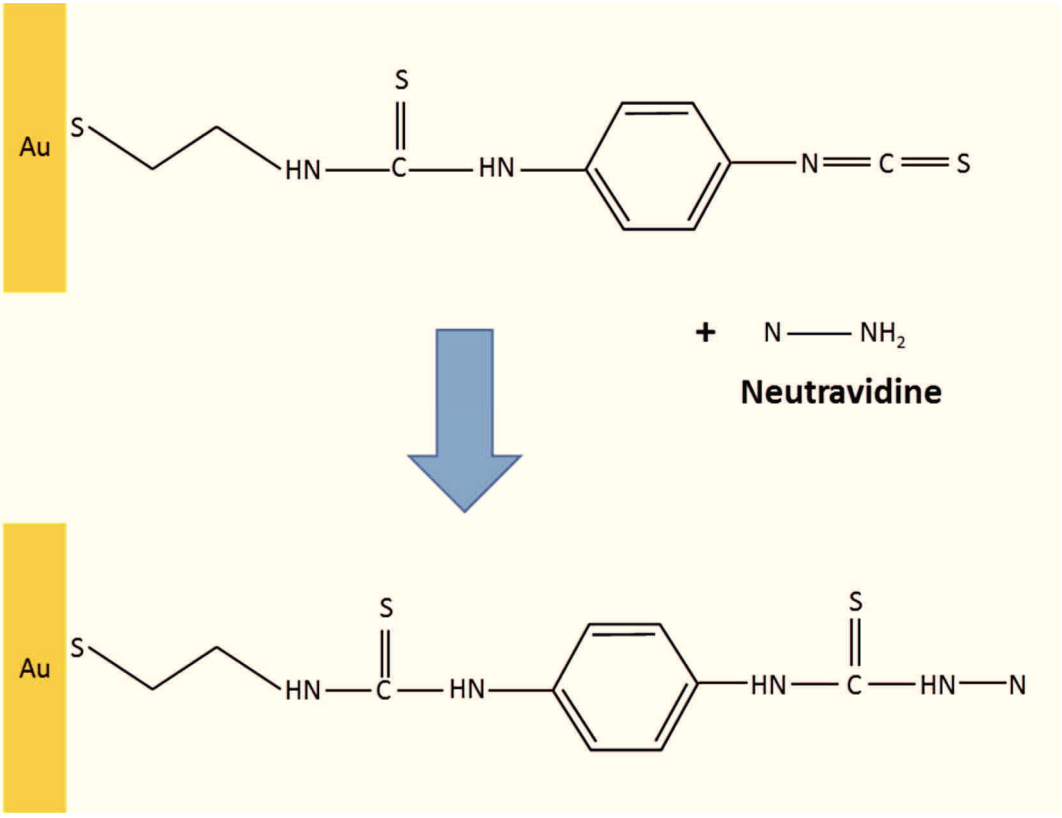


Figure 2.17 : Mécanisme réactionnel de la réticulation de la neutravidine sur un groupement thiocyanate

séquences d'ADN utilisées (sondes et cibles) sont décrites en Figure 2.14b.

2.4 Conclusion

Nous avons choisi d'utiliser des électrodes interdigitées coplanaires pour effectuer le transfert de masse puisque celles-ci sont efficaces et facilement fabricables et modélisables. La méthodologie des calculs et simulations effectués sur COMSOL a été détaillée et les résultats théoriques présentés montrent que la DEP et l'ACEO sont censés être mis en œuvre par le dispositif tel qu'il a été conçu. Les étapes de

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

microfabrication des échantillons ont été décrites ainsi que les différentes méthodes de caractérisation utilisées pour vérifier leur bon fonctionnement. Enfin, le procédé de fonctionnalisation de surface nécessaire à l'évaluation de notre dispositif sur un cas de biodétection spécifique a été expliqué.

Ces différentes phases aboutissent à un prototype de capteur SPR capable de mettre en œuvre des effets électrocinétiques dans l'objectif de collecter les particules ciblées sur les électrodes qui servent en parallèle de transducteurs. Reste maintenant à déterminer les modalités d'utilisation de ce dispositif, à vérifier son efficacité et à comprendre comment les effets électrocinétiques permettent d'améliorer ses performances : c'est l'objet du chapitre suivant.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

CHAPITRE 3 : FONCTIONNEMENT ET PERFORMANCES DU CAPTEUR SUR UN SYSTEME MODELE

3.1 Introduction

Les chapitres précédents ont permis d'expliquer les concepts liés à la SPR et à l'utilisation d'effets électrocinétiques sur des puces microfluidiques puis de présenter le dispositif conçu et ses étapes de fabrication. Ce chapitre démontre le bon fonctionnement de ce capteur sur un système modèle : une solution aqueuse de nanobilles. Au-delà de la simple preuve de concept, ce sera l'occasion de comprendre en profondeur le fonctionnement du dispositif en détaillant les influences séparées de la diélectrophorèse et de l'électroosmose, et de montrer l'amélioration de la limite de détection par rapport à un capteur plasmonique classique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

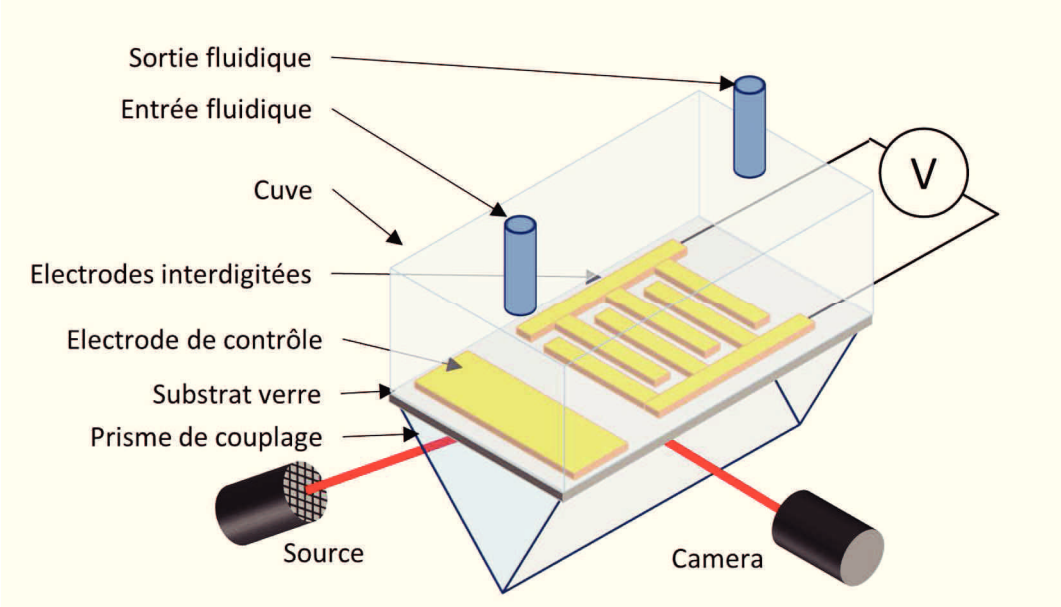


Figure 3.1 : Représentation schématique du dispositif installé sur le banc expérimental.

3.2 Utilisation du capteur

3.2.1 Installation sur le banc expérimental

L'échantillon utilisé est tout d'abord monté sur le banc expérimental. Pour ce faire, il est posé sur le prisme, au préalable enduit d'huile d'indice pour assurer la continuité de l'indice optique entre le verre de l'échantillon et celui du prisme. L'ensemble prisme-échantillon est ensuite calé contre un joint en mylar qui constitue la cuve fluidique, haute de 90 µm (voir Figure 3.2.a). Une pompe, contrôlée par un programme LabVIEW et associée à un dégazeur, permet de faire circuler le liquide dans le circuit fluidique (Figure 3.2.b). Une représentation schématique de l'ensemble prisme-échantillon-cuve est donnée en Figure 3.1.

Pour les échantillons à électrodes interdigitées, c'est-à-dire la majorité des dispositifs étudiés pendant ces travaux, une tension sinusoïdale est appliquée entre les électrodes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

La connexion est faite par le biais de pinces crocodiles reliées au GBF et branchées sur les pads de contact présents sur les dispositifs.

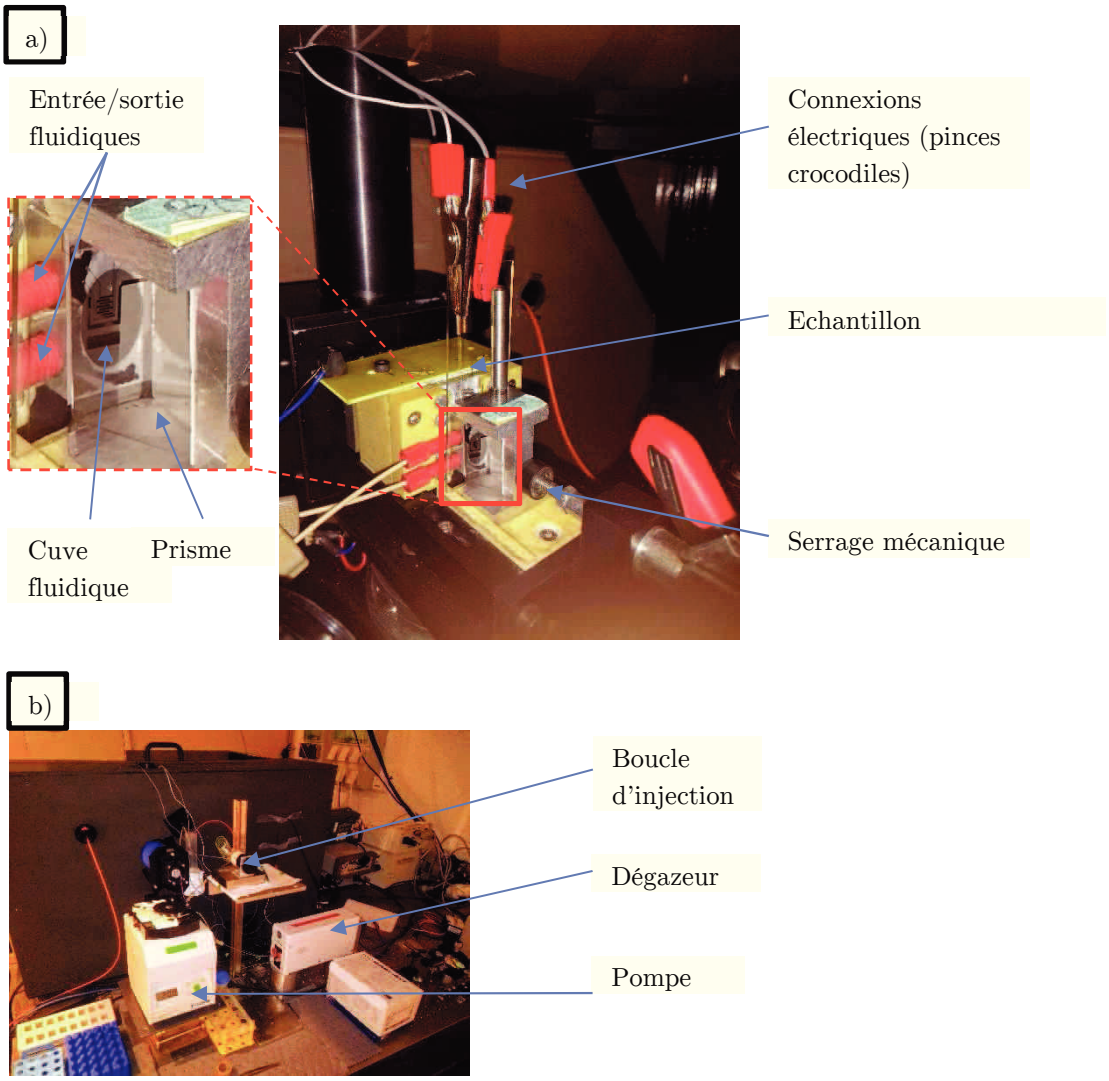


Figure 3.2 : Photographies du banc expérimental. a) Echantillon installé et serré mécaniquement entre le prisme et le support recouvert de la feuille de Mylar. Agrandissement et mise en évidence de la cuve fluidique. b) Vue d'ensemble du circuit fluidique.

3.2.2 Acquisition et traitement des données

Les moteurs contrôlant la position des bras supportant la caméra et l'optique du rayon incident sont dirigés par un programme LabVIEW qui permet par ailleurs de visualiser et enregistrer les images de la caméra et de réaliser les différents balayages (en angle

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

ou en longueur d'onde) utiles à la calibration des échantillons. La même caméra sert à capturer les images en polarisation TE et TM.

La méthode classique pour l'obtention de l'image au moment t est donnée par le calcul suivant :

$$\boldsymbol{Image_t = \frac{TM_t}{TE_t} - \frac{TM_{t=0}}{TE_{t=0}}} \qquad \textbf{Équation 3.1}$$

Où $\boldsymbol{TM_t}$ et $\boldsymbol{TE_t}$ sont respectivement les images TM et TE au temps t.

Pendant les expériences présentées ici, les premières images sont collectées à la fois en polarisation TM et TE, puis les images suivantes sont collectées seulement en polarisation TM, afin de diviser par deux le poids des données. En effet, les images étant acquises à une vitesse approximative de 0.5 image/s et les expériences durant plusieurs heures, il était primordial de prendre quelques précautions quant au stockage et traitement de l'information. En l'occurrence, les changements en polarisation TE sont négligeables par rapport à ceux en polarisation TM à l'échelle temporelle d'une expérience : dans nos calculs, nous n'utilisons donc que l'image TE initiale et parvenons à l'image au temps t par le biais du calcul suivant, réalisé sur le logiciel ImageJ :

$$\boldsymbol{Image_t = \frac{TM_t - TM_{init}}{TE_{init}}} \qquad \textbf{Équation 3.2}$$

Les images présentées dans ce manuscrit sont obtenues par ce procédé. Leur contraste a toutefois été ajusté et leur échelle de gris a été colorisée, à des fins de clarté et de confort visuel. Lorsqu'une quantification est nécessaire, l'acquisition du signal se fait ensuite par l'intégration de l'intensité des pixels sur une zone définie (ROI : Region of interest). La mesure obtenue est une variation de réflectivité normalisée relativement à la réflectivité initiale et sera présentée sur les courbes sous l'appellation « TM/TE » et donnée en pourcentages. Cette variation étant due à des changements locaux de l'indice optique, elle est directement liée à celle de la densité de matière à la surface du capteur et donc à la quantité d'objets ayant provoqué ces changements.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

3.2.3 Influence de la polarisation des électrodes sur la résonance plasmonique : précautions d'usage

3.2.3.1 Cas de la polarisation basse fréquence

Certains travaux, présentés dans l'état de l'art, mettent en évidence une modification du signal SPR lorsque le film d'or servant à la transduction est polarisé par une tension continue [80,91,92]. Or, la possibilité d'utiliser une tension continue sur notre dispositif aurait pu être intéressante pour mettre en œuvre des effets comme l'électrophorèse.

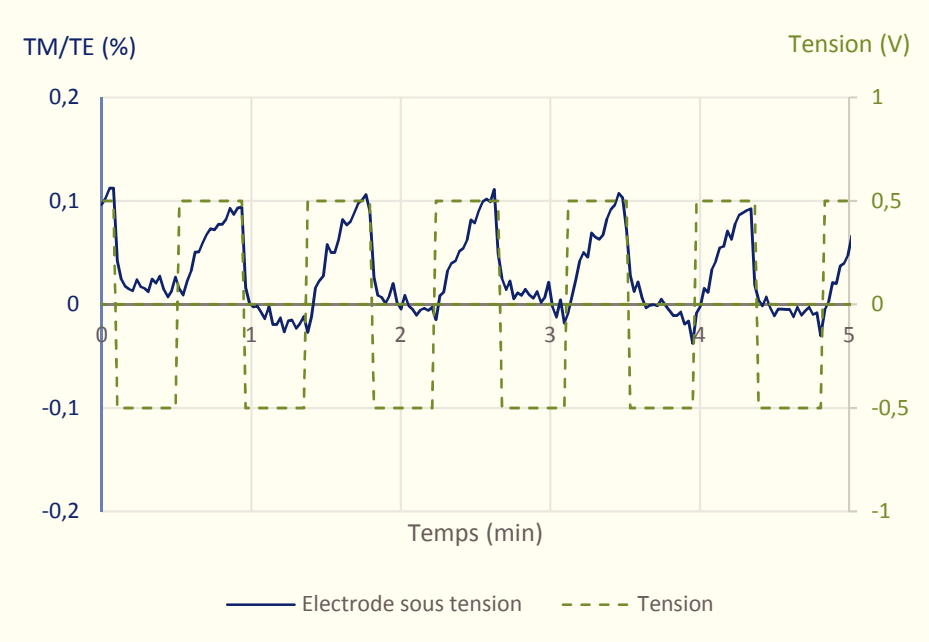


Figure 3.3 : Evolution du signal SPR lors de la polarisation des électrodes en basses fréquences (0,04 Hz, 0,5 Vpp).

Une vérification de ce résultat a donc été effectuée en appliquant une tension d'amplitude faible (0,5 V) sur les électrodes. Le signal électrique appliqué est carré à une fréquence de 0,04 Hz, ce qui permet de se placer dans des conditions similaires à celles de l'application d'une tension continue. La cuve fluidique est remplie d'eau ultrapure.

En suivant l'évolution du signal SPR par rapport à la tension appliquée (Figure 3.3), on retrouve des variations similaires à celles trouvées dans la littérature et présentées dans l'état de l'art [92]. L'application d'une tension positive provoque une plus grande

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

variation du signal que celle d'une tension négative. En effet, le signal entre en phase de croissance lorsqu'une tension de 0,5 V est appliquée. Lorsque la tension passe de 0,5V à -0,5V, le signal rechute quasi-immédiatement à son niveau de base, mais ne diminue pas. Cette asymétrie est rencontrée dans toutes les études portant sur l'influence de la polarisation du métal sur la résonance plasmonique. Plusieurs d'entre elles [92,93] donnent cette explication :

- Une polarisation positive (ou plutôt, supérieure au PZC de l'or dans l'eau, qui est proche de 0 [91]) de la surface métallique entraîne l'attraction d'électrons celle-ci, provoquant une augmentation de la densité électronique et un décalage de l'angle de résonance plasmonique (donc de l'intensité réfléchie dans notre cas) ;
- *A contrario*, une polarisation négative de la surface repousse une partie du nuage électronique du métal hors de celui-ci, ce qui compense la baisse de la densité électronique à l'interface solide-liquide, limitant alors le décalage de l'angle de résonance plasmonique.

En tout état de cause, ce résultat confirme la conclusion tirée suite à l'état de l'art, à savoir que pour éviter des perturbations du signal SPR non liées à la détection des objets visés, notre dispositif doit être utilisé à des fréquences plus élevées.

3.2.3.2 Cas de la polarisation à fréquence intermédiaire

A partir d'une certaine fréquence, les changements d'orientation du champ électrique sont trop rapides pour que les mouvements des espèces chargées dans le liquide puissent conduire à des réactions d'oxydo-réduction. Pour une amplitude et un électrolyte donnés, un balayage décroissant de la fréquence permet ainsi de déterminer une fréquence minimale au-dessus de laquelle le signal SPR mesuré n'est pas perturbé par la polarisation des électrodes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Ainsi on donne, à titre de « règle du pouce », la limite fréquence-amplitude en-dessous de laquelle notre dispositif devient difficilement utilisable pour deux électrolytes différents : le PBS 2X et l'eau ultrapure (voir Figure 3.4). Cette relation a été obtenue en opérant un balayage en fréquence, par fréquences décroissantes à partir de 1 MHz, en se plaçant à différentes amplitudes. Le point retenu est celui à partir duquel on observe, en temps réel et sans quantification autre que visuelle, une variation visible du signal SPR mesuré sur les électrodes.

Pour toute cette étude, la fréquence minimale d'opération de notre dispositif dans l'eau ultrapure est donc fixée à 500 Hz lorsque l'amplitude utilisée est de 20 Vpp, c'est-à-dire l'amplitude maximale utilisée (on verra plus tard que cette amplitude est celle permettant les meilleures performances). En effet, les différences de potentiel utilisées lors des expériences présentées ici (le plus souvent 20 Vpp) sont largement supérieures au potentiel d'oxydation de l'or (qui, dans l'eau, se situe autour de 1 V [94]). Dès lors, le risque d'oxydation de la surface d'or [95] et donc de modification

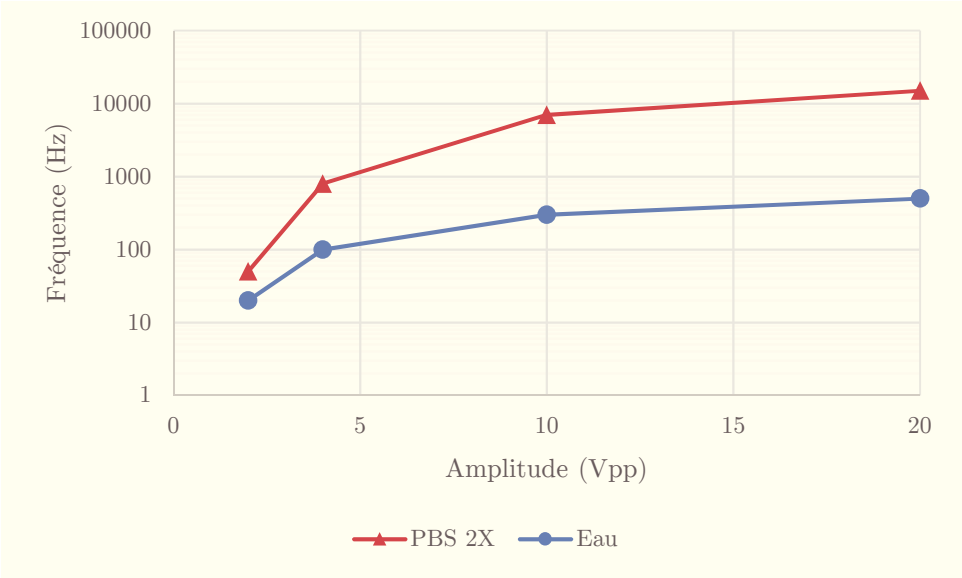


Figure 3.4 : Fréquence d'opération minimale, en-dessous de laquelle le signal SPR est perturbé par des modifications de l'état de surface et devient difficilement interprétable, en fonction de l'amplitude de la tension appliquée dans l'eau ultrapure et le PBS 2X.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

irréversible de son état de surface est trop important en-dessous de cette fréquence tandis qu'au-dessus, aucune perturbation du signal n'est observable.

On remarque par ailleurs que les conditions d'utilisation de notre dispositif changent en fonction de la nature de la solution utilisée [92]. En effet, dans un électrolyte conducteur tel qu'une solution de tampon phosphate salin (PBS), la mobilité ionique est plus élevée et le potentiel d'oxydation est abaissé. Par conséquent, la fréquence minimale d'utilisation dans un tel électrolyte est supérieure à celle dans l'eau.

La courbe donnée en Figure 3.4 illustre bien la relation fréquence-amplitude qui avait été pressentie dans l'état de l'art [92] et qui conditionne l'utilisation de notre dispositif : plus la fréquence d'utilisation est faible et plus l'amplitude de la tension appliquée doit être faible pour éviter des perturbations du signal dues à d'éventuelles réactions électrochimiques. Ainsi, c'est l'une des raisons de la pertinence de l'utilisation d'eau ultrapure pour apporter la preuve de concept du fonctionnement de notre capteur : cet électrolyte donne accès à une plus large gamme de fréquences et d'amplitudes utilisables, ce qui est nécessaire pour étudier et comprendre le fonctionnement de notre dispositif en fonction de ces deux paramètres. L'autre justification de l'utilisation d'eau ultrapure est la possibilité d'effectuer de la diélectrophorèse positive sur les objets visés (billes de polystyrène) et sera discutée dans la partie qui suit.

3.3 Preuve de concept

3.3.1 Réactifs et protocoles expérimentaux

Les réactifs utilisés pour cette série d'expériences sont les suivants :

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

- Billes de polystyrène de 200 nm de diamètre fonctionnalisées avec des groupements amine (Polybead® Amino Microspheres) fournies sous forme diluée à une concentration de 5.68 x 10^{12} particules/ml.
- Billes de polystyrène de 1 µm de diamètre fonctionnalisées de la même façon (Polybead® Amino Microspheres) fournies sous forme diluée à une concentration de 4.55 x 10^{10} particules/ml.
- De l'eau pure dont la conductivité est mesurée à 5.5 x 10^{-6} S/m avant qu'elle serve à diluer les solutions de billes.

Les solutions commerciales de billes sont diluées 1000 fois dans de l'eau pure pour la totalité des expériences présentées ici, à part pour l'étude de la limite de détection qui nécessite évidemment des solutions de différentes concentrations.

Après installation de l'échantillon sur le banc SPR et avant l'expérience, de l'eau pure est mise en circulation dans la cuve en attendant la stabilisation du signal, un balayage en longueur d'onde est effectué pour déterminer le point d'opération (défini au Chapitre 2), et un saut d'indice de calibration est opéré : une solution aqueuse de glucose correspondant à une variation d'indice de 10^{-3} RIU est injectée dans la cuve, produisant une forte variation de réflectivité qui sert à normaliser nos mesures, puis le circuit fluidique est de nouveau rincé à l'eau pure. En outre, une étape de vérification consistant à appliquer une tension sinusoïdale (500 Hz, 20 Vpp) sur les électrodes dans l'eau pure permet de contrôler que la polarisation des électrodes ne perturbe pas le signal mesuré.

Pour étudier le piégeage des particules sur notre dispositif, le protocole adopté pour la majorité des expériences consiste en une succession de séquences identiques : la solution à analyser est injectée dans la cuve, le flux est arrêté pendant une minute puis la tension choisie est appliquée entre les électrodes. Le temps de repos entre l'injection de la solution et l'application de la tension a pour objectif l'homogénéisation

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

de la répartition des billes dans le volume par diffusion. Le fait qu'aucun flux ne soit imposé par la pompe lors du transfert de masse par effets électrocinétiques est primordial, notamment pour comprendre la dynamique spatiale du système.

3.3.2 Preuve de concept : concentration des billes sur les électrodes

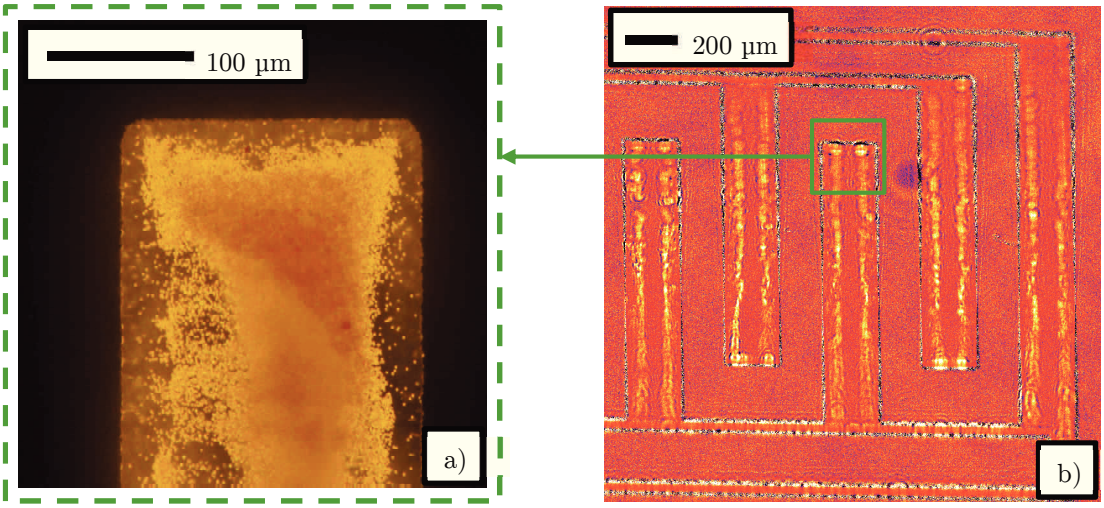


Figure 3.5 : Comparaison des résultats observés lors du piégeage de billes de 1 µm sur les électrodes sous tension (20 Vpp, 5 kHz) a) en microscopie optique et b) en imagerie SPR.

Une première vérification a été effectuée en utilisant une solution de billes de 1 µm diluées 1000 fois. La même expérience a été réalisée et observée en microscopie optique et en imagerie SPR (SPRI). Le choix de la taille des billes est justifié par le fait que leur diamètre de 1 µm permet de les voir par microscopie optique, ce qui n'est pas possible pour les billes de 200 nm.

Après injection de la solution dans le volume présent au-dessus du capteur, une tension de 20 Vpp et 5 kHz est appliquée sur les électrodes. Cela mène à l'accumulation de billes sur la surface de l'électrode (Figure 3.5). D'une part, c'est la confirmation que notre capteur fonctionne comme attendu. D'autre part, cela soulève une question :

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

pourquoi n'observons-nous pas le même résultat en imagerie SPR et en microscopie optique ?

En imagerie SPR, on observe la formation de bandes symétriques de billes sur les électrodes tandis qu'en microscopie optique, on peut voir les billes s'accumuler au-dessus de la quasi-totalité de la surface de l'électrode. Les expériences ayant été réalisées dans des conditions identiques, la différence entre ces deux résultats s'explique par les caractéristiques des deux techniques d'observation :

- en microscopie optique on voit l'entièreté du volume présent au-dessus du capteur, et donc on observe même les billes qui sont en circulation dans les vortex fluidiques à plusieurs dizaines de microns au-dessus de la surface
- en imagerie SPR, seules les premières centaines de nm au-dessus de la surface sont imagées. Le diamètre des billes étant de 1 µm, on n'observe donc que celles qui touchent directement les électrodes.

Ce résultat préliminaire met en lumière un des intérêts de l'utilisation d'effets électrocinétiques sur un capteur SPR : cette technique de détection fournit des informations qui ne peuvent s'obtenir autrement (par microscopie, fluorescence ou impédimétrie par exemple). N'être sensible qu'aux évènements se produisant à proximité de la surface peut évidemment être un inconvénient ou un avantage en fonction de la situation, mais soulignons tout de même l'intérêt que peut avoir la SPR pour l'étude des effets électrocinétiques en apportant des informations nouvelles.

3.3.3 Dynamique de l'accumulation des particules

La même expérience a été conduite sur une solution de billes de 200 nm diluée 1000 fois et monitorée en imagerie SPR. On observe alors la formation de bandes de billes, comme pour celles de 1 µm, et le déplacement progressif de celles-ci vers le centre de l'électrode où elles parviennent après 1 minute. Cette dynamique est illustrée par la

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

séquence d'images en Figure 3.6. Simultanément, on n'observe aucun changement sur l'électrode de contrôle qui, pour rappel, n'est pas polarisée. Cela permet de confirmer que c'est bel et bien la polarisation des électrodes interdigitées qui provoque la capture des billes sur celles-ci.

Les raisons de cette accumulation sous forme de bandes sont maintenant bien comprises [96] : à cette fréquence, les billes sont sujettes à une force diélectrophorétique positive et à la force de traînée du flux électroosmotique. La diélectrophorèse positive exerce une force attirant les billes vers les arêtes des électrodes tandis que l'électroosmose (ACEO) provoque des vortex qui repoussent les billes vers le centre des électrodes. Un équilibre est ainsi atteint et les billes se rassemblent sous forme de bandes là où la somme des forces est nulle (centre de l'électrode).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

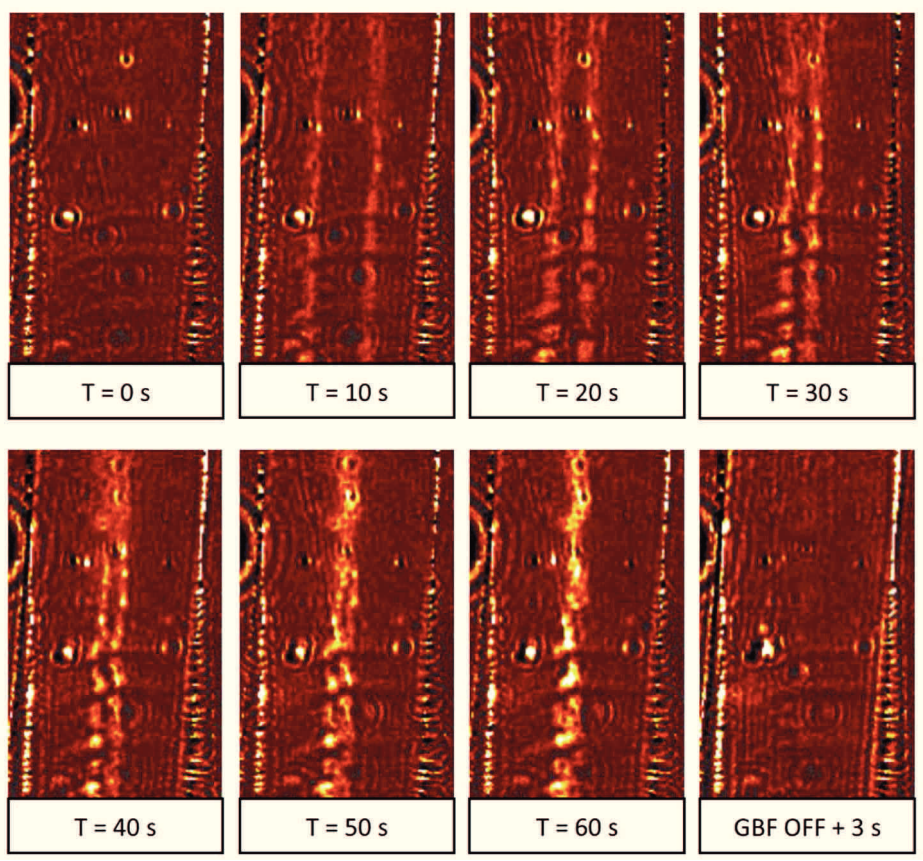


Figure 3.6 : Observation en SPRI de la dynamique d'accumulation des billes PS 200 nm dans de l'eau ultrapure sur les électrodes lors de l'imposition d'une tension (1 kHz, 20 Vpp) sur celles-ci.

L'influence de l'effet électrothermique sur ces motifs d'accumulation est négligeable à cette fréquence d'après les calculs réalisés (voir annexe), ce qui est cohérent avec les résultats obtenus et la littérature [96].

Irréalisable en microscopie optique, cette expérience souligne un autre intérêt, déjà connu, de l'utilisation de la SPR : la possibilité d'observer des objets submicroniques sans pré-marquage de ceux-ci. Par ailleurs, elle confirme la pertinence de la stratégie consistant à utiliser les effets électrocinétiques pour attirer les objets vers la surface, puisque aucune bille n'est observable sur l'électrode de contrôle, qui n'est pas sujette à ces effets.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

3.4 Etude des effets électrocinétiques à proximité de la surface

3.4.1 Influence de la taille des objets

L'utilisation de billes de taille différente permet de mettre en évidence l'influence d'un paramètre important lors de la mise en œuvre d'effets électrocinétiques : les dimensions des objets ciblés. En effet, la comparaison des dynamiques des billes de 1 µm et 200 nm montre que les bandes de billes de 1 µm, plus grosses, se déplacent plus lentement vers le centre de l'électrode. Ainsi, les variations de réflectivité sur toute la largeur d'une electrode 60 s après l'application de la tension (1 kHz, 20 Vpp) sur les deux solutions de billes montrent que les bandes de billes de 200 nm sont beaucoup plus proches du centre que celles de 1 µm après un même intervalle de temps (voir Figure 3.7).

La dépendance de la dynamique vis-à-vis de la taille se comprend au travers des équations décrivant les forces diélectrophorétique et électroosmotique. Le flux électroosmotique induit une force de traînée sur les billes qui est proportionnelle à leur rayon R (pour rappel, la force de traînée s'exerçant sur une sphère est $F_d = 6\pi\eta R v$ où v est la vitesse de la sphère dans le fluide et η est la viscosité dynamique de celui-ci). Or la force diélectrophorétique est proportionnelle au volume de l'objet, c'est à dire à R^3. Ainsi, tous les autres paramètres étant égaux par ailleurs, l'augmentation de la force diélectrophorétique est supérieure à celle de la force de traînée lorsque la taille

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

de l'objet ciblé augmente. Par conséquent, les bandes ont tendance à se former plus près des bords des électrodes puisque les billes sont plus attirées par les arêtes.

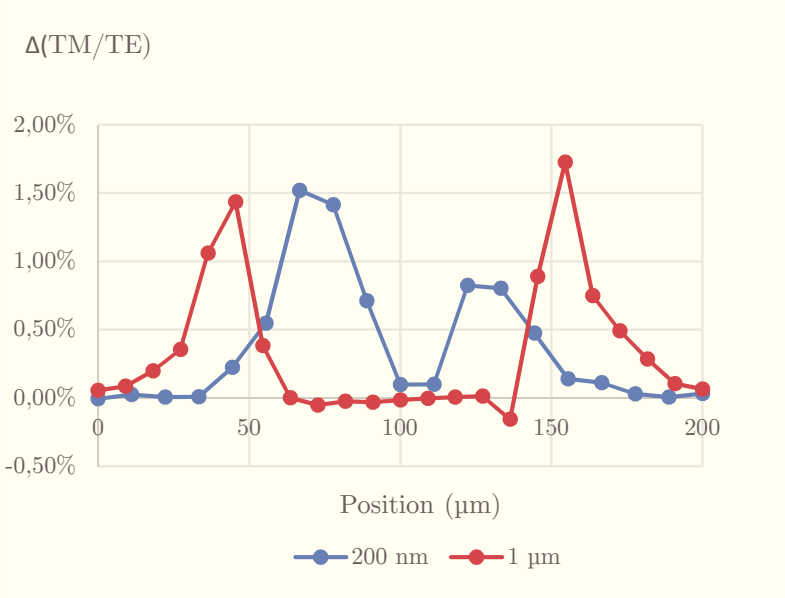


Figure 3.7 : Variations de réflectivité sur la largeur d'une électrode (un bord est à 0 µm, l'autre est à 200 µm) après 30 s d'application d'une tension sinusoïdale (1 kHz, 20 Vpp) sur deux solutions de billes PS de tailles différentes (200 nm, 1 µm).

Les évolutions séparées de ces forces sont visualisables sur les résultats de simulation COMSOL présentés en Figure 3.8. Les calculs ont été menés selon les explications détaillées au Chapitre 2. On observe bien l'augmentation relative des deux forces lors de l'augmentation de la taille des billes (passage de 200 nm à 1 µm) :

- La force de traînée induite par ACEO augmente mais reste dans le même ordre de grandeur (10^{-11} N).
- La force DEP passe d'environ 10^{-12} N à 10^{-8} N sur l'arête, et d'à peu près 10^{-15} N à 10^{-13} N dans le reste du volume.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

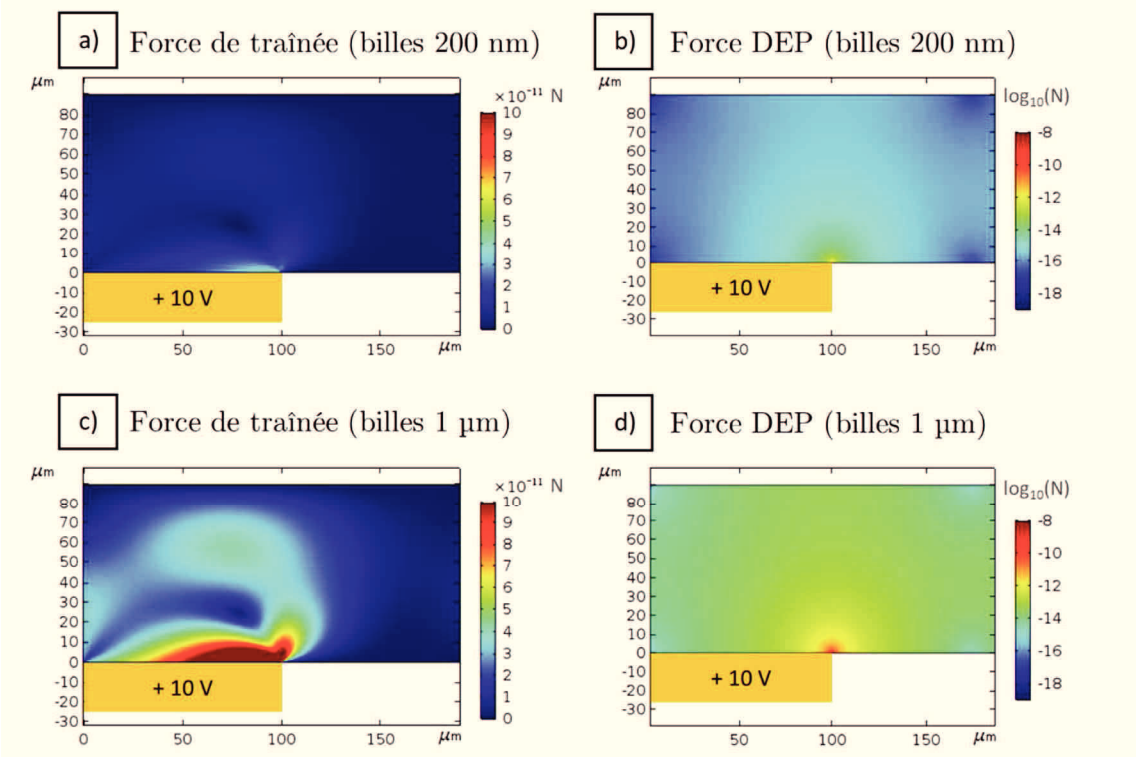


Figure 3.8 : Comparaison de la force de traînée s'exerçant sur les billes de a) 200 nm et c) 1 µm. Comparaison de la force diélectrophorétique (échelle log) s'exerçant les billes de b) 200 nm et d) 1 µm. Résultats obtenus par simulations COMSOL, centrés sur une demi-électrode pour voir clairement les variations des forces au voisinage de l'arête.

Ces résultats de simulation mettent donc en évidence une variation beaucoup plus grande pour la force diélectrophorétique (gain de plusieurs ordres de grandeur) ce qui corrobore les explications données ci-dessus.

3.4.2 Déplacement de l'équilibre DEP/ACEO

Comme nous l'avons montré précédemment, l'utilisation de l'imagerie SPR fournit une information spatiale sur les mouvements des particules à l'interface solide-liquide qui est inaccessible autrement. Etre capable d'analyser ces phénomènes et d'étudier la dynamique du transfert de masse à proximité de la surface est important dans le cadre des travaux menés sur certaines problématiques, comme la fonctionnalisation de

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

surface active, pour lesquels il est essentiel de savoir où précisément les particules sont en contact avec la surface.

Afin de comprendre les paramètres régissant les mouvements des bandes de billes, une série d'expériences à différentes fréquences (500 Hz, 1 kHz, 2 kHz) a été réalisée en appliquant des différences de potentiel s'échelonnant progressivement entre 2 et 20 Vpp. C'est toujours une solution de billes de 200 nm diluée 1000 fois qui est utilisée pour obtenir ces résultats.

Après introduction de la solution dans la cuve fluidique, la tension voulue est appliquée pendant 1 minute puis la solution est remise en circulation dans le circuit fluidique, de manière à rendre plus homogène la répartition des billes dans la cuve avant l'application de la tension suivante.

Lors du traitement des résultats obtenus en imagerie SPR, l'électrode est découpée dans toute sa largeur en 20 régions d'intérêt (ROI), chacune étant ainsi large de 10 µm. La variation de réflectivité entre $t = 0$ s et $t = 60$ s ($t = 0$ s correspondant à l'application de la tension) est convertie en variation d'indice optique. Plus celui-ci varie, plus le nombre de billes présentes en surface du capteur est grand. La densité relative des billes sur la largeur de l'électrode, et par extension leur position, est ainsi connue avec une résolution de 10 µm. Elle est représentée sur les graphiques en 3D de la Figure 3.9 et on peut y observer que :

1) Pour les fréquences 1 kHz et 2 kHz, la position des billes sur l'électrode change avec l'amplitude. A 2 Vpp, la résultante des forces n'est pas assez élevée pour provoquer du transfert de masse. L'accumulation des billes commence à être clairement observable à partir de 6 Vpp. A cette amplitude, les billes sont piégées près des bords des électrodes. Leur position d'accumulation se décale progressivement vers le centre de l'électrode lorsque l'amplitude augmente. Ce décalage est plus rapide à 1 kHz.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

2) A 500 Hz, les billes se rassemblent toutes au même point indépendamment de l'amplitude du signal électrique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

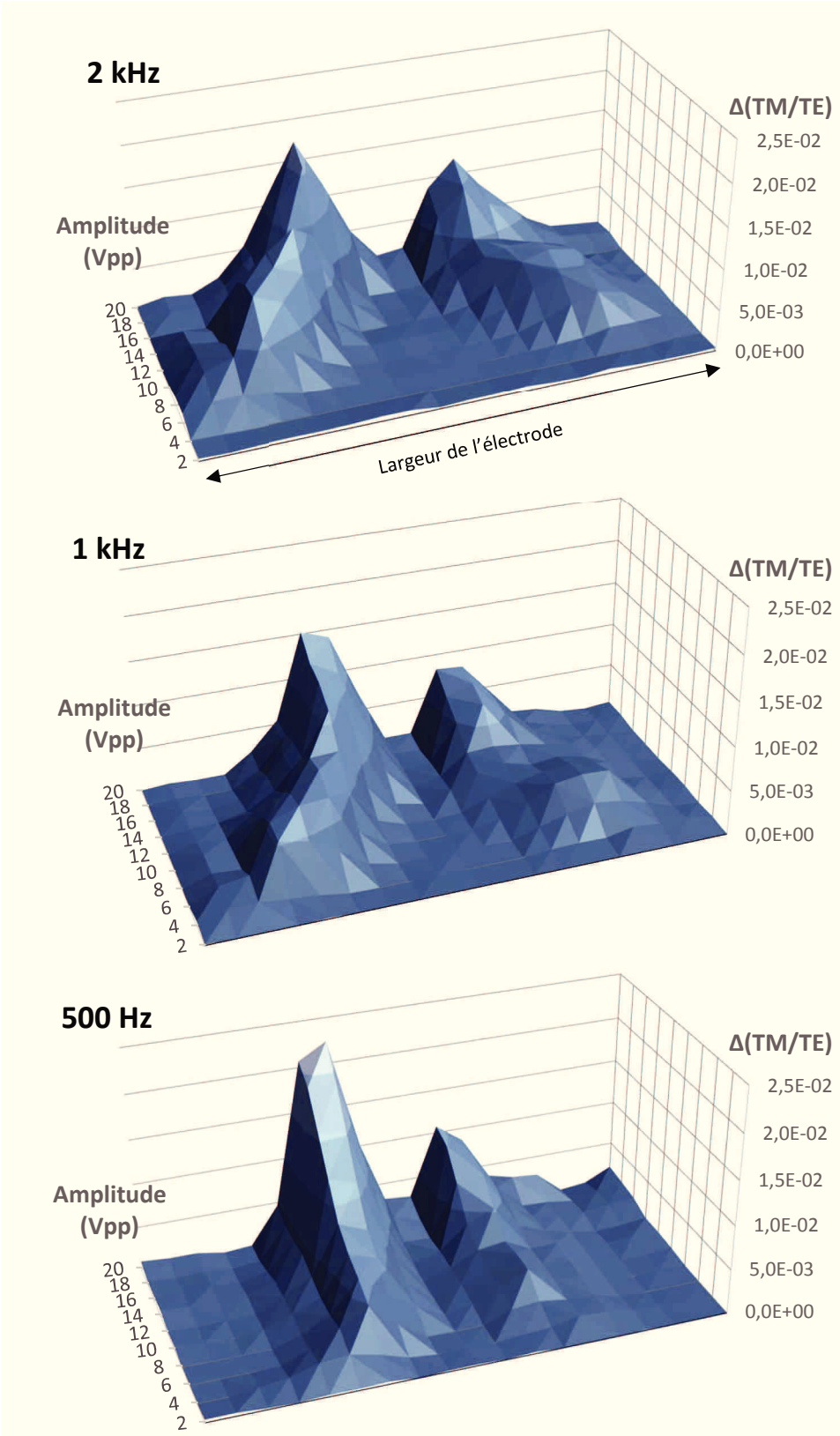


Figure 3.9 : Représentation 3D de la position des billes (200 nm) sur la largeur de l'électrode 30 s après le début de l'application de la tension : les variations d'indice de réfraction sur toute la largeur de l'électrode sont affichées en fonction de l'amplitude appliquée pour 3 fréquences (500 Hz, 1 kHz, 2 kHz).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Pour comprendre ce comportement, il faut se pencher sur les équations régissant les phénomènes en jeu dans ce système. Le calcul du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence, réalisé grâce au logiciel MyDEP (voir Figure 3.10), donne une partie réelle de 0.99 aux trois fréquences utilisées : c'est pourquoi la diélectrophorèse est positive et les particules sont attirées vers les arêtes des électrodes avec une force identique dans les trois cas.

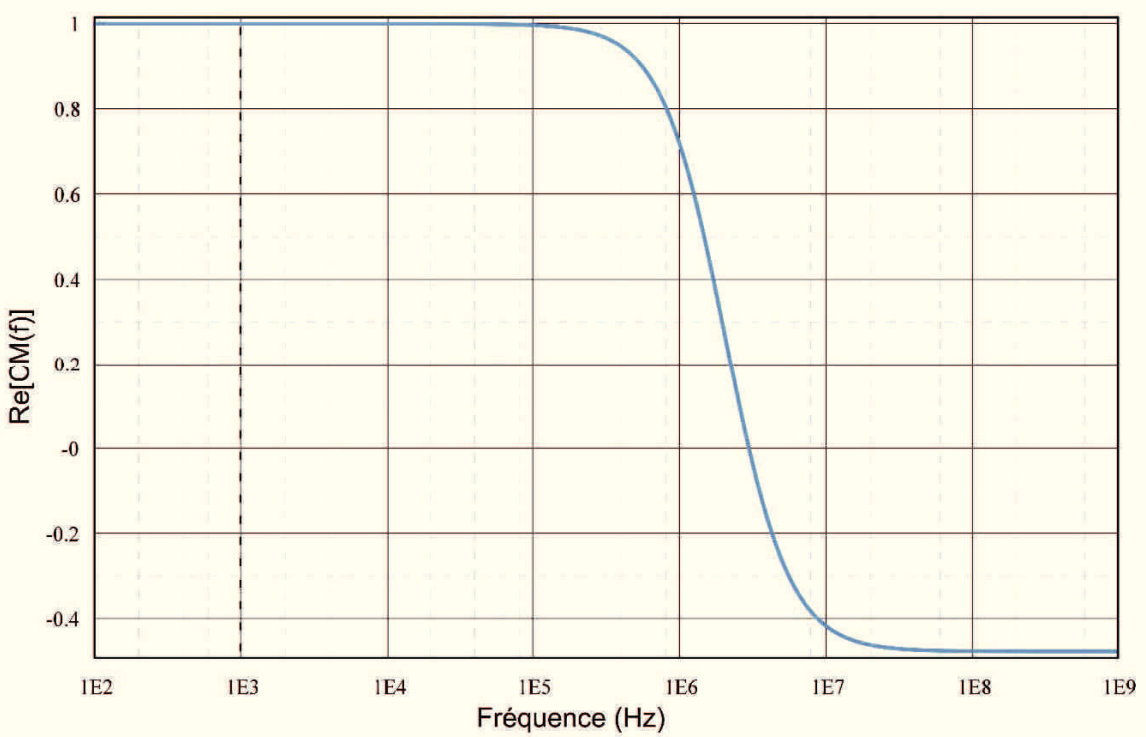


Figure 3.10 : Partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti des billes de 200 nm dans de l'eau pure, en fonction de la fréquence (curseur à 1 kHz).

Le flux électroosmotique à la surface des électrodes a été calculé d'après les explications théoriques fournies par Morgan et Green [87] et détaillées au Chapitre 2. La vitesse électroosmotique du fluide à une distance de 50 µm du bord de l'électrode est montrée sur la Figure 3.11 et met en évidence des comportements clairement différents pour les 3 fréquences utilisées. Cette vitesse est quasi-maximale à 500 Hz, intermédiaire à 1 kHz et proche de son minimum à 2 kHz. Cela explique l'allure des graphes 3D de la Figure 3.9 : à 500 Hz la vitesse électroosmotique est tellement élevée qu'à toutes les amplitudes appliquées, la force DEP n'est pas assez grande pour la compenser et les billes sont systématiquement repoussées vers le centre de l'électrode. Pour les

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

fréquences plus élevées (1 kHz et 2 kHz), la vitesse électroosmotique est moins grande et l'influence de la DEP positive devient alors observable puisque pour les faibles amplitudes, les billes ont tendance à rester plus près des bords. C'est aussi la raison pour laquelle le décalage des billes vers le centre avec l'augmentation de l'amplitude est plus rapide à 1 kHz qu'à 2 kHz où la vitesse électroosmotique est beaucoup plus faible.

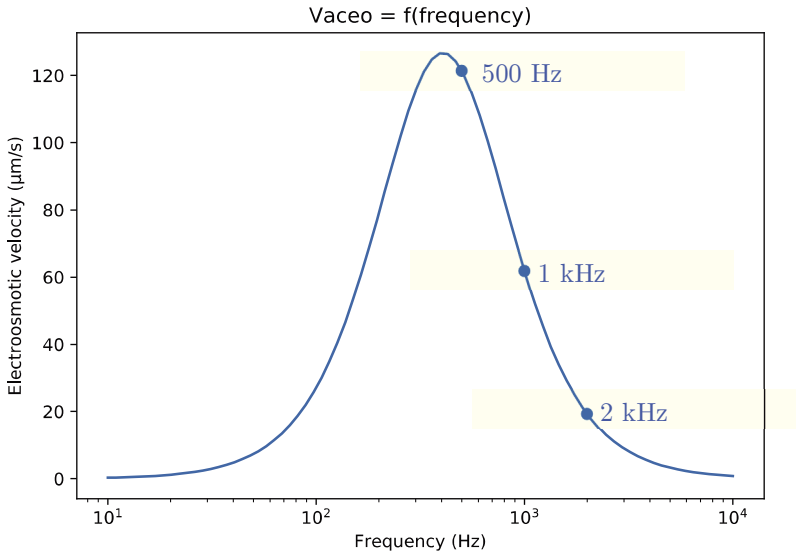


Figure 3.11 : Vitesse électroosmotique calculée à une distance de 50 µm du bord de l'électrode.

Les profils de distribution des billes sur la largeur de l'électrode ont été extraits des résultats expérimentaux pour chaque fréquence et pour une amplitude de 20 Vpp (voir Figure 3.12). Ils montrent nettement le déplacement du lieu d'accumulation des billes lors du changement de fréquence et illustrent bien le décalage de celui-ci vers le centre lorsque la fréquence s'approche de 500 Hz.

L'ensemble des résultats présentés ci-dessus montre que la position des objets attirés sur les électrodes peut être contrôlée électriquement. Les outils théoriques permettant de prévoir la configuration des motifs d'accumulation ont été présentés. Enfin, ces

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

travaux soulignent bien l'intérêt de la SPR pour l'étude des dynamiques de transfert de masse à proximité des surfaces actives.

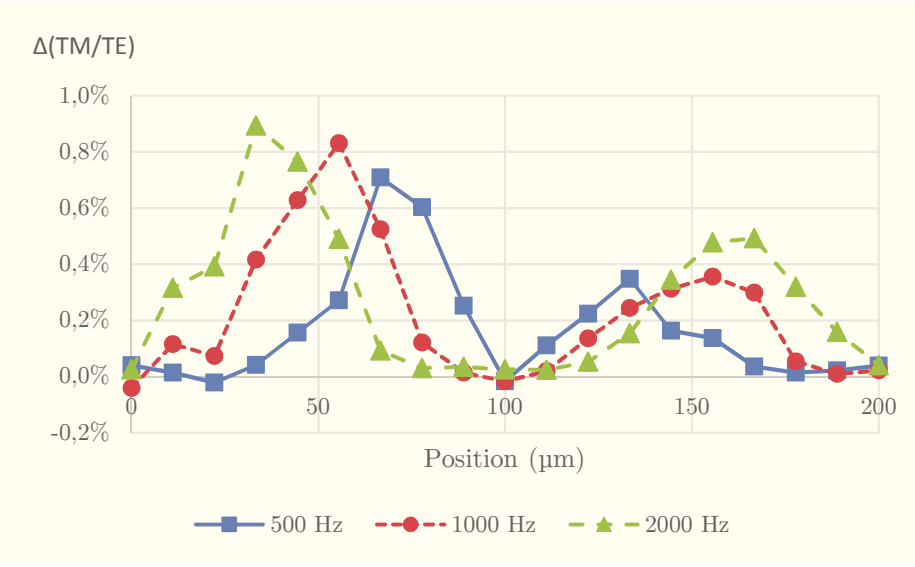


Figure 3.12 : Profils de distribution des billes (200 nm) sur la largeur d'une électrode après 30 s d'application de la tension, pour les fréquences 500 Hz, 1 kHz et 2 kHz.

3.5 Evaluation des performances

Nous avons montré que notre dispositif est capable de réaliser sa fonction première : attirer les objets analysés sur la surface des électrodes afin de les détecter par SPR. Dans un deuxième temps, nous allons quantifier les performances de ce capteur. Pour rappel, l'utilisation des effets électrocinétiques avait pour but de passer outre la limite de diffusion en attirant les cibles sur l'élément de transduction SPR. La lenteur du transfert de masse passif (limité par la diffusion) constitue un obstacle principalement lorsque l'on cherche à détecter des analytes en faible concentration. L'évaluation des performances se fera donc ici par une évaluation de l'amélioration de la limite de

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

détection du capteur, c'est-à-dire la concentration minimale de billes que le dispositif est capable de détecter.

3.5.1 Etude préliminaire de la limite de détection : efficacité du dispositif dans un fluide au repos

Plusieurs dilutions de la solution de billes 200 nm ont été réalisées pour cette expérience : des facteurs de dilution de 1000, 3000, 10 000, 30 000 et 100 000 ont été réalisés. Les différentes solutions ont été analysées successivement sur un même échantillon en appliquant un signal électrique identique (2 kHz, 20 Vpp) à chaque fois. Elles ont été injectées dans un ordre croissant de concentration de manière à réduire au maximum une éventuelle perturbation du signal qui pourrait être provoqué par l'accumulation résiduelle de billes à la surface des électrodes.

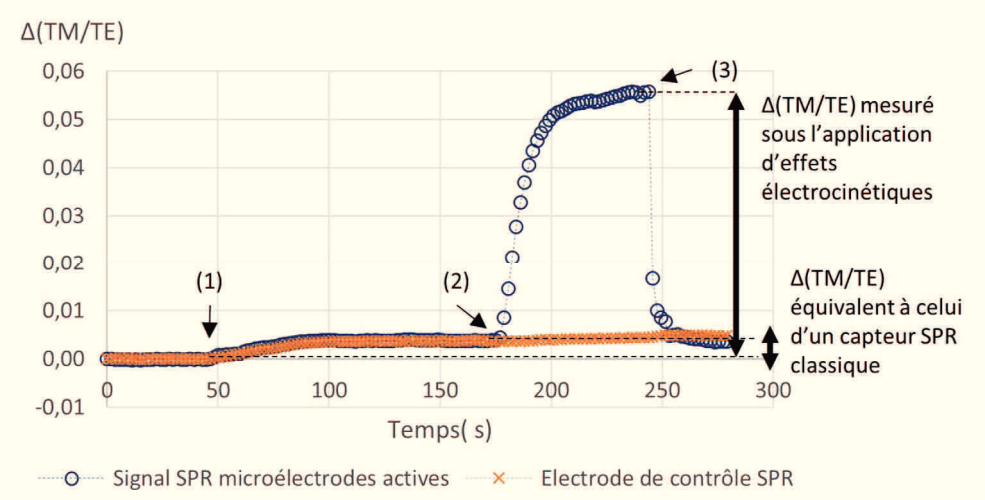


Figure 3.13 : Exemple de cinétique du signal SPR mesuré pendant l'injection d'une solution de billes de polystyrène (200 nm) diluées 300 fois. Les deux courbes ont été obtenues sur le même échantillon, pendant la même expérience, au même moment. (1) Injection des billes (2) Application d'une tension sinusoïdale (2 kHz, 20 Vpp) (3) Coupure de la tension

Afin d'expliquer comment les variations de signal ont été calculées, un exemple de cinétique du signal durant le piégeage de billes diluées 300 fois est donné en Figure 3.13. Le signal correspondant au capteur prototype a été extrait sur une ROI stratégiquement choisie au centre des électrodes. Le signal équivalent à celui d'un

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

capteur plasmonique classique (sans transport de masse actif) a été extrait d'une ROI de la même taille sur l'électrode de contrôle.

Après l'acquisition d'une ligne de base, l'expérience se déroule comme suit :

(1) La solution de billes est injectée dans la cuve fluidique. Comme attendu, on observe alors une augmentation du signal SPR similaire à la fois sur l'électrode de contrôle et les électrodes interdigitées. La pompe est coupée une fois que le signal mesuré est stabilisé.

(2) Une tension sinusoïdale (2 kHz, 20 Vpp) est appliquée sur les électrodes interdigitées. On observe alors une augmentation importante et rapide du signal SPR mesuré sur ces électrodes, attribuée à l'accumulation des billes à leur surface provoquée par les effets électrocinétiques.

(3) La tension est coupée. Le signal SPR mesuré sur les électrodes interdigitées revient alors à son niveau de base, ce qui est dû au fait que les billes se détachent de la surface dès l'arrêt des effets électrocinétiques.

Dans le même temps, aucune variation du signal SPR n'est observable sur l'électrode de contrôle. Cela permet de comparer directement les performances de notre prototype avec celles d'un capteur SPR classique, en extrayant des courbes cinétiques la variation de réflectivité mesurée entre les étapes (1) et (3) sur les électrodes électriquement actives et l'électrode de contrôle (le calcul de Δ(TM/TE) est illustré sur la Figure 3.13).

Pour évaluer l'amélioration de la limite de détection apportée par notre prototype, la variation de signal est mesurée 60 s après l'application de la tension : cela permet de caractériser la première cinétique d'accumulation des billes. En effet, après l'augmentation rapide du signal, une deuxième cinétique d'augmentation, plus lente, survient. Mêlant effets diffusifs et conséquences du flux électroosmotique, elle est

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

beaucoup plus complexe d'interprétation et a été laissée de côté dans le cadre de cette étude.

Les variations du signal SPR mesuré correspondant à chaque concentration de billes sont données en Figure 3.14. Le bruit blanc du capteur a été obtenu séparément sur chaque électrode (électrode active et électrode de contrôle) en calculant l'écart-type standard (auquel est appliquée la correction de Bessel) des points de mesure sur une ligne de base au début de l'expérience. Le seuil de détection est défini de manière conventionnelle comme étant égal à trois fois ce bruit blanc [97,98]. La limite de détection correspond à la concentration donnant une variation de signal égale à ce seuil de détection.

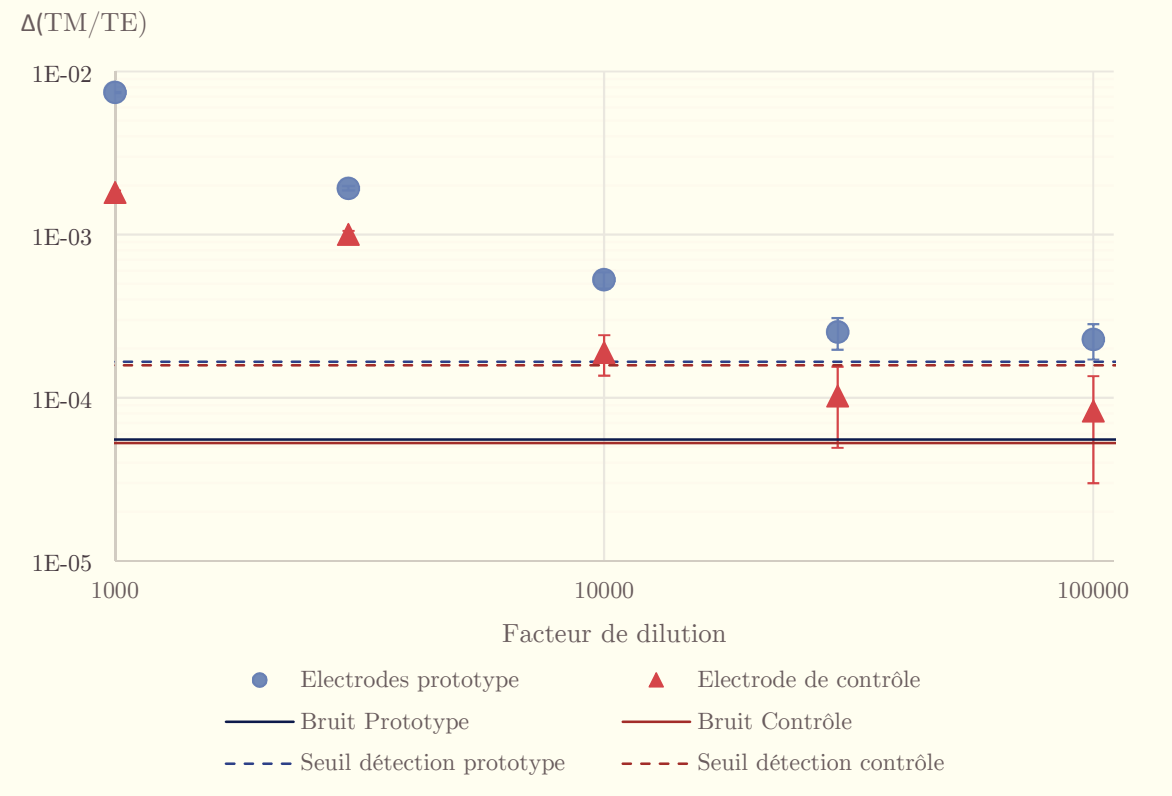


Figure 3.14 : Variations de signal mesurées pour les différentes solutions diluées. Le seuil de détection d'un capteur SPR classique est ajouté en pointillés.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Le signal mesuré sur l'électrode de contrôle montre que la limite de détection équivalente à celle d'un capteur SPR classique est atteinte pour la solution diluée 10 000 fois, puisque pour les solutions plus diluées la variation de réflectivité est inférieure au seuil de détection. En revanche, le signal mesuré sur les électrodes interdigitées est toujours supérieur à ce seuil de détection, même pour la solution la plus diluée (facteur de dilution 100 000). Cela prouve que, dans le cas du système billes/eau, notre prototype améliore la limite de détection par un facteur d'au moins 10.

3.5.2 Optimisation de la quantité d'objets capturés : utilisation du capteur sous flux

Il est aussi possible d'actionner notre dispositif « sous flux », c'est-à-dire pendant que la pompe est en marche et que le fluide dans la cuve a une vitesse non nulle. Au terme d'un temps fixe, cela permet de faire passer plus d'analytes dans la cuve. Pour une concentration donnée, on espère ainsi capturer plus de cibles et augmenter la variation de signal mesurée.

Pour chaque concentration étudiée, le protocole de mesure est le suivant :

1) La solution est injectée à un débit de 60 µl/min ;

2) A $t = 20$ s, la tension est appliquée aux bornes des électrodes ;

3) A $t = 132$ s, le débit est coupé pour des raisons d'optimisation de mesure expliquées plus tard dans cette partie ;

4) A $t = 188$ s, la tension est coupée, la pompe est actionnée de nouveau et la solution suivante est injectée.

La dynamique d'accumulation des billes 200 nm dans le cas d'une dilution par 1000 est donnée en Figure 3.15.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

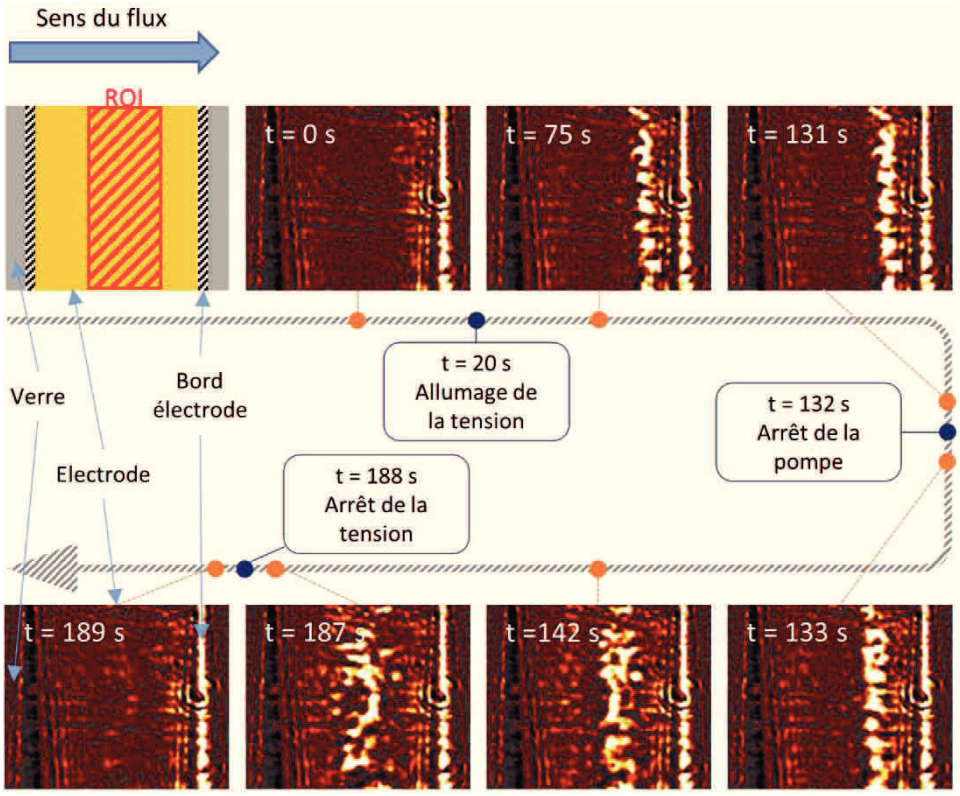


Figure 3.15 : Séquence d'images illustrant la dynamique de l'accumulation des billes sur une électrode lors de l'application d'une tension (2 kHz, 20 Vpp) sur une solution de billes 200 nm diluée 1000 fois et injectée à un débit de 30 µl/min.

Lorsque la tension est appliquée, on voit tout d'abord une bande de billes se former contre le bord droit de l'électrode. Contrairement à la situation rencontrée précédemment où les principales forces s'exerçant sur les billes sont au nombre de deux – la force DEP $\overrightarrow{F_{DEP}}$ et la force de traînée du flux induit par ACEO $\overrightarrow{F_{ACEO}}$ – ici il faut en ajouter une troisième : la force de traînée induite par le flux entrant dans la cuve, $\overrightarrow{F_{Flux}}$. Cette force est toujours dans la même direction, contrairement à la résultante des deux autres forces qui, dans le référentiel d'une électrode, est symétrique et dirigée vers le centre de celle-ci.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Ainsi, du côté gauche de l'électrode, la résultante des forces s'exerçant sur une bille, $\overrightarrow{F_{tot}}$ est toujours non nulle et dirigée vers la droite tandis que du côté droit, elle atteint une valeur nulle au point de formation de la bande de billes. La Figure 3.16 illustre de façon simplifiée ce mécanisme de part et d'autre de l'électrode. Cela montre qu'il est possible d'effectuer la capture des cibles sous flux, malgré la force de traînée induite par celui-ci. Notons que, même si les forces dues aux effets électrocinétiques avaient été plus faibles, on aurait pu arriver à la même conclusion simplement en imposant un débit assez faible, ce qui n'aurait pas été très intéressant : l'intérêt de ce résultat est que la vitesse de pompe utilisée ici est identique à celle couramment utilisée dans les expériences de biodétection réalisées sur le banc expérimental concerné. Le dispositif proposé est donc capable de capturer des cibles sous flux, et surtout dans les conditions expérimentales usuelles.

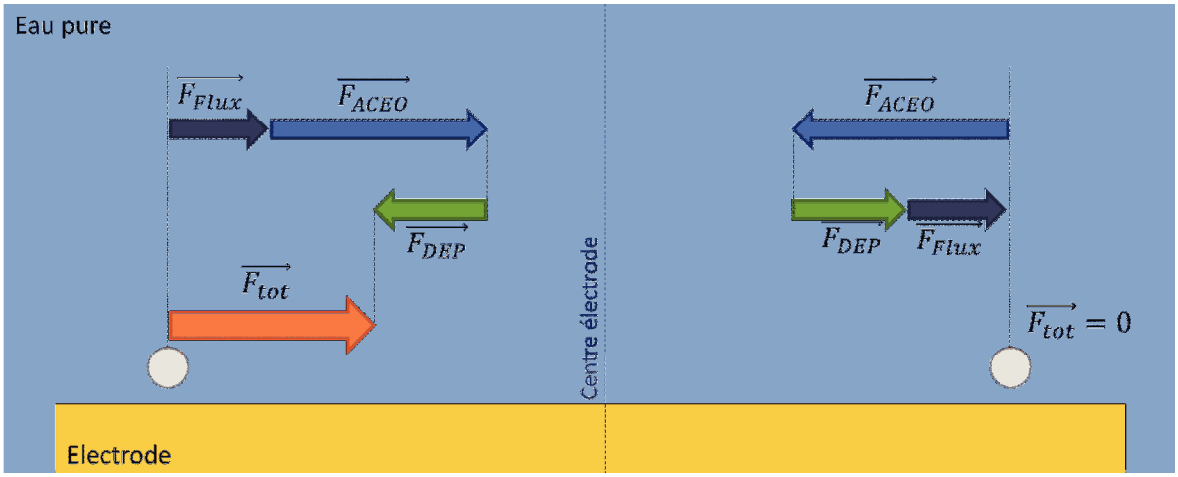


Figure 3.16 : Bilan des trois forces (diélectrophorèse, force de traînée induite par électroosmose, force de traînée induite par le flux entrant) s'exerçant sur une bille située de part et d'autres du centre d'une électrode, sous forme de schéma.

Dès que la pompe est arrêtée et donc que le flux entrant devient nul, le bilan des forces est à nouveau identique à celui présenté en partie 3.4 et la bande de billes qui s'était formée sur le bord droit se déplace vers le milieu de l'électrode. Simultanément, on discerne sur les images une deuxième bande de billes, beaucoup moins contrastée et venant du bord gauche (voir Figure 3.15, t = 142 s). Ainsi, il y a plus de billes au

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

centre de l'électrode après avoir coupé le débit que de billes sur le bord droit de celle-ci avant arrêt de la pompe : en plaçant notre ROI au centre de l'électrode (et pas sur le bord droit, là où se forme la bande de billes initialement), on espère donc maximiser la quantité de billes engendrant les variations de signal mesurées.

En mesurant le signal dans cette zone, l'expérience suivante a été menée pour comparer l'efficacité du capteur utilisé dans un fluide « au repos » et « sous flux » :

(1) Le débit est coupé après injection de la solution de billes diluée 1000 fois dans la cuve.

(2) La tension sinusoïdale (2 kHz, 20 Vpp) est appliquée entre les électrodes.

(3) La tension est coupée et pompe allumée, résultant en un débit de 60 µl/min.

(4) La tension (identique) est appliquée de nouveau, sous flux.

(5) La pompe est coupée, le débit devient nul.

(6) La tension est coupée.

(7) La pompe est rallumée.

Les variations de réflectivité mesurées sur une ROI centrale (identifiée en Figure 3.15) correspondant à ces différentes étapes sont données en Figure 3.17.

On remarque que, sous flux (après l'étape (3)), la mise sous tension des électrodes ((4)) provoque d'abord une légère augmentation du signal, due au fait que la ROI choisie comprend une partie de la bande de billes formée sur le bord droit. Dès l'arrêt de la pompe (qui provoque le déplacement des billes vers le centre de l'électrode), le signal mesuré sur la ROI augmente drastiquement, ce qui aboutit à une variation de réflectivité approximativement trois fois plus grande que celle observée lors de l'utilisation du capteur « au repos ».

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Ainsi, la stratégie consistant à actionner notre dispositif sous flux montre son efficacité, en augmentant le nombre d'objets capturés et donc en augmentant la variation de signal mesurée, ce qui devrait permettre de repousser encore plus la limite de détection.

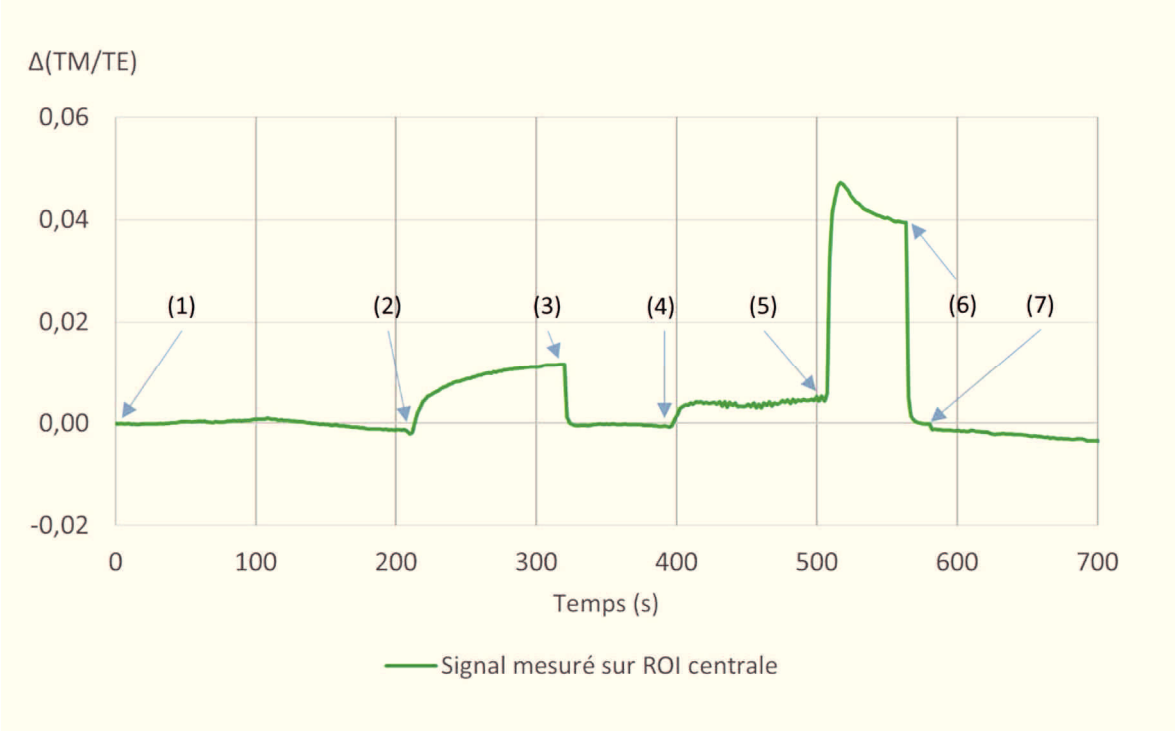


Figure 3.17 : Variations de réflectivité mesurées sur une ROI centrale sur une électrode lors de tentatives de capture de billes sans flux et sous flux.

3.5.3 Comparaison des limites de détection sous flux

Pour vérifier ceci, l'expérience servant à l'étude de la limite de détection « au repos » a été réitérée en adaptant le protocole :

(1) La solution est injectée à un débit de 60 µl/min

(2) La tension sinusoïdale (2 kHz, 20 Vpp) est imposée sur les électrodes

(3) 2 minutes après, la pompe est arrêtée

(4) 1 minute après, la tension est coupée et la solution suivante est injectée

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Différentes dilutions (correspondant à des facteurs de dilution de 3 000, 10 000, 30 000, 100 000, 300 000 et 1 000 000) ont été réalisées. De la même manière que pour l'expérience précédente, le bruit blanc du signal SPR a été évalué séparément sur chaque électrode, sur les mêmes ROIs que celles utilisées pour la mesure, et le seuil de détection en a été déduit. Chaque point de mesure correspond à la variation de réflectivité mesurée entre le moment où les billes sont accumulées au centre et le moment précédant la mise sous tension des électrodes.

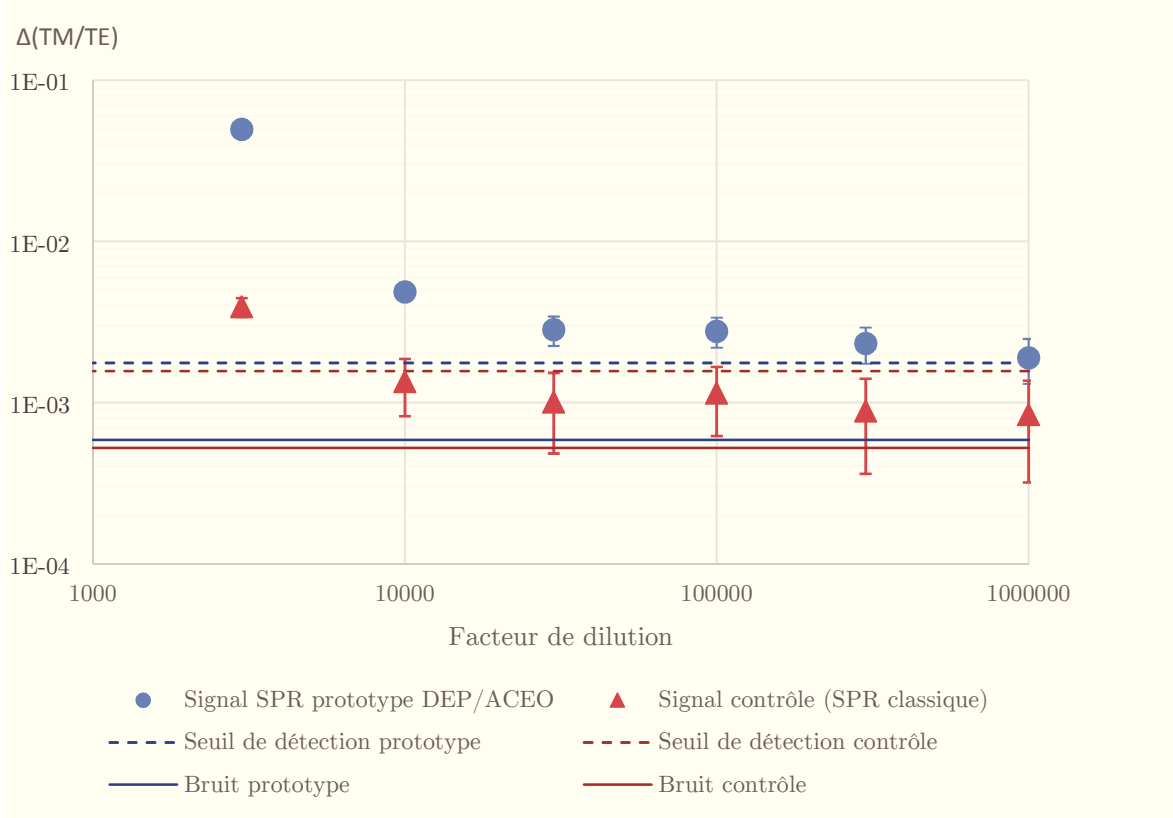


Figure 3.18 : Variations de signal mesurées pour les différentes solutions diluées. Le seuil de détection d'un capteur SPR classique est ajouté en pointillés.

Les variations de signal mesurées pour chaque dilution sont données en Figure 3.18, permettant ainsi la comparaison entre notre dispositif et un capteur plasmonique classique (or plan). Pour ce dernier, toutes les solutions diluées plus de 3 000 fois génèrent une variation de signal inférieure au seuil de détection, tandis que notre

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

dispositif détecte une variation de signal significative pour toutes les solutions, même la plus diluée. Notons que la performance de cet échantillon est moindre que celle observée précédemment, puisque l'électrode de contrôlé parvenait alors à détecter une solution de billes diluée 10 000 fois. Une explication possible à cette différence est le fait que les dépôts de métaux ont été réalisés séparément : l'état de surface des deux échantillons pourrait donc être différent, résultant en un capteur plus « bruité » que l'autre. Néanmoins, ces résultats expérimentaux, répétés à plusieurs reprises, montrent l'amélioration de la limite de détection par un facteur supérieur à 100.

3.6 Conclusion

Les travaux et résultats présentés ont permis de démontrer les capacités de piégeage de notre dispositif dans le cas d'objets modèles : des billes de polystyrène de 200 nm et 1 µm de diamètre en solution aqueuse. Les mécanismes à l'œuvre durant ce transfert de masse ont été compris et explicités théoriquement en très bonne cohérence avec les données expérimentales. La pertinence de l'imagerie SPR pour l'étude des effets électrocinétiques à proximité des électrodes a par ailleurs été soulignée. Enfin, nous avons montré que notre dispositif atteignait son objectif initial qui était de surmonter la limite de diffusion en effectuant du transport de masse actif : la limite de détection est améliorée d'un facteur supérieur à 100.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

CHAPITRE 4 : APPLICATION AUX OBJETS BIOLOGIQUES

Nous avons montré l'efficacité de notre dispositif en considérant un système donné : une solution de nanobilles de polystyrène dans de l'eau pure. Ce modèle nous a également permis de comprendre les phénomènes à l'œuvre et la façon dont ils agissent ensemble pour permettre le piégeage des objets sur le capteur présenté.

L'objectif de nos travaux étant de poser les bases pour la conception d'un biocapteur plasmonique actif et spécifique, donc capable de détecter des interactions biomoléculaires se produisant à sa surface, cette ultime partie s'attache à mettre en lumière les différentes problématiques qui peuvent être rencontrées lors du développement d'un tel capteur.

Ainsi nous verrons que les caractéristiques intrinsèques aux objets biologiques étudiés mais aussi les contraintes sur le milieu d'étude liées aux interactions biomoléculaires analysées sont autant de facteurs à prendre compte dans l'optimisation et l'évolution future de ce genre de dispositifs. Nous présenterons aussi les pistes qui semblent être les axes de réflexion à privilégier dans l'élaboration d'un biocapteur plasmonique actif et spécifique fonctionnel.

4.1 Un objet modèle : les levures

Pour mieux appréhender les problématiques impliquées par l'utilisation de notre dispositif à des fins de biodétection, nous présentons ici les résultats expérimentaux de l'application du capteur décrit précédemment à différents objets biologiques.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

La levure de boulanger (Saccharomyces cerevisiae), de par sa facilité d'acquisition, de culture et de conservation (sous forme lyophilisée notamment), est utilisée comme objet modèle dans de nombreux travaux de recherche touchant de près ou de loin à la biologie. Nous avons conduit des tests avec de la levure de boulanger Vahiné^{TM} : celle-ci a l'avantage de ne contenir que des levures et pas d'émulsifiant, et donc de limiter, au sein des solutions analysées, la présence de substances supplémentaires qui pourraient perturber les mesures.

4.1.1 Analyse des images SPR de levures soumises à un champ électrique alternatif

Les levures sont diluées dans de l'eau pure tiède (30°C) à une concentration de 1 mg/mL. Elles sont injectées dans la cuve fluidique à t = 0 s. Au bout de deux minutes le flux est coupé, puis après un temps de repos de 10 s une tension sinusoïdale (5 kHz, 20 Vpp) est appliquée aux bornes des électrodes.

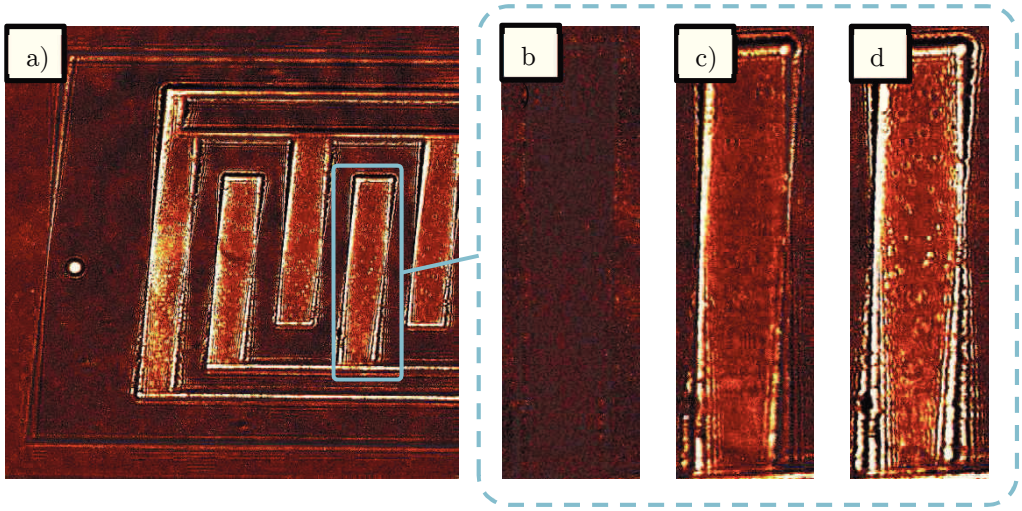


Figure 4.1 : Images SPR acquises en présence d'une solution aqueuse contenant des levures sur les électrodes. a) Image de la puce après injection des levures et application de la tension, accompagnée d'agrandissements de l'électrode encadrée en bleu : b) Avant injection (t = -1 s) c) Après injection mais avant application de la tension (t = 2 min 9 s) d) Après application de la tension (t = 3 min).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Les résultats sont présentés sur la Figure 4.1 : en comparant d'abord les agrandissements b) et c) on observe une variation de signal pendant l'injection. Celle-ci est uniforme et semble principalement due à un changement d'indice global qui pourrait être provoqué par le relâchement d'espèces par les levures dans l'eau. En effet, si cette variation était imputable aux levures elles-mêmes, on pourrait les distinguer individuellement comme sur l'agrandissement d).

Après application de la tension, on observe les levures se déposer individuellement sur la surface des électrodes polarisées (Figure 4.1 d)). À contrario, aucun objet ne devient visible sur l'électrode de référence (Figure 4.1 a)), ce qui montre que c'est bien la présence du champ électrique qui permet d'attirer les levures sur les électrodes. Par ailleurs, en observant les images en temps réel on peut distinguer un mouvement de certaines d'entre elles vers les bords. L'apparition d'irrégularités circulaires sur ces mêmes bords indique la possible présence d'un grand nombre de levures à cet endroit.

Pour confirmer cette hypothèse, des observations en microscopie optique de l'action des effets électrocinétiques sur les levures ont été réalisées. Celles-ci révèlent (Figure 4.2) que la plupart des levures sont effectivement attirées vers les bords des électrodes, formant des amas de cellules irréguliers. A la lumière des mécanismes expliqués dans les chapitres précédents, cela semble indiquer que la DEP positive est largement prédominante par rapport à la force exercée par le flux électroosmotique sur les levures.

On observe cependant toujours quelques levures qui restent sur la surface des électrodes sans se diriger vers les bords : ce sont selon toute vraisemblance les mêmes que l'on peut observer en SPRI. Une explication possible est la présence de défauts à la surface de l'or qui créent des variations locales du champ électrique et piègent donc par diélectrophorèse les cellules qui passent dans leur voisinage [99,100]. Cela expliquerait aussi pourquoi on n'observe pas ces levures « solitaires » au-dessus des zones en verre puisqu'une aspérité du verre n'induit pas de gradient de champ

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

électrique. L'adsorption n'est pas en cause car lorsque l'on coupe la tension elles disparaissent des images SPR, ce qui signifie qu'elles perdent contact avec la surface.

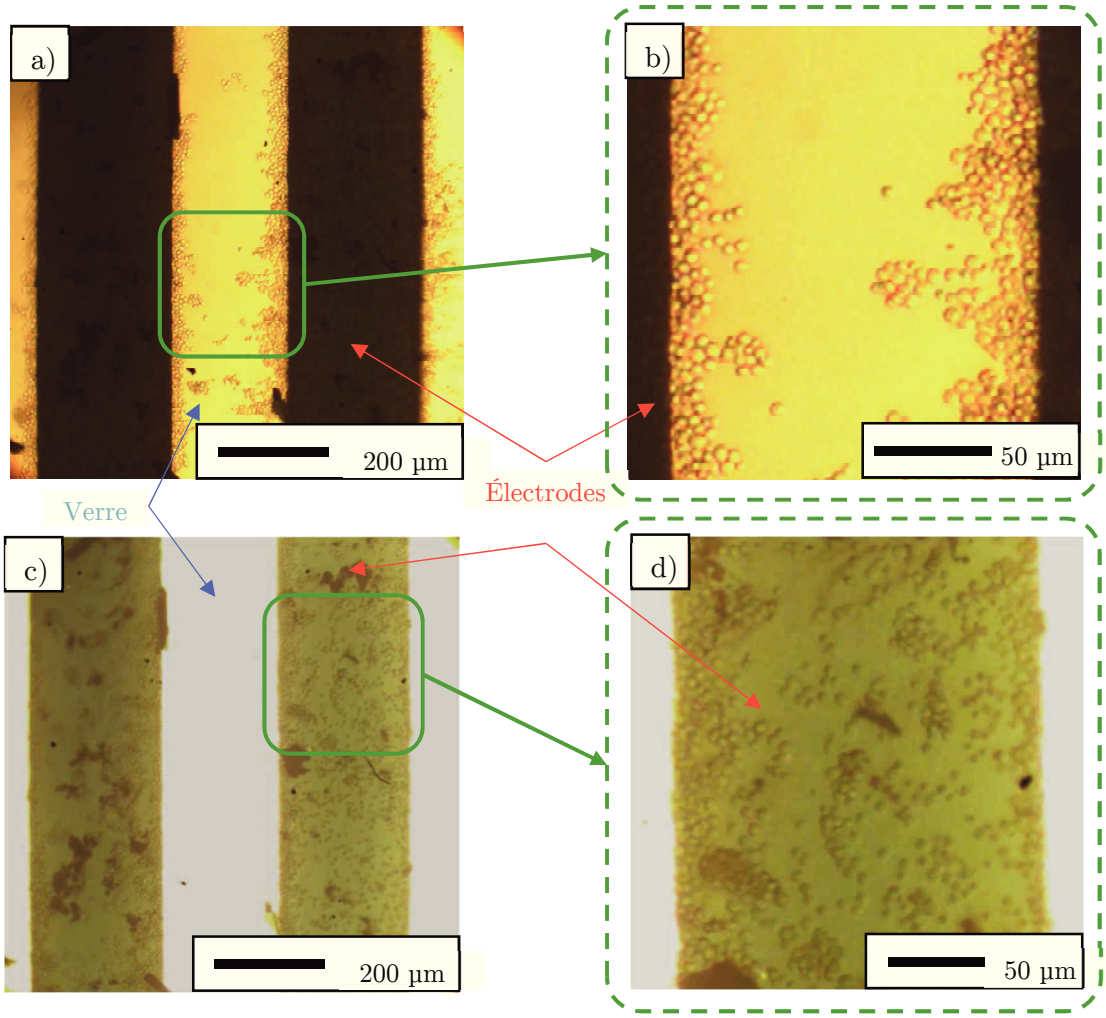


Figure 4.2 : a) Observation en microscopie optique lors de l'application des effets électrocinétiques sur une solution d'eau pure contenant des levures. c) Même image mais avec l'éclairage du microscope augmenté pour distinguer les objets présents sur les électrodes. b) et d) Agrandissements respectifs des zones encadrées sur les images a) et c).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

4.1.2 Interprétation de l'accumulation des levures sur les bords

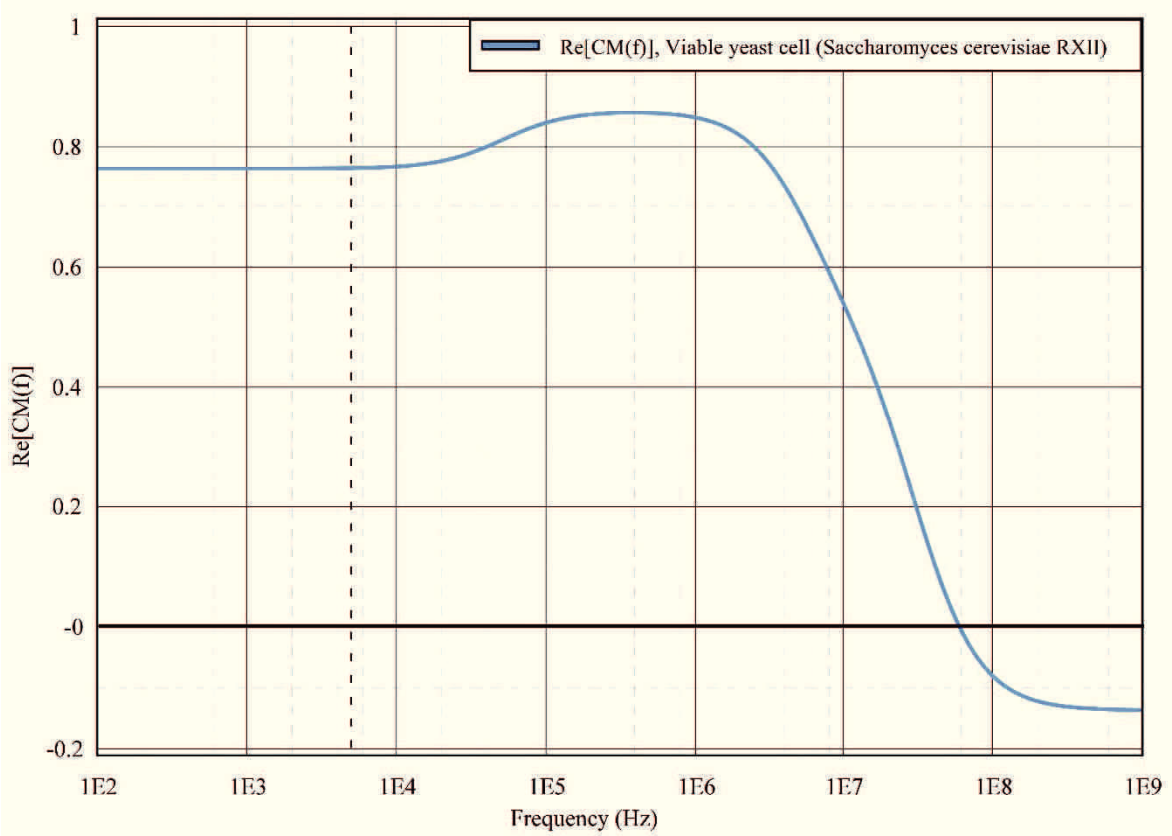


Figure 4.3 : Évolution de la partie réelle du facteur Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence. Curseur à 5 kHz, la fréquence utilisée pour attirer les levures sur les électrodes.

Pour comprendre pourquoi les levures s'accumulent en priorité autour des arêtes des électrodes, le modèle COMSOL présenté au Chapitre 2 a été repris et adapté aux cellules considérées. La partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti a été calculée à l'aide du logiciel MyDEP et vaut 0.76 à la fréquence considérée (voir Figure 4.3). Un rayon de 2.5 µm a été choisi pour les levures. Les paramètres expérimentaux ont été repris dans les calculs : tension sinusoïdale de 20 Vpp, 5 kHz, et conductivité de l'eau à $5.5*10^{-6}$ S/m. Le modèle comprend plusieurs électrodes de polarisations successives opposées (comme au Chapitre 2) mais les résultats présentés sont centrés sur une électrode à + 10V.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

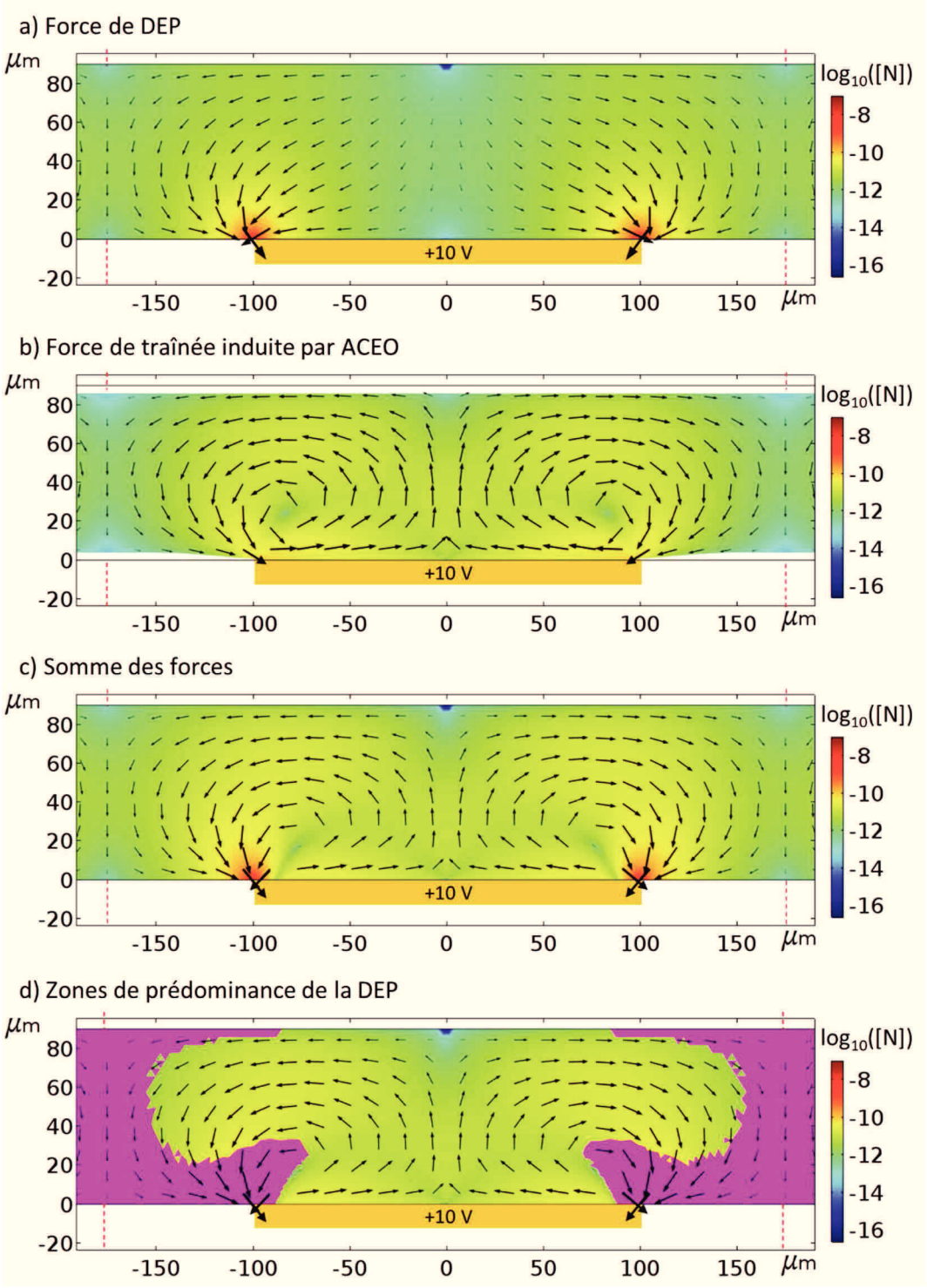


Figure 4.4 : Résultats des simulations COMSOL montrant les forces engendrées par l'application d'une tension sinusoïdale (20 Vpp, 5 kHz) sur une solution de levures dans de l'eau pure. L'électrode est représentée par le rectangle couleur or, les centres des gaps (axes de symétrie en pointillés rouges) se situent à -175 µm et 175 µm sur l'axe horizontal. a) Champ de force de DEP, échelle logarithmique. b) Champ de force de traînée induite par le flux électroosmotique, échelle logarithmique. c) Somme des champs de force engendrés par DEP et ACEO, échelle logarithmique. d) Même résultat que c), mais les régions où la force de DEP est supérieure à la force de traînée ont été mises en évidence (magenta).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Les résultats de simulation montrent tout d'abord que dans les conditions de l'expérience, les levures sont soumises à la diélectrophorèse positive (comme l'indiquait la partie réelle positive du facteur de Clausius-Mossotti) qui tend à les diriger vers les arêtes des électrodes (Figure 4.4a). Le champ de vitesse induit par électroosmose est inchangé par rapport à celui calculé en partie 2, puisque le milieu (eau pure) est le même (Figure 4.4b)).

Le calcul de la somme des forces (Figure 4.4c)) montre donc la présence de vortex dans la solution et indique la présence de « points chauds » sur les arêtes des électrodes, comme pour le système billes/eau. On observe en outre que la force de DEP prédomine surtout dans la région inter-électrodes (Figure 4.4d)). Cela pourrait aussi expliquer pourquoi les levures au-dessus du verre sont toutes attirées par les arêtes tandis que, parmi celles présentes au-dessus des électrodes, certaines sont moins soumises à l'action de la DEP.

Ces résultats constituent ainsi un premier exemple d'application de notre stratégie à un objet biologique, confirmant que les levures peuvent bien être attirées par les effets électrocinétiques vers les électrodes tout en étant observables en imagerie SPR. Cependant, celles-ci s'accumulent en grande partie vers les bords, vraisemblablement à cause d'une force diélectrophorétique bien supérieure à la force de traînée exercée par le flux électroosmotique.

De ce fait, avec cette configuration d'électrodes, l'imagerie SPR permet de deviner les levures sous forme de points, ce qui est suffisant pour étudier certaines de leurs propriétés [101,102]. Cela dit, la majorité des levures attirées se concentre sur les bords des électrodes, ce qui n'est pas optimal pour leur observation et pose une question plus large : comment adapter le design des électrodes pour que les objets ciblés soient bien ramenés sur l'or, même lorsqu'ils sont soumis à une force de DEP dominante par rapport à l'ACEO ? D'autres recherches menées dans le groupe, notamment sur des

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

configurations d'électrode *top-bottom* (travaux de Marion Costella, soumis pour publication) ou encore sur la nanostructuration des substrats [34] (donc sur la formation d'électrodes aux dimensions largement inférieures à celles des levures), pourraient apporter des réponses satisfaisantes.

4.2 Application à des protéines : BSA

4.2.1 Protocole expérimental et résultats

Si les levures peuvent être concentrées efficacement par notre dispositif, il n'en reste pas moins qu'elles constituent de gros objets au regard de nombre d'espèces biologiques. Nous avons donc testé les performances de notre capteur sur des molécules plus petites : l'albumine de sérum bovin (BSA). Cette protéine est très utilisée notamment dans les procédés de fonctionnalisation de surface, pour limiter l'adsorption non spécifique. Ainsi, être capable de manipuler la BSA pourrait permettre à terme de faire de la fonctionnalisation de surface localisée.

Une solution de BSA dans de l'eau pure à une concentration de 20 µg/mL (soit 50 fois moins concentrée que la solution utilisée dans le protocole de fonctionnalisation ADN) a tout d'abord été réalisée. De l'eau pure est initialement mise en circulation dans la cellule fluidique pour fournir une ligne de base stable au signal SPR mesuré. La BSA s'adsorbe très facilement sur l'or : l'expérience ne peut donc être menée selon le même protocole que pour les billes et levures, qui se désorbent de la surface d'or dès l'interruption de la tension. Par conséquent, il faut réaliser l'injection de la solution d'analytes directement sous tension.

Le débit est réglé sur un niveau faible (15 µL/min) pour limiter l'influence des mécanismes fluidiques inhérents au circuit et avoir le milieu le plus homogène possible au-dessus du capteur, étant donné qu'aucune période de relaxation ne peut être donnée

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

au fluide dans notre cas. La tension imposée est de 1 kHz et 10 Vpp. Celle-ci est appliquée avant même l'injection de la BSA, donc dans l'eau pure, toujours afin de vérifier que cela n'a pas d'influence sur la mesure SPR.

La variation de signal mesurée sur les électrodes 15 minutes après le début d'injection de la dilution de BSA est très supérieure à celle mesurée sur l'électrode de contrôle : au moins deux fois plus grande (voir Figure 4.5). Rappelons que, comme précisé au Chapitre 2, le sens du flux fait que la solution est analysée par l'électrode de contrôle avant d'arriver au-dessus des électrodes interdigitées. Ainsi, le « signal contrôle » mesuré n'est pas perturbé par les effets électrocinétiques et représente vraiment la cinétique d'adsorption de la BSA sur une lame d'or nue. De cette manière, l'efficacité de notre dispositif pour la capture de protéines à sa surface et son gain de performance par rapport à un capteur classique sont démontrés.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

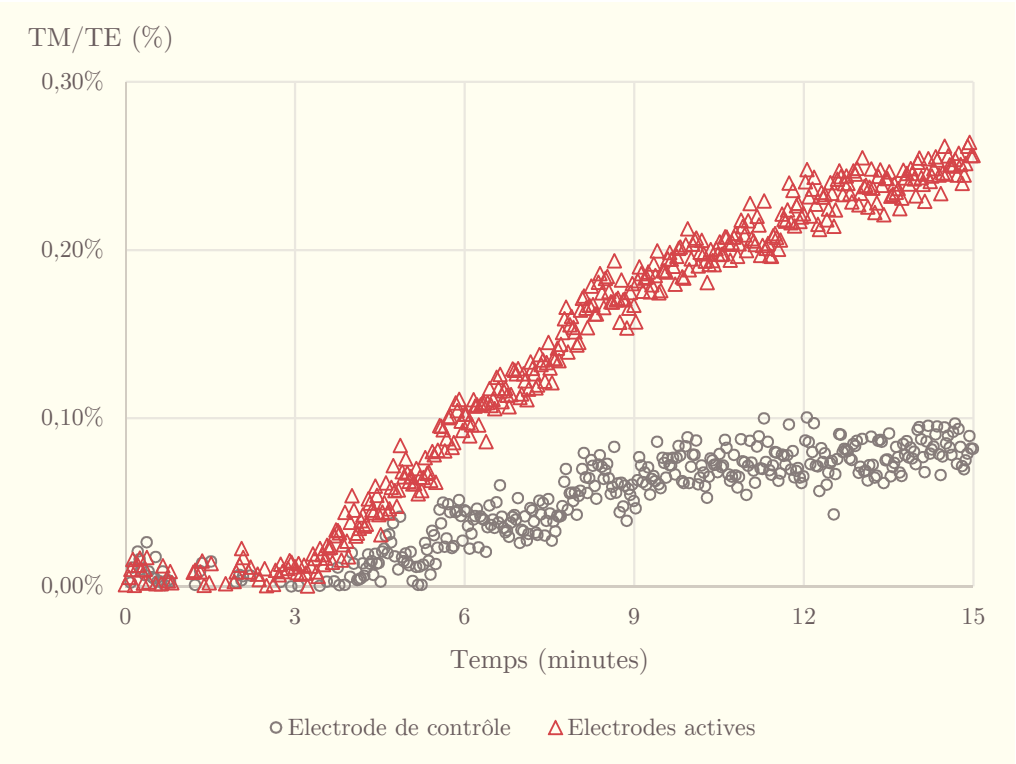


Figure 4.5 : Comparaison des signaux mesurés sur l'électrode de contrôle et les électrodes actives lors de l'injection de BSA concentrée à 20 µg/ml dans de l'eau, sous application d'une tension (1 kHz, 10 Vpp).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

4.2.2 Discussion sur le comportement du dispositif sur des objets biologiques de petite taille

Une différence remarquable avec les résultats présentés précédemment est le côté relativement homogène de l'adsorption de la BSA sur toute la largeur de l'électrode. En effet, contrairement aux billes de polystyrène qui forment des bandes au point d'équilibre DEP/ACEO, les protéines se déposent ici sur l'intégralité de la surface de détection (voir Figure 4.6) et semblent être moins sujettes à l'influence de la DEP.

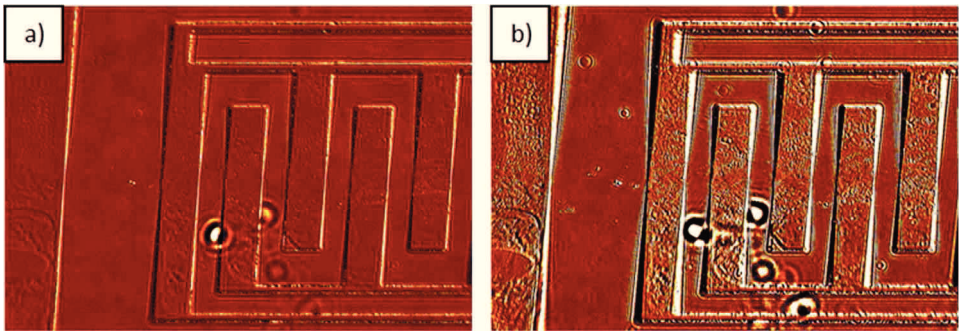


Figure 4.6 : Images SPR de la puce obtenues a) avant injection de la BSA b) 15 minutes après le début de l'injection.

Ainsi, le profil du signal mesuré sur une électrode après 20 minutes d'injection de BSA et application concomitante d'une tension (1 kHz, 10 Vpp) sur les électrodes reste relativement constant sur toute la largeur de l'électrode (voir Figure 4.7).

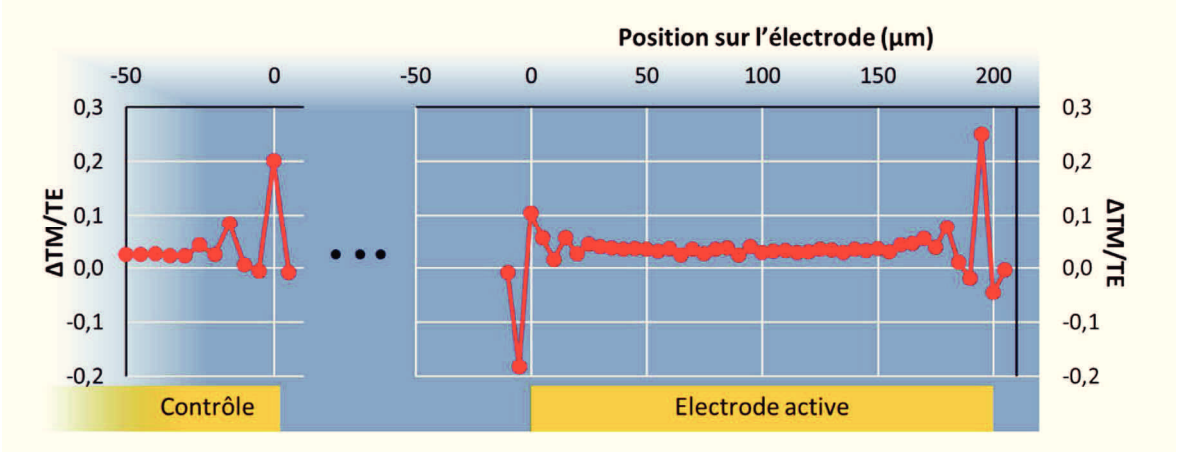


Figure 4.7 : Différence de signal observée sur les électrodes 15 minutes après l'injection de BSA concentrée à 20 µg/mL, sous l'action des effets électrocinétiques (10 Vpp, 1 kHz).

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Les variations importantes sont observables seulement sur les bords des structures : celles-ci semblent davantage correspondre à des produits des aberrations optiques causées par la transition or/verre plutôt qu'à la conséquence d'effets électrocinétiques. Deux raisons peuvent être invoquées pour ceci :

- Il y a bien une force de DEP positive ici puisque la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti $Re[f_{CM}]$ de la BSA est positive et égale à 1 à la fréquence considérée et dans l'eau pure [103]. Il pourrait donc y avoir un effet d'accumulation des protéines sur les bords des électrodes, mais si cela était le cas, alors la variation de signal serait symétrique sur les bords gauche et droit de l'électrode représentée sur la Figure 4.4.
- Le rapport (signal max sur le bord)/(signal moyen au centre) est le même pour l'électrode de référence (7.37), qui n'induit pas de DEP, et pour l'électrode active (7.32) donc l'électrode active ne semble pas attirer plus de protéines sur ses arêtes que l'électrode de contrôle, qui n'en attire pas en théorie.

En rapportant la molécule de BSA à une sphère en première approximation, la force DEP qui s'exerce sur celle-ci s'exprime :

$$< \overrightarrow{F_{DEP}} > = 2\pi\varepsilon_m r_{BSA}^3 Re[f_{CM}]\nabla E_{eff}^2 \qquad \textbf{Équation 4.1}$$

En considérant un rayon de 3.5 nm pour la BSA [104], contre 100 nm pour les billes de polystyrène présentées au Chapitre 3, la force diélectrophorétique s'exerçant sur les protéines serait donc plus de 10^4 fois moins forte que celle s'exerçant sur les billes.

Le flux induit par électroosmose, lui, reste inchangé puisque la conductivité de la solution de BSA diluée dans de l'eau pure a été mesurée à $15*10^{-4}$ S/m, une valeur très proche de celle de la solution de billes ($4*10^{-4}$ S/m). Cependant, la force de traînée exercée par ce flux étant proportionnelle au carré du rayon de l'objet considéré, celle-ci est approximativement 10^3 fois moins forte que dans le cas des billes de 200 nm, ce

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

qui par ailleurs explique la lenteur de la cinétique par comparaison au cas des billes (pour lesquelles la collecte est quasi-instantanée).

Les deux effets électrocinétiques considérés sont donc moins forts dans ce cas que dans celui des billes, cependant l'influence de l'électroosmose diminue moins que celle de la diélectrophorèse. Par conséquent, l'action de mélange (électroosmose) et donc de balayage de la surface de détection est plus forte que celle de piégeage localisé (diélectrophorèse). Ainsi, l'électroosmose est l'effet électrocinétique prédominant pour ce système BSA/eau. Les vortex fluidiques entraînent le mélange de la solution dans tout le volume et empêchent la BSA de rester au niveau des arêtes métalliques, ce qui se traduit par un recouvrement plus homogène de l'électrode par les protéines [105].

Les résultats présentés montrent que le dispositif étudié est à même d'améliorer la détection de protéines, ici des molécules de BSA dans de l'eau pure. En complément aux travaux décrits plus haut sur les levures, c'est la preuve que notre capteur est adapté à la collecte et la détection d'objets biologiques de constitution et de taille variées même si des différences de comportement, liées à la nature et à la taille des espèces étudiées, sont à anticiper.

4.3 Utilisation en tant que biocapteur spécifique : le cas de l'hybridation ADN/ADN

Les capteurs SPR sont particulièrement intéressants pour l'analyse d'interactions biomoléculaires. Nous avons donc cherché à évaluer la compatibilité de notre dispositif avec un protocole de biodétection qui soit spécifique. L'hybridation de séquences ADN complémentaires, avec toutes les contraintes qu'elle implique (fonctionnalisation de surface, composition du milieu de suspension compatible avec l'hybridation), est un cas d'application pertinent pour cela.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

4.3.1 Protocole : fonctionnalisation de surface

Pour rendre le capteur spécifique, il faut en fonctionnaliser la surface, c'est-à-dire accrocher les séquences d'ADN sondes sur les électrodes d'or. Les brins cibles et sondes utilisés font respectivement 25 bp et 37 bp et leur séquence est rappelée dans le Tableau 4.1. Le protocole de fonctionnalisation de surface utilisé pour immobiliser les sondes sur l'or a été détaillé au Chapitre 2.

A la fin de celui-ci, les sondes d'ADN biotinylées sont « spottées » (i.e. déposées sous forme de plots) sur l'échantillon. L'échantillon ainsi préparé permet aux séquences d'ADN cibles présentes dans le liquide injecté de s'hybrider avec les séquences sonde accrochées à la surface de l'or. La surface fonctionnalisée peut être régénérée par injection d'eau pure, qui provoque la déshybridation des brins d'ADN cibles.

Brin	Séquence
ADN sonde	5'-**ATTAGTAGTAATCTT**GCGTATGGCCAGTTTTTTTTTT-3'-Biotine
ADN cible	5'-AGTG**AAGATTACTACTAAT**ACCCTC-3'

Tableau 4.1 : Résumé des séquences ADN utilisées pour l'expérience d'hybridation. La zone de complémentarité est en gras.

4.3.2 Évaluation des performances pour l'hybridation ADN/ADN

4.3.2.1 Contrôle de la réaction d'hybridation

Une expérience modèle d'hybridation ADN/ADN a été menée sur un échantillon sans la présence de connexions électriques (une surface d'or plane), pour vérifier que la surface fonctionnalisée obtenue permet bien la détection de la réaction d'hybridation.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Le capteur est fonctionnalisé selon le procédé décrit plus haut, et « spotté » avec des brins d'ADN complémentaires des cibles d'une part, et des brins non complémentaires d'autre part (voir Figure 4.8). Il est mis en place sur le banc expérimental comme lors des manipulations décrites plus haut, puis du PBS 2X est mis en circulation dans la cuve fluidique. La solution contenant les brins d'ADN cibles (solution concentrée à 200 nM dans du PBS 2X) est ensuite injectée. La température de fusion des oligonucléotides correspondant aux séquences complémentaires des brins utilisés dans du PBS 2X a été estimée à 39.91 °C par la méthode des plus proches voisins.

Cette manipulation de contrôle permet de vérifier que le protocole de fonctionnalisation de surface est efficace : comme on peut le voir sur la Figure 4.8, seuls les plots contenant des brins complémentaires de l'ADN « s'allument » sur les images, SPR, ce qui signifie que l'indice optique a été localement modifié et donc qu'il y a eu hybridation entre deux brins cible et sonde. La cinétique d'hybridation est observable en temps réel via la mesure du signal SPR (Figure 4.9).

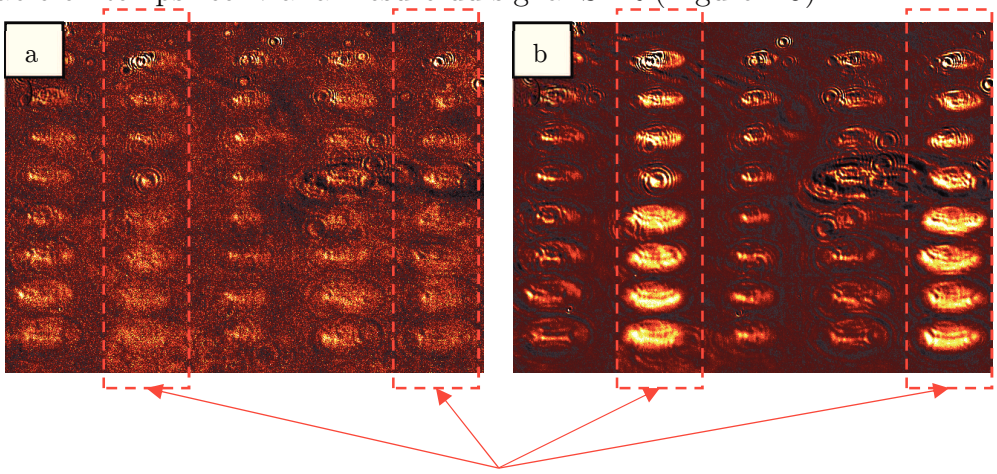


Figure 4.8 : Images obtenues par SPR d'un capteur fonctionnalisé et spotté a) avant injection de l'ADN cible et b) 12 min après injection de l'ADN cible.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

4.3.2.2 Evaluation de l'efficacité des effets électrocinétiques

Pour juger de l'efficacité des effets électrocinétiques, une expérience d'hybridation a été conduite sur le capteur SPR actif présenté en partie 3, fonctionnalisé comme décrit ci-dessus. L'ADN est dilué dans du PBS 0.1X : cela n'empêche pas l'hybridation ADN/ADN (la température de fusion estimée est de 26.07 °C dans ce cas) et rend possible l'utilisation des effets DEP et ACEO.

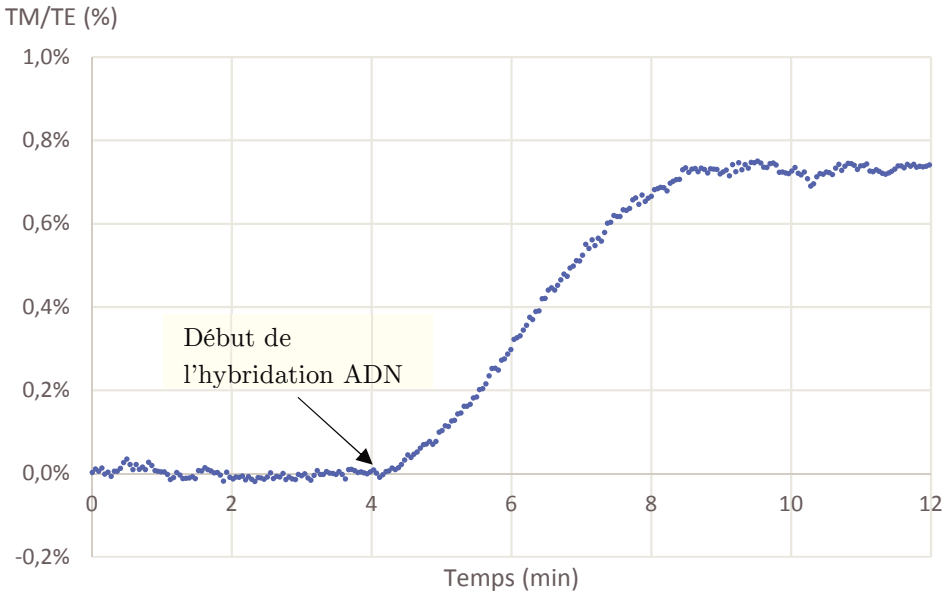


Figure 4.9 : Signal SPR mesuré sur les plots complémentaires lors de l'injection d'ADN à t = 0 min.

Dans notre cas, la faible concentration ionique du PBS 0.1X (conductivité de 0.1 S/m) en regard du PBS 2X (conductivité de 2 S/m) rend l'hybridation moins stable : ainsi la variation de signal (0.5 %) mesurée 5 minutes après le début de la réaction (Figure 4.10) est inférieure à celle observée dans le cas du PBS 2X (0.7 %). On peut également remarquer sur l'exemple donné en Figure 4.10 la régénération de la surface lorsqu'on injecte de l'eau pure : ce changement de milieu provoque la déshybridation des brins et le retour du signal à son niveau d'origine.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

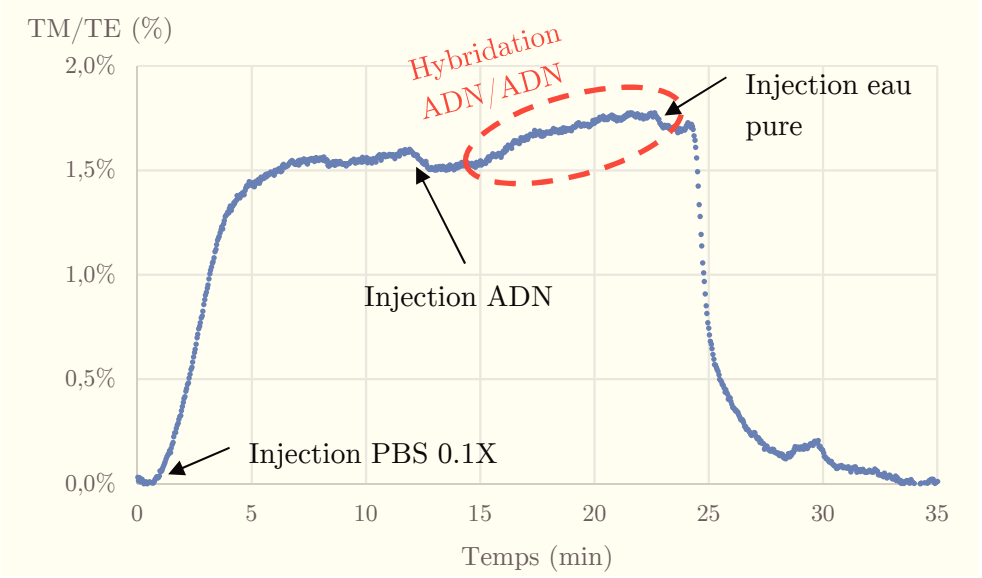


Figure 4.10 : Exemple de cinétique d'hybridation ADN/ADN dans du PBS 0.1X.

Pour juger de l'efficacité ou non de notre dispositif sur ce système, l'expérience est renouvelée mais l'injection est coupée vers le milieu de la cinétique d'hybridation et différentes tensions sont appliquées successivement sur les électrodes. Plusieurs fréquences échelonnées entre 500 Hz et 1 MHz ont été testées.

Aucune variation significative du signal n'est observable. Pour les fréquences comprises entre 10 et 20 kHz (voir le signal mesuré entre 15 et 20 min sur la Figure 4.11), la présence d'une légère augmentation (≈ 0,1 %) du signal mesuré sur l'électrode active conjointement à une diminution de celui mesuré sur l'électrode de contrôle pourrait indiquer l'existence de phénomènes électrocinétiques : le flux éventuellement induit par électroosmose pourrait créer une zone de déplétion au-dessus de l'électrode de contrôle tout en transportant les molécules d'ADN vers les électrodes actives. Cependant, une fois la tension coupée, le signal revient à son niveau d'origine, indiquant par là-même qu'il n'y a pas eu hybridation.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

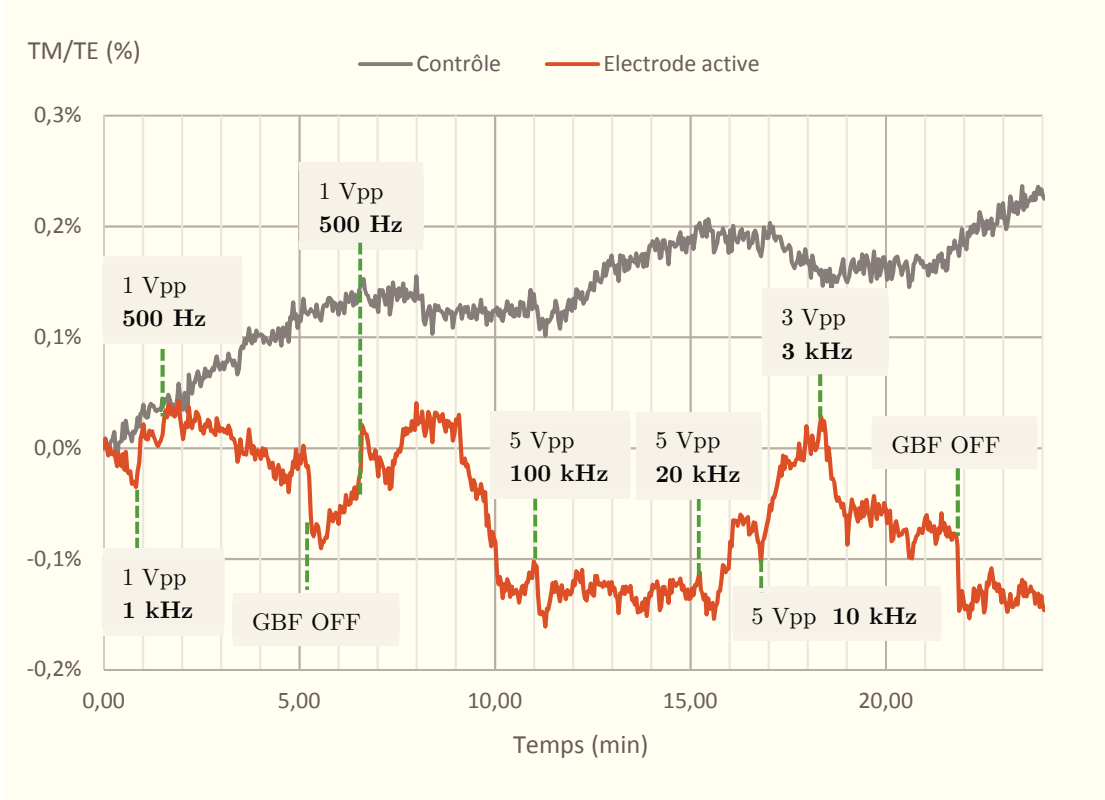


Figure 4.11 : Influence de l'application de tensions sur l'hybridation entre les cibles et les sondes ADN dans du PBS 0.1X : signal mesuré sur l'électrode de contrôle et les électrodes actives pendant l'application de différentes tensions électriques sur celles-ci.

Ainsi, il semblerait que notre dispositif n'est pas à même d'améliorer la détection de l'hybridation de séquences ADN en l'état. Aucune des fréquences utilisées n'a induit de changement significatif dans le signal mesuré, et l'amplitude applicable est limitée par le milieu conducteur qu'est le PBS : comme cela a été expliqué au début du Chapitre 3, une amplitude trop élevée mène instantanément à une modification irréversible de l'état de surface du capteur, qui rend ininterprétables les données collectées.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

4.3.3 Discussion sur les contraintes sur le milieu d'hybridation : l'influence de la conductivité

L'hybridation des brins d'ADN ne peut se faire dans l'eau pure : au contraire, ce milieu a l'effet inverse sur les molécules et régénère la surface fonctionnalisée en laissant les brins sondes libres, comme cela a été montré précédemment. Le milieu de suspension et ses propriétés de pH et de conduction sont primordiaux pour la bonne hybridation des brins complémentaires entre eux. Or, les solutions génériques utilisées pour ces expériences (PBS, SSC) sont des milieux extrêmement conducteurs.

L'augmentation de la conductivité du milieu a une conséquence sur tous les effets électrocinétiques utilisés :

- La différence de polarisabilité entre l'objet que l'on veut attirer et le milieu environnant est plus faible, ce qui diminue la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti et entraîne une diminution de la force de DEP.
- La vitesse électroosmotique évolue généralement à la baisse avec la conductivité d'après la littérature [85]. C'est d'autant plus dérangeant qu'on pouvait se passer de DEP puisque l'hybridation joue le rôle de mécanisme de piégeage, mais sans fonction de mélange notre dispositif est privé, en termes de volume, de la majorité de sa capacité de transport de masse.

À des fins de vérification, des expériences préliminaires ont toutefois été menées avec des solutions de billes PS de 200 nm diluées 10 000 fois, dans différentes concentrations décroissantes de PBS (0.1X, 0.05X, 0.01X, 0.005X). Dans les gammes de tensions (1 – 5 V) et de fréquences (1 kHz – 1 MHz) testées, les effets électrocinétiques et leurs conséquences (collection des billes sur les électrodes) ne furent observables que pour le milieu le moins salin, soit le PBS 0.005X qui, à cette dilution-là, a une conductivité (10^{-4} S/m) plus proche de celle de l'eau pure ($5.5*10^{-6}$

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

S/m) que de celle d'un milieu favorisant l'hybridation ADN/ADN ($2*10^{-2}$ S/m pour le PBS 1X).

Pour que notre capteur soit employable pour l'étude et l'analyse d'interactions biomoléculaires en milieu complexe, il faut donc que notre dispositif et/ou son mode d'utilisation soient modifiés de façon à pouvoir fonctionner dans des électrolytes à conductivité élevée.

La littérature rapporte quelque cas de manipulation de l'ADN par le biais d'effets électrocinétiques dans des milieux conducteurs comme le PBS ou le SSC. Les groupes de recherche à l'origine de ces travaux utilisent :

- Des tensions très élevées, allant jusqu'à plusieurs centaines de volts [106], trop élevées par rapport à ce que notre capteur peut supporter. Même pour piéger de très grosses molécules d'ADN (8,9 kbp), sur lesquelles la force DEP est pourtant plus grande, il faudrait des tensions de l'ordre de 150 Vpp, ce qui correspond à une force électrique de 10^6 V/m dans notre cas [107].
- Un offset sur la tension alternative appliquée [108] : l'utilisation d'une telle tension continue est incompatible avec notre dispositif en l'état.
- Une couche de protection sur les électrodes (gel d'agarose fonctionnalisé), permettant justement l'application de tensions élevées et/ou continues [109,110]. Malheureusement ces couches de protection ont une épaisseur trop grande (1 µm) pour permettre des mesures SPR, puisque l'onde évanescente du plasmon s'éteint quelques centaines de nanomètres au-dessus de la surface d'or. Notons toutefois l'intérêt et l'originalité de ces travaux qui parviennent à l'hybridation de molécules d'ADN et pas seulement à leur piégeage.
- Des nanoparticules fonctionnalisées avec de l'ADN [111,112] : de cette manière les objets à manipuler sont les nanoparticules et non plus les molécules d'ADN. Cette solution est intéressante puisqu'elle a aussi été employée jusqu'au stade

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

de l'hybridation et peut de plus être combinée avec les techniques de résonance de plasmon de surface localisée [113] mais dépasse le cadre de ce projet.

- Un électrolyte non usuel, fruit d'un compromis entre faible conductivité et stabilisation de l'hybridation ADN/ADN. L'électrolyte en question est une solution aqueuse de D-histidine et permet la manipulation des molécules d'ADN ainsi que leur hybridation sous champ électrique [114–116]. Nous avons mené quelques essais moyennement concluants avec cet électrolyte ; ceux-ci sont présentés en Annexe A.

Ainsi l'utilisation de la résonance de plasmon de surface comme technique de détection pose un double problème : d'une part la sensibilité à l'état de surface prohibe l'utilisation de tensions menant à l'oxydo-réduction de l'or, d'autre part la profondeur de pénétration de l'onde plasmonique empêche l'utilisation d'une couche de protection de notre surface. Dès lors, il est nécessaire de trouver d'autres solutions permettant l'utilisation d'un tel capteur dans des milieux complexes. Dans cette optique, la partie suivante s'attache à développer certaines des pistes explorées lors de nos travaux pour répondre à cette problématique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

4.4 Comment adapter le capteur aux milieux conducteurs ?

4.4.1 Choisir un mode opératoire différent : comment adapter la fréquence pour induire un brassage électroosmotique dans des milieux conducteurs ?

4.4.1.1 Calcul de la vitesse électroosmotique en fonction de la conductivité

Dans le cas de l'hybridation ADN/ADN, l'électroosmose est le plus important des effets électrocinétiques mis en œuvre par notre dispositif. En effet, l'hybridation produit déjà un effet de piégeage qui s'ajoute à celui de la DEP ; c'est plutôt le mélange du fluide induit par le flux électroosmotique qui va permettre d'amener plus vite les brins cibles vers les brins sondes et donc d'améliorer la cinétique de détection.

Dès lors, est-il possible d'utiliser l'électroosmose et son effet de « brassage » du liquide lorsque celui-ci a une conductivité élevée ? L'objectif de cette partie est de comprendre comment la vitesse électroosmotique évolue en fonction de la fréquence et de la conductivité. Rappelons que la vitesse électroosmotique à l'interface solide/liquide s'exprime ainsi :

$$< V_{ACEO} > \; = \; \frac{\varepsilon_m \varphi_0^2 \Omega^2}{8\eta d(1+\Omega^2)^2} \qquad \textbf{Équation 4.2}$$

où ε est la permittivité diélectrique du milieu, φ_0 le potentiel appliqué, η la viscosité dynamique, d la distance du point considéré par rapport au centre du gap inter-électrodes et est Ω une pulsation qui s'écrit :

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

$$\Omega = \frac{1}{2}\pi\kappa d\frac{\varepsilon_m}{\sigma_m}\omega \qquad \textbf{Équation 4.3}$$

où σ_m est la conductivité du milieu, ω la pulsation de la tension appliquée sur les électrodes, et κ est l'inverse de la longueur de Debye, calculée, pour un électrolyte monovalent, de la façon suivante :

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{\varepsilon_m k_B T}{2N_A e^2 I}} \qquad \textbf{Équation 4.4}$$

où e est la charge élémentaire et I la force ionique de la solution. L'augmentation de la conductivité signifie généralement une augmentation de la force ionique et donc une diminution de la longueur de Debye. Il est possible, en première approximation [117,118], de relier linéairement la conductivité C et la force ionique I via l'expression

$$I\ (mol/m^3) = 1.6 * 10^{-2} * C\ (\mu S/cm) \qquad \textbf{Équation 4.5}$$

En remontant les équations ci-dessus, on peut donc obtenir l'allure de V_{ACEO} en fonction de la conductivité C (voir Figure 4.12). On observe ainsi que la gamme de fréquences pour laquelle il y a mélange électroosmotique augmente avec la conductivité. Notons par ailleurs que la largeur du pic de vitesse électroosmotique n'est pas aussi constante que ce que pourrait faire croire l'échelle logarithmique appliquée aux deux axes horizontaux : plus la conductivité augmente et plus le pic de vitesse s'aplatit.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

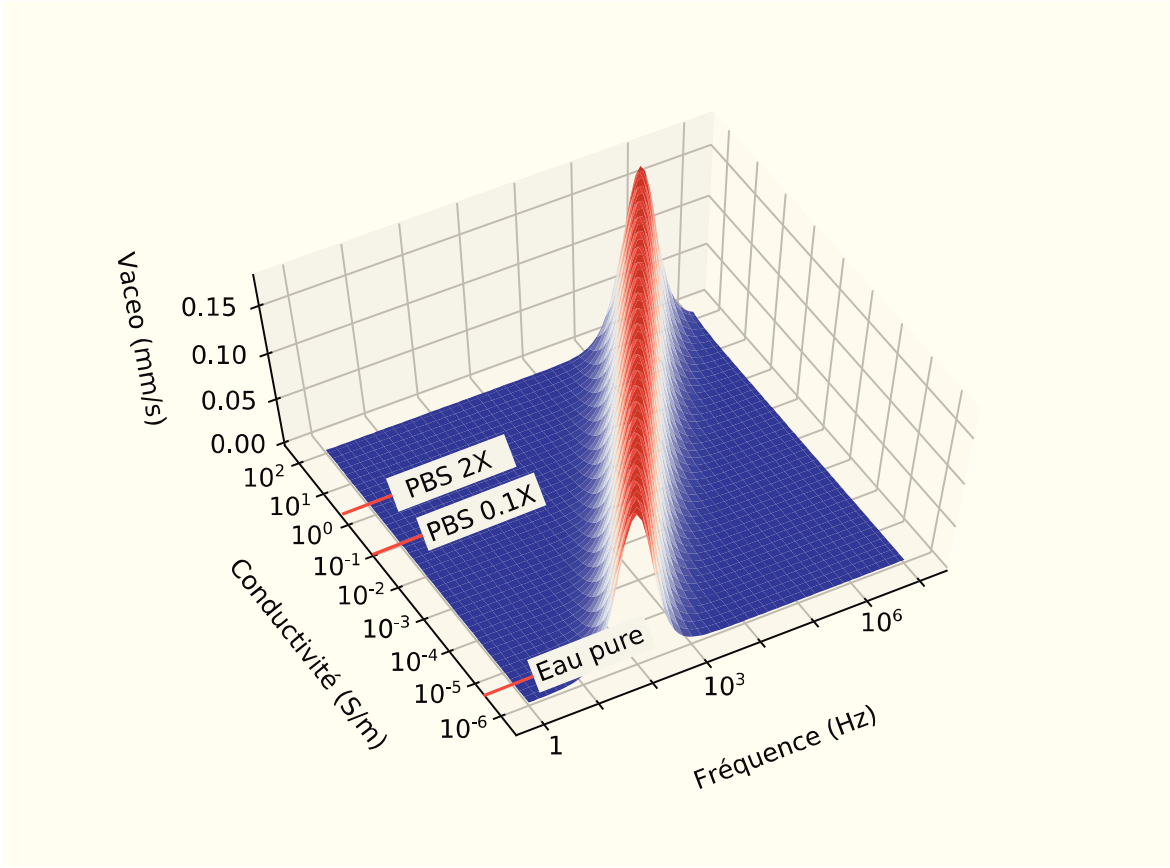


Figure 4.12 : Vitesse électroosmotique à une distance d = 50 µm du bord de l'électrode, en fonction de la conductivité (échelle log) du milieu considéré et de la fréquence (échelle log) appliquée, pour une tension de 1 V.

4.4.1.2 Calcul de la fréquence optimale pour le mélange électroosmotique en fonction de la conductivité

On peut calculer la fréquence optimale pour laquelle la vitesse électroosmotique est la plus élevée. En dérivant l'expression de la vitesse V_{ACEO} en fonction de la pulsation Ω, on obtient ainsi :

$$\omega_{opt} = \frac{2\sigma_m}{\pi\kappa d\varepsilon_m} \qquad \textbf{Équation 4.6}$$

soit :

$$f_{opt} = \frac{\sigma_m}{\pi^2\kappa d\varepsilon_m} \qquad \textbf{Équation 4.7}$$

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

La Figure 4.13 montre l'allure de l'évolution de cette fréquence optimale avec la conductivité. On remarque ainsi qu'elle passe de quelques kHz pour l'eau pure (milieu fortement dilué où l'approximation de la relation linéaire conductivité – force ionique arrive en limite de validité, ce qui explique la différence avec la vitesse électroosmotique calculée au chapitre 3) à plus de 150 kHz pour le PBS 1X. La fréquence qu'il faut appliquer pour obtenir un mélange électroosmotique maximal augmente donc drastiquement avec la conductivité du milieu considéré.

Pourtant, des fréquences de 100 et 150 kHz ont été appliquées lors de nos essais sur l'hybridation ADN/ADN, sans succès. Différentes causes peuvent expliquer cette absence d'efficacité :

- Le brassage électroosmotique n'est pas suffisant pour améliorer la détection de l'hybridation ;

- L'effet électrothermique (ETE) devient dominant par rapport aux autres effets électrocinétiques dans ce cas.

Cette dernière hypothèse s'appuie notamment sur les travaux de Oh [85], qui soulignent qu'à conductivité élevée (0,05 S/m dans son cas ; contre 2 S/m pour le PBS 2X), la dépendance quadratique de l'ETE vis-à-vis du champ électrique le rend dominant aux tensions utilisées (5-10 V). Or, l'ETE a l'action inverse de l'ACEO et de la DEP dans le sens où le champ de vitesse qu'il crée tend à éloigner les particules des électrodes, ce qui pourrait expliquer pourquoi aucune amélioration de l'hybridation n'est observée lors de l'application de la tension.

Dans cette optique, la possibilité d'utiliser les effets électrocinétiques tout en appliquant des tensions faibles serait intéressante. Cela permettrait d'une part de réduire l'influence de l'ETE à haute conductivité, et d'autre part d'utiliser des fréquences plus faibles sans risquer l'oxydo-réduction à la surface du capteur.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

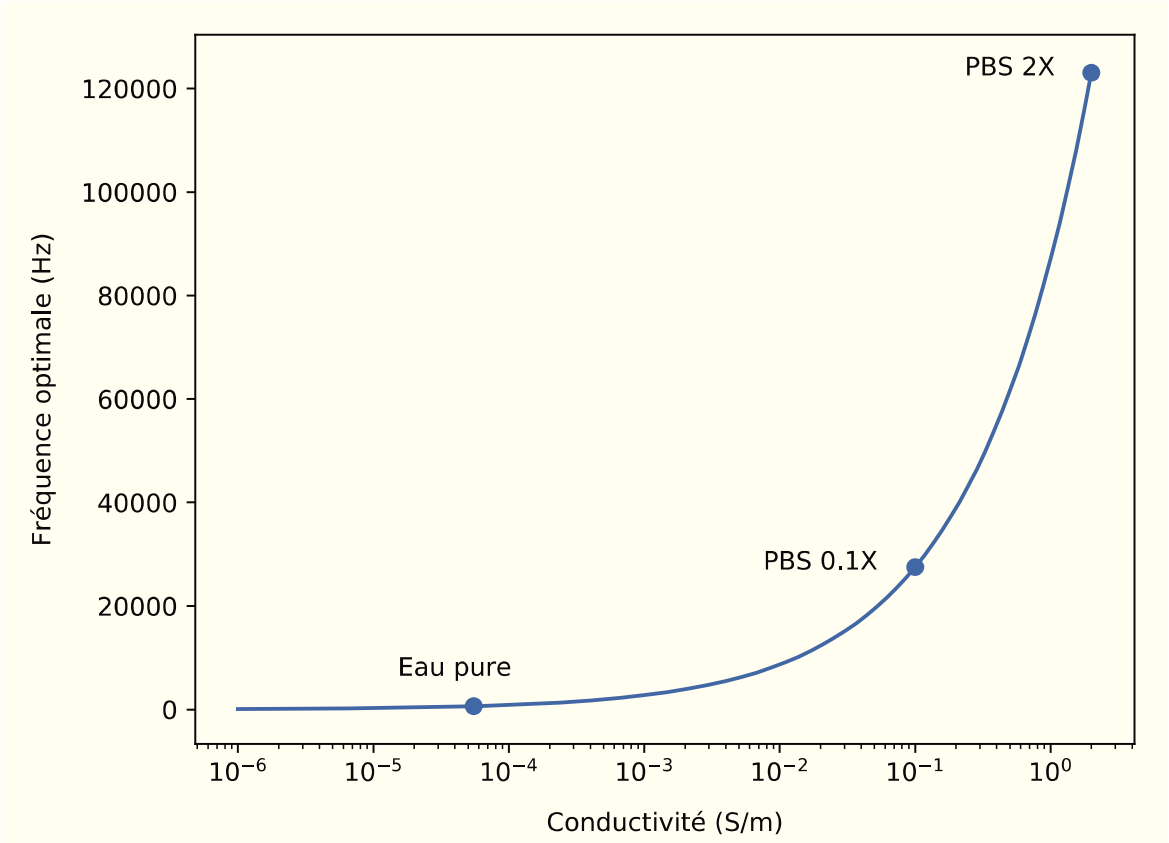


Figure 4.13 : Fréquence optimale (assurant une vitesse électroosmotique maximale) en fonction de la conductivité du milieu.

4.4.2 Optimisation de la géométrie de l'échantillon : influence de la largeur de gap

Parmi les différents paramètres géométriques définissant le design de notre puce, la largeur du gap inter-électrodes est déterminante. En effet, celle-ci influence non seulement le champ de vitesse électroosmotique, comme on peut le voir au travers des équations décrivant la vitesse électroosmotique mais aussi le champ de force diélectrophorétique puisque tout changement de géométrie modifie le gradient de champ électrique. Si l'on parvient à augmenter ces deux forces électrocinétiques par une modification de la géométrie des électrodes, on pourrait alors utiliser le capteur en appliquant des tensions faibles et donc en limitant l'influence de l'ETE, comment mentionné ci-dessus.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

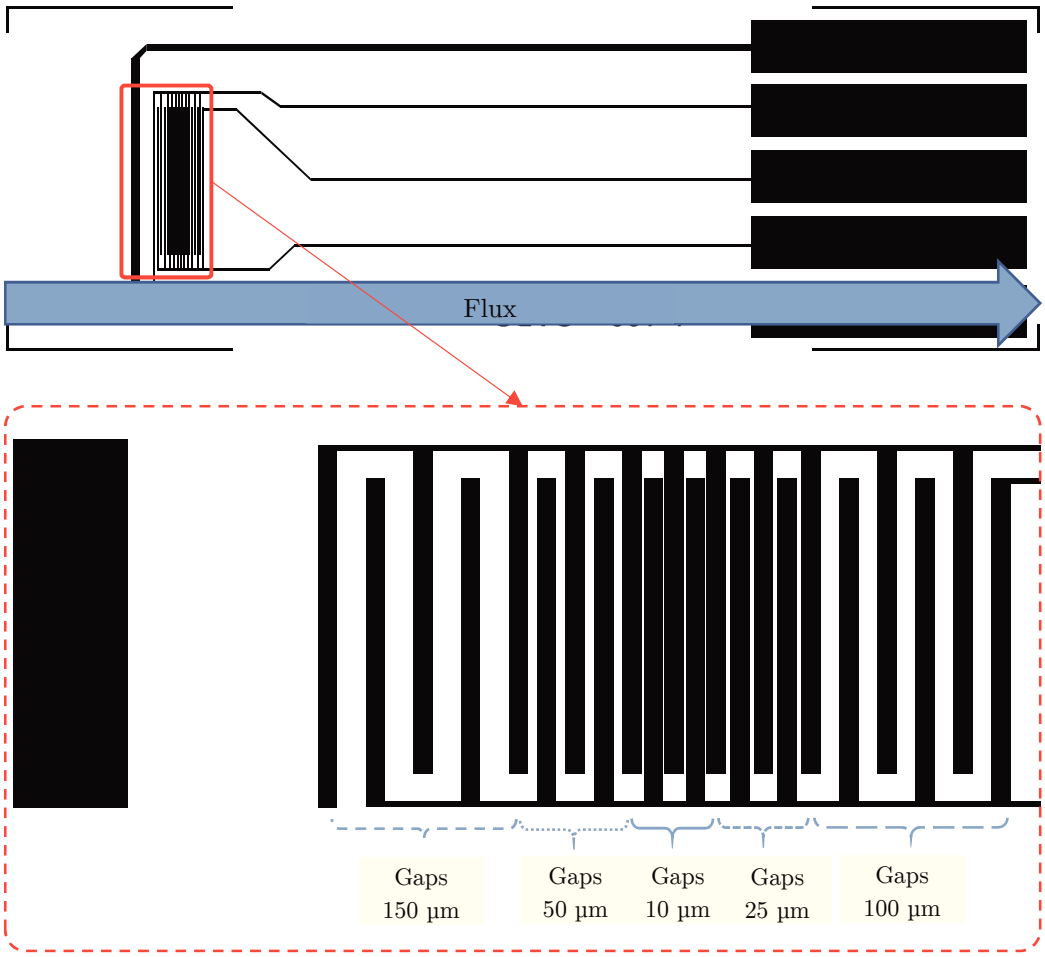


Figure 4.14 : Design de la puce multigaps, avec zoom sur la zone active du capteur où se trouvent les peignes d'électrodes servant au transfert de masse et à la détection.

4.4.2.1 Protocole expérimental

Pour mieux comprendre l'influence de la largeur du gap inter-électrodes dans la configuration choisie (électrodes interdigitées rectilignes), une puce dite « multigaps » a été réalisée. La microstructuration a été réalisée avec un procédé de lift-off identique à celui décrit au Chapitre 2, à la différence près que l'étape d'exposition a été réalisée par lithographie laser.

Le design de la puce est montré en Figure 4.14. Contrairement au dispositif utilisé pour la majorité de cette étude, les électrodes sont ici réparties en différents groupes

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

au sein desquels elles sont espacées d'un gap constant. 5 groupes d'électrodes correspondant à 5 largeurs de gap différentes (10 µm, 25 µm, 50 µm, 100 µm et 150 µm) sont accolés dans le désordre pour rendre les résultats plus aisément interprétables en les décorrélant autant que possible du sens du flux. Pour cette expérience, la largeur des électrodes a été abaissée à 100 µm pour pouvoir voir la totalité des différents groupes sur la même image et avec une résolution maximale.

Une solution de billes PS de 200 nm de diamètre, diluée 10 000 fois par rapport à la solution commerciale, a été utilisée pour cette expérience. Le facteur de dilution a été choisi de manière à obtenir un signal significatif (borne supérieure de la dilution) sans pour autant saturer la surface de billes (borne inférieure de la dilution).

A l'instar des expériences menées en partie 3 pour la détermination de la limite de détection du capteur, les capacités de collection des billes ont été évaluées ici dans deux conditions différentes :

- « au repos », c'est-à-dire sans champ de vitesse fluidique imposé de façon extérieure par la pompe ;
- « sous flux », c'est-à-dire sous débit constant et égal à 30 µL/min.

Dans les deux cas, le signal est mesuré sur chaque électrode 5 s et 100 s après l'application de la tension (1 kHz, 10 Vpp) et le signal à t = 0 s lui est soustrait pour obtenir la variation de signal imputable aux effets électrocinétiques. Au sein de chaque groupe d'électrodes séparées par le même gap (groupe 1 : électrodes séparées de 10 µm ; groupe 2 : électrodes séparées de 25 µm, etc.) le signal mesuré est ensuite moyenné arithmétiquement. On obtient ainsi la variation de signal en fonction de la largeur du *gap* interélectrodes.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

4.4.2.2 Résultats

Lorsque la tension est appliquée sous flux, le piégeage « instantané » (après t = 5 s) des billes est à peu près constant quel que soit le gap (Figure 4.15). A t = 100 s, on

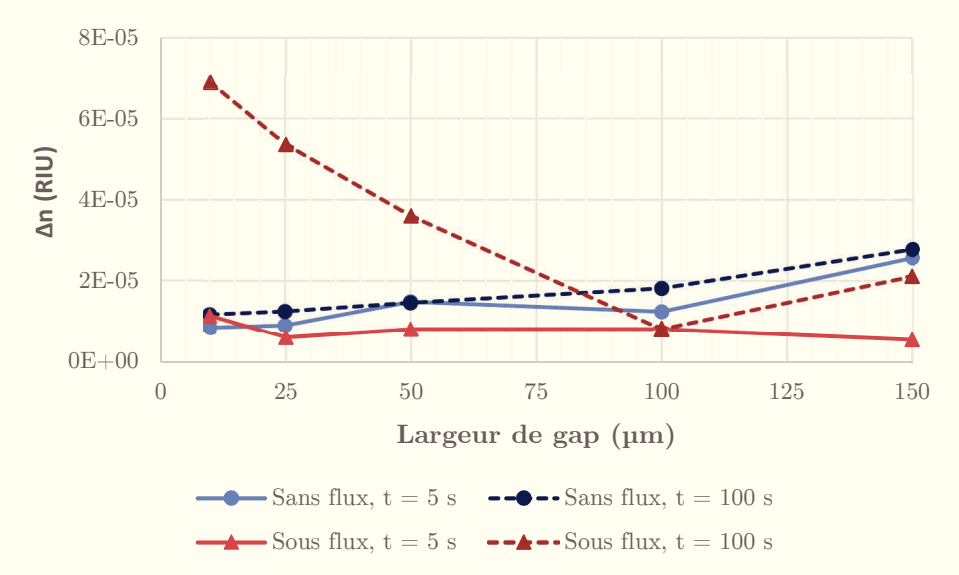


Figure 4.15 : Variations de signal mesurées en fonction du gap des électrodes concernée lors de l'application d'une tension sinusoïdale (1 kHz, 10 Vpp) sur une solution de billes PS 200 nm dans de l'eau pure.

observe une forte influence de la taille du gap sur la quantité de billes collectées : à partir de 100 µm, cette quantité augmente au fur et à mesure que le gap diminue. Le minimum observé pour le gap de 100 µm pourrait être expliqué par la position de ce groupe d'électrodes, situé en aval du flux et donc dans une région possiblement dépeuplée en billes. En effet, à t = 5 s, soit après 30 % de renouvellement du volume de la cuve (7 µL), donc avec une influence moins importante de cet éventuel dépeuplement, ce minimum n'est pas observable dans les résultats obtenus après t = 5 s.

L'application de la tension dans le fluide « au repos » conduit à des résultats sensiblement différents. A t = 5 s, les mesures sont dispersées mais à t = 100 s, on observe une légère tendance croissante de l'accumulation des billes avec la largeur de gap. Cela peut être attribué au volume de capture disponible pour chaque électrode :

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

les électrodes plus espacées peuvent attirer des billes à partir d'un volume plus grand, et la concentration initiale en billes dans le fluide étant supposée homogène, elles peuvent donc attirer plus de billes, même si elles le font moins vite. Cela expliquerait la différence entre ce qui se passe au repos et sous flux : lorsque le fluide est en circulation, la notion de volume de capture a moins d'importance puisque le nombre de billes dans ce volume est renouvelé en permanence.

4.4.2.3 Discussion

En calculant la vitesse électroosmotique à une distance de 30 µm du bord de l'électrode (Figure 4.16), on obtient une allure décroissante de la vitesse induite par rapport à la taille du gap pour les fréquences 1 kHz et 2 kHz (le calcul a été réalisé pour des électrodes de largeur 100 µm). A 500 Hz, elle reste relativement constante. Or, plus la vitesse électroosmotique induite est grande, plus le mélange fluidique est rapide au-dessus de l'électrode en question, et donc plus le nombre de billes passant près de la surface est élevé.

D'autre part, la force DEP est aussi affectée par cette diminution du gap. Dans un système à une dimension, la force DEP est proportionnelle à $\overrightarrow{grad}(E_{rms}^2) = \frac{dE_{rms}^2}{dx}$ et donc à $\frac{d^2V}{dx^2} * \frac{dV}{dx}$. Ainsi, en première approximation, la force DEP est inversement proportionnelle au cube de la largeur de gap [85]. Par exemple, cette force est 1000 fois plus grande dans le cas du gap 10 µm que dans le cas du gap 100 µm. Par conséquent, plus le gap inter-électrodes est faible, plus les billes à proximité de la surface sont efficacement piégées.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Ainsi donc, l'influence de la largeur de gap sur les deux effets électrocinétiques majeurs dans cette gamme de fréquences est claire : lorsqu'elle diminue, la vitesse électroosmotique croit et provoque une augmentation du débit de billes à proximité de la surface. Ces billes sont capturées par la force DEP, qui elle aussi augmente avec la diminution du gap. Lorsque le gap diminue, les électrodes sont donc capables de capturer plus de billes dans un temps imparti.

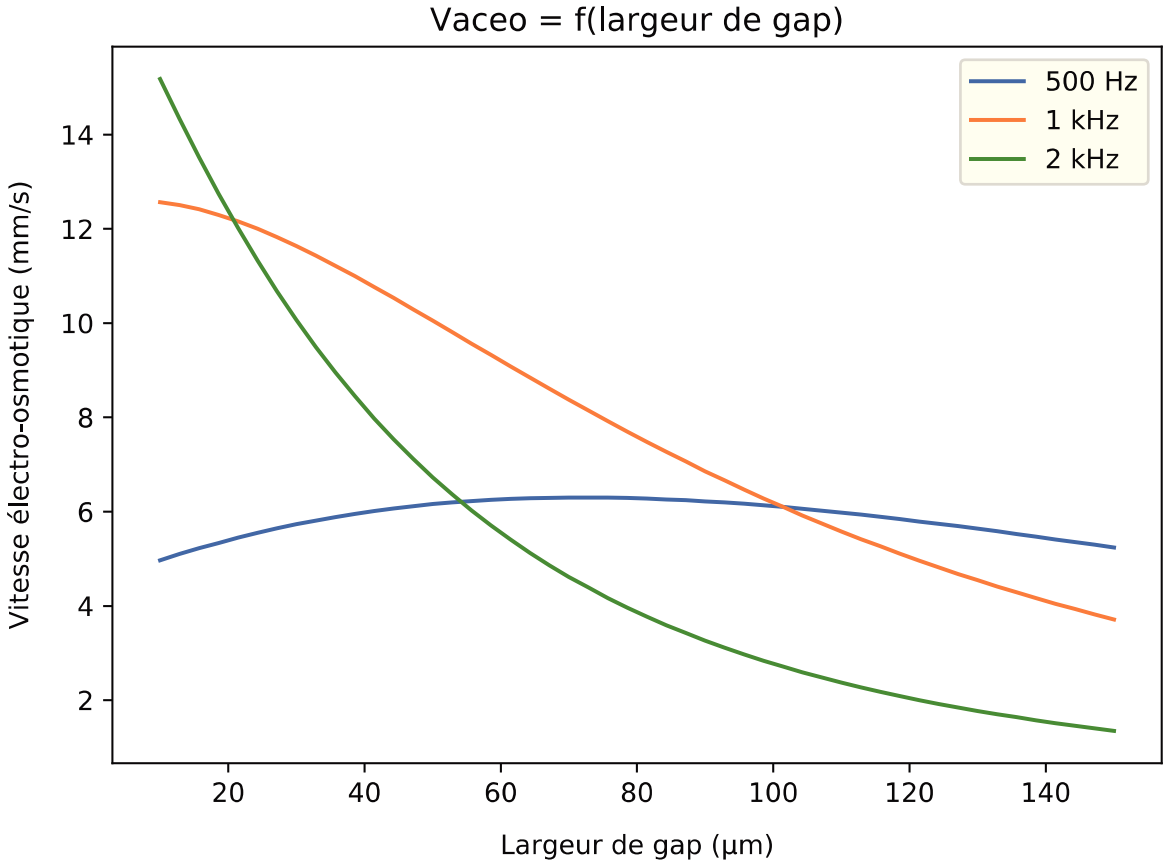


Figure 4.16 : Vitesse électroosmotique dans de l'eau pure à une distance de 30 µm du bord de l'électrode, avec une tension appliquée de 10 Vpp pour 3 fréquences différentes, en fonction de la largeur du gap interélectrodes.

Diminuer le gap peut donc avoir plusieurs intérêts en fonction de la situation. D'une part, l'augmentation conséquente de la vitesse électroosmotique permet d'améliorer le mélange du fluide, ce qui pourrait être utile dans les milieux conducteurs en permettant de contrebalancer l'influence de la conductivité sur l'ACEO. D'autre part, l'augmentation de la force DEP permet de piéger plus efficacement les molécules. Cette

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

conséquence est à nuancer cependant, puisque l'augmentation de la conductivité peut faire basculer la DEP de positive à négative : si la force DEP augmente mais qu'elle devient négative, les analytes sont repoussés et cela peut avoir l'effet inverse à celui recherché.

Ainsi, l'optimisation de la géométrie des électrodes apparaît comme un facteur d'amélioration important pour l'utilisation de notre capteur, en milieu conducteur mais aussi dans un cadre d'utilisation plus général.

4.5 Conclusion

Nous avons montré l'efficacité de notre dispositif pour le piégeage d'objets biologiques de nature et de tailles différentes : des cellules (levures) et des protéines (BSA) dans de l'eau pure. L'étude des performances de notre dispositif sur le cas de l'hybridation ADN/ADN met en lumière le défi principal à surmonter pour en faire un biocapteur spécifique : la mise en œuvre des effets électrocinétiques en milieu conducteur.

Dans ce cas précis, la technique de détection utilisée (SPR) impose des contraintes fortes sur les modalités d'opération du capteur et ne permet pas, en l'état, l'utilisation de la plupart des solutions décrites dans la littérature. Par conséquent nous avons exploré les pistes qui semblaient prometteuses, ce qui nous a permis de comprendre comment adapter la fréquence à la conductivité du milieu et comment la taille des électrodes influence les performances du capteur.

Les résultats obtenus montrent que ces démarches ne sont pas suffisantes. Il faudra donc développer d'autres approches originales. Des voies d'amélioration possibles seraient par exemple la nanotexturation de surface, qui permet d'augmenter localement le gradient de champ, ou bien le recouvrement de la surface par des couches

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

protectrices assez fines pour rendre possible la détection SPR. Ces stratégies pourraient être pertinentes pour l'adaptation de ce capteur aux milieux conducteurs.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

CHAPITRE 5 : CONCLUSION

5.1 Conclusions générales

L'objectif de ce travail de thèse était l'intégration d'une méthode d'actuation électrocinétique sur un capteur plasmonique. Les capteurs SPR sont en effet particulièrement intéressants pour l'étude et l'analyse d'interactions biomoléculaires puisqu'ils sont très sensibles, utilisables en temps réel et ne nécessitent pas de marquage préalable. Cependant, une barrière importante à l'amélioration de leurs performances aujourd'hui est la limite de diffusion.

Pour pallier ce problème, nous avons proposé d'intégrer une méthode d'actuation électrocinétique à un capteur plasmonique, par le biais d'une microstructuration de la surface métallique du capteur. Les effets électrocinétiques résultent de l'application d'un champ électrique sur des particules dans un fluide et sont couramment utilisés pour manipuler des objets en milieu liquide. Dans le cadre de ce projet, on utilise :

- le flux électroosmotique engendré par la mise en mouvement des ions de la double couche à l'interface solide/liquide par le champ électrique, pour agir à grande distance en assurant la mise en mouvement de tout le volume ;
- la diélectrophorèse, conséquence du gradient de champ électrique dans le fluide, pour piéger les particules sur l'élément de transduction SPR (action localisée).

Ces effets sont généralement mis en œuvre par des électrodes aux géométries variées, qui s'avèrent intégrables et compatibles avec la structure d'un capteur plasmonique.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Un dispositif type a été conçu en se basant sur l'état de l'art et en prenant en compte les contraintes expérimentales. Celui-ci est constitué d'électrodes interdigitées parallèles, obtenues par un procédé de fabrication rapide.

Les échantillons fabriqués ont été caractérisés électriquement, visuellement par microscopie et optiquement par un balayage en longueur d'onde permettant de vérifier la qualité de la résonance de plasmon de surface obtenue. Ces étapes de contrôle ont aussi permis d'acquérir la gamme de fonctionnement électrique du capteur : aux amplitudes utilisées (comprises entre 2 et 20 Vpp) la fréquence de la tension appliquée sur les électrodes dans l'eau ultrapure doit être supérieure à 500 Hz, pour éviter des modifications irréversibles de l'état de surface, dues à l'oxydo-réduction de l'or, qui perturberaient le signal mesuré.

Pour étudier et mieux comprendre le fonctionnement du capteur proposé, les premières expériences ont été effectuées sur un système modèle constitué de billes de polystyrène de 200 nm de diamètre en suspension dans de l'eau pure. Il a tout d'abord été montré que le dispositif était bien capable d'attirer ces objets à la surface de ses électrodes. Le transfert de masse est réalisé dès l'application d'une tension (1 kHz, 10 Vpp) aux bornes des peignes d'électrode. En outre, le fonctionnement sur des objets de nature identique mais plus gros (billes de 1 µm de diamètre) a été vérifié et les différences dans la dynamique de piégeage dues à la taille ont été expliquées de façon théorique en bonne concordance avec les résultats expérimentaux.

La façon dont les billes s'accumulent sur les électrodes est liée aux deux phénomènes électrocinétiques à l'œuvre dans ce système : la diélectrophorèse et l'électroosmose. Nous avons montré que les motifs suivant lesquels les billes s'amassent, c'est à dire sous forme de bandes parallèles aux électrodes, sont engendrés par l'équilibre entre les forces générées par ces deux phénomènes. Nous avons par ailleurs expliqué l'influence

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

des paramètres d'amplitude et de fréquence de la tension appliquée sur ces forces et le déplacement de l'équilibre associé à leur modification.

Les travaux menés sur ce système modèle ont permis de démontrer l'amélioration de la limite de détection du capteur. Celle-ci ayant été divisée par un facteur supérieur à 100, le dispositif étudié répond bien à l'objectif visé par ce projet. En outre, la pertinence de la SPR pour l'étude des phénomènes électrocinétiques à proximité des surfaces actives a été mise en lumière.

Dans un deuxième temps, la preuve de concept du fonctionnement du capteur proposé sur des objets biologiques a été apportée. Toujours pour des fréquences de l'ordre du kHz et des tensions ne dépassant pas 20 Vpp, des levures de boulanger (*Saccharomyces cerevisiae*) et des protéines (BSA) diluées dans de l'eau pure ont été attirées à la surface des électrode avec succès, permettant par là même leur observation individuelle pour les levures (malgré qu'une grande partie d'entre elles soit piégée sur les bords des électrodes) ou leur détection par mesure de la variation d'indice de réfraction pour les protéines.

Les dimensions très différentes des objets capturés, 5 µm pour les levures et 5 nm pour les protéines, montrent que le dispositif étudié est capable d'agir sur des analytes de natures et de tailles variées. En outre, les différences de comportement entre les levures et les protéines sous l'action des effets électrocinétiques ont été expliquées de façon théorique, littérature à l'appui.

Enfin, le dispositif a été fonctionnalisé pour en faire un biocapteur spécifique et évaluer ses performances dans le cas modèle de la détection d'évènements d'hybridation entre deux brins d'ADN complémentaires. Si le dispositif proposé n'est pas moins efficace qu'un biocapteur plasmonique classique, aucune amélioration liée aux effets électrocinétiques n'a cependant été observée.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Ce statu quo s'explique par la conductivité élevée du PBS, le milieu d'hybridation utilisé pour ces expériences. Nous avons en effet expliqué comment l'augmentation de la conductivité mène à la diminution de la force diélectrophorétique, voire à sa transition vers une force de DEP négative, ainsi qu'à la baisse de la vitesse électroosmotique. Ces deux conséquences résultent en un brassage du liquide beaucoup plus lent et un piégeage beaucoup moins efficace des objets ciblés.

Ce résultat soulève une difficulté importante rencontrée lors de la détection d'interactions biomoléculaires. En effet, ces dernières se produisent seulement dans un milieu de suspension adéquat et ceux-ci ont souvent une conductivité élevée, à laquelle les effets électrocinétiques changent radicalement de comportement par rapport à celui rencontré dans l'eau pure.

A cet égard, différentes stratégies ont été proposées qui pourraient permettre d'améliorer les performances du capteur. Ainsi nous avons montré que la fréquence peut être adaptée à la conductivité du milieu : les calculs semblent en effet montrer que la vitesse électroosmotique ne diminue pas de façon absolue dans un liquide conducteur, et qu'il y a en fait un déplacement de la fréquence optimale (celle induisant une vitesse électroosmotique maximale) vers les hautes fréquences lorsque la conductivité augmente. Par ailleurs, l'influence de la taille du gap interélectrodes a été étudiée. Les résultats pressentis, à savoir l'augmentation de l'efficacité du piégeage du fait de la diminution du gap, ont été confirmés expérimentalement.

5.2 Perspectives

L'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit confirment que le capteur proposé répond à la problématique que nous avions défini au commencement de ce projet de recherche : en utilisant efficacement les effets électrocinétiques que sont la diélectrophorèse et l'électroosmose via sa structure en électrodes interdigitées

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

parallèles, il permet de passer outre la limite de diffusion et donc d'améliorer sa limite de détection. Capable de piéger et détecter des objets variés tels que des billes, levures ou protéines, son application au cas de l'hybridation ADN/ADN a cependant soulevé une difficulté inhérente à son utilisation dans un milieu biologique : la conductivité élevée d'un tel milieu réduit drastiquement l'efficacité des effets électrocinétiques. Par conséquent, l'adaptation du dispositif à son utilisation en milieu conducteur constituera l'axe principal d'amélioration d'un tel capteur dans le futur.

Si différentes pistes ont été explorées pour apporter un début de réponse à ce problème (adaptation de la fréquence d'opération, dimensionnement des électrodes, compromis sur le milieu d'hybridation), il semble que la solution réside dans des stratégies plus longues à mettre en application. La nanotexturation des électrodes et l'augmentation de la force diélectrophorétique engendrée par l'augmentation locale du gradient de champ en est un bon exemple [99]. Le développement d'un procédé de protection de la surface métallique par une couche de passivation qui n'affecterait pas ou peu la qualité de la résonance plasmonique, permettant ainsi l'application de tensions élevées, constitue une piste tout aussi pertinente.

En outre, certains travaux menés au laboratoire apporteront d'excellents compléments à la poursuite de ce projet. Ceux sur la nanostructuration de la surface d'or pourraient par exemple permettre l'observation d'objets biologiques en haute résolution [34] après les avoir positionnés en appliquant les effets électrocinétiques. Enfin, l'étude de capteurs intégrant une fonction d'actuation électrocinétique dans une configuration différente (électrodes en face-à-face) apporte déjà des résultats prometteurs (voir les travaux de Marion Costella, doctorante Ampère-LN2, soumis pour publication) et se présente comme une solution très pertinente.

La conséquence la plus directe de la poursuite de ce projet devrait être une amélioration significative des performances des biocapteurs, entraînant des diagnostics

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

plus rapides et moins coûteux. On peut s'attendre à ce que le développement de cette technologie facilite la recherche dans ce domaine et aie des répercussions sur l'ensemble des recherches en ingénierie biomédicale mais aussi dans les autres champs d'application des biocapteurs (agroalimentaire, militaire, etc.). Ainsi, outre l'intérêt scientifique que l'on peut y trouver, la poursuite des travaux sur ce sujet et leur réussite promet d'intéressantes retombées sociales et économiques.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Bibliographie

[1] Kulasingam, V. and Diamandis, E.P. (2008) Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. *Nature Clinical Practice Oncology*, **5**, 588–99. https://doi.org/10.1038/ncponc1187

[2] MarketsandMarkets. (2015) Biosensors Market by Application (Point of Care, Home Diagnostics, Research Labs, Biodefense, Environmental Monitoring, Food Industry), Product (Wearable, Non-Wearable), Technology (Electrochemical, Piezoelectric, Optical) & Geography - Analysis & Forecas.

[3] MarketsandMarkets. (2017) Biosensors Market by Application (POC, Home Diagnostics, Research Labs, Biodefense, Environmental Monitoring, Food & Beverages Industry), Technology, Product (Wearable and Non-Wearable), and Geography - Global Forecast to 2022.

[4] Sheehan, P.E. and Whitman, L.J. (2005) Detection limits for nanoscale biosensors. *Nano Letters*, **5**, 803–7. https://doi.org/10.1021/nl050298x

[5] Piliarik, M. and Homola, J. (2009) Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits? *Optics Express*, **17**, 16505–17.

[6] Stemmler, I., Brecht, A. and Gauglitz, G. (1999) Compact surface plasmon resonance-transducers with spectral readout for biosensing applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **54**, 98–105. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00317-7

[7] Thirstrup, C. and Zong, W. (2005) Data analysis for surface plasmon resonance sensors using dynamic baseline algorithm. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **106**, 796–802. https://doi.org/10.1016/j.snb.2004.09.032

[8] Piliarik, M., Párová, L. and Homola, J. (2009) High-throughput SPR sensor for food safety. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 1399–404. https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.08.012

[9] Nenninger, G.G., Piliarik, M. and Homola, J. (2002) Data analysis for optical sensors based on spectroscopy of surface plasmons. *Measurement Science and Technology*, **13**, 2038.

[10] Chinowsky, T.., Quinn, J.., Bartholomew, D.., Kaiser, R. and Elkind, J.. (2003) Performance of the Spreeta 2000 integrated surface plasmon resonance affinity

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

sensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **91**, 266–74. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(03)00113-8

[11] Wu, C.-M. and Pao, M.-C. (2004) Sensitivity-tunable optical sensors based on surface plasmon resonance and phase detection. *Optics Express*, **12**, 3509–3514.

[12] Bardin, F., Bellemain, A., Roger, G. and Canva, M. (2009) Surface plasmon resonance spectro-imaging sensor for biomolecular surface interaction characterization. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 2100–5. https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.10.023

[13] Piliarik, M., Vala, M., Tichý, I. and Homola, J. (2009) Compact and low-cost biosensor based on novel approach to spectroscopy of surface plasmons. *Biosensors and Bioelectronics*, **24**, 3430–5. https://doi.org/10.1016/j.bios.2008.11.003

[14] Homola, J. (2003) Present and future of surface plasmon resonance biosensors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **377**, 528–39. https://doi.org/10.1007/s00216-003-2101-0

[15] Sarkar, M., Bryche, J.-F., Moreau, J., Besbes, M., Barbillon, G., Bartenlian, B. et al. (2015) Generalized analytical model based on harmonic coupling for hybrid plasmonic modes: comparison with numerical and experimental results. *Optics Express*, **23**, 27376–90. https://doi.org/10.1364/OE.23.027376

[16] Renaudin, A., Chabot, V., Grondin, E., Aimez, V. and Charette, P.G. (2010) Integrated active mixing and biosensing using surface acoustic waves (SAW) and surface plasmon resonance (SPR) on a common substrate. *Lab Chip*, **10**, 111–5. https://doi.org/10.1039/B911953A

[17] Chabot, V., Miron, Y., Grandbois, M. and Charette, P.G. (2012) Long range surface plasmon resonance for increased sensitivity in living cell biosensing through greater probing depth. *Sensors and Actuators B: Chemical*, Elsevier B.V. **174**, 94–101. https://doi.org/10.1016/j.snb.2012.08.028

[18] Mohanty, S.P. and Koucianos, E. (2006) Biosensors: A tutorial review. *IEEE Potentials*, **25**, 35–40. https://doi.org/10.1109/MP.2006.1649009

[19] Tudos, A.J. and Schasfoort, R.B.M. (2007) Introduction to Surface Plasmon Resonance. *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, p. 1–14. https://doi.org/10.1007/978-3-642-28079-5

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

[20] Wijaya, E., Lenaerts, C., Maricot, S., Hastanin, J., Habraken, S., Vilcot, J.P. et al. (2011) Surface plasmon resonance-based biosensors: From the development of different SPR structures to novel surface functionalization strategies. *Current Opinion in Solid State and Materials Science*, Elsevier Ltd. **15**, 208–24. https://doi.org/10.1016/j.cossms.2011.05.001

[21] Homola, J. (2006) Surface plasmon resonance based sensors. Surface plasmon resonance based sensors. https://doi.org/10.1007/b100321

[22] Söllradl, T., Banville, F.A., Fröhlich, U., Canva, M., Charette, P.G. and Grandbois, M. (2018) Label-free visualization and quantification of single cell signaling activity using metal-clad waveguide (MCWG)-based microscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, **100**, 429–36. https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.09.002

[23] van der Merwe, P.A. and Barclay, A.N. (1996) Analysis of cell-adhesion molecule interactions using surface plasmon resonance. *Current Opinion in Immunology*, **8**, 257–61.

[24] Thiel, A.J., Frutos, A.G., Jordan, C.E., Corn, R.M. and Smith, L.M. (1997) In situ surface plasmon resonance imaging detection of DNA hybridization to oligonucleotide arrays on gold surfaces. *Anal Chem*, **69**, 4948–56. https://doi.org/10.1021/ac9708001

[25] Koubová, V., Brynda, E., Karasová, L., Škvor, J., Homola, J., Dostálek, J. et al. (2001) Detection of foodborne pathogens using surface plasmon resonance biosensors. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **74**, 100–5. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(00)00717-6

[26] Peterson, A.W., Halter, M., Tona, A., Bhadriraju, K. and Plant, A.L. (2010) Using surface plasmon resonance imaging to probe dynamic interactions between cells and extracellular matrix. *Cytometry Part A*, **77A**, 895–903. https://doi.org/10.1002/cyto.a.20938

[27] Wang, W., Wang, S., Liu, Q., Wu, J. and Tao, N. (2012) Mapping Single-Cell–Substrate Interactions by Surface Plasmon Resonance Microscopy. *Langmuir*, **28**, 13373–9. https://doi.org/10.1021/la301712h

[28] Milgram, S., Cortes, S., Villiers, M.-B., Marche, P., Buhot, A., Livache, T. et al. (2011) On chip real time monitoring of B-cells hybridoma secretion of immunoglobulin. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 2728–32. https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.044

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

[29] Shinohara, H., Sakai, Y. and Mir, T.A. (2013) Real-time monitoring of intracellular signal transduction in PC12 cells by two-dimensional surface plasmon resonance imager. *Analytical Biochemistry*, **441**, 185–9. https://doi.org/10.1016/j.ab.2013.07.017

[30] Nonobe, Y., Yokoyama, T., Kamikubo, Y., Yoshida, S., Hisajima, N., Shinohara, H. et al. (2016) Application of surface plasmon resonance imaging to monitoring G protein-coupled receptor signaling and its modulation in a heterologous expression system. *BMC Biotechnology*, **16**. https://doi.org/10.1186/s12896-016-0266-9

[31] Yang, Y., Yu, H., Shan, X., Wang, W., Liu, X., Wang, S. et al. (2015) Label-Free Tracking of Single Organelle Transportation in Cells with Nanometer Precision Using a Plasmonic Imaging Technique. *Small*, **11**, 2878–84. https://doi.org/10.1002/smll.201403016

[32] Söllradl, T., Banville, F.A., Chabot, V., Canva, M., Grandbois, M. and Charette, P.G. (2017) Metal clad waveguide (MCWG) based imaging using a high numerical aperture microscope objective. *Optics Express*, **25**, 1666. https://doi.org/10.1364/OE.25.001666

[33] Banville, F.A., Söllradl, T., Zermatten, P.-J., Grandbois, M. and Charette, P.G. (2015) Improved resolution in SPR and MCWG microscopy by combining images acquired with distinct mode propagation directions. *Optics Letters*, **40**, 1165. https://doi.org/10.1364/OL.40.001165

[34] Banville, F.A., Moreau, J., Sarkar, M., Besbes, M., Canva, M. and Charette, P.G. (2018) Spatial resolution versus contrast trade-off enhancement in high-resolution surface plasmon resonance imaging (SPRI) by metal surface nanostructure design. *Optics Express*, **26**, 10616. https://doi.org/10.1364/OE.26.010616

[35] Wang, R., Lajevardi-Khosh, A., Choi, S. and Chae, J. (2011) Regenerative Surface Plasmon Resonance (SPR) biosensor: Real-time measurement of fibrinogen in undiluted human serum using the competitive adsorption of proteins. *Biosensors and Bioelectronics*, **28**, 304–7. https://doi.org/10.1016/j.bios.2011.07.036

[36] Scarano, S., Mascini, M., Turner, A.P.F. and Minunni, M. (2010) Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, **25**, 957–66. https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.08.039

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

[37] Jung, S.O., Ro, H.-S., Kho, B.H., Shin, Y.-B., Kim, M.G. and Chung, B.H. (2005) Surface plasmon resonance imaging-based protein arrays for high-throughput screening of protein-protein interaction inhibitors. *PROTEOMICS*, **5**, 4427–31. https://doi.org/10.1002/pmic.200500001

[38] Ro, H.-S., Jung, S.O., Kho, B.H., Hong, H.P., Lee, J.S., Shin, Y.-B. et al. (2005) Surface Plasmon Resonance Imaging-Based Protein Array Chip System for Monitoring a Hexahistidine-Tagged Protein during Expression and Purification. *Applied and Environmental Microbiology*, **71**, 1089–92. https://doi.org/10.1128/AEM.71.2.1089-1092.2005

[39] Ro, H.-S., Koh, B.H., Jung, S.O., Park, H.K., Shin, Y.-B., Kim, M.-G. et al. (2006) Surface plasmon resonance imaging protein arrays for analysis of triple protein interactions of HPV, E6, E6AP, and p53. *PROTEOMICS*, **6**, 2108–11. https://doi.org/10.1002/pmic.200500635

[40] Christopher, J.A., Brown, J., Doré, A.S., Errey, J.C., Koglin, M., Marshall, F.H. et al. (2013) Biophysical Fragment Screening of the β_1 -Adrenergic Receptor: Identification of High Affinity Arylpiperazine Leads Using Structure-Based Drug Design. *Journal of Medicinal Chemistry*, **56**, 3446–55. https://doi.org/10.1021/jm400140q

[41] Olaru, A., Bala, C., Jaffrezic-Renault, N. and Aboul-Enein, H.Y. (2015) Surface Plasmon Resonance (SPR) Biosensors in Pharmaceutical Analysis. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, **45**, 97–105. https://doi.org/10.1080/10408347.2014.881250

[42] Sakai, G., Ogata, K., Uda, T., Miura, N. and Yamazoe, N. (1998) A surface plasmon resonance-based immunosensor for highly sensitive detection of morphine. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **49**, 5–12. https://doi.org/10.1016/S0925-4005(98)00107-5

[43] Wood, S.J. (1992) DNA-DNA Hybridization in Real Time Using BIAcore. Microchemical Journal. p. 330–7.

[44] Lee, H.J., Goodrich, T.T. and Corn, R.M. (2001) SPR imaging measurements of 1-D and 2-D DNA microarrays created from microfluidic channels on gold thin films. *Analytical Chemistry*, **73**, 5525–31. https://doi.org/10.1021/ac010762s

[45] Nelson, B.P., Grimsrud, T.E., Liles, M.R., Goodman, R.M. and Corn, R.M. (2001) Surface plasmon resonance imaging measurements of DNA and RNA

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

hybridization adsorption onto DNA microarrays. *Analytical Chemistry*, **73**, 1–7. https://doi.org/10.1021/ac0010431

[46] He, L., Musick, M.D., Nicewarner, S.R., Salinas, F.G., Benkovic, S.J., Natan, M.J. et al. (2000) Colloidal Au-Enhanced Surface Plasmon Resonance for Ultrasensitive Detection of DNA Hybridization. *J Am Chem Soc*, 9071–7.

[47] Lee, C.Y., Chang, C.L., Wang, Y.N. and Fu, L.M. (2011) Microfluidic mixing: A review. *International Journal of Molecular Sciences*, **12**, 3263–87. https://doi.org/10.3390/ijms12053263

[48] Sritharan, K., Strobl, C.J., Schneider, M.F., Wixforth, A. and Guttenberg, Z. (2006) Acoustic mixing at low Reynold's numbers. *Applied Physics Letters*, **88**, 1–3. https://doi.org/10.1063/1.2171482

[49] Xu, B., Wong, T.N., Nguyen, N.T., Che, Z. and Chai, J.C.K. (2010) Thermal mixing of two miscible fluids in a T-shaped microchannel. *Biomicrofluidics*, **4**, 1–13. https://doi.org/10.1063/1.3496359

[50] Stellwagen, N.C. (2009) Electrophoresis of DNA in agarose gels, polyacrylamide gels and in free solution. *Electrophoresis*, **30**, S188–95. https://doi.org/10.1002/elps.200900052.Electrophoresis

[51] Pethig, R. and Markx, G.H. (1997) Applications of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, **15**, 426–32. https://doi.org/10.1016/S0167-7799(97)01096-2

[52] Ross, P.D. (1964) On a Relationship Between Electrophoresis and Donnan Equilibrium Experiments on DNA. *Biopolymers*, **2**, 9–14.

[53] Olivera, B.M., Baine, P. and Davidson, N. (1964) Electrophoresis of the nucleic acids. *Biopolymers*, **2**, 245–57.

[54] Costantino, L., Liquori, A.M. and Vitagliano, V. (1964) Influence of Thermal Denaturation. *Biopolymers*, **2**, 1–8.

[55] Scott, C. (2014) Analysis by size and charge. *BioProcess International*, **12**.

[56] Bakewell, D., Vergara-Irigaray, N. and Holmes, D. (2013) Dielectrophoresis of Biomolecules. *JSM Nanotechnology & Nanomedicine*, **1**, 1–14.

[57] Washizu, M. and Kurosawa, O. (1990) Electrostatic Manipulation of DNA in Microfabricated Structures. *IEEE Transactions on Industry Applications*, **26**, 1165–72. https://doi.org/10.1109/28.62403

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

[58] Suzuki, S., Yamanashi, T., Tazawa, S., Kurosawa, O. and Washizu, M. (1998) Quantitative analysis of DNA orientation in stationary AC electric fields using fluorescence anisotropy. *IEEE Transactions on Industry Applications*, **34**, 75–83. http://dx.doi.org/10.1109/28.658723

[59] Asbury, C.L., Diercks, A.H. and Van Den Engh, G. (2002) Trapping of DNA by dielectrophoresis. *Electrophoresis*, **23**, 2658–66. https://doi.org/10.1002/1522-2683(200208)23:16<2658::AID-ELPS2658>3.0.CO;2-O

[60] Asbury, C.L. and van den Engh, G. (1998) Trapping of DNA in nonuniform oscillating electric fields. *Biophysical Journal*, Elsevier. **74**, 1024–30. https://doi.org/10.1016/S0006-3495(98)74027-5

[61] Germishuizen, W.A., Walti, C., Wirtz, R., Johnston, M.B., Pepper, M., Davies, A.G. et al. (2003) Selective dielectrophoretic manipulation of surface-immobilized DNA molecules. *Nanotechnology*, **14**, 896–902. https://doi.org/10.1088/0957-4484/14/8/310

[62] Bakewell, D.J.G., Hughes, M.P., Milner, J.J. and Morgan, H. (1998) Dielectrophoretic manipulation of avidein and DNA. *Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, **20**, 1079.

[63] Zheng, L., Brody, J.P. and Burke, P.J. (2004) Electronic manipulation of DNA, proteins, and nanoparticles for potential circuit assembly. *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 606–19. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.03.029

[64] Tuukkanen, S. (2006) Dielectrophoresis as a tool for on-chip positioning of DNA and electrical characterization of nanoscale DNA. University of Jyväskylä.

[65] Green, N.G., Ramos, A., Gonzalez, A., Morgan, H. and Castellanos, A. (2002) Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. III. Observation of streamlines and numerical simulation. *Physical Review E - Statistical, Nonlinear, and Soft Matter Physics*, **66**, 1–11. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.66.026305

[66] Green, N., Ramos, A., González, A., Morgan, H. and Castellanos, A. (2000) Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. I. Experimental measurements. *Physical Review E*, **61**, 4019–28. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.61.4019

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

[67] González, a., Ramos, a., Green, N., Castellanos, a. and Morgan, H. (2000) Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. II. A linear double-layer analysis. *Physical Review E*, **61**, 4019–28. https://doi.org/10.1103/PhysRevE.61.4019

[68] Bown, M.R. and Meinhart, C.D. (2006) AC electroosmotic flow in a DNA concentrator. *Microfluidics and Nanofluidics*, **2**, 513–23. https://doi.org/10.1007/s10404-006-0097-4

[69] Hoettges, K.F., McDonnell, M.B. and Hughes, M.P. (2003) Use of combined dielectrophoretic/electrohydrodynamic forces for biosensor enhancement. *Journal of Physics D: Applied Physics*, **36**, L101–4. https://doi.org/10.1088/0022-3727/36/20/L01

[70] Li, S., Ren, Y. and Jiang, H. (2014) Convection and mass transfer enhanced rapid capacitive serum immunoassay. *RSC Advances*, **4**, 9064. https://doi.org/10.1039/c3ra46697c

[71] Li, S., Ren, Y., Cui, H., Yuan, Q., Wu, J., Eda, S. et al. (2015) Alternating current electrokinetics enhanced in situ capacitive immunoassay: Microfluidics and Miniaturization. *ELECTROPHORESIS*, **36**, 471–4. https://doi.org/10.1002/elps.201400284

[72] Hübner, Y., Mcdonnell, M.B., Carter, M.J. and Hughes, M.P. (2007) Applications of dielectrophoretic / electro- hydrodynamic " zipper " electrodes for detection of biological nanoparticles. *International Journal of Nanomedicine*, **2**, 427–31.

[73] Barik, A., Otto, L.M., Yoo, D., Jose, J., Johnson, T.W. and Oh, S.H. (2014) Dielectrophoresis-enhanced plasmonic sensing with gold nanohole arrays. *Nano Letters*, **14**, 2006–12. https://doi.org/10.1021/nl500149h

[74] Lei, K.F., Cheng, H., Choy, K.Y. and Chow, L.M.C. (2009) Electrokinetic DNA concentration in microsystems. *Sensors and Actuators, A: Physical*, **156**, 381–7. https://doi.org/10.1016/j.sna.2009.10.006

[75] Wong, P.K., Chen, C.Y., Wang, T.H. and Ho, C.M. (2005) Electrokinetic bioprocessor for concentrating cells and molecules. *Analytical Chemistry*, **76**, 6908–14. https://doi.org/10.1021/ac049479u

[76] Cao, S.H., Xie, T.T., Cai, W.P., Liu, Q. and Li, Y.Q. (2011) Electric field assisted surface plasmon-coupled directional emission: An active strategy on enhancing sensitivity for DNA sensing and efficient discrimination of single base

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

mutation. *Journal of the American Chemical Society*, **133**, 1787–9. https://doi.org/10.1021/ja107964s

[77] Schoemaker, F.C., Grobbe, N., Schakel, M.D., de Ridder, S.A.L., Slob, E.C. and Smeulders, D.M.J. (2012) Experimental Validation of the Electrokinetic Theory and Development of Seismoelectric Interferometry by Cross-Correlation. *International Journal of Geophysics*, **2012**, 1–23. https://doi.org/10.1155/2012/514242

[78] Lopatynskyi, A.M., Lopatynska, O.G., Guiver, M.D., Poperenko, L. V and Chegel, V.I. (2008) Factor of interfacial potential for the surface plasmon-polariton resonance sensor response. 329–36.

[79] Huang, Y., Pitter, M.C., Somekh, M.G., Zhang, W., Xie, W., Zhang, H. et al. (2013) Plasmonic response of gold film to potential perturbation. *Science China: Physics, Mechanics and Astronomy*, **56**, 1495–503. https://doi.org/10.1007/s11433-013-5173-7

[80] Abeles, F., Lopez-Rios, T. and Tadjeddine, A. (1975) Investigation of the metal-electrolyte interface using surface plasma waves with ellipsometric detection. *Solid State Communications*, **16**, 843–847.

[81] Kötz, R., Kolb, D.M. and Sass, J.K. (1977) Electron density effects in surface plasmon excitation on silver and gold electrodes. *Surface Science*, **69**, 359–64. https://doi.org/10.1016/0039-6028(77)90181-9

[82] Heaton, R.J., Peterson, a W. and Georgiadis, R.M. (2001) Electrostatic surface plasmon resonance: direct electric field-induced hybridization and denaturation in monolayer nucleic acid films and label-free discrimination of base mismatches. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 3701–4. https://doi.org/10.1073/pnas.071623998

[83] Lioubimov, V., Kolomenskii, A., Mershin, A., Nanopoulos, D. V and Schuessler, H. a. (2004) Effect of varying electric potential on surface-plasmon resonance sensing. *Applied Optics*, **43**, 3426–32. https://doi.org/10.1364/AO.43.003426

[84] Khoshmanesh, K., Nahavandi, S., Baratchi, S., Mitchell, A. and Kalantar-zadeh, K. (2011) Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems. *Biosensors and Bioelectronics*, **26**, 1800–14. https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.09.022

[85] Oh, J., Hart, R., Capurro, J. and Noh, H. (Moses). (2009) Comprehensive analysis of particle motion under non-uniform AC electric fields in a microchannel. *Lab Chip*, **9**, 62–78. https://doi.org/10.1039/B801594E

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

[86] Cottet, J., Fabregue, O., Berger, C., Buret, F., Renaud, P. and Frénéa-Robin, M. (2018) MyDEP: a new computational tool for dielectric modeling of particles and cells [Internet]. Zenodo.

[87] Morgan, H. and Green, N.G. (2003) AC electrokinetics: colloids and nanoparticles. Research Studies Press, Baldock.

[88] Hasted, J.B., Ritson, D.M. and Collie, C.H. (1948) Dielectric Properties of Aqueous Ionic Solutions. Parts I and II. *The Journal of Chemical Physics*, **16**, 1–21. https://doi.org/10.1063/1.1746645

[89] Hottin, J., Moreau, J., Spadavecchia, J., Bellemain, A., Lecerf, L., Goossens, M. et al. (2008) Self-calibrated dynamical optical biochip system using surface plasmon resonance imaging: application to genotyping. In: Popp J, Drexler W, Tuchin VV, and Matthews DL, editors. Strasbourg, France. p. 69910Q. https://doi.org/10.1117/12.781364

[90] Spadavecchia, J., Moreau, J., Hottin, J. and Canva, M. (2009) New cysteamine based functionalization for biochip applications. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **143**, 139–43. https://doi.org/10.1016/j.snb.2009.09.007

[91] Kötz, R., Kolb, D.M. and Sass, J.K. (1977) Electron density effects in surface plasmon excitation on silver and gold electrodes. *Surface Science*, **69**, 359–64. https://doi.org/10.1016/0039-6028(77)90181-9

[92] Lioubimov, V., Kolomenskii, A., Mershin, A., Nanopoulos, D.V. and Schuessler, H.A. (2004) Effect of varying electric potential on surface-plasmon resonance sensing. *Applied Optics*, **43**, 3426–3432.

[93] Kolb, D. and Kötz, R. (1977) Electroreflectance spectra of Ag(111) electrodes. *Surface Science*, **64**, 96–108. https://doi.org/10.1016/0039-6028(77)90260-6

[94] Kurtz, O., Barthelmes, J., Rüther, R., Lagorce-Broc, F., Ruge, M. and Donner, C. Testing of Corrosion Resistance Mechanisms by means of Cyclic Voltammetry. 15.

[95] Burke, L.D. and Nugent, P.F. (1997) The electrochemistry of gold: I the redox behaviour of the metal in aqueous media. *Gold Bulletin*, **30**, 43–53.

[96] Oh, J., Hart, R., Capurro, J. and Noh, H. (Moses). (2009) Comprehensive analysis of particle motion under non-uniform AC electric fields in a microchannel. *Lab Chip*, **9**, 62–78. https://doi.org/10.1039/B801594E

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

[97] Guide de vérification/validation des méthodes en Biologie Médicale [Internet]. Cofrac (Comité français d'accréditation).

[98] (2018) Recueil des méthodes internationales d'analyse des vins et des moûts [Internet]. OIV (Organisation internationale de la vigne et du vin).

[99] Koklu, A., Sabuncu, A.C. and Beskok, A. (2017) Enhancement of dielectrophoresis using fractal gold nanostructured electrodes: Microfluidics and Miniaturization. *ELECTROPHORESIS*, **38**, 1458–65. https://doi.org/10.1002/elps.201600456

[100] Velmanickam, L., Fondakowski, M., Lima, I.T. and Nawarathna, D. (2017) Integrated dielectrophoretic and surface plasmonic platform for million-fold improvement in the detection of fluorescent events. *Biomicrofluidics*, **11**, 044115. https://doi.org/10.1063/1.5000008

[101] Viitala, L., Maley, A.M., Fung, H.W.M., Corn, R.M., Viitala, T. and Murtomäki, L. (2016) Surface Plasmon Resonance Imaging Microscopy of Liposomes and Liposome-Encapsulated Gold Nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, **120**, 25958–66. https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.6b09503

[102] Maley, A.M., Lu, G.J., Shapiro, M.G. and Corn, R.M. (2017) Characterizing Single Polymeric and Protein Nanoparticles with Surface Plasmon Resonance Imaging Measurements. *ACS Nano*, **11**, 7447–56. https://doi.org/10.1021/acsnano.7b03859

[103] Zheng, L., Brody, J.P. and Burke, P.J. (2004) Electronic manipulation of DNA, proteins, and nanoparticles for potential circuit assembly. *Biosensors and Bioelectronics*, **20**, 606–19. https://doi.org/10.1016/j.bios.2004.03.029

[104] Erickson, H.P. (2009) Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy. *Biological Procedures Online*, **11**, 32–51. https://doi.org/10.1007/s12575-009-9008-x

[105] Luo, C.-P., Heeren, A., Henschel, W. and Kern, D.P. (2006) Nanoelectrode arrays for on-chip manipulation of biomolecules in aqueous solutions. *Microelectronic Engineering*, **83**, 1634–7. https://doi.org/10.1016/j.mee.2006.01.189

[106] Erickson, D., Liu, X., Krull, U. and Li, D. (2004) Electrokinetically Controlled DNA Hybridization Microfluidic Chip Enabling Rapid Target Analysis. *Analytical Chemistry*, **76**, 7269–77. https://doi.org/10.1021/ac049396d

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

[107] Bakewell, D.J. and Morgan, H. (2006) Dielectrophoresis of DNA: time- and frequency-dependent collections on microelectrodes. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, **5**, 139–46. https://doi.org/10.1109/TNB.2005.864012

[108] Bown, M.R. and Meinhart, C.D. (2006) AC electroosmotic flow in a DNA concentrator. *Microfluidics and Nanofluidics*, **2**, 513–23. https://doi.org/10.1007/s10404-006-0097-4

[109] Sonnenberg, A., Marciniak, J.Y., Krishnan, R. and Heller, M.J. (2012) Dielectrophoretic isolation of DNA and nanoparticles from blood: Nucleic acids. *ELECTROPHORESIS*, **33**, 2482–90. https://doi.org/10.1002/elps.201100700

[110] Sosnowski, R.G., Tu, E., Butler, W.F., O'Connell, J.P. and Heller, M.J. (1997) Rapid determination of single base mismatch mutations in DNA hybrids by direct electric field control. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **94**, 1119–1123.

[111] Gagnon, Z., Senapati, S., Gordon, J. and Chang, H.-C. (2008) Dielectrophoretic detection and quantification of hybridized DNA molecules on nano-genetic particles. *ELECTROPHORESIS*, **29**, 4808–12. https://doi.org/10.1002/elps.200800528

[112] Gagnon, Z., Senapati, S. and Chang, H.-C. (2010) Optimized DNA hybridization detection on nanocolloidal particles by dielectrophoresis. *ELECTROPHORESIS*, **31**, 666–71. https://doi.org/10.1002/elps.200900473

[113] Petryayeva, E. and Krull, U.J. (2011) Localized surface plasmon resonance: Nanostructures, bioassays and biosensing—A review. *Analytica Chimica Acta*, **706**, 8–24. https://doi.org/10.1016/j.aca.2011.08.020

[114] Cheng, J., Sheldon, E.L., Wu, L., Uribe, A., Gerrue, L.O., Carrino, J. et al. (1998) Preparation and hybridization analysis of DNA/RNA from E. coli on microfabricated bioelectronic chips. *Nature Biotechnology*, **16**, 541.

[115] Sosnowski, R., Heller, M.J., Tu, E., Forster, A.H. and Radtkey, R. (2002) Active microelectronic array system for DNA hybridization, genotyping and pharmacogenomic applications: *Psychiatric Genetics*, **12**, 181–92. https://doi.org/10.1097/00041444-200212000-00001

[116] Edman, C.F., Raymond, D.E., Wu, D.J., Tu, E., Sosnowski, R.G., Butler, W.F. et al. (1997) Electric field directed nucleic acid hybridization on microchips. *Nucleic Acids Research*, **25**, 4907–4914.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

[117] Ponnamperuma, F.N., Tianco, E.M. and Loy, T.A. (1966) Ionic strengths of the solutions of flooded soils and other natural aqueous solutins from specific conductance. *Soil Science*, **102**.

[118] Russell, L.L. (1979) Chemical Aspects of Ground Water Recharge with Wastewaters [Internet]. University Microfilms.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

ANNEXE A

Utilisation d'électrolytes spécifiques, le cas de la D-histidine

Dans le cas de l'hybridation ADN/ADN, la conductivité du milieu d'hybridation (PBS) posait problème puisqu'elle empêchait la mise en œuvre des effets électrocinétiques, comme cela a été expliqué dans le Chapitre 4.

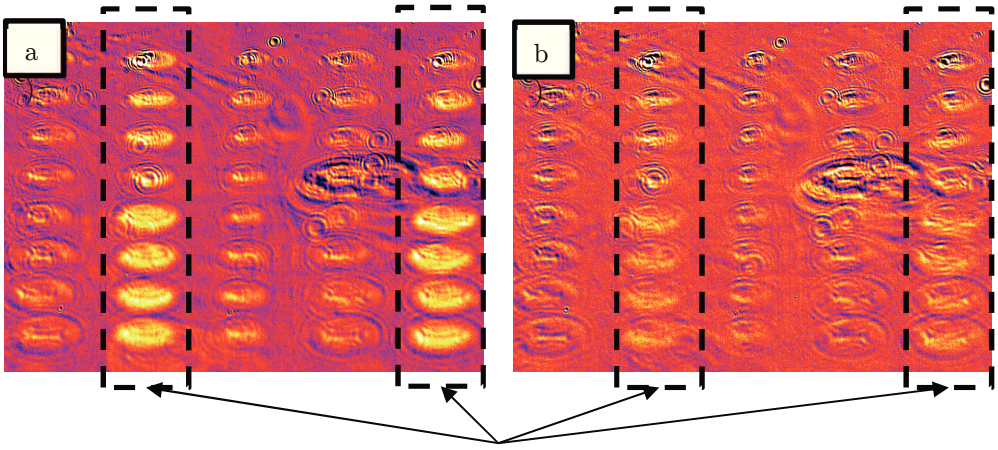


Figure A.2 : Images SPR de la puce obtenues au bout de 5 minutes après le début de l'hybridation a) dans le PBS 2X et b) dans la D-histidine

Une solution envisageable pour ce cas précis est de remplacer le milieu d'hybridation classique (PBS, SSC) par un électrolyte moins courant, une solution aqueuse de D-histidine à 50 mM [116,114,115]. Dans les travaux décrits dans la littérature, l'utilisation de cet électrolyte va de pair avec l'utilisation d'un hydrogel sur la surface fonctionnalisée mais aussi avec l'application d'un offset sur la tension alternative utilisée. Cependant, nous avons voulu vérifier si la seule utilisation d'un électrolyte

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

adapté rendait possible l'utilisation d'effets électrocinétiques tout en permettant l'hybridation ADN/ADN.

Nous avons mené nos propres essais, d'abord en vérifiant que l'hybridation « passive » des brins d'ADN (identiques à ceux utilisés au Chapitre 4) était possible avec notre fonctionnalisation de surface dans cet électrolyte. Celle-ci a bien lieu, comme on peut le voir sur la Figure A.1.

Une comparaison des cinétiques d'hybridation dans cet électrolyte et dans du PBS 2X confirme qu'il y a bien hybridation ADN/ADN dans la D-histidine, sélective qui plus est, mais moins forte que dans le PBS 2X (Figure A.2).

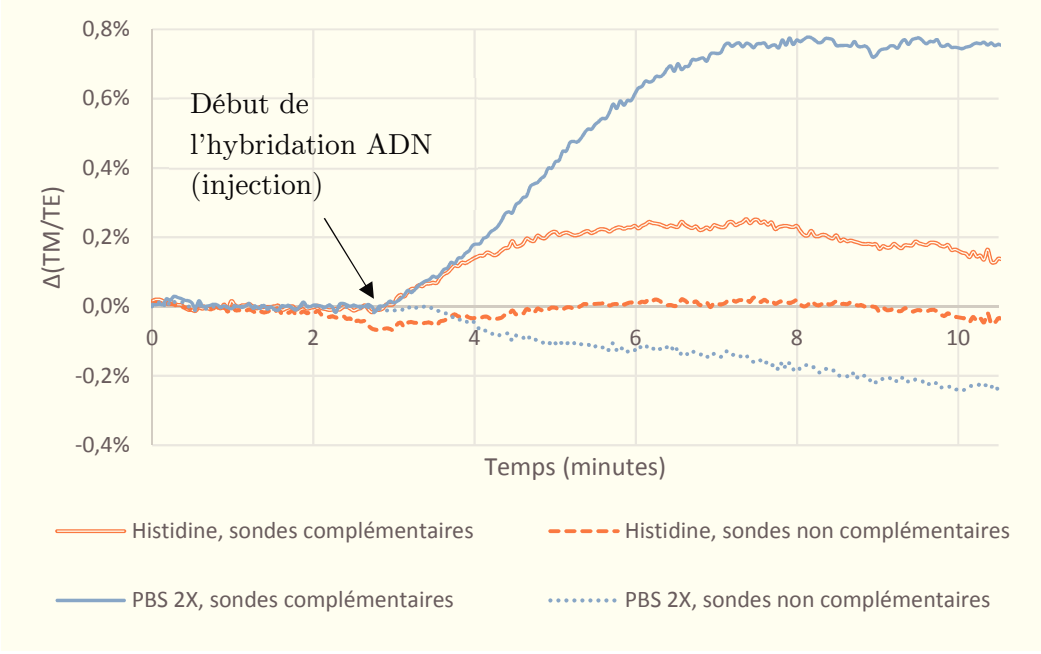


Figure A.2 : Comparaison des cinétiques d'hybridation ADN/ADN dans deux électrolytes différents (PBS 2X et D-histidine).

Nous avons aussi voulu vérifier que la mise en œuvre d'effets électrocinétiques dans la solution de D-histidine est possible. Nous avons donc utilisé notre prototype (électrodes de 200 µm de large, *gap* de 150 µm) et appliqué différentes tensions sinusoïdales sur une solution de billes 200 nm diluées 1000 fois dans la solution de D-histidine à 50 mM.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

Pour une amplitude de 10 Vpp, la gamme de fréquences efficace (i.e. permettant d'attirer les billes sur les électrodes) semble être comprise entre 2.5 kHz et 10 kHz, avec une fréquence optimale se situant autour de 5 kHz. On peut observer sur la Figure A.3 la formation de bandes de billes proches des bords 5 secondes après le début de l'application de la tension (10 Vpp, 5 kHz).

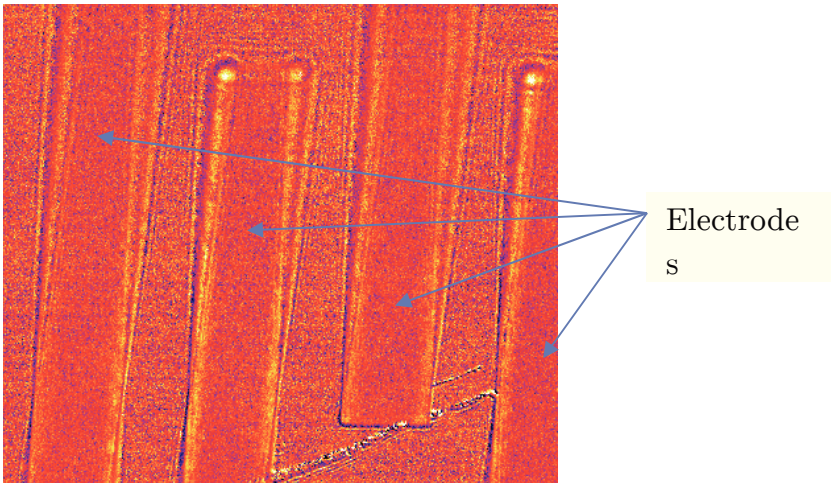


Figure A.3 : Observation en imagerie SPR de l'effet de l'application d'une tension sinusoïdale (10 Vpp, 5 kHz) sur une solution de billes 200 nm diluées 1000 fois dans une solution de D-histidine à 50 mM, 5 s après le début de l'application de la tension.

Ainsi, nous avons vérifié expérimentalement qu'une solution de D-histidine à 50 mM :

- Permet l'utilisation des effets électrocinétiques
- Permet l'hybridation passive entre deux brins d'ADN complémentaires

Nous avons ensuite fonctionnalisé un échantillon prototype avec les brins d'ADN sonde et l'avons utilisé pour évaluer l'efficacité des effets électrocinétiques sur l'hybridation ADN/ADN. Aucun gain au niveau de la cinétique n'a été observé (ni en amplitude, ni en vitesse). Les résultats positifs observés ailleurs dans la littérature [116,114,115] semblent donc nécessiter l'utilisation d'un hydrogel sur la surface fonctionnalisée et/ou l'application d'un offset sur la tension alternative. En outre, si le remplacement de l'électrolyte par cette solution de D-histidine peut être adapté au cas de l'hybridation ADN/ADN, cela n'en fait pas une méthode pertinente pour autant pour la détection et l'analyse d'autres espèces biologiques et cela ne résout pas le problème de

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

l'utilisation des effets électrocinétiques dans des milieux complexes comme le sang. Par conséquent, les pistes évoquées dans la conclusion semblent être plus pertinentes pour les développements futurs de ce genre de dispositifs.

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés

FOLIO ADMINISTRATIF

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON OPEREE AU SEIN DE L'INSA LYON

NOM : AVENAS — DATE de SOUTENANCE : 20/12/2018
Prénoms : Quentin, Jean, Jacques

TITRE : Intégration d'une méthode d'actuation électrocinétique sur biocapteur plasmonique

NATURE : Doctorat — Numéro d'ordre : 2018LYSEI122
Ecole doctorale : ED160 Electronique Electrotechnique et Automatique (EEA)
Spécialité : Génie électrique

RESUME :
Cette thèse porte sur le développement d'un capteur plasmonique intégrant une fonction d'actuation des objets visés. L'objectif est de rompre la limite de diffusion en attirant les analytes sur la surface de détection. La stratégie adoptée est de structurer le film d'or servant à la détection de manière à pouvoir l'utiliser pour mettre en mouvement le fluide et les molécules par le biais de champs électriques. Le transfert de masse est réalisé par diélectrophorèse et électroosmose, deux effets électrocinétiques mis en œuvre par des électrodes servant à la fois d'actuateur et de capteur plasmonique. Un état de l'art exhaustif et des simulations multiphysiques ont permis de concevoir un prototype constitué d'électrodes interdigitées permettant la détection plasmonique. Une première phase de tests sur un système modèle, des billes de polystyrène dans de l'eau, a permis d'apporter la preuve de concept du fonctionnement du capteur, qui est effectivement capable de piéger rapidement les objets visés sur la surface de transduction. Les mécanismes de transfert de masse ont été expliqués et la preuve de l'amélioration de la limite de détection par un facteur supérieur à 100 a été apportée. Dans un second temps, les performances du capteur appliqué à des objets biologiques ont été évaluées. Celui-ci piège efficacement des levures et des protéines, mais n'apporte pas de gain lors de la détection spécifique de l'hybridation entre deux brins d'acide désoxyribonucléique (ADN). Les causes en ont été expliquées et différentes solutions ont été explorées : l'adaptation de la fréquence d'opération et l'optimisation de la géométrie des électrodes. Ainsi, tout en soulignant la problématique de la mise en œuvre des effets électrocinétiques dans des milieux biologiques complexes, les travaux présentés montrent l'efficacité de la stratégie adoptée dans plusieurs cas modèles.

MOTS-CLÉS : Biocapteur ; Résonance de plasmon de surface (SPR) ; Diélectrophorèse (DEP), Electroosmose (ACEO) ; Limite de détection ; Transfert de masse ; Electrodes interdigitées ; Acide désoxyribonucléique (ADN)

Laboratoire (s) de recherche :
Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL) – UMR CNRS 5270
Laboratoire Nanosystèmes et Nanocaractérisation – UMI CNRS 3463
Laboratoire Ampère – UMR CNRS 5005
Laboratoire Charles Fabry – UMR CNRS 8501

Directeur de thèse: Abdelkader Souifi

Président de jury :
PEYRADE, David : Directeur de recherche CNRS, LTM

Composition du jury :
CANVA, Michael : Professeur, LN2
CHARETTE, Paul : Professeur, Université de Sherbrooke
FRENEA-ROBIN, Marie : MCF HDR, UCBL/INSA Lyon
HAGHIRI-GOSNET, Anne-Marie : Directrice de recherche CNRS, C2N
SARRY, Frédéric : Professeur, Université de Lorraine
SOUIFI, Abdelkader : Professeur, INSA Lyon

Cette thèse est accessible à l'adresse : http://theses.insa-lyon.fr/publication/2018LYSEI122/these.pdf
© [Q. Avenas], [2018], INSA Lyon, tous droits réservés