



HAL
open science

Développement et caractérisation de capteurs électromagnétiques utilisant la diélectrophorèse haute fréquence pour l'isolation rapide de cellules souches cancéreuses sur puce

Thomas Provent

► **To cite this version:**

Thomas Provent. Développement et caractérisation de capteurs électromagnétiques utilisant la diélectrophorèse haute fréquence pour l'isolation rapide de cellules souches cancéreuses sur puce. Electronique. Université de Limoges, 2022. Français. NNT : 2022LIMO0039 . tel-03701182

HAL Id: tel-03701182

<https://theses.hal.science/tel-03701182v1>

Submitted on 21 Jun 2022

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

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

Université de Limoges

**ED 610 - Sciences et Ingénierie des Systèmes, Mathématiques,
Informatique (SISMI)**

XLIM _ UMR CNRS 7252

Thèse pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Discipline : Electronique des Hautes Fréquences, Photonique et Systèmes

Présentée et soutenue par
Thomas PROVENT

**Développement et caractérisation de capteurs électromagnétiques
utilisant la diélectrophorèse haute fréquence pour l'isolation rapide
de cellules souches cancéreuses sur puce**

Thèse dirigée par Annie BESSADOU, Arnaud POTHIER et Claire DALMAY

JURY :

Rapporteurs

M. Vincent Senez, Directeur de Recherche CNRS HDR au Laboratoire CANTHER

M. Olivier Français, Professeur à l'ESIEE, Responsable Département Santé, Energie
et Environnement Laboratoire ESYCOM

Examineurs

Mme. Anne-Laure Deman-Him, Maître de conférence HDR, INL de Lyon

M. Fabrice Lalloué, Professeur, Université de Limoges, UMR INSERM CAPTuR

Mme. Annie Bessadou, Professeur, XLIM, Université de Limoges

M. Arnaud Pothier, Chargé de Recherche CNRS, XLIM, Université de Limoges

Invités

Mme. Claire Dalmay, Maître de conférences, XLIM, Université de Limoges



A ceux qui ont lu et liront ces pages.

« *Pratique le feu sacré, mais Prométhée n'est qu'un virage de flamme* »
Lucio Bukowski, *Le noble sentier octuple*

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Table des matières

Droits d'auteurs	4
Table des matières	5
Table des illustrations	8
Table des tableaux	19
Introduction générale	20
Partie I. La cellule de sa caractérisation à sa manipulation	23
I.1. Introduction	23
I.2. La cellule eucaryote	24
I.3. L'Electro-manipulation	27
I.3.1. Principe	27
I.3.2. La diélectrophorèse en basse fréquence	31
I.3.3. Montée en fréquence : DEP-UHF	35
I.3.4. Viabilité cellulaire et caractère non-invasif de la méthode :	37
I.4. Le tri cellulaire : contexte et enjeux	40
I.4.1. Les différentes techniques de tri avec marqueurs	41
I.4.1.1. Tri par marqueurs fluorescence (FACS)	42
I.4.1.2. Tri par marqueurs magnétiques (MACS)	44
I.4.2. Les différentes techniques de tri dites « label-free »	46
I.4.2.1. Intégration sur un laboratoire sur puce	47
I.4.2.2. Techniques fluidiques passives	48
I.4.2.3. Tri par Fractionnement par Flux Force	50
I.4.2.4. Tri par force optique	52
I.4.2.5. Tri par force acoustique	53
I.4.3. Différentes utilisations de la force de diélectrophorèse	55
I.4.3.1. Tri par emprisonnement	55
I.4.3.2. Tri par déviation	56
I.4.3.3. Tri par décalage temporel	59
I.4.3.4. Tri cellulaire contrôlé par analyse	60
I.4.3.5. Choix retenu de l'approche à mettre en œuvre dans ces travaux	61
I.4.3.6. Intégration des électrodes	62
I.5. Conclusion du chapitre	64
Références bibliographiques du chapitre I	66
Partie II. Caractérisation des cellules et du champ électrique et premier prototype	71
II.1. Introduction	71
II.2. Modélisation et caractérisation diélectrique d'une cellule	73
II.2.1. Modèles diélectriques de la cellule aux fréquences UHF et facteur de Clausius-Mossotti f_{CM}	73
II.2.2. Variation des caractéristiques diélectriques et influence du milieu de suspension	74
II.2.3. Lien entre la caractérisation d'une cellule et ses propriétés diélectriques	78
II.2.3.1. Caractériser une cellule par mesure de sa fréquence de transition UHF f_{x0278}	78
II.2.3.2. Caractériser une cellule à partir de $Re[f_{CM}]$ à une fréquence donnée	80
II.3. Evaluation des forces s'appliquant aux cellules en suspension dans le microsystème	84

II.3.1. Présentation des différentes forces s'exerçant sur une cellule en flux	84
II.3.1.1. Force de trainée	84
II.3.1.2. Force de portance	86
II.3.1.3. Force de Magnus	88
II.3.1.4. Force de flottabilité	88
II.3.1.5. Mouvement Brownien	90
II.3.2. Ordres de grandeur	91
II.4. Conception des électrodes pour la génération du champ électrique.....	96
II.4.1. Géométrie et tension d'alimentation	96
II.4.2. Transmission du signal DEP jusqu'au canal microfluidique	105
II.5. Conception d'un premier système de tri à partir des fréquences de transition.....	110
II.5.1. Utilisation de la fréquence de transition comme critère de séparation.....	110
II.5.2. Implémentation d'un premier système de tri	113
II.5.3. Fabrication de premiers prototypes	118
II.5.4. Validation Expérimentale	120
II.5.4.1. Validation des trajectoires de déviation	120
II.5.4.2. Ajustement de la fréquence sur le tri pour séparer un échantillon de cellules	123
II.6. Conclusion	127
Références bibliographiques du chapitre II.....	129
Partie III. Optimisation et validation du cytomètre sur puce et des conditions de tri par diélectrophorèse haute fréquence	133
III.1. Etude de la trajectoire d'une cellule au sein de la zone de tri	133
III.1.1. Étapes de déviation	134
III.1.2. Accélération d'une cellule soumise à une force constante	137
III.1.3. Régime permanent d'une cellule déviée	140
III.2. Cibler des cellules selon les conditions de tri	144
III.3. Mise en place des expériences	147
III.3.1. Conception et fabrication d'un microsystème de tri optimisé.....	148
III.3.2. Trajectoires des cellules et conditions de traversée du champ électrique	151
III.3.3. Banc expérimental.....	153
III.3.4. Population cellulaire de référence utilisée.....	155
III.4. Conditions expérimentales et observations optiques.....	158
III.4.1. Suivi automatisé	158
III.4.2. Traitement statistique des résultats	162
III.4.3. Procédure de manipulation	164
III.4.4. Reproductibilité des conditions de manipulation	165
III.5. Résultats expérimentaux.....	166
III.5.1. Tri d'une population de cellules de glioblastomes issues de la lignée U87-MG.....	167
III.5.1.1. Influence de la puissance du signal DEP	167
III.5.1.2. Influence de la vitesse du flux	168
III.5.1.3. Influence de la fréquence du signal DEP.....	169
III.5.2. Influence de la taille des cellules sur le tri.....	171
III.5.3. Susceptibilité diélectrophorétique d'une population cellulaire	173
III.6. Conclusion	180
Partie IV. Conclusion générale et perspectives :.....	182
IV.1. Conclusion.....	182

IV.2. Perspectives :	183
Références bibliographiques du chapitre III et des Conclusion générale et perspectives ...	187

Table des illustrations

Figure.1 : Schéma d'une cellule eucaryote et ses constituants. 13 est un organe uniquement présent dans les cellules animales. [2].....	24
Figure.2 : (a) Image d'une cellule CHO sous un microscope DIC inversé. (b) Modèle à quatre couche représentant la cellule constituée du noyau cellulaire, l'enveloppe nucléaire, le cytoplasme et la membrane plasmique. Chaque couche a ses propres propriétés diélectriques et dimensions. [3]	25
Figure.3 : Représentation en circuit électrique du modèle quatre couches d'une cellule eucaryote. [4]	25
Figure.4 : Circuit électrique simplifié d'une cellule eucaryote modélisée par 2 compartiments : la membrane plasmique, représentée par la mise en parallèle de la résistance et la capacitance de la membrane, et l'intérieur de la cellule qui est lui simplifié avec la combinaison série d'une résistance et d'une capacitance liées aux caractéristiques diélectriques internes globales. [5].....	26
Figure.5 : Séquence d'images d'une cellule soumise à un champ électrique (un débris cellulaire en arrière-plan se déplace du fait du flux). (a) pas de champ électrique appliqué par la pointe ; (b, c) un signal de 10 kHz est appliqué à l'électrode. A cette fréquence la cellule apparait tel un objet isolant et est ainsi repoussée par le champ; (d) le signal est maintenant à 10 MHz, le champ pénètre maintenant dans le cytoplasme ; (e, f) la cellule apparait maintenant comme un objet conducteur et se retrouve attirée par le champ. [7]	27
Figure.6 : Photographies illustrant les effets du champ électrique sur des globules rouges. a) à 100 kHz provoquant un effet d'attraction (pDEP) et b) à 10 kHz provoquant un effet de répulsion (nDEP). [8].	28
Figure.7 : Schéma présentant la force DEP induite sur un dipôle en présence d'un champ électrique non-uniforme. a) DEP Positive ; a) DEP Négative. [10]	28
Figure.8 : Représentation des lignes de champ autour d'une particule dans un champ uniforme :	29
Figure.9 : Parties imaginaire et réelles du f_{CM} pour un modèle à quatre couches. Les permittivités et conductivités rentrées en paramètre sont présenté dans le Tableau.1 et calculé par le logiciel MyDEP [14] Pour un milieu de $\epsilon_{medium} = 78$; $\sigma_{medium} = 0.05$ S/m.	31
Figure.10 : Exemple de variation de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence (échelle logarithmique) pour des cellules vivantes et mortes dans un milieu de faible conductivité ($55 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$) [16].	32
Figure.11 : Première fréquence de transition de cellules venant de différentes lignées de tumeurs chez l'humain et de cellules sanguines périphériques déduites par une analyse DEP-FFF dans un milieu de $30 \text{ mS}\cdot\text{m}^{-1}$. La finesse de chaque barre de couleurs représente la distribution du nombre de cellules à ladite fréquence de transition. [17].....	33
Figure.12 Schéma présentant le déphasage entre les signaux pour générer un champ tournant [21].....	35
Figure.13 : Séquence d'images sous microscope optique de la mesure de la fréquence de transition f_{XO2} (119 MHz) pour une cellule de glioblastome (U87) par la variation de la	

fréquence du signal du champ électrique appliqué. Aux fréquences supérieures à 119 MHz, la cellule est repoussée au centre des électrodes en nDEP, et en dessous de cette fréquence, la cellule est attirée par le champ en pDEP [26].	36
Figure.14 : Graphique en boîte présentant les secondes fréquences de transition de cellules U87-MG et LN18 cultivées dans deux conditions différentes : en bleu la culture est faite en milieu normal (NN) en rouge une culture en milieu défini (DN). Les valeurs de p sont déterminées par One-way ANOVA test. *** représente une valeur de $p < 0,0001$; ** représente une valeur de $p < 0,001$. [26]	37
Figure.15 : Viabilité des cellules exposées à un champ électrique sur des temps allant de 15 à 135 minutes pour différentes intensités de champ dans un milieu aqueux composé de sucrose (80,7 g/L), de dextrose (4,4 g/L), et d'HEPES en tant qu'agent tampon pour le pH (2,4 g/L) [29].	38
Figure.16 : a) système utilisé dans un canal microfluidique de 22 μm de profond, les électrodes sont en noir. Les cellules testées sont entre le gap de 10 μm au centre de la photographie. b) Pourcentage de cellules mortes par rapport à la tension appliquée à 100 kHz (bleu) et à 10 MHz (orange). Les photos incérées montrent la vérification optique de la viabilité de la cellule par fluorescence verte. [30].	39
Figure.17 : Schéma présentant le marquage d'une cellule au travers d'anticorps (marquage direct) et d'anticorps plus As pour permettre l'accroche de la particule magnétique sur l'anticorps (indirect). [32]	41
Figure.18 : Schéma d'un tri cellulaire par cytométrie en flux FACS. (1) injection de l'échantillon de cellules centrées par un flux de focalisation qui permet d'aligner les cellules les unes à la suite des autres. (2) passage des cellules pré-alignées devant un laser et mesures cellule par cellule de leur taille par dispersion directe (Foward Scatter FSC), et de leur fluorescence (Side Scater SSC). (3) avant de sortir du système au travers d'une buse, les cellules sont individuellement chargées électriquement. (4) déviation des cellule par un électro-aimant, les dirigeant dans différents tubes en sortie (5) [34]	43
Figure.19 : Schéma illustrant les étapes d'un tri par MACS à aimant permanent externe. Le tri est réalisé grâce à la présence de matériaux ferromagnétiques fixés sur des antigènes utilisés pour marquer les cellules. [36]	44
Figure.20 : A) Photographie d'une puce microfluidique avec à droite les entrées cellules et buffer, puis la zone de séparation qui guide les cellules vers l'une des 5 sorties de gauche suivant leur réaction au champ magnétique. B) migration de macrophages vers différentes sorties selon leur différente charge magnétique. C) Après tri, la masse de fer de chaque fraction de cellule est quantifiée par un système de magnétophorèse. [37]	45
Figure.21 : Diagramme résumant les principales méthodes de séparation en flux continu développées dans la littérature. La diélectrophorèse mise en évidence en noir sera la technique utilisée dans ces travaux de thèse. Sont encadrées en bleu des techniques qui seront discutées [38, p. 167].	46
Figure.22 : Impact des lois d'échelles sur les rapports entre les puissances.	47
Figure.23 : La présence des parois modifie le profil de vitesse. a) le canal est large et la vitesse se stabilise à une certaine distance des parois ; b) le canal est étroit, ne permettant pas une stabilisation de la vitesse. Le profil de vitesse s'en trouve être parabolique.	48

Figure.24 : Schéma de principe de la méthode de séparation par différence de taille. À gauche en bleu, vert et jaune les patterns que prennent les parcours du liquide entre les piliers. Les plus petites particules peuvent suivre le chemin fléché en vert, alors que les plus larges cellules ne peuvent suivre la trajectoire du flux du fait de leur taille, les menant ainsi vers la droite et générant ainsi une séparation des particules. [44].....49

Figure.25 : A) Image par Microscopie Electronique à Balayage des microcanaux d'un système de tri opérant par inertie. B) Images expérimentales montrant en sorties a) une bille de large diamètre prendre la sortie du haut et b) une bille de petit diamètre prenant la sortie du bas. C) schéma des trajectoires théoriques selon la taille des particules. [45].....50

Figure.26 : Schéma de la vue de côté d'un canal de SdFFF dans une centrifugeuse. L'application d'un champ gravitationnel perpendiculaire au flux mène les particules injectées à prendre différentes hauteurs dans le canal suivant leurs caractéristiques induisant des différences de vitesses du fait du profil parabolique du flux. [48]51

Figure.27 : Schéma représentant un système de tri de micro/nano particules par la combinaison de forces optiques et fluidiques. [50].....52

Figure.28 : (a) Système combiné de piégeage optique holographique et de vidéo microscopique holographique. Cette combinaison permet de suivre et de caractériser des sphères de silice pendant la séparation optique. (b) Image de 103 pinces optiques holographiques dans le plan focal du microscope. 4 trajectoires de sphères de propriétés différentes sont présentées avec les rouges déviées jusqu'à la zone centrale et les jaunes n'étant pas assez impactées pour changer de course. (c) Image holographique d'une sphère de silice de 1,5 μm de diamètre. [22].....53

Figure.29 : schéma d'un étage de séparation par acoustophorèse. A) vue de dessus illustrant la répartition que prend la séparation le long du transducteur. B) Vue de côté présentant la séparation des lipides et des globules rouges. C'est la dominance entre la force de gravité ou de portance sur les particules capturées qui réalise cette séparation. [52]54

Figure.30 : Différents motifs de disposition de billes obtenus selon différentes fréquences de vibration : (a) 1 MHz ; (b) 3-6 MHz ; (c) 7 MHz ; (d) 8 MHz ; (e) 9 MHz ; (f) 13 MHz ; (g) 17 MHz ; (h) 18 MHz ; (i) 22 MHz. Les flèches montrent les directions qu'empruntent les microbilles de silice avant de se stabiliser dans les positions stables observées. [53]54

Figure.31 Schéma décrivant les étapes d'un tri par piégeage : a) Le champ est activé et l'échantillon à trier passe dans la zone de tri ; b) une fois l'échantillon écoulé, les cellules ne réagissant pas assez au champ ont été collectées (rouges), seules restent les cellules qui ont été piégées par le champ électrique (violette) ; c) le champ est désactivé et les cellules piégées sont collectées à leur tour.55

Figure.32 : Photographie par fluorescence de la démonstration du système de tri par DEP-BF après un fonctionnement de (a) 1 minute et de (b) 3 minutes. Le bord des parois en blanc est ajouté après photographie. Un champ électrique AC de 40 kHz est appliqué. Il permet de piéger les cellules MDA-MB-231 (vertes) pendant que les cellules Jurkat (jaunes) continues à être portées par le flux. [57]56

Figure.33 : (a) Implémentation d'un système de tri par DEP constitué de deux réseaux d'électrodes en vis-à-vis ; (b) la différence de force DEP appliquée sur la particule par chaque réseau d'électrodes détermine la position d'équilibre de la cellule dans le canal.

Cette position d'équilibre pousse les particules vers une sortie différente selon les particules. [38].....	57
Figure.34 : (a) Schéma en vue de dessus d'un système de séparation de cellules par twDEP. Selon la direction de la force DEP liée à $\text{Im}[f_{CM}]$ les cellules vont prendre différentes sorties ; b) Une cellule en +twDEP suis toujours la phase présentant le plus haut potentiel et se déplace donc dans le sens de propagation de l'onde, au contraire, une cellule en -twDEP va vers le plus bas potentiel [59].	58
Figure.35 : Utilisation de la TwDEP pour réaliser un tri par décalage temporel. a) système d'électrodes présentant 4 phases toutes décalées de 90° ; b) chronogramme de collections des cellules dans le cas d'une population accélérée par le champ (rouge) et d'une seconde ralentie par celui-ci (violet) ; c) le temps entre l'injection des premières et des dernières cellules est trop long ainsi les populations ne se discernent plus dans le temps.....	59
Figure.36 : Principe de fonctionnement : (a) en l'absence de cellules les signaux sont synchronisés, (b) en présence d'une cellule selon la capacité propre engendrée par la cellule sous test, le déphasage du signal d'analyse avec le signal de référence ne sera pas le même. Cette différence permet de choisir dans quelle sortie guider la cellule analysée. [61, p. 95].....	61
Figure.37 : quatre approches de tri et leurs principaux avantages et inconvénients.	62
Figure.38 : Risque de fuite dans le cas de parois de canaux mal disposés au-dessus des électrodes disposées dans le canal.....	63
Figure.39 : Modélisation d'une cellule biologique immergée dans d'un milieu liquide. par un modèle homogène, mono-enveloppe et bi-enveloppe.	73
Figure.40 : Comparaison des modèles homogène (courbes violette et rouge), mono-enveloppe (courbes verte et marron) et bi-enveloppe (courbes bleue et orange). Rayon cellule = $10 \mu\text{m}$. Les propriétés utilisées sont récapitulées dans le Tableau.4. Caractéristiques diélectriques du milieu : $\epsilon_m = 72$; $\sigma_m = 38 \text{ mS.m}^{-1}$	74
Figure.41 : Influence des caractéristiques diélectriques intracellulaire sur f_{CM} dans le cas d'un modèle homogène. Les paramètres invariants sont ceux présentés dans le Tableau.4. A) Variation de la permittivité relative entre 45 et 75 ; B) Variation de la conductivité entre 0,2 et 1 S.m^{-1} . Les courbes en gras sont liées à la valeur de conductivité/permittivité la plus faible affichée. Caractéristiques diélectriques du milieu de suspension : $\epsilon_m = 72$; $\sigma_m = 38 \text{ mS.m}^{-1}$	75
Figure.42 : Evolution de $f_{CM}(\omega)$ selon les caractéristiques diélectriques d'une cellule par rapport à celles du milieu de suspension ($\epsilon_m = 72$; $\sigma_m = 38 \text{ mS.m}^{-1}$) pour un modèle mono-enveloppe. Caractéristiques de la membrane : épaisseur = 6 nm ; $\epsilon_{mem} = 12$; $\sigma_m = 1 \mu\text{S.m}^{-1}$	76
Figure.43 : Evolution de $f_{CM}(\omega)$ pour un modèle mono-enveloppe par rapport aux caractéristiques diélectriques du milieu de suspension. A) Variation de la permittivité relative entre 70 et 80 ; B) Variation de la conductivité entre 20 et 50 mS.m^{-1} . La cellule présente les caractéristiques diélectriques décrites dans le Tableau.4 pour le modèle mono-enveloppe..	77
Figure.44 : Evolution de $f_{CM}(\omega)$ pour trois couples de valeurs de permittivité relative et conductivité différentes résultant en une fréquence de transition identique.	78

Figure.45 : Couples de conductivité et permittivité relative possibles, en considérant un modèle homogène, pour une cellule immergée dans un milieu de suspension de permittivité relative de 72 et de conductivité de 38 mS.m ⁻¹ et qui présente une fréquence f_{X02} de 250 MHz.....	79
Figure.46 : Couples de conductivité et permittivité relative possibles pour des cellules présentant différentes f_{X02} , en considérant un modèle homogène, pour des cellules immergées dans un milieu de suspension de permittivité relative de 72 et de conductivité de 38 mS.m ⁻¹	80
Figure.47 : Couples de conductivité et permittivité relative possibles, en considérant un modèle homogène pour des cellules présentant différentes valeur de f_{CM} , cellules immergées dans un milieu de permittivité relative de 72 et de conductivité de 38 mS.m ⁻¹ selon leur f_{CM} pour un signal de 200 MHz.....	81
Figure.48 : Couples de conductivité et permittivité relative possibles dans un modèle homogène pour des cellules selon la fréquence à laquelle la cellule exprime un f_{CM} de -0,02 ou de 0,02 dans un milieu de permittivité relative de 72 et une conductivité de 38 mS.m ⁻¹ ...	82
Figure.49 : Couples de valeurs $(\epsilon-\sigma)_c$ possibles pour une cellule selon les valeurs de f_{CM} considérées. Par mesure de $f_{X02} = 200$ MHz : courbe rouge. Par mesure de $f_{CM} : 0,04$ à 150 MHz et -0,02 à 300 MHz. Le point orange représente l'intersection de ces courbes et donc le seul couple $(\epsilon-\sigma)_c$ en adéquation avec les données des mesures réalisées dans un milieu de permittivité relative de 72 et une conductivité de 38 mS.m ⁻¹	83
Figure.50 : Directions de la force de trainée selon si la vitesse de la cellule est a) supérieure, b) inférieure) ou c) égale à la vitesse du flux. Les lignes de flux sont considérées pour des nombres de Reynolds inférieur à 1.....	85
Figure.51 : Relevés expérimentaux du coefficient de trainée c_D par rapport au nombre de Reynolds pour trois géométries différentes de particules [19].....	85
Figure.52 : Shéma présentant la force de portance proportionnelle à la vitesse relative du milieu et au gradient du flux.....	86
Figure.53 : A) Profil de la vitesse du flux dans des canaux de différentes largeurs avec une pression imposée afin d'avoir une vitesse de 8 mm/s. B) Gradient des profils de vitesses de A). Tous deux simulés sous COMSOL Multiphysics.....	87
Figure.54: Shéma présentant la force de Magnus proportionnelle à la vitesse relative et à la rotation de la particule.....	88
Figure.55: Shéma présentant la force de flotaison proportionnelle au gradient de pression autour de la particule.....	89
Figure.56 : Simulation du mouvement aléatoire d'une particule lié à l'effet du mouvement Brownien. [29].....	90
Figure.57 :Amplitude de déplacement d'une particule en une seconde induit par différents phénomènes en fonction de sa taille (flux : 20 mm.s ⁻¹ ; hauteur canal : 45 μ m ; tension DEP appliquée: 5 Vpp ; écart des électrodes : 25 μ m ; $\sigma_m : 0,01$ S.m ⁻¹). Graphique repris de A. Castellanos et al [26].....	91

Figure.58 : Déplacement d'une particule de diamètre 20 μm en une seconde lié à différentes forces selon la tension appliquée (flux : 10 mm.s^{-1} ; hauteur canal : 45 μm ; écart des électrodes : 25 μm ; σ_m : 0,01 S.m^{-1}). Graphique repris de A. Castellanos et al [26].....	93
Figure.59 : 2 systèmes d'évaluation de force DEP. A) électrodes planaires générant une force opposée à la gravité par inclinaison de la puce (tension : 20 Vpp), la force DEP est présentée pour une particule de 14 μm de diamètre ; B) Plots métalliques réalisant un piège DEP opposé à la vitesse du flux (espace inter-plots : 30 μm et 50 μm), la force DEP est évaluée pour 3 diamètres de bille. [18], [30]	94
Figure.60 : Différentes projections des lignes de champ électrique entre deux électrodes planaires sur le bord d'un micro-canal. (a) Electrodes en vis-à-vis; (b) Arrangement symétrique d'électrodes coplanaires dans un plan à demi-ouvert ; (c) Largeur asymétrique d'électrodes coplanaires ; (d) Electrodes disposés à la perpendiculaire l'une de l'autre sur l'angle d'un canal; (e) Arrangement symétrique d'électrodes coplanaires dans un canal de 80 μm de haut. [32]	97
Figure.61 : Génération d'un champ électrique entre deux électrodes de 1 μm d'épais, espacées de 30 μm (lignes jaunes) alimentées en 5 V_{max} alternatif. Les lignes de champ sont représentées en rouge. Le champ se propage à la fois dans l'eau (de 0 à 45 μm en hauteur) que dans le substrat de silicium (de 0 à -45 μm en hauteur) ou dans le PDMS (de 45 à 90 μm en hauteur).....	98
Figure.62 : Orientation de la force de DEP selon f_{CM} et $\nabla E^2 $ auquel elle est proportionnelle. Les deux zones rouges montrent les zones où le gradient de champ est le plus intense.....	99
Figure.63 : Différence du gradient du champ au carré ($\nabla E^2 $) selon la distance d'observation au dessus des électrodes (en jaune). Signal: 5 V_{max} à 500 Mhz ; écart des électrodes : 30 μm ; épaisseur d'électrodes : 2 μm	100
Figure.64 : Impact de l'épaisseur des électrodes (en jaune) sur le gradient du champ au carré ($\nabla E^2 $) pour une même altitude au dessus des électrodes. Signal: 5 V_{max} à 500 Mhz ; altitude au dessus des électrodes : 20 μm ; écart des électrodes: 30 μm	101
Figure.65 : Impact de l'intensité du signal appliqué aux électrodes (en jaune) sur le gradient du champ au carré ($\nabla E^2 $). altitude : 20 μm ; écart des électrodes: 30 μm ; épaisseur d'électrodes : 2 μm	101
Figure.66 : Courbes présentant le lien entre le gradient du champ électrique et la tension. Nous y observons une tendance linéaire à V_{max}^2 que cela soit pour les maximums de champ ou la moyenne des valeurs du gradient de champ dans les environs du maximum. En bas à droite sont représentées les électrodes et les zones autour des maximums de champ que nous avons considéré.....	102
Figure.67 : Impact de la distance inter électrodes sur le gradient du champ au carré ($\nabla E^2 $). Les électrodes sont représentées sur le bas en jaune encadrées par la couleur correspondant à la courbe liée. Les pointillées violet mettent en évidence la correspondance des pics du gradient par rapport aux électrodes. Tension inter électrodes : 5 V_{max} ; altitude d'observation au dessus des électrodes : 20 μm ; épaisseur d'électrodes : 2 μm	103
Figure.68 : Vue de coupe d'une ligne CPW. [34]	105
Figure.69 : Schéma de la ligne CPW et des milieux traversés depuis la zone de pose des pointes RF (tronçon 1) jusqu'à la zone de tri de cellules (tronçon 4).	106

Figure.70 : A) : Représentation des coefficients S_{11} , S_{22} , S_{12} et S_{21} sur un port CPW pris entre 2 ports. B) Coupe transversale (plan YZ) du modèle de simulation sous HFSS. Ligne CPW de 10 mm.	107
Figure.71 : Résultat de simulation avec HFSS. CPW recouverte d'air, $g= 24 \mu\text{m}$ et $w= 120 \mu\text{m}$	108
Figure.72 : Résultat de simulation avec HFSS. CPW sous un milieu de permittivité 2,75, $g= 30 \mu\text{m}$ et $w= 84 \mu\text{m}$	109
Figure.73 : Utilisation de f_{signal} pour guider une cellule soit par effet attractif pDEP, soit par effet répulsif nDEP.	110
Figure.74 : Schéma d'un système séparant les cellules attirées le long des électrodes des autres cellules (repoussées ou n'interagissant pas ou trop peu avec le champ). Un focus hydrodynamique est d'abord réalisé avant la zone de tri. Deux sorties distinctes collectent les cellules ainsi séparées. [40].	111
Figure.75 : A) Exemples de signatures DEP (f_{X02}) de deux populations de cellules. B) Lien entre ces signatures avec des valeurs de f_{CM} possibles.	113
Figure.76 : Détail de la zone de tri : A) Modèle de simulation ; B) Simulation du champ électrique à $15 \mu\text{m}$ d'altitude généré par une tension de 10 Vpp entre les électrodes de $2 \mu\text{m}$ d'épaisseur ; C) Simulation de $\nabla E ^2$ dans les mêmes conditions. Les traits blancs mettent en évidence la position des électrodes.	114
Figure.77 : Photographie d'une puce ; angles de 20° et -20° . La ligne en pointillé blanche représente la trajectoire des cellules sans effet de champ électrique.	115
Figure.78 : Vue d'ensemble de la puce microfluidique avec à gauche les entrées, au centre la zone de tri et à droite les trois sorties rassemblées dans un seul réservoir pour une simplification fluide. [43].	116
Figure.79 : Variation de vitesse dans un canal selon sa résistance microfluidique pour une différence de pression donnée. P : pression ; V : vitesse ; R : résistance fluide. La taille de police des variables est liée à leur intensité : $P_1 > P_2$; $R_3 > R_2 > R_1$ donc $V_3 < V_2 < V_1$	117
Figure 80 : Schéma des différentes étapes de la fabrication de la puce microfluidique depuis A) le Wafer à nu, à F) la puce avec les motifs d'électrodes réalisées.	118
Figure.81 : Schéma des différentes étapes de la fabrication du capot de PDMS avec les motifs de canaux microfluidiques imprimés.	119
Figure.82 : Système de pressage permettant de maintenir en contact étanche le PDMS et la puce.	120
Figure.83 : Superposition d'images de déviations de cellules réalisées à partir d'un signal DEP de fréquence 50 MHz sur des cellules de lignée U87-MG. À cette fréquence, les cellules peuvent prendre trois trajectoires possibles dans le système du fait de leurs caractéristiques diélectriques intracellulaires propres. La ligne en pointillé orange représente la ligne de « décrochement », au-dessus de laquelle les cellules en nDEP sont relâchées. Vitesse du flux de l'ordre de $6,4 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, puissance en entrée de 27,5 dBm.	121
Figure.84 : Superposition d'images de déviations avec des cellules de lignée LN18 réagissant en nDEP et en pDEP simultanément. Fréquence du signal à 65 MHz. Vitesse du flux de l'ordre de $3 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$, puissance en entrée de 33 dBm.	123

Figure.85 : Superpositions d'images montrant l'influence de la fréquence du signal DEP appliquée au système en présence d'une population de cellules de type U87-NG. Entre les photos, les lignes et les flèches rouges représentent la fréquence de tri utilisée par rapport à la signature DEP établie au préalable pour cette population.....	124
Figure.86 : Superposition d'images d'une déviation à 70 MHz sur des cellules de type U87. Nous observons que les cellules sur le haut de l'image subissent une attraction car elles passent sous la ligne pointillée de « décrochage », mais la force pDEP est insuffisante pour guider les cellules jusqu'à la sortie centrale. Vitesse de l'ordre de 8 mm.s ⁻¹ , puissance en entrée de 29,87 dBm.	125
Figure.87 : Trajectoires possibles d'une cellule se déplaçant dans le canal microfluidique et entrant dans la zone de champ électrique la plus intense : A) Déviation de la cellule car la force DEP est suffisante ; B) La cellule traverse le maximum de champ car la force DEP est trop faible.	134
Figure.88 : L'environnement considéré est un plan 2D avec pour axe x la longueur du canal dirigé des entrées aux sorties, et l'axe y la largeur de ce canal allant du bas du repère vers le sommet de celui-ci. Deux électrodes parallèles et tournées d'un angle α en sens anti-trigonométrique par rapport à l'axe x sont polarisées par une tension V_{pp} alternative, générant un gradient de champ $\nabla E ^2$. Un flux se déplace dans le sens de l'axe x et présente un profil uniforme selon l'axe y.	136
Figure.89 : Décomposition en 3 étapes la déviation de trajectoire d'une cellule repoussée par le champ. A) La cellule se déplace à la même vitesse que le flux sans subir de perturbation. B) Arrivée à proximité du champ électrique, la cellule subit une force qui perturbe sa course entraînant une accélération et donc une variation de vitesse par rapport à celle du fluide. C) Un équilibre entre forces diélectriques et fluidiques est trouvé permettant à la cellule de suivre de nouveau un mouvement rectiligne uniforme le long des électrodes.....	136
Figure.90 : Evolution de la somme des forces au cours du temps. La vitesse gagnée par la cellule durant l'accélération à un temps donné est liée à toutes les forces appliquées sur celle-ci depuis le début du régime transitoire. Cette différence de vitesse croissante par rapport au fluide augmente la force de traînée, diminuant ainsi l'accélération de la cellule au cours du temps jusqu'à un équilibre entre les deux forces, mettant fin au régime transitoire.	139
Figure.91 : Impact de l'angle des électrodes par rapport à la direction du flux sur la déviation d'une cellule de 15 μm de diamètre pour différentes conditions de tri électrique et fluidique. Les électrodes sont distantes de 30 μm	141
Figure.92 : Impact de la vitesse du flux sur la déviation d'une cellule pour différents angles d'électrodes, pour une tension de 12,5 V_{pp} et un écart inter électrodes de 30 μm	143
Figure.93 : Impact de la tension appliquée aux électrodes sur la déviation de la cellule pour différents angles d'électrodes, pour une vitesse de flux de 6 mm.s ⁻¹ . Lien tension-gradient du champ est calculé à partir des maximums de champs simulés sous COMSOL : $\nabla E ^2 = V^2 \cdot 1,56E^{12} \text{ m}^{-1}$	143
Figure.94 : évolution de f_{CM} de trois cellules différentes. Le choix des conditions de tri influence dans quelle sortie sont collectées les cellules. Conditions de tri optimales possible : Fréquence : 265 MHz +/- 45 MHz ; tension V_{pp} : 12,5 V ; vitesse flux : 6 mm.s ⁻¹	145

Figure.95 : Tri de deux populations cellulaires distinctes présentant des caractéristiques biologique différentes. En appliquant une tension de 10,1 V à 400 MHz et une vitesse de flux de 5 mm.s ⁻¹ et avec des angles de 35°, 45° et 60° nous obtenons une séparation.	146
Figure.96 : Photographie d'une puce microfluidique avec zoom sur la zone de tri où deux formes d'électrodes sont présentées. Les canaux microfluidiques sont identiques pour les deux géométries.....	148
Figure.97 : Gradient de champ à la perpendiculaire de la ligne CPW immergée dans le canal. Les maximums de champs positifs vont être les zones qui vont permettre de dévier le plus efficacement les cellules. En jaune sont représentées les électrodes polarisées à 600 MHz par un signal de 5 Vpp. Hauteur observée : 20 µm. Simulation réalisée avec COMSOL Multiphysics.....	149
Figure.98 : Perte d'intensité des maximums de gradient de champ centraux avec une électrode centrale de 40 µm. En jaune sont représentées les électrodes polarisées à 600 MHz par un signal de 5 Vpp. Hauteur observée : 20 µm. Simulation réalisée avec COMSOL Multiphysics.....	150
Figure.99 : Réalisation des canaux par lithographie UV d'un film sec de résine négative laminée au-dessus des électrodes.	151
Figure.100 : Compilation d'images des trajectoires possibles des cellules en fonction de leur réaction répulsive au champ.....	152
Figure.101 : Impact de l'inclinaison des trois segments de la zone de tri sur la séparation des cellules. L'angle du premier segment est l'angle de référence utilisé pour calculer le rapport entre les f_{CMc}	153
Figure.102 : Photographies du banc expérimental. Les équipements de 1 à 4 et 9 permettent le contrôle des conditions fluidiques. Les équipements de 6 à 8 permettent l'observation et le suivi visuel des expériences, et les équipements de 10 à 12 complétés par un amplificateur puissance de gain 40 dB permettent d'appliquer le signal électrique DEP au microsystème.	154
Figure.103 : Deuxième fréquence de transition f_{X02} des cellules de lignée U87-MG. La moyenne des fréquences f_{X02} est de 111 MHz, la plus haute fréquence est de 215 MHz et la plus basse fréquence est de 30 MHz. La population présente un écart type de 45 MHz. [9]	155
Figure.104 : Photos de cellules U87-MG. A) cellules dans leur milieu de culture ; B) cellules après plusieurs minutes dans le milieu de manipulation ; C) zoom sur des cellules dans le milieu de manipulation soumises à un champ électrique.	156
Figure.105 : Histogramme de la répartition de la taille des cellules mesurées au Coulter Counter classique (bleu) sur 11000 évènements dans le milieu de survie et les tailles constatées au cours de nos manipulations (noir) sur 4000 évènements.....	157
Figure.106 : Interface du système CVX et zones de détections pour notre microsystème. 6 zones sont configurées : une pour chaque sortie, une en entrée et une avant les sorties...	159
Figure.107 : Fonctionnement d'une zone de détection configurée. A) l'image de référence est identique à l'image actuelle : aucune détection faite ; B) Une cellule passe, elle ressort en tant que tache blanche et le CVX la marque d'une croix ; C) décalage de l'image de	

référence par rapport à l'image acquise, l'or est détecté, aucune acquisition n'est possible.	160
Figure.108 : Interface de sélection des données qui sont mémorisées dans un fichier.	161
Figure.109 : Recherche de l'équilibre entre la vitesse du flux des cellules et de celle du buffer afin que les cellules, sans application du champ électrique, aillent toutes dans la sortie 1. Si des cellules vont dans les autres sorties, le focus des cellules est trop relâché.....	164
Figure.110 : Impact de l'équilibre buffer et flux de cellules à un même débit au niveau du buffer ($0,21 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) et une même puissance ($29,98 \text{ dBm}$) à 500 MHz . A) le focus des cellules est trop relâché et donc des cellules qui auraient dû être collectées dans la sortie 1 vont dans la sortie 2 ; B) L'équilibre fluide a correctement été établi.....	165
Figure.111 : Illustration de 6 acquisitions de tri menées sur des cellules de type U87 pour lesquelles trois combinaison de paramètres de tri ont été appliqués.	166
Figure.112 : Impact de la variation de la puissance du signal DEP appliqué lors du tri d'une population de cellules U87-MG. Débit du buffer: $0,14 \mu\text{L}/\text{min}$ ($4,7 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$); Fréquence du signal DEP : 500 MHz ; taux de confiance : 95% ; 1183 évènements détectés au total ; 30 minutes d'écart entre la première et la dernière acquisition.	167
Figure.113 : Impact de la variation de la vitesse du flux sur le tri sur une population de cellules U87- MG Puissance du signal DEP : $29,98 \text{ dBm}$; Fréquence du signal DEP : 500 MHz ; taux de confiance : 95% ; 1602 évènements détectés au total ; 30 minutes d'écart entre la première et la dernière acquisition.....	169
Figure.114 : Impact de la variation de la fréquence du signal DEP sur le tri sur une population de U87-MG. Puissance : $28,9 \text{ dBm}$; Débit buffer : $0,13 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ($4,4 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$); taux de confiance : 95% ; 1154 évènements détectés au total ; 50 minutes d'écart entre la première et la dernière acquisition.....	170
Figure.115 : illustration de la répartition des diamètres surfaciques des cellules observées dans chaque sortie et pour l'entrée de la zone de tri pour les 6 acquisitions de la Figure.114.	172
Figure.116 : A) Compilation des données des 5 acquisitions de la Figure.112 en lien avec les contraintes de déviation obtenues en faisant varier la puissance du signal DEP utilisé. 35% de la population n'a pas été déviée lors de ces acquisitions et donc ne peuvent correctement être évaluée; B) Compilation des données des 6 acquisitions de la Figure.113 en lien avec les différentes contraintes de déviations obtenues en faisant varier la vitesse du flux. 12% de la population n'a été déviée lors des acquisitions donc ne peut correctement être évaluées.	175
Figure.117 : Répartition de la population de cellules U87-MG soumise à un signal DEP de fréquence 500 MHz selon leur susceptibilité diélectrophorétique normalisée sur des intervalles d'intensité de $0,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mW}^{-1}$. La courbe bleu est obtenue à partir de la courbe de tendance de la Figure.112.A et la courbe rouge à partir de la courbe de tendance de la Figure.113.B. $1\text{h}30$ séparent les débuts des deux séries d'acquisitions qui ont commencées 3h après la mise en suspension des cellules dans le milieu DEP.	177
Figure.118 : Pour connaître le comportement des cellules soumises au champ électrique, un balayage des intensités de contrainte de déviation est nécessaire. En partant de contraintes	

fortes dévient peu de cellules jusqu'à des contraintes faibles dévient le plus de cellules possibles.178

Figure.119 : Concept de système de caractérisation de la susceptibilité diélectrophorétique des cellules. Des cellules initialement injectées par l'entrée cellules tournent dans le canal central (flèches blanches) du fait du flux imposé pas les entrées buffer. Si leur susceptibilité est suffisante, le champ les guidera vers la sortie. En augmentant graduellement la puissance du signal DEP, un large panel de susceptibilité sera sondé et à chaque intensité, un certain nombre de cellules sortira du dispositif électro-fluidique. Leur comptabilisation dans la zone de comptage permettrait de construire un histogramme.184

Figure.120 : Différents sens de circulation du flux selon les étapes de caractérisation. Avant chaque nouvelles caractérisation (circulation A), un nettoyage des débris restant de la précédente caractérisation doit être fait (circulation B)) avant de faire venir les nouvelles cellules à caractériser (circulation C). Ceci permet de recommencer la caractérisation à 0 (circulation A).185

Table des tableaux

Tableau.1 : valeurs et nomination des différents paramètres d'une cellule CHO [3].	30
Tableau.2 : Force DEP générée sur des cellules de types différents. Expériences réalisées avec un signal de 20 Vpp générant un champ de l'ordre de $\nabla E^2 = 2.20 \times 10^{12} \text{ V}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ à deux fréquences différentes [15].	32
Tableau.3 : Mesure par électro-rotation des caractéristiques diélectriques de cellules sanguines. [19].	34
Tableau.4 : Paramètres utilisés pour tracer l'évolution de f_{CM} selon les différents modèles.	74
Tableau.5 : Récapitulatif des forces interagissant avec les cellules.	95
Tableau.6 : Position du maximum de champ et largeur de zone où les intensités sont à 5% de la valeur du maximum de gradient de champ.	104
Tableau.7 : Nombres d'évènements nécessaires pour obtenir différents pourcentages d'erreurs à un taux de confiance donné.	163

Introduction générale

Notre corps est constitué d'un nombre incommensurable de cellules dépassant les milliers de milliards. Continuellement, ces cellules se renouvellent, grâce à des processus tels que la mitose (duplication d'une cellule mère en deux cellules filles identiques) et l'apoptose (mort autodestructive et programmée des cellules). Ces processus assurent une transmission de notre ADN et une régulation du nombre de cellules nécessaires au fonctionnement de notre organisme. Mais au fil du vieillissement du corps et des divisions cellulaires, des mutations interviennent régulièrement. Nous possédons un système de régulation qui permet une réparation et un contrôle de ces mutations, mais il apparaît dans certains cas une défaillance de ces mécanismes de régulation et de réparation qui peuvent entraîner l'émergence de maladies telles que le cancer. En effet, les pathologies cancéreuses se caractérisent par une prolifération chaotique de certaines cellules qui continuent à se renouveler hors de tout contrôle et indépendamment des facteurs de croissances censés réguler la prolifération et commander les processus de mitose et d'apoptose. Lorsque le système immunitaire se retrouve dépassé par cette prolifération, le cancer entraîne une excroissance dans le corps appelée tumeur lorsqu'un organe est touché ou hémopathies si ce cancer est lié au sang et à la moelle osseuse. Avec l'augmentation de l'agressivité tumorale, des cellules perdent également leur mécanisme de différenciation (assignation à un rôle spécifique dans le corps) et peuvent s'échapper via les vaisseaux sanguins irriguant la tumeur initiale, permettant de coloniser d'autres organes et y former des métastases.

La lutte contre le cancer représente par conséquent un enjeu sociétal majeur à l'heure actuelle. C'est pourquoi d'importants efforts de recherche sont déployés partout dans le monde et notamment en France. Des organisations tel que l'Institut National du Cancer (INCa) ou encore des associations telles que ARCAGY-GINECO, la ligue Contre le Cancer parmi de nombreuses autres se mobilisent autour de cette problématique. Ce sont en France près de 385 000 personnes diagnostiquées en 2015, 382 000 en 2018 [1] pour 149 500 décès en 2015 et 150 000 en 2018.

La guérison des patients dépend cependant fortement du type de cancer : ainsi actuellement les données montrent que pour un cancer du pancréas les statistiques ne s'élèvent seulement qu'à 9% de survie chez l'homme et qu'à 10% pour la femme, alors qu'au contraire pour une cancer de la thyroïde elle peuvent aller jusqu'à 97% de survie chez la femme et pour un cancer de la prostate 93% de survie chez l'homme [1]. Ces pourcentages sont continuellement en hausse depuis quelques année grâce à l'amélioration du diagnostic plus précoce des cancers, qui permet une prise en charge plus en amont et donc plus efficace des patients, ainsi que l'amélioration des traitements chirurgicaux et médicamenteux. De nouvelles pistes de prévention mais aussi de traitement continuent à être développées.

Parmi ces pistes de lutte contre cette maladie, le rôle important de cellules particulières, appelées cellules souches cancéreuses (CSCs), initiatrices de tumeurs a été mis en évidence depuis une dizaine d'années et ouvre de nouvelles perspectives. Ces CSCs sont des cellules cancéreuses qui possèdent un statut indifférencié avec l'aptitude de pouvoir régénérer n'importe quelles cellules de la tumeur et qui de surcroit deviennent « dormantes ». En effet elles sont dormantes dans le sens où elles peuvent rester telles quelles sans rentrer dans un cycle de division cellulaire pendant de très longues périodes et donc ne prolifèrent pas comme les autres cellules cancéreuses au sein de la tumeur, ce qui les rend particulièrement résistantes aux traitements thérapeutiques conventionnels ciblant

préférentiellement la prolifération excessive des cellules. Cependant ces cellules souches pathologiques peuvent sortir de leur état quiescent en fonction de l'évolution de leur micro environnement. Ainsi, de par leur aptitude à un échappement thérapeutique, ces CSCs sont soupçonnées d'être les instigatrices des récives qui sont observées chez un nombre conséquent de patients, pour lesquels de nouvelles masses tumorales apparaissent quelques mois après la fin du traitement de la tumeur originelle. Le caractère indifférencié de ces CSCs et leur aptitude à rester indétectables aussi bien au sein qu'en périphérie de la tumeur les rendent complexes à identifier d'autant que les biologistes ne disposent pas à ce jour de marqueurs suffisamment spécifiques ou de méthodes simples et implémentables en clinique qui permettent de les reconnaître ou sinon sur des temps d'analyses très longs.

C'est dans ce contexte que le développement de nouveaux outils de diagnostic concentre des efforts de recherche et que le projet européen SUMCASTEC pour « Semiconductor-based Ultrawideband Micromanipulation of Cancer STEm Cells », a vu le jour. Mes travaux de thèse s'inscrivent dans le cadre de ce projet, financé par l'Union Européenne au travers de son programme HORIZON 2020. Ce projet était coordonné par l'Université de Limoges au travers des laboratoires XLIM (Equipe MINT) et EA3848 (équipe CAPTuR), et rassemblait 6 partenaires au total. Les objectifs visés par ce projet étaient de pouvoir isoler en quasi temps réel des cellules souches CSCs et de les neutraliser en mettant à profit des ondes électromagnétiques au sein de micro laboratoires sur puces.

Dans ce contexte, mes travaux de thèse visent à développer un microsystème de tri cellulaire grâce à l'utilisation d'ondes électromagnétiques et du principe de diélectrophorèse (DEP). Nous ciblons particulièrement les CSCs issues de tumeurs du cerveau de type Glioblastome, qui sont les formes les plus agressives de cancer du système nerveux central. Ce tri devra permettre de séparer les CSCs présentes dans une population tumorale du reste de la population des cellules différenciées. Ma thèse s'inscrit dans la continuité des travaux de thèse de Fatima Hjeij [1], qui ont permis le développement d'un microsystème pour la caractérisation cellulaire par DEP. L'originalité de l'approche proposée par Fatima Hjeij consiste dans l'utilisation de fréquences de plusieurs centaines de MHz (spectre UHF), permettant à l'onde électromagnétique de pénétrer à l'intérieur de la cellule pour interagir avec le cytoplasme.

Les premiers résultats démontrent la possibilité que cette gamme UHF permette de discriminer l'état de différenciation des cellules au travers de leur signature diélectrophorétique. L'objectif de mes travaux de thèse est d'exploiter cette différence de signatures pour mettre au point un nouveau dispositif de tri cellulaire : un cytomètre électromagnétique par DEP-UHF.

Ce manuscrit de thèse sera organisé en trois chapitres. Le premier chapitre portera sur la caractérisation des cellules par DEP-UHF. Il permettra également de faire un état de l'art des techniques de tri cellulaire existantes.

Le second chapitre présentera la conception et la réalisation d'un cytomètre électromagnétique par DEP-UHF. Le principe de diélectrophorèse sera présenté en détail et un modèle sera établi pour évaluer les forces qui agissent sur les cellules durant le tri et permettre notamment de dimensionner de façon optimale le profil des électrodes à utiliser pour générer le champ électrique au sein du canal microfluidique du microsystème.

Le troisième chapitre présentera les résultats expérimentaux qui permettront d'établir des équations facilitant le ciblage des conditions de tri à sélectionner selon les caractéristiques diélectriques des cellules cibles. Un banc expérimental spécifique a été mis au point dans le cadre de mes recherches pour évaluer les performances des dispositifs développés. Il intègre en particulier la comptabilisation et le suivi automatique des cellules nécessaires à l'analyse des résultats obtenus pour des conditions de tri variées, mais aussi l'évaluation de l'erreur statistique liée à l'observation. Ce banc expérimental sera présenté amplement dans ce chapitre.

Cela nous mènera à la conclusion générale de cette thèse et ses perspectives.

Partie I. La cellule de sa caractérisation à sa manipulation

I.1. Introduction

L'objectif de cette thèse est la conception et la caractérisation d'un microsysteme qui en flux continu permettra le tri de cellules grâce au phénomène de diélectrophorèse. Les cellules qui seront utilisées dans nos expériences sont des cellules de glioblastome. L'objectif est de séparer ces cellules par DEP-UHF, grâce à leurs différences cellulaires internes. A partir de la caractérisation de la population de cellules, nous devons être en capacité de séparer les cellules indifférenciées/souches présentes dans la population des autres cellules traversant le microsysteme.

Ce premier chapitre présente dans un premier temps la cellule, son ordre de grandeur et ses modèles électriques et diélectriques. Puis, différents systemes de tri cellulaires, basés sur l'utilisation de marqueur (très utilisés dans les travaux de routine en biologie cellulaire) ou au contraire sans marqueur (technique dites « label-free ») seront présentés.

Parmi ces techniques « label-free », une attention particulière sera apportée au phénomène de diélectrophorèse sur lequel repose ces travaux. La DEP permet de moduler la trajectoire de cellules, en fonction de leurs propriétés biologiques, lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique non uniforme. Nous verrons comment, grâce à ce principe, des cellules biologiques peuvent être caractérisées. En particulier, la gamme de fréquence utilisée aura une importance majeure puisque les propriétés diélectriques des cellules varient en fonction de la fréquence. Ce chapitre permettra également d'aborder le caractère non-invasif de la méthode en bornant les conditions d'exposition des cellules au champ électromagnétique. L'impact de l'intégration sera aussi présenté.

Enfin, des systemes de tri cellulaires utilisant la diélectrophorèse seront présentés. Ces exemples d'utilisations seront exposés selon des approches qui sont liées à la méthode de tri ou à la forme du systeme. Nous concluons alors ce premier chapitre.

I.2. La cellule eucaryote

Les cellules eucaryotes sont des éléments biologiques très complexes. Une cellule possède un taille allant d'un diamètre de la dizaine de μm à un diamètre de la centaine de μm . Elle est composée de nombreux constituants tels que la membrane plasmique, frontière entre le milieu extérieur et intracellulaire et qui très souvent garantit la viabilité de la cellule, le cytosol, principalement constitué d'eau et de protéines qui est porteur des différents constituants intracellulaires, les organites (Figure.1 : éléments 2 à 6, 8 à 10, 12 et 13). Au milieu de ces nombreux d'éléments se trouve également un noyau qui mesure de 5 à 7 μm de diamètre et contient l'ensemble du code génétique de la cellule, il possède lui-même une membrane dite nucléaire. Le corps humain est constitué de nombreuses cellules. Il existe près de 200 types différents de cellules, depuis les globules rouges qui en représentent le plus grand nombre jusqu'aux neurones en passant par les cellules musculaires.



Cellule animale :

- | | | |
|--|----------------------------------|---|
| 1. Nucléole | 6. Appareil de Golgi | 11. Cytosol |
| 2. Noyau | 7. Cytosquelette | 12. Lysosome |
| 3. Ribosome | 8. Réticulum endoplasmique lisse | 13. Centrosome (constitué de deux centrioles) |
| 4. Vésicule | 9. Mitochondries | 14. Membrane plasmique |
| 5. Réticulum endoplasmique rugueux (granuleux) (REG) | 10. Péroxysome | |

Figure.1 : Schéma d'une cellule eucaryote et ses constituants. 13 est un organite uniquement présent dans les cellules animales. [2]

C'est grâce à la présence de récepteurs voire d'antigènes sur la membrane externe de la cellule, que celle-ci pourra être reconnue par le système immunitaire via les anticorps. Si elle n'est pas reconnue, le système immunitaire la traitera comme un corps étranger. Ces mêmes antigènes permettent une caractérisation des cellules par les techniques utilisant des marqueurs, techniques qui seront présentées plus loin.

De nombreuses études ont vues le jour pour analyser les cellules. Les outils de caractérisation développés peuvent être basés sur les antigènes que présente la cellule, leur taille mais aussi leur comportement face à un phénomène physique qui peut être optique, mécanique ou encore électrique comme c'est le cas dans ces travaux.

Ainsi, une cellule est un élément diélectrique qui peut être décomposée et étudiée au travers entre autre de sa permittivité et conductivité (Figure.2). Dans cette figure nous pouvons observer une cellule venant d'ovaire de hamster chinois (partie (a)) et sa représentation

simplifiée (partie (b)). Les 4 couches qui sont représentées dans ce modèle, sont en partant du centre : le noyau, la membrane nucléaire, le cytosol et les organites qui constituent ensemble le cytoplasme et la membrane plasmique. Une modélisation prenant en compte indépendamment les différents organites est complexe car ce sont des éléments mobiles, nombreux et petits en comparaison du noyau. En revanche les organites ont un impact sur la permittivité et conductivité modélisées pour le cytoplasme.

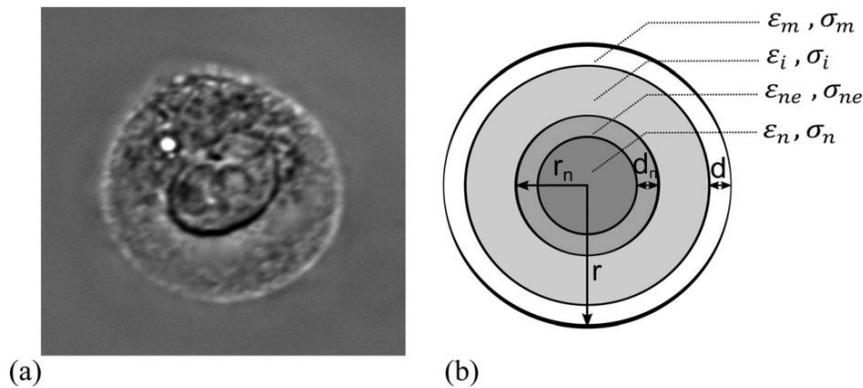


Figure.2 : (a) Image d'une cellule CHO sous un microscope DIC inversé. (b) Modèle à quatre couche représentant la cellule constituée du noyau cellulaire, l'enveloppe nucléaire, le cytoplasme et la membrane plasmique. Chaque couche a ses propres propriétés diélectriques et dimensions. [3]

Il est également possible de modéliser la cellule grâce à une représentation électrique. Nous retrouvons dans la Figure.3 une fois encore les 4 éléments les plus essentiels dans le comportement électrique d'une cellule soumise aux effets d'un champ électrique. Les membranes sont des isolants présentant donc une faible conductivité et permittivité ; le cytoplasme et le cœur du noyau apparaissent conducteurs bien que composés d'éléments isolants.

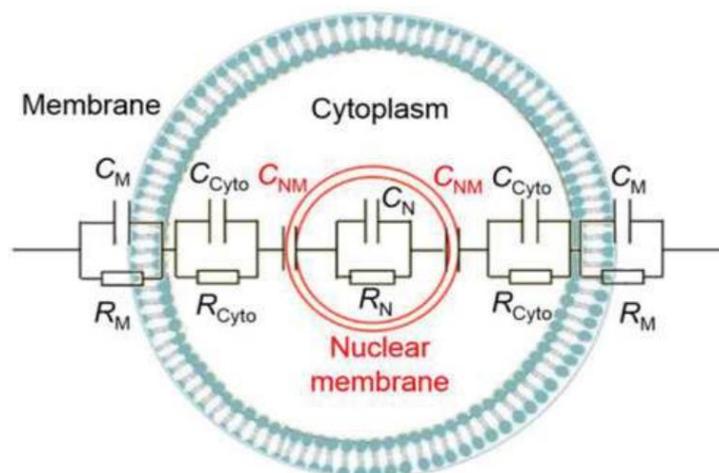


Figure.3 : Représentation en circuit électrique du modèle quatre couches d'une cellule eucaryote. [4]

Le plus souvent, il est privilégié un modèle à deux couches différenciant la membrane plasmique du milieu intracellulaire vue de manière globale comme un seul élément. En effet, afin d'utiliser le modèle de la Figure.3, une mesure fine de chaque éléments qui le compose, est nécessaire ; or une différenciation des éléments internes de la cellule reste complexe. Le modèle électrique de l'intérieur de la cellule est donc une combinaison des caractéristiques diélectriques des éléments qui la composent comme illustré sur le modèle simplifié de la Figure.4.

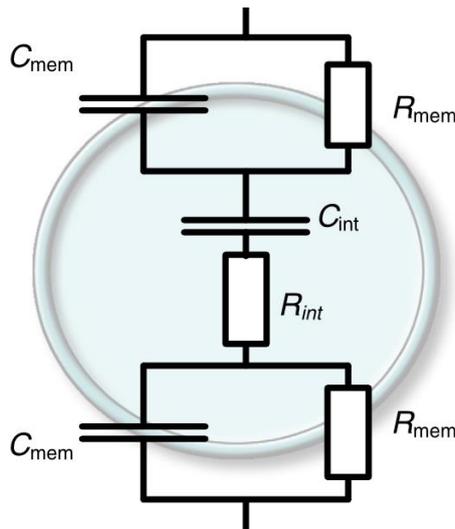


Figure.4 : Circuit électrique simplifié d'une cellule eucaryote modélisée par 2 compartiments : la membrane plasmique, représentée par la mise en parallèle de la résistance et la capacitance de la membrane, et l'intérieur de la cellule qui est lui simplifié avec la combinaison série d'une résistance et d'une capacitance liées aux caractéristiques diélectriques internes globales. [5]

L'impédance des différentes capacités étant dépendante de la fréquence, celle-ci perd en importance avec l'augmentation de la fréquence (f) et peut être considérée négligeable lorsque :

$$\omega = 2 \cdot \pi \cdot f > \frac{\sigma}{\epsilon_0 \cdot \epsilon} \quad (1)$$

Avec σ et ϵ respectivement la conductivité et la permittivité des membranes considérées.

Pour la membrane plasmique, c'est à partir de la centaine de MHz que sa capacité est négligée. Ainsi à ces fréquences, la résistance de la membrane, en parallèle de la capacité, est court-circuitée. Ceci, diminue en haute fréquence l'influence des caractéristiques de la membrane dans les phénomènes électriques.

Il a été démontré qu'à basse fréquence, les caractéristiques membranaires dominent avant de perdre en importance face aux caractéristiques diélectriques du cytoplasme [6]. Cela est lié à l'inégalité (1) et au fait, qu'à plus haute fréquence, les temps de charge de la membrane deviennent largement inférieurs à la demi-période du signal. Ainsi plus la fréquence sera élevée, plus les ondes du champ électrique pourront pénétrer à l'intérieur de la cellule et en sonder le contenu permettant à la force de DEP d'être majoritairement modulée par les caractéristiques diélectriques internes de la cellule. Il sera vu par la suite plus en détail ce que cela entraîne pour la caractérisation des cellules et donc leur différenciation potentielle.

Les cellules présentent sont donc des éléments polarisables et possèdent une susceptibilité électrique et diélectrique qui est liée à leurs caractéristiques et nombreux constituants. Ainsi, l'application d'un champ électrique autour d'une cellule influence son comportement. C'est ce que nous allons maintenant détailler au travers de l'électro-manipulation.

I.3. L'Electro-manipulation

I.3.1. Principe

Soumise à un champ électrique non uniforme, une particule diélectrique (telle qu'une cellule) subit une force qui induit un mouvement de cette dernière comme le présente la Figure.5. Cette force dépend du volume de la particule, mais aussi de ses caractéristiques diélectriques par rapport au milieu dans lequel elle se trouve immergée. Ainsi en fonction de la conductivité et la permittivité intrinsèques de la cellule soumise au champ électrique, l'intensité et la direction de la force varie. Ce phénomène est appelé « diélectrophorèse » (DEP).

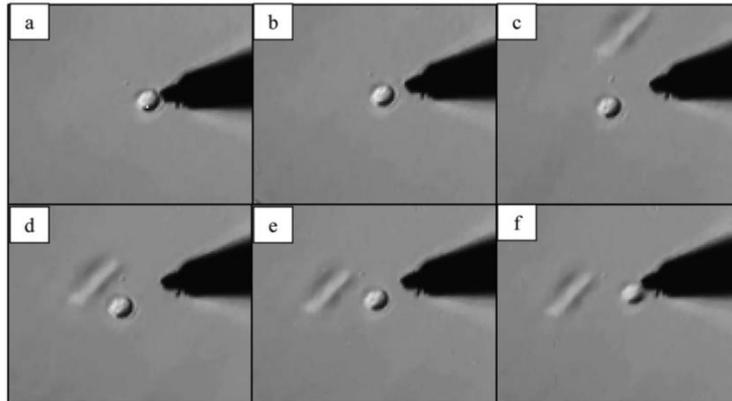


Figure.5 : Séquence d'images d'une cellule soumise à un champ électrique (un débris cellulaire en arrière-plan se déplace du fait du flux). (a) pas de champ électrique appliqué par la pointe ; (b, c) un signal de 10 kHz est appliqué à l'électrode. A cette fréquence la cellule apparaît tel un objet isolant et est ainsi repoussée par le champ; (d) le signal est maintenant à 10 MHz, le champ pénètre maintenant dans le cytoplasme ; (e, f) la cellule apparaît maintenant comme un objet conducteur et se retrouve attirée par le champ. [7]

La force alors générée sur la cellule est appelée « force diélectrophorétique » et notée F_{DEP} . Cette force n'aura pas la même direction suivant les caractéristiques de la particule diélectrique manipulée. Nous parlons de DEP positive (pDEP) lorsque, comme le cas a) de la Figure.6.a, les particules, ici des globules rouges, sont attirées par le maximum de champ se situant sur le bord des électrodes (zones noires). Au contraire, lorsque les particules sont repoussées par le champ électrique, nous parlons de DEP négative (nDEP) comme dans le Figure.6.b. Les cellules sont repoussées jusqu'aux zones où le champ est plus faible.

D'autre part, en plus de la direction, l'intensité de la force dépend aussi des propriétés diélectriques des cellules qui sont liées aux propriétés biologiques des cellules. De ce fait, F_{DEP} devient un reflet des caractéristiques diélectriques des cellules et informe sur les caractéristiques biologiques de la cellule manipulée ; c'est ce que nous allons développer au cours des prochaines pages après avoir détaillé l'origine de ce phénomène.

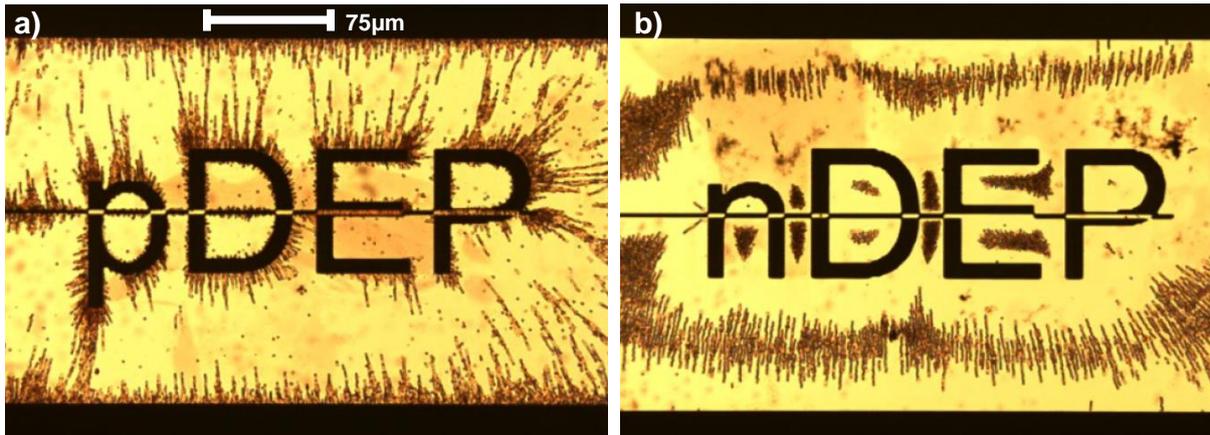


Figure.6 : Photographies illustrant les effets du champ électrique sur des globules rouges. a) à 100 kHz provoquant un effet d'attraction (pDEP) et b) à 10 kHz provoquant un effet de répulsion (nDEP). [8].

Les particules diélectriques telles que les cellules portent des charges électriques qui sont en temps normal peu mobiles. Du fait de l'application d'un champ électrique, une force de Coulomb s'applique sur ces charges qui se déplacent au sein de la cellule jusqu'aux interfaces, telle que celles entre la membrane et le cytoplasme ou entre le milieu extérieur et la membrane, et non plus uniquement au sein des molécules comme il est habituellement le cas [9]. La cellule devient ainsi un dipôle aligné au champ électrique externe (Figure.7).

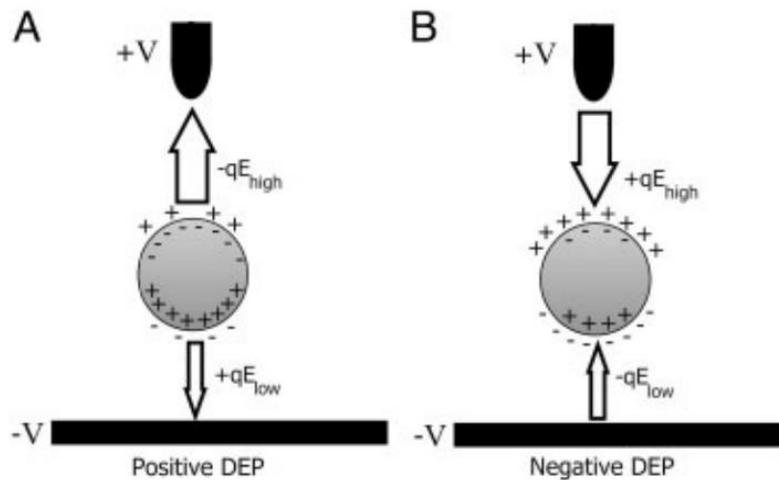


Figure.7 : Schéma présentant la force DEP induite sur un dipôle en présence d'un champ électrique non-uniforme. a) DEP Positive ; a) DEP Négative. [10]

L'application d'un champ électrique non uniforme crée un déséquilibre dans les forces qu'exercent les charges en différents points de la cellule et entraîne un moment qui provoque son déplacement et ou sa rotation. En fonction des propriétés diélectriques de la cellule, celle-ci sera plus ou moins facilement polarisable par rapport au milieu dans lequel elle est immergée ce qui perturbe les lignes de champ autour d'elle comme le présente la Figure.8.

Dans le cas présenté sur la Figure.8.a, la cellule est plus polarisable que le milieu : les lignes de champ vont traverser la cellule. Ainsi, elle sera attirée vers le maximum de champ pour un signal alternatif (situé au bord des électrodes) ou vers l'électrode présentant le plus fort potentiel dans le cas d'un signal continu (donc à l'opposé du sens du moment \vec{m} [5]) : nous parlons alors de DEP positive (pDEP).

Dans le cas inverse où la cellule est moins polarisable que le milieu, (Figure.8.b), les lignes de champs vont éviter celle-ci, la poussant vers les minima de champ loin des électrodes ou vers l'électrode du plus faible potentiel (au sens inverse de \vec{m}) suivant si l'on polarise les électrodes avec un signal alternatif ou continu. Dans ce cas on parle de DEP négative (nDEP).

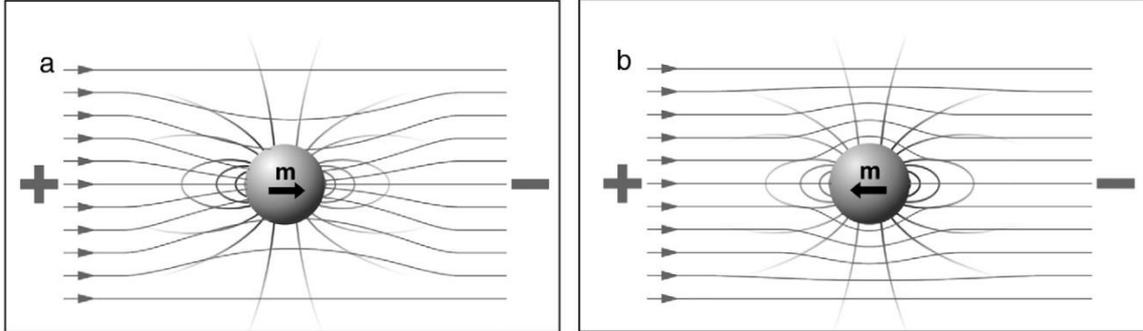


Figure.8 : Représentation des lignes de champ autour d'une particule dans un champ uniforme :
(a) la particule est plus polarisable que son milieu, ainsi les lignes la traversent et le dipôle induit est orienté dans le sens du champ appliqué ;
(b) les lignes de champ évitent la particule moins polarisable que son environnement, le sens du dipôle est, dans ce cas, opposé au champ appliqué. [5]

La force qui s'exerce sur la cellule sous l'influence d'un champ électrique est la même que sur tout dipôle et se calcule à partir de l'équation 2 [7].

$$\vec{F} = (\vec{m} \cdot \nabla) \cdot \vec{E} \quad (2)$$

Cette force est donc liée au moment du dipôle (\vec{m}), ainsi qu'au champ électrique \vec{E} . ∇ exprime ici l'opérateur gradient appliqué au champ électrique, qui est un vecteur de dérivées partielles selon la position (équation 3).

$$\nabla \vec{E} = \delta \vec{E}(u\vec{x}, u\vec{y}, u\vec{z}) \cdot \begin{bmatrix} \frac{1}{\delta u\vec{x}} \\ \frac{1}{\delta u\vec{y}} \\ \frac{1}{\delta u\vec{z}} \end{bmatrix} \quad (3)$$

Avec $u\vec{x}$, $u\vec{y}$ et $u\vec{z}$ les vecteurs unitaires d'un repère orthonormé.

Le moment dipolaire, pour une sphère de rayon r , est donné par l'équation 4 [10].

$$\vec{m} = 4\pi \cdot \epsilon_m \cdot r^3 \cdot f_{CM}(\omega) \cdot \vec{E} \quad (4)$$

Avec ϵ_m la permittivité du milieu, f_{CM} le facteur de Clausius-Mossotti qui dépend des permittivités complexes de la cellule et du milieu qui l'entoure.

Lorsque l'on combine (2) et (4), nous obtenons la formule suivante :

$$\vec{F}_{DEP} = 4\pi \cdot \epsilon_m \cdot r^3 \cdot f_{CM}(\omega) \cdot \vec{E} \cdot \nabla \cdot \vec{E} \quad (5)$$

Seul le champ \vec{E} présente un lien avec le repère spatial ($u\vec{x}, u\vec{y}, u\vec{z}$), ainsi l'opérateur vectoriel ∇ n'a une influence que sur lui, laissant inchangé les autres paramètres de l'équation. Le champ appliqué étant produit à partir d'une différence de potentiel, il est irrotationnel et ainsi $\vec{E} \cdot \nabla \cdot \vec{E} = 1/2 \nabla \vec{E}^2$ [7]. Ainsi on peut conclure que la force de DEP est liée à :

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi \cdot \epsilon_m \cdot r^3 \cdot f_{CM}(\omega) \cdot \nabla |E_{rms}|^2 \quad (6)$$

Au sein de cette formule, on retrouve deux paramètres dépendant des caractéristiques de la cellule. Le premier est son rayon r , la force de DEP est donc liée au volume de la cellule, et c'est pourquoi il a été démontré la possibilité de différencier des cellules en fonction de leurs tailles respectives en utilisant le phénomène de DEP [10-11]. Le second paramètre qui nous intéresse plus spécifiquement dans ces travaux de thèse, est le facteur de Clausius-Mossotti (f_{CM}). Ce paramètre est lié aux propriétés diélectriques (permittivités et conductivités) des constituants de la cellule (membrane, cytoplasme,...) par rapport à celles du milieu extracellulaire. Sa formule est donnée par l'équation 7 [9].

$$f_{CM}(\omega) = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \quad (7)$$

Avec ε_p^* et ε_m^* respectivement la permittivité complexe de la cellule et du milieu, toutes deux dépendant de la fréquence. ε_p^* dépend des permittivités et conductivités des différents constituants de la cellule en rapport à leur proportion respective dans la cellule. C'est une combinaison de ses permittivités complexes qui dicte son comportement face au champ électrique. Différents modèles existent, comme les modèles à deux ou quatre couches présentés Figure.2, et influencent le calcul de la permittivité complexe générale de la cellule comme cela sera détaillé dans le chapitre 2.

Il est important de noter que, du fait de l'importance de la permittivité complexe de la cellule, l'intensité de la force DEP peut être différente entre deux cellules selon leurs différences diélectriques. De plus, cette force peut être modulée pour une même cellule selon la fréquence du signal utilisé pour générer le champ électrique du fait de la dépendance fréquentielle des permittivités complexes.

La direction de la force DEP (attraction ou répulsion) est quant à elle liée à f_{CM} . Si le facteur de Clausius-Mossotti est négatif, la cellule sera repoussée par le maximum de gradient de champ : elle sera donc en nDEP (Figure.7.b et Figure.8.b). Au contraire si le facteur est positif, elle sera attirée par le maximum de gradient de champ : la cellule sera ainsi en pDEP (Figure.7.a et Figure.8.a). Une même cellule selon la fréquence du signal appliqué pourra donc exprimer les deux comportements diélectrophorétiques.

Tableau.1 : valeurs et nomination des différents paramètres d'une cellule CHO [3].

Élément	Permittivité relative	conductivité	dimension
membrane	$\varepsilon_m = 8,5$	$\sigma_m = 1 \mu\text{S/m}$	$e_m = 5 \text{ nm}$
cytoplasme	$\varepsilon_{\text{cyto}} = 60$	$\sigma_{\text{cyto}} = 0.42 \text{ S/m}$	/
membrane nucléaire	$\varepsilon_{\text{ne}} = 23.2$	$\sigma_{\text{ne}} = 1 \text{ mS/m}$	$e_{\text{mn}} = 40 \text{ nm}$
noyau	$\varepsilon_n = 120$	$\sigma_n = 1,5 \text{ S/m}$	$r_n = 3,3 \mu\text{m}$

La Figure.9 représente à titre d'exemple, les valeurs que peuvent prendre f_{CM} selon la fréquence du champ en considérant une cellule présentant comme dont les caractéristiques sont résumées dans le Tableau.1. Cette cellule, de $6 \mu\text{m}$ de rayon, est immergée dans un milieu aqueux ($\varepsilon_{\text{medium}} = 78$; $\sigma_{\text{medium}} = 0.05 \text{ S/m}$). Le f_{CM} est une grandeur complexe qui présente donc une partie imaginaire (Figure.9 : courbe orange) et une partie réelle (Figure.9 : courbe bleu). Toutes deux sont liées aux conductivités et permittivités de la cellule, mais n'impactent pas la force DEP de la même façon. La partie imaginaire, qui découle de l'effet des charges mobiles [13], joue un rôle prépondérant lorsque le champ est généré par un système d'électrodes présentant plus de 2 phases, ses effets sont en

particulier mis en jeu lors du phénomène d'électro-rotation ou la traveling-waves DEP que nous décrivons plus loin. La partie réelle, qui est liée au mouvement des charges liées aux interfaces [13], module principalement l'intensité de la force lorsque la cellule est dans les situations présentées avant (Figure.6) .

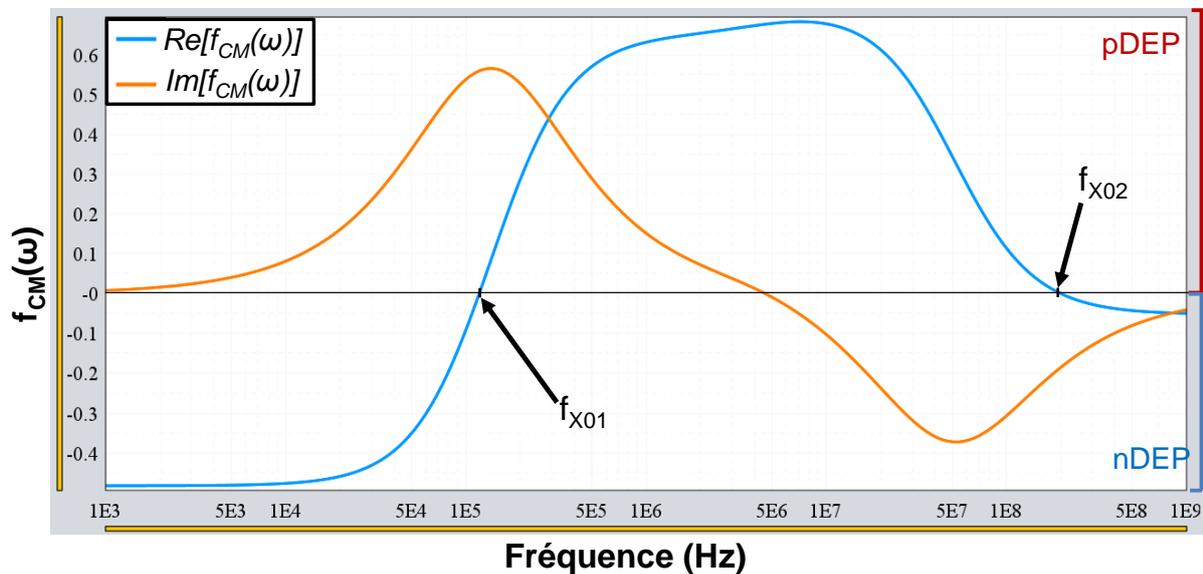


Figure.9 : Parties imaginaire et réelles du f_{CM} pour un modèle à quatre couches. Les permittivités et conductivités rentrées en paramètre sont présentés dans le Tableau.1 et calculés par le logiciel MyDEP [14] Pour un milieu de $\epsilon_{\text{medium}} = 78$; $\sigma_{\text{medium}} = 0.05$ S/m.

Ainsi, si la partie réelle de f_{CM} est positive, nous pouvons observer le phénomène de pDEP. Dans le cas contraire si f_{CM} est négatif, on assistera à un phénomène de nDEP. La force étant proportionnelle à f_{CM} , si sa valeur est grande, la force sera plus intense. Mais si le facteur f_{CM} devient nul à une fréquence donnée, la force sera alors inexistante et ainsi, aucun mouvement ne sera induit par cette force. Dans ce cas particulier, où $Re[f_{CM}]=0$ ou $Im[f_{CM}]=0$, est nommée fréquence de transition. Dans le cas de manipulation avec un milieu à faible conductivité, nous observons deux fréquences de transition pour la partie réelle de f_{CM} . Une première de l'ordre de quelques kHz à la centaine de kHz nommée f_{X01} et une deuxième fréquence de transition de l'ordre de quelques MHz à la centaine de MHz nommée f_{X02} .

1.3.2. La diélectrophorèse en basse fréquence

Précédemment, il a été présenté que la force DEP varie entre deux cellules du fait de leurs différences biologiques. Nous allons dans cette partie voir l'expression de cette différence diélectrique sur la force DEP pour les basses fréquences.

La différence des cellules s'exprime par l'intensité de la force de répulsion que subit la cellule. Le Tableau.2 montre que, pour deux cellules de types cellulaires différents (MCF10A et HeLa vivante), soumises au même champ électrique, la force de répulsion ne sera pas la même. Nous observons ainsi une différence d'intensité de 20,9% entre ces deux cellules à 20kHz et 65,7% de différence d'intensité de F_{DEP} à 40 kHz.

De façon similaire, pour un même type cellulaire, la force diélectrophorétique engendrée ne sera pas la même suivant si celle-ci est vivante ou morte. Par exemple, une cellule HeLa morte est soumise à une force DEP présentant une intensité 59,7% inférieure à celle auquel sera soumise une cellule HeLa vivante à 20 kHz. A 40 kHz, cette différence d'intensité est de -20%.

Tableau.2 : Force DEP générée sur des cellules de types différents. Expériences réalisées avec un signal de 20 Vpp générant un champ de l'ordre de $\nabla E^2 = 2.20 \times 10^{12} \text{ V}^2 \cdot \text{m}^{-3}$ à deux fréquences différentes [15]

	Force en pN à 20 kHz	Force en pN à 40 kHz
MCF10A	0.81 +/- 0.05	0.58 +/- 0.04
HeLa vivante	0.67 +/- 0.04	0.35 +/- 0.03
HeLa morte	0.27 +/- 0.01	0.28 +/- 0.02

Pour les mêmes types de cellules, nous observons donc des écarts différents selon la fréquence du signal utilisé.

La fréquence utilisée pour générer le champ électrique a donc ainsi avoir une forte influence pour réaliser le tri cellulaire. C'est ce principe qu'exploite G. Mernier dans son étude [16] où le système développé se compose de deux parties utilisant toutes deux le phénomène de DEP. La première réalise une focalisation des cellules qui seront triées dans la deuxième partie du système. Chaque partie travaille à une fréquence différente (Figure.10).

A 20 kHz, les cellules de levure mortes et vivantes sont repoussées par le champ électrique. Leur comportement étant similaire, cette étape permet de focaliser les cellules vers la deuxième partie du système. Dans cette deuxième partie, le champ est généré à partir d'un signal alternatif généré à 5 MHz. A cette fréquence, les cellules vivantes et les cellules mortes utilisées présentent une différence de direction de la force DEP. En effet, les cellules vivantes sont attirées par le champ tandis que les cellules mortes sont repoussées par le champ. C'est cette différence de direction qui est exploitée pour mener à bien le tri.

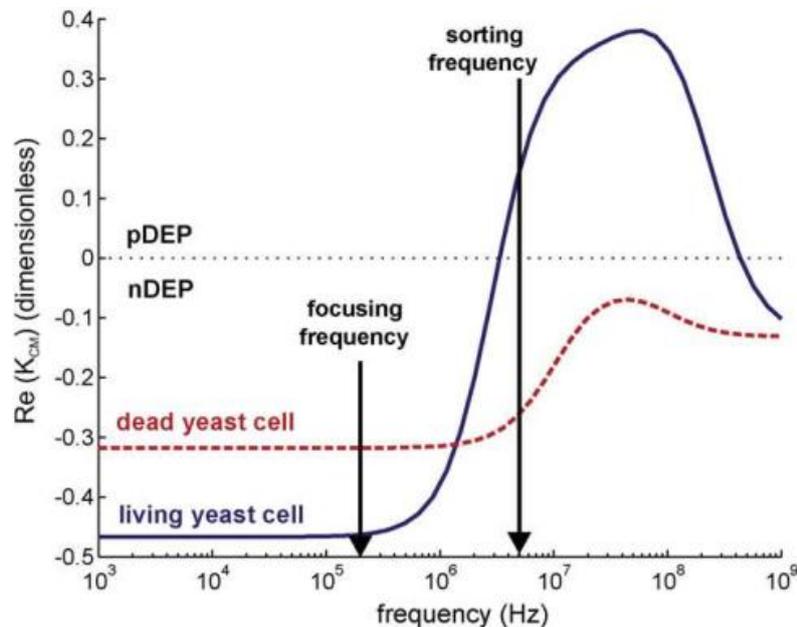


Figure.10 : Exemple de variation de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence (échelle logarithmique) pour des cellules vivantes et mortes dans un milieu de faible conductivité ($55 \text{ mS} \cdot \text{m}^{-1}$) [16].

Au travers de cet exemple, nous pouvons voir que ce n'est pas seulement l'intensité de F_{DEP} qui permet de distinguer une cellule d'une autre, mais aussi la fréquence à partir de laquelle la cellule étudiée aura un comportement pDEP soumise au champ (f_{x01}). Cette première fréquence de transition varie selon l'épaisseur et les caractéristiques de la membrane [5]. Ainsi, si des cellules présentent des différences de caractéristiques membranaires, elles

pourront présenter une différence au niveau de leur f_{x01} . C'est ce que présente la Figure.11 qui montre les f_{x01} de cellules tumorales et sanguines.

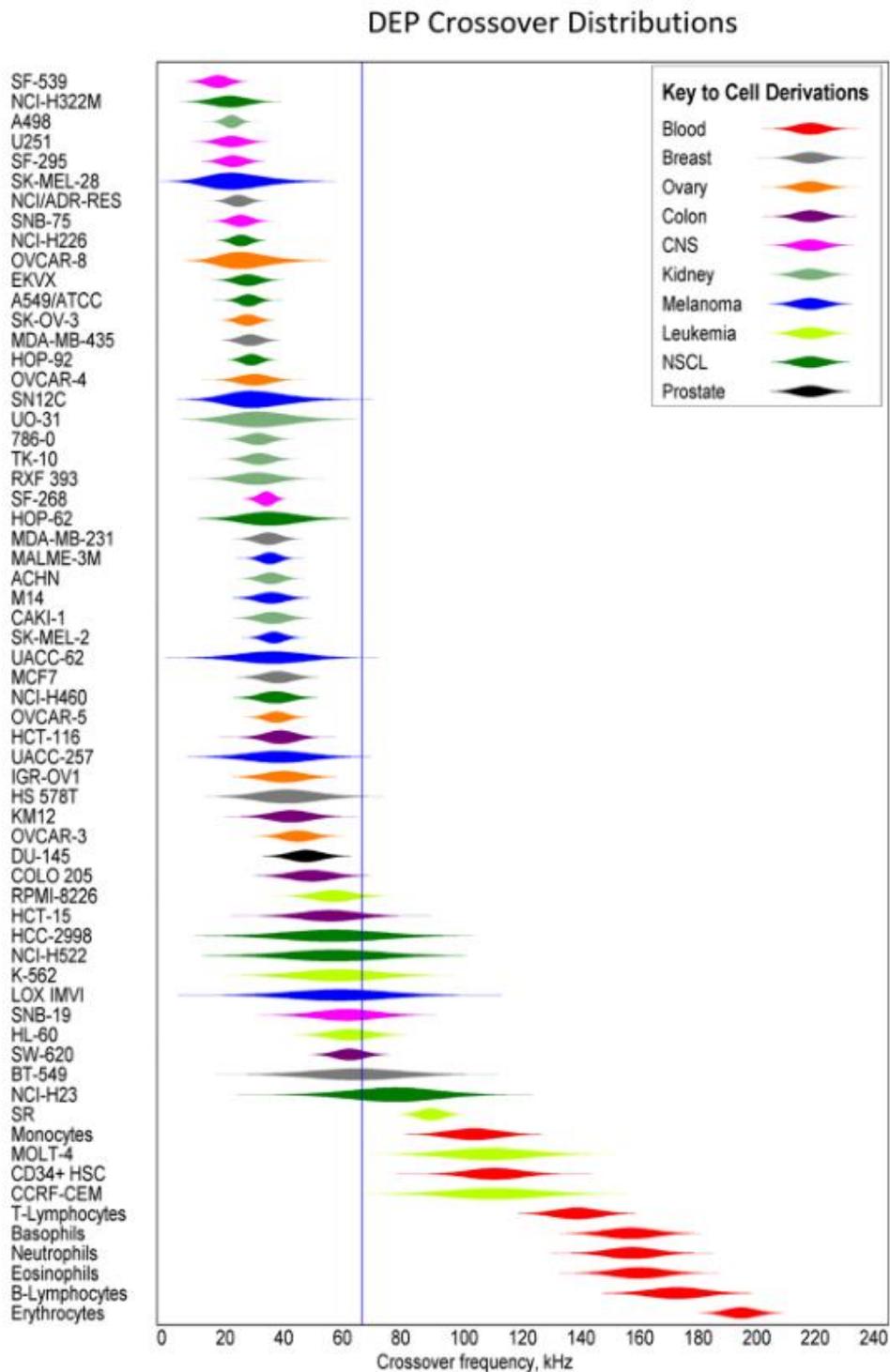


Figure.11 : Première fréquence de transition de cellules venant de différentes lignées de tumeurs chez l'humain et de cellules sanguines périphériques déduites par une analyse DEP-FFF dans un milieu de 30 mS.m^{-1} . La finesse de chaque barre de couleurs représente la distribution du nombre de cellules à ladite fréquence de transition. [17]

Au sein d'un même type cellulaire, chaque cellule ne présente pas exactement la même fréquence de transition. En effet, une population cellulaire présente, même au sein d'une

lignée, des disparités biologiques qui se retrouvent donc dans la signature fréquentielle de la population (*i.e.* mesure des f_{x01}).

Nous pouvons observer une grande similitude de f_{x01} au niveau de lignée cellulaire pourtant bien distinctes (*i.e.* U251 : cellules gliales du système nerveux ; SF-295 : cellule de glioblastome) faisant de cette fréquence de transition un critère très peu discriminant, ne pouvant être utilisé pour distinguer ces types cellulaires entre eux. En revanche, pour d'autres populations, ce critère est pertinent pour des applications de tri cellulaire. C'est le cas, par exemple, entre les cellules sanguines et la plus grande part des cellules tumorales. En utilisant un signal électrique présentant une fréquence de 65kHz (mis en évidence par la ligne bleu Figure.11), le champ généré repousse toutes les cellules sanguines, car ces cellules possèdent des fréquences de transition supérieures, alors qu'une grande part des cellules tumorales sera attirée par le champ électrique.

En parallèle des méthodes exploitant la partie réelle de f_{CM} , nous trouvons celle, comme l'électro-rotation qui est liée à la partie imaginaire de f_{CM} .

L'Electro-rotation est un moyen de manipuler une cellule en la faisant tourner sur elle-même du fait de l'application d'un champ électrique de plus de deux phases. Cette technique permet notamment d'analyser les caractéristiques diélectriques de la cellule en fonction de la fréquence. En effet, elle est utilisée pour caractériser la différence de propriétés diélectriques entre des cellules viables et non viables par exemple, ainsi que pour mesurer la capacité et la résistivité de la membrane [18]. Le Tableau.3 présente une caractérisation de la capacité de la membrane et des caractéristiques diélectriques internes de cellules sanguines, mises en évidence avec cette technique.

Tableau.3 : Mesure par électro-rotation des caractéristiques diélectriques de cellules sanguines. [19]

Cell type	Number	Radius (μm)	C_{mem} (mF/m ²)	σ_{int} (S/m)	ϵ_{int}
T-lymphocytes	91	3.29 ± 0.35	10.5 ± 3.1	0.65 ± 0.15	103.9 ± 24.5
B-lymphocytes	49	3.29 ± 0.26	12.6 ± 3.5	0.73 ± 0.18	154.4 ± 39.9
Monocytes	43	4.63 ± 0.36	15.3 ± 4.3	0.56 ± 0.10	126.8 ± 35.2
Granulocytes	33	4.71 ± 0.23	11.0 ± 3.2	0.60 ± 0.13	150.9 ± 39.3

Ces caractéristiques sont, en revanche, obtenues par un balayage de fréquences allant de 1 kHz à 120 MHz. En effet, les basses fréquences renseignent principalement sur la capacité de la membrane de la cellule et ne permettent pas de sonder les caractéristiques diélectriques internes des cellules.

Le principe de cette technique repose sur l'utilisation d'un système à 4 électrodes qui permet de capturer la cellule en son centre. Un champ électrique tournant est généré à partir des 4 électrodes chacune polarisée avec une différence de phase de 90° avec l'électrode adjacente telle que le présente la Figure.12. Suivant la relaxation de charge de la cellule (RC_{cell}), qui est liée aux caractéristiques diélectriques de celle-ci ($RC_{cell} = \epsilon_{cell} / \sigma_{cell}$), et par rapport à la relaxation de charge du milieu (RC_{medium}), elle se mettra à tourner sur elle-même dans un sens ou dans un autre par rapport à celui du champ [20]:

- $RC_{cell} < RC_{medium}$ même sens de rotation que le champ

- $RC_{cell} > RC_{medium}$ sens inverse de rotation que le champ

Afin de mener une analyse complète du phénomène, l'observation du sens de rotation ainsi que la mesure de la vitesse de rotation de la cellule doivent être précises [21].

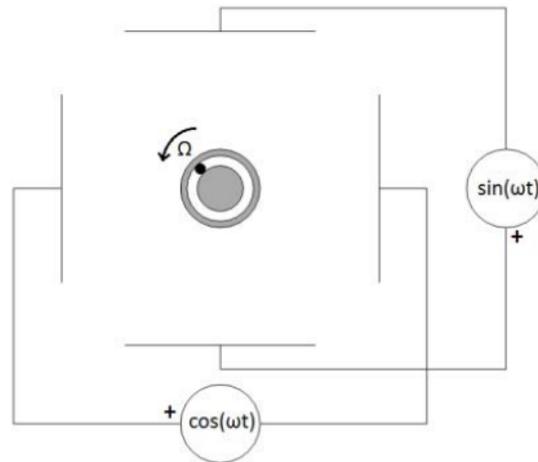


Figure.12 Schéma présentant le déphasage entre les signaux pour générer un champ tournant [21]

La DEP aux basses fréquences a donc été largement exploitée dans la littérature pour des applications de tri cellulaire [22]. En revanche, pour les raisons que nous avons vu précédemment, ces fréquences ne permettent pas de différencier certains types cellulaires. C'est pourquoi il est maintenant investigué une montée en fréquence des signaux appliqués dans l'objectif de sonder le contenu intracellulaire.

I.3.3. Montée en fréquence : DEP-UHF

Nous avons pu constater précédemment deux limitations principales par rapport à la DEP basses fréquences :

- La signature fréquentielle f_{x01} de certaines populations est très similaire : cette gamme de fréquence n'est pas suffisante pour différencier tous les types cellulaires
- La membrane est vue comme une capacité qui agit comme une barrière aux ondes électriques basses fréquences : une augmentation de la fréquence diminue son influence sur la force DEP

C'est pour cette raison que des caractérisations par électro-rotation à une centaine de MHz ont été investiguées afin d'évaluer les caractéristiques diélectriques internes globales d'une cellule (Tableau.3).

Dans le contexte du tri de cellules souches cancéreuses (CSC), la possibilité de pouvoir sonder le contenu intracellulaire apparaît comme capitale puisqu'il n'a pas été identifiée à basse fréquence une variation de la capacité membranaire en lien avec l'état de différenciation des cellules [24]. Dans ces travaux R. Pethig avance donc la possibilité que les cellules souches présentent des fréquences de transition HF (f_{x02}) bien distinctes de celles des cellules différenciées [24].

Cette hypothèse a été confirmée dans les travaux de thèse de F. HJEIJ, menés dans l'équipe, grâce au développement d'un microsystème système pour la mesure de ces fréquences de transition hautes (f_{x02}) par DEP-UHF. Comme illustré Figure.13, un quadruple permet de piéger les cellules une par une en son centre (en nDEP), puis en diminuant la fréquence du signal appliqué, les forces DEP appliquées sur la cellule vont diminuer en

intensité jusqu'à s'annuler lorsque la fréquence du signal sera la fréquence de transition f_{xO2} de la cellule. En diminuant encore la fréquence la cellule bascule en DEP positive et commence à être attirée par le bord des électrodes. Il est alors possible d'observer à partir de quelle fréquence l'équilibre de position est rompu, signe que la cellule bascule vers un comportement de pDEP en passant par f_{xO2} [25].

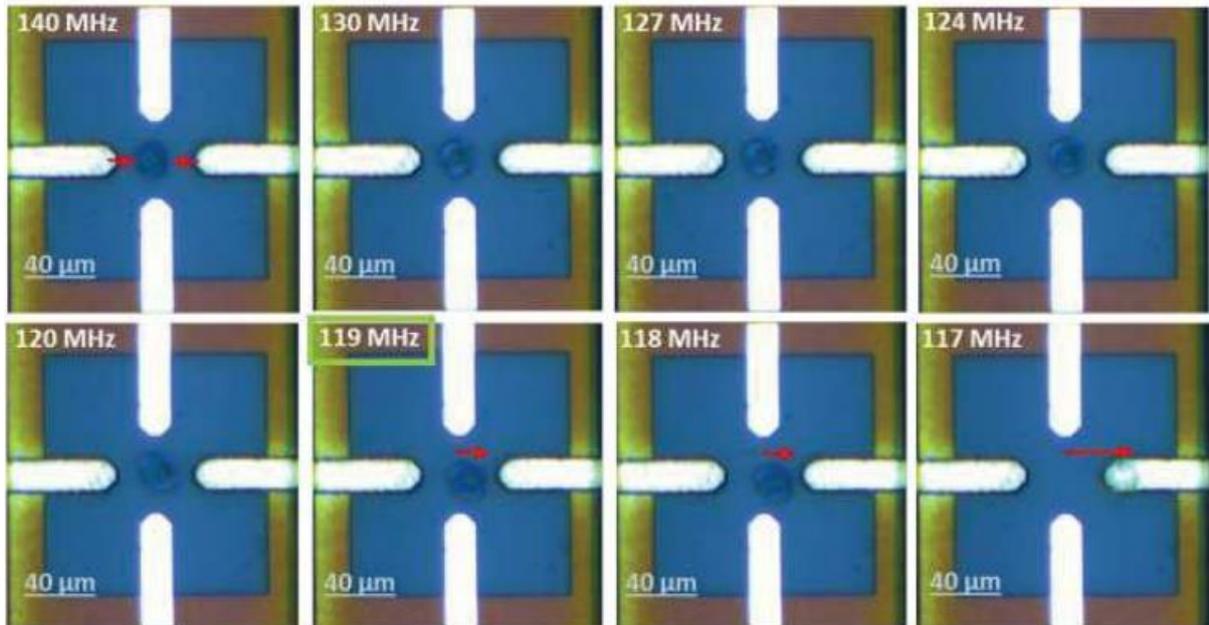


Figure.13 : Séquence d'images sous microscope optique de la mesure de la fréquence de transition f_{xO2} (119 MHz) pour une cellule de glioblastome (U87) par la variation de la fréquence du signal du champ électrique appliqué. Aux fréquences supérieures à 119 MHz, la cellule est repoussée au centre des électrodes en nDEP, et en dessous de cette fréquence, la cellule est attirée par le champ en pDEP [26].

En effectuant ce scan fréquentiel sur un nombre significatif de cellules, il est possible d'obtenir la signature diélectrophorétique d'une population donnée. La Figure.14 illustre les compilations de signatures de quatre populations cellulaires distinctes. Chacune de ces signatures est constituée des données de mesure de fréquences de transitions, f_{xO2} , d'un grand nombre de cellules ($n > 50$) et est présentée sous forme de diagramme en boîte. Ces diagrammes en boîte montrent la dispersion de valeurs de f_{xO2} qui peut exister au sein d'un même type cellulaire. La partie colorée représente la gamme de fréquences mesurée pour 50% des cellules étudiées avec le trait de la médiane à l'intérieur.

Au travers des données de la Figure.14, nous observons deux types de populations cellulaires différentes issues de deux lignées de Glioblastomes humains : les U87 et les LN18. Pour chaque lignée, une signature a été établie pour une population cultivée dans un milieu de culture conventionnel dit normal (NN) (diagrammes en boîte bleus) et une autre cultivée dans un milieu défini (DN) (diagrammes en boîte rouges) ayant la propriété de favoriser spécifiquement la multiplication et l'enrichissement en cellules souches cancéreuses.

Nous pouvons observer l'impact de cet enrichissement sur les signatures enregistrées. En effet, en milieu de culture DN, les cellules les plus différenciées présentent généralement de faible taux de survie à la différence des cellules souches ou en voie de différenciation. Il en résulte une diminution de l'hétérogénéité globale des populations cultivées dans ce type de milieu se traduisant ici une plage de fréquence de transition plus ramassée pour les

populations DN. Nous pouvons aussi noter un abaissement significatif des fréquences de transitions mesurées sur cette population en comparaison avec les cellules cultivées en milieu NN. Un recouvrement existe avec la plage de fréquence des cellules NN qui représente l'image de la population globale. Nous pouvons noter cette même tendance de modification de signature induite par le milieu de culture pour la seconde lignée cellulaire. En revanche, nous pouvons noter que la différence de signature de f_{X02} entre les deux lignées cellulaires utilisées qui sont représentatives de la même pathologie, reste peu marquée.

Ainsi, il peut être conclu au travers de l'étude [27] que f_{X02} peut permettre d'identifier la présence de CSC au sein d'une population donnée. Si une cellule présente une fréquence de transition faible face à la f_{X02} médiane de la population totale, sa probabilité d'être une CSC est supérieure.

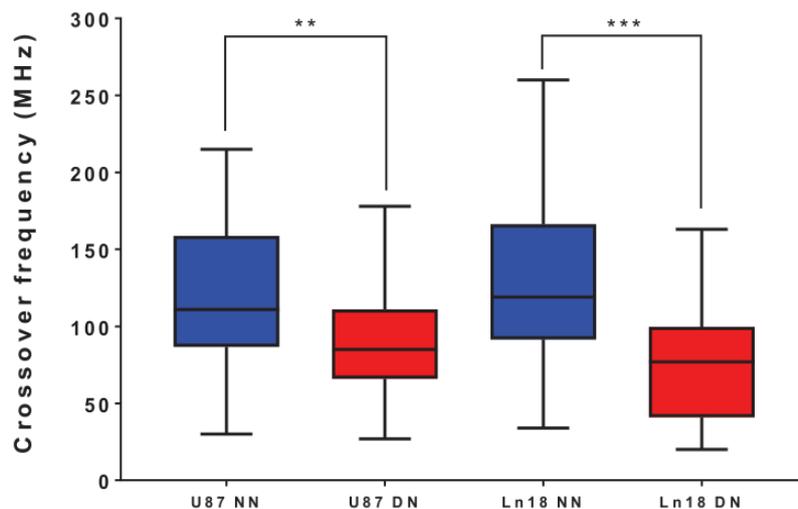


Figure.14 : Graphique en boîte présentant les secondes fréquences de transition de cellules U87-MG et LN18 cultivées dans deux conditions différentes : en bleu la culture est faite en milieu normal (NN) en rouge une culture en milieu défini (DN). Les valeurs de p sont déterminées par One-way ANOVA test. *** représente une valeur de $p < 0,0001$; ** représente une valeur de $p < 0,001$. [26]

Ses résultats démontrent qu'il est possible potentiellement de trier les CSC en mettant à profit cette différence significative de fréquences de transitions. C'est dans cet objectif que les travaux menés durant cette thèse visent au développement d'un cytomètre électromagnétique mettant à profit la DEP-UHF en exploitant les différences de fréquence de transition haute f_{X02} de cellules ayant des états de différenciation différents.

1.3.4. Viabilité cellulaire et caractère non-invasif de la méthode :

Il est important, lorsque l'on utilise le principe de diélectrophorèse et donc que l'on soumet les cellules à un champ électrique de prendre en compte et d'évaluer les risques de perméabilisation, réversible ou irréversible, de ces dernières. En effet, par l'application d'un champ électrique pulsé, le champ résultant peut générer un effet perméabilisant sur la membrane de la cellule et impliquer des échanges entre l'intérieur et l'extérieur de celle-ci. Ce principe d'électroporation est utilisé à des fins thérapeutiques car il permet notamment d'insérer de l'ADN dans les cellules [28]. Si le champ appliqué est trop intense, typiquement à partir de $1,1 \text{ kV.cm}^{-1}$ pour une impulsion supérieure à $50 \mu\text{s}$ [28], cela entraînera la perméabilisation irréversible et donc la mort de la cellule. Cette mort cellulaire entraînée par

l'application d'un champ n'est pas limitée à l'application d'une impulsion électrique et doit être considérée avec l'utilisation de tensions alternatives.

En effet, des études ont été menées sur des temps d'exposition des cellules plus longs [29]. Avec un système d'électrodes espacées de 22 μm à 40 μm , des cellules ont été soumises à un champ électrique générant une répulsion sur celles-ci. La viabilité des cellules au cours du temps d'exposition (Figure.15) a été observée par fluorescence. Après 15 minutes d'exposition, pour une tension appliquée de 3 et 5 V_{pp} (courbes rouge et vertes), la viabilité des cellules reste supérieure à 90%. Ces champs apparaissent ainsi peu dangereux. En revanche pour le champ généré par une tension de 10 V_{pp} (courbe bleue), la viabilité diminue à 80%. Ce même champ entraîne au cours du temps la mort de plus en plus de cellules jusqu'à ce qu'après 135 minutes d'exposition toutes soient mortes, le champ étant trop intense.

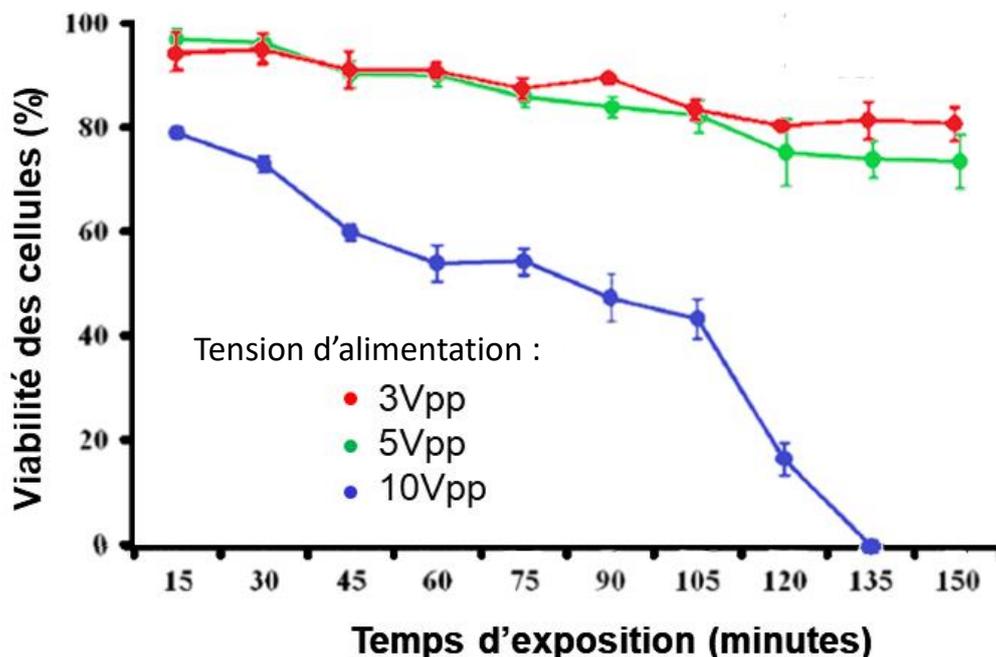


Figure.15 : Viabilité des cellules exposées à un champ électrique sur des temps allant de 15 à 135 minutes pour différentes intensités de champ dans un milieu aqueux composé de sucrose (80,7 g/L), de dextrose (4,4 g/L), et d'HEPES en tant qu'agent tampon pour le pH (2,4 g/L) [29].

Contrairement à l'utilisation d'une tension de 10 V_{pp} , les tensions de 3 et 5 V_{pp} apparaissent inoffensives pour les cellules, la viabilité diminue avec un temps d'exposition plus long. Ainsi, après 150 minutes d'exposition au champ électrique, environ 20 et 25% des cellules sont mortes sous l'effet du champ.

L'intensité n'est pas le seul paramètre qui impacte la viabilité des cellules, la fréquence l'influence aussi. La Figure.16 présente un microsystème (a) avec lequel le pourcentage de mort cellulaire a été observée selon l'application de différentes tensions alternatives (b). Après avoir été piégée par le système, la cellule reste en présence du champ électrique appliqué durant 1 minute. Nous pouvons voir qu'avec l'application d'un signal à 100 kHz (courbe bleue), c'est à partir de 1 V_{pp} , pour un système avec des électrodes plus proches que précédemment, qu'une partie des cellules meurent, tandis qu'avec l'application d'un signal à 1,3 V, toutes les cellules périssent. A 10 Mhz les premières cellules mortes sont observées à partir d'une tension de 2,7 V et toutes meurent avec l'application d'un signal de 4,2 V pendant 1 minute.

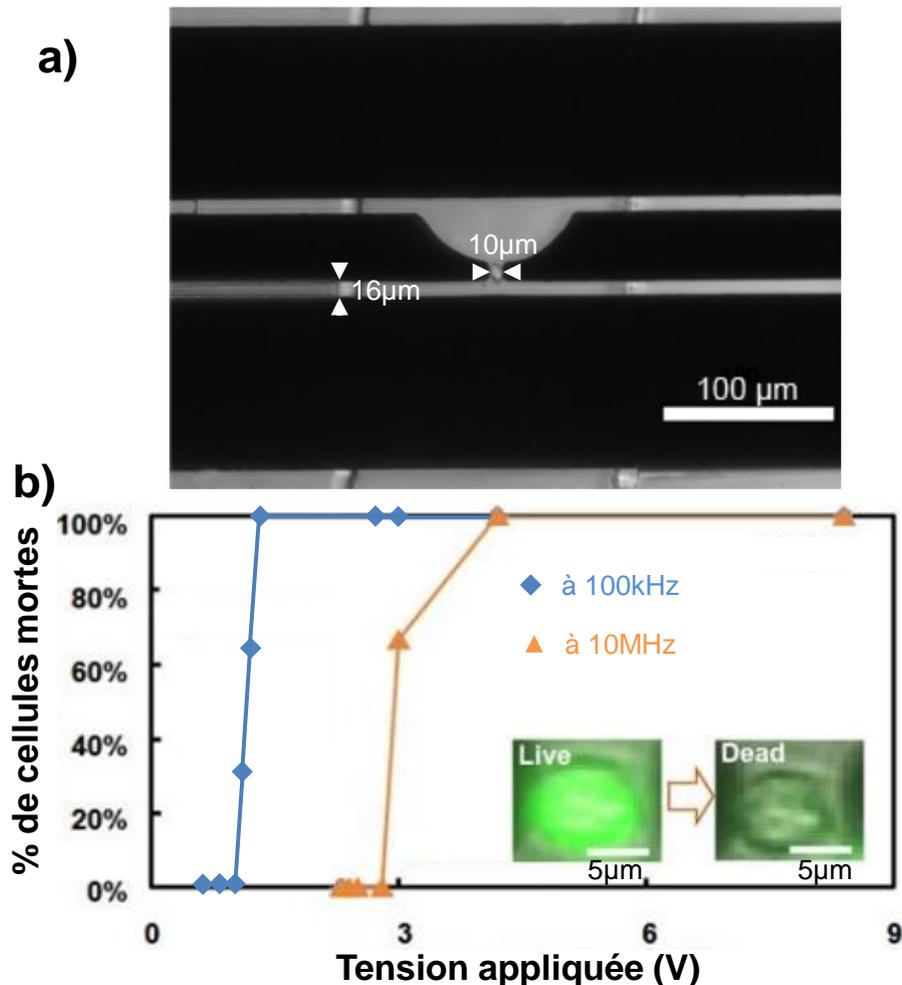


Figure.16 : a) système utilisé dans un canal microfluidique de 22 μm de profond, les électrodes sont en noir. Les cellules testées sont entre le gap de 10 μm au centre de la photographie. b) Pourcentage de cellules mortes par rapport à la tension appliquée à 100 kHz (bleu) et à 10 MHz (orange). Les photos incérées montrent la vérification optique de la viabilité de la cellule par fluorescence verte. [30]

Cette différence de tension selon la fréquence du signal qui induit la mort cellulaire peut être liée au temps de charge de la membrane. En effet, comme il a été présenté dans le modèle électrique de la cellule, la membrane est vue comme une capacité qui présente donc un temps de charge sous l'effet du champ électrique. Ce temps est évalué de l'ordre de 350 ns à 3 μs selon la conductivité du milieu variant de 100 $\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$ à 10 $\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$ pour une cellule de 14 μm de diamètre et de conductivité interne de 1,5 $\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$ et une épaisseur de membrane de 5nm [28]. Ainsi avec un signal de 100 kHz qui possède une demi-période de 5 μs , la membrane de la cellule peut pleinement se charger en ce laps de temps ce qui est moins le cas pour un signal de 10 MHz qui a une demi-période de 50 ns.

Ainsi l'utilisation de la gamme des fréquences UHF permet d'appliquer des tensions plus grandes (comparé à la DEP à plus basse fréquence) sans atteindre le phénomène d'électroperméabilisation à proscrire dans ces travaux pour garantir le caractère non invasif de la méthode.

I.4. Le tri cellulaire : contexte et enjeux

Il a été présenté au cours de la partie précédente que les cellules pouvaient être caractérisées d'un point de vue diélectrique. C'est à partir de ces caractérisations que des différences de comportement DEP ont pu être identifiées et permettent d'envisager une séparation des cellules par rapport à leurs différences diélectriques et donc biologiques. La caractérisation apparaît donc une première étape indispensable pour mener à bien le tri de cellules d'intérêt.

Pour mener à bien la conception d'un système qui, à partir d'une caractérisation des cellules en lien avec le phénomène de DEP-UHF, permettrait de trier des cellules, il est important dans un premier temps, de présenter une vision des systèmes existants.

Deux grandes familles de systèmes de tri cellulaire se distinguent, divisées entre les techniques utilisant des marqueurs pour indirectement reconnaître des caractéristiques cellulaires et les techniques dites « label-free » n'ayant pas recours à ses marqueurs.

Parmi les systèmes de tri les plus connus dans la première famille, on peut citer la cytométrie en flux qui représente à ce jour l'une des méthodes d'analyse les plus utilisées en biologie cellulaire. Cette méthode présente l'avantage d'une grande vitesse d'analyse, permettant ainsi d'analyser plus de $3 \cdot 10^4$ événements à la seconde avec certains systèmes disponibles sur le marché. Les informations collectées peuvent être très variées depuis la détection de certains types d'antigènes jusqu'à des propriétés physiques de la cellule comme sa viscosité en particulier. Ce procédé d'analyse est d'ailleurs à la base d'une technique de tri nommé FACS (acronyme de Fluorescence-Activated Cell Sorting) qui, en quelques minutes peut séparer les cellules en différentes sous population sur des critères basée sur la reconnaissance de marqueurs fluorescents.

La seconde famille, dite « label-free », présente une moins grande maturité que les techniques ayant recourt à un marquage des cibles. En revanche, en s'affranchissant des marqueurs, il n'est par conséquent plus nécessaire de réaliser les étapes de marquage qui peuvent s'avérer longues, fastidieuses et onéreuses en fonction de la cible et du nombre de marqueurs à combiner. L'utilisation de ces techniques sans marqueur permet également de limiter les perturbations/altérations potentielles subies par la cellule du fait de la présence des marqueurs [31]. Aussi, ces techniques ne permettent pas, la plupart du temps, d'atteindre une précision aussi bonne que les techniques avec marqueurs ; en revanche, elles permettent d'investiguer certaines spécificités constitutives, morphologiques, physiques ou chimiques de la cellule en lien avec le phénomène utilisé.

Ces deux grandes familles de techniques de tri cellulaire sont donc très complémentaires. C'est d'ailleurs le cas pour l'étude des cellules souches cancéreuses pour lesquelles, à ce jour, il n'existe pas encore de marqueur incontesté et spécifique à ce type cellulaire qui permettrait de les identifier et de les reconnaître avec précision. L'accroissement de l'expression ou l'absence d'expression de différents marqueurs représentatifs de certains critères connus des cellules souches (indifférenciation, pluripotence...) permettent d'affiner un faisceau de preuves pour converger vers l'identification des cellules ayant un caractère souche. C'est pourquoi le développement de techniques « label-free » connaît un fort essor afin de répondre à cette problématique d'identification incontestable et de possibilité d'isolement par une technique de tri.

Nous allons à présent détailler des exemples de systèmes pour ces deux grandes familles.

I.4.1. Les différentes techniques de tri avec marqueurs

Cette première famille de tri utilise des marqueurs qui vont se fixer sur la cellule grâce à des mécanismes de reconnaissance d'antigènes par des anticorps soit sur la surface membranaire comme dans l'exemple de la Figure.17, soit au niveau intracellulaire.

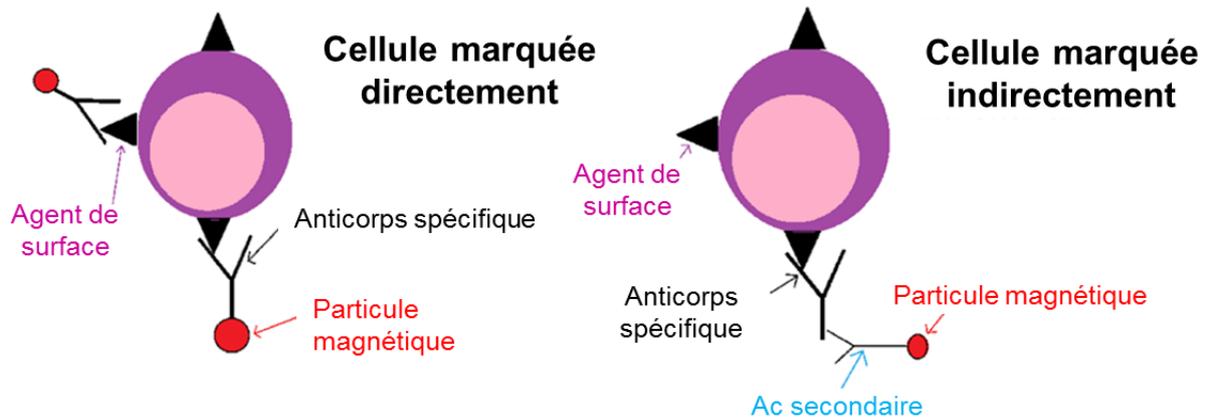


Figure.17 : Schéma présentant le marquage d'une cellule au travers d'anticorps (marquage direct) et d'anticorps plus As pour permettre l'accroche de la particule magnétique sur l'anticorps (indirect). [32]

Ces marqueurs peuvent être magnétiques (techniques MACS) ou encore fluorescents (techniques FACS) et seront plus amplement discutés dans la suite de ce chapitre. L'utilisation de ses marqueurs n'est pas limitée à la reconnaissance d'un seul antigène à la fois. Il est possible par exemple dans certains cas de cytométrie en flux d'utiliser plus d'une trentaine de marqueurs différents réagissant à différents agents de surface de la cellule.

Différents composants de la cellule peuvent être ciblés, tel que l'ADN en cible interne à la cellule, mais aussi des macromolécules présentes à la surface des cellules, qui sont appelées antigènes, qui reflètent l'état cellulaire, et qui servent à la reconnaissance ou non d'une cellule par le système immunologique d'un individu. Ces antigènes peuvent capter entre autre des anticorps. Ainsi, si un antigène associé à un ou plusieurs anticorps devient détectable du fait de l'utilisation de marqueurs (fluorochromes, magnétiques ...), la technique permet de connaître la spécificité de la cellule grâce au repérage de ces antigènes.

Souvent ce n'est pas une réponse uniquement binaire qui est obtenue, à savoir si oui ou non les marqueurs utilisés ont été captés. La réponse est plus complexe car certaines cellules peuvent réussir à présenter les antigènes recherchés sans être la population ciblée. Le tri se base donc plus sur la quantité d'anticorps captés (se traduisant en intensité de fluorescence ou en concentration de billes magnétiques) que sur le fait que la cellule en ait capté ou non. Bien sûr, les antigènes ne sont pas les seuls éléments qui peuvent permettre le marquage. Par exemple, des réactions bioorthogonales permettent de lier un élément avec des protéines présentes sur les cellules [33].

Les spécificités ciblées par ces techniques (MACS, FACS, ...) vont ainsi varier suivant les marqueurs utilisés sans pour autant avoir à modifier leur fonctionnement. Nous allons voir dans ce qui suit, les étapes nécessaires au tri après marquage des cellules.

I.4.1.1. Tri par marqueurs fluorescence (FACS)

La Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS) est une méthode qui présente une grande maturité et précision, faisant d'elle une des techniques les plus utilisées en routine dans le domaine de la biologie cellulaire. Son objectif est de marquer les cellules par un fluochrome afin de les distinguer optiquement par fluorescence. La simple fluorescence par elle-même ne permet pas de trier, elle permet surtout de reconnaître la fluorescence des cellules de la population qui est testée. Mais il est possible de la compléter avec un système qui permettra de dévier une cellule exprimant une forte fluorescence et de l'isoler des autres n'exprimant pas ou trop peu de fluorescence et réaliser ainsi un tri. La Figure.18 présente le principe de fonctionnement d'un FACS. Avant toute chose, les cellules sont marquées par un ou plusieurs marqueurs de fluorescence chacun attaché à un anticorps donné suivant ce qui est recherché dans la population à trier. La zone (1) présente l'entrée des cellules dans le système, une zone où elles seront focalisées et alignées pour n'y pénétrer dans la colonne d'analyse qu'une par une. Malgré une analyse menée individuellement cellule par cellule, plusieurs milliers de cellules peuvent être néanmoins triées par seconde car les cellules naviguent dans le cytomètre dans des flux très rapides et la détection de fluorescence réalisée en étape (2) est très rapide. En effet, lors de cette deuxième étape, un laser éclaire la cellule à une longueur d'onde donnée afin « d'activer » la fluorescence qui sera émise à une autre longueur d'onde par les fluorochromes qui auraient pu se fixer à la cellule. A partir de cela, deux choses seront observées lors du passage d'une cellule : la lumière diffractée, et la lumière réfractée.

L'analyse de l'intensité de lumière diffractée grâce au forward scatter (FSC) qui la capte, permet de connaître la taille de la cellule. L'analyse de l'intensité de la lumière réfractée par la cellule suite à l'absorption de la lumière émise par le laser, grâce au système side scatter (SSC) est corrélée à la quantité de marqueurs sur ou dans la cellule et donc à la présence des antigènes recherchés. A partir de ces informations, il est alors possible au sein d'une population cellulaire globale d'identifier des sous populations aux caractéristiques spécifiques.

À partir de l'étape (3), on passe à la partie tri du système. Suivant l'intensité de lumière collectée lors du passage de la cellule dans le faisceau laser lors de la précédente étape, la cellule est chargée électriquement, soit positivement, soit négativement. Ainsi lors de l'étape (4), soumises à un électro aimant, les cellules vont être attirées individuellement d'un côté ou de l'autre d'un collecteur permettant ainsi une séparation des sous populations identifiées dans différents contenants. Les cellules non déviées car non chargées continueront tout droit leur course vers un contenant « poubelle ».

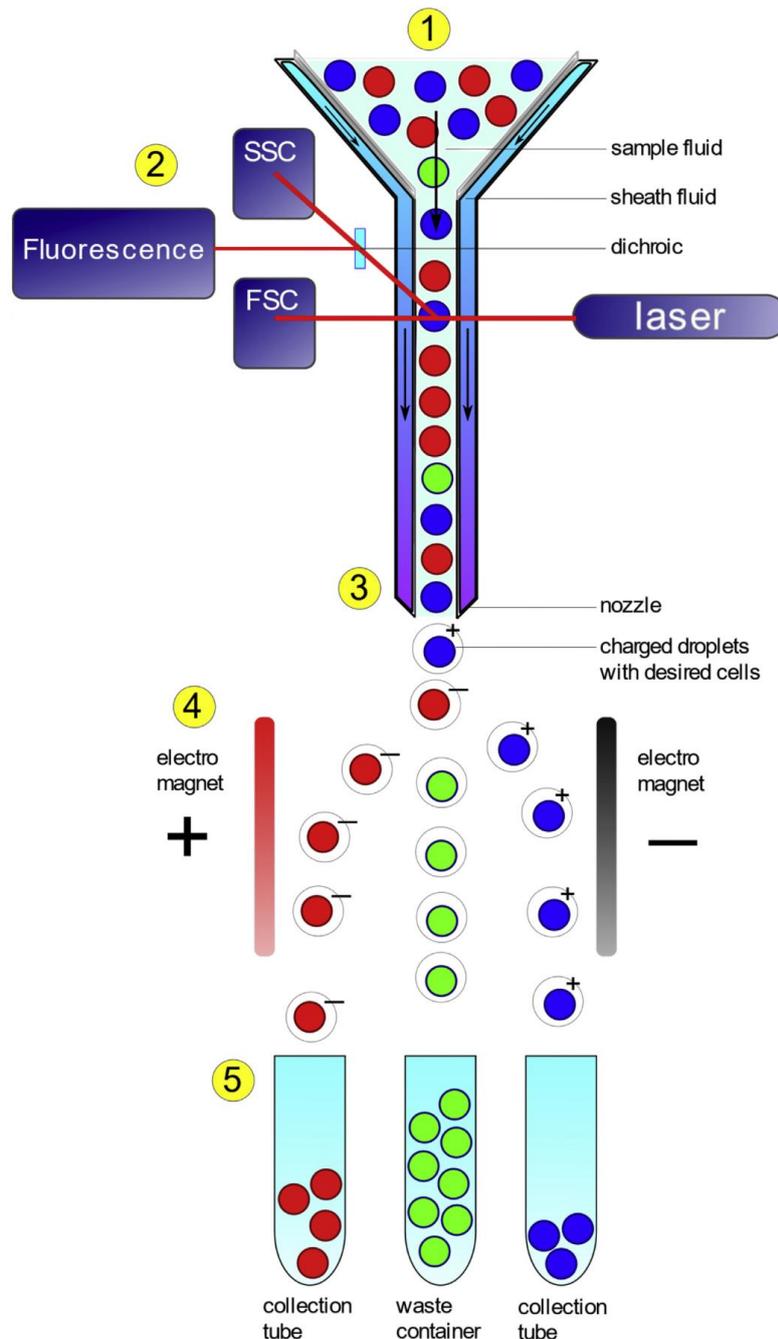


Figure.18 : Schéma d'un tri cellulaire par cytométrie en flux FACS. (1) injection de l'échantillon de cellules centrées par un flux de focalisation qui permet d'aligner les cellules les unes à la suite des autres. (2) passage des cellules pré-alignées devant un laser et mesures cellule par cellule de leur taille par dispersion directe (Foward Scatter FSC), et de leur fluorescence (Side Scater SSC). (3) avant de sortir du système au travers d'une buse, les cellules sont individuellement chargées électriquement. (4) déviation des cellule par un électro-aimant, les dirigeant dans différents tubes en sortie (5) [34]

Certains systèmes FACS, permettent une analyse plus fines des cellules dès l'étape (2) grâce à une prise d'image lors de leur passage. Nous parlons ainsi de cytométrie à image. Ceci permet entre autre, d'identifier les agglomérats mais surtout d'acquérir plus d'informations qualitative qu'une simple intensité lumineuse et la largeur d'impulsion du signal. En revanche ne pouvant pas tenir la même cadence de traitement de cellules par seconde, ce système permet un tri moins rapide que le premier décrit [34]. Pour améliorer la

précision du tri, des marqueurs aux couleurs variées peuvent être utilisés, marqueurs combinés en une seule et même analyse. En 2002, L. A. Herzenberg *et al.* [35] expose la possibilité d'implémenter 12 couleurs différentes de marquage rendues possible grâce à l'excitation réalisée par 3 types de lasers différents.

I.4.1.2. Tri par marqueurs magnétiques (MACS)

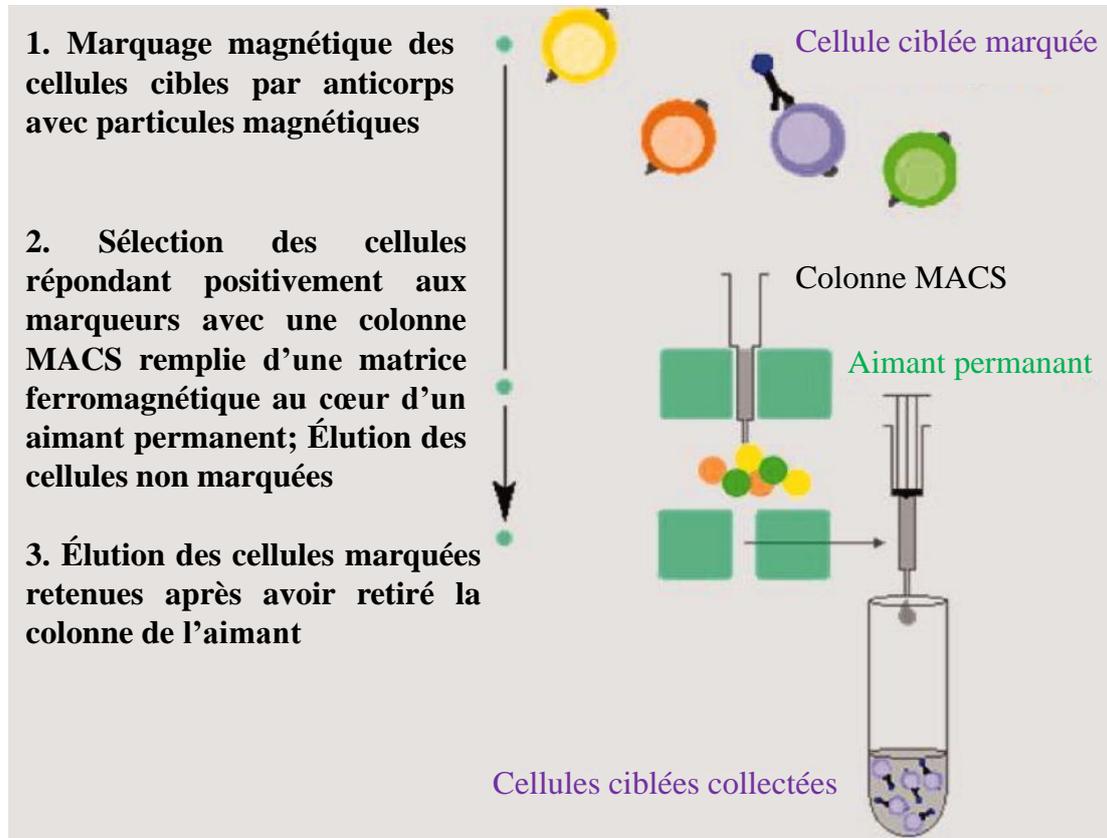


Figure.19 : Schéma illustrant les étapes d'un tri par MACS à aimant permanent externe. Le tri est réalisé grâce à la présence de matériaux ferromagnétiques fixés sur des antigènes utilisés pour marquer les cellules. [36]

Une seconde méthode de tri avec marqueurs, dénommée MACS ou « Magnetic cell sorter », est mise en œuvre grâce à un type de système qui utilise des marqueurs porteurs de particules magnétiques. Ces marqueurs permettent la séparation des cellules suivant la présence ou non des antigènes à leur surface. C'est pourquoi, le marquage au préalable des cellules constitue une première étape indispensable avant d'utiliser n'importe quel système ayant recours à des marqueurs magnétiques comme l'illustre la Figure.19. Une fois cette première étape passée, les cellules passent dans une colonne appelée *MACS*, dans laquelle les cellules sont soumises à un champ magnétique. Celui-ci permet de capter et retenir les cellules qui ont réagi positivement aux marqueurs, tout en laissant passer celles qui ne l'ont pas fait. Après collecte des cellules dites « négatives », la colonne est retirée de l'aimant, libérant les cellules piégées par le champ magnétique du fait des marqueurs et de leurs particules magnétiques : les cellules sont libérées et collectées à leur tour. Nous parlons ainsi de tri négatif.

La Figure.20 présente un second système possédant un panel de 5 intensités de déviation selon la quantité de marqueurs présents sur les cellules. L'approche proposée se base sur le fait que des cellules présentant un plus grand nombre de site de fixation de marqueurs

voient leur trajectoire plus déviée que les autres. Elles sont ainsi menées à une sortie différente, plus éloignée de la trajectoire initiale des cellules qui n'ont pas ou peu capté d'anticorps. En fonction de l'efficacité de la déviation ainsi obtenue, un gradient de concentration de particules magnétiques peut être ainsi établi.

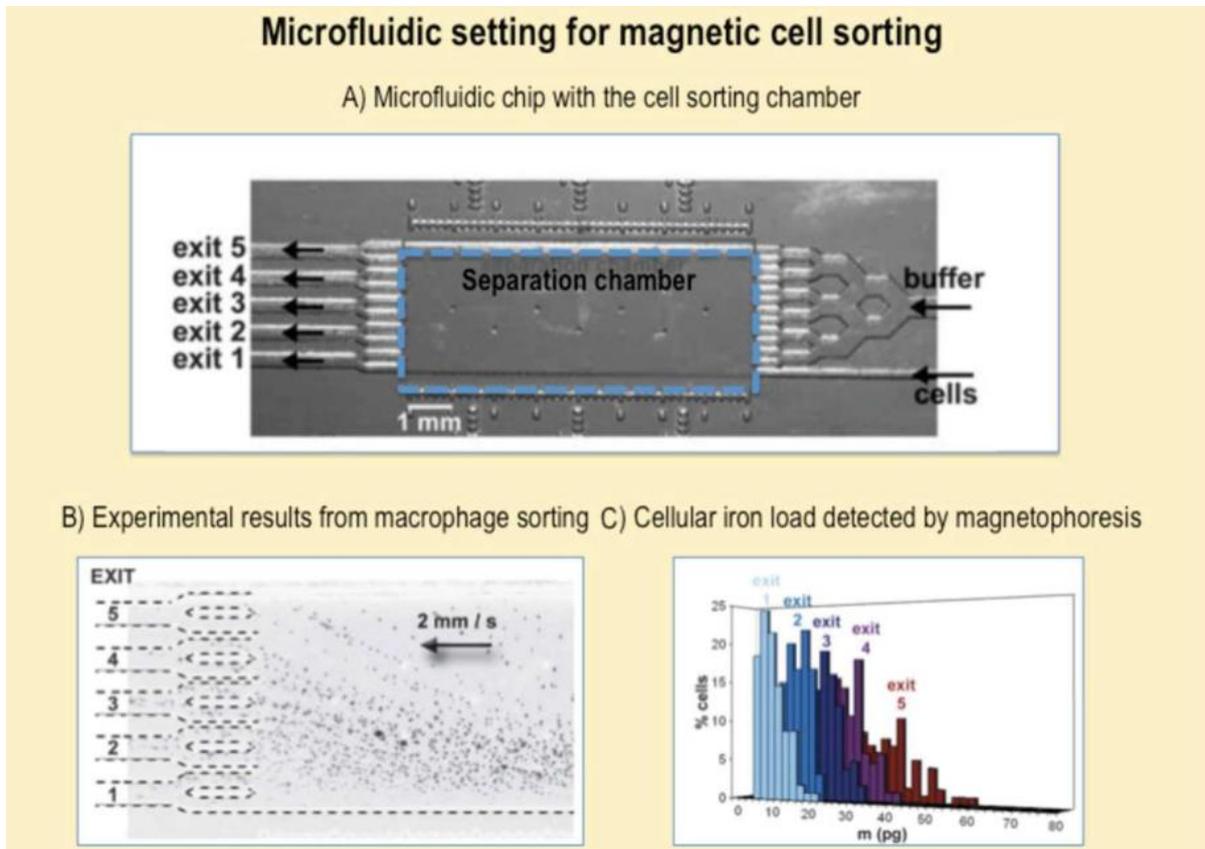


Figure.20 : A) Photographie d'une puce microfluidique avec à droite les entrées cellules et buffer, puis la zone de séparation qui guide les cellules vers l'une des 5 sorties de gauche suivant leur réaction au champ magnétique. B) migration de macrophages vers différentes sorties selon leur différente charge magnétique. C) Après tri, la masse de fer de chaque fraction de cellule est quantifiée par un système de magnétophorèse. [37]

Il existe différentes tailles de particules magnétiques. Elles peuvent être fabriquées avec des diamètres allant de 20nm -100nm à des tailles plus grandes de 1 à 3 μm [36].

I.4.2. Les différentes techniques de tri dites « label-free »

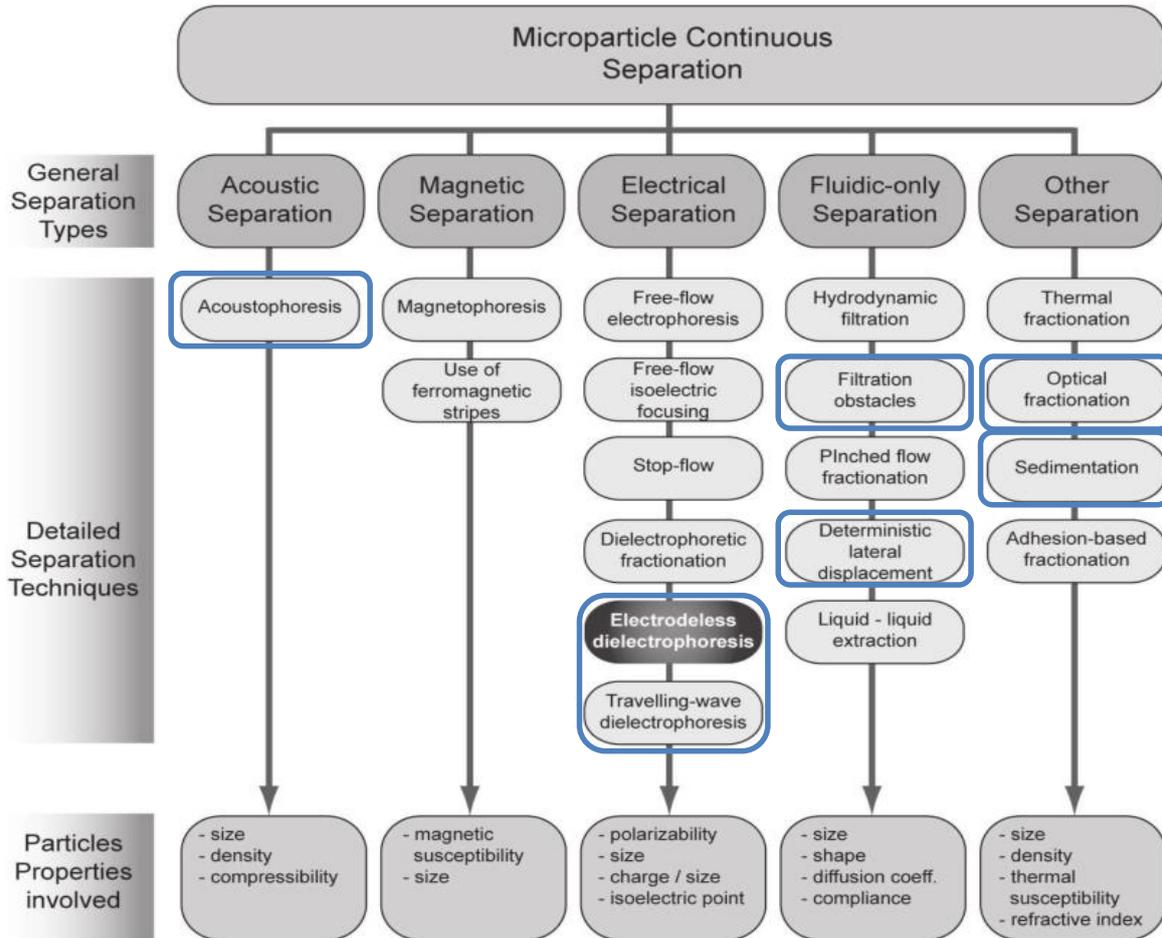


Figure.21 : Diagramme résumant les principales méthodes de séparation en flux continu développées dans la littérature. La diélectrophorèse mise en évidence en noir sera la technique utilisée dans ces travaux de thèse. Sont encadrées en bleu des techniques qui seront discutées [38, p. 167]

Comme nous l'avons introduit précédemment, le recours à un marquage des cellules, n'est pas la seule approche possible, et, comme le présente la Figure.21, il existe un grand nombre d'autres techniques, dites « label-free ». Nous pouvons, entre autre, les classer par le phénomène physique mis en œuvre pour permettre la séparation des sous populations. L'objectif de ces techniques reste de simplifier les étapes préparatoires et de ne pas induire d'altération ou de modification de la cellule avant le tri par l'interaction des marqueurs. Ces méthodes sont privilégiées pour leur caractère non invasif qui permet de ne pas du tout modifier l'état de la cellule de façon définitive après son passage dans la zone de tri.

Chaque technique est largement décrite dans la littérature et permet une mise en œuvre pour de nombreuses applications [7-8]. Nous allons à présent nous focaliser sur quelques-unes de ses techniques au travers d'exemples mis en valeur dans la Figure.21 et associés à différents phénomènes physiques tels qu'un procédé fluidique passif, la force centrifuge, un phénomène optique, la force acoustique et la polarisation sous champ électrique via le phénomène de diélectrophorèse. Ces techniques, comme nous allons le voir, permettent de cibler différentes particularités de la cellule. Toutes les techniques présentées mettent en jeu des forces liées à la taille des particules à trier.

I.4.2.1. Intégration sur un laboratoire sur puce

Les méthodes de tri « label-free » qui vont être présentées, utilisent différents phénomènes physiques, liés à la taille et donc au volume des cellules. Le diamètre typique des cellules eucaryotes étant de l'ordre de la dizaine de μm [17], ces phénomènes entraineront des forces de l'ordre du pN. Pour que ces forces ne soient pas négligeables, une mise à l'échelle de l'environnement de la cellule, tel que les débits et volumes fluidiques ou encore la miniaturisation des électrodes qui génèrent les forces, est nécessaire. Cette miniaturisation a conduit à l'émergence d'une nouvelle génération de microsystèmes d'analyse que l'on appelle laboratoires sur puce ou LOC (Lab-On-a-Chip).

Un LOC peut se définir comme une combinaison de microsystèmes intégrés sur une surface très réduite de quelques millimètres carrés afin de réaliser des fonctions complexes de concentration, de mélange, de séparation et bien entendu, d'analyse. Du fait de cette forte intégration, les volumes d'échantillons traités sont fortement réduits et les phénomènes liés à la taille des cellules sont exacerbés. Les canaux microfluidiques qui équipent ces LOC ont une largeur typique de l'ordre de la dizaine à la centaine de micromètres et véhiculent des débits dépassant difficilement le $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ [41].

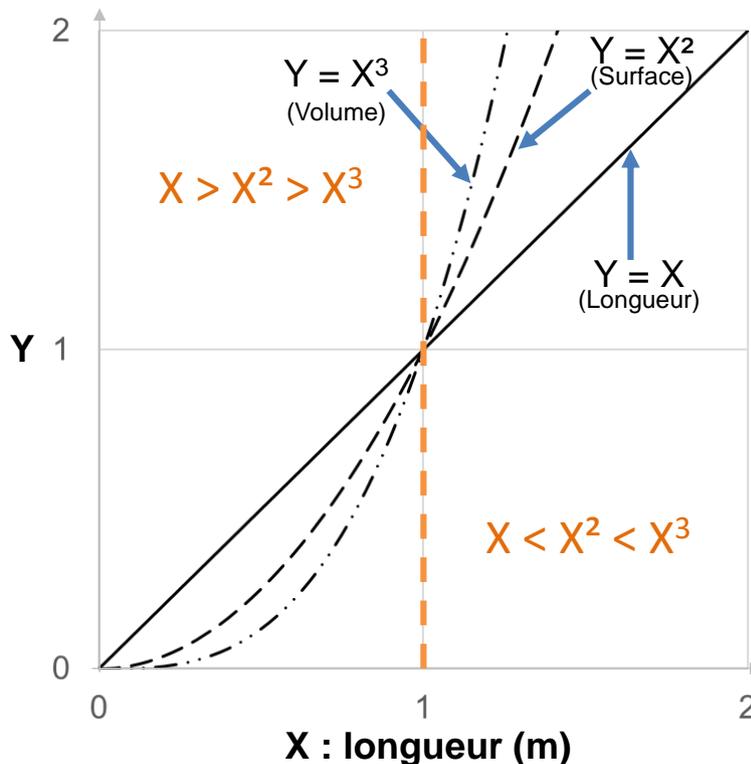


Figure.22 : Impact des lois d'échelles sur les rapports entre les puissances.

Du fait de ces faibles dimensions, largement inférieures au mètre, et des vitesses de flux dépassant rarement le $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$ ou des débits de l'ordre du $\text{mL}\cdot\text{s}^{-1}$, nous observons un renversement d'importance dans les ordres de grandeur entre les forces liées aux longueurs, surfaces ou volumes (Figure.22). Ainsi pour le cas des liquides, l'inertie des liquides (dimension³) n'est plus une force suffisante pour traverser la tension de surface (dimension²), empêchant des mélanges par turbulence : ce sont des conditions dites de flux laminaire.

De plus, avec des canaux présentant des largeurs et hauteurs de l'ordre de plusieurs dizaines de μm , les parois auront une forte influence sur le profil de vitesse du flux

(Figure.23). Cela tient à l'absence de glissement entre les parois et le fluide, la vitesse du fluide est donc nulle au contact d'une paroi. La vitesse du fluide augmente graduellement avec l'éloignement des parois jusqu'à atteindre une vitesse maximale à partir d'une certaine distance des parois (a). Si la largeur du canal est trop faible devant sa hauteur, le flux présentera un profil de vitesse parabolique avec le maximum de vitesse au centre des parois (b).

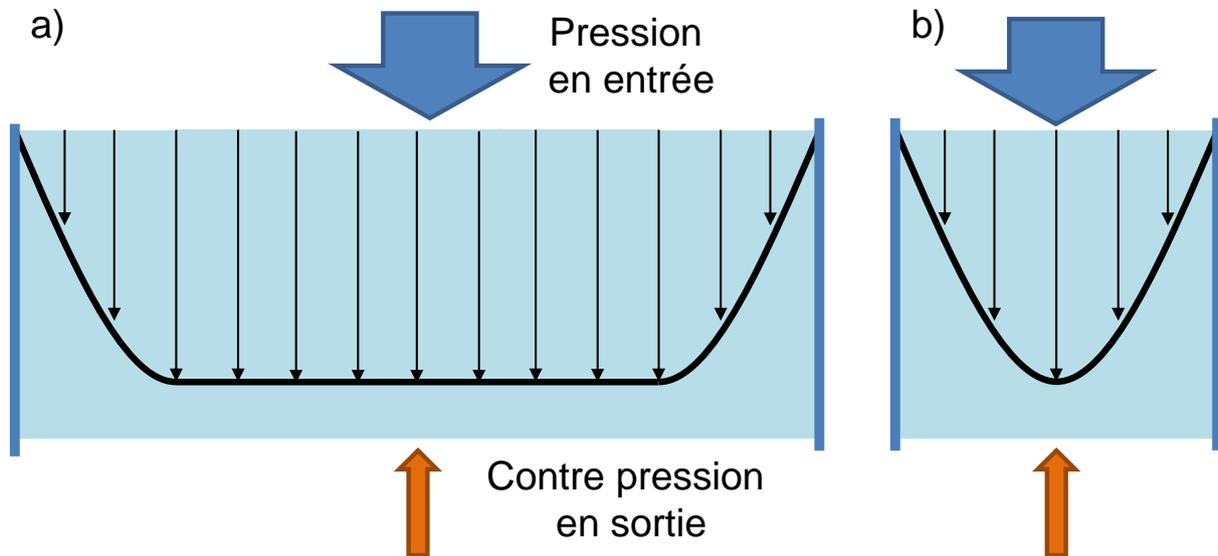


Figure.23 : La présence des parois modifie le profil de vitesse. a) le canal est large et la vitesse se stabilise à une certaine distance des parois ; b) le canal est étroit, ne permettant pas une stabilisation de la vitesse. Le profil de vitesse s'en trouve être parabolique.

Les LOC ont largement démontré, au travers de nombreux développements dans la littérature, leur applicabilité ainsi qu'un très fort potentiel dans les domaines de la chimie [42] et de la biologie [43] ; en particulier leur usage apparaît également très prometteur pour les applications de tri cellulaires « label-free » que nous allons détailler au travers des différents microsystemes qui seront présentés.

I.4.2.2. Techniques fluidiques passives

On distingue tout d'abord les techniques de séparation particulaire dites passives, c'est-à-dire qui induisent un tri de particules du seul fait de la géométrie des canaux microfluidiques ou des forces induites naturellement dans la structure lors du mouvement des particules sous l'effet d'un flux continu.

La Figure.24 illustre la mise en œuvre de cette technique. Des obstacles sont disposés de manière périodique sur le passage de la cellule gênant sa progression en ligne droite dans le sens de circulation du fluide. Il s'avère que ces obstacles n'ont pas le même impact sur la trajectoire des cellules en fonction de leur taille. Les plus petites auront peu de difficulté à contourner les obstacles leur permettant ainsi de garder une direction générale similaire à la direction du flux. En revanche les plus grandes cellules ne pourront pas suivre ce même parcours et se retrouvent alors déviées progressivement par rapport à la trajectoire pseudo rectiligne des plus petites : un tri passif basé sur la différence de taille des cellules peut être ainsi réalisé.

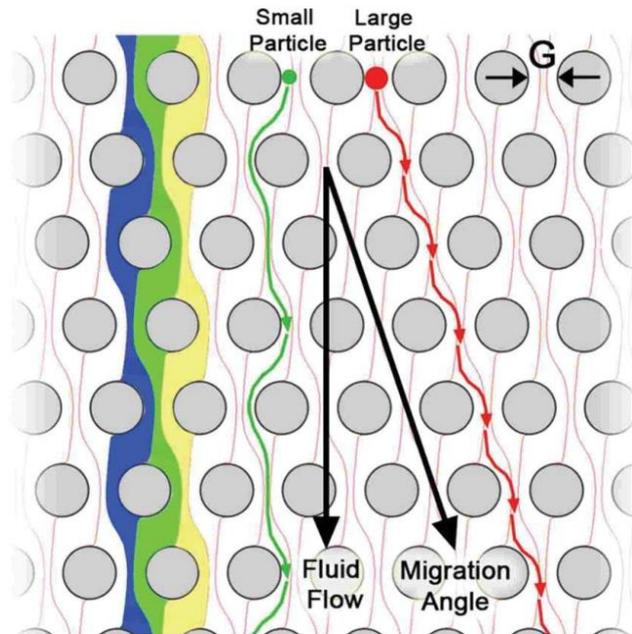


Figure.24 : Schéma de principe de la méthode de séparation par différence de taille. À gauche en bleu, vert et jaune les patterns que prennent les parcours du liquide entre les piliers. Les plus petites particules peuvent suivre le chemin fléché en vert, alors que les plus larges cellules ne peuvent suivre la trajectoire du flux du fait de leur taille, les menant ainsi vers la droite et générant ainsi une séparation des particules. [44]

D'autres systèmes passifs peuvent également tirer avantage d'autres phénomènes physiques tels que la gravité. Les forces induites par le flux sont aussi utilisables pour réaliser des systèmes de tri. Le prototype présenté sur la Figure.25 utilise en particulier la force d'inertie afin de réaliser un tri sur le critère de taille des particules. Le concept est ici démontré avec des microbilles de verre. Le principe est simple : injectées par un côté (Figure.25.A), les billes vont suivre le flux rectiligne jusqu'à arriver à un virage où la séparation des particules s'opèrera. Du fait des forces d'inertie, les plus grosses particules vont se retrouver poussées vers l'extérieur du virage alors qu'au contraire, les particules de plus petites tailles vont être amenées à l'intérieur du virage (Figure.25.C). Ce tri nécessite une forte vitesse de flux en particulier pour les environnements LOC, avec des vitesses de l'ordre de $0,1 \text{ m.s}^{-1}$, en comparaison, notre application ne dépassera pas les 10 mm.s^{-1} .

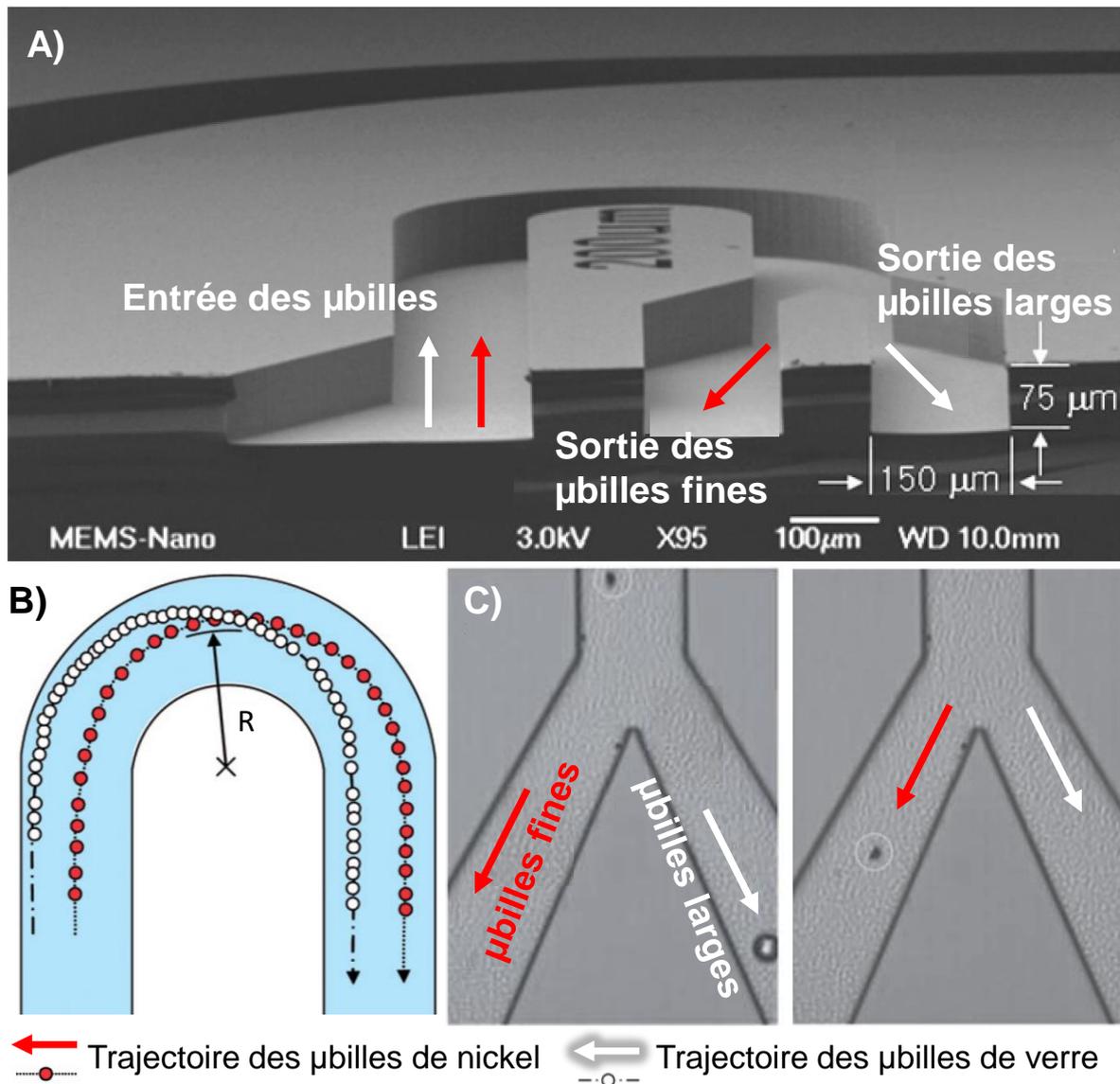


Figure.25 : A) Image par Microscopie Electronique à Balayage des microcanaux d'un système de tri opérant par inertie. B) Images expérimentales montrant en sorties a) une bille de large diamètre prendre la sortie du haut et b) une bille de petit diamètre prenant la sortie du bas. C) schéma des trajectoires théoriques selon la taille des particules. [45]

Il existe en plus de ces méthodes passives, des méthodes permettant la séparation de particules de manière active, qui se basent sur différents types de phénomènes physiques que nous allons voir à présent.

I.4.2.3. Tri par Fractionnement par Flux Force

Les techniques de Fractionnement par couplage Flux Force (FFF) offrent une grande variété de possibilité de tri en mettant à profit différents phénomènes qu'ils soient d'origine thermique, électrique, magnétique, sédimentation ou encore centrifuge. Ces phénomènes vont générer un champ de séparation entre éléments allant de tailles nanométriques (10 nm à 200 nm) à des tailles microniques tels que des cellules biologiques [46]. A titre d'exemple, nous allons ici détailler la sédimentation FFF (SdFFF) ou également appelée « gravitationnal FFF ».

Le principe mis en œuvre est similaire aux autres systèmes FFF : dans un canal de l'ordre de la centaine de micromètres de haut, de 1 à 2 cm de large et jusqu'à 90 cm de longueur [47] les cellules sont injectées d'un côté du canal (Figure.26) où elles sont guidées tout au long par un flux à profil parabolique (plus rapide loin des bords). Dans ce canal, les cellules sont également soumises à un champ gravitationnel perpendiculaire au sens du flux (pour les autres techniques de FFF le champ de perturbation sera tout autre mais toujours perpendiculaire). Ce champ gravitationnel est réalisé par l'effet centrifuge qui apparaît lors de la mise en rotation du système (Figure.26). Au cours de leur trajet dans le canal, soumises à cette force gravitationnelle et d'autres forces propres au mode d'utilisation du système (force de diffusion ou force de portance par exemple), les cellules vont subir une modulation de leur vitesse entre elles liées à leurs caractéristiques propres. Du fait de ces différences de vitesses, on obtient une élution (séparation temporelle) de la population. La collection des cellules en sortie du système, s'étale sur plusieurs minutes et dépend entre autre, du diamètre et de la densité des cellules.

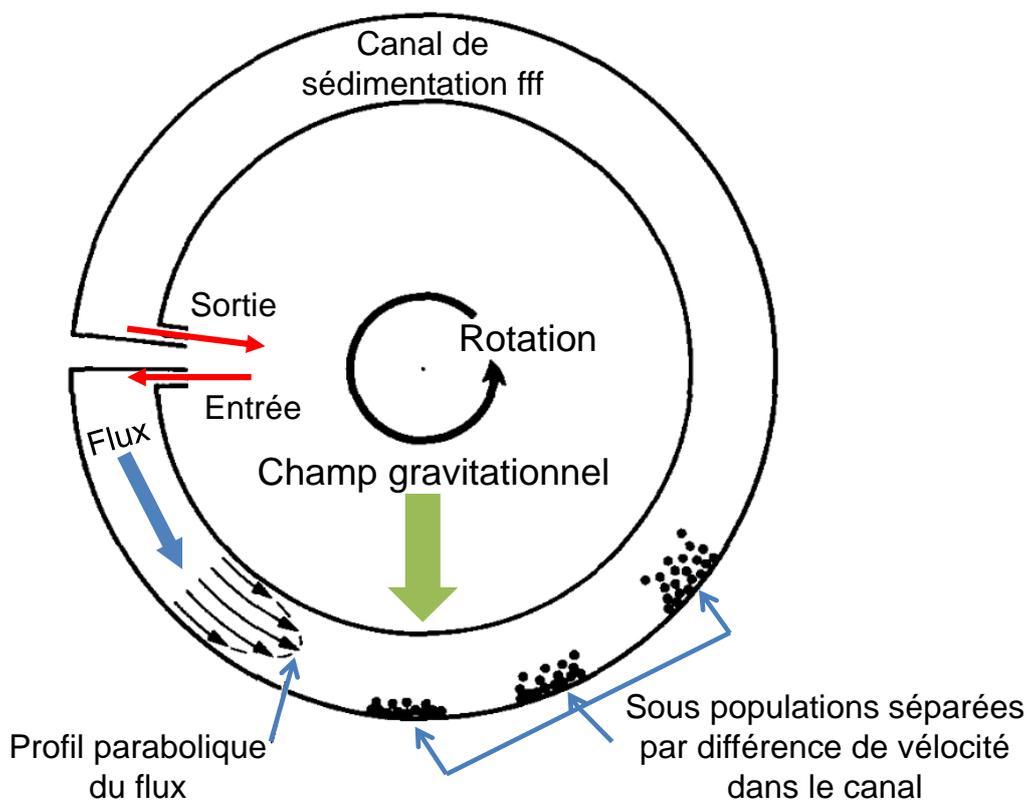


Figure.26 : Schéma de la vue de côté d'un canal de SdFFF dans une centrifugeuse. L'application d'un champ gravitationnel perpendiculaire au flux mène les particules injectées à prendre différentes hauteurs dans le canal suivant leurs caractéristiques induisant des différences de vitesses du fait du profil parabolique du flux. [48]

La collection des cellules peut alors être fractionnée sous forme de différentes sous populations qui correspondent aux cellules collectées durant différents instants. L'étude sélective des cellules de chaque fraction permet ainsi d'identifier les populations d'intérêt. Différents paramètres tels que la vitesse de rotation du canal, le moment de collection jouent sur la composition des fractions à la sortie. Ainsi, il est important d'identifier les paramètres les plus adaptés pour cibler les populations d'intérêt [49].

I.4.2.4. Tri par force optique

On peut dans un premier temps parler des méthodes optiques utilisant des lasers pour modifier la trajectoire des cellules en flux. La présence d'un faisceau laser dans un canal microfluidique génère deux forces différentes sur les cellules. La première est la force de gradient, qui est liée à l'induction d'un gradient lumineux, et attire les particules vers la zone de forte intensité lumineuse. La seconde est la force de diffusion qui pousse les particules dans le sens de propagation de la lumière.

Ainsi, dans l'exemple de la Figure.27, un faisceau lumineux est amené par une fibre optique juste au-dessus du canal fluidique. Selon laquelle des deux forces dominant, l'altitude de la cellule change dans le canal. Là où la force de gradient domine, la cellule s'élève dans le canal. Dans le second cas, du fait de la force de diffusion, la cellule baisse en altitude. Dans le système que propose Y. Yang [50], l'utilisation de ces deux forces combinées avec les forces fluidiques aboutissent à un tri basé sur le critère de taille des particules. Dans le cas des plus petites particules (70 nm), les forces optiques n'auront pas assez d'impact sur celles-ci, les laissant poursuivre leur trajectoire au centre du canal, là où elles étaient focalisées de façon hydrodynamique par deux flux encadrant leur trajectoire. Pour des particules plus grandes (500 nm) la force de gradient les élève dans le canal, mais la force de diffusion n'est pas suffisante pour contrecarrer l'effet du gradient les laissant ainsi au sommet du canal. Pour les particules de 1 μm , en revanche, les forces de diffusion sont suffisantes pour prendre le dessus et ainsi repousser les particules jusqu'au fond du canal.

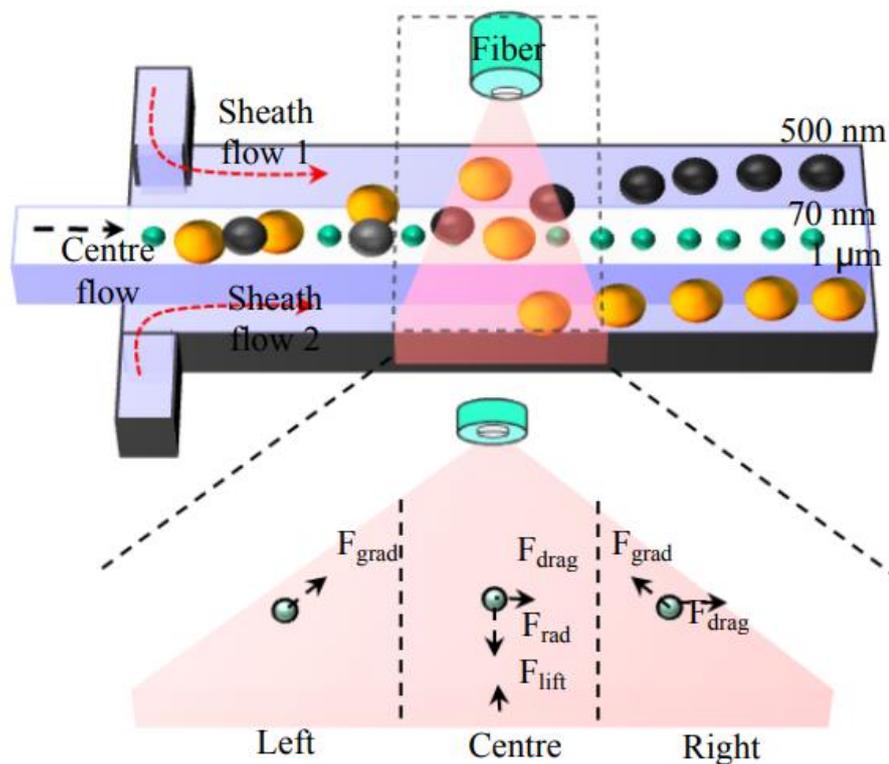


Figure.27 : Schéma représentant un système de tri de micro/nano particules par la combinaison de forces optiques et fluidiques. [50]

Nous venons de voir l'exemple où les forces optiques peuvent permettre un tri selon la taille des particules. Ceci est lié au fait que l'intensité des deux forces qui découlent de la présence d'un faisceau lumineux sont liées à la dimension de la particule. Mais ces deux forces dépendent aussi de l'indice de diffraction et du coefficient d'extinction de la particule

(coefficient lié à l'absorption de la lumière par l'élément) par rapport au milieu : ceci permet donc de réaliser un tri sur les propriétés optiques des particules [51]. La Figure.28 présente justement le cas d'un système basé sur un réseau de pinces optiques qui, dans un flux de l'ordre de $34 \mu\text{m/s}$, réalise un tri sur deux types de sphères de silice, de $1,5 \mu\text{m}$ de diamètre, présentant une différence d'indice de réfraction entre elles. La Figure.28.b présente les trajectoires que le système de séparation donne aux sphères. On peut y voir en rouge la population qui présente la plus grande taille et le plus grand indice optique : c'est celle qui est le plus efficacement déviée par les différentes pinces optiques ; et en jaune la trajectoire de l'autre population dont la trajectoire n'est pas impactée par les forces optiques.

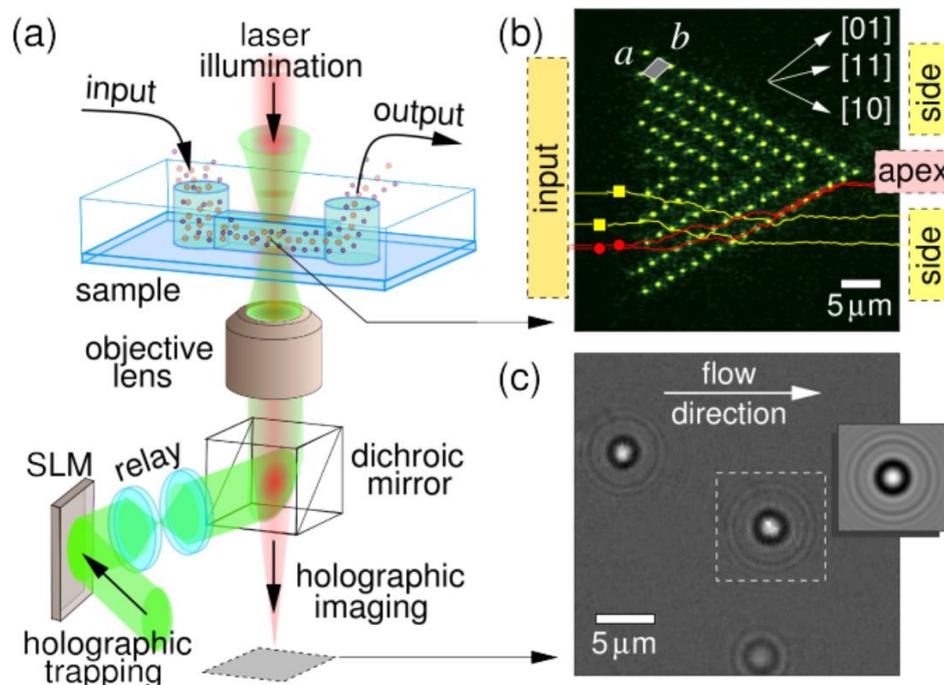


Figure.28 : (a) Système combiné de piégeage optique holographique et de vidéo microscopique holographique. Cette combinaison permet de suivre et de caractériser des sphères de silice pendant la séparation optique. (b) Image de 103 pinces optiques holographiques dans le plan focal du microscope. 4 trajectoires de sphères de propriétés différentes sont présentées avec les rouges déviées jusqu'à la zone centrale et les jaunes n'étant pas assez impactées pour changer de course. (c) Image holographique d'une sphère de silice de $1,5 \mu\text{m}$ de diamètre. [22]

I.4.2.5. Tri par force acoustique

La technique présentée est basée sur un tri induit à partir de vibrations. Ces vibrations vont générer un gradient dans le système avec des zones plus stables que d'autres. Un élément piézoélectrique permet de générer à une fréquence donnée ce gradient. Il en découle la génération d'une force acoustique s'exerçant sur les particules et proportionnelle au gradient acoustique. Cette force, appelée radiance acoustique, permet, en fonction de la fréquence utilisée et de la géométrie du système, de manipuler ces particules (Figure.29). L'intensité de cette force dépend du volume de la particule, de sa densité et de sa compressibilité, et permet par conséquent, de réaliser des tris basés sur l'ensemble de ces caractéristiques. Sur la Figure.29, cette force est utilisée en tant que piège (A) pour bloquer les particules dans le flux établi et ainsi laisser le temps à la gravité et la flottaison de séparer les particules. Dans cet exemple, les globules rouges pour qui la gravité domine face à la portance, tombent au fond du canal, pendant que les lipides, pour lesquels c'est la force de flottaison qui domine vont s'élever dans la hauteur du canal (B).

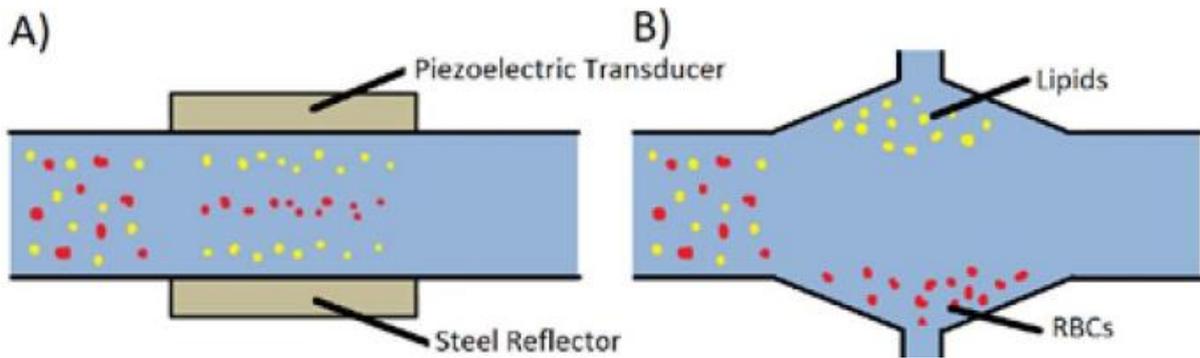


Figure.29 : schéma d'un étage de séparation par acoustophorèse. A) vue de dessus illustrant la répartition que prend la séparation le long du transducteur. B) Vue de côté présentant la séparation des lipides et des globules rouges. C'est la dominance entre la force de gravité ou de portance sur les particules capturées qui réalise cette séparation. [52]

Comme illustré Figure.30, dans le cas de microbilles de SiO_2 , le choix de la fréquence appliquée à l'élément piézoélectrique est important car cette fréquence modifie la forme du gradient acoustique. Dans cet exemple, les microbilles sont en suspension dans une solution et initialement réparties aléatoirement au-dessus de membranes circulaires connectées entre elles, appelées diaphragmes, qui servent à générer des vibrations à l'origine du gradient acoustique.

Une première fréquence de vibration de 7 MHz (Figure.30.c) pousse les billes au-dessus d'un diaphragme sur deux. A 8 MHz (Figure.30.d) les billes sont maintenant déviées au-dessus de chaque centre de diaphragmes. En changeant encore les fréquences de vibrations des diaphragmes, le gradient acoustique est lui aussi modifié, ce qui impacte la disposition des microbilles dans le microsystème.

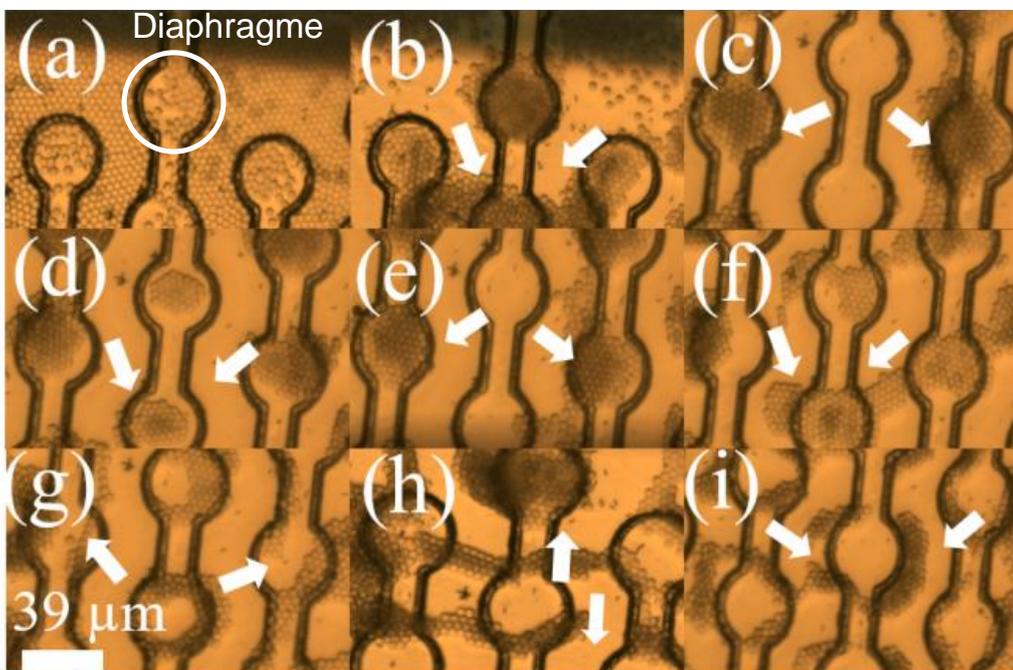


Figure.30 : Différents motifs de disposition de billes obtenus selon différentes fréquences de vibration : (a) 1 MHz ; (b) 3-6 MHz ; (c) 7 MHz ; (d) 8 MHz ; (e) 9 MHz ; (f) 13 MHz ; (g) 17 MHz ; (h) 18 MHz ; (i) 22 MHz. Les flèches montrent les directions qu'empruntent les microbilles de silice avant de se stabiliser dans les positions stables observées. [53]

I.4.3. Différentes utilisations de la force de diélectrophorèse

Nous allons à présent détailler des systèmes permettant de trier des particules/cellules par DEP. Celle-ci a montré une efficacité certaine pour trier des cellules mortes de cellules vivantes [54], des cellules de différentes tailles [12] ou de différentes morphologies [55]. Dans notre cas, c'est sa capacité à discriminer et à séparer des cellules de types différents qui nous intéresse [56].

Grâce aux systèmes de tri présentés précédemment, nous pouvons retenir quatre approches possible d'un tri : par piégeage, par déviation, par décalage temporel et par séparation contrôlée par analyse. Ces quatre approches communes aux systèmes de tri quel que soit le phénomène utilisé, vont être résumées et reprises avec des applications liées au phénomène de DEP, qui nous intéresse plus particulièrement dans ces travaux et qui nous permettent de dégager les avantages et inconvénients.

I.4.3.1. Tri par emprisonnement

Un tri par emprisonnement présente différentes étapes décrites dans la Figure.31. Cette approche vise à retenir une des deux populations de cellules à trier en la piégeant par un champ électrique pendant que le reste de la population reste mobile et est évacuée jusqu'à la sortie de collection (Figure.31.a). Le système MACS avec colonne présenté Figure.19 utilise cette première approche. A la suite de cette première étape, lorsque l'échantillon à trier est totalement passé, il ne reste que les cellules qui ont été capturées par le champ dans le canal microfluidique (Figure.31.b). C'est à ce moment que la population piégée est relâchée à son tour pour être collectée (Figure.31.c).

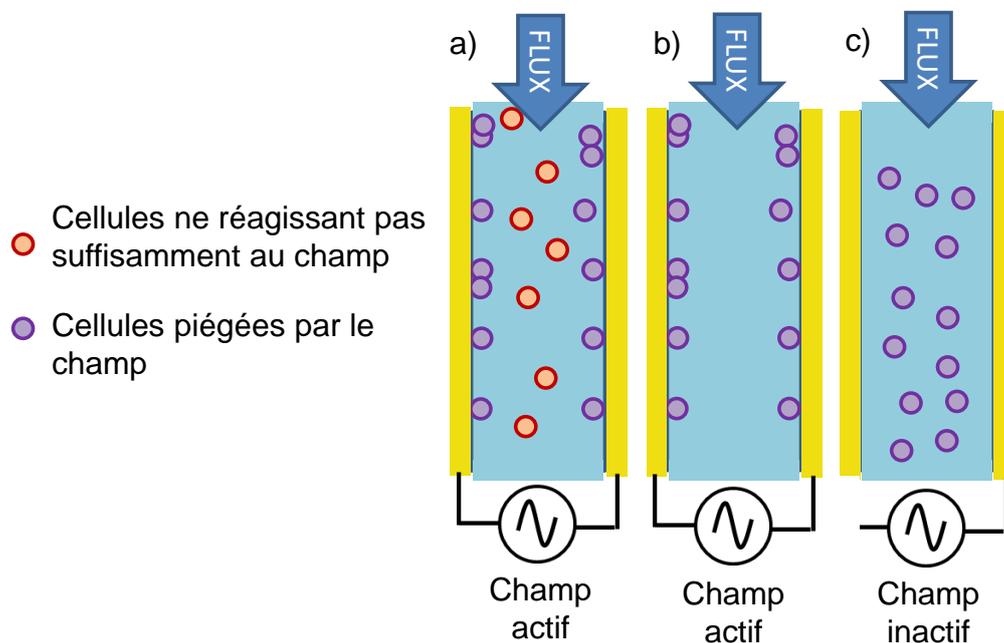


Figure.31 Schéma décrivant les étapes d'un tri par piégeage : a) Le champ est activé et l'échantillon à trier passe dans la zone de tri ; b) une fois l'échantillon écoulé, les cellules ne réagissant pas assez au champ ont été collectées (rouges), seules restent les cellules qui ont été piégées par le champ électrique (violette) ; c) le champ est désactivé et les cellules piégées sont collectées à leur tour.

La Figure.32 présente le cas d'un système où un champ électrique appliqué à la fréquence de 40kHz attire et capte les cellules MDA-MB-231 qui réagissent en pDEP à cette fréquence, alors que les cellules Jurkat sont repoussées par le champ et donc restent portées par le

flux. Nous avons donc ici un tri. Ce cas permet donc typiquement de séparer des cellules qui ne présentent pas la même fréquence de transition en basse fréquence (f_{x01}).

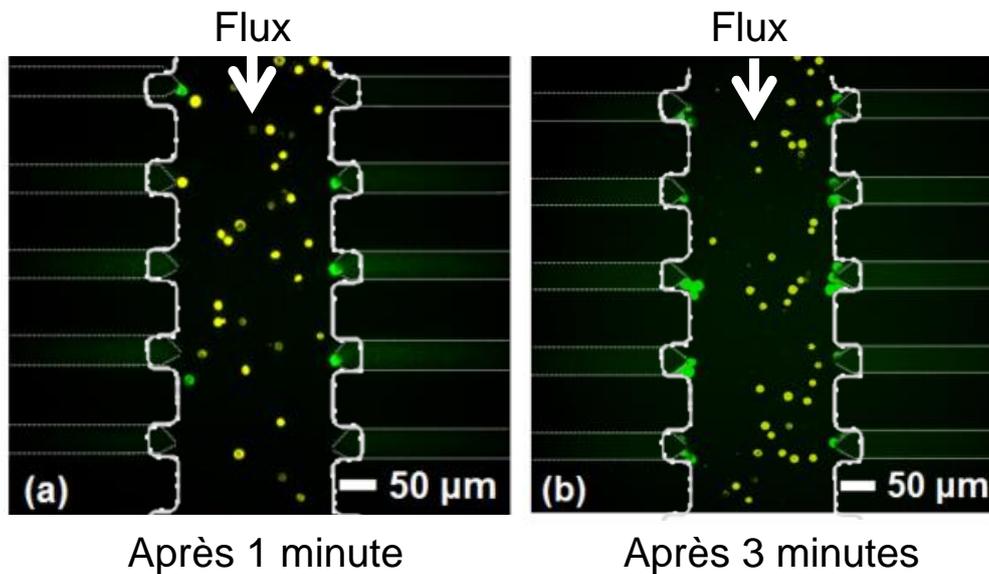


Figure.32 : Photographie par fluorescence de la démonstration du système de tri par DEP-BF après un fonctionnement de (a) 1 minute et de (b) 3 minutes. Le bord des parois en blanc est ajouté après photographie. Un champ électrique AC de 40 kHz est appliqué. Il permet de piéger les cellules MDA-MB-231 (vertes) pendant que les cellules Jurkat (jaunes) continuent à être portées par le flux. [57]

Pour ce type d'approche, une seule entrée et une seule sortie fluïdique est nécessaire, le tube de collection en sortie pouvant facilement être changé avant de relâcher les cellules piégées. Le contrôle de la vitesse de flux est donc aisé. La vitesse du flux représente un des paramètres importants dans le tri, le second étant l'intensité du champ électrique. Un équilibre entre les deux est à trouver pour pouvoir capter toute la population souhaitée [58]. Un champ trop faible pour une vitesse de flux donnée, ou une vitesse de flux trop rapide pour un champ donné, fera que toutes les cellules ciblées ne seront pas capturées par le champ.

Le principal désavantage de cette approche reste que les cellules qui sont ainsi piégées en pDEP, se retrouvent potentiellement exposées au champ pendant des durées longues, ce qui peut s'avérer dangereux pour ces cellules, surtout dans le cas d'un piégeage par pDEP qui les maintient dans les zones où l'intensité du champ électrique est la plus intense.

1.4.3.2. Tri par déviation

Un tri par déviation s'appuie sur un champ électrique pour dévier les cellules de leur position d'origine dans la largeur du canal et pour les guider dans différentes sorties réparties en sortie de la zone de tri. Cette déviation entraîne la sortie des cellules selon une intensité de force comme il a été présenté dans le microsystème par tri magnétique (Figure.20) mais aussi par une position d'équilibre liée à l'application de deux forces comme nous allons le décrire maintenant.

L'exemple de système de tri que présente la Figure.33, est basé sur la superposition de deux forces nDEP aux sens opposés et perpendiculaires au sens du flux, qui permettent de dévier les cellules d'un côté ou de l'autre du canal. La position de la cellule dans la largeur du canal dépend de la réaction de la cellule aux forces combinées générées par les deux

champs auxquels elles sont soumises. Toutes les expériences liées à ce système sont menées avec des fréquences inférieures ou égales à 5 MHz.

Le choix des signaux utilisés pour générer les champs électriques disposés de chaque côté du canal conditionne l'utilisation du système. En utilisant deux signaux identiques (en fréquence, amplitude et en phase), les cellules, qui sont soumises à des forces de répulsion, sont guidées au centre du canal.

Si l'intensité des deux signaux est différente, les cellules sont déviées d'un côté ou de l'autre du canal selon l'intensité du signal. Nous avons ici le cas d'un système qui guide les cellules qui sont déviées à différentes positions dans le canal et ainsi menées dans différentes sorties disposées à la fin du réseau d'électrodes.

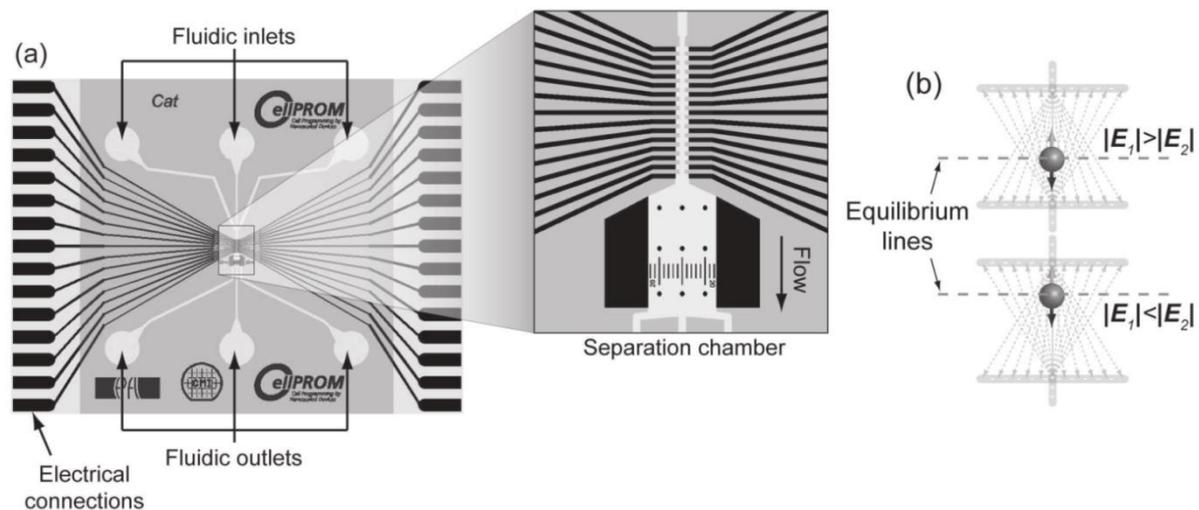


Figure.33 : (a) Implémentation d'un système de tri par DEP constitué de deux réseaux d'électrodes en vis-à-vis ; (b) la différence de force DEP appliquée sur la particule par chaque réseau d'électrodes détermine la position d'équilibre de la cellule dans le canal. Cette position d'équilibre pousse les particules vers une sortie différente selon les particules. [38]

Si les deux signaux présentent la même intensité mais des fréquences différentes, alors le fonctionnement est autre. Dans ce cas-là, les deux forces nDEP s'exerçant sur la cellule n'ont pas la même intensité du fait de la différence de fréquences qui fait que f_{CM} n'est pas le même pour les deux forces. En conséquence, la cellule est poussée d'un côté ou de l'autre du canal. Si la cellule présente des caractéristiques diélectriques qui font que pour ces deux fréquences différentes, elle présente un f_{CM} identique, alors elle est déviée au centre du canal. En revanche, si le f_{CM} de la cellule n'est pas le même pour les deux fréquences de signal appliqué, alors la cellule est décalée d'un côté ou l'autre du canal vers le champ électrique qui est généré à une fréquence où son f_{CM} est le plus faible. Dans cette configuration, les cellules sont guidées dans différentes sorties selon leurs caractéristiques diélectriques au travers de la partie réelle de f_{CM} .

A présent, nous allons voir un exemple de microsysteme qui trie les cellules en fonction de la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti ($Im[f_{CM}]$) (Figure.34). Ce micro systeme utilise un réseau d'électrodes alimenté par 4 signaux d'amplitudes identiques mais déphasés entre eux de 90° (Figure.34.b). Lorsque qu'une force DEP est liée à un champ qui est généré par un réseau d'électrodes de trois phases ou plus, nous parlons de « traveling waves DEP force » (twDEP). Les cellules soumises à ce champ sont poussées par une force DEP dans le sens de la propagation de l'onde (i.e. de 90° vers 180°) ou inverse (i.e. de 180° vers 90°)

selon si $\text{Im}[f_{\text{CM}}]$ est respectivement positif ou négatif. Nous parlons de $+tw\text{DEP}$ si la partie imaginaire de f_{CM} est positive, et dans les cas contraire nous parlons de $-tw\text{DEP}$.

Ainsi dans le système présenté dans la Figure.34.a, les cellules qui au préalable ont été focalisées au centre du canal, arrivent à la zone de tri : les cellules trop petites ou ne réagissant pas assez au champ continuent leur trajectoire en restant au centre du canal pour terminer leur course dans la sortie centrale (cellules violettes) ; celles qui réagissent en $-tw\text{DEP}$ (cellules rouges), sont déviées vers la sortie gauche du canal en étant repoussées par les fortes intensités du signal à un instant donné. Pour les cellules réagissant en $+tw\text{DEP}$ (cellules bleues), présentant un $\text{Im}[f_{\text{CM}}]>0$ à la fréquence utilisée, elles sont poussées vers la sortie sur la droite du canal, attirées au contraire vers les fortes intensités du champ à un instant donné.

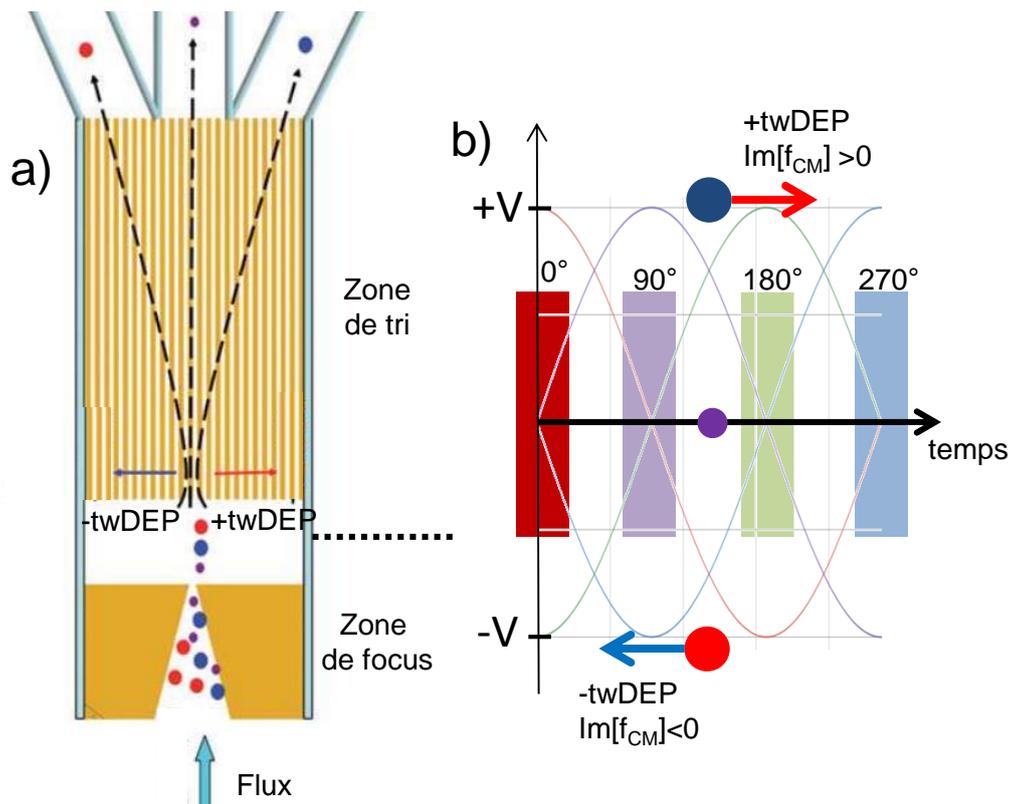


Figure.34 : (a) Schéma en vue de dessus d'un système de séparation de cellules par $tw\text{DEP}$. Selon la direction de la force DEP liée à $\text{Im}[f_{\text{CM}}]$ les cellules vont prendre différentes sorties ; b) Une cellule en $+tw\text{DEP}$ suit toujours la phase présentant le plus haut potentiel et se déplace donc dans le sens de propagation de l'onde, au contraire, une cellule en $-tw\text{DEP}$ va vers le plus bas potentiel [59].

Contrairement à l'approche par piégeage, les cellules restent en présence du champ électrique seulement une dizaine de secondes, selon la vitesse de flux. Par contre, les cellules étant guidées dans des sorties distinctes, il est nécessaire d'intégrer autant de sorties que de populations que l'on souhaite différencier. L'exemple précédent présente 3 sorties distinctes et ainsi 3 sous-populations différentes pourront être collectées. Dans le cas de la Figure.20, c'est 5 sorties qui sont utilisées pour distinguer 5 types de sous-population. Il est important que chaque sortie présente une même résistance fluidique afin d'éviter un déséquilibre fluidique qui perturbera le tri. Si par exemple une sortie présente une résistance fluidique de sortie trop faible, le débit du flux sera supérieur dans cette sortie et pourrait aspirer des cellules devant sortir dans une autre zone de collection.

I.4.3.3. Tri par décalage temporel

Cette approche de tri consiste à identifier les cellules selon leur instant de sortie. Un phénomène (gravité, DEP,...) est utilisé afin de modifier la vitesse des cellules différemment selon leur réaction à ce phénomène. Ainsi, les cellules qui auront la plus grande vitesse sortiront en premier alors que les plus lentes sortiront en dernier. La sortie est la même, ainsi se sont les temps de collections qui permettent de différencier les populations collecter.

C'est l'approche sur laquelle est basée la SdFFF présentée Figure.26. Il existe d'ailleurs dans la famille de tri FFF : la DEP-FFF qui, par application d'un champ électrique non-uniforme, module la hauteur des cellules dans le canal, leur donnant ainsi des vitesses différentes selon le profil parabolique du canal. Du fait de cette différence de vitesse, les cellules sortent du système successivement selon leur réaction propre au champ. Cette méthode convient peu à une intégration type LOC du fait des dimensions nécessaires au bon fonctionnement d'un tel système : généralement des longueurs de canaux de plusieurs dizaines de centimètres [60].

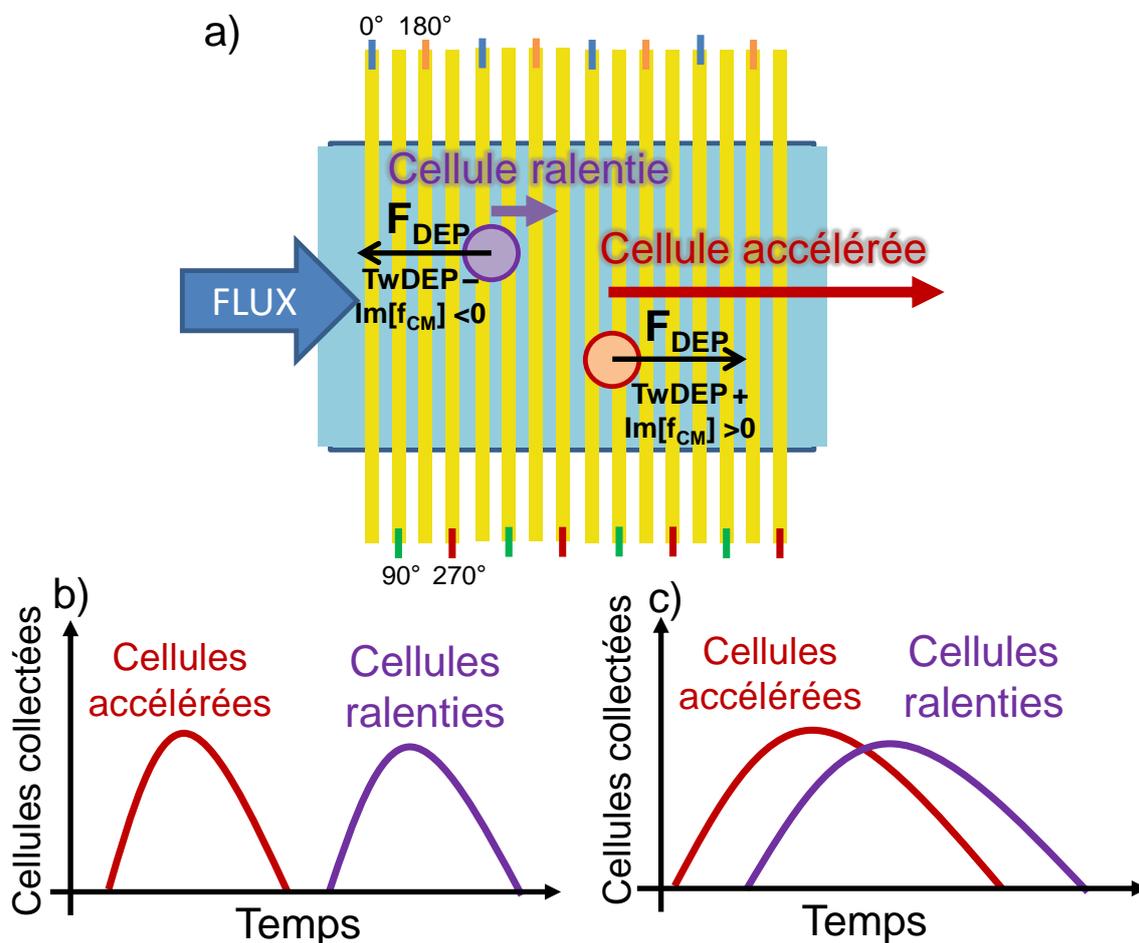


Figure.35 : Utilisation de la TwDEP pour réaliser un tri par décalage temporel. a) système d'électrodes présentant 4 phases toutes décalées de 90° ; b) chronogramme de collections des cellules dans le cas d'une population accélérée par le champ (rouge) et d'une seconde ralentie par celui-ci (violet) ; c) le temps entre l'injection des premières et des dernières cellules est trop long ainsi les populations ne se discernent plus dans le temps.

Dans cette même idée d'imposer des vitesses différentes aux cellules selon leurs caractéristiques, la TwDEP peut être utilisée (Figure.35). En disposant un réseau

d'électrodes à la perpendiculaire du flux (a), les cellules réagissant en +twDEP, sont accélérées pendant que les cellules en -twDEP sont ralenties. Ainsi du fait de la modulation de leur vitesse basée sur $\text{Im}[f_{CM}]$, les cellules sortent de la zone de tri à des temps différents (b)).

En revanche comme il n'est pas souhaité de se retrouver avec un canal de l'ordre de plusieurs dizaines de centimètres, les échantillons à trier sont limités en volume pour éviter que les dernières cellules entrées dans la zone de tri, ne sortent en même temps ou après les cellules les plus lentes entrées en premier dans le système (c)).

Tout comme le tri par emprisonnement, le système fluide à mettre en œuvre est simple et peut se résumer à un simple canal avec uniquement une entrée et une sortie. Pour que les différences de vitesses soient significatives, la longueur de la zone de tri doit, en revanche, être importante et les temps de collection et d'injections doivent être contrôlés pour permettre la séparation des populations.

I.4.3.4. Tri cellulaire contrôlé par analyse

Dans cette approche, le phénomène utilisé ne se base pas sur une différence dans la trajectoire des cellules. Le phénomène utilisé permet de collecter une ou plusieurs informations sur une cellule, et active en réponse, un système de guidage orientant la cellule analysée dans une sortie choisie. C'est le cas d'un système FACS (Figure.18) qui présente une partie qui analyse la fluorescence de chaque cellule puis une seconde partie qui l'oriente vers la sortie.

De manière similaire, il est possible de mener une analyse des caractéristiques diélectriques de la cellule, puis à la suite guider la cellule dans une sortie ou une autre selon la correspondance de la cellule aux critères choisis. C'est le cas du système présenté Figure.36. Son principe est basé sur une mesure différentielle grâce à l'implémentation d'oscillateurs, un de référence et un second pour l'analyse des propriétés diélectriques de la cellule. Ces oscillateurs sont liés à des électrodes plongées dans un canal microfluidique. Lorsque seul le milieu est présent dans le canal, les deux oscillateurs sont synchronisés (a). En revanche la présence d'une cellule au-dessus des électrodes d'analyse crée un déphasage entre le signal d'analyse et celui de référence, car la cellule présente une capacité parasite qui entraîne cette désynchronisation des signaux (b). Ce déphasage induit par la présence d'une cellule, varie selon ses caractéristiques diélectriques intrinsèques. Lors de tests, il a été montré que le système présentait pour une variation de capacité de 5 aF, un déphasage de l'ordre de $6,5^\circ$ [61, p. 159].

Ainsi en établissant un critère d'un certain degré de déphasage, il est possible, à la suite de cette analyse, d'activer un guide disposé à la suite pour amener les cellules d'intérêt dans une première sortie et les cellules ne correspondant pas au critère établi, dans une autre.

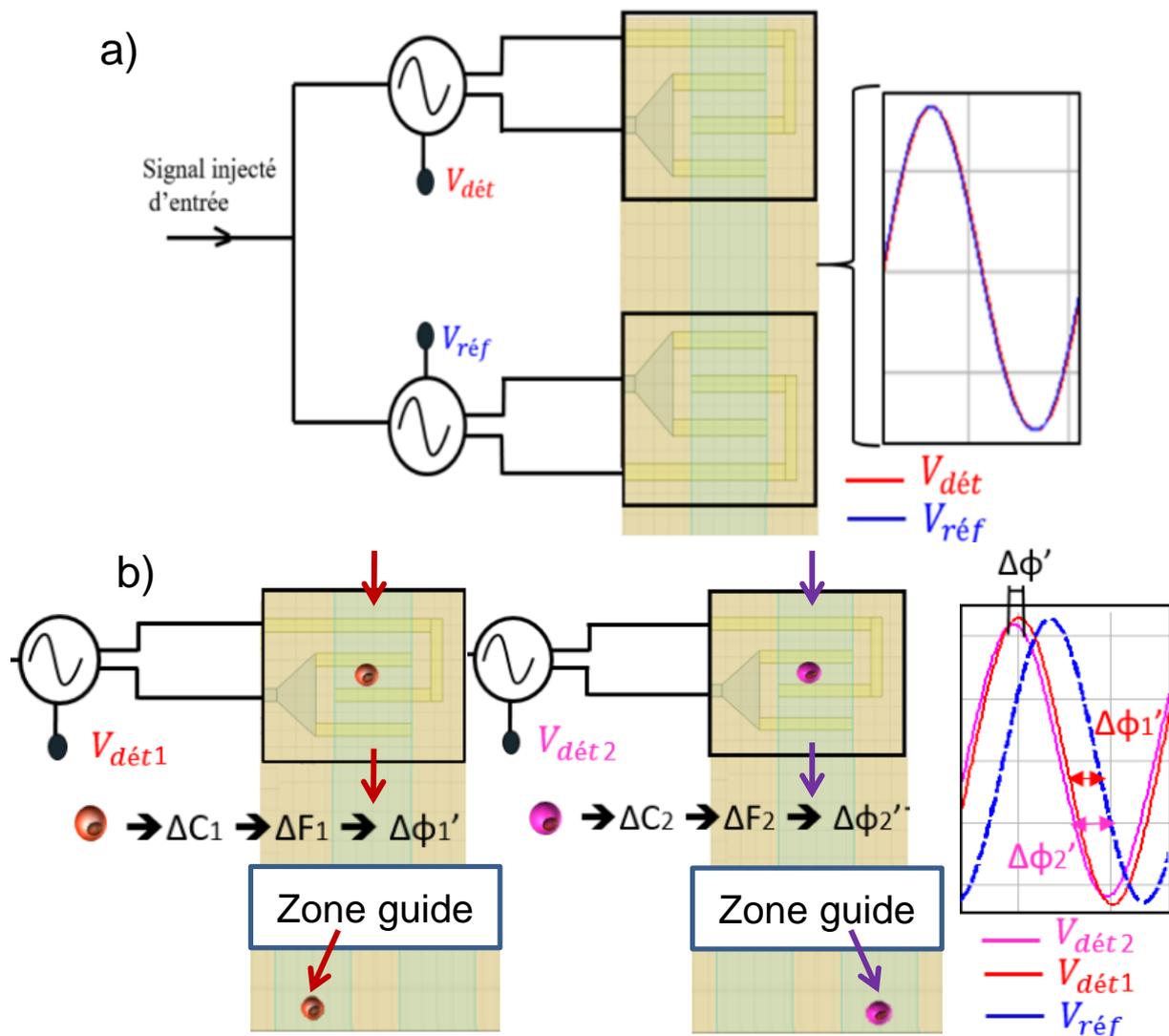


Figure.36 : Principe de fonctionnement : (a) en l'absence de cellules les signaux sont synchronisés, (b) en présence d'une cellule selon la capacité propre engendrée par la cellule sous test, le déphasage du signal d'analyse avec le signal de référence ne sera pas le même. Cette différence permet de choisir dans quelle sortie guider la cellule analysée. [61, p. 95]

La difficulté de cette approche de tri est la rapidité d'analyse et d'interprétation que peut avoir le système qui contrôlera le guide.

I.4.3.5. Choix retenu de l'approche à mettre en œuvre dans ces travaux

Nous avons présenté différentes approches de tris possibles, et la Figure.37 en résume les points critiques. Pour ce qui est des approches par emprisonnement et par décalage temporel, il est nécessaire de stopper ponctuellement l'injection de nouvelles cellules afin de mener à bien le tri faisant d'eux, des systèmes ne pouvant pas fonctionner en continu. De plus, les temps d'exposition des cellules se révèlent être de l'ordre de plusieurs minutes. Comme évoqué § I.3.4, cela ne remet pas nécessairement en question la viabilité cellulaire mais peut compromettre le caractère non-invasif du tri, nous choisissons donc de limiter le temps d'exposition.

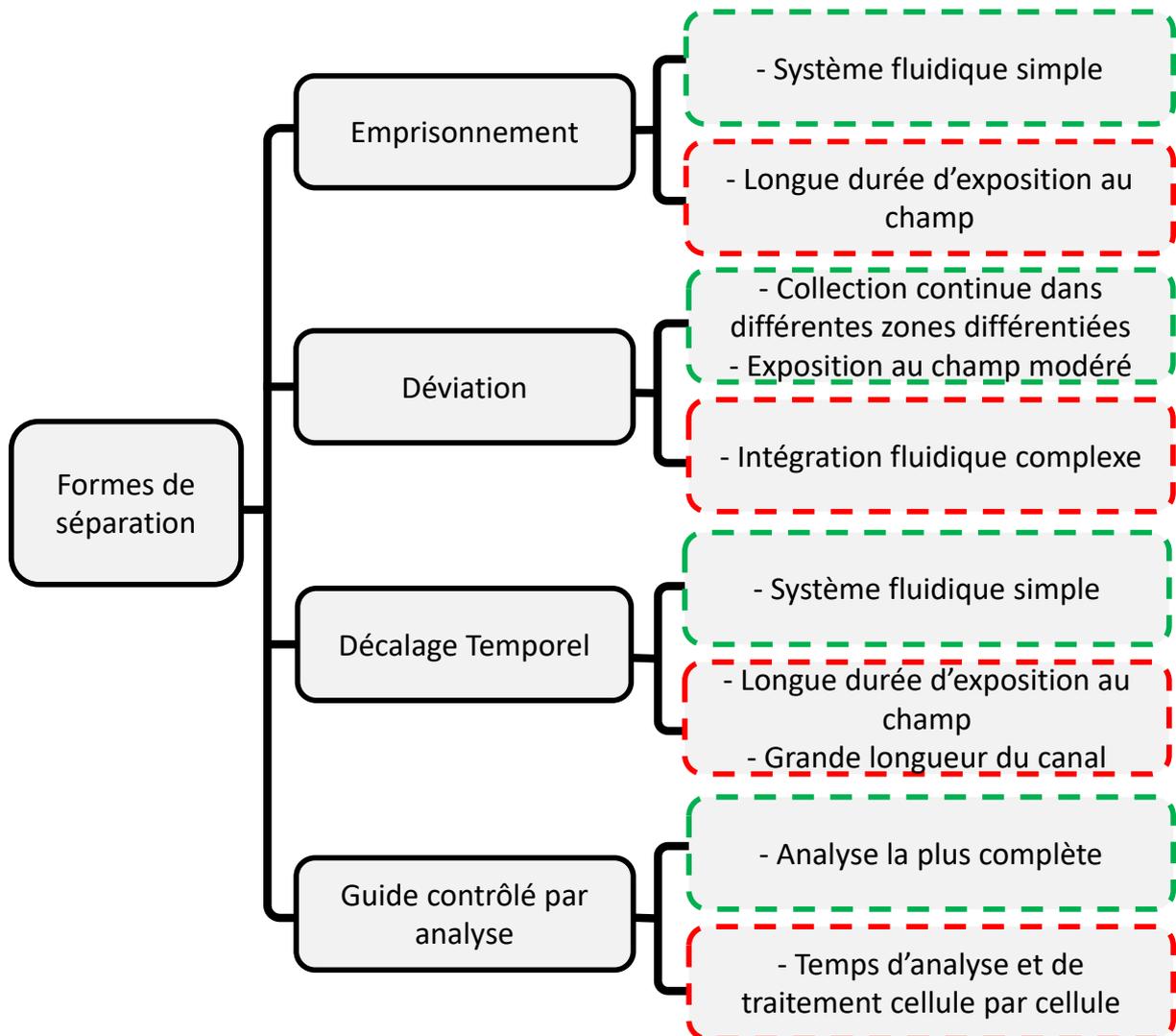


Figure.37 : quatre approches de tri et leurs principaux avantages et inconvénients.

L'approche par déviatation contrôlée à partir des résultats d'analyse, est déjà étudiée dans le cadre du projet SUMCASTEC dans la thèse de Meissa Babay [61] ; ainsi nous mettrons en application la dernière approche qui est celle par déviatation, et qui a pour objectif de trier les cellules d'intérêt selon l'intensité et/ou la direction de la force DEP.

Pour cette approche, deux exemples ont été présentés, un premier où la force est dépendante de la partie réelle de f_{CM} , et un second basé sur la partie imaginaire de f_{CM} au travers de la $twDEP$. Cette technique de $twDEP$ ne sera pas envisagée, car le contrôle du déphasage des différents signaux pour des fréquences de plusieurs centaines de MHz et sur une large bande spectrale, nécessiterait un développement important au préalable pour son bon fonctionnement. Nous choisissons donc d'exploiter les résultats obtenus par DEP-UHF dans la thèse de F. HJEIJ pour développer l'outil de tri cellulaire.

I.4.3.6. Intégration des électrodes

Dans les microsystèmes de tri par DEP présentés dans le § I.4.3, tous implémentent des électrodes métalliques intégrées à l'intérieur des canaux microfluidiques. C'est une démarche très classique et facilement compatible avec des techniques de fabrication par dépôt ou électrolyse sur un substrat lisse. A la suite de la fabrication des électrodes, un polymère est déposé au-dessus du substrat pour réaliser les parois et le capot des canaux.

Reste le problème de la biocompatibilité des matériaux utilisés. En effet, si la biocompatibilité est faible, les cellules souffriront du contact avec l'élément concerné, entraînant leur mort après une trop longue exposition. L'or, par exemple, présente une bonne biocompatibilité et reste inerte biologiquement [62] : il pourra donc être utilisé. La même réflexion est à conduire pour tous les matériaux constituant le LOC. Les substrats de silicium, qu'il y ait une couche d'oxyde ou de nitrure peuvent être utilisés dans des environnements biologiques [63] tout comme le polymère nommé PDMS (PolyDiMethylSiloxane) très souvent utilisé en microfluidique pour former les canaux et/ou le capot supérieur des canaux [64]. L'intégration des électrodes dans le canal peut en revanche générer des fuites. Cela est le cas si les électrodes sont trop épaisses ou si les parois posées au-dessus de celles-ci ne sont pas adaptées (mauvais recouvrement de surface) (Figure.38). Le PDMS possède une souplesse suffisante pour éviter ses fuites pour le cas d'électrodes inférieures à 10 μm d'épaisseur. L'utilisation de résines déposées avec un bon recouvrement ou un polymère très souple peut permettre d'intégrer des électrodes plus épaisses sans risque de fuite.

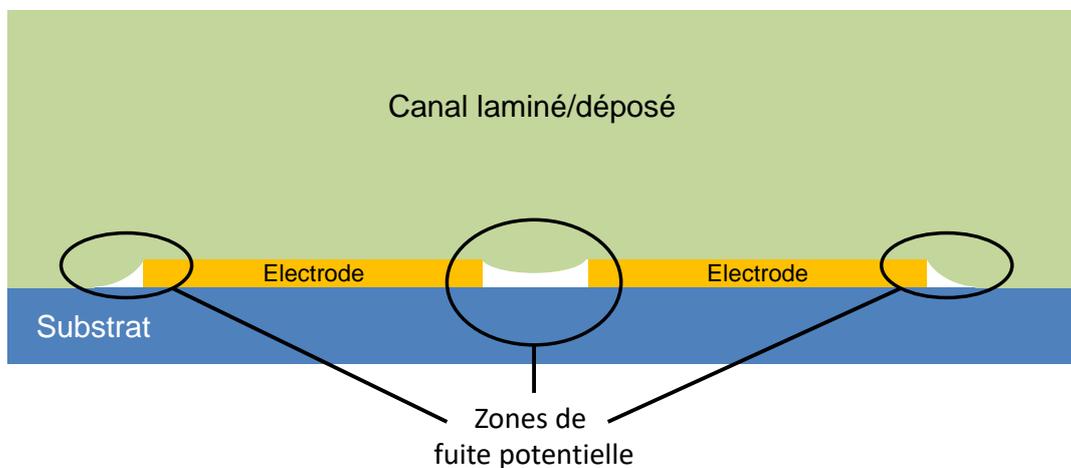


Figure.38 : Risque de fuite dans le cas de parois de canaux mal disposés au-dessus des électrodes disposées dans le canal.

Il est également possible de garder les électrodes à l'extérieur des canaux microfluidiques [12]. Cela offre, en plus d'éviter le problème de fuite présenté Figure.38 et de biocompatibilité, l'avantage d'éviter de présenter des surfaces pouvant être rugueuses et donc entraîner l'adhésion des cellules ce qui pourrait perturber le flux et donc le tri cellulaire.

I.5. Conclusion du chapitre

Ce premier chapitre nous a permis de présenter les enjeux liés au tri des cellules biologiques.

Tout d'abord, les caractéristiques principales d'une cellule eucaryote ont été présentées. De l'ordre de la dizaine de μm de diamètre, elles sont protégées par une membrane qui présente une très faible conductivité de l'ordre du $\mu\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$ pour une permittivité relative allant de 2 à 10 et une épaisseur de 4 à 10 nm. Son intérieur est bien plus conducteur, de l'ordre du $\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$ pour une permittivité supérieure à 50 [6]. Grâce aux caractéristiques diélectriques de la cellule, un modèle électrique est établi et représente la membrane comme une capacité en parallèle d'une résistance.

Nous avons ensuite présenté comment exploiter la polarisabilité des cellules, soumises à un champ électrique, pour les électromanipuler. La force ainsi exploitée, f_{DEP} , varie en intensité et en direction par rapport aux caractéristiques diélectriques, et donc biologiques, des cellules. Il a été vu que pour une cellule donnée dans un champ non uniforme de même intensité, f_{DEP} varie en intensité et en direction selon la fréquence du signal à l'origine du champ. Deux fréquences se distinguent : les « fréquences de transition ». Elles correspondent aux fréquences du signal qui induisent sur une cellule donnée, une force DEP nulle. La première est en basse fréquence (f_{x01}) et la seconde en haute fréquence (f_{x02}).

En mesurant les fréquences de transitions des cellules d'une population, sa signature diélectrophorétique peut être établie. La mesure des f_{x01} de différentes populations cellulaires a montré entre autre une capacité certaine à identifier des populations de cellules sanguines et de cellules tumorales. En revanche, la différence de signature est moins marquée entre populations tumorales. Cette première fréquence est fortement dépendante des caractéristiques de la membrane des cellules. Ainsi, si les différences des cellules tumorales sont internes, la gamme des basses fréquences ne permettra pas de les séparer par le phénomène de DEP.

Pour ce qui est des signatures diélectrophorétiques UHF (mesures de f_{x02}), celles-ci sont fortement liées aux caractéristiques internes des cellules. Il a été montré qu'au sein de populations de cellules tumorales de glioblastome, une forte proportion de CSC entraîne des mesures de f_{x02} dont la médiane est plus basse que cette même population moins enrichie en cellules souches ou en voie de différenciation. C'est pour cette raison que notre choix se porte sur la gamme de fréquence UHF, pour exploiter cette caractérisation dépendante des propriétés internes des cellules qui apparaissent sensibles à l'état de différenciation de la cellule analysée.

Cette montée en fréquence permet, entre autre, de réduire les risques de morts cellulaires par de fortes expositions au champ électrique. En effet, une forte intensité de champ entraîne une dégradation de la membrane de la cellule et donc par la suite, la mort de la cellule. A haute fréquence, l'intensité du champ nécessaire pour entraîner la mort d'une cellule est supérieure à l'intensité nécessaire en basse fréquence. Cela est lié au temps de charge de la membrane qui est supérieur aux demi-périodes de signaux de plusieurs MHz, entraînant une charge plus faible de la membrane pour une même intensité.

L'utilisation de caractérisation par DEP-UHF étant établie, nous nous sommes intéressés à la problématique du tri des cellules en comparant les systèmes existants. Il a été dans un premier temps présenté les techniques utilisant des marqueurs, FACS et MACS, qui sont communément utilisées en biologie cellulaire ainsi que des techniques dites « label-free »

qui utilisent des phénomènes variés aussi bien optiques, qu'acoustiques ou fluidiques. Au vu de ces systèmes, quatre approches pour trier des cellules ont été identifiées :

- Séparation par piégeage : une population est stoppée par le phénomène mis en jeu alors que la seconde reste mobile,
- Séparation par déviation : par la variation de la direction et de l'intensité de la force mise en jeu selon les caractéristiques des cellules, la position des cellules dans le canal est modifiée,
- Séparation temporelle : le phénomène en jeu ralenti ou accélère les cellules selon leurs caractéristiques modifiant leur instant de sortie du système,
- Séparation contrôlée par analyse : système en deux parties, la première analyse les cellules une par une, les résultats sont transformés en commande pour la seconde partie pour dévier la cellule précédemment analysée dans la sortie voulue.

Ces approches ne sont pas dépendantes du phénomène utilisé ou de la forme du système. Ainsi pour chaque approche, un exemple d'application avec le phénomène de DEP a été présenté. C'est l'approche par déviation qui a retenu notre attention afin de mener un tri continu des cellules avec un temps d'exposition au champ ne dépassant pas la minute à partir des analyses des fréquences de transitions f_{X02} des populations.

Notre système de tri par DEP porte sur la gamme des fréquences UHF ce qui est très innovant puisqu'à notre connaissance, jusqu'à présent ce type de système met en jeu des fréquences de tri ne dépassant pas les 50 MHz.

Références bibliographiques du chapitre I

- [1] « l'Institut National du Cancer (INCa) informations ». <https://www.e-cancer.fr>
- [2] « Cellule (Biologie) », *Wikipedia*. https://fr.wikipedia.org/wiki/Cellule_%28biologie%29 (consulté le janv. 29, 2021).
- [3] E. Salimi, K. Braasch, M. Butler, D. J. Thomson, et G. E. Bridges, « Dielectric model for Chinese hamster ovary cells obtained by dielectrophoresis cytometry », *Biomicrofluidics*, vol. 10, n° 1, p. 014111, janv. 2016, doi: 10.1063/1.4940432.
- [4] J. Yao, M. Sugawara, H. Obara, T. Mizutani, et M. Takei, « Distinct Motion of GFP-Tagged Histone Expressing Cells Under AC Electrokinetics in Electrode-Multilayered Microfluidic Device », *IEEE Trans. Biomed. Circuits Syst.*, vol. 11, n° 6, p. 1450-1458, déc. 2017, doi: 10.1109/TBCAS.2017.2729584.
- [5] R. Pethig, « Dielectrophoresis: An assessment of its potential to aid the research and practice of drug discovery and delivery », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 65, n° 11-12, p. 1589-1599, nov. 2013, doi: 10.1016/j.addr.2013.09.003.
- [6] G. H. Markx et C. L. Davey, « The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology », *Enzyme Microb. Technol.*, vol. 25, n° 3-5, p. 161-171, août 1999, doi: 10.1016/S0141-0229(99)00008-3.
- [7] R. Pethig, « Review—Where Is Dielectrophoresis (DEP) Going? », *J. Electrochem. Soc.*, vol. 164, n° 5, p. B3049-B3055, 2017, doi: 10.1149/2.0071705jes.
- [8] V. Nerguizian, I. Stiharu, N. Al-Azzam, B. Yassine-Diab, et A. Alazzam, « The effect of dielectrophoresis on living cells: crossover frequencies and deregulation in gene expression », *The Analyst*, vol. 144, n° 12, p. 3853-3860, 2019, doi: 10.1039/C9AN00320G.
- [9] S. Dash et S. Mohanty, « Dielectrophoretic separation of micron and submicron particles: A review: Microfluidics and Miniaturization », *ELECTROPHORESIS*, vol. 35, n° 18, p. 2656-2672, sept. 2014, doi: 10.1002/elps.201400084.
- [10] B. Çetin et D. Li, « Dielectrophoresis in microfluidics technology », *ELECTROPHORESIS*, vol. 32, n° 18, p. 2410-2427, sept. 2011, doi: 10.1002/elps.201100167.
- [11] N. Piacentini, G. Mernier, R. Tornay, et P. Renaud, « Separation of platelets from other blood cells in continuous-flow by dielectrophoresis field-flow-fractionation », *Biomicrofluidics*, vol. 5, n° 3, p. 034122, sept. 2011, doi: 10.1063/1.3640045.
- [12] Y. Tao, Y. Ren, H. Yan, et H. Jiang, « Continuous separation of multiple size microparticles using alternating current dielectrophoresis in microfluidic device with acupuncture needle electrodes », *Chin. J. Mech. Eng.*, vol. 29, n° 2, p. 325-331, mars 2016, doi: 10.3901/CJME.2015.1028.128.
- [13] A. Valero, T. Braschler, et P. Renaud, « A unified approach to dielectric single cell analysis: Impedance and dielectrophoretic force spectroscopy », *Lab. Chip*, vol. 10, n° 17, p. 2216, 2010, doi: 10.1039/c003982a.
- [14] J. Cottet, O. Fabregue, C. Berger, F. Buret, P. Renaud, et M. Frénéa-Robin, « MyDEP: A New Computational Tool for Dielectric Modeling of Particles and Cells », *Biophys. J.*, vol. 116, n° 1, p. 12-18, janv. 2019, doi: 10.1016/j.bpj.2018.11.021.
- [15] S. Tada, Y. Omi, M. Eguchi, N. Nakai, et A. Tsukamoto, « Analysis of Dielectrophoretic Properties of Cells by the use of the Uniform Field Gradient », in *2018 World Automation Congress (WAC)*, Stevenson, WA, juin 2018, p. 1-5. doi: 10.23919/WAC.2018.8430427.

- [16] G. Mernier, N. Piacentini, R. Tornay, N. Buffi, et P. Renaud, « Cell viability assessment by flow cytometry using yeast as cell model », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 154, n° 2, p. 160-163, juin 2011, doi: 10.1016/j.snb.2009.11.066.
- [17] S. Shim, K. Stemke-Hale, J. Noshari, F. F. Becker, et P. R. C. Gascoyne, « Dielectrophoresis has broad applicability to marker-free isolation of tumor cells from blood by microfluidic systems », *Biomicrofluidics*, vol. 7, n° 1, p. 011808, janv. 2013, doi: 10.1063/1.4774307.
- [18] W. M. Arnold et U. Zimmermann, « Electro-rotation: development of a technique for dielectric measurements on individual cells and particles », *J. Electrostat.*, vol. 21, n° 2-3, p. 151-191, sept. 1988, doi: 10.1016/0304-3886(88)90027-7.
- [19] J. Yang, Y. Huang, X. Wang, X.-B. Wang, F. F. Becker, et P. R. C. Gascoyne, « Dielectric Properties of Human Leukocyte Subpopulations Determined by Electrorotation as a Cell Separation Criterion », *Biophys. J.*, vol. 76, n° 6, p. 3307-3314, juin 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77483-7.
- [20] E. Alizadeh-Haghighi, S. Jafarmadar, et S. Khalilarya, « Application of genetic algorithm in extracting cell dielectric characteristics with electrorotation », p. 6, 2017.
- [21] C. Jiang et J. K. Mills, « Development of a cell orientation control system for mouse embryo using electro-rotation », in *2014 IEEE International Conference on Mechatronics and Automation*, Tianjin, China, août 2014, p. 1085-1090. doi: 10.1109/ICMA.2014.6885849.
- [22] K. Khoshmanesh, S. Nahavandi, S. Baratchi, A. Mitchell, et K. Kalantar-zadeh, « Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, n° 5, p. 1800-1814, janv. 2011, doi: 10.1016/j.bios.2010.09.022.
- [23] H. Hadady, D. Redelman, S. R. Hiibel, E. J. Geiger, et 1 Mechanical Engineering Department, University of Nevada, Reno, USA, « Continuous-flow sorting of microalgae cells based on lipid content by high frequency dielectrophoresis », *AIMS Biophys.*, vol. 3, n° 3, p. 398-414, 2016, doi: 10.3934/biophys.2016.3.398.
- [24] R. Pethig, « Review Article—Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications », *Biomicrofluidics*, vol. 4, n° 2, p. 022811, juin 2010, doi: 10.1063/1.3456626.
- [25] F. Hjeij *et al.*, « Biological cell discrimination based on their high frequency dielectrophoretic signatures at UHF frequencies », in *2017 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS)*, Honolulu, HI, USA, juin 2017, p. 533-536. doi: 10.1109/MWSYM.2017.8058618.
- [26] R. Manczak *et al.*, « UHF-Dielectrophoresis Crossover Frequency as a New Marker for Discrimination of Glioblastoma Undifferentiated Cells », *IEEE J. Electromagn. RF Microw. Med. Biol.*, vol. 3, n° 3, p. 191-198, sept. 2019, doi: 10.1109/JERM.2019.2895539.
- [27] A. Casciati *et al.*, « Human Medulloblastoma Cell Lines: Investigating on Cancer Stem Cell-Like Phenotype », *Cancers*, vol. 12, n° 1, p. 226, janv. 2020, doi: 10.3390/cancers12010226.
- [28] A. Silve, « Nouveaux dispositifs pour l'application contrôlée d'impulsions électriques nanosecondes et pour la détection de leurs effets sur les cellules: Nouveaux résultats et hypothèses sur les paramètres contrôlant l'électroperméabilisation des cellules biologiques », pages 11-12 ; 113.
- [29] S. V. Puttaswamy, S. Sivashankar, R.-J. Chen, C.-K. Chin, H.-Y. Chang, et C. H. Liu, « Enhanced cell viability and cell adhesion using low conductivity medium for negative

- dielectrophoretic cell patterning », *Biotechnol. J.*, vol. 5, n° 10, p. 1005-1015, oct. 2010, doi: 10.1002/biot.201000194.
- [30] H. Li, X. Ma, X. Du, X. Cheng, et J. C. M. Hwang, « High-frequency continuous-wave electroporation of Jurkat human lymphoma cells », in *2016 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS)*, San Francisco, CA, mai 2016, p. 1-4. doi: 10.1109/MWSYM.2016.7540431.
- [31] G. M. Richardson, J. Lannigan, et I. G. Macara, « Does FACS perturb gene expression?: Does FACS Perturb Gene Expression? », *Cytometry A*, vol. 87, n° 2, p. 166-175, févr. 2015, doi: 10.1002/cyto.a.22608.
- [32] « Tri cellulaire magnétique », *Wikipédia*. https://fr.wikipedia.org/wiki/Tri_cellulaire_magn%C3%A9tique (consulté le janv. 29, 2021).
- [33] K. Lang et J. W. Chin, « Bioorthogonal Reactions for Labeling Proteins », *ACS Chem. Biol.*, vol. 9, n° 1, p. 16-20, janv. 2014, doi: 10.1021/cb4009292.
- [34] R.-J. Bleichrodt et N. D. Read, « Flow cytometry and FACS applied to filamentous fungi », *Fungal Biol. Rev.*, vol. 33, n° 1, p. 1-15, janv. 2019, doi: 10.1016/j.fbr.2018.06.001.
- [35] L. A. Herzenberg, D. Parks, B. Sahaf, O. Perez, M. Roederer, et L. A. Herzenberg, « The History and Future of the Fluorescence Activated Cell Sorter and Flow Cytometry: A View from Stanford », *Clin. Chem.*, vol. 48, n° 10, p. 1819-1827, oct. 2002, doi: 10.1093/clinchem/48.10.1819.
- [36] A. Grützkau et A. Radbruch, « Small but mighty: How the MACS®-technology based on nanosized superparamagnetic particles has helped to analyze the immune system within the last 20 years », *Cytometry A*, vol. 77A, n° 7, p. 643-647, mai 2010, doi: 10.1002/cyto.a.20918.
- [37] J. Kolosnjaj-Tabi, C. Wilhelm, O. Clément, et F. Gazeau, « Cell labeling with magnetic nanoparticles: Opportunity for magnetic cell imaging and cell manipulation », *J. Nanobiotechnology*, vol. 11, n° Suppl 1, p. S7, 2013, doi: 10.1186/1477-3155-11-S1-S7.
- [38] N. DEMIERRE, « Continuous-flow separation of cells in a lab-on-a-chip using “liquid electrodes” and multiple-frequency dielectrophoresis », Thèse, ÉCOLE POLYTECHNIQUE FÉDÉRALE DE LAUSANNE.
- [39] P. Sajeesh et A. K. Sen, « Particle separation and sorting in microfluidic devices: a review », *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 17, n° 1, p. 1-52, juill. 2014, doi: 10.1007/s10404-013-1291-9.
- [40] M. Kersaudy-Kerhoas, R. Dhariwal, et M. P. Y. Desmulliez, « Recent advances in microparticle continuous separation », *IET Nanobiotechnol.*, vol. 2, n° 1, p. 1, 2008, doi: 10.1049/iet-nbt:20070025.
- [41] K. W. Ferrara et V. R. Algazi, « An experimental comparison of the signal from laminar and disturbed blood flow », in *1993 Proceedings IEEE Ultrasonics Symposium*, Baltimore, MD, USA, 1993, p. 1043-1047 vol.2. doi: 10.1109/ULTSYM.1993.339629.
- [42] M. D. Symes *et al.*, « Integrated 3D-printed reactionware for chemical synthesis and analysis », *Nat. Chem.*, vol. 4, n° 5, p. 349-354, mai 2012, doi: 10.1038/nchem.1313.
- [43] H. Andersson et A. van den Berg, « Microfluidic devices for cellomics: a review », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 92, n° 3, p. 315-325, juill. 2003, doi: 10.1016/S0925-4005(03)00266-1.
- [44] D. W. Inglis, « Efficient microfluidic particle separation arrays », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 94, n° 1, p. 013510, janv. 2009, doi: 10.1063/1.3068750.

- [45] D. H. Yoon, J. B. Ha, Y. K. Bahk, T. Arakawa, S. Shoji, et J. S. Go, « Size-selective separation of micro beads by utilizing secondary flow in a curved rectangular microchannel », *Lab Chip*, vol. 9, n° 1, p. 87-90, 2009, doi: 10.1039/B809123D.
- [46] X. Zhang, Y. Li, S. Shen, S. Lee, et H. Dou, « Field-flow fractionation: A gentle separation and characterization technique in biomedicine », *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 108, p. 231-238, nov. 2018, doi: 10.1016/j.trac.2018.09.005.
- [47] C. Contado, « Field flow fractionation techniques to explore the “nano-world” », *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 409, n° 10, p. 2501-2518, avr. 2017, doi: 10.1007/s00216-017-0180-6.
- [48] J. CALVIN GIDDINGS, « Colloid Characterization by Sedimentation Field-Flow Fractionation », *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 92, n° 1, p. 15, mars 1983.
- [49] C. Mélin *et al.*, « Cancer Stem Cell Sorting from Colorectal Cancer Cell Lines by Sedimentation Field Flow Fractionation », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 3, p. 1549-1556, févr. 2012, doi: 10.1021/ac202797z.
- [50] Y. Yang, Y. Z. Shi, L. K. Chin, J. B. Zhang, D. P. Tsai, et A. Q. Liu, « Optofluidic nanoparticles sorting by hydrodynamic optical force », in *2013 Transducers & Eurosensors XXVII: The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (TRANSDUCERS & EUROSENSORS XXVII)*, Barcelona, Spain, juin 2013, p. 2122-2125. doi: 10.1109/Transducers.2013.6627220.
- [51] D. McGloin, « Optical tweezers: 20 years on », *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.*, vol. 364, n° 1849, p. 3521-3537, déc. 2006, doi: 10.1098/rsta.2006.1891.
- [52] M. D. Nicpon, M. J. Rust, et B. Lipkens, « Multi-stage Acoustophoretic Separation of Particles from Blood », in *2013 39th Annual Northeast Bioengineering Conference*, Syracuse, NY, USA, avr. 2013, p. 291-292. doi: 10.1109/NEBEC.2013.116.
- [53] C. Y. Cheng *et al.*, « Thin Film PZT-Based PMUT Arrays for Deterministic Particle Manipulation », *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control*, vol. 66, n° 10, p. 1606-1615, oct. 2019, doi: 10.1109/TUFFC.2019.2926211.
- [54] I. Doh et Y.-H. Cho, « A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 121, n° 1, p. 59-65, mai 2005, doi: 10.1016/j.sna.2005.01.030.
- [55] P. R. C. Gascoyne, S. Shim, J. Noshari, F. F. Becker, et K. Stemke-Hale, « Correlations between the dielectric properties and exterior morphology of cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation: General », *ELECTROPHORESIS*, vol. 34, n° 7, p. 1042-1050, avr. 2013, doi: 10.1002/elps.201200496.
- [56] H. Song *et al.*, « Continuous-flow sorting of stem cells and differentiation products based on dielectrophoresis », *Lab. Chip*, vol. 15, n° 5, p. 1320-1328, 2015, doi: 10.1039/C4LC01253D.
- [57] M. Li et R. K. Anand, « High-Throughput Selective Capture of Single Circulating Tumor Cells by Dielectrophoresis at a Wireless Electrode Array », *J Am Chem Soc*, p. 10, 2017.
- [58] I.-F. Cheng, H.-C. Chang, D. Hou, et H.-C. Chang, « An integrated dielectrophoretic chip for continuous bioparticle filtering, focusing, sorting, trapping, and detecting », *Biomicrofluidics*, vol. 1, n° 2, p. 021503, juin 2007, doi: 10.1063/1.2723669.
- [59] I.-F. Cheng, V. E. Froude, Y. Zhu, H.-C. Chang, et H.-C. Chang, « A continuous high-throughput bioparticle sorter based on 3D traveling-wave dielectrophoresis », *Lab. Chip*, vol. 9, n° 22, p. 3193, 2009, doi: 10.1039/b910587e.
- [60] J. Yang, Y. Huang, X.-B. Wang, F. F. Becker, et P. R. C. Gascoyne, « Differential Analysis of Human Leukocytes by Dielectrophoretic Field-Flow-Fractionation »,

Biophys. J., vol. 78, n° 5, p. 2680-2689, mai 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76812-3.

- [61] M. Babay, « Etude de nouvelles architectures intégrées sur CMOS de laboratoires sur puces pour les applications biomédicales », p. 169, 2020.
- [62] E. E. Connor, J. Mwamuka, A. Gole, C. J. Murphy, et M. D. Wyatt, « Gold Nanoparticles Are Taken Up by Human Cells but Do Not Cause Acute Cytotoxicity », *Small*, vol. 1, n° 3, p. 325-327, mars 2005, doi: 10.1002/sml.200400093.
- [63] G. Voskerician *et al.*, « Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices », *Biomaterials*, vol. 24, n° 11, p. 1959-1967, mai 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(02)00565-3.
- [64] P. M. van Midwoud, A. Janse, M. T. Merema, G. M. M. Groothuis, et E. Verpoorte, « Comparison of Biocompatibility and Adsorption Properties of Different Plastics for Advanced Microfluidic Cell and Tissue Culture Models », *Anal. Chem.*, vol. 84, n° 9, p. 3938-3944, mai 2012, doi: 10.1021/ac300771z.

Partie II. Caractérisation des cellules et du champ électrique et premier prototype

II.1. Introduction

Au travers du premier chapitre, nous avons pu voir que la diélectrophorèse (DEP) permet de générer une force de déplacement sur des particules polarisables soumises à un champ électrique non uniforme. Ce phénomène s'exerce également sur des cellules biologiques permettant de les électromanipuler sélectivement en fonction de leurs caractéristiques diélectriques propres. Ce principe a d'ailleurs été largement mis en œuvre dans des gammes basses fréquences (typiquement de quelques kHz à 50 MHz) pour séparer et trier des cellules sur la base de leur différence de taille ou de propriétés diélectriques membranaires.

En revanche, nous avons vu que l'utilisation de la DEP basse fréquence pouvait être appliquée pour identifier les propriétés de différenciation de cellules [1] mais que la spécificité fréquentielle de leur signature, entre des cellules souches et des cellules différenciées, restait mince dans cette gamme fréquentielle. En revanche, la spécificité de signatures observée dans la gamme haute fréquence semble plus marquée. En effet, il a été montré au travers de caractérisations des secondes fréquences de transition (f_{x02}) qui apparaissent dans le spectre UHF, que des différences de contenu cytoplasmique existant entre cellules différenciées et indifférenciées pouvaient être plus facilement détectées. C'est pour cette raison que dans le cadre de cette thèse, nous allons investiguer la DEP Haute Fréquence dans l'objectif de développer un système de tri de cellules souches cancéreuses basé sur la déviation sélective de ces cellules en fonction de leurs caractéristiques diélectriques spécifiques.

Ainsi, un système microfluidique en flux continu utilisant un champ électrique, généré entre des électrodes fines, sera développé pour dévier les trajectoires des cellules mises en suspension dans le système. La sélection des cellules sera faite à partir des caractérisations de leurs fréquences de transition UHF.

Les principes et l'utilisation de la DEP ont été présentés au travers du premier chapitre de ce manuscrit. Au cours de ce deuxième chapitre nous allons nous intéresser particulièrement au comportement diélectrique de cellules biologiques en suspension dans une solution liquide au travers du facteur de Clausius-Mossotti. Nous aborderons leur modélisation afin de pouvoir sélectionner le modèle qui sera le plus adapté à notre étude. Ceci nous amènera au choix des caractéristiques diélectriques les plus appropriées pour le milieu de suspension à utiliser. Par la suite nous verrons comment les caractérisations de leurs fréquences de transition couplées à l'intensité de la force DEP peuvent nous renseigner sur les propriétés diélectriques des cellules.

Outre la force générée par le phénomène de diélectrophorèse, nous nous intéresserons aux autres types de forces qui peuvent influencer la trajectoire des cellules au sein du microsystème. Cela nous permettra d'évaluer quelles sont les forces qui dominent tout le long de la trajectoire des cellules et concevoir un système de tri qui en tire le mieux parti.

Puis, nous étudierons comment produire de manière optimale le gradient de champ électrique nécessaire à générer la force de diélectrophorèse. Nous verrons comment la forme et la disposition des électrodes impactent l'intensité ainsi que la distribution du champ électrique dans le canal. La transmission du signal haute fréquence jusqu'aux électrodes de la zone de tri, fera également l'objet d'une attention particulière. En effet, dans notre cas à la



différence des systèmes classiques de DEP, de par la montée en fréquence, une désadaptation électrique pourrait induire une atténuation du signal et en conséquence une diminution de la force appliquée aux cellules qu'il nous faudra limiter.

Finalement dans la dernière partie, nous décrivons le principe de fonctionnement du microsystème de tri que nous avons développé, ainsi que la manière dont seront mises à profit les caractérisations préalables des fréquences de transition f_{x02} des cellules pour établir les conditions de séparation entre deux populations cellulaires. La fabrication et la mise en œuvre expérimentale d'un premier prototype de cytomètre DEP seront enfin présentées avant de conclure ce chapitre.

Ainsi à la fin de ce chapitre nous aurons à disposition les connaissances pour relier les caractéristiques diélectriques des cellules à leur réaction au champ électrique pour les trier avec un premier prototype conçu, réalisé et testé.

II.2. Modélisation et caractérisation diélectrique d'une cellule

II.2.1. Modèles diélectriques de la cellule aux fréquences UHF et facteur de Clausius-Mossotti f_{CM}

Comme nous l'avons introduit dans le premier chapitre, il existe différents modèles permettant de représenter une cellule d'un point de vue diélectrique. La représentation de la cellule peut aller de la simple sphère homogène (Figure.39.A) avec des propriétés diélectriques représentant l'ensemble de toutes les caractéristiques diélectriques des éléments la constituant, jusqu'à une représentation multi-stratifiée de la cellule [2] comme le montre la Figure.39.C qui représente un modèle bi-enveloppe présentant trois strates autour d'une sphère homogène. Ce modèle représente de manière indépendante le noyau cellulaire, la membrane nucléaire, le cytoplasme et la membrane extérieure.

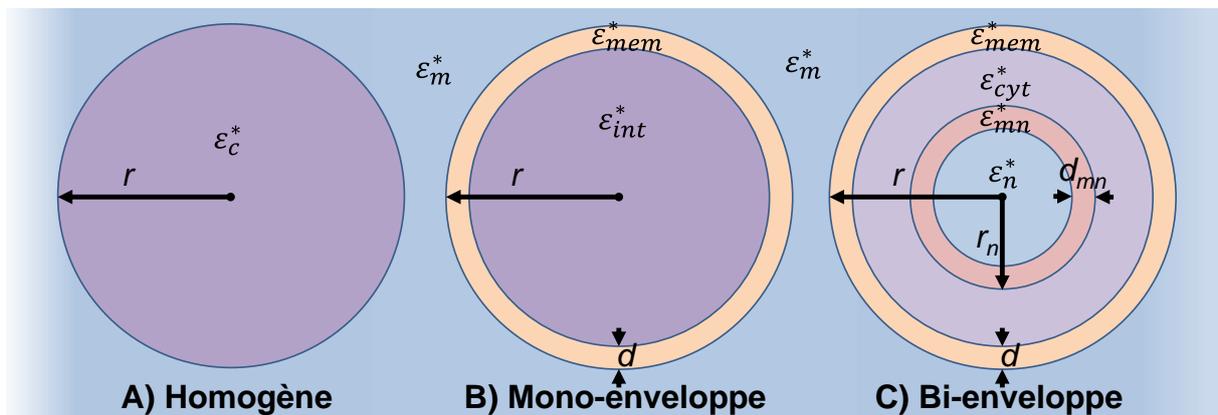


Figure.39 : Modélisation d'une cellule biologique immergée dans un milieu liquide. par un modèle homogène, mono-enveloppe et bi-enveloppe.

Quel que soit le modèle considéré, pour obtenir par calcul les valeurs diélectriques effectives qui nous intéressent et pour calculer le facteur de Clausius-Mossotti (f_{CM}), il nous faut considérer la formule suivante [3] :

$$f_{CM} = \frac{\varepsilon_c^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_c^* + 2\varepsilon_m^*} \quad (1)$$

En fonction du modèle considéré, la permittivité complexe de la cellule (ε_c^*) sera évaluée par un modèle mathématique différent [4], [5].

Dans le cas le plus simple du modèle homogène, ε_c^* est représentée de la même manière que celle du milieu (ε_m^*) en utilisant :

$$\varepsilon_x^* = \varepsilon_x - j \cdot \frac{\sigma_x}{\omega} \quad (2)$$

Avec ε_x^* la permittivité diélectrique complexe du milieu x considéré, ε_x la permittivité absolue de x , σ_x la conductivité de x , et ω la pulsation du champ électrique proportionnelle à la fréquence du signal DEP utilisé.

La Figure.40 illustre l'évolution de $f_{CM}(\omega)$ pour les trois modèles présentés : homogène (courbes violette et rouge), mono-enveloppe (courbes verte et marron) et bi-enveloppe (courbes bleu et orange). Avec les valeurs utilisées, reportées dans le Tableau.4, les 3



modèles coïncident pour des fréquences supérieures à 10 MHz. Pour les fréquences plus basses, le modèle homogène diverge des deux autres modèles qui eux restent semblables. Cette divergence du modèle homogène est naturelle car le comportement réel de la cellule est fortement lié à l'influence de la membrane plasmique en basses fréquences, si celle-ci n'est pas prise en compte dans le modèle considéré, alors celui-ci sera inadapté pour cette gamme de fréquence.

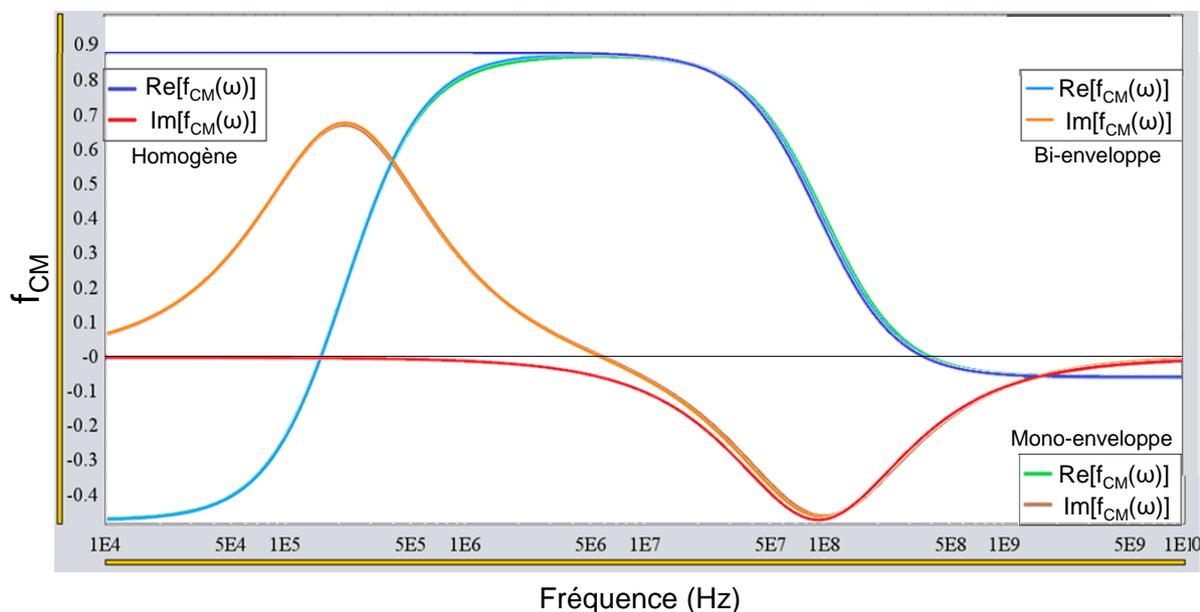


Figure.40 : Comparaison des modèles homogène (courbes violette et rouge), mono-enveloppe (courbes verte et marron) et bi-enveloppe (courbes bleue et orange). Rayon cellule = 10 μm . Les propriétés utilisées sont récapitulées dans le Tableau.4. Caractéristiques diélectriques du milieu : $\epsilon_m = 72$; $\sigma_m = 38 \text{ mS.m}^{-1}$.

Tableau.4 : Paramètres utilisés pour tracer l'évolution de f_{CM} selon les différents modèles.

Modèle de la cellule ($r = 10\mu\text{m}$)	Membrane ($d = 10\text{nm}$)	Cytoplasme	Membrane nucléaire ($d_{nm} = 40\text{nm}$)	Noyau ($r_n = 5\mu\text{m}$)
Modèle Homogène	/	$\epsilon_c = 60$ $\sigma_c = 1 \text{ S/m}$	/	/
Modèle Mono-enveloppe	$\epsilon_{mem} = 5$ $\sigma_{mem} = 1\mu\text{S/m}$	$\epsilon_{int} = 60$ $\sigma_{int} = 1 \text{ S/m}$	/	/
Modèle Bi-enveloppe	$\epsilon_{mem} = 5$ $\sigma_{mem} = 1\mu\text{S/m}$	$\epsilon_{cyt} = 55$ $\sigma_{cyt} = 0,95 \text{ S/m}$	$\epsilon_{mn} = 110$ $\sigma_{mn} = 10 \text{ mS/m}$	$\epsilon_n = 120$ $\sigma_n = 2 \text{ S/m}$

Cette étude nous permet de conclure que, dans le cadre de ces travaux de thèse, vues les gammes fréquentielles mises en jeu, le modèle homogène de la cellule est bien adapté et sera donc utilisé pour la caractérisation des populations cellulaires par f_{X02} et le développement du cytomètre DEP-UHF.

II.2.2. Variation des caractéristiques diélectriques et influence du milieu de suspension

Lors de l'utilisation d'un modèle, nombreux sont les paramètres qui vont varier, qu'ils soient liés aux cellules ou au milieu de suspension. Nous allons ici observer leur influence sur $f_{CM}(\omega)$.

La Figure.41 présente l'impact de la variation des caractéristiques diélectriques globales de la cellule sur $f_{CM}(\omega)$ pour un milieu de suspension donné possédant une faible conductivité. Dans le cas A), nous observons que plus la fréquence augmente, plus la variation de la permittivité de la cellule aura une forte influence sur f_{CM} . Au contraire, cas B), avec l'augmentation de la fréquence, la variation induite par différentes conductivités de la cellule diminue.

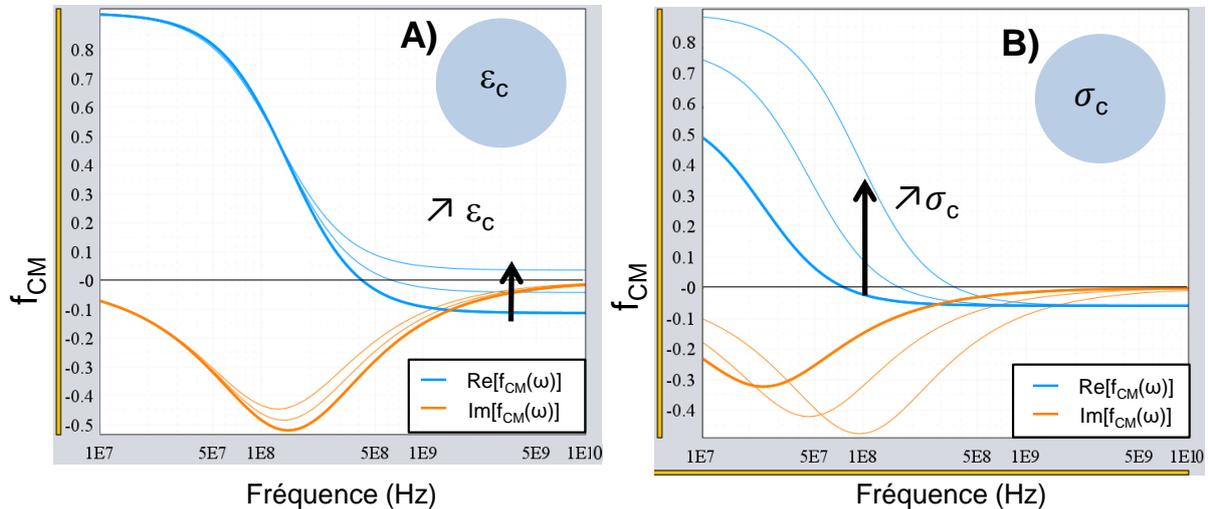


Figure.41 : Influence des caractéristiques diélectriques intracellulaire sur f_{CM} dans le cas d'un modèle homogène. Les paramètres invariants sont ceux présentés dans le Tableau.4. A) Variation de la permittivité relative entre 45 et 75 ; B) Variation de la conductivité entre 0,2 et 1 S.m-1. Les courbes en gras sont liées à la valeur de conductivité/permittivité la plus faible affichée. Caractéristiques diélectriques du milieu de suspension : $\epsilon_m = 72$; $\sigma_m = 38 \text{ mS.m-1}$.

Nous pouvons aussi constater que lorsque la permittivité de la cellule est supérieure à celle du milieu, aucune f_{X02} n'est mesurable car la cellule ne repasse jamais en régime de DEP négative (cas A). En effet une f_{X02} , transition HF entre un phénomène de pDEP à nDEP, ne sera mesurable que si la cellule présente une permittivité inférieure à celle du milieu de suspension, ainsi qu'une conductivité supérieure à celui-ci (Figure.42).

Il serait possible de mesurer une fréquence de transition f_{X02} dans le cas opposé ($\epsilon_c > \epsilon_m$ et $\sigma_c < \sigma_m$). En revanche, le fait que le contenu intracellulaire présente une faible conductivité (inférieure à $0,1 \text{ S.m}^{-1}$) tend à montrer que la cellule est probablement morte [6].

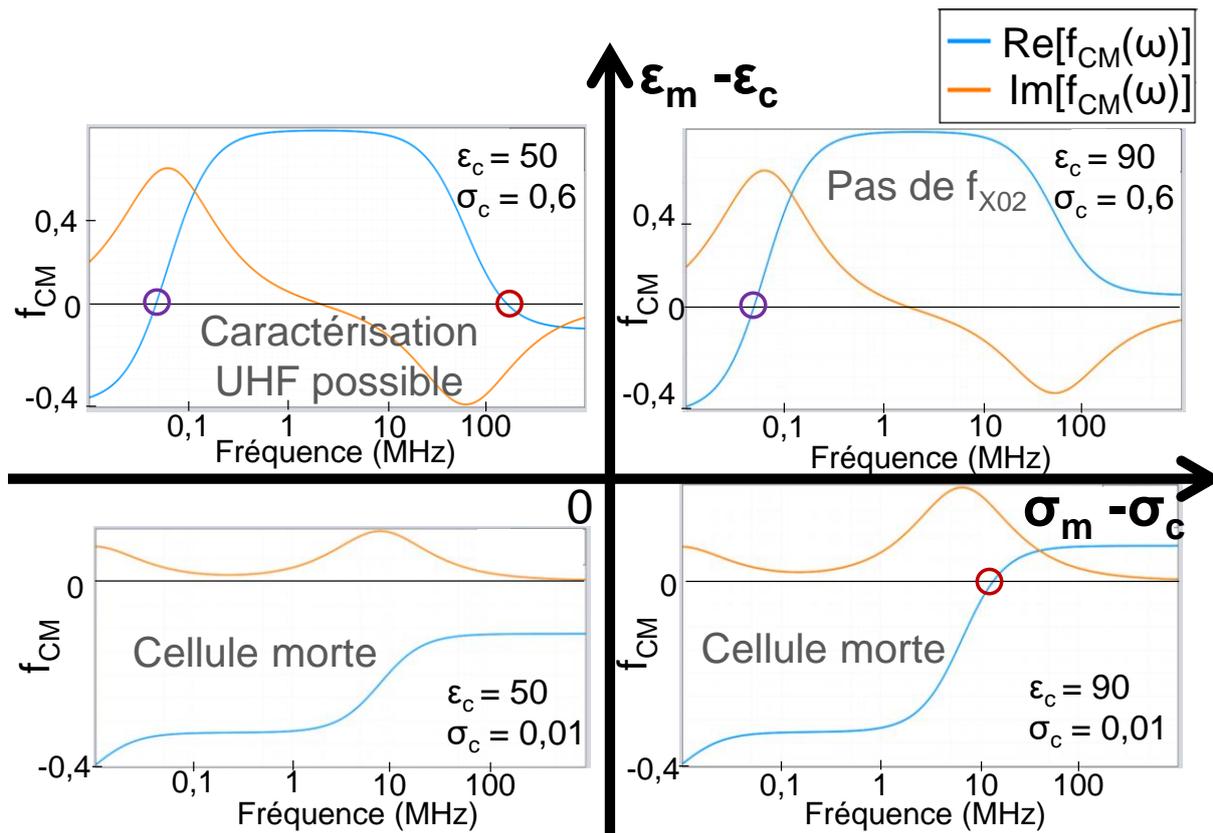


Figure.42 : Evolution de $f_{CM}(\omega)$ selon les caractéristiques diélectriques d'une cellule par rapport à celles du milieu de suspension ($\epsilon_m = 72$; $\sigma_m = 38 \text{ mS.m}^{-1}$) pour un modèle mono-enveloppe. Caractéristiques de la membrane : épaisseur = 6 nm ; $\epsilon_{mem} = 12$; $\sigma_m = 1 \text{ }\mu\text{S.m}^{-1}$.

Il est généralement considéré que la conductivité classique du milieu cytoplasmique d'une cellule peut varier dans une gamme de 0,2 à 1 S.m^{-1} , la permittivité intracellulaire globale variant elle dans un gamme pouvant aller de 40 à 70 [7]–[11] relevées à des fréquences inférieures au GHz. Ainsi des milieux de suspensions présentant des conductivités inférieures à 0,1 S.m^{-1} auront toujours une conductivité inférieure à celle des cellules électromanipulées. Dans ces gammes de conductivité, l'impact sur l'intensité de la force DEP pour des milieux intracellulaire de conductivités différentes, est faible à haute fréquence (Figure.43.B) et plus marquée pour les basses fréquences.

Au contraire, pour des milieux de permittivités différentes, la variation de $f_{CM}(\omega)$ est plus marquée aux hautes fréquences comparée aux fréquences basses (Figure.43.A). De plus, si la permittivité du milieu de suspension est proche de celle de la cellule, la force DEP pour des fréquences supérieures à f_{X02} sera faible. Ainsi pour faciliter une électro-manipulation efficace est plus sélective à haute fréquence, une permittivité du milieu de suspension forte sera avantageuse.

Ainsi, pour observer une fréquence de transition, le milieu doit présenter une conductivité faible et une permittivité forte face à la conductivité et la permittivité intracellulaire. De plus, tel que le montre la Figure.43.A, une permittivité de milieu élevée accentuera la force nDEP à laquelle sera soumise la cellule.

La conductivité du milieu de suspension, lorsqu'elle est inférieure à 50 mS.m^{-1} , ne peut varier suffisamment pour affecter le comportement de la cellule lorsque la fréquence utilisée s'approche ou dépasse f_{X02} comme le montre la Figure.43.B. Ainsi, tant que la conductivité

de notre milieu restera inférieure à cette valeur, sa conductivité exacte n'aura pas d'influence sur le tri réalisé en fréquence UHF.

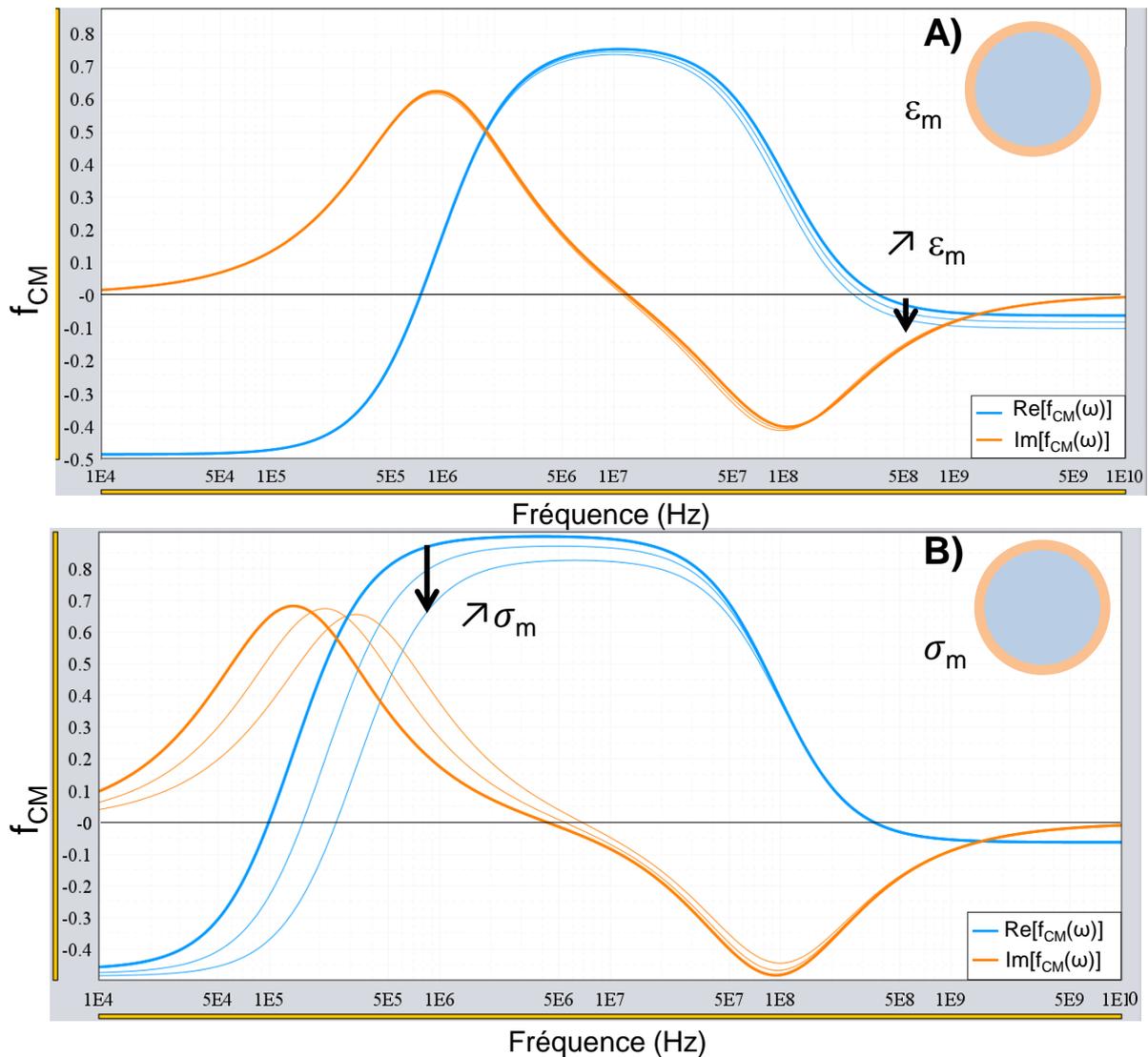


Figure.43 : Evolution de $f_{CM}(\omega)$ pour un modèle mono-enveloppe par rapport aux caractéristiques diélectriques du milieu de suspension. A) Variation de la permittivité relative entre 70 et 80 ; B) Variation de la conductivité entre 20 et 50 $mS \cdot m^{-1}$. La cellule présente les caractéristiques diélectriques décrites dans le Tableau.4 pour le modèle mono-enveloppe.

Dans notre cas, nous avons fait le choix d'utiliser un mélange d'eau déionisée (DI) et de sucre pour suspendre les cellules comme de nombreuses études présentes dans la littérature [12]. Ce milieu constitue un milieu de survie pour les cellules qui nous assure un environnement garantissant leur intégrité pendant 4 à 6 heures grâce au maintien d'une osmolarité appropriée de l'ordre de 300 mOsm [13] malgré l'absence d'ions.

La permittivité relative de ce milieu est de l'ordre de 72 pour des fréquences inférieures à 500 MHz, légèrement inférieure au 78 classiquement observé pour de l'eau DI à 20 °C de par la concentration de sucre dans la solution [14]. Cette valeur de permittivité du milieu de suspension reste stable pour des variations de fréquences de quelques centaines de MHz.

La conductivité mesurée de ce milieu est de 38 mS.m^{-1} , en adéquation avec nos besoins. À noter que la faible conductivité permet également d'éviter les effets thermiques liés à l'échauffement du liquide par effet joule sous l'effet d'un champ électrique [15].

II.2.3. Lien entre la caractérisation d'une cellule et ses propriétés diélectriques

II.2.3.1. Caractériser une cellule par mesure de sa fréquence de transition UHF f_{X02}

Comme nous pouvons observer sur la Figure.41, pour un milieu de suspension donné, la fréquence de transition mesurée ne sera pas la même selon les caractéristiques diélectriques de la cellule. Dans le cas d'une modélisation de sphère homogène, le lien entre cette fréquence et les propriétés diélectriques de la cellule immergée dans ce milieu est décrit par la formule suivante [16]:

$$f_{X02} = \frac{1}{2\pi} \sqrt{\frac{\sigma_c^2 - \sigma_m \sigma_c - 2\sigma_m^2}{2\varepsilon_m^2 - \varepsilon_m \varepsilon_c - \varepsilon_c^2}} \quad (3)$$

Avec σ_c et ε_c les caractéristiques diélectriques intracellulaires de la cellule : respectivement la conductivité et la permittivité absolue. Et σ_m et ε_m celles du le milieu liquide extracellulaire dans lequel la cellule est immergée. Connaissant les caractéristiques de notre milieu, seul le couple des caractéristiques diélectriques de la cellule (σ_c et ε_c) reste inconnu.

La méthode que nous avons utilisée pour mesurer cette fréquence est détaillée dans le chapitre 1 (§ I.3.3). Des fréquences de transition très proches voire similaires ont été mesurées pour des cellules de population différentes [17]. Pour autant, cela ne signifie pas nécessairement que ces cellules présentent les mêmes caractéristiques diélectriques, car, pour une même f_{X02} peuvent correspondre différents couples de permittivité et conductivité cellulaire ($(\varepsilon-\sigma)_c$) (Figure.44). De plus, pour chacun des couples $(\varepsilon-\sigma)_c$, l'évolution de valeurs de f_{CM} peut s'avérer différente en fonction de la fréquence comme l'illustre la Figure.44.

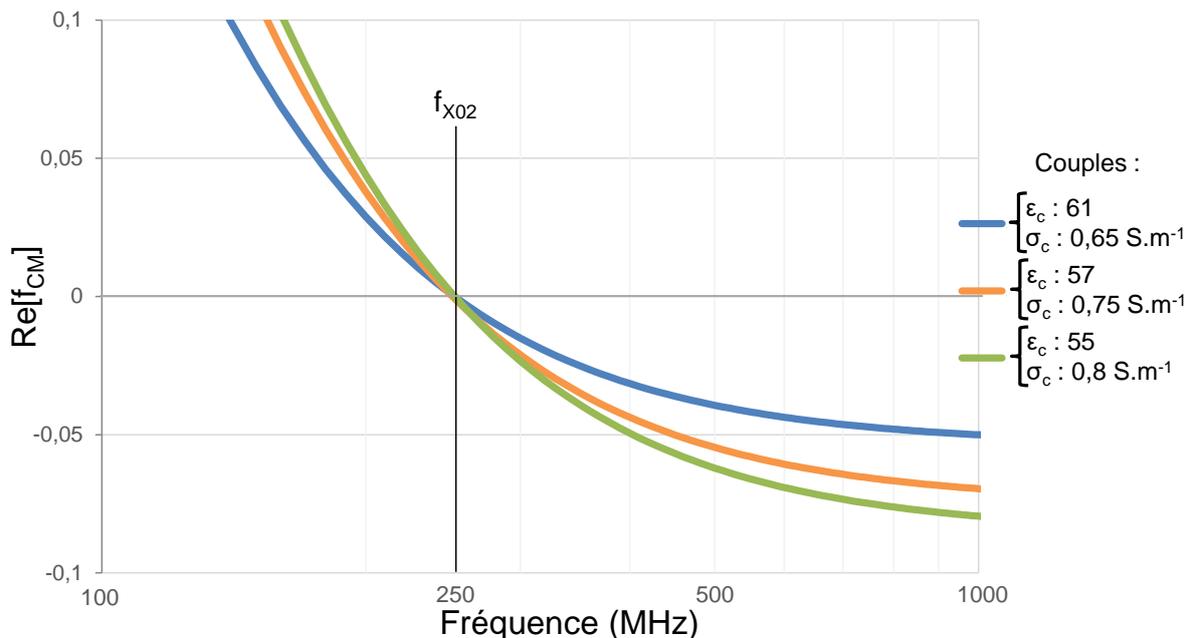


Figure.44 : Evolution de $f_{CM}(\omega)$ pour trois couples de valeurs de permittivité relative et conductivité différentes résultant en une fréquence de transition identique.

En fait, il existe un grand nombre de solution permettant d'obtenir une même fréquence de transition. Nous comprenons ainsi qu'au travers de la seule valeur de la fréquence de transition, ce couple d'inconnues ne peut être résolu. Cependant, à partir de l'équation (3), il est possible d'exprimer ϵ_c en fonction à σ_c en résolvant l'équation du second degré suivante :

$$\left(-\epsilon_c^2 - \epsilon_m \epsilon_c + \left(2\epsilon_m^2 - \frac{\sigma_c^2 - \sigma_m \sigma_c - 2\sigma_m^2}{(2\pi \cdot f_{x02})^2} \right) \right) = 0 \quad (4)$$

Nous considérons que f_{x02} est mesurable, ce qui implique que la conductivité de la cellule doit être supérieure à celle du milieu de suspension, et inversement, la permittivité de la cellule doit être inférieure à celle de ce milieu. De plus, les valeurs de la permittivité absolue du milieu de suspension et de la cellule sont largement plus faibles que la valeur de leur conductivité. Ainsi, en considérant ϵ_c comme variable, le discriminant Δ de l'équation (4) sera toujours positif, donnant donc pour une conductivité de la cellule donnée deux solutions mathématiques possibles pour sa permittivité. Une des solutions donnant une valeur de permittivité cellulaire négative pour des valeurs de conductivité positives, il ne reste que la solution suivante :

$$\epsilon_{int} = -\frac{1}{2} \cdot \epsilon_m + \sqrt{\frac{9\epsilon_m^2 \cdot f_{x02}^2 \cdot \pi^2 + 2\sigma_m^2 + \sigma_m \sigma_{int} - \sigma_{int}^2}{2\pi \cdot f_{x02}}} \quad (5)$$

A partir du tracé de $\epsilon_c = f(\sigma_c)$ (Figure.45), nous observons pour une f_{x02} considérée, que plus la conductivité de la cellule est faible, plus sa permittivité sera proche de celle du milieu. Au contraire, une cellule avec une plus grande conductivité présentera une permittivité plus faible.

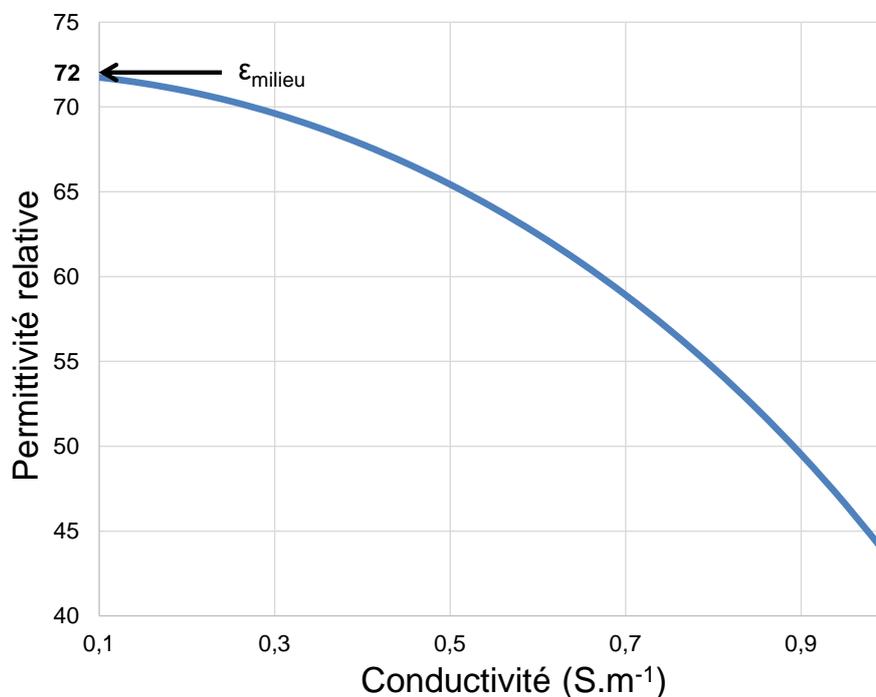


Figure.45 : Couples de conductivité et permittivité relative possibles, en considérant un modèle homogène, pour une cellule immergée dans un milieu de suspension de permittivité relative de 72 et de conductivité de 38 mS.m⁻¹ et qui présente une fréquence f_{x02} de 250 MHz.

Le nombre de couples $(\epsilon/\sigma)_c$ possibles résultants d'une fréquence de transition mesurée est par conséquent réduit connaissant f_{x02} , mais ces couples restent très nombreux et variés pour être en mesure d'identifier de manière catégorique une cellule sur la seule base de la mesure de sa fréquence de transition UHF. Il faut cependant noter que si des cellules présentent des f_{x02} différentes, leurs caractéristiques diélectriques le seront indubitablement également (Figure.46).

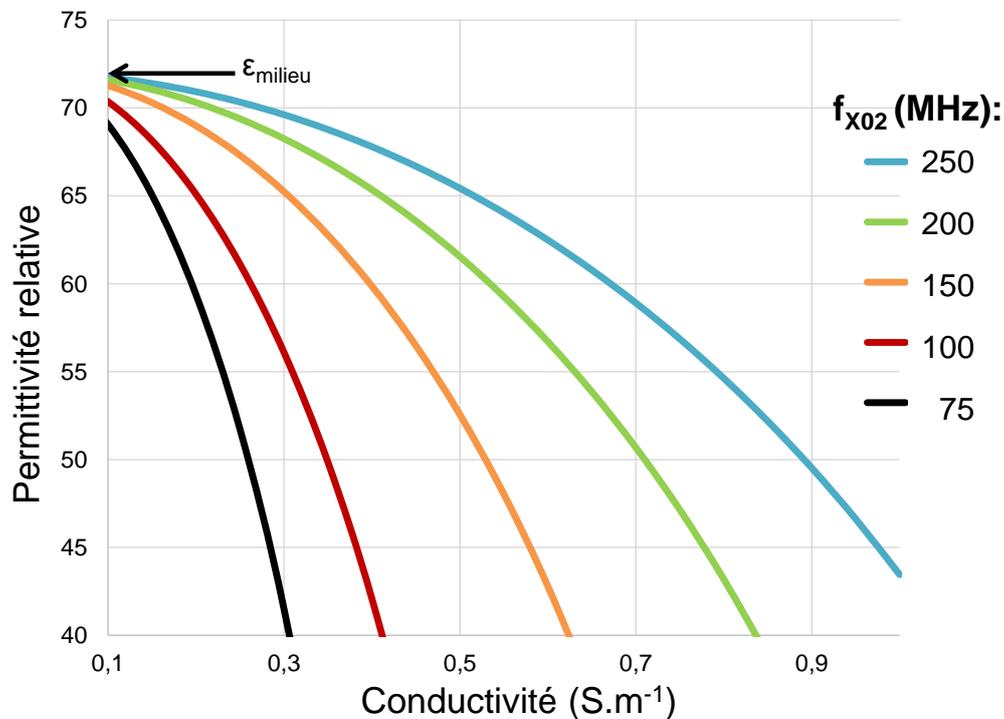


Figure.46 : Couples de conductivité et permittivité relative possibles pour des cellules présentant différentes f_{x02} , en considérant un modèle homogène, pour des cellules immergées dans un milieu de suspension de permittivité relative de 72 et de conductivité de 38 mS.m⁻¹.

f_{x02} est donc un critère permettant de différencier des cellules sur la base de ses propriétés physiques intracellulaires. Il arrive que les signatures fréquentielles entre différentes populations cellulaires présentent des f_{x02} identiques, mais ce recoupement dans les signatures fréquentielles n'indique pas une que les cellules soient identiques diélectriquement et donc l'incapacité à séparer ces populations par diélectrophorèse. Cette information étant insuffisante pour identifier exactement les caractéristiques diélectriques d'une cellule, il est ainsi nécessaire de compléter cette caractérisation.

II.2.3.2. Caractériser une cellule à partir de $\text{Re}[f_{CM}]$ à une fréquence donnée

A partir d'un système à quatre électrodes comme celui utilisé pour la caractérisation fréquentielle, il est possible de mesurer la force DEP à laquelle est soumise une cellule dans un champ donné [18] (décrit plus en détail dans le paragraphe II.4.2). En connaissant l'intensité du champ et les dimensions de la cellule, il est en théorie possible de retrouver la valeur de f_{CM} de cette cellule à la fréquence du signal utilisé. Comme nous le verrons au cours du chapitre 3, le lien qui sera présenté ici, entre l'intensité de la force DEP à une fréquence donnée et les propriétés diélectriques possibles de la cellule, nous permettra d'orienter nos choix de conditions de tri en fonction des caractéristiques diélectriques des cellules à cibler. Dans ces travaux nous n'avons pas réalisé ces mesures, leur intérêt étant apparu trop tard et nécessitant un travail conséquent pour obtenir une précision des

caractéristiques des cellules satisfaisante. Ceci reste tout de même important pour réaliser le tri envisagé, permettant de lier une intensité de force DEP à des caractéristiques diélectriques.

Cette caractérisation peut être utilisée en tant que signature d'une population à une fréquence donnée, représentant la dispersion des caractéristiques diélectriques des cellules au sein de cette population. Mais de la même manière que précédemment, à une valeur du facteur f_{CM} donnée et pour une certaine fréquence de signal, il existe plusieurs couples correspondants de permittivité et de conductivité que pourrait posséder la cellule observée. Pour cela, il faut résoudre selon ϵ_c l'équation (1) pour la valeur mesurée de $f_{CM}(\omega)$. Puisque nous ne nous intéresserons qu'à la partie réelle de f_{CM} , la permittivité de la cellule s'exprimera sous la forme suivante :

$$\epsilon_c = - \frac{\epsilon_m(4f_{CM}-1)\omega + \sqrt{9\epsilon_m^2\omega^2 - (\sigma_c + 2\sigma_m)((4\sigma_c + 8\sigma_m)f_{CM}^2 + (8\sigma_c + 4\sigma_m)f_{CM} + (4\sigma_m - 4\sigma_c))}}{2(f_{CM}-1)\omega} \quad (6)$$

L'équation (6) dépend donc de la valeur mesurée du facteur de Clausius-Mossotti ($f_{CM}(\omega)$), de ω la pulsation du signal électrique DEP soit $2\pi \times \text{Freq}$ (Freq étant la fréquence du signal considéré), des caractéristiques diélectriques du milieu (σ_m et ϵ_m) dans lequel la cellule est immergée et de la conductivité globale équivalente de la cellule (σ_c).

A partir de $\epsilon_c = f(\sigma_c)$ (Figure.47) nous observons qu'entre deux cellules présentant des f_{CM} mesurés différents, celle qui possède la valeur de f_{CM} la plus basse sera aussi celle dont les couples de valeurs $(\epsilon/\sigma)_c$ possibles seront inférieurs à ceux de la seconde cellule. A rappeler que tous les couples $(\epsilon/\sigma)_c$ ayant une permittivité supérieure à celle du milieu de suspension ne présenteront pas de f_{X02} , ainsi ces cellules seront soumises à des forces pDEP même à plus haute fréquence.

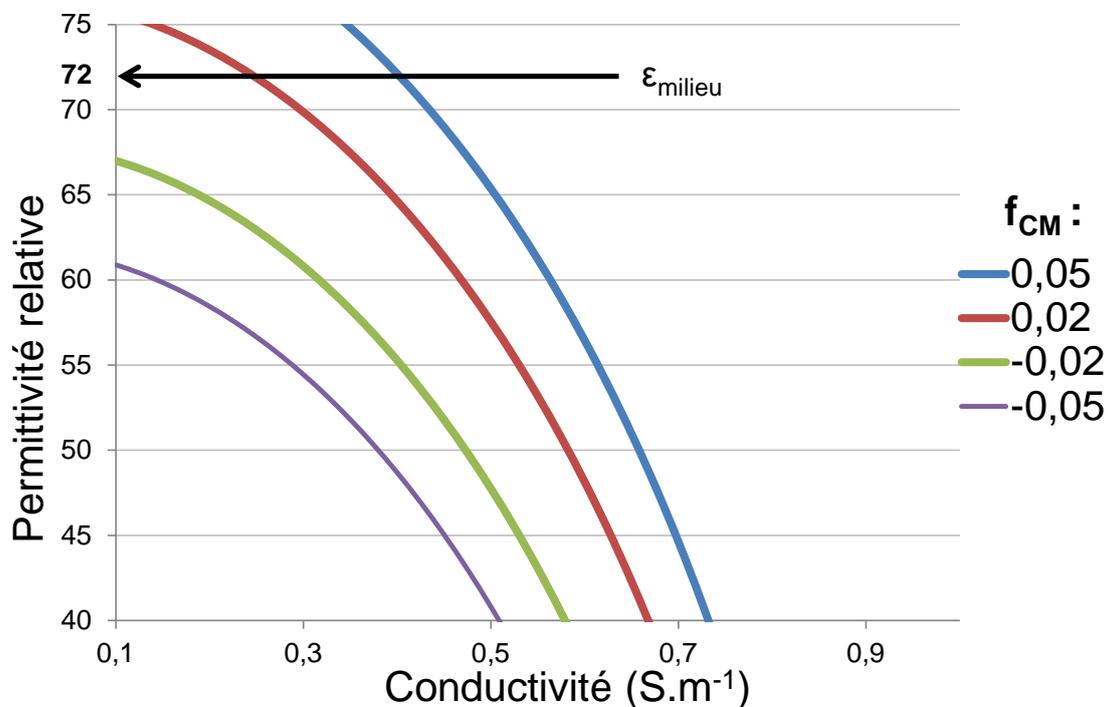


Figure.47 : Couples de conductivité et permittivité relative possibles, en considérant un modèle homogène pour des cellules présentant différentes valeur de f_{CM} , cellules immergées dans un milieu de permittivité relative de 72 et de conductivité de 38 mS.m^{-1} selon leur f_{CM} pour un signal de 200 MHz.

Selon la fréquence utilisée, la valeur de f_{CM} mesurée sera plus ou moins fortement dépendante de la conductivité de la cellule (Figure.48). En effet, nous observons qu'à 400 MHz (courbes oranges) la plage de permittivités possibles est bien plus étroite qu'à 150 MHz (courbes bleues) alors que des valeurs de conductivités plus fortes sont possibles. Pour illustrer, pour deux cellules possédant un f_{CM} de -0,02 à 150 MHz, une cellule qui aurait une conductivité de $0,1 \text{ S.m}^{-1}$ et une autre qui posséderait une conductivité de $0,58 \text{ S.m}^{-1}$ présente une différence de permittivité relative de 28. Pour ce qui est de deux cellules qui possèdent à 400 MHz un f_{CM} de -0,02, entre l'une qui a une conductivité de $0,1 \text{ S.m}^{-1}$ et l'autre de 1 S.m^{-1} , la différence entre leur permittivité relative est de 20, soit une plus faible variation sur une plus grande plage de conductivité.

Cela peut aussi simplement s'observer par la forme de la permittivité complexe ($\epsilon^* = \epsilon - j.\sigma/\omega$). Considérons les caractéristiques diélectriques des cellules présentées en Tableau.4, avec ϵ et σ/ω du même ordre de grandeur autour de 150-200 MHz. Ainsi plus la fréquence du signal augmente, plus la permittivité prend le dessus dans l'expression de la permittivité complexe pour ce qui est de la partie réelle de f_{CM} . Ces fréquences seront donc ainsi plus utiles pour distinguer des cellules présentant des différences de permittivité.

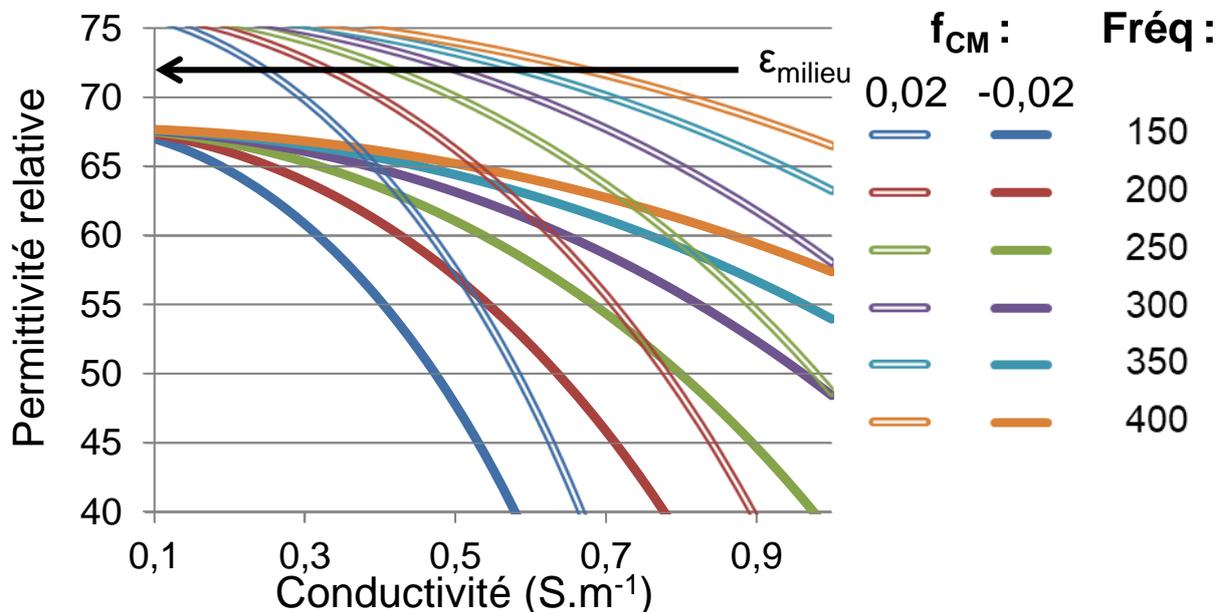


Figure.48 : Couples de conductivité et permittivité relative possibles dans un modèle homogène pour des cellules selon la fréquence à laquelle la cellule exprime un f_{CM} de -0,02 ou de 0,02 dans un milieu de permittivité relative de 72 et une conductivité de 38 mS.m^{-1} .

Une caractérisation par une seule mesure de f_{CM} ne sera donc vraisemblablement pas suffisante pour évaluer les propriétés diélectriques globales d'une cellule, mais cela devient possible en réalisant une seconde mesure à une autre fréquence, ou encore la mesure spécifique de f_{X02} (Figure.49). En effet, disposer des données issues de deux mesures à des fréquences différentes permettra de résoudre le système de deux équations aux deux inconnues ϵ_c et σ_c dont nous recherchons à connaître les valeurs.

Prenons le cas d'une cellule inconnue dont la fréquence de transition est 200 MHz. A partir de cette mesure, les couples $(\epsilon/\sigma)_c$ possibles peuvent se réduire à ceux de la courbe rouge. Si une mesure à 300 MHz de la force de répulsion à laquelle la cellule est assujettie, montre que cette dernière présente un $f_{CM}(300 \text{ MHz}) = -0,02$, alors en traçant les couples $(\epsilon/\sigma)_c$ pouvant justifier à un tel comportement (courbe verte), nous observons un point

d'intersection unique avec la courbe rouge. Ainsi de ces deux mesures, un seul couple peut correspondre : une conductivité de $0,5 \text{ S.m}^{-1}$ et une permittivité relative de 63.

Une autre possibilité pourrait être de réaliser une autre mesure à 150 MHz. Dans cet exemple, le f_{CM} mesuré serait de 0,04 et la courbe violette correspondrait aux couples $(\epsilon/\sigma)_c$ en adéquation avec cette nouvelle donnée.

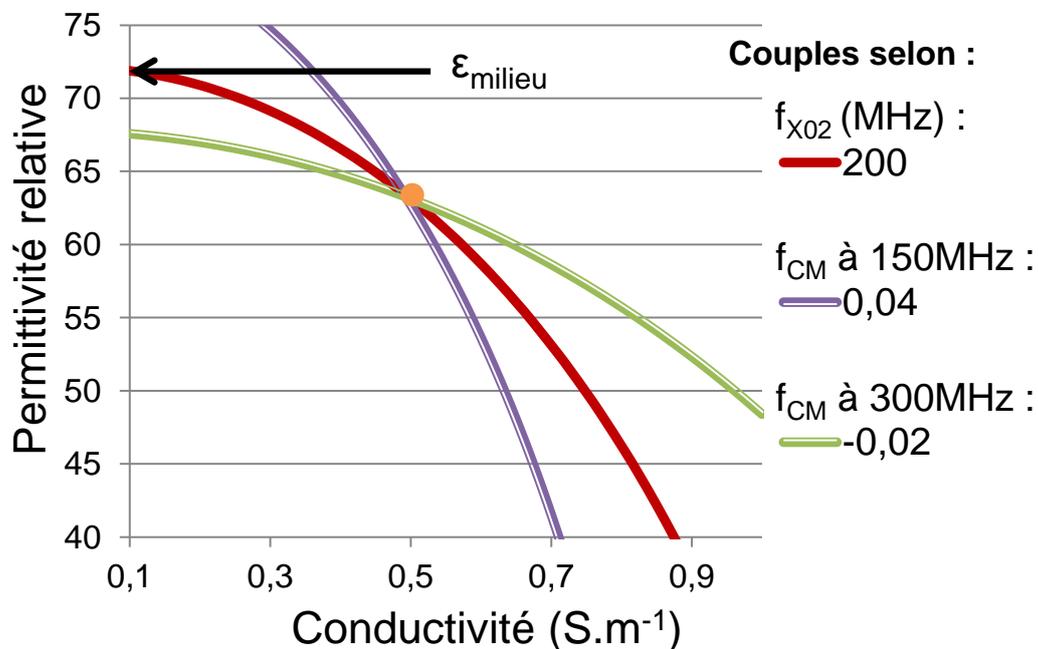


Figure.49 : Couples de valeurs $(\epsilon-\sigma)_c$ possibles pour une cellule selon les valeurs de f_{CM} considérées. Par mesure de $f_{X02} = 200 \text{ MHz}$: courbe rouge. Par mesure de f_{CM} : 0,04 à 150 MHz et -0,02 à 300 MHz. Le point orange représente l'intersection de ces courbes et donc le seul couple $(\epsilon-\sigma)_c$ en adéquation avec les données des mesures réalisées dans un milieu de permittivité relative de 72 et une conductivité de 38 mS.m^{-1} .

Toute cette partie nous a permis de voir plus précisément ce que représente la fréquence de transition d'une cellule que cela soit par rapport aux caractéristiques diélectriques possible de la cellule, mais aussi que cela représente réellement un indicateur de distinction entre deux cellules ayant une f_{X02} différente. Le facteur de Clausius-Mossotti en est aussi un et il nous sera utile au cours du chapitre trois. Tous deux, f_{X02} et f_{CM} , peuvent mener à la connaissance des caractéristiques diélectriques réelles des cellules caractérisées. Les caractéristiques de la force DEP étant maintenant précisées, nous présenterons dans la partie qui suit des forces qui seront-elles aussi en interaction avec les cellules au cours du tri. Il est important de les considérer afin de pouvoir anticiper les trajectoires des cellules lors du tri.

II.3. Evaluation des forces s'appliquant aux cellules en suspension dans le microsysteme

Nous allons nous intéresser à présent aux forces qui influenceront les cellules durant le tri. Un bilan et la présentation de ces forces seront ici réalisés, et nous déterminerons lesquelles nous semblent indispensables à considérer pour modéliser la déviation par force DEP de cellules en flux et pour optimiser notre système de tri par la suite. Ce bilan de forces nous permettra de plus facilement interpréter les trajectoires des cellules observées au cours de nos manipulations et seront la base nous permettant au cours du chapitre 3 de mettre en équation l'accélération des cellules et la condition d'équilibre des forces pour les cellules déviées à partir du principe fondamental de dynamique.

II.3.1. Présentation des différentes forces s'exerçant sur une cellule en flux

Parmi les différentes forces auxquelles les cellules sont soumises, nous pouvons citer la gravité, qui attire la cellule vers le fond du canal microfluidique et entraîne classiquement une sédimentation lorsqu'il n'y a pas ou très peu de flux dans les canaux. D'autres forces liées aux interactions fluide-particule s'exercent comme par exemple la portance dite de cisaillement qui est liée aux mouvements de la cellule dans le fluide et à son profil de vitesse. Il y a également la traînée, les forces de flottaison, les forces de Magnus et les forces en lien avec le mouvement Brownien. Nous allons à présent décrire l'origine et l'influence de ces cinq forces sur la cellule.

II.3.1.1. Force de traînée

La première force qui sera décrite ici est la force de traînée (F_D : Drag force en anglais). Cette force trouve son origine dans les frottements entre la cellule et le milieu liquide qui l'entoure. Ces frottements s'opposent au déplacement de la cellule par rapport au fluide qui s'écoule dans le canal.

Ainsi, F_D est liée à la différence de vitesse entre le liquide et la cellule considérée. De ce fait, plus la différence de vitesse sera grande plus cette force de traînée le sera aussi. Au contraire, si la différence de vitesse entre le liquide et la cellule est nulle, il n'y aura aucun frottement (Figure.50.C). Nous pouvons donc constater deux cas où la force ne sera pas nulle :

- Le liquide entourant la cellule est en mouvement et la cellule est à l'arrêt ou plus lente : F_D est dirigé dans le sens du flux, accélérant la cellule jusqu'à ce qu'elle atteigne la vitesse de celui-ci (Figure.50.A).
- La cellule est en mouvement alors que le liquide autour d'elle est plus lent ou à l'arrêt : F_D est dirigé dans le sens inverse de la vitesse de la cellule. Cette dernière ralentira jusqu'à atteindre la vitesse du flux (Figure.50.B).

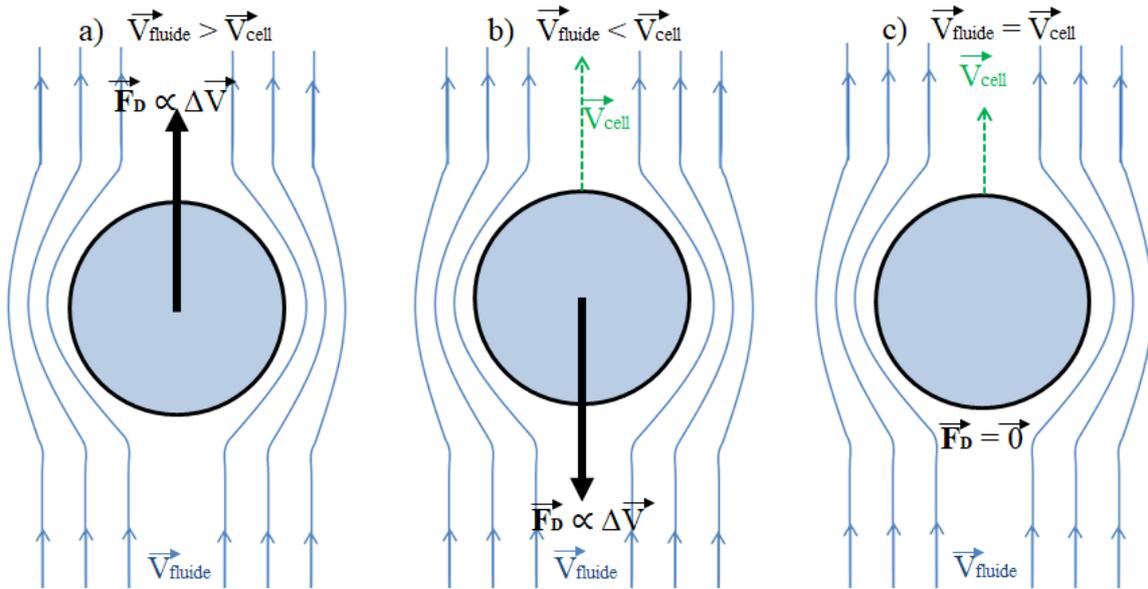


Figure.50 : Directions de la force de trainée selon si la vitesse de la cellule est a) supérieure, b) inférieure) ou c) égale à la vitesse du flux. Les lignes de flux sont considérées pour des nombres de Reynolds inférieur à 1.

La force de trainée peut s'estimer grâce à la formule suivante pour une sphère [19] :

$$\vec{F}_D = \frac{1}{8} \rho_f \cdot \Delta\vec{V}^2 \cdot C_D \cdot 2\pi r^2 \quad (8)$$

Avec ρ_f la masse volumique du fluide, $\Delta\vec{V}$ le vecteur de la différence de vitesse du flux par rapport à celle de la cellule, r est le rayon de la sphère. C_D est le coefficient de trainée qui dépend fortement du nombre de Reynolds et de la forme de la particule considérée [20] (Figure.51).

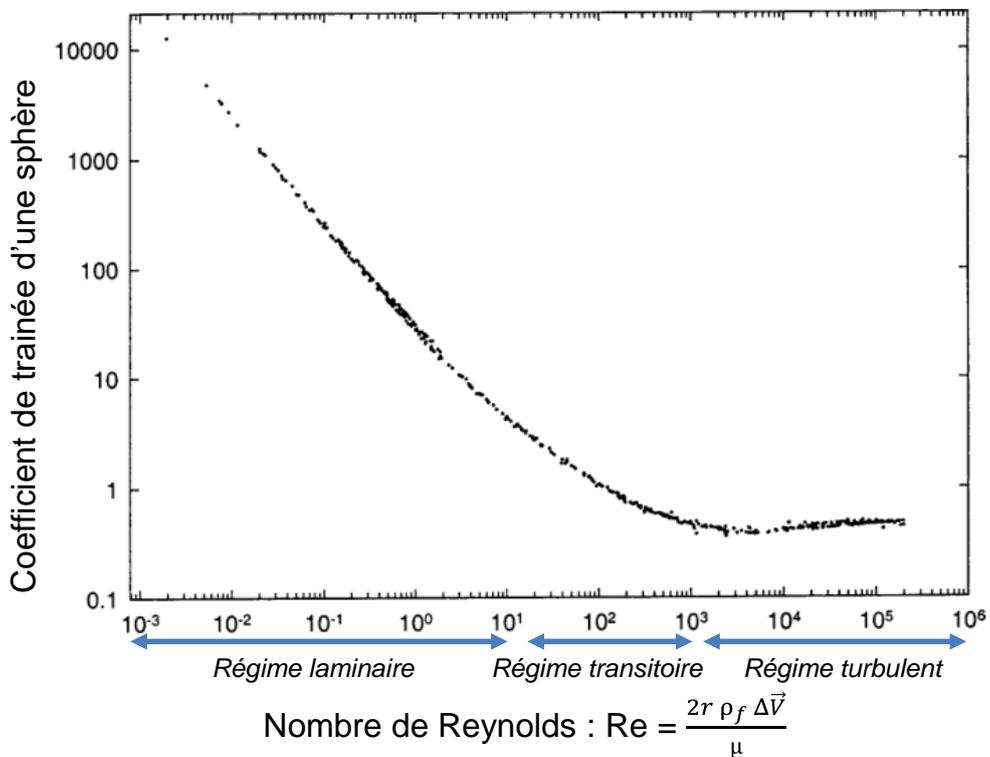


Figure.51 : Relevés expérimentaux du coefficient de trainée c_D par rapport au nombre de Reynolds pour trois géométries différentes de particules [19].

De nombreuses approximations existent selon les régimes d'écoulements considérés (laminaire, transitoire ou turbulent) tel que Van Alln, Osen, Euler–Euler,... [21]. Nous cherchons ainsi à trouver l'approximation du coefficient de traînée qui correspondra le mieux à nos conditions d'expérience en considérant les cellules comme des sphères. Dans le cas de nos expérimentations, nous nous trouverons toujours dans des écoulements de types laminaires ($Re < 1$) comme présenté au chapitre 1. Là encore, différents modèles existent ([21],[22]) mais, comme il sera présenté au cours du troisième chapitre, nos valeurs du nombre de Reynolds ne dépasseront pas 0,5, nous pouvons ainsi utiliser le modèle de Stokes qui permet de calculer la force de traînée avec l'équation suivante [19] :

$$\vec{F}_D = -6\pi \cdot \mu \cdot r \cdot \Delta\vec{V} \quad (9)$$

Où μ est la viscosité dynamique du fluide, r le rayon de la cellule et $\Delta\vec{V}$ le vecteur de la différence de vitesse du flux par rapport à celle de la cellule.

II.3.1.2. Force de portance

Toute cellule se déplaçant dans un fluide et par rapport à celui-ci sera également soumise à l'influence d'une force de portance (F_L : Lift force en anglais). Cette force s'applique de manière perpendiculaire à la vitesse relative de la particule par rapport au milieu liquide. En considérant à nouveau un modèle de cellule parfaitement sphérique, quelle que soit la différence de vitesse entre la cellule et le milieu, la force de portance restera nulle si la vitesse du flux qui entoure la cellule est homogène ; car celle-ci est proportionnelle au gradient du flux (cf. équation (10)). En revanche, si le profil de vitesse du flux n'est pas uniforme, ce qui est classique dans des canaux microfluidiques, la force de portance ne sera pas nulle (Figure.52). Dans le cas d'une sphère, l'équation de Saffman [24] permet d'évaluer cette force de portance :

$$F_L = 1,615 \cdot \rho_f \cdot \mu_f^{1/2} \cdot (2r)^2 \cdot \Delta\vec{V} \cdot (\nabla v_f)^{1/2} \quad (10)$$

Avec ρ_f et μ_f respectivement la masse volumique et la viscosité dynamique du liquide, r le rayon de la cellule, $\Delta\vec{V}$ le vecteur de la différence de vitesse du flux par rapport à celle de la cellule et ∇v_f est le gradient de vitesse du fluide dans le canal microfluidique. Ce sont $\Delta\vec{V}$ et ∇v_f qui vont donner la direction de cette force.

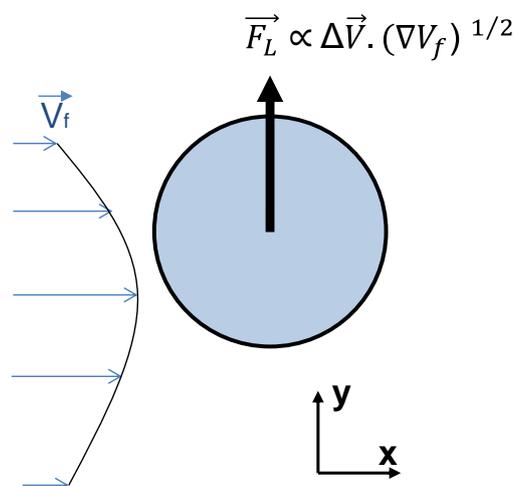


Figure.52 : Shéma présentant la force de portance proportionnelle à la vitesse relative du milieu et au gradient du flux.

De par cette force de portance, les cellules qui n'ont pas une vitesse supérieure à celle du flux sont repoussées des zones de fortes vitesses vers des zones plus lentes. Comme annoncé plus tôt, la vitesse du flux dans un canal microfluidique n'est pas uniforme (Figure.53.A). En effet, les parois des canaux vont perturber le profil de vitesse du fluide par un phénomène de non glissement entre le liquide et la paroi. Il y aura ainsi une composante de cette force parallèle à la largeur et la hauteur du canal. En revanche, en s'éloignant des parois le gradient de vitesse diminue devenant très faible à plus de 60 μm du bord du canal (Figure.53.B). La hauteur du canal étant généralement plus faible que sa largeur, F_L sera par conséquent plus intense pour influencer l'altitude de la cellule dans le canal que sa position dans la largeur de ce dernier.

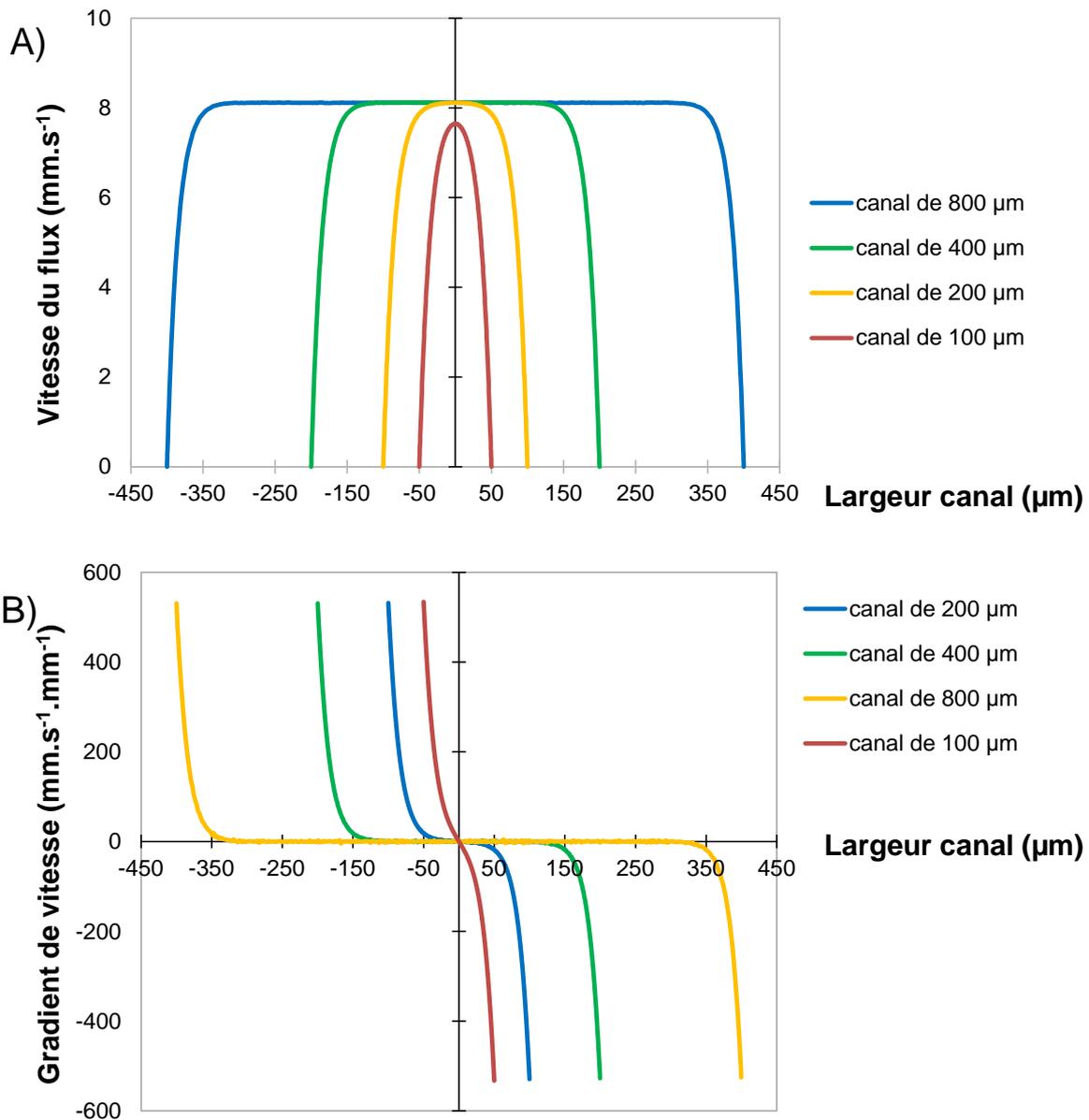


Figure.53 : A) Profil de la vitesse du flux dans des canaux de différentes largeurs avec une pression imposée afin d'avoir une vitesse de 8 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$. B) Gradient des profils de vitesses de A). Tous deux simulés sous COMSOL Multiphysics.

Pour des vitesses inférieures à 8 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, le gradient de vitesse sera moins intense. En revanche, la distance avec le bord du canal nécessaire pour que le gradient soit stable reste inchangée.



II.3.1.3. Force de Magnus

Il peut arriver que les cellules se mettent à tourner sur elles-mêmes dans le flux. S'il n'y a pas ou peu de glissement entre le flux et la membrane cellulaire, il est possible d'observer une modification du profil de vitesse du flux autour des cellules. Une partie du flux allant dans le sens de rotation de la particule sera accéléré tandis que le flux allant dans le sens opposé à la rotation sera ralenti. Or, par effet Bernoulli, la pression que le fluide exerce sur un objet varie inversement proportionnellement à la vitesse de ce fluide par rapport à l'objet. Une différence de pression qu'exerce le fluide en mouvement apparaît donc au contact de la cellule. Cette différence de pression génère la force de Magnus (F_M). Comme le présente la Figure.54, la force exercée est perpendiculaire à la vitesse du flux ainsi qu'à l'axe de rotation de la particule. Cette force pour une sphère se déplaçant par rapport au flux peut s'évaluer avec l'équation suivante [25] :

$$\vec{F}_M = \frac{1}{8} \pi \cdot \rho_f \cdot r^3 \cdot \Delta \vec{V} \cdot \vec{\Omega} \quad (11)$$

Avec $\vec{\Omega}$ le vecteur de rotation de la sphère. Nous remarquerons ici que si la sphère se déplace à la même vitesse que le flux, la force de Magnus sera nulle.

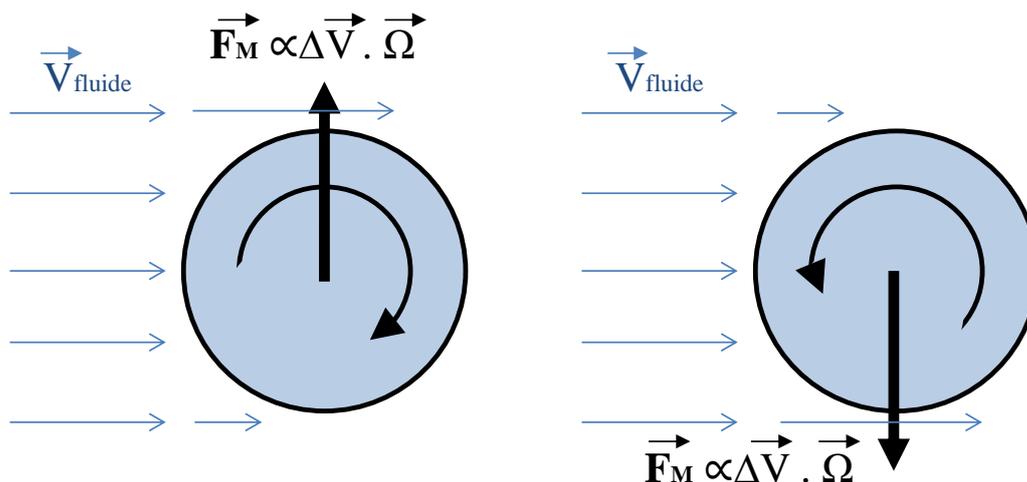


Figure.54: Schéma présentant la force de Magnus proportionnelle à la vitesse relative et à la rotation de la particule.

II.3.1.4. Force de flottabilité

Comme présenté avec la force de Magnus, une différence de pression autour d'un objet génère une force dirigée dans la direction où la pression exercée sur l'objet est la plus faible (Figure.55). Lorsque cette différence de pression est liée à la pression du flux au repos, nous parlons de force de flottabilité (F_B : Buoyancy force). Lorsque la différence de pression est liée à un gradient de température, nous parlons dans ce cas de flottabilité thermique (thermal buoyancy). Ce gradient de température peut par exemple apparaître avec l'application d'un champ électrique intense dans le fluide. Le milieu liquide chauffé présente une pression plus faible attirant ainsi les objets vers les zones les plus chaudes.

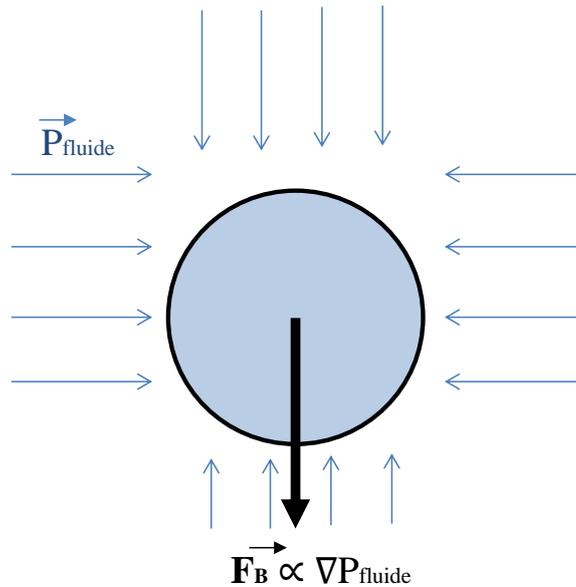


Figure.55: Shéma présentant la force de flotaison proportionnelle au gradient de pression autour de la particule.

L'apparition des perturbations du mouvement de la cellule par effet thermique est lié au nombre de Rayleigh [26] :

$$Ra = \frac{g \cdot \left| \frac{d\rho_f}{dT} \right| \cdot \Delta T \cdot h^3}{\mu \cdot \chi} \quad (12)$$

Avec g la gravité, $\frac{d\rho_f}{dT}$ la variation de la masse volumique du fluide selon sa température T en Kelvin, h la hauteur du système, μ la viscosité dynamique du liquide et χ le coefficient de diffusion thermique. Si ce nombre est supérieur à 1500, alors il y aura une perturbation liée à une source de chaleur. Or, pour un ΔT de 10K il faudrait une hauteur de 2 mm pour observer des mouvements de la cellule sous l'influence de la force de flottabilité thermique. Il faudra ainsi des différences de températures plus importantes que 10 K dans un canal microfluidique qui généralement ne dépasse rarement la centaine de micromètres d'épaisseur pour observer un tel phénomène.

Pour des microsystèmes similaires au notre ayant des électrodes écartées de 25 μm et alimentées par une tension de 10 Vpp, l'intensité du champ électrique est de l'ordre de $4 \times 10^5 \text{ V.m}^{-1}$ ce qui amène une dissipation de puissance de $1,6 \text{ W.mm}^{-3}$ dans un liquide de conductivité $0,01 \text{ S.m}^{-1}$ [27]. Cette dissipation de puissance est une source de chaleur faible car inférieure au $^\circ\text{C}$.

Cet échauffement du milieu liquide est d'autant plus faible qu'il diminue avec l'augmentation de la fréquence du signal DEP. En effet, pour échauffer un milieu, un temps de dissipation est nécessaire, et s'il est trop grand face à la période du signal, l'échauffement sera faible. Ce temps de diffusion (t_{dif}) peut être estimé dans le cas de deux électrodes parallèles écartées d'une distance l comme ceci :

$$t_{dif} = \frac{\rho_m c_p l^2}{k} \quad (13)$$

Où k est la conductivité thermique ($k = 0,596 \text{ J.m}^{-1}.\text{s}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour de l'eau DI à $20 \text{ }^\circ\text{C}$), c_p sa capacité thermique spécifique ($c_p = 4,18 \cdot 10^3 \text{ J.kg}^{-1}.\text{K}^{-1}$ pour l'eau), ρ_m sa densité ($\rho_m = 2000 \text{ kg.m}^{-3}$). Pour une distance inter-électrode de 30 μm , nous avons donc un temps de diffusion de l'ordre de 13 ms. Il faut ainsi appliquer le champ électrique 13 ms pour que l'équilibre

thermique soit atteint. Notre période de signal étant de l'ordre de 0,1 ns, cet équilibre n'est jamais atteint et ainsi la différence de température est réduite face à des fréquences basses.

C'est à une fréquence inférieure à 5 MHz que Thomas Schnelle, lors d'expérimentations détaillées dans [28], a montré qu'une augmentation de température de l'ordre de 1 K peut être mesurée dans un microsystème d'électrodes interdigitées de 30 μm de large et espacées de 30 μm lors de l'application d'une tension de 2 Vpp dans un milieu fortement conducteur ($1,3 \text{ S}\cdot\text{m}^{-1}$). Les variations de températures nécessiteront l'application d'une très grande tension pour influencer notre système, ce qui ne sera jamais le cas.

II.3.1.5. Mouvement Brownien

Du fait de la température, non nulle, du liquide qui circule dans les canaux microfluidiques ce dernier peut être sujet à une agitation thermique des molécules qui le composent. En conséquence, ces molécules percutent les particules se trouvant dans le liquide générant ainsi un mouvement aléatoire nommé mouvement Brownien. Statistiquement ce mouvement Brownien est de 0 μm , mais les directions du mouvement étant aléatoires, ces légers déplacements entraînent les petites particules à l'écart de leur position initiale (Figure.56). L'amplitude de déplacement de telles particules peut être estimée en calculant la moyenne quadratique de ce mouvement [26]:

$$\Delta x = \sqrt{\frac{k_B \cdot T}{3\pi \cdot r \cdot \mu} t} \quad (14)$$

Où k_B est la constante de Boltzmann ($1,38064852 \times 10^{-23} \text{ m}^2 \text{ kg s}^{-2} \text{ K}^{-1}$), T la température absolue du fluide en Kelvin, r le rayon de la particule, μ la viscosité dynamique du fluide et t le temps d'observation. Cette force étant aléatoire, elle représente un problème pour la reproductibilité d'un système manipulant de petites particules. Il est à noter que ce mouvement diminue avec des particules de plus grande taille.

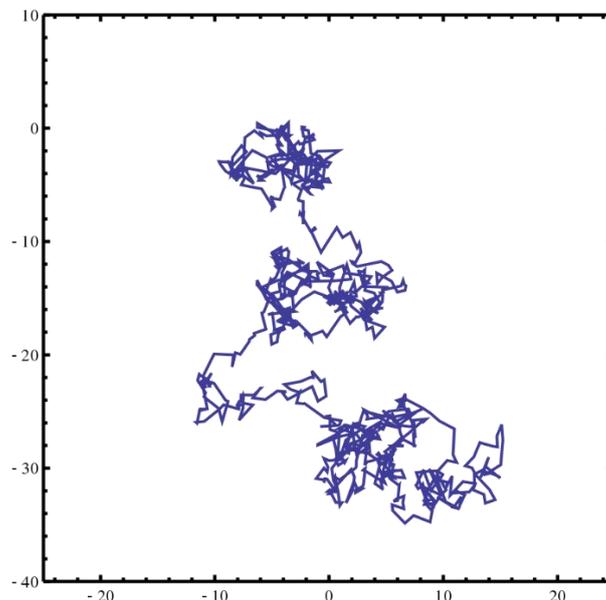


Figure.56 : Simulation du mouvement aléatoire d'une particule liée à l'effet du mouvement Brownien. [29]

II.3.2. Ordres de grandeur

Toutes les forces décrites précédemment ne vont pas avoir une influence d'intensité similaire sur les cellules se déplaçant dans notre système de tri. En particulier, l'ordre de grandeur de certaines de ces forces dépend de la taille de la particule considérée. C'est par exemple le cas du mouvement Brownien qui a une intensité plus faible avec des particules plus grandes, ou au contraire la force de portance qui augmente avec la taille des particules. Pour notre cas, l'ordre de grandeur des cellules manipulées sera compris entre 10 μm et 35 μm de diamètre.

La Figure.57 représente l'impact théorique de la taille de particules en suspension dans un fluide sur le déplacement de la cellule, calculé sur une seconde et pour une force donnée. Cet équivalent de vitesse de déplacement de la cellule est reporté en ne considérant l'influence que d'une seule force à la fois. Ce graphique est issu des données des travaux de A. Castellanos et al [26].

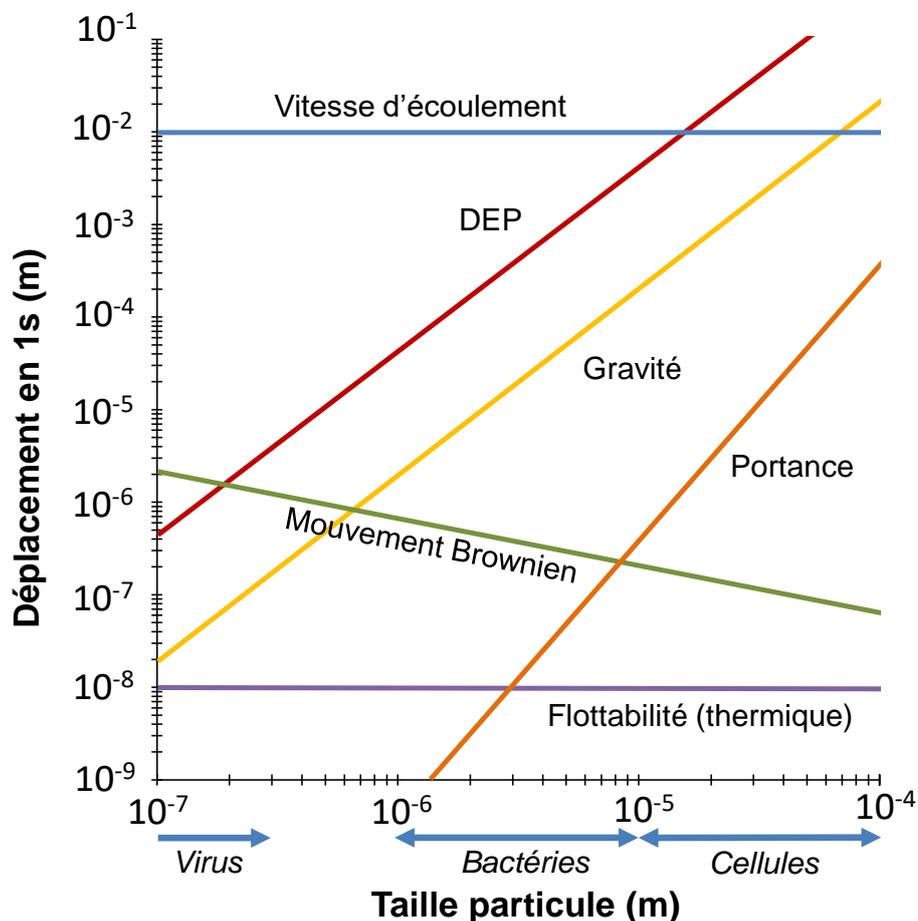


Figure.57 : Amplitude de déplacement d'une particule en une seconde induit par différents phénomènes en fonction de sa taille (flux : 20 mm.s^{-1} ; hauteur canal : $45 \mu\text{m}$; tension DEP appliquée: 5 Vpp ; écart des électrodes : $25 \mu\text{m}$; σ_m : $0,01 \text{ S.m}^{-1}$). Graphique repris de A. Castellanos et al [26].

Nous remarquons que 3 vitesses prédominent d'un facteur 100 les autres forces lorsque les particules dépassent $4 \mu\text{m}$ de diamètre :

- La vitesse donnée à la cellule par le déplacement d'un flux (souvent de l'ordre de quelques mm.s^{-1})

- La vitesse liée à la force de DEP (conditions utilisées : écart entre les électrodes de 25 μm et tension appliquée de 5 V)
- La vitesse liée à la force de gravité terrestre

A partir de particules de 40 μm , l'écart entre la vitesse liée à la portance et celle de gravité devient inférieur à ce facteur 100. En revanche pour une cellule de 30 μm de diamètre, l'effet de la force de portance est encore 200 fois inférieur à celle de gravité. Ainsi, bien que le rapport entre les vitesses liées à la portance et à la gravité diminue avec des particules plus grandes, cette force reste négligeable pour des cellules inférieures à 50 μm de diamètre dans la largeur des canaux. En considérant des vitesses de flux supérieures à 10 $\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, la vitesse obtenue par effet de portance sera moins négligeable par rapport aux autres phénomènes dans la hauteur du canal considérée ici à 45 μm . Comme il a été vu dans la Figure.53.B son influence est quasiment nulle à plus de 60 μm d'une paroi, car il n'y a plus de gradient de vitesse. Cet écart d'une paroi est tout à fait possible dans la largeur d'un canal, mais pas dans la hauteur de celui-ci dans notre cas.

La vitesse liée à la flottabilité thermique est faible face aux autres vitesses. De plus, elle est indépendante de la taille de la particule considérée, et ainsi devient de plus en plus négligeable en regard aux effets des autres forces au fur et à mesure que la taille des particules grandit. Les effets du mouvement Brownien lui, au contraire des effets de la gravité et de la force DEP diminue avec la taille croissante de la particule. Ainsi, alors que ce mouvement est très important pour des éléments nanométriques tels que des virus, le déplacement induit est négligeable face à la force de gravité et à la force DEP pour des cellules de taille micrométrique (il existe à minima un facteur 1000).

L'ordre de grandeur du déplacement liée à la force de gravité est tout de même inférieur à celle liée à la force de DEP d'un facteur 20 dans les conditions présentées ci-dessus. Pour ce qui est de la vitesse de flux découlant de la force de trainée, la taille de la cellule a une influence uniquement sur la phase d'accélération et non sur la vitesse maximale atteinte qui est uniquement dépendante des conditions fluidiques. La vitesse du flux est très facilement modulable dans un laboratoire sur puce, et devra être ajustée par rapport à l'intensité de la force DEP selon les besoins pour mener à bien un tri.

L'écoulement n'est pas le seul paramètre à moduler au cours de nos manipulations, la tension appliquée aux électrodes est importante. Dans le cas des forces présentées, seules les forces DEP et de flottaison induite par l'échauffement thermique sont impactées par le champ généré entre les électrodes à l'application de cette tension. La Figure.58 illustre leur évolution en fonction de la tension appliquée entre deux électrodes espacées de 25 μm et un milieu plus conducteur que le nôtre (100 $\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$).

Sur cette figure nous pouvons constater que ce sont toujours les effets de la vitesse d'écoulement, la force de gravité et la force DEP qui dominent le déplacement d'une particule malgré l'augmentation de la vitesse liée à la flottabilité thermique.

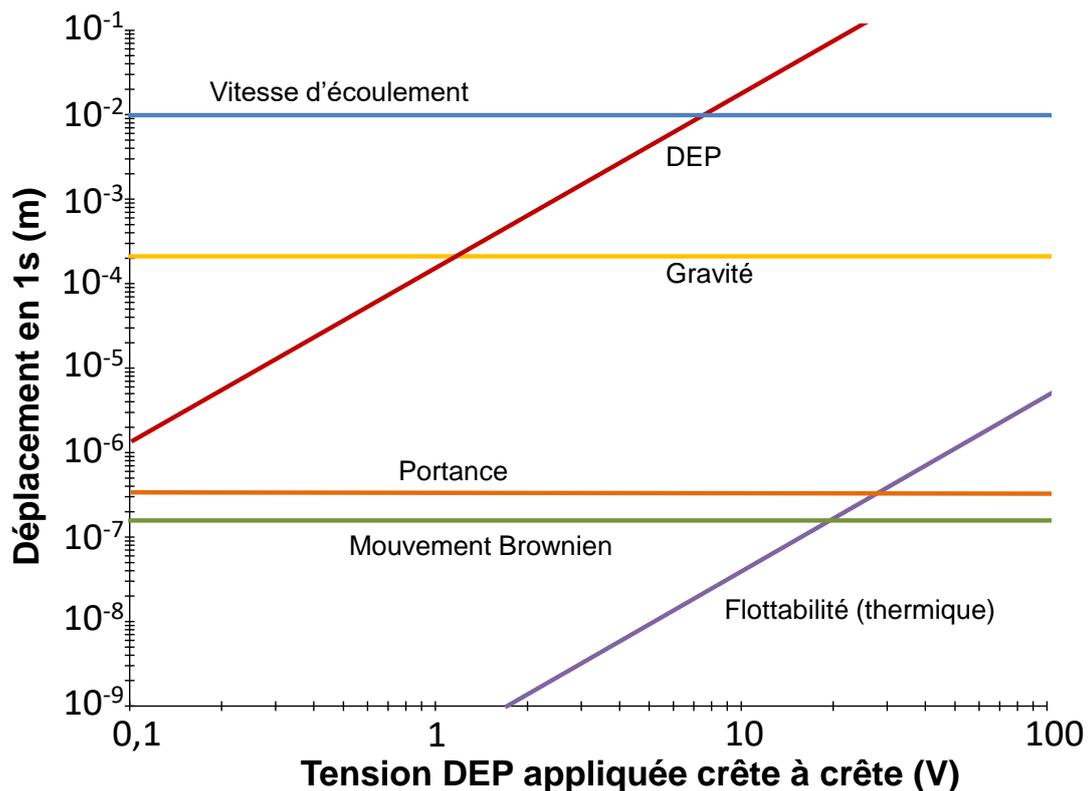


Figure.58 : Déplacement d'une particule de diamètre $20\ \mu\text{m}$ en une seconde lié à différentes forces selon la tension appliquée (flux : $10\ \text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$; hauteur canal : $45\ \mu\text{m}$; écart des électrodes : $25\ \mu\text{m}$; σ_m : $0,01\ \text{S}\cdot\text{m}^{-1}$). Graphique repris de A. Castellanos et al [26].

Nous pouvons en revanche constater qu'en fonction de l'amplitude de la tension appliquée, les effets de la force DEP peuvent très bien devenir inférieurs, comparables ou supérieurs à la force de gravité et la vitesse du flux.

C'est d'ailleurs dans des conditions où ces forces s'équilibrent que les forces de DEP sont mesurées : en opposant la force de DEP à la force de gravité [30] ou à la force de traînée [18], un point d'équilibre est trouvé ou dépassé permettant de calculer la force de DEP.

Ainsi le dispositif présenté sur la Figure.59.A, constitué de deux électrodes fines à forme paraboliques qui par application d'une tension génèrent un champ plus ou moins intense selon la position de la bille sur l'axe central, permet de mesurer la force DEP par effet de gravité. En modifiant l'angle d'inclinaison de la puce par rapport au sol, la force de gravité peut être ajustée pour être plus ou moins orientée dans le sens du canal. A partir de la position d'équilibre de la particule observée soumise au champ électrique dont l'intensité varie en fonction de l'écart entre les électrodes, une estimation de la force DEP en ce point est possible. Ainsi avec une tension de $20\ \text{V}_{pp}$, la force DEP est estimée à $20\ \text{pN}$ sur la bille de verre lorsqu'elle se situe entre les électrodes espacées de $100\ \mu\text{m}$, et à $5\ \text{pN}$ pour un écart de $530\ \mu\text{m}$.

Pour le dispositif de la Figure.59.B, les cellules sont piégées entre 4 plots métalliques disposés en losange autour desquels un champ électrique est généré pour former une cage électrique de type piège à cellules. En augmentant la vitesse de flux, le piège électrique n'est plus suffisamment efficace pour retenir la cellule. A partir d'une vitesse dite de décrochage, la force de traînée nécessaire pour surpasser la force de DEP est calculée permettant ainsi

d'estimer avec une bonne précision la force de DEP qui retenait la cellule. Nous pouvons noter que les écartements entre les électrodes du dispositif étant plus petits que pour le dispositif précédant (30 μm), et la particule plus grande (environ 20 μm de diamètre), la force DEP peut ici dépasser les 100 pN pour des tensions supérieures à 2 Vpp sur une particule de 13,2 μm de diamètre. Dans notre cas, nous utiliserons des électrodes espacées avec des écartements de 30 μm également, ce qui devrait nous permettre de générer des forces DEP d'un ordre de grandeur assez similaire.

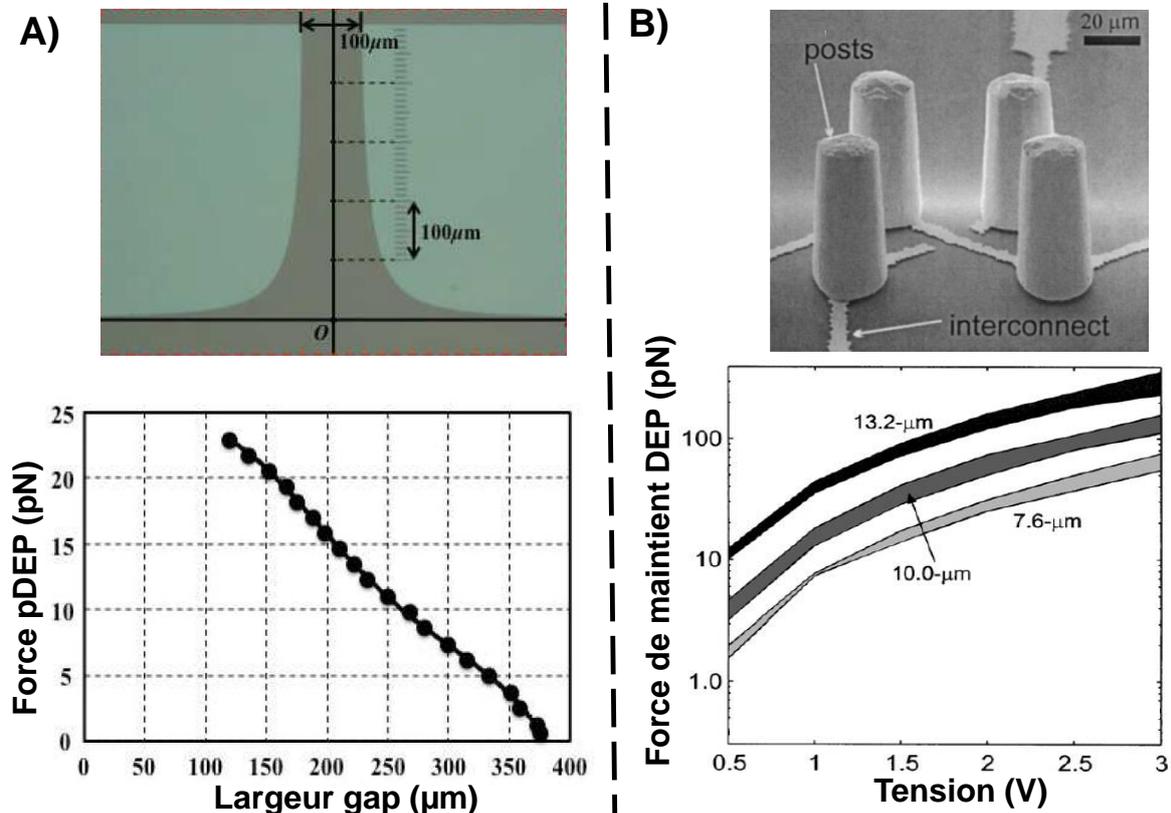


Figure.59 : 2 systèmes d'évaluation de force DEP. A) électrodes planaires générant une force opposée à la gravité par inclinaison de la puce (tension : 20 Vpp), la force DEP est présentée pour une particule de 14 μm de diamètre ; B) Plots métalliques réalisant un piège DEP opposé à la vitesse du flux (espace inter-plots : 30 μm et 50 μm), la force DEP est évaluée pour 3 diamètres de bille. [18], [30]

Nous avons pu voir au cours de cette partie que les interactions auxquelles est soumise une cellule se déplaçant dans un canal microfluidique sont nombreuses. En effet, de nombreuses forces peuvent s'exercer sur celle-ci lorsque le liquide autour d'elle est en mouvement. En revanche, en analysant l'influence de ces différentes forces pour des particules de tailles micrométriques telles que des cellules, nous pouvons limiter à trois le nombre de forces à considérer (cf. Tableau.5): la force de trainée liée aux frottements fluide-cellule, la force de gravité liée à l'attraction terrestre et la force de diélectrophorèse qui est liée à l'interaction champ-cellule. Ces forces sont suffisantes pour prédire la trajectoire que suivront les cellules lorsqu'elles pénétreront dans la zone de tri de notre microsystème fluidique.

La force de portance est particulière, car elle n'est à considérer que si la cellule approche d'une paroi. C'est d'ailleurs cette force qui empêche les cellules en déplacement de sédimenter par effet de gravité dans le canal [25]. En revanche, dans la largeur du canal celle-ci n'aura pas d'influence significative sur le tri à plus de 60 μm des parois.

Tableau.5 : Récapitulatif des forces interagissant avec les cellules.

Forces non-négligeables	Forces négligeables
<ul style="list-style-type: none"> •Force de gravité •Force de traînée •Force de DEP •Force de portance (à moins de 60 μm d'un mur) 	<ul style="list-style-type: none"> •Force de portance (à plus de 60 μm d'un mur) •Mouvement Brownien (car d cellules \gg à 1 μm) •Force de Magnus (pas de rotation rapide) •Flottabilité thermique (peu d'échauffement)

L'intensité de ces forces est de l'ordre de plusieurs dizaines de pN (10^{-12} N). Leur effet, bien que très faibles du point de vue macroscopique, reste important sur une cellule du fait de son faible volume (quelques pL ou nm^3). Pour ce volume mis en mouvement par de telles forces, les durées d'accélération sont inférieures à la seconde. Suivant les ordres de grandeurs utilisés les durées d'accélération peuvent même être de l'ordre de la milliseconde et sont ainsi souvent négligées [31]. Ceci sera détaillé au cours du troisième chapitre.

Maintenant que nous avons identifié les forces dominantes qui vont interagir avec la cellule, nous pouvons anticiper les trajectoires que pourront suivre les cellules aux environs du champ électrique, ce qui nous permettra de concevoir et de réaliser une première puce microfluidique.



II.4. Conception des électrodes pour la génération du champ électrique

L'impact du champ électrique auquel la cellule est soumise durant le phénomène de diélectrophorèse a été décrit au travers de l'évolution de f_{CM} et f_{XO2} selon les modèles utilisés et les caractéristiques diélectriques de la cellule. La direction et l'intensité de F_{DEP} n'est pas uniquement liée à la cellule, et c'est pourquoi la génération du champ électrique est maintenant étudié plus en détail, et plus spécifiquement le gradient de ce champ au carré ($\nabla|E^2|$) ; la force DEP y étant directement proportionnelle.

Les simulations qui seront présentées ici ont été réalisées à partir du logiciel de simulation multi-physique COMSOL. Le module de simulation utilisé est « Electric Current », et ne prend pas en compte la propagation des ondes électromagnétiques dans les matériaux du système. Ainsi ces simulations seront complétées, à la suite de cette troisième partie par des simulations ANSYS HFSS afin de prendre en compte en particulier les pertes électriques liées à ces phénomènes de propagation. Le module Electric Current nous permet tout de même de connaître la distribution précise du champ électrique dans une section du système là où les effets de propagation n'ont pas à être considéré.

II.4.1. Géométrie et tension d'alimentation

Dans cette partie, nous présentons comment générer un champ électrique localisé dans un petit volume de liquide. C'est ce champ qui permettra de dévier la trajectoire des cellules par effet DEP. Ainsi le système de tri cellulaire doit pouvoir générer des intensités fortes de champ dans la limite de puissance d'alimentation que peuvent fournir nos générateurs. Si le champ électrique n'est pas assez intense, alors la force DEP agissant sur les cellules le sera également, ce qui entraînera le recours à de faibles vitesses de flux pour obtenir un équilibre entre celui-ci et la force DEP (cf. § II.4.4). Il faut noter qu'une trop grande intensité de champ peut endommager les cellules et provoquer des échauffements, ainsi lors du dimensionnement des électrodes, tel que le choix de la largeur inter-électrodes, la puissance du champ ne sera pas le seul paramètre pris en considération.

Comme présenté sur la Figure.60, la disposition des électrodes dans un canal microfluidique impose une certaine distribution des lignes de champ. Ces lignes de champ sont en fait les trajectoires des vecteurs qui permettent la représentation du champ électrique. Dans le cas de la Figure.60.A, les lignes de champ sont uniformément réparties car le champ est lui-même uniforme entre deux électrodes en configuration plaques parallèles. En revanche, dès que les électrodes ne sont plus en vis-à-vis, le champ généré devient non-uniforme (Figure.60.B-D).

Nous pouvons aussi observer à partir de Figure.60.A que le champ se focalise naturellement dans le chemin le plus court entre les deux électrodes portées à un potentiel différent. De plus, dans le cas d'une implémentation symétrique des électrodes disposées sur un même plan (Figure.60.B et Figure.60.E) le champ sera lui aussi symétrique et selon le même axe de symétrie que celui des électrodes.

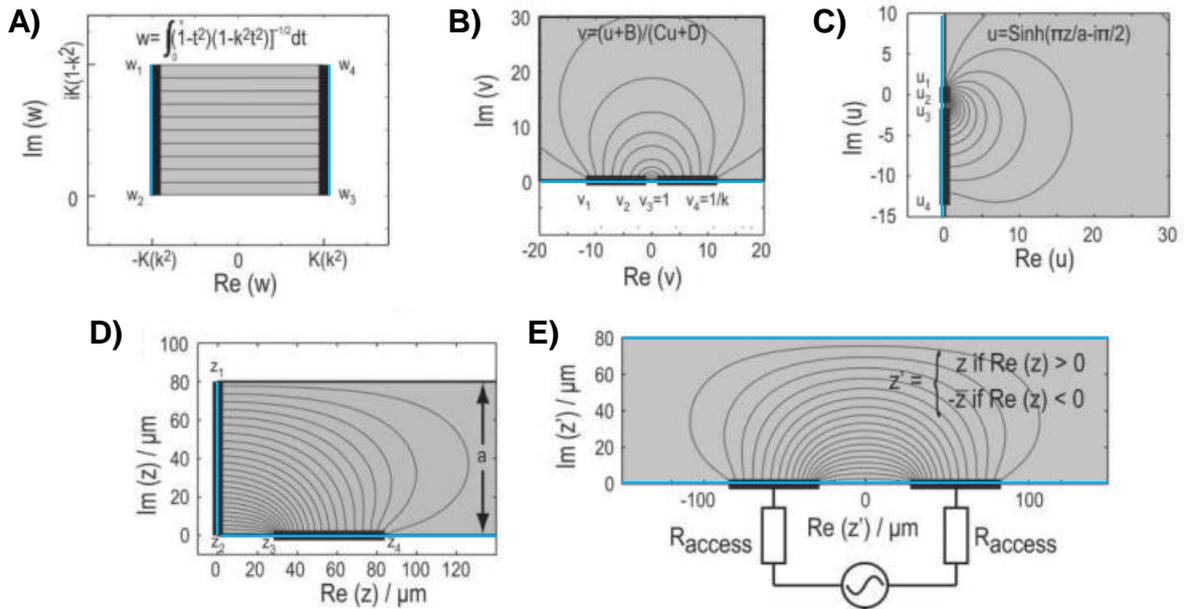


Figure.60 : Différentes projections des lignes de champ électrique entre deux électrodes planaires sur le bord d'un micro-canal. (a) Electrodes en vis-à-vis; (b) Arrangement symétrique d'électrodes coplanaires dans un plan à demi-ouvert ; (c) Largeur asymétrique d'électrodes coplanaires ; (d) Electrodes disposées à la perpendiculaire l'une de l'autre sur l'angle d'un canal; (e) Arrangement symétrique d'électrodes coplanaires dans un canal de 80 μm de haut. [32]

Toute dissymétrie dans les dimensions des électrodes (Figure.60.C) engendrera une dissymétrie du champ électrique. Il est important de noter que les parois du canal, du fait de leurs caractéristiques diélectriques propres qui diffèrent de celles du liquide circulant dans le canal, impactent la forme du profil du champ (Figure.60.D et Figure.60.E). Une partie du champ peut toutefois se localiser dans la paroi supérieure, tout comme une partie du champ se propage dans le substrat qui supporte les électrodes (Figure.61).

Nous nous intéressons essentiellement au cas de la Figure.60.E avec les électrodes coplanaires, symétriques et qui sont disposées dans un canal fermé de 45 μm de hauteur. En effet, une implémentation coplaire présente une grande simplicité de fabrication et de mesure, et la forme du champ généré correspond à nos besoins.

Les électrodes sont dans ces simulations plongées dans de l'eau de permittivité relative de 72 et de conductivité de 38 $\text{mS}\cdot\text{m}^{-1}$ et disposées sur un substrat de silicium. La Figure.61 présente le modèle de simulation qui sera utilisé par la suite. Les électrodes font 90 μm de large, et le reste de leurs dimensions pouvant varier selon les simulations présentées seront précisées à chaque fois.

Les épaisseurs considérées dans les simulations pour le substrat et le PDMS sont réduites à 45 μm de hauteur, ce qui est bien inférieur à la réalité mais permet d'utiliser un maillage de simulation plus précis sans dépasser les capacités de l'unité de calcul et de réduire le temps de simulation. De plus les épaisseurs sont suffisantes pour ne pas affecter les résultats des intensités du champ à l'intérieur du canal. Au travers de la Figure.61, nous pouvons voir que les lignes de champ autour de la zone centrale, qui est notre zone d'intérêt, ne sont pas comprimées et donc la réduction de hauteur ne devrait pas impacter outre mesure les résultats de simulation dans la zone d'intérêt.

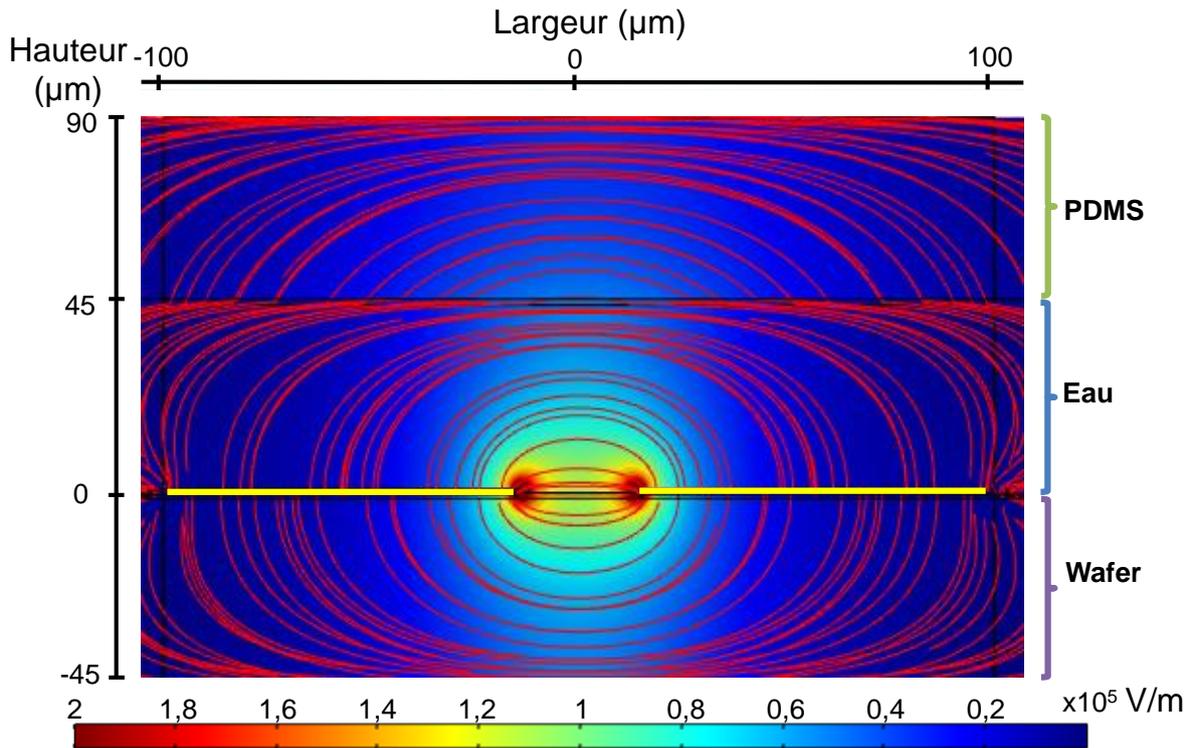


Figure.61 : Génération d'un champ électrique entre deux électrodes de 1 μm d'épais, espacées de 30 μm (lignes jaunes) alimentées en $5 V_{\text{max}}$ alternatif. Les lignes de champ sont représentées en rouge. Le champ se propage à la fois dans l'eau (de 0 à 45 μm en hauteur) que dans le substrat de silicium (de 0 à -45 μm en hauteur) ou dans le PDMS (de 45 à 90 μm en hauteur).

Il est à noter que la zone du champ la plus intense se situe sur le bord des électrodes de chaque côté de l'espace entre les électrodes (zone rouge Figure.61). Dans l'étude de l'impact du champ sur l'intensité de F_{DEP} c'est surtout le gradient du champ qui nous intéresse, et plus particulièrement $\nabla|E^2|$: le gradient du champ au carré, comme la force DEP, est directement proportionnelle à ce dernier.

Le signe de $\nabla|E^2|$, positif en s'approchant des zones de forte intensité et négatif en s'en écartant, donne la direction de la force DEP (Figure.62). Ainsi, si le gradient est positif et que la cellule est soumise à un effet de pDEP ($f_{\text{CM}} > 0$), la force sera dirigée dans le même sens que l'axe considéré qui est sa direction donnée par le flux. De façon similaire, si $\nabla|E^2| < 0$ et que la cellule est sous effet de nDEP ($f_{\text{CM}} < 0$), F_{DEP} sera positif et donc là encore orienté dans le sens de l'axe considéré. Au contraire la force sera inverse à l'axe si $\nabla|E^2|$ et f_{CM} sont de signes opposés. Enfin, plus le gradient sera fort, plus la force DEP sera intense. Ainsi c'est surtout les zones au-dessus des électrodes de chaque côté de l'espace qui les séparent qui influenceront le plus les cellules (zones rouges).

Tout comme le champ électrique est symétrique par rapport au centre de l'espace inter-électrodes, la valeur absolue du gradient l'est aussi. La direction de la force est en revanche opposée selon si la cellule est à gauche ou à droite du centre inter-électrodes. La zone de gauche pourra servir de barrière électrique qui servira à dévier les cellules dans le canal microfluidique, repoussant les cellules en nDEP et retenant les cellules en pDEP. L'intensité du gradient impactera la possibilité ou non de dévier les cellules.

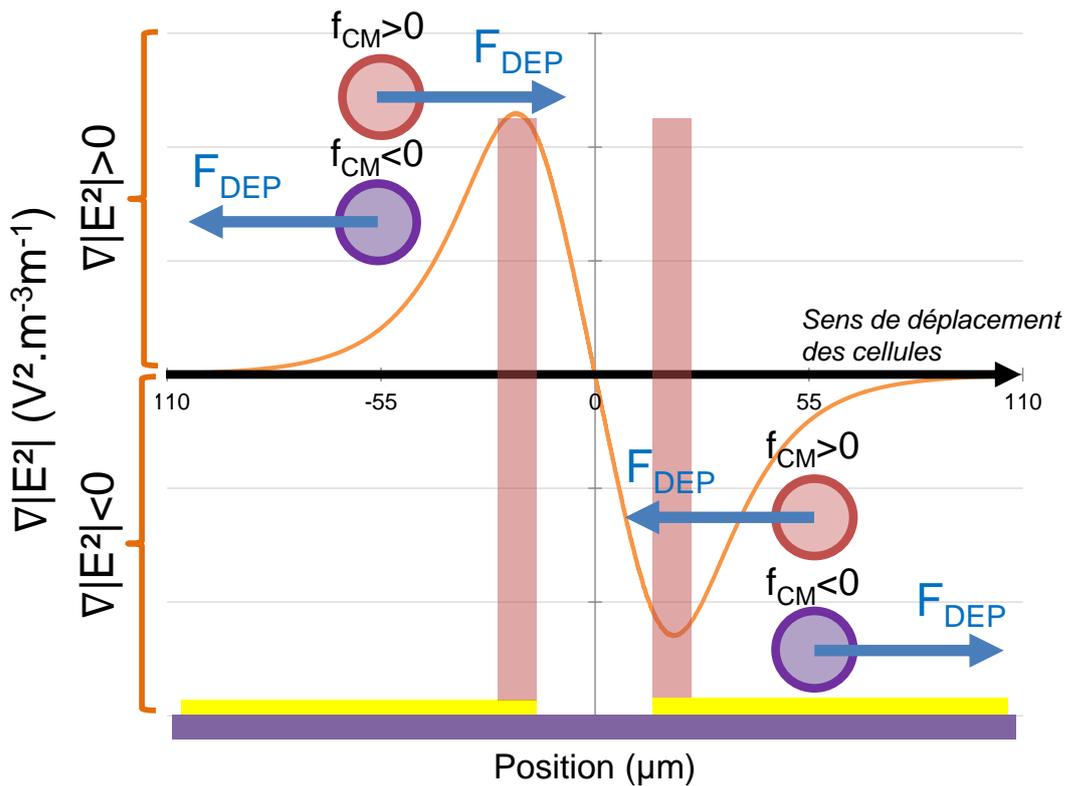


Figure.62 : Orientation de la force de DEP selon f_{CM} et $|\nabla|E^2|$ auquel elle est proportionnelle. Les deux zones rouges montrent les zones où le gradient de champ est le plus intense.

La principale raison motivant à limiter la hauteur du canal microfluidique à une épaisseur inférieure à 50 μm est d'éviter que les cellules puissent passer au-dessus des électrodes à des hauteurs trop disparates. En effet, comme le montre la Figure.63, l'intensité du gradient de champ diminue rapidement pour des altitudes croissantes au-dessus des électrodes. Nous observons une réduction d'un rapport de 2,6 en comparant les intensités maximales du gradient entre une altitude de 15 μm et de 35 μm .

Il semble donc important de limiter l'excursion possible des cellules pouvant circuler au-dessus des électrodes en limitant la hauteur du canal. En revanche, trop réduire son épaisseur pourrait empêcher les cellules les plus grosses (de l'ordre de 35 μm de diamètre pour nos expériences) de circuler facilement dans le canal. C'est pourquoi nous avons opté pour un canal de 45 μm de hauteur.

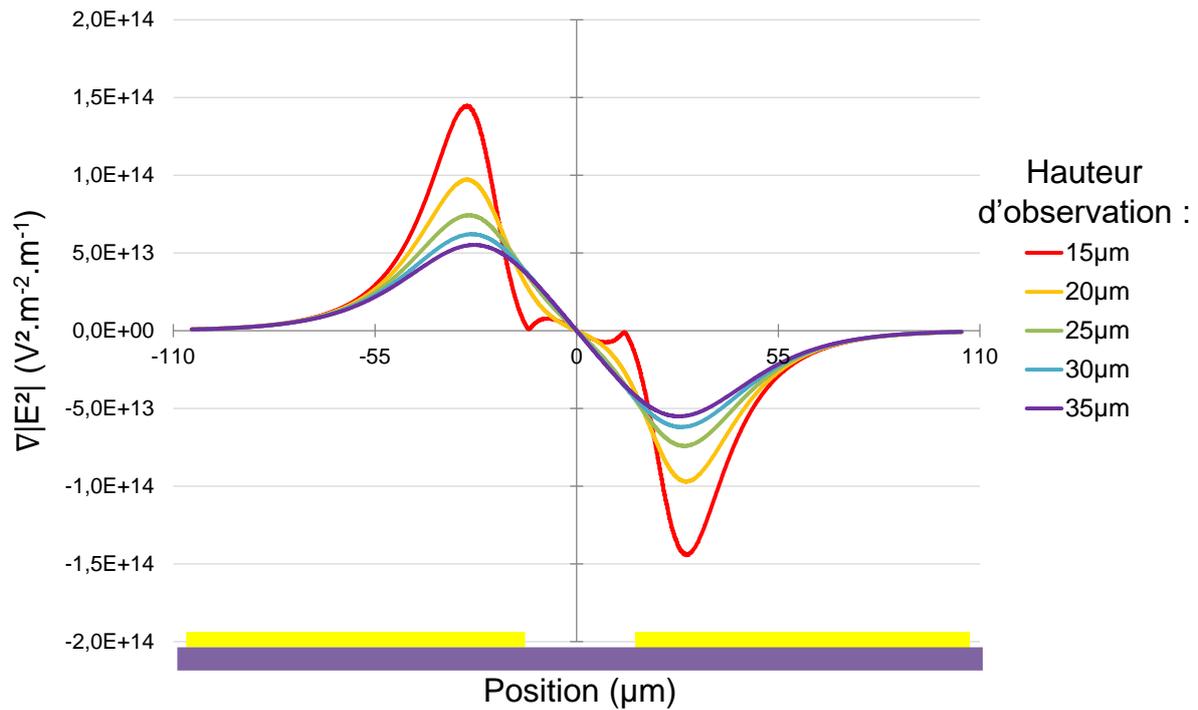


Figure.63 : Différence du gradient du champ au carré ($\nabla|E^2|$) selon la distance d'observation au dessus des électrodes (en jaune). Signal: 5 Vmax à 500 Mhz ; écart des électrodes : 30 μm ; épaisseur d'électrodes : 2 μm .

En limitant la hauteur du canal il est préférable de ne pas avoir recours à des électrodes de fortes épaisseurs. En effet, en leur présence la hauteur effective du canal est réduite et pourrait gêner le passage des plus grosses cellules. Pour éviter de telles contraintes des électrodes d'épaisseur inférieure à 10 μm seront ainsi privilégiées.

De plus, la variation de l'épaisseur des électrodes modifie peu la forme du gradient et module juste son maximum d'intensité (Figure.64). En effet, alors que son épaisseur est 5 fois inférieure à une électrode de 10 μm , une électrode de 2 μm ne présente qu'une intensité maximale du gradient de 19% moins intense. Entre des électrodes de 2 μm et de 5 μm d'épais, leurs maximums d'intensité ne présentent qu'un écart de 7%. Au final, une épaisseur de 2 μm est choisie afin de limiter l'impact de la présence des électrodes.

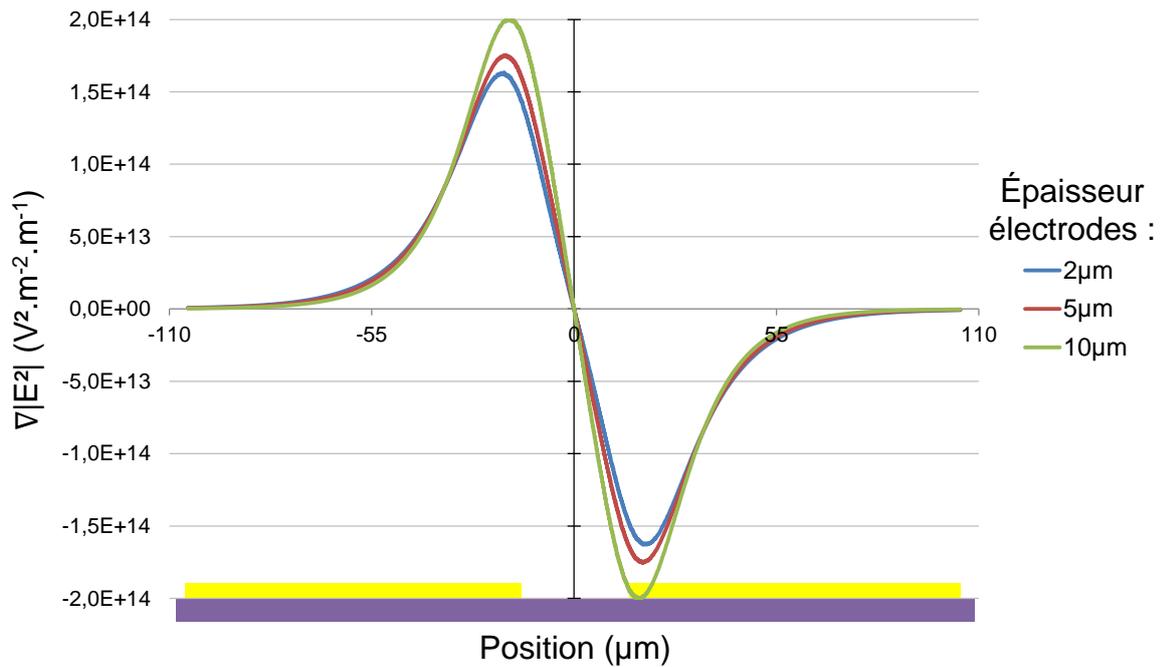


Figure.64 : Impact de l'épaisseur des électrodes (en jaune) sur le gradient du champ au carré ($\nabla|E^2|$) pour une même altitude au dessus des électrodes. Signal: 5 Vmax à 500 Mhz ; altitude au dessus des électrodes : 20 μm ; écart des électrodes: 30 μm .

Le paramètre qui influence le plus l'intensité de $\nabla|E^2|$ est en fait la différence de potentiel inter électrodes (Figure.65). De plus, cette différence de potentiel permet une forte modulation de l'intensité du gradient facilement modifiable en cours de manipulation contrairement à la géométrie des électrodes qui est fixée lors de leur fabrication.

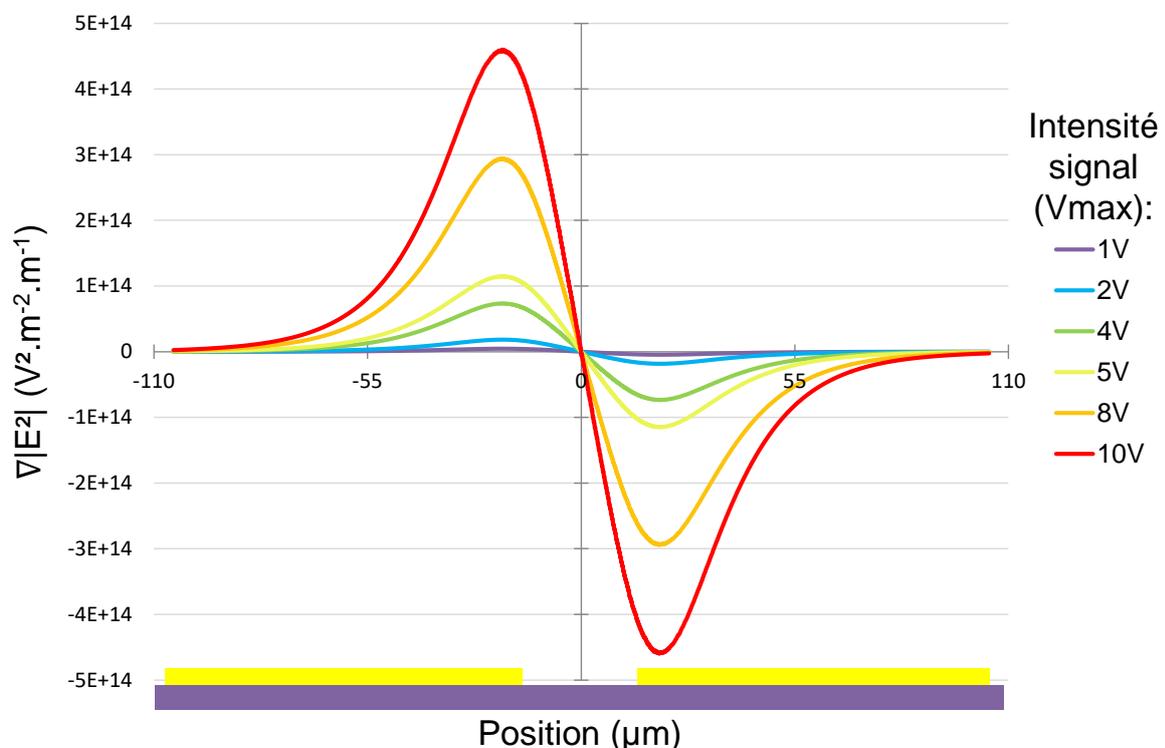


Figure.65 : Impact de l'intensité du signal appliqué aux électrodes (en jaune) sur le gradient du champ au carré ($\nabla|E^2|$). altitude : 20 μm ; écart des électrodes: 30 μm ; épaisseur d'électrodes : 2 μm .

L'intensité du gradient du champ et la différence de potentiel ne sont pas proportionnelles. En traçant le maximum du gradient de champ en fonction de la différence de potentiel appliquée aux électrodes, (Figure.66 courbe orange) nous constatons que ce gradient est linéaire avec la différence de potentiel au carré sous la forme $\nabla|E^2| = A \cdot V^2$. Il est donc également linéaire à la puissance du signal DEP injecté dans les électrodes de par la formule $P = V^2 / Z$ (Z étant l'impédance de la charge électrique).

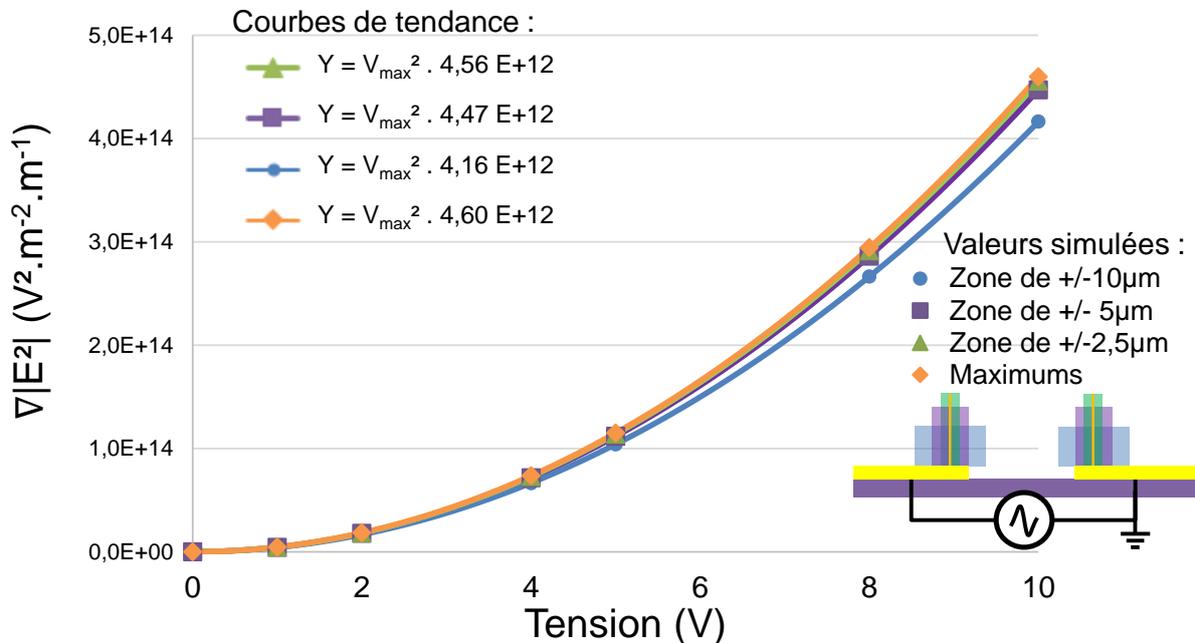


Figure.66 : Courbes présentant le lien entre le gradient du champ électrique et la tension. Nous y observons une tendance linéaire à V_{\max}^2 que cela soit pour les maximums de champ ou la moyenne des valeurs du gradient de champ dans les environs du maximum. En bas à droite sont représentées les électrodes et les zones autour des maximums de champ que nous avons considéré.

Jusqu'ici, nous nous étions limités à considérer les intensités de $\nabla|E^2|$ au travers des maximums de champ. Mais le champ ne se résume pas à un point unique, il est en effet plus judicieux de considérer une zone plus large autour des maximums de champ pour simplifier la forme de l'intensité du gradient de champ. Simplifier $\nabla|E^2|$ par une valeur constante sur une zone s'étendant à plus ou moins quelques micromètres d'un maximum de champ et une valeur nulle au-delà, permet d'obtenir une valeur représentative du potentiel de déviation du champ. La zone doit être supérieure à la distance d'accélération des cellules déviées si celle-ci est prise en compte. Comme nous le verrons au cours du chapitre 3 (III.1.2), cette distance est inférieure à 2 µm dans nos conditions expérimentales, nous chercherons donc à simplifier la forme du gradient de champ en considérant une zone rectangulaire d'au moins 5 µm centrée sur un maximum d'intensité de $\nabla|E^2|$.

Les maximums d'intensité sont situés de part et d'autre de l'espace inter-électrodes, par exemple à 20,3 µm de son centre pour le cas d'un écart de 30 µm ; soit à 5,3 µm du bord des électrodes au-dessus de celles-ci. En calculant autour de ce point la moyenne d'intensité de $\nabla|E^2|$ sur des zones plus ou moins larges nous observons là aussi une linéarité avec V^2 sur la Figure.66 pour laquelle ces zones ont été positionnées autour du maximum de champ (ligne orange) : zone verte : +/- 2,5 µm ; zone violette : +/- 5 µm ; zone bleue : +/- 10 µm.

Pour ce qui est des zones s'étendant sur +/- 2,5 µm et sur +/- 5 µm autour du maximum d'intensité, leur équation de courbe d'intensité de gradient de champ par rapport à la tension

du signal DEP inter-électrode présente des valeurs très proches avec celle basée sur le maximum d'intensité : respectivement 0,87% et 2,83% d'écart. Pour le cas d'une zone plus large à +/-10 μm du maximum, le pourcentage d'écart monte à 9,57%, rendant le maximum champ moins représentatif. Ainsi pour deux électrodes distantes de 30 μm , une zone de 10 μm de large à 0,3 μm du bord des électrodes de même valeur que l'intensité du maximum de champ peut être considérée. Il est à noter que les cellules déviées par le champ resteront ainsi au-dessus des électrodes et non entre les électrodes.

Tout comme en s'éloignant de la source du champ son intensité diminue, il faut remarquer qu'en écartant les électrodes l'une de l'autre, l'intensité du gradient diminue (Figure.67). La diminution de l'intensité du champ peut dans une certaine mesure être compensée par l'augmentation de la tension d'alimentation, nous nous limiterons tout de même à des écarts d'électrodes inférieurs à 50 μm pour limiter les contreparties de cette réduction d'intensité.

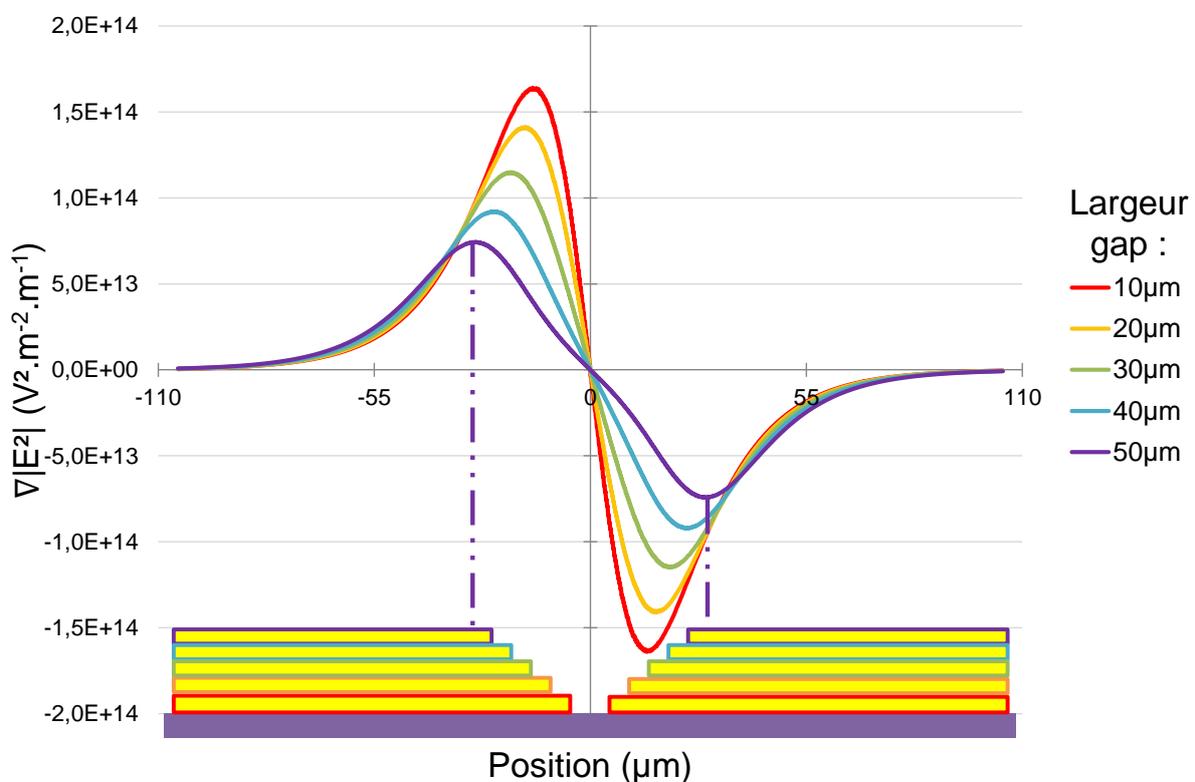


Figure.67 : Impact de la distance inter électrodes sur le gradient du champ au caré ($\nabla|E^2|$). Les électrodes sont représentées sur le bas en jaune encadrées par la couleur correspondant à la courbe liée. Les pointillées violet mettent en évidence la correspondance des pics du gradient par rapport aux électrodes. Tension inter électrodes : $5 V_{\text{max}}$; altitude d'observation au dessus des électrodes : 20 μm ; épaisseur d'électrodes : 2 μm .

La différence d'écartement entre les électrodes modifie aussi le profil de $\nabla|E^2|$. La position du maximum d'intensité est par exemple plus proche du bord des électrodes avec des écartements larges (Tableau.6). Autour de ces maximums d'intensité se trouve une zone « significative » du champ, dans le sens où cette zone est suffisante pour modéliser le champ s'il est considéré comme une barrière de déviation pour les cellules. Toutes les intensités comprises entre le maximum et 95% de sa valeur forment cette zone. Sur le Tableau.6, nous pouvons remarquer que la largeur de cette zone augmente légèrement pour

des écartements d'électrodes de plus en plus larges, mais ne varie plus pour des écartements supérieurs à 40 μm .

Tableau.6 : Position du maximum de champ et largeur de zone où les intensités sont à 5% de la valeur du maximum de gradient de champ.

Largeur gap (μm)	10	20	30	40	50
Ecart du maximum avec le bord des électrodes (μm)	9,8	6,4	5,3	4,8	4,2
Largeur de zone significative à 5% du maximum (μm)	7,0	7,4	8,2	8,5	8,5
Maximum d'intensité normalisé selon gap 10μm	1	0,86	0,70	0,56	0,45

Notre choix s'est porté sur l'implémentation d'un écart inter-électrodes de 30 μm afin d'avoir une largeur de zone significative presque optimale en limitant la réduction d'intensité maximale induite si un écartement plus large avait été considéré. En effet, utiliser un écart de 40 μm réduirait de 20% l'intensité du gradient de champ en n'apportant qu'une augmentation de largeur de la zone significative de 0,3 μm .

Il faut noter que la fréquence du signal n'a pas ou très peu d'impact sur la forme ou l'amplitude du gradient de champ à des fréquences de plusieurs centaines de MHz. Comme présenté précédemment, c'est la disposition et la géométrie des électrodes qui influencent la forme du champ électrique. Pour ce qui est de l'amplitude du gradient de champ, c'est essentiellement l'augmentation de la tension d'alimentation et la réduction de la distance inter-électrodes qui favorise de fortes intensités du gradient.

En revanche, la fréquence a un impact sur la transmission du signal le long des électrodes depuis les pointes RF jusqu'à la zone de tri. Ainsi, en augmentant la fréquence du signal électrique, celui-ci peut se propager moins efficacement au travers du système d'électrode à cause d'effets tels que les pertes électriques ou pertes de désadaptation. Ce phénomène de propagation rend donc l'intensité du champ présent entre les électrodes dépendant de la fréquence. Nous souhaitons utiliser des fréquences UHF ; il est par conséquent important de prendre en considération ce phénomène par rapport à un système basses fréquences, afin de favoriser une propagation optimale du signal et en limiter les pertes. Ces notions vont être à présent abordées dans la partie suivante.



II.4.2. Transmission du signal DEP jusqu'au canal microfluidique

Le signal DEP doit être transmis avec le moins d'atténuation possible jusqu'à la zone de tri. Or, avec la montée en fréquence, les phénomènes de désadaptation [33] ont des conséquences plus notables sur la transmission d'un signal électromagnétique et ne peuvent ainsi plus être considérés comme négligeables aux fréquences supérieures à 100 MHz. En effet une mauvaise adaptation entre le générateur de signal DEP et l'impédance de la ligne « guide d'onde » entraîne la réflexion d'une partie du signal avant que celui-ci n'arrive au niveau des électrodes du cytomètre. Cette désadaptation plus ou moins importante dépend de plusieurs paramètres dont les caractéristiques diélectriques du substrat et des métallisations et des capacités parasites (Figure.68) existantes inter-pistes. Elle entraîne des pertes de signal transmis le long de la ligne électrique en supplément des pertes métalliques et de celles liées au substrat, toutes deux dépendantes de la fréquence du signal utilisée.

Par les dimensions des guides d'ondes et leur géométrie, il est possible de limiter ces pertes électriques. Dans notre cas, des lignes dites CPW (CoPlanar Waveguide en anglais) apparaissent comme un moyen efficace pour transmettre le signal DEP jusqu'à la zone de tri avec des pertes limitées tout en restant compatible avec une implémentation d'électrodes coplanaires au fond du canal (Figure.68). Cette technologie est d'autant plus intéressante car elle nécessite un nombre faible d'étapes de fabrication et un accès facile à l'utilisation d'une pointe RF (sonde type Ground-Signal-Ground) pour amener le signal du générateur à la ligne CPW.

Une ligne CPW se caractérise par une ligne centrale qui propage le signal et deux lignes extérieures portées à la masse. Concernant la géométrie de la ligne, deux paramètres importants influencent l'impédance de la ligne : la distance inter-électrodes, notée g et la largeur de l'électrode centrale, notée w .

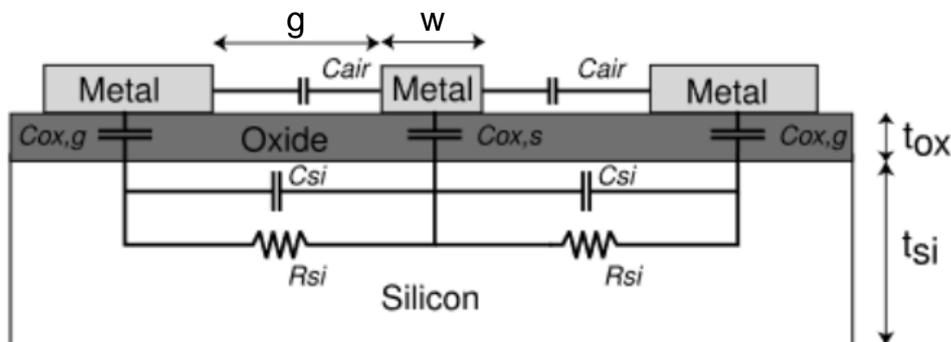


Figure.68 : Vue de coupe d'une ligne CPW. [34]

L'adaptation d'une ligne CPW dépend également de la nature du substrat et du milieu diélectrique se trouvant à proximité des électrodes constituant la ligne coplanaire [35]. Dans notre cas (Figure.69), le signal est amené via une pointe RF (Tronçon 1). Ainsi le premier tronçon de la ligne disposée sur le substrat sera entouré uniquement d'air de permittivité relative égale à 1 (Tronçon 2). Puis, la ligne CPW passera sous un milieu polymère constituant les murs des canaux microfluidiques qui présente une permittivité relative de 2,75 donc plus forte que celle de l'air (cf. § II.5.3) (Tronçon 3). Ce polymère sera recouvert d'un capot de PDMS épais présentant une permittivité de 2,75 également [36]–[38]. Au bout de la ligne se trouve notre système d'électrodes niveau du canal microfluidique qui est au contact d'un milieu aqueux dans lequel seront suspendues les cellules. La géométrie de ce tronçon

ayant été discuté précédemment (cf. § II.4.1), selon nos besoins pour générer un gradient de champ nécessaire à la déviation des cellules, il ne sera pas discuté ici.

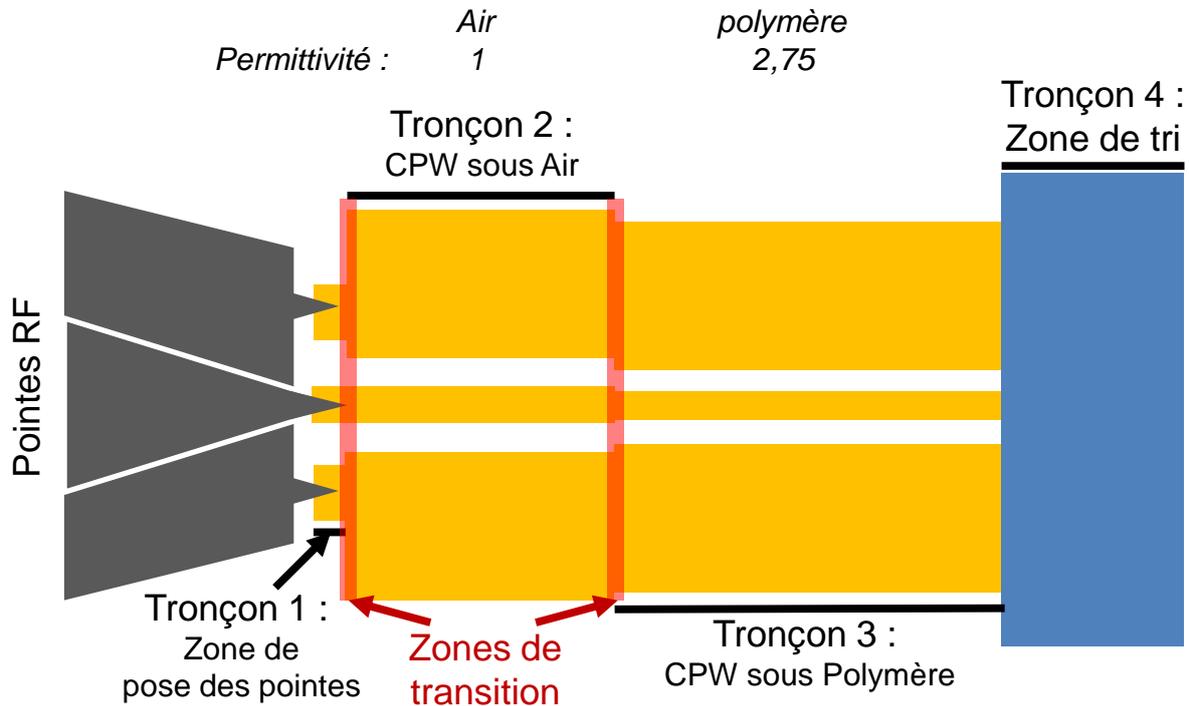


Figure.69 : Schéma de la ligne CPW et des milieux traversés depuis la zone de pose des pointes RF (tronçon 1) jusqu'à la zone de tri de cellules (tronçon 4).

Les simulations de pertes de la ligne CPW ont été réalisées avec le logiciel de simulation électromagnétique 3D @HFSS d'ANSYS. Les pertes sont évaluées dans les différents cas au travers des paramètres S de la ligne. Ces résultats de simulation sont en fait des rapports de puissance, exprimés en dB, entre les signaux respectivement réfléchis et transmis entre 2 ports et le signal de référence d'excitation de la ligne. Les ports concernés sont référencés par les numéros 1 et 2, le port 1 étant un premier port d'excitation et le port 2 un second port d'excitation disposé à l'autre extrémité de la ligne (Figure.70.A).

Ainsi, S_{12} et S_{21} représentent les coefficients de transmission et sont les images des pertes de propagation du signal partant d'un port et se propageant jusqu'à l'autre port (Figure.70.A flèches bleues). Ainsi dans l'idéal, il est important que ces deux coefficients de transmission soient les plus proches possible de 0 dB, signifiant qu'un maximum de puissance est bien transmis. Dans notre cas, notre système étant purement passif, avoir des coefficients S_{12} ou S_{21} positifs n'est pas possible car cela représenterait une amplification de la puissance du signal injecté. Des pertes les plus proches possibles de 0 dB pour des fréquences inférieures à 1 GHz sont recherchées pour recevoir le plus de puissance du signal DEP possible.

Dans le cas de S_{11} et de S_{22} , ils représentent les coefficients de réflexion du signal partant d'un port et retournant à ce même port, respectivement le port 1 et le port 2 (Figure.70.A flèches vertes). Ainsi à la différence de S_{12} et S_{21} , S_{11} et S_{22} doivent être les plus faibles possibles pour limiter la quantité de puissance réfléchi et donc ne s'étant propagée le long de la ligne jusqu'à l'autre port. Des réflexions de puissance du signal DEP les plus faibles possible pour des fréquences inférieures à 1 GHz sont recherchées.

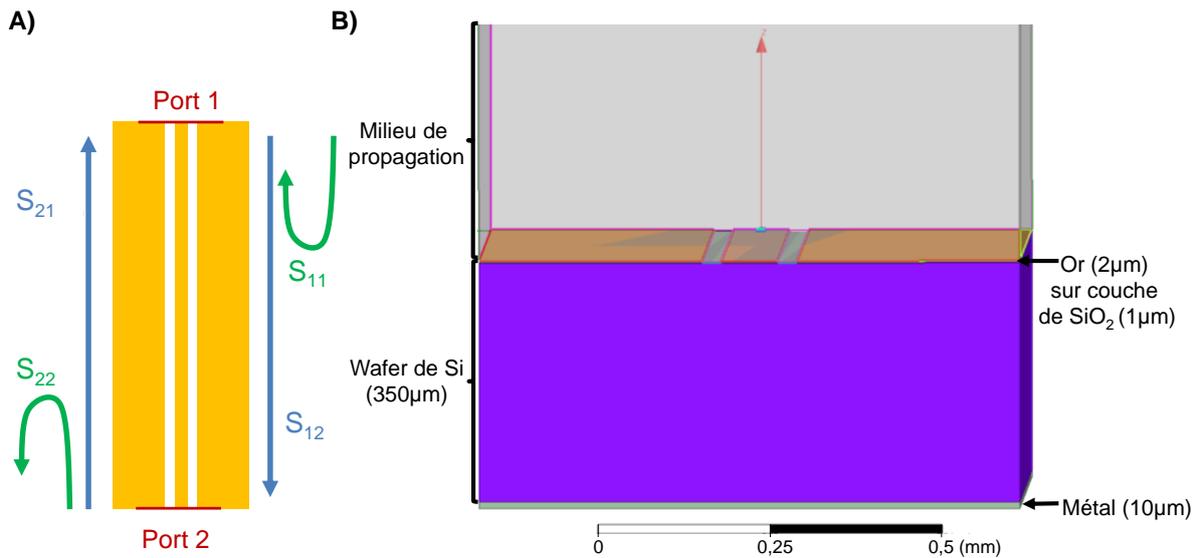


Figure.70 : A) : Représentation des coefficients S_{11} , S_{22} , S_{12} et S_{21} sur un port CPW pris entre 2 ports.
 B) Coupe transversale (plan YZ) du modèle de simulation sous HFSS. Ligne CPW de 10 mm.

Le modèle utilisé pour les simulations ainsi que les différentes épaisseurs des couches sont résumés dans Figure.70.B. Les différents prototypes réalisés au cours de cette thèse ont été implémentés sur des wafers de silicium de 350 μm haute résistivité ($>1000 \text{ Ohm/cm}$) recouverts d'une fine couche d'oxyde d'environ 1 μm . Les lignes métalliques réalisées sur ces wafers sont en or de 2 μm d'épaisseur (cf. § II.5.3). Lors des manipulations, la puce est toujours posée sur un support de platine de positionnement d'échantillons du microscope qui est représenté par la couche de métal sous le wafer dans la Figure.70.B. La ligne simulée fait 10 mm de long ce qui est supérieur à la longueur totale de la plus longue ligne réalisée d'un facteur 5 dans l'objectif d'exacerber par simulation les potentiels effets de désadaptation.

Ce modèle, au niveau de la géométrie, comprend 2 paramètres permettant d'optimiser la transmission du signal. En effet, comme nous l'avons dit, deux dimensions sont primordiales à considérer : l'espacement entre les électrodes (g) et la largeur de la ligne centrale (w). La largeur des lignes externes de masse est fixée à 325 μm .

Le premier tronçon en début de ligne (Figure.69.1/) afin d'être compatible avec la géométrie de la pointe RF présente les dimensions suivantes : $g = 35 \mu\text{m}$ et $w = 120 \mu\text{m}$. Les dimensions recherchées de la ligne CPW sous l'air (Figure.69.2/) à la suite de ce premier tronçon doit avoir des dimensions proches pour éviter une variation trop brusque de l'espacement inter-électrodes et de la largeur de la ligne centrale sur la surface de transition entre les deux zones, car cela entrainerait des pertes supplémentaires. Les dimensions de ligne trouvées pour le second tronçon respectant cette contrainte et offrant une adaptation optimale sont les suivantes : $g = 24 \mu\text{m}$ et $w = 120 \mu\text{m}$.

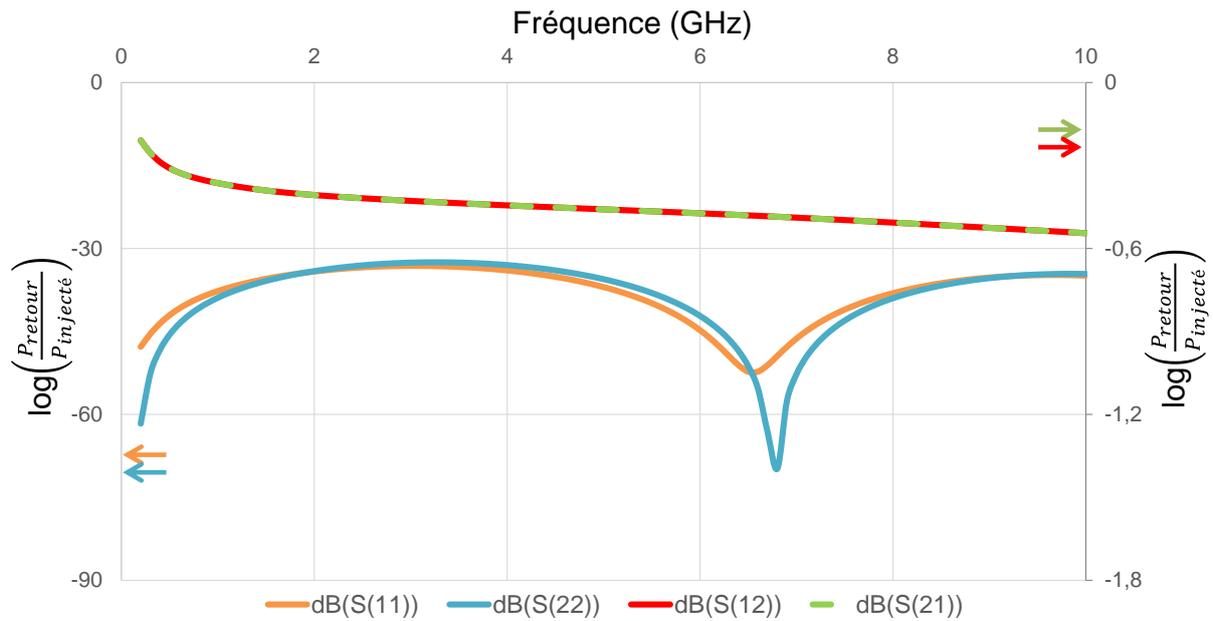


Figure.71 : Résultat de simulation avec HFSS. CPW recouverte d'air, $g= 24 \mu\text{m}$ et $w= 120 \mu\text{m}$.

Les résultats présentés Figure.71 répondent à nos attentes avec les coefficients de réflexion maximums autour de -32,5 dB. Ce qui signifie que pour 1W injecté dans un des deux ports, il y aura au maximum 0,562 mW qui reviendra à ce même port à quelques GHz. Pour ce qui est des coefficients de transmission minimums simulés entre 200 MHz et 1 GHz, ils sont inférieurs à -0,37 dB. Ceci représente des pertes de l'ordre de 8,2%. Rappelons que cette valeur est largement surestimée puisque calculée pour une longueur de ligne au moins 5 fois supérieure à la longueur réelle sur la puce.

Pour ce qui concerne la simulation du tronçon de la ligne CPW disposée sous les parois du canal, les propriétés du milieu polymère ou le PDMS considéré présentent une permittivité relative de 2,75 et une conductivité de $0,01 \mu\text{S}\cdot\text{m}^{-1}$. Sous ce milieu, les dimensions optimales ont été trouvées pour : $g = 30 \mu\text{m}$ et $w = 84 \mu\text{m}$. Là encore une transition courte et douce est à privilégier entre les deux tronçons au voisinage du passage entre l'air et le polymère, mais aussi pour le passage entre le polymère et le milieu aqueux vu que l'espacement inter-électrode dans cette dernière zone est aussi de $30 \mu\text{m}$.

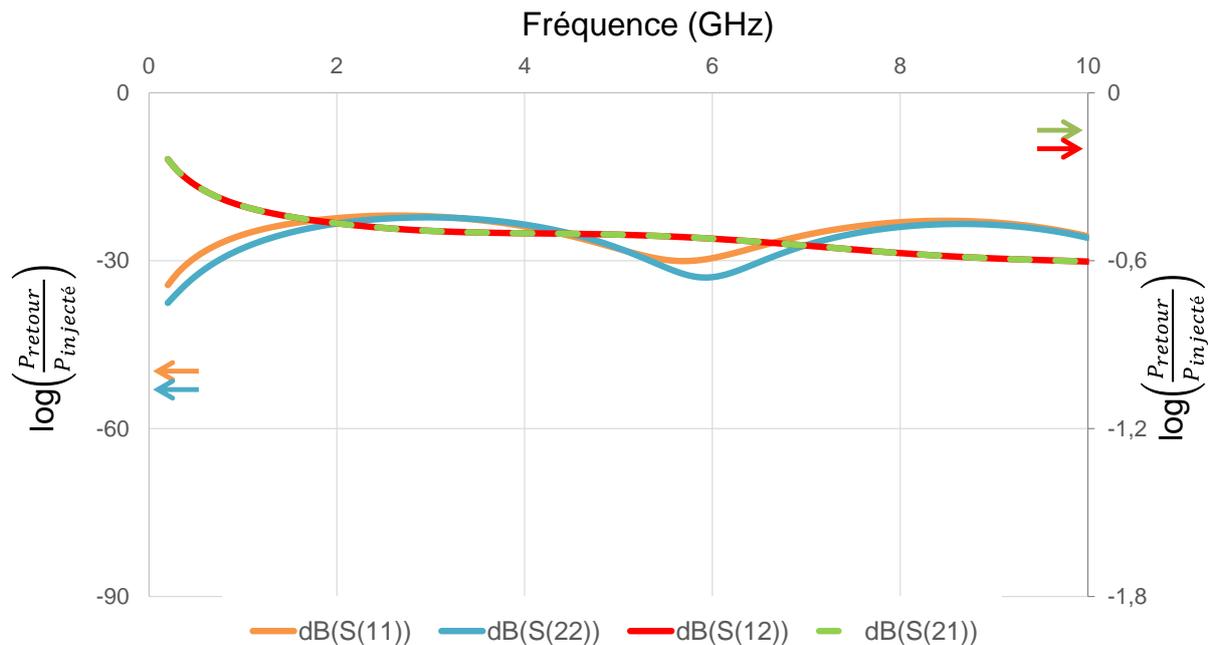


Figure.72 : Résultat de simulation avec HFSS. CPW sous un milieu de permittivité 2,75, $g = 30 \mu\text{m}$ et $w = 84 \mu\text{m}$.

Les résultats présentés Figure.72 répondent là encore à nos attentes. Les paramètres de réflexion, en dessous de 1 GHz, qui est notre maximum de plage fréquentiel, le rapport de puissance en réflexion est inférieur à -27,8 dB et donc acceptable à nos besoins. Pour ce qui est des paramètres de transmission, la puissance perdue minimale simulée entre 200 MHz et 1 GHz est supérieure à -0,40 dB. Ceci représente des pertes de l'ordre de 8,8%, ce qui est similaire aux 8,2% de perte obtenues avec l'air.

Pour résumer, nous avons tout d'abord vu l'importance de limiter la hauteur du canal afin de limiter la possibilité que les cellules ne soient pas soumises à une différence d'intensité de champ trop grande. Cette limitation de la hauteur du canal limite par la même occasion l'épaisseur possible des électrodes afin d'éviter l'entrave des cellules circulant dans le canal.

En observant le gradient du champ en fonction des dimensions des électrodes, nous pouvons conclure que leur épaisseur n'est pas un paramètre critique, car cela n'impacte pas la forme du champ, mais uniquement et légèrement l'intensité de celui-ci. Au contraire, l'écartement entre les électrodes a une forte influence sur le champ. Un écart inter-électrodes large réduit l'intensité du champ, mais dans une certaine limite élargi le pic d'intensité du gradient. Une chute d'intensité pouvant être compensée par la tension appliquée, nous avons par conséquent privilégié un écart inter-électrodes de $30 \mu\text{m}$ qui offre un compromis l'intensité du champ et la largeur de la zone où le champ est fortement présent.

Enfin nous avons optimisé différentes dimensions de la ligne CPW (sous un milieu d'air et un milieu de polymère) afin de trouver les dimensions les plus appropriées permettant de limiter les pertes de transmission du signal DEP jusqu'à la zone de tri immergée sous l'eau.

II.5. Conception d'un premier système de tri à partir des fréquences de transition

Dans cette dernière partie de ce chapitre, nous allons voir le principe et le fonctionnement du système de tri que nous avons mis au point dans le cadre de cette thèse.

Nous allons voir quelles sont les trajectoires attendues et leur lien avec le bilan des forces que nous avons établi précédemment. Puis nous présenterons l'implémentation d'un premier système de tri microfluidique sur puce et sa réalisation en salle blanche.

Enfin nous concluons cette partie et ce chapitre par les premiers résultats expérimentaux obtenus au travers de l'observation des trajectoires de cellules issues d'une même culture mais dont la population présente une forte hétérogénéité. Ceci permettra de mettre en avant l'effet de la fréquence du signal DEP utilisé pour le tri et comment utiliser cette fréquence pour ajuster les proportions de cellules séparées et constituer des sous-populations.

II.5.1. Utilisation de la fréquence de transition comme critère de séparation

Nous avons montré au cours du chapitre II que nous pouvons caractériser les fréquences f_{x02} de transition des cellules, et que, les cellules souches cancéreuses d'un type cellulaire présentaient des fréquences de transition plus faibles que les cellules différenciées moins immatures (cf. § I.3.3). De plus, au début du chapitre II (cf. § II.2.3.1), nous avons vu que f_{x02} était indicateur de différence de propriétés diélectriques entre les cellules. Ainsi, nous pouvons utiliser une méthode de déviation basée sur la différence de direction de la force DEP [39]–[42], qui est très souvent utilisée pour des systèmes de tri par diélectrophorèse. En effet, en appliquant un signal à une fréquence donnée, une partie des cellules à trier réagit au champ en pDEP et sont collectées dans une première sortie. Une seconde partie des cellules réagit en nDEP et ces cellules sont collectées dans une seconde sortie. Pour cela, il faudra que la fréquence du signal DEP (f_{signal}) soit respectivement, supérieure ou inférieure à leur fréquence de transition (Figure.73). Dans la littérature, des systèmes utilisant cette approche de tri ont réussi à présenter un taux de réussite lors de la séparation des cellules cibles du reste de l'échantillon.

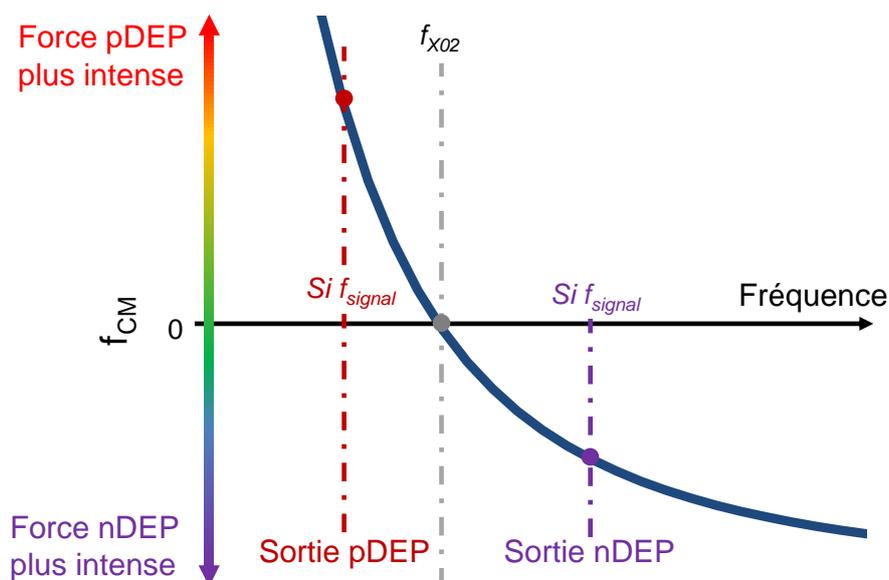


Figure.73 : Utilisation de f_{signal} pour guider une cellule soit par effet attractif pDEP, soit par effet répulsif nDEP.

La Figure.74 présente un exemple de système avec une implémentation d'électrode très intéressante pour réaliser cette séparation entre cellules en nDEP et pDEP [40]. Les cellules

sont injectées dans la zone de tri, de 330 μm de large pour une hauteur de 30 μm de large, à partir d'un canal d'entrée de la puce à gauche avec un débit de 0,1 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$. Ce canal d'entrée est entre deux autres canaux qui servent à la focalisation hydrodynamique du flux de cellules. En effet les deux entrées latérales dites « buffer » permettent d'injecter uniquement du milieu liquide sans cellule en suspension. Leur débit est de 0,4 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$, et elles permettent ainsi de focaliser les cellules arrivant par le canal central dans la zone souhaitée. Une fois focalisées, elles sont poussées par le flux circulant dans le canal principal de la puce vers les électrodes de déviation. En circulant au-dessus de ces électrodes, les cellules peuvent suivre trois trajectoires possibles, du fait des forces DEP et de trainée, et être dirigées vers l'une des deux sorties disposées à droite de la zone de tri en fonction des forces de trainée et force DEP qui s'exercent sur elles:

- Si une cellule est soumise à une force pDEP (Type I Figure.74) : attirée par le champ, la cellule est d'abord guidée le long des électrodes en dessous de l'axe milieu du canal principal (représenté par la ligne pointillée) avant d'être amenée au-dessus de cette ligne en suivant la courbure prise par les électrodes. Sa course se termine ainsi dans la sortie du haut.
- Si une cellule est soumise à une force nDEP (Type II Figure.74) : repoussée par le champ, la cellule est d'abord guidée le long des électrodes en dessous de l'axe central avant de quitter la zone d'influence du champ et poursuivre sa trajectoire poussée par le flux uniquement. Sa course se termine donc dans la sortie du bas.
- Enfin, si une cellule est soumise à une force DEP trop faible qu'elle soit répulsive ou attractive (Type III Figure.74) : trop peu affectée par le champ pour être suffisamment déviée de sa course, la cellule poursuit tout droit sa route jusqu'à la sortie du bas sous la seule influence du flux.

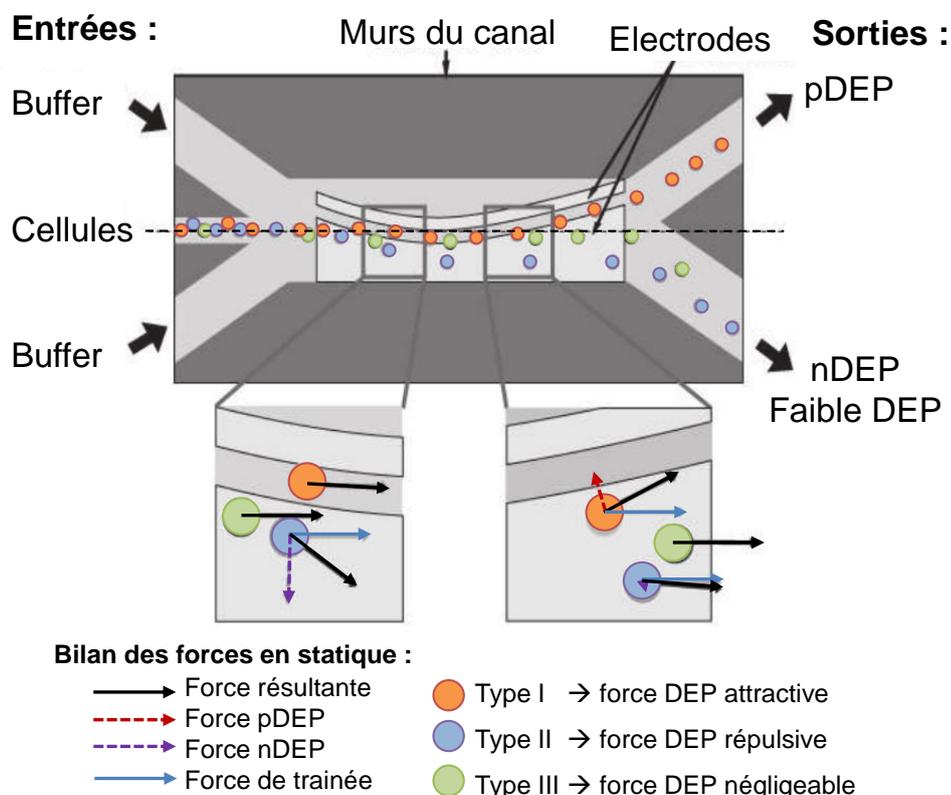


Figure.74 : Schéma d'un système séparant les cellules attirées le long des électrodes des autres cellules (repoussées ou n'interagissant pas ou trop peu avec le champ). Un focus hydrodynamique est d'abord réalisé avant la zone de tri. Deux sorties distinctes collectent les cellules ainsi séparées. [40]

Dans leur preuve de concept, H. S. Moon *et al.* [40] réalisent un tri entre des billes de polystyrène de 2 μm et des bactéries du même ordre de grandeur de taille. Les électrodes sont polarisées avec un signal DEP de 10 Vpp et de fréquence 1 MHz. À la fin de leurs expériences, ils réussissent à collecter sur la sortie du haut les bactéries réagissant en pDEP avec un taux de pureté de 95% +/- 5% et les billes sur l'autre sortie avec une efficacité de séparation similaire à la collecte de bactéries. Ce système présente néanmoins un taux de survie durant le tri de l'ordre de 90% +/- 5% sans doute en partie liées à l'adhésion des bactéries en pDEP sur les électrodes. Soumises à un champ attractif intense, les bactéries, mais aussi les cellules, se déplacent lentement et au contact des électrodes, ce qui fait que, affectées trop longtemps par le champ, elles finissent par s'accrocher et adhérer aux électrodes. Pour réduire l'occurrence de ce phénomène qui entraîne potentiellement la défaillance du système, le signal est coupé toutes les 200 ms pour une durée similaire afin de libérer les cellules commençant à adhérer.

Dans ces travaux, le tri ne sélectionne que les cellules réagissant en pDEP et récolte dans la seconde sortie les cellules réagissant en nDEP et celles réagissant peu ou pas au champ. Et pourtant, la collection des cellules peu affectées par le champ peut se révéler très intéressante, car ces cellules sont entre autre des cellules dont leur fréquence de transition est proche de f_{signal} . Ainsi, en choisissant f_{signal} par rapport à la fréquence de transition d'un type de cellule voulu, nous pouvons les isoler facilement des cellules réagissant en nDEP et en pDEP en ajoutant une sortie spécifique pour les collecter.

Cette sortie pourrait par exemple rassembler toutes les cellules de deux populations différentes dont leur f_{x02} est proche (Figure.75) et donc difficilement différenciables, laissant ainsi les sorties collectant les cellules réagissant en nDEP et les cellules réagissant en pDEP avec uniquement une seule des populations ciblées et non pas un mélange. Pour l'exemple de situation de la Figure.75, la fréquence du signal DEP considérée ici se situe à 110 MHz, là où des fréquences f_{x02} des deux populations à séparer sont identiques (Figure.75.A). Dans cette condition, une majorité de la population B (orange) réagit en DEP positive, là où une majorité de la population A (bleue) réagit en DEP négative. Toutes les cellules des deux populations dont leur f_{x02} est proche de f_{signal} (zone verte) réagissent peu au champ et pourront être écartées du fait de leur différence de comportement par rapport à toutes les autres cellules.

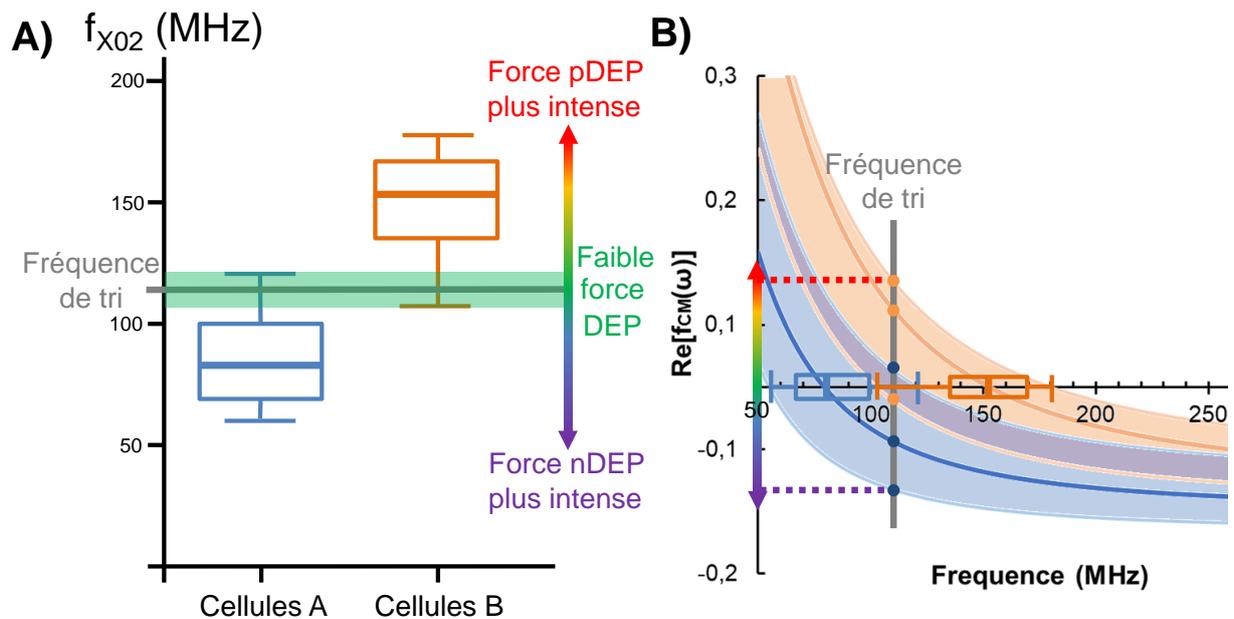


Figure.75 : A) Exemples de signatures DEP (f_{X02}) de deux populations de cellules. B) Lien entre ces signatures avec des valeurs de f_{CM} possibles.

La Figure.75.B trace des valeurs de f_{CM} possibles à partir des signatures des populations. Ces valeurs ne peuvent être déduites des signatures f_{X02} mais la tendance de la force DEP à laquelle est soumise une cellule reste la suivante pour une fréquence de signal DEP donnée :

- $f_{X02} \approx f_{\text{signal}}$ (ou proche): La force DEP n'affecte que peu la cellule
- $f_{X02} > f_{\text{signal}}$: La force DEP attire la cellule
- $f_{X02} < f_{\text{signal}}$: La force DEP repousse la cellule

Nous ne connaissons ainsi pas l'intensité exacte de la force DEP, mais nous pouvons nous attendre à ces trois comportements ce qui nous permettra de séparer les cellules et les guider dans trois sorties différentes.

II.5.2. Implémentation d'un premier système de tri

Nous utiliserons donc ce principe pour notre premier prototype : choisir une fréquence appropriée et repousser les cellules réagissant en nDEP jusqu'à une première sortie, et ramener les cellules en pDEP jusqu'à une deuxième sortie. Enfin les cellules réagissant trop peu au champ traverseront celui-ci jusqu'à une troisième sortie en suivant une trajectoire rectiligne. Le tri étant basé sur la direction de la force, l'influence de la taille est minime par rapport au signe du facteur f_{CM} , nous permettant ainsi de trier principalement selon les caractéristiques diélectriques de la cellule comme souhaité.

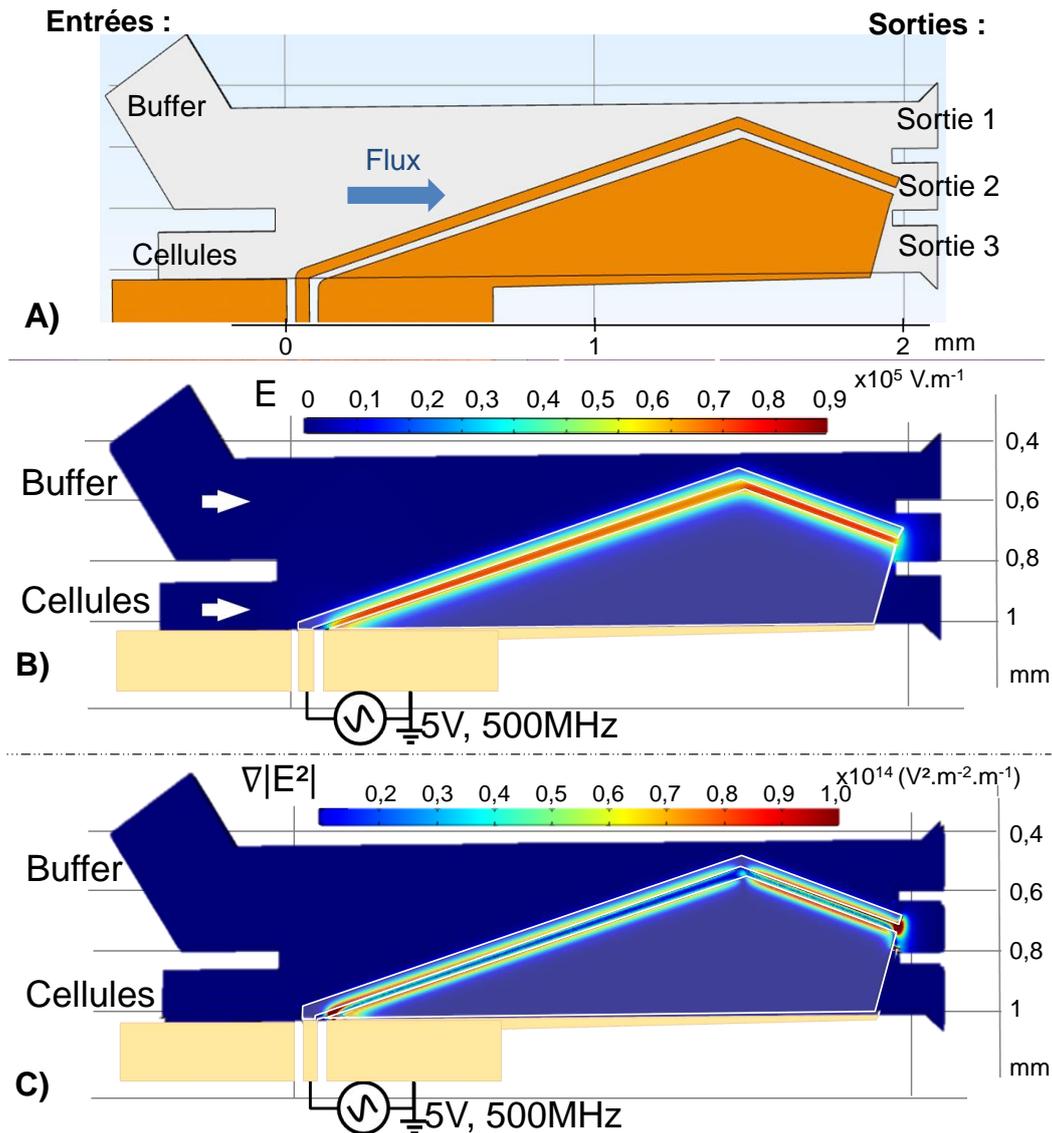


Figure.76 : Détail de la zone de tri : A) Modèle de simulation ; B) Simulation du champ électrique à $15 \mu\text{m}$ d'altitude généré par une tension de 10 Vpp entre les électrodes de $2 \mu\text{m}$ d'épaisseur ; C) Simulation de $|\nabla|E^2|$ dans les mêmes conditions. Les traits blancs mettent en évidence la position des électrodes.

La zone de tri que nous avons conçue est présentée dans la Figure.76. Pour ce premier prototype, nous cherchons essentiellement à valider le potentiel du concept et donc reprenons une forme très similaire aux travaux de Moon, la différence principale en plus de l'ajout d'une troisième sortie est que nous avons nos électrodes qui sont droites plutôt qu'arquées. Cette disposition permet à ce que les cellules déviées le long des électrodes soient soumises à des forces DEP avec une direction constante (sa direction est toujours perpendiculaire à la tangente de l'écartement inter-électrodes).

Deux entrées sont disposées, sur la modélisation (Figure.76.A), sur la gauche, celle du bas pour injecter la suspension de cellules dans le canal, la seconde pour réaliser une focalisation avec uniquement le milieu de suspension. Cette focalisation implique que sans application de champ, toutes les cellules prennent la direction de la sortie 1.

Sur cette même figure, les électrodes sont en orange/doré. En bas à droite est visible la fin de la ligne CPW permettant d'amener le signal depuis les pointes RF jusqu'à la zone de tri. Seules deux des trois électrodes continuent dans la zone de tri et sont immergées. Comme présenté précédemment dans la partie II.3, la simulation du champ électrique ((Figure.76.B) montre qu'il est le plus intense entre les électrodes et plus particulièrement près de leur bords. Ainsi, le gradient du champ ((Figure.76.C) est le plus intense de part et d'autre de l'espace inter-électrodes.

Les électrodes parallèles entre elles de 2 μm d'épaisseur, présentent une forme avec deux angles différents par rapport au sens de circulation du flux dans le canal. Le premier de 20° permettant de guider toutes les cellules vers le haut du canal. Le second de -20° permet de ramener les cellules réagissant en pDEP vers le centre du canal et ainsi être guidées jusqu'à la sortie 2. Les cellules déviées en nDEP restent dans la partie haute du canal et sont guidées vers la sortie 3. Une puce similaire est réalisée avec cette fois des angles de 10° et -15° . Cette seconde puce par ses angles plus faibles devrait permettre de dévier plus facilement l'ensemble des cellules que la première puce, cependant pour les dévier de leurs trajectoires sur la même largeur de canal, la puce présentant des angles d'électrodes plus faible possède une zone de tri de 3500 μm , ce qui est bien plus long que la première puce qui a une zone de tri de 1900 μm de long.

Du fait de la forme droite des électrodes face à la forme arquée du système présenté Figure.74, il sera plus aisé à partir du bilan des forces présenté dans II.4 de donner des critères de déviation pour chaque sortie. Ceci sera plus amplement détaillé durant le chapitre III. Pour l'instant, il faut retenir que lors d'une déviation le long de l'espace inter-électrodes, les forces interagissant sur une cellule sont équilibrées entre elles. Ce lien entre ces deux forces fait que, pour une cellule qui était déviée dans une condition donnée, si la vitesse du flux est augmentée, afin que la cellule soit de nouveau déviée de sa trajectoire, la puissance du signal DEP doit aussi être augmentée.

Ces équilibres de forces, devraient entrainer suivant les caractéristiques diélectriques des cellules, les trajectoires présentées Figure.77. Par la gauche arrive un mélange de cellules, certaines réagissant peu au champ (vertes), d'autres repoussées par le champ suffisamment pour être déviées par celui-ci (bleues) et enfin des cellules suffisamment attirées par le champ pour être déviées par celui-ci (oranges).

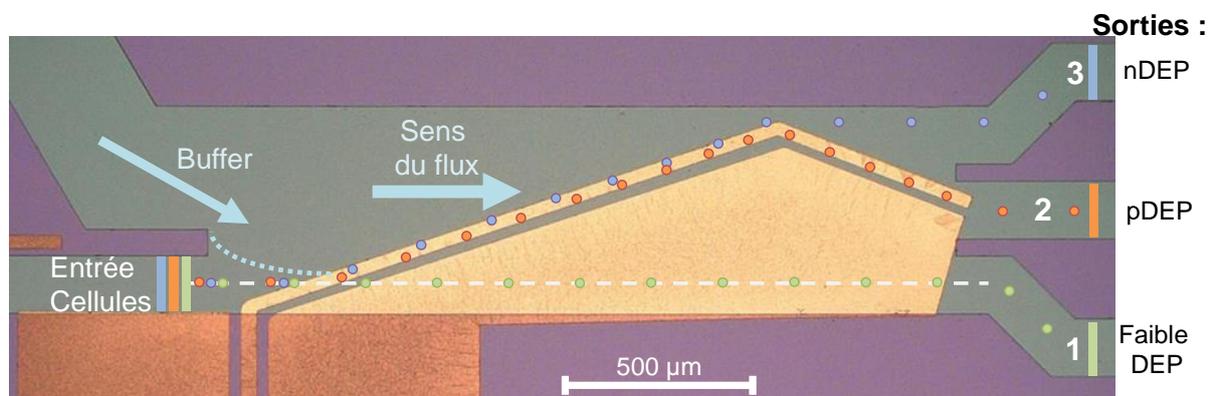


Figure.77 : Photographie d'une puce ; angles de 20° et -20° . La ligne en pointillé blanche représente la trajectoire des cellules sans effet de champ électrique.

Les cellules réagissant faiblement au champ (vertes) sont guidées uniquement par le flux vers la sortie 1 en suivant une trajectoire rectiligne. C'est l'effet de pincement d'un flux buffer,



légèrement plus rapide que le flux des cellules, qui permet de focaliser celles-ci vers la sortie 1 et pas une autre. Les cellules réagissant en nDEP et pDEP sont déviées de cette première trajectoire. Elles ont aussi une trajectoire rectiligne le long de la première pente, avant l'espace inter-électrodes, mais tournée d'un certain angle par rapport au sens du flux. À la fin de cette première pente, l'angle des électrodes change. Par ce changement, les cellules réagissant en nDEP (bleues) sont trop loin du champ pour être encore affectées par ce dernier et reprennent une trajectoire rectiligne dans le sens du flux pour être collectées dans la sortie 3. Au contraire, les cellules réagissant en pDEP restent proche de l'espace inter-électrodes continuant la trajectoire le long de la seconde pente et jusqu'à la sortie 2. Maintenant que la zone de tri a été décrite, nous allons maintenant nous intéresser à la puce de façon plus générale.

La Figure.78 présente la photographie générale de notre microsystème présentant sur la gauche les zones d'injection du milieu buffer et des cellules en suspension et sur la droite les trois canaux de sortie rassemblés en un unique réservoir de sortie afin de simplifier les conditions de réglages fluidiques : une seule contre-pression à gérer au lieu de trois. L'objectif dans un premier temps ici est juste d'observer que les trajectoires prises par les cellules sont bien conformes à nos attentes. Au centre encadré en blanc se trouve la zone de tri avec en dessous en orangé la ligne CPW reliant les électrodes de tri immergées dans le canal à la zone de pose des pointes RF en bord de puce.

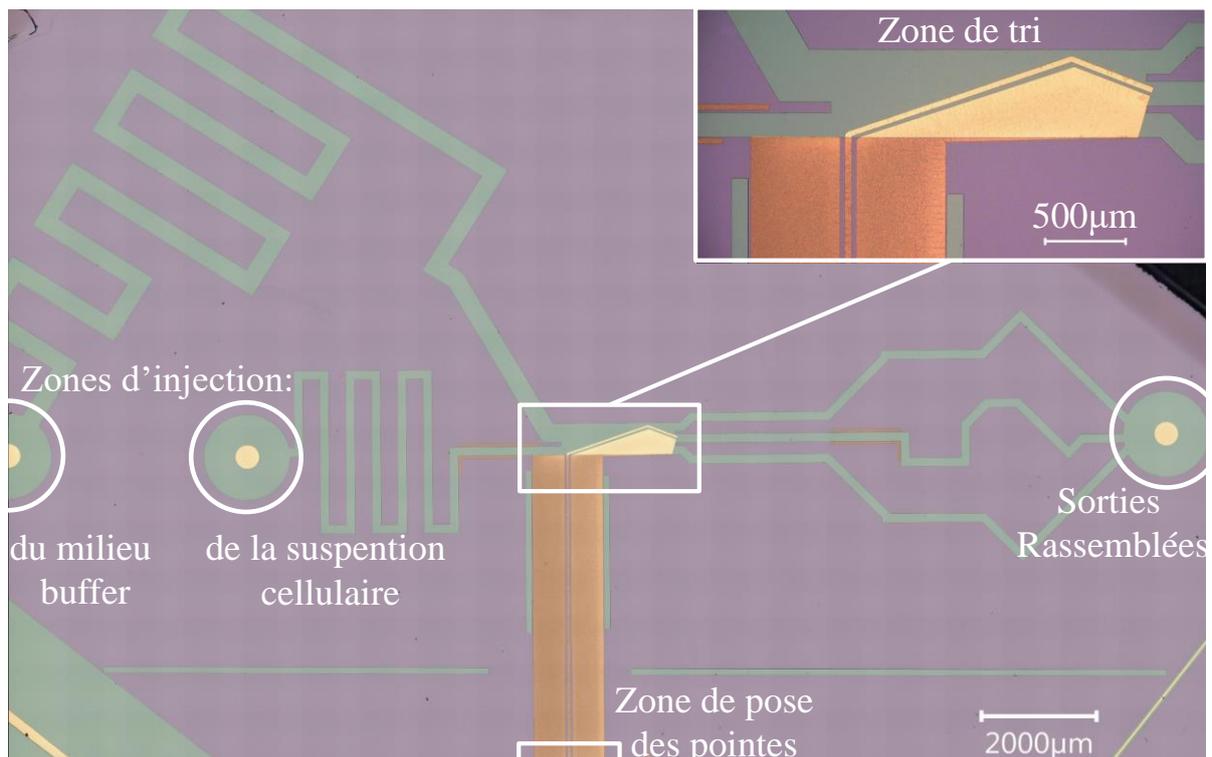


Figure.78 : Vue d'ensemble de la puce microfluidique avec à gauche les entrées, au centre la zone de tri et à droite les trois sorties rassemblées dans un seul réservoir pour une simplification fluidique. [43]

Les canaux microfluidiques partent de réservoirs (cerclés en blanc), où des capillaires en PTFE (Polytétrafluoroéthylène) amenant les liquides jusqu'à la puce seront connectés. Ces canaux sont disposés en méandres afin de présenter une plus grande longueur sur une

surface réduite et ainsi posséder une plus grande résistance fluidique (R_{fluid}) par rapport à des canaux en lignes droites.

Ceci a deux objectifs. Le premier est de donner aux entrées une plus grande R_{fluid} que celle des canaux de sortie dans l'objectif de faciliter le sens de circulation allant de chaque entrée vers les sorties, plutôt qu'un reflux pouvant se produire d'une entrée à l'autre. La seconde raison est que pour une même variation de pression, une forte R_{fluid} entraîne un changement plus faible de vitesse qu'avec une faible R_{fluid} , car la pression découle de la vitesse du flux multipliée par la résistance fluidique [44]. Ceci apporte une réduction des perturbations potentielles liées à de petites variations non contrôlées ou non régulées de la pression, mais aussi à plus de finesse de réglage permettant de trouver une vitesse fluidique adaptée à la manipulation.

Les longueurs effectives des deux canaux d'entrée sont telles que leur résistance fluidique est similaire malgré leur différence de largeur. Ainsi, à une pression égale, les débits effectifs dans chacun seront proches. Pour dimensionner les canaux, leur résistance fluidique a été évaluée à partir de la formule ci-dessous valide pour des canaux de section rectangulaire [45] :

$$R_{\text{fluid}} = \frac{12\mu \cdot L}{w \cdot h^3} \quad (15)$$

L , w et h étant respectivement la longueur, la largeur et la hauteur du canal. Nous voyons bien pour des canaux à section rectangulaire qu'au travers du facteur L/w , qu'ajuster la longueur du canal permet de rester à résistance fluidique constante entre deux canaux de largeur différente.

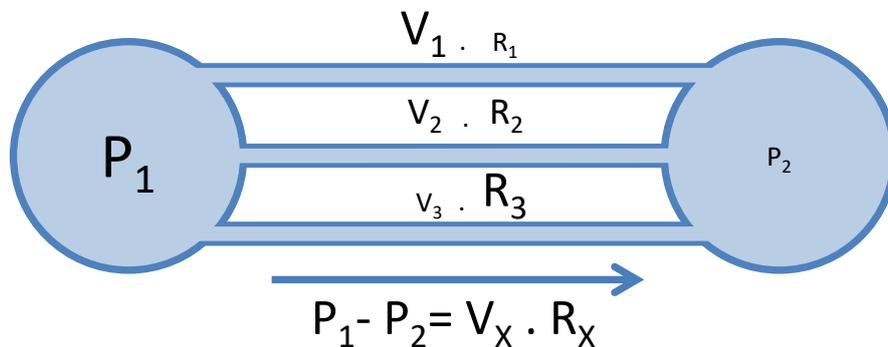


Figure.79 : Variation de vitesse dans un canal selon sa résistance microfluidique pour une différence de pression donnée. P : pression ; V : vitesse ; R : résistance fluidique. La taille de police des variables est liée à leur intensité : $P_1 > P_2$; $R_3 > R_2 > R_1$ donc $V_3 < V_2 < V_1$.

A la différence des canaux en entrée, les canaux de sorties sont courts afin de limiter leur résistance fluidique que nous avons souhaité maintenir faible face à celles des entrées. Leur longueur a tout de même été ajustée afin de faire en sorte que leurs R_{fluid} soient identiques. En effet, en cas de déséquilibre de résistance entre ces trois canaux, cela pourrait induire des vitesses de circulation des cellules différentes entre ceux-ci (Figure.79). Cette différence de vitesse entraînerait des perturbations au niveau de la zone de tri par un effet d'aspiration vers la sortie à la R_{fluid} la plus faible et au contraire une potentielle obstruction d'une sortie avec une R_{fluid} trop grande vis-à-vis des deux autres sorties.

II.5.3. Fabrication de premiers prototypes

Pour fabriquer les puces microfluidiques, nous les avons réalisées en deux parties séparées. Pour la première, les électrodes sont définies par photolithographie sur un substrat de silicium de 2 pouces permettant de fabriquer simultanément 6 puces qui sont ensuite découpées. Pour la seconde partie, un polymère silicone de polydiméthylsiloxane (PDMS) dans lequel les motifs des canaux sont moulés, permet de définir le réseau microfluidique, sous la forme d'un « capot ». Cette pièce de PDMS est reportée sur la plaque de silicium, et maintenue par un système de pressage mécanique, formant ainsi des canaux microfluidiques clos au-dessus des électrodes. Ce packaging réversible, permet de retirer le capot de PDMS pour optimiser le nettoyage de la puce et allonger sa durée d'utilisation.

Dans cette partie, nous allons décrire le procédé de fabrication de ces deux éléments.

Les électrodes de déviation ainsi que leur ligne CPW de connexion sont réalisées sur un wafer de silicium (Si) haute résistivité de 380 μm d'épaisseur recouvert d'une couche d'oxyde thermique de 1 μm (Figure.80.A). Le faible dopage du wafer est ici nécessaire afin de limiter l'atténuation du signal DEP le long des électrodes et maximiser le champ électrique dans le canal microfluidique. Pour former la métallisation des motifs, un multicouche de deux matériaux est évaporé au canon à électron dans une enceinte sous vide (Figure.80.B) :

- Titane (Ti) : 15 nm permettant une meilleure accroche de la couche suivante.
- Cuivre (Cu) : 130 nm constituant la base nécessaire pour une croissance par électrolyse des électrodes.
- Titane (Ti) : 15 nm constituant une protection contre l'oxydation du cuivre et une couche d'adhérence pour la résine de photolithographie.

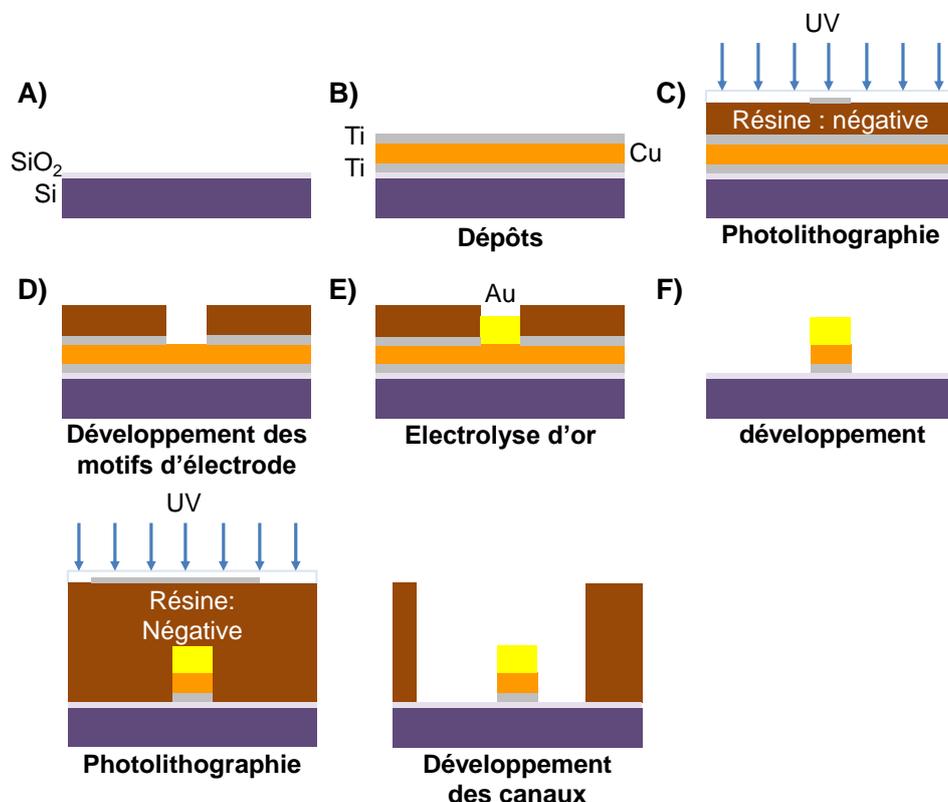


Figure.80 : Schéma des différentes étapes de la fabrication de la puce microfluidique depuis A) le Wafer à nu, à F) la puce avec les motifs d'électrodes réalisées.

À la suite de ce dépôt, une étape de photolithographie UV est réalisée (Figure.80.C et Figure.80.D) afin de définir la forme (motifs négatifs) des électrodes dans une résine de 5 μm d'épaisseur (MEGAPOSIT™ SPR220). La résine utilisée étant négative, seules les zones non exposées aux UV seront dissoutes lors de la phase de développement (Figure.80.D). À la suite de ce développement, la couche supérieure de titane non couverte de résine qui protégeait le cuivre de l'oxydation est retirée dans un bain d'acide fluorhydrique à 5%, pour accéder à la surface de cuivre. Ce dernier est maintenu immergé dans de l'eau jusqu'à la prochaine étape afin d'éviter la formation d'une couche d'oxyde de cuivre au contact de l'air.

Maintenant que les surfaces de cuivre des électrodes sont accessibles et délimitées par une résine, une croissance par électrolyse d'or (Figure.80.E) est réalisée pour former des motifs de 2 μm d'épaisseur. Plongé dans une solution d'auro cyanure, le wafer est connecté à la borne négative d'un générateur de tension continue, la borne positive étant reliée à l'anode de type grille de titane platiné. Ainsi la croissance d'or sur la surface de cuivre est réalisée par application d'une tension continue, en ajustant le courant délivré par le générateur et ainsi contrôler la vitesse de croissance et les effets de rugosité. En effet, si celui-ci est trop grand la croissance d'or sera rapide, mais rugueuse. Au contraire, un courant faible, entraîne une croissance plus lente mais plus uniforme. La solution d'électrolyse est maintenue à 55 °C avec une agitation douce réalisée au moyen d'un agitateur magnétique. Une fois que la croissance d'or atteint les 2 μm visés, le wafer est sorti de la solution, le moule de résine est supprimé et les surfaces métalliques protégées par la résine ayant servies de « seed layer » sont gravés chimiquement sans avoir de recours à de la photolithographie, l'or n'étant pas sensible aux solutions utilisées pour dissoudre le titane et le cuivre (Figure.80.F).

Pour fabriquer les canaux microfluidiques de nos puces, un moule inversé est réalisé au moyen d'une résine époxy de 50 μm d'épaisseur (SU8) défini par lithographie (Figure.81.A et Figure.81.B). Ainsi là où un canal devrait prendre forme, une section de résine est présente et au contraire, aux endroits où des parois seront nécessaires, la résine sera dissoute. Ce moule est ensuite recouvert de PDMS (Sylgard 184) sous forme liquide (Figure.81.C) qui a été au préalable dégazé en le plaçant dans une enceinte à vide facilitant l'élimination des bulles d'air pouvant se trouver emprisonnées dans le PDMS. Une fois le cycle de réticulation achevé après avoir passé 2 heures dans un four à 75 °C, les tampons de PDMS sont démoulés (Figure.81.D).

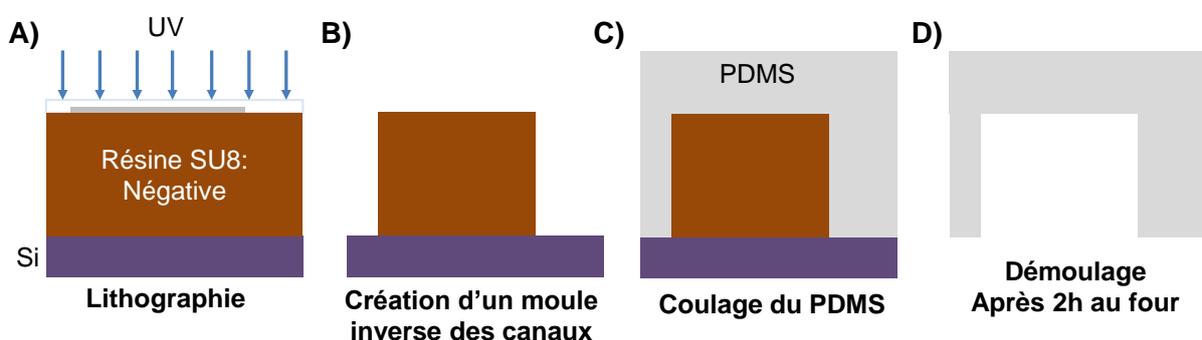


Figure.81 : Schéma des différentes étapes de la fabrication du capot de PDMS avec les motifs de canaux microfluidiques imprimés.

Généralement, la dernière étape de fabrication consiste à coller la base de la puce au capot de PDMS à la suite d'un traitement plasma d'oxygène des deux parties. Cependant, dans le cadre de nos expériences et notamment afin de permettre un nettoyage plus aisé de la puce

microfluidique, nous avons privilégié une approche différente. En effet, afin d'assurer l'étanchéité entre ces deux parties et éviter toute fuite, un système de pression mécanique a été utilisé (Figure.82). Ce dernier est équipé d'une fenêtre d'observation qui permet de maintenir une pression équi-répartie sur la majorité de la surface du tampon et tout de même connecter des capillaires dans le PDMS pour amener les liquides jusque dans la puce.

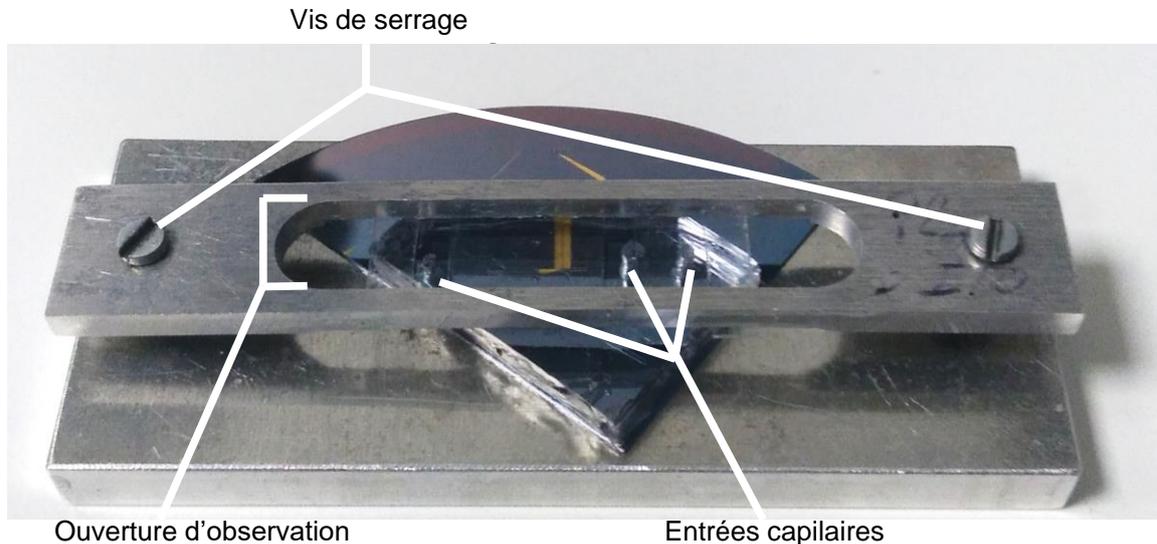


Figure.82 : Système de pressage permettant de maintenir en contact étanche le PDMS et la puce.

II.5.4. Validation Expérimentale

Au travers de cette dernière partie du chapitre II, nous allons présenter les premiers résultats expérimentaux obtenus au cours de nos travaux dans l'objectif de réaliser un trieur de cellules basé sur leurs caractéristiques diélectriques. Le critère de sélection des cellules utilisé par notre système de tri pour représenter les caractéristiques diélectriques de chaque cellule est leur fréquence de transition f_{x02} . Nous verrons tout d'abord que nous avons bien pu observer les trajectoires attendues, et en lien avec le bilan des forces établi, lorsque des cellules entrent en interaction avec le champ généré par les électrodes de nos premiers prototypes. Nous verrons également que des populations de cellules peuvent effectivement être triées avec ces dispositifs en fonction de différentes fréquences de signaux DEP appliqués aux électrodes.

II.5.4.1. Validation des trajectoires de déviation

Lors de l'utilisation de nos micro dispositifs, le flux de la suspension cellulaire à trier dans les canaux de la puce est imposé par la balance entre les pressions imposées aux entrées et celle à la sortie grâce à l'utilisation d'un contrôleur de pression OBI1 d'ElveFlow. Ce dernier permet d'imposer une pression pouvant aller de 0 à 200 mbar par pas de 0,01 mbar indépendamment entre chacune des entrées et sorties microfluidique de la puce et permettant d'ajuster la vitesse de déplacement des cellules dans la zone de tri. Des vitesses inférieures à 10 mm.s^{-1} ont été utilisées durant nos manipulations permettant de pouvoir observer aisément le déplacement des cellules à l'œil, sans avoir recours à une caméra rapide, nous permettant d'avoir un suivi simple et un post traitement efficace des cellules au travers d'enregistrements vidéo. En effet, à 10 mm.s^{-1} , une cellule met 200 ms à traverser la zone de tri (2 mm de longueur) en ligne droite, soit uniquement 6 images de cette cellule peuvent être enregistrées avec une fréquence d'enregistrement de trente images par

seconde. C'est pourquoi nous verrons plus tard que nous avons eu recours à des vitesses de flux plus faibles par moment afin de mieux suivre les trajectoires.

Pour ces premiers tests, nous avons polarisé les électrodes de la puce avec un signal DEP de fréquence supérieure à 300 MHz et une puissance injectée supérieure à 25 dBm (soit environ 5,6 Vpp en considérant une impédance de 50 Ω). La fréquence est choisie pour que les cellules réagissent toutes en nDEP et donc loin de la dernière fréquence de transition mesurée de la population triée. L'amplitude du signal DEP est ensuite augmentée progressivement jusqu'à trouver une condition où les cellules sont toutes déviées par le champ jusqu'à la sortie 3 de la zone de tri. Une fois ces conditions établies, la fréquence du signal peut être ajustée.

Les différentes trajectoires attendues des cellules, présentée Figure.77, se retrouvent bien expérimentalement (Figure.83). Sur cette figure une superposition de photos prises toutes les 33 millisecondes durant 4 secondes nous permettent d'observer sept cellules et de deviner la trajectoire qu'elles ont suivi. Une a réagi en DEP positive, 2 en DEP négative et les 4 dernières sur le bas de l'image ont traversé le champ électrique généré entre les électrodes sans être suffisamment influencées par celui-ci maintenant leur trajectoire originelle en se dirigeant vers la sortie 1 du système (zone verte).

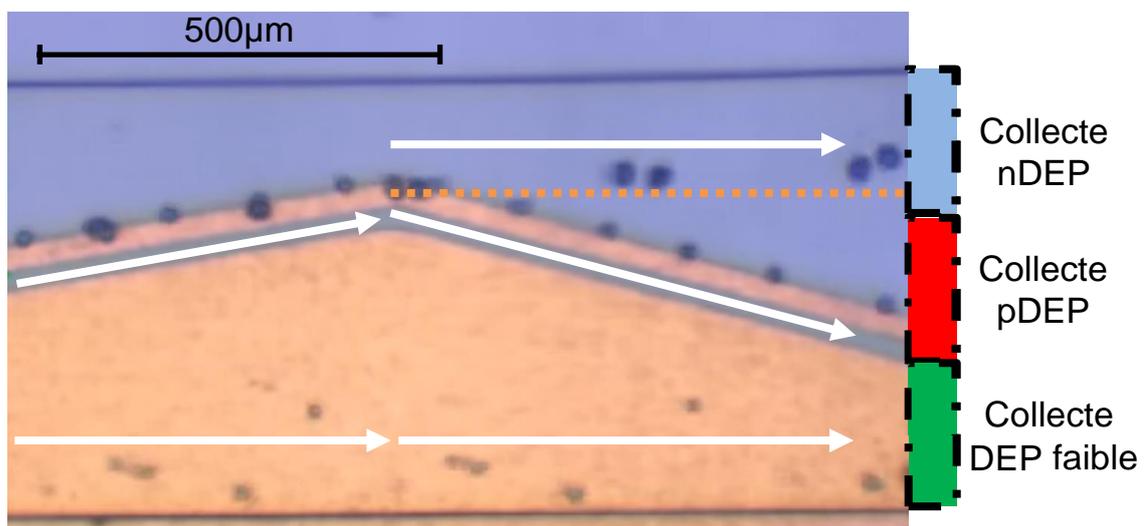


Figure.83 : Superposition d'images de déviations de cellules réalisées à partir d'un signal DEP de fréquence 50 MHz sur des cellules de lignée U87-MG. À cette fréquence, les cellules peuvent prendre trois trajectoires possibles dans le système du fait de leurs caractéristiques diélectriques intracellulaires propres. La ligne en pointillé orange représente la ligne de « décrochement », au-dessus de laquelle les cellules en nDEP sont relâchées. Vitesse du flux de l'ordre de $6,4 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$, puissance en entrée de 27,5 dBm.

Sur le sommet de l'image, deux trajectoires différentes des trois cellules distinctes sont visibles. Sur la première pente (partie gauche), présentée par les électrodes, inclinées de 10° par rapport à la direction du flux de cellules (de gauche à droite) les deux cellules suivent une trajectoire de même forme que les électrodes, déviées le long l'espace inter-électrodes et nous ne distinguons que peu de différence de trajectoire car elles suivent un chemin parallèle écarté de quelques micromètres uniquement. C'est au niveau du changement d'angle des électrodes que nous pouvons voir que l'une des trois cellules présente une brusque modification de trajectoire en continuant à suivre par effet d'attraction au champ l'inclinaison de l'électrode fine, passée à -15° par rapport au flux, et vient terminer sa course dans la sortie 2 (zone rouge).

Au contraire, les deux autres cellules, soumises elles à un phénomène de nDEP, continuent leur course tout droit jusqu'à la sortie 3 (zone bleue). En effet, au moment du changement d'angle des électrodes, les cellules, jusque-là repoussées par le champ, arrivent dans une zone où le champ devient de moins en moins intense, et ne sont à présent plus influencées par une intensité de champ électrique suffisante pour agir sur leur trajectoire. Elles prennent alors une nouvelle trajectoire qui à présent n'est imposée que par le flux uniquement.

Ainsi, ces trois trajectoires attendues ont été observées à plusieurs reprises à des vitesses, des tensions et des fréquences variées. Nous avons pu voir qu'à une puissance de signal DEP donnée l'augmentation ou la diminution de la vitesse du flux la proportion de cellules à traverser le champ augmente ou diminue. Ceci montre l'importance de la vitesse de flux dans le tri, ce qui était attendu au travers de l'influence de la force de trainée dans le bilan des forces. L'influence de la gravité, elle, est difficilement observable ayant une vue de dessus du système. Aucune rotation des cellules sur elles-mêmes n'est observée, ce qui confirme la possibilité de négliger la force de Magnus. Pour ce qui est des autres forces non considérées, leur influence n'a pas été constatée. Nous pouvons également noter que les cellules restent au-dessus de la fine électrode, ceci est tout à fait en accord avec les profils des gradients de champ que nous avons montré lors de la partie II.4.1 car les cellules qui dépassent la zone de maximum de gradient ne sont pas déviées par le champ électrique. Au contraire, les cellules déviées sont plus ou moins proches de cette zone de maximum au-dessus de l'électrode fine sans jamais la dépasser.

La puce présentant les angles de 10° et -15° est celle où les conditions pour attirer les cellules jusqu'à la sortie 2 se sont avérées les plus faciles. En revanche, du fait du grandissement utilisé pour le microscope, afin de pouvoir distinguer les cellules, nous ne pouvons pas voir les entrées et les sorties simultanément, à la différence de l'autre puce, dont la zone de tri est plus courte.

Comme nous l'avons évoqué durant la partie I.3.1, l'intensité de force de DEP dépend également de la taille des cellules exposées au champ électrique. Nous avons également réalisé des expériences à partir de plus petites cellules de la lignée cellulaire LN18 de diamètres moyens de l'ordre de $7 \mu\text{m}$ (Figure.84). Dans les mêmes conditions expérimentales que pour les cellules U87-MG, qui présentent des diamètres moyens de l'ordre de $17 \mu\text{m}$, nous pourrions s'attendre à les voir toutes sortir dans la sortie 1 du système, sans avoir été suffisamment impactées par le champ quelle que soit la fréquence du signal DEP choisi. Mais en adaptant la vitesse du fluide et l'amplitude du signal appliqué aux électrodes, nous avons pu observer qu'il est tout à fait possible de réaliser des conditions de manipulations similaires (Figure.84).

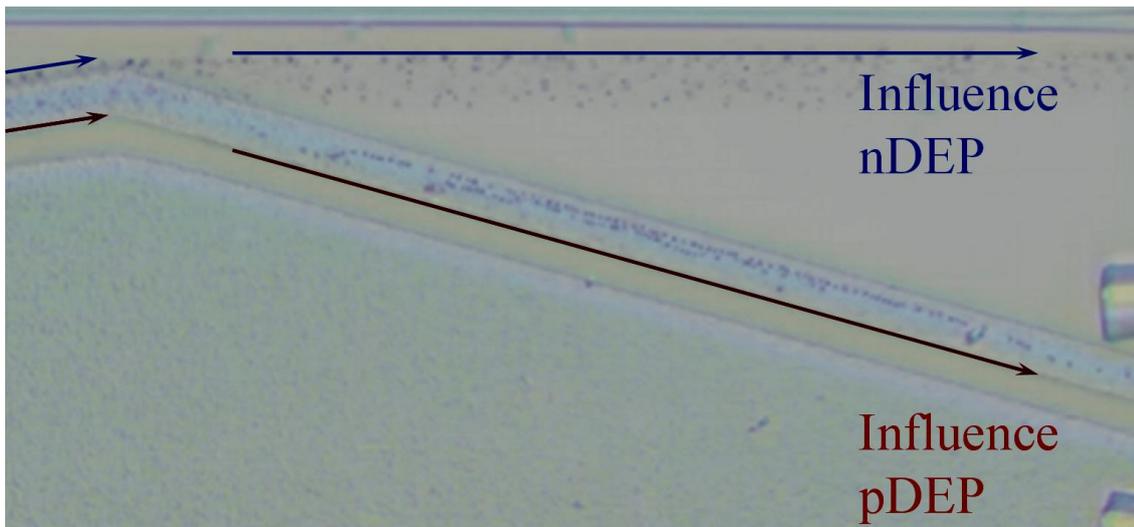


Figure.84 : Superposition d'images de déviations avec des cellules de lignée LN18 réagissant en nDEP et en pDEP simultanément. Fréquence du signal à 65 MHz. Vitesse du flux de l'ordre de 3 mm.s⁻¹, puissance en entrée de 33 dBm.

II.5.4.2. Ajustement de la fréquence sur le tri pour séparer un échantillon de cellules

Maintenant que le principe de fonctionnement du système est validé, nous nous intéressons à présent à comment utiliser la fréquence du signal DEP appliqué aux électrodes pour séparer des cellules aux propriétés diélectriques intracellulaires différentes.

Sur la Figure.85, les conditions fluidiques utilisées ici sont particulières. En effet, le focus fluide n'est pas réalisé volontairement par rapport à ce que nous avons vu précédemment dans l'objectif de guider les cellules naturellement vers la sortie 1 (ici la plus à gauche). Ceci a permis de favoriser l'arrivée de nombreuses cellules par unité de temps sans imposer une grande vitesse de flux au niveau du buffer pour assurer le pincement du flux de cellules. En conséquence, en l'absence de champ électrique, les cellules prennent majoritairement la direction de la sortie centrale. En revanche, durant le tri dans cette configuration la trajectoire pour les cellules en pDEP n'est pas observable.

Pour une population de cellules U87-MG présentant une forte disparité dans les fréquences f_{x02} (car provenant ici d'un prélèvement de patient et donc non clonale), nous pouvons observer qu'il est possible de la fractionner en deux sous populations avec des proportions de cellules potentiellement différentes selon la fréquence du signal DEP choisie (Figure.85). Ainsi, pour une vitesse de cellules de 7 mm.s⁻¹, si nous polarisons le système avec un signal de tri de fréquence 200 MHz pour une puissance de 30 dBm, toutes les cellules sont déviées en nDEP jusqu'à la sortie 3 (la plus à droite) car cette fréquence est supérieure à toutes les fréquences de transition de la population. La cellule observée au niveau de la sortie 2 n'est qu'un débris cellulaire ayant adhéré lors d'une manipulation précédente.

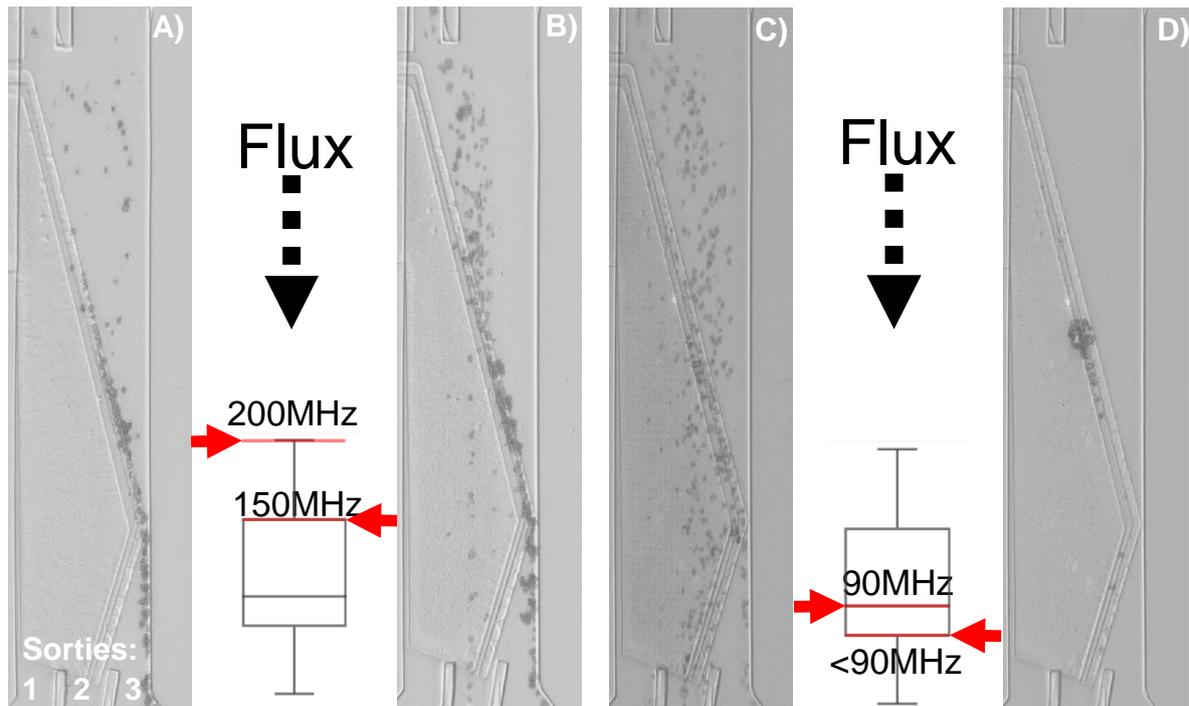


Figure.85 : Superpositions d'images montrant l'influence de la fréquence du signal DEP appliquée au système en présence d'une population de cellules de type U87-NG. Entre les photos, les lignes et les flèches rouges représentent la fréquence de tri utilisée par rapport à la signature DEP établie au préalable pour cette population.

En diminuant la fréquence du signal DEP à 150 MHz, une partie de la population subie à présent des phénomènes de pDEP, mais elle reste encore faible. En revanche, cette fréquence devient très proche de la f_{x02} d'un nombre non négligeable de cellules ; f_{signal} se situant au niveau de la frontière entre le 1^{er} et le 2nd quartile du box plot des f_{x02} . Pour ces dernières, l'intensité de la force DEP (F_{DEP}) faiblit. Nous pouvons donc observer que certaines cellules réagissent alors peu au champ, arrivent à le traverser pour prendre la sortie 2 alors qu'une très large majorité continue à être déviées jusqu'à la sortie 3 et cela alors que les conditions fluidiques et électriques n'ont pas changé autrement que par la fréquence.

Lorsque la fréquence de tri est choisie pour correspondre à la médiane des signatures f_{x02} de la population (Figure.85.C), un nombre bien plus important de cellules ne réagit plus au champ électrique, diminuant fortement le nombre de cellules collectées sur la sortie 3.

Enfin, en appliquant une fréquence de tri relativement basse par rapport à la signature f_{x02} de la population, comme dans l'exemple de la Figure.85.D prise à la frontière entre le 3^{ème} et 4^{ème} quartile du box, nous observons de plus en plus de cellules réagissent en pDEP avec certaines une plus forte intensité. En conséquence, fortement attirées par le champ, de nombreuses cellules finissent par s'agglomérer progressivement et adhérer sur les électrodes, formant des amas immobiles entraînant un dysfonctionnement du système. Dans la littérature [39], [46] pour limiter ce phénomène d'adhérence le signal électrique est souvent adapté en ajoutant un cycle durant lequel le signal DEP est coupé pendant quelques millisecondes et à une fréquence de quelques Hertz afin de relâcher les cellules sous l'effet du flux et cela avant qu'elles n'adhèrent trop aux électrodes.

Dans notre cas, la désactivation du champ, même sur un temps réduit induit des problèmes de fonctionnement du tri. La Figure.86 présente le cas d'une cellule soumise à une

interaction pDEP insuffisante pour une déviation correcte jusqu'à la sortie centrale (cadre rouge). Nous pouvons observer que la cellule dans un premier temps reste au-dessus de la première électrode à la suite du changement d'angle pour se diriger vers la sortie 2. Ainsi dans sa trajectoire la cellule est attirée vers le milieu du canal. Une cellule repoussée par le champ aurait suivi une trajectoire rectiligne dans le sens du flux, et serait restée au-dessus de la ligne pointillée orange (cf. Figure.83). Or ici la cellule passe d'abord en dessous de ce trait pointillé avant de s'écarter des électrodes et terminer dans la sortie 3 (zone bleue Figure.86). En principe, ce type de trajectoire ne peut être suivi que par des cellules soumises à des forces d'attraction. Et c'est très probablement à cause d'une force d'attraction trop faible, ou d'un arrêt du champ électrique que la cellule ne poursuit pas sa course jusqu'à la sortie prévue (sortie centrale). Ainsi, nous voyons qu'il ne semble pas approprié d'utiliser un cycle de fonctionnement par alternance du champ pour éviter les phénomènes d'agglomération des cellules attirées par le champ.

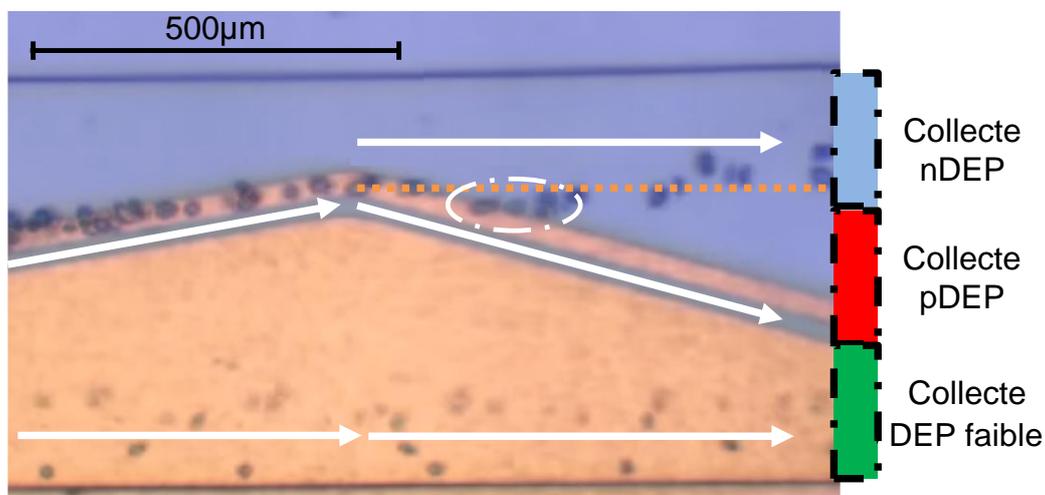


Figure.86 : Superposition d'images d'une déviation à 70 MHz sur des cellules de type U87. Nous observons que les cellules sur le haut de l'image subissent une attraction car elles passent sous la ligne pointillée de « décrochage », mais la force pDEP est insuffisante pour guider les cellules jusqu'à la sortie centrale. Vitesse de l'ordre de 8 mm.s^{-1} , puissance en entrée de 29,87 dBm.

Au travers de ces différentes expériences, nous avons pu valider le principe de tri que nous avons imaginé. En effet, nous avons pu montrer qu'une séparation entre cellules qui possèderaient des caractéristiques diélectriques intracellulaires différentes est possible en mettant à profit l'obtention de déviations individualisées de trajectoires selon trois types de trajectoires possibles. En mettant en œuvre une caractérisation préalable des cellules ciblées, basée sur la mesure de leur fréquence de transition f_{X02} , nous avons montré qu'il est possible de cibler plus facilement les fréquences de signal DEP à appliquer aux électrodes du microsystème durant le tri afin de séparer une première sous-population de cellules d'une seconde par effet de répulsion. Un troisième type de trajectoire peut également être mis à profit permettant d'isoler l'ensemble des cellules ne réagissant pas ou trop peu au champ électrique. Ceci peut permettre de séparer une troisième sous population frontière aux deux autres avec les cellules dont la fréquence de transition se situe proche de celle du signal DEP utilisé. Cette approche peut en particulier permettre d'isoler des types cellulaires particuliers en ciblant spécifiquement des valeurs de f_{X02} .

En revanche, nous avons pu voir que la manipulation des cellules en mode attraction peut devenir rapidement très complexe voire problématique. En effet, un équilibre doit être trouvé pour éviter une adhérence aux électrodes des cellules réagissant en forte attraction. Lors de

nos expériences préliminaires, nous avons également pu observer que les cellules en faible attraction peuvent aussi être déviées vers la sortie à l'opposé que leurs propriétés diélectriques seraient sensées leur faire prendre (celle dédiée aux cellules en répulsion). Cela peut être lié aux angles choisis qui peuvent être trop brusques pour certaines cellules ne pouvant ainsi pas suivre le changement de trajectoire. Dans leurs travaux, Moon *et al* n'indiquent rien en rapport à ces cellules en attraction qui ne peuvent être guidées dans la sortie correspondante. Soit celles-ci sont la conséquence des 5% de cellules mal triées, soit la forme en arc permet d'optimiser la déviation. Pour un meilleur suivi de ce changement d'angle de trajectoire, une zone de transition est nécessaire afin de rendre le changement d'angle moins brusque.

II.6. Conclusion

Au cours de ce chapitre nous avons présenté comment modéliser des cellules pour prendre en compte leurs caractéristiques diélectriques membranaires et intracellulaires. Nous avons pu voir que le modèle homogène de la cellule est celui qui apparait comme étant le plus simple et tout à fait adapté aux caractérisations de fréquence de transition haute f_{X02} et manipulations par diélectrophorèse aux fréquences UHF. Nous avons mis en évidence que cette caractérisation des cellules bien que partielle pour les discriminer pleinement est un véritable indicateur de leurs différences diélectriques.

Nous avons également passé en revue les principales forces auxquelles peuvent être soumises des cellules lors de leur traversée d'un canal microfluidique. Nous avons vu que face à la force DEP seules les forces de gravité et de traînée présentent des intensités d'ordre de grandeur similaire. Nous en avons conclu que pour modéliser de manière fidèle et prédire le comportement de cellules entrant sous l'influence d'un champ électrique, la prise en compte uniquement de ces trois forces peut suffire. Ce bilan des forces met tout de suite en avant que pour avoir un tri dans un flux rapide afin d'augmenter le nombre de cellules triées dans un temps donné nécessite un champ lui aussi fort. Au cours du chapitre III il sera établi à partir de ce bilan quelles sont les conditions qui permettront ou pas à une cellule d'être déviée par le champ nous amenant à définir une nouvelle géométrie pour un second système de tri.

Nous avons également présenté comment générer un champ électrique adapté pour électromanipuler sélectivement une suspension de cellules à partir de leur caractéristiques diélectriques propres ; cela en fonction de la géométrie et la disposition des électrodes par rapport au flux qui fait circuler les cellules dans les canaux microfluidique. L'intensité des forces de déviation DEP mises en jeu étant proportionnelle au gradient $\nabla|E^2|$ du champ généré par ces électrodes, nous avons étudié quels profils de gradient nous seraient les plus favorables et identifier les zones où ce gradient est le plus intense notamment au-dessus des électrodes à quelques micromètres de l'espace inter-électrodes.

Enfin pour conclure ce chapitre, nous avons souhaité évaluer expérimentalement une implémentation d'une géométrie d'électrodes afin de valider la possibilité de trier des cellules sur la base de leurs différences de fréquence de transition haute f_{X02} . Cette géométrie a pu être éprouvée au travers la réalisation et plusieurs tests de premiers prototypes de puces DEP-UHF microfluidiques avec différentes suspensions de cellules de lignées U87-MG et LN18. Lors de ces tests, nous avons pu observer la déviation de cellules sous l'effet de signaux DEP en gamme UHF et leurs différentes trajectoires se sont révélées conformes à celles que nous attendions ; validant le principe de fonctionnement du micro dispositif de tri. En revanche, nous avons pu nous apercevoir d'un certain nombre de limites de fonctionnement et notamment de l'apparition de problématiques de formation d'amas de cellules et d'adhérence sur les électrodes lors de la mise en jeu de forces pDEP trop intenses. En effet à cause de forces d'attractions trop conséquentes, les cellules se retrouvant bloquées par le champ s'agglutinent et induisent rapidement la défaillance du système lorsqu'elles deviennent trop nombreuses

Au cours de quelques exemples d'expériences que nous avons pu réaliser, nous avons montré que la géométrie d'électrodes proposée semble appropriée afin de séparer des cellules quelle que soit leur taille. Il suffit pour cela d'adapter les paramètres fluidiques et électriques pour trouver conditions de tri optimales. En revanche, pour des cellules de tailles similaires, nous avons pu observer qu'il est possible d'adapter la fréquence du signal DEP



appliquée aux électrodes de tri afin de modifier quelle sortie emprunte les cellules. En utilisant les signatures des f_{x02} des populations, cela nous permet d'utiliser la fréquence de tri pour cibler des cellules et les guider dans la sortie voulue. Ceci nous permet aussi de mettre en évidence la prédominance du facteur de Clausius-Mossotti (f_{CM}) pour notre concept de trieur cellulaire démontrant ainsi qu'il n'est pas sensible uniquement à la taille des cellules.

Ainsi, à partir de ces premières constatations, nous allons voir au cours du prochain chapitre quelle l'influence peuvent avoir sur le tri différents paramètres tels que : la vitesse du flux, l'intensité du signal DEP UHF transmise aux électrodes ainsi que l'inclinaison des électrodes par rapport au flux. Durant ce chapitre, la conception d'un second prototype optimisé de trieur sera présentée ainsi qu'un système de traitement d'images que nous avons utilisé pour évaluer les performances du trieur. Nous avons en effet utilisé un système d'observation avec reconnaissance de forme, qui nous a permis de mettre en œuvre de manière automatisée un comptage des cellules déviées et séparées selon les différentes sorties fluidiques de la puce empruntées. Ainsi, il nous est possible d'étudier au sein de sous populations cellulaires séparées quelles influences possèdent les conditions de réglage du système (Intensité du signal DEP, fréquence du signal et vitesse du flux) sur les proportions de groupes de cellules ainsi isolées.

Références bibliographiques du chapitre II

- [1] L. A. Flanagan *et al.*, « Unique Dielectric Properties Distinguish Stem Cells and Their Differentiated Progeny », *Stem Cells*, vol. 26, n° 3, p. 656-665, mars 2008, doi: 10.1634/stemcells.2007-0810.
- [2] A. Irimajiri, T. Hanai, et A. Inouye, « A dielectric theory of “multi-stratified shell” model with its application to a lymphoma cell », *J. Theor. Biol.*, vol. 78, n° 2, p. 251-269, mai 1979, doi: 10.1016/0022-5193(79)90268-6.
- [3] S. Dash et S. Mohanty, « Dielectrophoretic separation of micron and submicron particles: A review: Microfluidics and Miniaturization », *ELECTROPHORESIS*, vol. 35, n° 18, p. 2656-2672, sept. 2014, doi: 10.1002/elps.201400084.
- [4] Y. P. Irina Ermolina et B.-Z. G. Yuri Feldman Michael Schlessinger, « Study of Normal and Malignant White Blood Cells by Time Domain Dielectric Spectroscopy », vol. 8, n° 2, p. 9, 2001.
- [5] Y. Huang, R. Holzel, R. Pethig, et X.-B. Wang, « Differences in the AC electrostatics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies », *Phys. Med. Biol.*, vol. 37, n° 7, p. 1499-1517, juill. 1992, doi: 10.1088/0031-9155/37/7/003.
- [6] S. Afshar *et al.*, « Progression of change in membrane capacitance and cytoplasm conductivity of cells during controlled starvation using dual-frequency DEP cytometry », *Anal. Chim. Acta*, vol. 1059, p. 59-67, juin 2019, doi: 10.1016/j.aca.2019.01.046.
- [7] L. Wu, L.-Y. Lanry Yung, et K.-M. Lim, « Dielectrophoretic capture voltage spectrum for measurement of dielectric properties and separation of cancer cells », *Biomicrofluidics*, vol. 6, n° 1, p. 014113, mars 2012, doi: 10.1063/1.3690470.
- [8] E. Salimi, K. Braasch, M. Butler, D. J. Thomson, et G. E. Bridges, « Dielectric model for Chinese hamster ovary cells obtained by dielectrophoresis cytometry », *Biomicrofluidics*, vol. 10, n° 1, p. 014111, janv. 2016, doi: 10.1063/1.4940432.
- [9] T. T. H. Tran, N. V. Nguyen, N. C. Nguyen, T. T. Bui, et T. C. Duc, « Biological microparticles detection based on differential capacitive sensing and dielectrophoresis manipulation », in *2016 International Conference on Advanced Technologies for Communications (ATC)*, Hanoi, Vietnam, oct. 2016, p. 297-301. doi: 10.1109/ATC.2016.7764793.
- [10] T. Sandu, « Calculation of dielectrophoretic force acting on biological cells and on micro- and nanoparticles », in *2015 International Semiconductor Conference (CAS)*, Sinaia, oct. 2015, p. 215-218. doi: 10.1109/SMICND.2015.7355212.
- [11] M. Camarda *et al.*, « Theoretical and experimental study of the role of cell-cell dipole interaction in dielectrophoretic devices: application to polynomial electrodes », *Biomed. Eng. OnLine*, vol. 13, n° 1, p. 71, 2014, doi: 10.1186/1475-925X-13-71.
- [12] R. Pethig, « Review Article—Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications », *Biomicrofluidics*, vol. 4, n° 2, p. 022811, juin 2010, doi: 10.1063/1.3456626.
- [13] S. S. Ozturk et B. O. Palsson, « Effect of medium osmolarity on hybridoma growth, metabolism, and antibody production », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 37, n° 10, p. 989-993, avr. 1991, doi: 10.1002/bit.260371015.
- [14] C. G. Malmberg et A. A. Maryott, « Dielectric constants of aqueous solutions of dextrose and sucrose », *J. Res. Natl. Bur. Stand.*, vol. 45, n° 4, p. 299, oct. 1950, doi: 10.6028/jres.045.030.

- [15] S. Park, M. Koklu, et A. Beskok, « Particle Trapping in High-Conductivity Media with Electrothermally Enhanced Negative Dielectrophoresis », *Anal. Chem.*, vol. 81, n° 6, p. 2303-2310, mars 2009, doi: 10.1021/ac802471g.
- [16] L. M. Broche, F. H. Labeed, et M. P. Hughes, « Extraction of dielectric properties of multiple populations from dielectrophoretic collection spectrum data », *Phys. Med. Biol.*, vol. 50, n° 10, p. 2267-2274, mai 2005, doi: 10.1088/0031-9155/50/10/006.
- [17] A. Casciati *et al.*, « Human Medulloblastoma Cell Lines: Investigating on Cancer Stem Cell-Like Phenotype », *Cancers*, vol. 12, n° 1, p. 226, janv. 2020, doi: 10.3390/cancers12010226.
- [18] J. Voldman, M. Toner, M. L. Gray, et M. A. Schmidt, « Design and analysis of extruded quadrupolar dielectrophoretic traps », *J. Electrostat.*, vol. 57, n° 1, p. 69-90, janv. 2003, doi: 10.1016/S0304-3886(02)00120-1.
- [19] P. P. Brown et D. F. Lawler, « Sphere Drag and Settling Velocity Revisited », *J. Environ. Eng.*, vol. 129, n° 3, p. 222-231, mars 2003, doi: 10.1061/(ASCE)0733-9372(2003)129:3(222).
- [20] S. K. P. Sanjeevi, J. A. M. Kuipers, et J. T. Padding, « Drag, lift and torque correlations for non-spherical particles from Stokes limit to high Reynolds numbers », *Int. J. Multiph. Flow*, vol. 106, p. 325-337, sept. 2018, doi: 10.1016/j.ijmultiphaseflow.2018.05.011.
- [21] S. M. Monahan, V. S. Vitankar, et R. O. Fox, « CFD predictions for flow-regime transitions in bubble columns », *AIChE J.*, vol. 51, n° 7, p. 1897-1923, juill. 2005, doi: 10.1002/aic.10425.
- [22] N.-S. Cheng, « Comparison of formulas for drag coefficient and settling velocity of spherical particles », *Powder Technol.*, vol. 189, n° 3, p. 395-398, févr. 2009, doi: 10.1016/j.powtec.2008.07.006.
- [23] P. Mazur et A. J. Weisenborn, « The Oseen drag on a sphere and the method of induced forces », *Phys. Stat. Mech. Its Appl.*, vol. 123, n° 1, p. 209-226, janv. 1984, doi: 10.1016/0378-4371(84)90112-2.
- [24] S. Ookawara, M. Agrawal, D. Street, et K. Ogawa, « Quasi-direct numerical simulation of lift force-induced particle separation in a curved microchannel by use of a macroscopic particle model », *Chem. Eng. Sci.*, vol. 62, n° 9, p. 2454-2465, mai 2007, doi: 10.1016/j.ces.2007.01.031.
- [25] J. Zhang *et al.*, « Fundamentals and applications of inertial microfluidics_ A review », p. 40.
- [26] A. Castellanos, A. Ramos, A. González, N. G. Green, et H. Morgan, « Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: scaling laws », *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 36, n° 20, p. 2584-2597, oct. 2003, doi: 10.1088/0022-3727/36/20/023.
- [27] A. Ramos, H. Morgan, N. G. Green, et A. Castellanos, « Ac electrokinetics: a review of forces in microelectrode structures », *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 31, n° 18, p. 2338-2353, sept. 1998, doi: 10.1088/0022-3727/31/18/021.
- [28] T. Schnelle, T. Müller, A. Voigt, K. Reimer, B. Wagner, et G. Fuhr, « Adhesion-Inhibited Surfaces. Coated and Uncoated Interdigitated Electrode Arrays in the Micrometer and Submicrometer Range », *Langmuir*, vol. 12, n° 3, p. 801-809, janv. 1996, doi: 10.1021/la950065t.
- [29] « Mouvement Brownien ». https://fr.wikipedia.org/wiki/Mouvement_brownien
- [30] M. Eguchi, F. Kuroki, H. Imasato, et T. Yamakawa, « Design of ceiling electrode for cell separation using positive Dielectrophoresis and inclined gravity », in *2014 World*

Automation Congress (WAC), Waikoloa, HI, août 2014, p. 303-306. doi: 10.1109/WAC.2014.6935903.

- [31] L. Chen, S. Li, H. Cui, et X. Zheng, « Numerical simulation about trapping two particles in microfluidic dielectrophoretic chip », in *2012 International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale (3M-NANO)*, Xi'an, China, août 2012, p. 288-291. doi: 10.1109/3M-NANO.2012.6472944.
- [32] N. Demierre, T. Braschler, P. Linderholm, U. Seger, H. van Lintel, et P. Renaud, « Characterization and optimization of liquid electrodes for lateral dielectrophoresis », *Lab Chip*, vol. 7, n° 3, p. 355-365, 2007, doi: 10.1039/B612866A.
- [33] D. C. Degroot, D. K. Walker, et R. B. Marks, « Impedance mismatch effects on propagation constant measurements », in *Electrical Performance of Electronic Packaging*, Napa, CA, USA, 1996, p. 141-143. doi: 10.1109/EPEP.1996.564810.
- [34] D. Lederer et J.-P. Raskin, « Substrate loss mechanisms for microstrip and CPW transmission lines on lossy silicon wafers », *Solid-State Electron.*, vol. 47, n° 11, p. 1927-1936, nov. 2003, doi: 10.1016/S0038-1101(03)00253-3.
- [35] X. Bao, I. Ocket, J. Bao, D. Kil, L. Brancato, et B. Nauwelaers, « Broadband dielectric spectroscopy measurements of liquids combining interdigital capacitor and coplanar waveguide », in *2017 47th European Microwave Conference (EuMC)*, Nuremberg, oct. 2017, p. 946-949. doi: 10.23919/EuMC.2017.8231002.
- [36] N. Duc Hoang, « Etude des propriétés électriques des élastomères silicones utilisés pour l'isolation électrique », Université Joseph-Fourier - Grenoble, 2005.
- [37] A. Ghannam, C. Viallon, D. Bourrier, et T. Parra, « Dielectric Microwave Characterization of the SU-8 Thick », p. 5.
- [38] U. Annaiyan, K. Kalantar-Zadeh, Q. Fang, et I. Cosic, « Development of a conductive photoresist with a mixture of SU-8 and HCl doped polyaniline », in *TENCON 2005 - 2005 IEEE Region 10 Conference*, Melbourne, Australia, nov. 2005, p. 1-5. doi: 10.1109/TENCON.2005.300927.
- [39] I. Doh et Y.-H. Cho, « A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 121, n° 1, p. 59-65, mai 2005, doi: 10.1016/j.sna.2005.01.030.
- [40] H. S. Moon, Y. W. Nam, J. C. Park, et H. I. Jung, « Continuous microfluidic airborne bacteria separation using dielectrophoresis », in *TRANSDUCERS 2009 - 2009 International Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference*, Denver, CO, USA, juin 2009, p. 2038-2041. doi: 10.1109/SENSOR.2009.5285664.
- [41] Y. Zhao, U.-C. Yi, et S. K. Cho, « Microparticle Concentration and Separation by Traveling-Wave Dielectrophoresis (twDEP) for Digital Microfluidics », *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 16, n° 6, p. 1472-1481, déc. 2007, doi: 10.1109/JMEMS.2007.906763.
- [42] G. Mernier, N. Piacentini, R. Tornay, N. Buffi, et P. Renaud, « Cell viability assessment by flow cytometry using yeast as cell model », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 154, n° 2, p. 160-163, juin 2011, doi: 10.1016/j.snb.2009.11.066.
- [43] T. Provent *et al.*, « Ultra-High Frequencies continuous biological cell sorting based on repulsive and low dielectrophoresis forces », in *2019 IEEE MTT-S International Microwave Symposium (IMS)*, Boston, MA, USA, juin 2019, p. 224-227. doi: 10.1109/MWSYM.2019.8701063.
- [44] W. B. J. Zimmerman, *Microfluidics: History, Theory and Applications*, Springer. 2006.



- [45] D. J. Beebe, G. A. Mensing, et G. M. Walker, « Physics and Applications of Microfluidics in Biology », *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, vol. 4, n° 1, p. 261-286, août 2002, doi: 10.1146/annurev.bioeng.4.112601.125916.
- [46] H. Hadady, D. Redelman, S. R. Hiibel, E. J. Geiger, et 1 Mechanical Engineering Department, University of Nevada, Reno, USA, « Continuous-flow sorting of microalgae cells based on lipid content by high frequency dielectrophoresis », *AIMS Biophys.*, vol. 3, n° 3, p. 398-414, 2016, doi: 10.3934/biophy.2016.3.398.



Partie III. Optimisation et validation du cytomètre sur puce et des conditions de tri par diélectrophorèse haute fréquence

Au cours du second chapitre un premier système de tri a été proposé. Nous avons vu les modèles sur les forces interagissant avec les cellules au cours du tri et le lien entre les caractéristiques diélectriques des cellules et le facteur de Clausius-Mossotti. A partir de ces éléments, nous allons présenter ici le développement d'un second système de tri optimisé et comment l'utiliser pour cibler les cellules d'intérêt.

Tout d'abord, en nous appuyant sur les résultats des expériences présentées lors du chapitre précédent, nous allons établir une équation, reflet du bilan des forces auxquelles sont soumises les cellules entrant dans la zone de tri, pour étudier plus en détail les changements de trajectoires des cellules depuis leur arrivée dans le canal principal de nos dispositifs, jusqu'au moment où elles entrent en interaction avec le champ. Nous verrons ainsi qu'il est possible de déterminer une condition critique pour prédire si une cellule sera, ou non, déviée par le champ électrique et cela pour des conditions de tri données.

Ces informations vont nous permettre de proposer des améliorations à apporter sur la géométrie des électrodes et nous donner l'occasion de proposer un second microsystème pour le tri cellulaire qui a été optimisé dans l'objectif de n'utiliser que des intensités de force DEP répulsives pour diviser un échantillon de cellules en quatre sous populations dont les cellules possèdent des similitudes diélectriques. Nous verrons dans la seconde partie de ce chapitre que plusieurs prototypes ont été réalisés. Des expériences menées avec ces derniers seront ensuite présentées. Les résultats ainsi obtenus seront confortés avec la théorie présentée au début du chapitre.

Lors des expérimentations, nous avons utilisé un système de reconnaissance de forme et de comptage des cellules automatisé en temps réel permettant de faciliter les traitements des résultats. La troisième partie de ce chapitre s'attachera à le présenter ainsi qu'à détailler les réglages du système de tri et les ajustements des conditions expérimentales. L'erreur statistique liée à l'observation d'échantillons de quelques centaines ou milliers de cellules sera également discutée.

Enfin, dans la dernière partie de ce chapitre, nous présenterons et discuterons les résultats les plus significatifs des expériences que nous avons pu réaliser. Nous y verrons l'importance du choix des conditions de tri, c'est-à-dire la fréquence du signal DEP, sa puissance ou encore la vitesse du milieu de suspension, dans le tri d'une population cellulaire. Ainsi en observant le comportement des cellules soumises au champ électrique, nous avons pu caractériser les populations cellulaires étudiées et mieux cibler par la suite des conditions optimales pour la séparation des cellules et leur tri.

III.1. Etude de la trajectoire d'une cellule au sein de la zone de tri

Au cours de cette première partie, nous allons voir plus amplement comment l'ajustement des conditions de tri peuvent impacter sur la déviation effective des cellules par le champ électrique. Pour cela, nous allons présenter le modèle lié aux conclusions de la partie II.3 et les hypothèses sur lesquelles nous nous sommes basés nous permettant de prédire quelle sera la trajectoire de la cellule avant, pendant et après son interaction avec le champ

électrique de déviation. Nous verrons en particulier l'étape d'accélération de la cellule lorsque celle-ci arrive à proximité du champ électrique.

Cette phase d'accélération est souvent négligée dans les publications portant sur les systèmes d'électromanipulation par DEP [1]. La raison principale est que l'état de l'art évalue ce temps nécessaire à cette accélération de l'ordre de la μs [2] à 1 ms [3] ainsi, durant ce laps de temps, la distance parcourue par la cellule est faible à l'échelle d'un microsystème avec des vitesses de flux de l'ordre du $\text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$. Cette distance parcourue est donc souvent considérée comme négligeable. Dans notre cas, nous en ferons une évaluation précise dans les conditions expérimentales.

Passé cette phase, un équilibre s'établit entre les forces diélectrophorétiques et celles liées au mouvement fluïdique. Cela nous permettra de calculer la condition « critique » au-delà de laquelle une cellule pourra être déviée par le champ électrique.

Une fois l'influence des conditions électriques et fluidiques sur cette valeur critique de déviation connue, nous verrons qu'il est alors possible d'ajuster judicieusement l'intensité de champ et/ou la vitesse du flux afin de cibler une certaine catégorie de cellules au sein d'une population de cellules pour les séparer et les collecter au niveau de la sortie fluïdique souhaitée du microsystème.

III.1.1. Étapes de déviation

Afin de pouvoir séparer les cellules aux caractéristiques diélectriques ciblées, il faut faire un bilan des forces qui emmènent les cellules à être déviées ou non par le champ électrique. Nous allons voir ici, pour une géométrie d'électrode définie imposant un champ électrique d'intensité constante parallèle à la trajectoire de déviation et pour une vitesse de flux constante quelles sont les caractéristiques que devra avoir une cellule pour être déviée par ce champ électrique (Figure.87.A) plutôt que de le traverser (Figure.87.B). Pour cela, nous allons d'abord définir un modèle de la déviation avant de poser les équations qui permettront de connaître les valeurs minimales, appelées par la suite valeur « critiques », des caractéristiques que doit avoir une cellule pour être déviée.

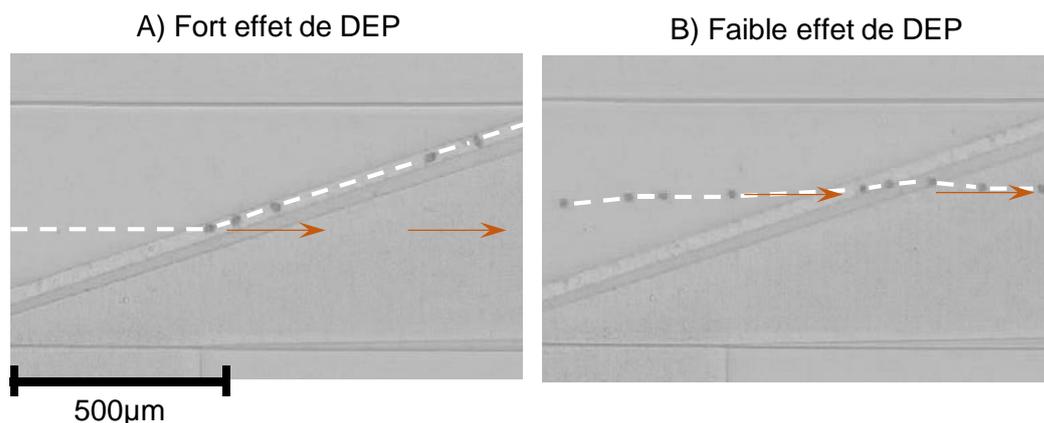


Figure.87 : Trajectoires possibles d'une cellule se déplaçant dans le canal microfluidique et entrant dans la zone de champ électrique la plus intense : A) Déviation de la cellule car la force DEP est suffisante ; B) La cellule traverse le maximum de champ car la force DEP est trop faible.

Nous avons vu au cours du chapitre 2 que trois forces principales (la gravité, la force de trainée et la force DEP) dominaient le déplacement de la cellule dans le canal microfluidique et pouvaient affecter sa trajectoire de manière plus significative que les autres forces

auxquelles elle est également soumise tel que la force Magnus. Dans les équations qui suivent, nous ne considérerons que 2 axes qui sont la longueur et la largeur du canal. La hauteur de la cellule change au cours de la déviation, typiquement une cellule repoussée par le champ électrique montera dans la hauteur du canal, mais tout ce que nous allons voir reste vrai. En effet, la variation de hauteur ne va être qu'une modulation de la vitesse du flux et de l'intensité du champ électrique, le reste du processus de déviation n'est pas affecté. Nous postulons donc en l'état que la cellule reste à une hauteur constante dans le canal.

De plus, nous n'allons pas considérer le cas des cellules soumises à des phénomènes de pDEP. En effet, nos manipulations avec les cellules soumises aux forces attractives pDEP se sont révélées peu concluantes car peu reproductibles. En effet, beaucoup de cas ont conduit à générer la défaillance du dispositif. En effet, la vitesse des cellules le long des électrodes s'est avérée plus lente que celle des cellules repoussées par le champ électrique entraînant des collisions entre cellules. De plus, étant attirées vers les électrodes, ces cellules entrent en contact avec ces dernières, dont la rugosité de surface est propice à favoriser l'adhésion des cellules et par conséquent la création d'agglomérats par effet d'accumulation. Ce phénomène d'adhérence difficilement reproductible d'une cellule à l'autre s'ajoute aux autres forces de déplacement sous forme de frottement et entrave les mouvements de la cellule. Cette force de frottement présente également une variance d'intensité entre cellules et dépend fortement des surfaces de contact [4] ; ce qui rend le bilan des forces sur les cellules soumises à un comportement de pDEP plus complexe encore à modéliser.

C'est pourquoi nous avons fait le choix d'écartier l'utilisation de forces DEP attractives dans notre microsystème de tri cellulaire.

La modélisation du mouvement de la cellule utilisée, est celle présentée sur la Figure.88. Nous nous plaçons au-dessus des électrodes dans un plan 2D. L'altitude de la cellule n'étant plus considérée, la gravité ne présente plus d'impact dans les axes observés. Les forces restantes sont alors les frottements générés par le liquide sur la cellule, et le gradient de champ qui peut dévier la cellule par répulsion le long de la ligne rouge (Figure.88) à $5,3 \mu\text{m}$ du bord des électrodes (cf. § II.4.1 Tableau.6). L'intensité du gradient de champ sera considérée comme constante tout au long des électrodes et sur uniquement une bande d'une largeur de l'ordre de $8,2 \mu\text{m}$ avec pour valeur le maximum d'intensité calculé avec le logiciel COMSOL mutiphysics (cf. § II.4.1). En vérité, le champ commence avant cette bande à dévier la cellule, mais si la cellule reste dans cette bande à la fin de sa phase d'accélération, alors ignorer cette première partie du champ électrique n'aura pas d'influence. L'angle des électrodes α est défini par rapport au sens du flux (de gauche à droite) et son signe donné selon le sens trigonométrique.

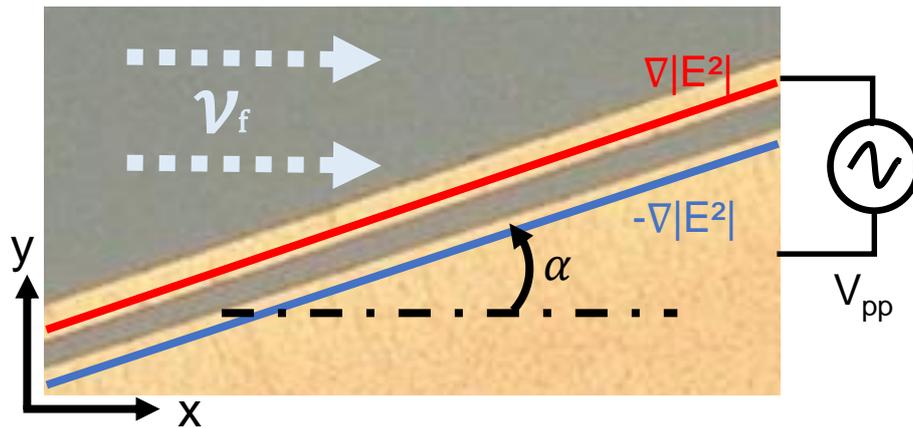


Figure.88 : L'environnement considéré est un plan 2D avec pour axe x la longueur du canal dirigé des entrées aux sorties, et l'axe y la largeur de ce canal allant du bas du repère vers le sommet de celui-ci. Deux électrodes parallèles et tournées d'un angle α en sens anti-trigonométrique par rapport à l'axe x sont polarisées par une tension V_{pp} alternative, générant un gradient de champ $\nabla|E^2|$. Un flux se déplace dans le sens de l'axe x et présente un profil uniforme selon l'axe y.

Le long du parcours de la cellule dans notre système, la cellule subit différentes conditions qui influencent sa vitesse et sa direction. Les différentes étapes, qui seront discutées dans les prochaines pages, sont présentées sur la Figure.89 et illustrent le cas d'une cellule qui est suffisamment repoussée par le champ électrique pour être déviée par celui-ci.

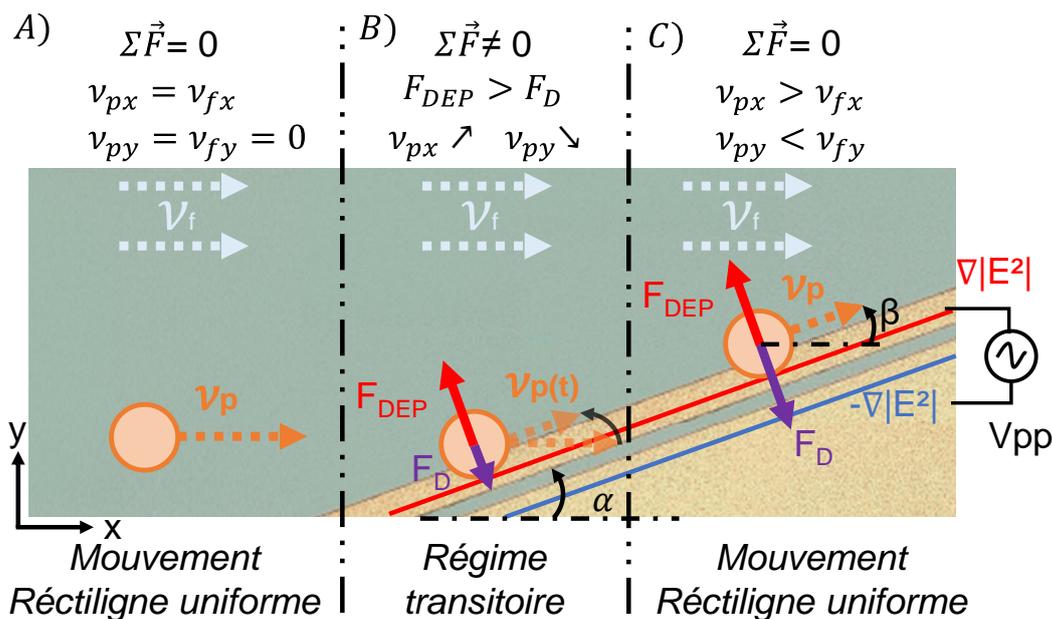


Figure.89 : Décomposition en 3 étapes la déviation de trajectoire d'une cellule repoussée par le champ. A) La cellule se déplace à la même vitesse que le flux sans subir de perturbation. B) Arrivée à proximité du champ électrique, la cellule subit une force qui perturbe sa course entraînant une accélération et donc une variation de vitesse par rapport à celle du fluide. C) Un équilibre entre forces diélectriques et fluidiques est trouvé permettant à la cellule de suivre de nouveau un mouvement rectiligne uniforme le long des électrodes.

La phase A de la Figure.89 représente la cellule transportée par le fluide dans les canaux microfluidiques en direction de la zone de tri. Durant tout le parcours de la cellule en direction des électrodes, seul l'interaction du fluide qui entoure la cellule est à considérer. La cellule a un mouvement rectiligne uniforme de même sens et de même vitesse que le fluide.

Nous pouvons ainsi considérer la situation comme étant stable. Dans cette situation, la somme totale des forces appliquées sur la cellule sur les axes x et y est nulle.

Cette situation fixe les conditions initiales pour la phase suivante. En effet lorsque la cellule est amenée à proximité du champ électrique, le précédent équilibre des forces est rompu entraînant une accélération (négative ou positive) et par conséquent un changement de vitesse qui sera détaillé dans le point suivant.

III.1.2. Accélération d'une cellule soumise à une force constante

Lorsque la cellule transportée par le flux est guidée jusqu'à proximité du champ électrique, la force DEP (\vec{F}_{DEP}), qui s'exerce sur la cellule au moment où elle pénètre dans la zone d'influence des électrodes, génère une accélération sur cette dernière. Du fait de ce changement de vitesse, la force de trainée augmente pour s'opposer au mouvement induit par l'effet du champ électrique qui apparaît par rapport au flux, comme le présente la Figure.89.B. Au cours de l'accélération, la différence de vitesse par rapport à la vitesse du flux augmente, la vitesse de la cellule diminuant sur l'axe X et augmentant sur l'axe Y, augmentant ainsi l'intensité de la force de trainée ($\vec{F}_D(t)$) jusqu'au moment où, cette force devient égale à l'intensité de la force de DEP à laquelle elle s'oppose. La somme des forces appliquées sur la cellule ($\Sigma\vec{F}(t)$) est à cet instant nulle, un nouvel équilibre s'établit et ceci termine la phase d'accélération qui n'était qu'un régime transitoire. En résumé, à un instant t , au premier ordre le mouvement de la cellule est régi par l'équation suivante :

$$\Sigma\vec{F}(t) = \vec{F}_{DEP} - \vec{F}_D(t) = \vec{F}_{DEP} - F_D^* \cdot \Delta\vec{v}_p(t) \quad (1)$$

Avec F_D^* une constante liée à la force de trainée qui correspond à :

$$F_D^* = \frac{\vec{F}_D}{\Delta\vec{v}_p(t)} = 6\pi \cdot \mu_f \cdot r \quad (2)$$

μ_f étant la viscosité dynamique du fluide et r le rayon de la cellule. $\Delta v_p(t)$ est la différence de vitesse entre le fluide et la cellule, à un temps t donné. Cette différence de vitesse est acquise du fait de l'accélération ($\vec{a}(t)$) subie par la cellule au cours du temps. Ce qui nous amène à l'équation suivante :

$$\Delta\vec{v}_p(t) = \int_0^t \vec{a}(s) ds \quad (3)$$

La vitesse acquise par la cellule est directement liée à l'accélération. A $t = 0$ s, lorsque la cellule arrive à proximité du champ électrique, la cellule possède déjà une vitesse qui sera modifiée par la suite jusqu'au moment où l'équilibre des forces sera rétabli marquant la fin de la phase d'accélération à l'instant t . L'accélération est liée à la masse et aux forces appliquées sur l'objet considéré. Ceci est décrit par l'équation suivante :

$$\vec{a}(t) = \frac{\Sigma\vec{F}(t)}{m} \quad (4)$$

Avec m la masse d'une sphère déterminée par :

$$m = \frac{3\pi}{4} \cdot r^3 \cdot \rho_p \quad (5)$$

Avec ρ_p la densité de la cellule.

Pour illustrer cela, nous pouvons considérer l'exemple suivant : une cellule à l'arrêt dans un fluide l'étant lui aussi. Le temps $t = 0$ s est l'instant où par effet de pression le fluide sera mis en mouvement. De ce fait, une forte force de trainée est appliquée à la cellule ($\Sigma\vec{F}(t) \neq 0$ du



fait de la différence de vitesse), la cellule gagne ainsi en vitesse. Du fait de l'accélération de la cellule liée au déplacement du fluide autour de celle-ci, la force de frottement diminue jusqu'à devenir nulle lorsque le fluide et la cellule ont la même vitesse, mettant fin à cette phase d'accélération. La cellule, tant qu'aucune autre force n'interviendra conservera la même vitesse que le fluide autour d'elle.

A partir des équations (3) et (4), nous pouvons développer $\Delta v_p(t)$ de l'équation (1), et ainsi réécrire cette équation sous la forme suivante :

$$\Sigma \vec{F}(t) = \vec{F}_{DEP} - \int_0^t \frac{F_D^*}{m} \cdot \Sigma \vec{F}(s) ds \quad (6)$$

Nous pouvons décrire cette équation ainsi : la somme des forces appliquées sur la cellule à un temps donné dépend de la force \vec{F}_{DEP} ici considérée constante qui est à l'origine du régime transitoire. A cette force s'oppose une force de trainée qui, dépend de l'accélération acquise depuis le début de ce régime transitoire et donc de la somme des forces appliquées à la cellule durant les temps précédents.

Nous souhaitons trouver la solution de sorte que $\Sigma \vec{F}(t)$ ne dépende pas d'elle-même. (6) est l'équation intégrale qui peut être résolue à partir du Lemme 1.1 de Gronwall [5]. La solution prend la forme suivante :

$$x(t) = b \cdot \exp\left(\int_0^t a(s) ds\right) \quad (7)$$

Avec dans notre cas $b = \vec{F}_{DEP}$ et $a(s) = -\frac{F_D^*}{m}$. Ce qui nous donne la solution suivante (courbe rouge pointillé Figure.90) :

$$\Sigma \vec{F}(t) = \vec{F}_{DEP} \cdot \exp\left(-t \cdot \frac{F_D^*}{m}\right) \quad (8)$$

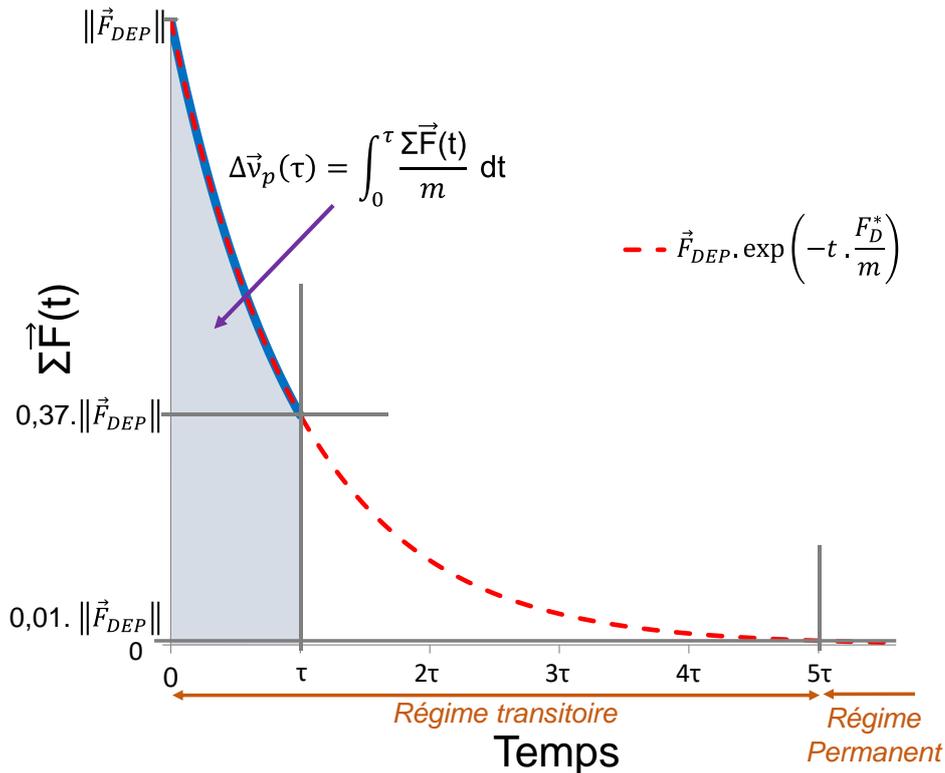


Figure.90 : Evolution de la somme des forces au cours du temps. La vitesse gagnée par la cellule durant l'accélération à un temps donné est liée à toutes les forces appliquées sur celle-ci depuis le début du régime transitoire. Cette différence de vitesse croissante par rapport au fluide augmente la force de traînée, diminuant ainsi l'accélération de la cellule au cours du temps jusqu'à un équilibre entre les deux forces, mettant fin au régime transitoire.

Tout comme une décharge de condensateur, la somme des forces que la cellule subit suit une décroissance exponentielle négative de la forme $\exp(-t/\tau)$. Cette dernière présente un temps particulier τ . Lorsque $t = \tau$ la valeur de $\Sigma \vec{F}(t)$ est égale à 37% de la valeur initiale, et à $\Sigma \vec{F}(5\tau)$, nous pouvons considérer que la cellule entre dans le régime permanent de la fonction étant à uniquement 1% de la valeur initiale. L'accélération peut ainsi être considérée terminée à $t = 5\tau$. Dans notre cas, τ correspond à :

$$\tau = \frac{m}{F_D^*} = \frac{3\pi/4 \cdot r^3 \cdot \rho_p}{6\pi \cdot \mu_f \cdot r^2} = \frac{r^2 \cdot \rho_p}{8\mu_f} \quad (9)$$

Pour une cellule de $10 \mu\text{m}$ de diamètre et de densité similaire à l'eau, immergée dans un milieu aqueux, l'accélération durerait $15,6 \mu\text{s}$. Il faudrait une vitesse du fluide de l'ordre de $64\text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$ pour que la cellule puisse parcourir $1 \mu\text{m}$ durant ce laps temps. Nos vitesses de manipulation étant largement inférieures à cette vitesse, nous pouvons négliger ce temps d'accélération. Dans le cas de cellules de $30 \mu\text{m}$, le temps d'accélération est de $140,6 \mu\text{s}$. Pour ces cellules, avec une vitesse de flux de $10 \text{mm}\cdot\text{s}^{-1}$, le déplacement serait au maximum de $1,4 \mu\text{m}$. Du fait de la faible variation du gradient de champ entre le début de l'accélération et la fin de cette phase, nous pouvons valider notre hypothèse initiale qui est de considérer un champ d'intensité constante le temps de l'accélération.

Du fait de ses observations, nous pouvons conclure que la phase d'accélération est négligeable dans nos conditions de manipulation. A la suite de cette phase, un second régime permanent est atteint (Figure.89.C). Il convient d'observer quel est maintenant la

direction de la cellule et de savoir quelles doivent être les caractéristiques de la cellule pour que cette nouvelle direction permette la déviation de la cellule le long des électrodes.

III.1.3. Régime permanent d'une cellule déviée

Dans cette troisième étape de déviation, la cellule présente un mouvement rectiligne uniforme (Figure.89.C). En revanche, cette fois, ce n'est pas uniquement le flux qui maintient sa vitesse de déplacement, mais aussi la force DEP qui a précédemment entraînée la variation de vitesse. Ne subissant plus d'accélération, la somme des forces appliquées sur la cellule est nulle du fait d'un équilibre retrouvé entre les forces électriques et fluidiques, donnant l'égalité suivante :

$$\vec{F}_{DEP} = \vec{F}_D \quad (10)$$

Si nous projetons l'égalité (10) sur les axes x qui est orienté dans le sens du flux et y la largeur du canal, nous obtenons les équations suivantes :

$$\begin{cases} -2\pi \cdot \varepsilon_f \cdot f_{CM} \cdot r^3 \cdot \nabla |E^2| \cdot \sin(\alpha) = 6\pi \cdot \mu_f \cdot r \cdot (v_f - v_{px}) \\ 2\pi \cdot \varepsilon_f \cdot f_{CM} \cdot r^3 \cdot \nabla |E^2| \cdot \cos(\alpha) = -6\pi \cdot \mu_f \cdot r \cdot v_{py} \end{cases} \quad (11)$$

Pour rappel, ε_f est la permittivité du fluide, f_{CM} le facteur de Clausius-Mossotti de la cellule et r son rayon, $\nabla |E^2|$ le gradient au carré du champ électrique (cf. § I.3.1) et α l'angle des électrodes par rapport au flux. μ_f est la viscosité dynamique du fluide, v_f et v_{px} les vitesses respectivement du fluide et de la cellule (cf. § II.3.1.1). Cette décomposition nous permet de d'isoler des équations la vitesse d'une cellule de rayon r présentant un f_{CM} donné, selon les deux axes x et y considérés :

$$\begin{cases} v_{px} = v_f + \frac{\varepsilon_f \cdot f_{CM} \cdot r^2 \cdot \nabla |E^2| \cdot \sin(\alpha)}{3\mu_f} \\ v_{py} = -\frac{\varepsilon_f \cdot f_{CM} \cdot r^2 \cdot \nabla |E^2| \cdot \cos(\alpha)}{3\mu_f} \end{cases} \quad (12)$$

Dans ce cas où la cellule est repoussée par le champ, nous pouvons observer une décélération de la cellule par rapport au flux sur l'axe x, ainsi qu'une accélération sur l'axe y. Ce changement de vitesse initié par le champ électrique fait que la cellule suit un angle β par rapport à la direction du fluide qui, par règle de trigonométrie correspond à :

$$\tan(\beta) = \frac{v_{py}}{v_{px}} = \frac{\sin(\beta)}{\cos(\beta)} \quad (13)$$

Dans notre cas, comme nous cherchons à trouver les conditions dans lesquelles la cellule est déviée par le champ électrique, cet angle de déviation β doit être égal à l'angle des électrodes α . A partir des équations (12) et (13) et en isolant f_{CM} , nous obtenons l'équation suivante :

$$\frac{\sin(\alpha)}{\cos(\alpha)} = \frac{-\frac{\varepsilon_f \cdot f_{CM} \cdot r^2 \cdot \nabla |E^2| \cdot \cos(\alpha)}{3\mu_f}}{v_f + \frac{\varepsilon_f \cdot f_{CM} \cdot r^2 \cdot \nabla |E^2| \cdot \sin(\alpha)}{3\mu_f}}$$

$$f_{CM}^c = -\frac{3 v_f \cdot \mu_f \cdot \sin(\alpha)}{r^2 \cdot \varepsilon_f \cdot \nabla |E^2|} \quad (14)$$

Avec, v_f , μ_f et ε_f représentant respectivement la vitesse, la viscosité dynamique et la permittivité du fluide. α est l'angle présenté par les électrodes par rapport à la direction du fluide qui pousse la cellule dans le canal, r le rayon de la cellule et $\nabla|E^2|$ le gradient du champ électrique au carré. L'exposant « c » du facteur de Clausius-Mossotti (f_{CM}^c) indique ici une valeur dite « critique » de f_{CM} .

Cette valeur critique détermine la valeur de f_{CM} en dessous de laquelle la cellule sera effectivement repoussée par le champ ($f_{CM} \leq f_{CM}^c$, c'est donc une force de répulsion plus grande). Rappelons ici qu'en DEP négative f_{CM} prend toujours une valeur négative. Au contraire, dans les cas où f_{CM} est supérieur à f_{CM}^c (F_{DEP} plus faible que nécessaire), la cellule continue sa course sans suivre les électrodes. Il est maintenant important d'observer l'évolution de cette valeur de f_{CM} critique par rapport aux conditions électriques et fluidiques. En effet, déterminer et moduler cette valeur critique nous permet de pouvoir identifier quelles cellules pourront être isolées et séparées de la population initiale par rapport à leur valeur de f_{CM} exprimée à une fréquence donnée.

L'angle présenté par les électrodes par rapport au flux a un impact direct sur la facilité de dévier ou non une cellule comme le montre la Figure.91. Ainsi, plus l'angle entre les électrodes et la direction du flux est faible (moins les électrodes sont placées à la perpendiculaire du flux), plus le $|f_{CM}^c|$ nécessaire à la déviation de la cellule sera proche de 0. Dans la Figure.91, quatre conditions de manipulation différentes de tri (vitesse de flux et tension inter électrodes) sont présentées. Pour chacune, à un angle d'électrode donné une valeur de $|f_{CM}^c|$ différente peut être calculée. Si une cellule présente un $|f_{CM}|$ inférieur (F_{DEP} trop faible), elle traversera le champ électrique, et dans l'autre cas elle sera déviée.

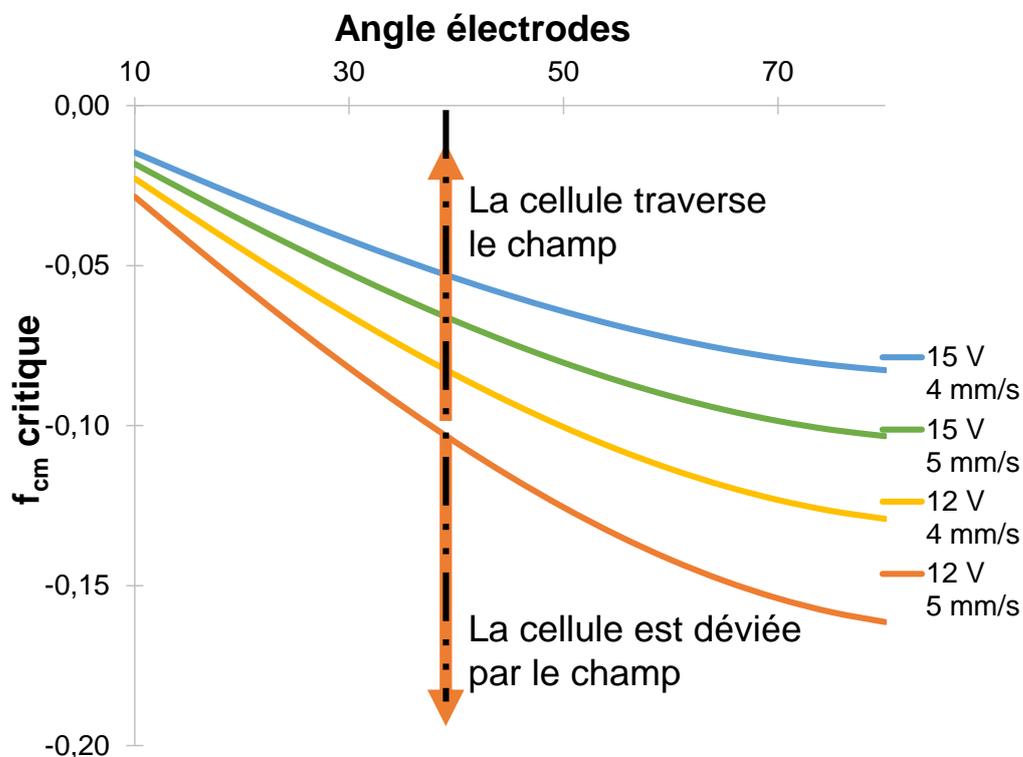


Figure.91 : Impact de l'angle des électrodes par rapport à la direction du flux sur la déviation d'une cellule de 15 μm de diamètre pour différentes conditions de tri électrique et fluidique. Les électrodes sont distantes de 30 μm .

Ce principe de déviation sélective en fonction de l'angle des électrodes a déjà été mis en œuvre dans la littérature. Jeroen H. Nieuwenhuis *et al.* [6] l'ont exploité pour développer un système de focalisation de cellules avec des angles d'électrodes très faibles permettant de fonctionner avec des flux rapides. Unyoung Kim *et al.* [7] ont au contraire mis à profit des angles forts, pour trier des grosses particules de 10 μm de plus petites particules de 5 μm . Ces dernières, pour être déviées, nécessitent d'une seconde paire d'électrodes présentant un angle plus faible.

Pour notre application, nous allons mettre à profit ce principe avec trois paramètres de réglage pour ajuster le tri : la vitesse de flux, l'intensité du champ électrique et la fréquence du signal DEP. Nous considérerons un système qui présente une géométrie d'électrode avec 3 pentes différentes et successives: $\alpha_1=35^\circ$, $\alpha_2=45^\circ$ et $\alpha_3=60^\circ$. L'inclinaison de ces électrodes sera croissante car, comme le présente la Figure.91, un angle faible dévie plus efficacement qu'un angle fort. Les cellules qui ne pourront pas être déviées le long de la première pente de 35° car trop peu sensibles au champ électrique, prendront la sortie 1. Celles qui seront déviées jusqu'à la deuxième pente de 45° mais qui ne réagiront pas assez au champ au niveau de cette nouvelle zone de déviation, prendront la sortie 2, sur le même principe les cellules traversant le champ lors de leur passage au niveau de la troisième pente prendront la sortie 3 et enfin celles pouvant être déviées le long des trois pentes, sortiront à la sortie 4.

C'est en considérant ce système, que la Figure.92 présente les critères limites de f_{CM} pour qu'une déviation s'opère, et cela en fonction de la vitesse du flux. Les conditions électriques sont une tension inter électrodes de 12,5 V et un gap de 30 μm . La cellule étant plus difficile à dévier lorsque la vitesse du fluide augmente, un $|f_{\text{CM}}|$ grand est nécessaire afin de suivre l'angle des électrodes jusqu'au bout lorsque la vitesse du flux dans le canal est grande. La formule (14) étant aussi dépendante de la taille de la cellule, une cellule sera plus facilement déviée qu'une autre cellule plus petite possédant le même f_{CM} qui lui est indépendant de la taille (cf. § II.2.1).

L'objectif de notre étude porte sur la possibilité d'un tri basé sur les caractéristiques diélectriques des cellules au travers de leur valeur de f_{CM} plutôt que sur leur taille. Par la suite, les cellules seront considérées comme ayant une taille constante de 15 μm de diamètre. L'impact de la taille sur le tri sera tout de même étudié au cours de nos expériences mais ne sera pas le cœur de notre propos ici.

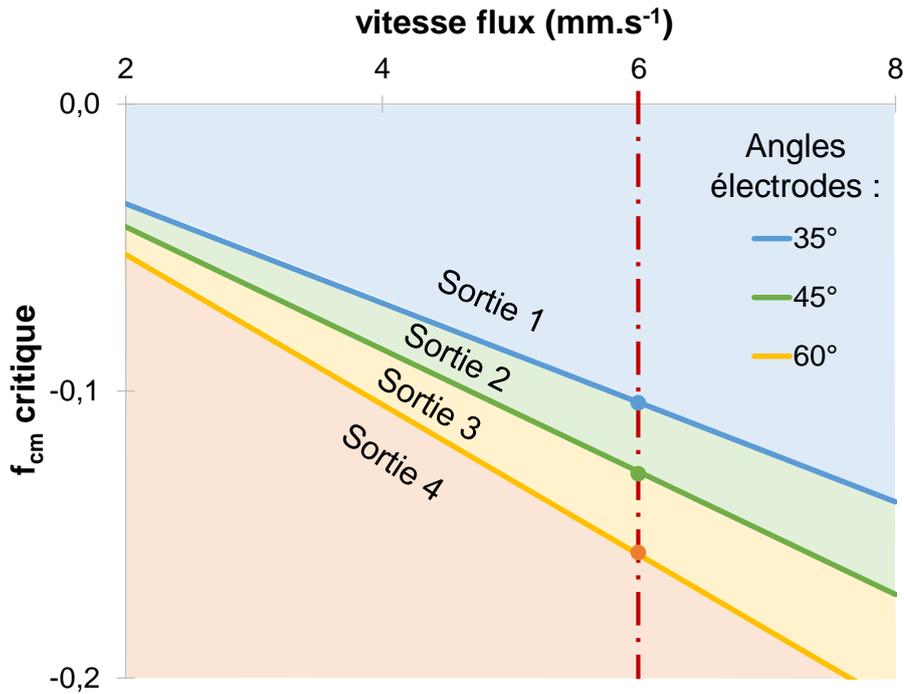


Figure.92 : Impact de la vitesse du flux sur la déviation d'une cellule pour différents angles d'électrodes, pour une tension de 12,5 V_{pp} et un écart inter électrodes de 30 μm.

L'impact de la tension appliquée aux électrodes sur le tri est inverse à celui de la vitesse du flux : l'augmentation de la tension permet de dévier plus efficacement les cellules. Elles peuvent présenter une valeur de $|f_{CM}|$ plus petite pour y arriver (Figure.93). La proportionnalité entre la tension et le maximum de gradient du champ a été calculée pour un écart inter électrode de 30 μm et des électrodes épaisses de 2 μm avec le logiciel COMSOL Multiphysics (cf. Figure.63). La vitesse de flux considérée pour chaque courbe est de 6 mm.s⁻¹.

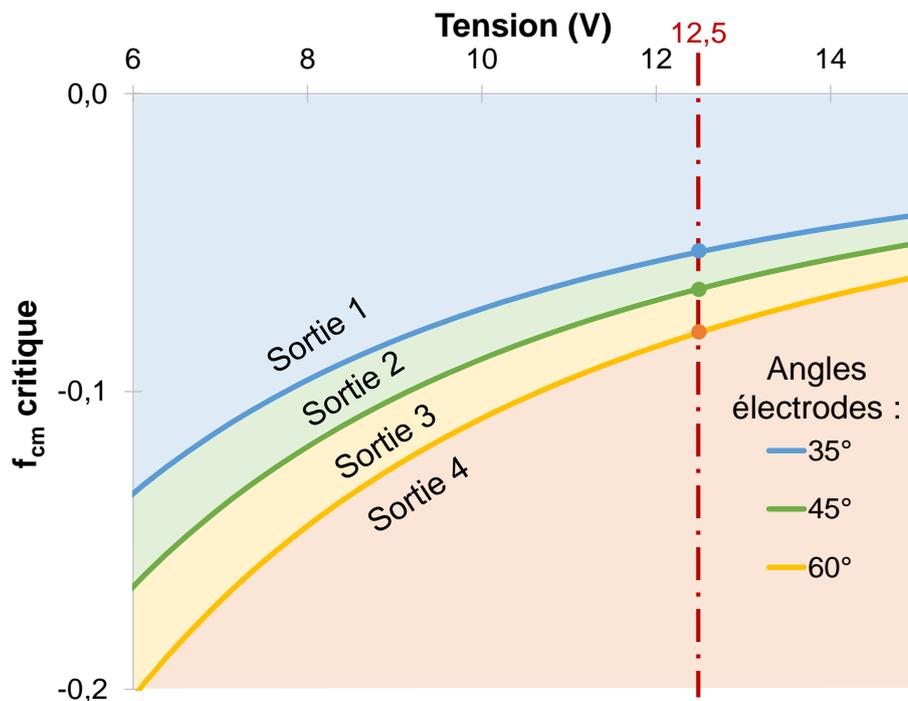


Figure.93 : Impact de la tension appliquée aux électrodes sur la déviation de la cellule pour différents angles d'électrodes, pour une vitesse de flux de 6 mm.s⁻¹. Lien tension-gradient du champ est calculé à partir des maximums de champs simulés sous COMSOL : $\nabla|E^2| = V^2 \cdot 1,56E^{12} \text{ m}^{-1}$.

Les trois paramètres que sont l'angle des électrodes, la vitesse du flux et l'intensité du champ électrique, constituent ce que nous appellerons la contrainte de déviation et conditionne les valeurs de f_{CM} critique. Une contrainte de déviation forte, obtenue par exemple avec un angle proche de 90° , une grande vitesse de flux et/ou un champ électrique faible fera qu'une cellule sera plus difficile à dévier, et donc nécessitera un $|f_{CM}|$ très supérieur à 0. Au contraire, pour des contraintes de déviations faibles, une force DEP plus faible est suffisante pour réaliser la déviation.

A une valeur de f_{CM} critique donnée, peuvent correspondre différentes contraintes de déviation. Si à une première contrainte de déviation la vitesse du flux est quadruplée, alors doubler la tension permettra de revenir aux mêmes valeurs de f_{CM} critique pour chaque angle comme nous pouvons le voir avec l'équation (14).

Il est préférable dans nos expériences d'éviter des vitesses inférieures au mm.s^{-1} afin d'éviter une sédimentation des cellules au-dessus des électrodes. De plus, une vitesse trop faible limiterait fortement la quantité de cellules triées par unité de temps. Au contraire, une vitesse très grande entraîne une observation des cellules difficile et impose l'utilisation de fortes tensions qui pourraient amener à de possibles échauffements de la solution de transport des cellules et la dégradation de ces dernières comme expliqué au cours du chapitre 1 (cf. § I.3.4). Ainsi, lors de nos manipulations nous avons utilisé un compromis avec des vitesses de flux comprises entre 4 et 7 mm.s^{-1} .

III.2. Cibler des cellules selon les conditions de tri

A partir des équations établies pour déterminer si une cellule réagit aux forces de déviation exercées par le système de tri, il est plus aisé de cibler les conditions de tri nécessaires pour cibler des cellules. Les contraintes de déviations qui sont liées, à l'angle des électrodes, l'intensité du gradient du champ électrique et de la vitesse de flux font partie des conditions de tri. La fréquence du signal électrique est le dernier élément qui complète les conditions de tri, en régissant la valeur du facteur f_{CM} .

Il sera par exemple possible pour trouver les conditions optimales de tri, de tracer l'évolution fréquentielle de f_{CM} telle qu'illustré dans la Figure.94. Trois cellules différentes sont considérées dans cette figure. Deux cellules B et C qui possèdent la même fréquence de transition f_{X02} égale à 150 MHz, respectivement illustrées par la courbe verte et la courbe jaune. La troisième cellule, A, (courbe bleue) présente la même permittivité intracellulaire que la cellule B avec une conductivité différente.

Ainsi pour diriger ces trois cellules dans 3 sorties différentes, il faut un système d'électrodes avec au moins deux sections présentant des angles différents permettant ainsi d'obtenir deux conditions de tri différentes. Une première condition de séparation est réalisée avec des électrodes présentant un angle de 35° par rapport au flux par exemple. Les cellules n'étant pas déviées par cette pente prendront la sortie 1. Celles qui seront déviées, arriveront jusqu'à une seconde zone de tri présentant un autre angle de tri de 60° . Les cellules qui avaient été déviées dans la première zone mais qui ne présentent pas une valeur de f_{CM} suffisante pour être déviées par ce second tri, iront à la sortie 2 et enfin, les cellules réagissant suffisamment au champ prendront la sortie 3. Les fréquences autour de 200 MHz semblent les plus adaptées pour le tri car c'est autour de ces fréquences que le f_{CM} des trois cellules sont les plus distincts.

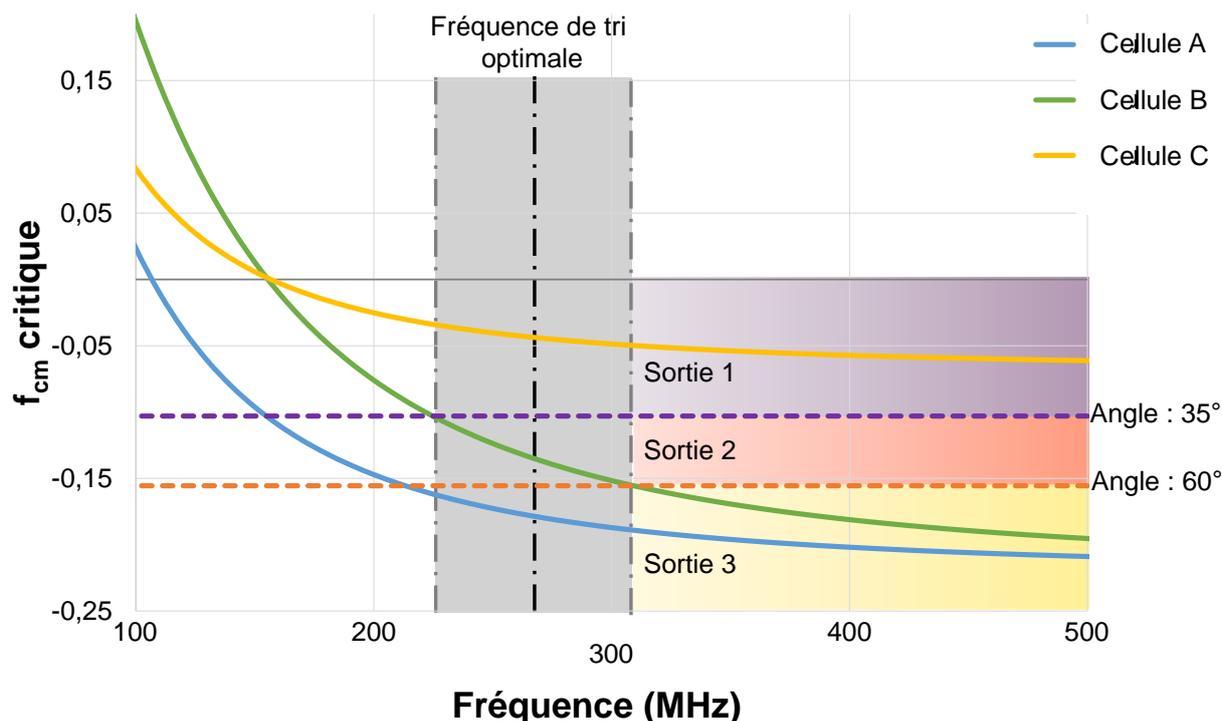


Figure.94 : évolution de f_{CM} de trois cellules différentes. Le choix des conditions de tri influence dans quelle sortie sont collectées les cellules. Conditions de tri optimales possible : Fréquence : 265 MHz +/- 45 MHz ; tension V_{pp} : 12,5 V ; vitesse flux : 6 mm.s^{-1} .

Il convient maintenant de sélectionner une vitesse de flux et une tension adaptées qui permettent de diriger la cellule B jusqu'à la sortie 2 et de l'isoler. Pour cela, une vitesse de 6 mm.s^{-1} et une tension de 12,5 V appliquées entre les électrodes distantes de 30 μm ont été choisies. Il aurait été possible de choisir également une vitesse de flux de 8 mm.s^{-1} avec une tension de 14,5 V pour arriver à des conditions de tri similaires. Mais les premières conditions correspondent à nos attentes c'est-à-dire une vitesse suffisante pour éviter la sédimentation et permettre une bonne observation en permettant de garder une tension raisonnable. Avec ces contraintes de déviation, nous avons un premier f_{CM} critique lié à l'angle α_1 de -0,10 et un second f_{CM} critique lié à l'angle α_3 de -0,16 pour un f_{CM} de la cellule B égale à -0,13 à 260 MHz. Ces conditions permettent ainsi d'isoler la cellule B des deux autres cellules.

Cette première méthode est fonctionnelle si nous ne cherchons à différencier que peu de cellules ou que celles-ci présentent une différence dans leurs valeurs de f_{CM} suffisamment importante. L'augmentation du nombre de courbes ajoutées pour chaque cellule considérée réduit l'utilité de cette méthode devenant de moins en moins lisible.

Une deuxième méthode de sélection de conditions de tri a donc été mise au point. Nous allons l'illustrer au travers d'un exemple qui portera sur deux populations cellulaires distinctes constituées de cellules présentant de fortes similitudes biologiques avec les autres cellules de sa population, mais peu avec l'autre. Ces deux populations cellulaires, appelées A et B, sont représentées sur un graphique selon leur conductivité et leur permittivité diélectrique à l'image de la Figure.95. Les caractéristiques diélectriques des cellules sont comprises dans les zones représentées en rouge pour la population 1 et en violet pour la population B.

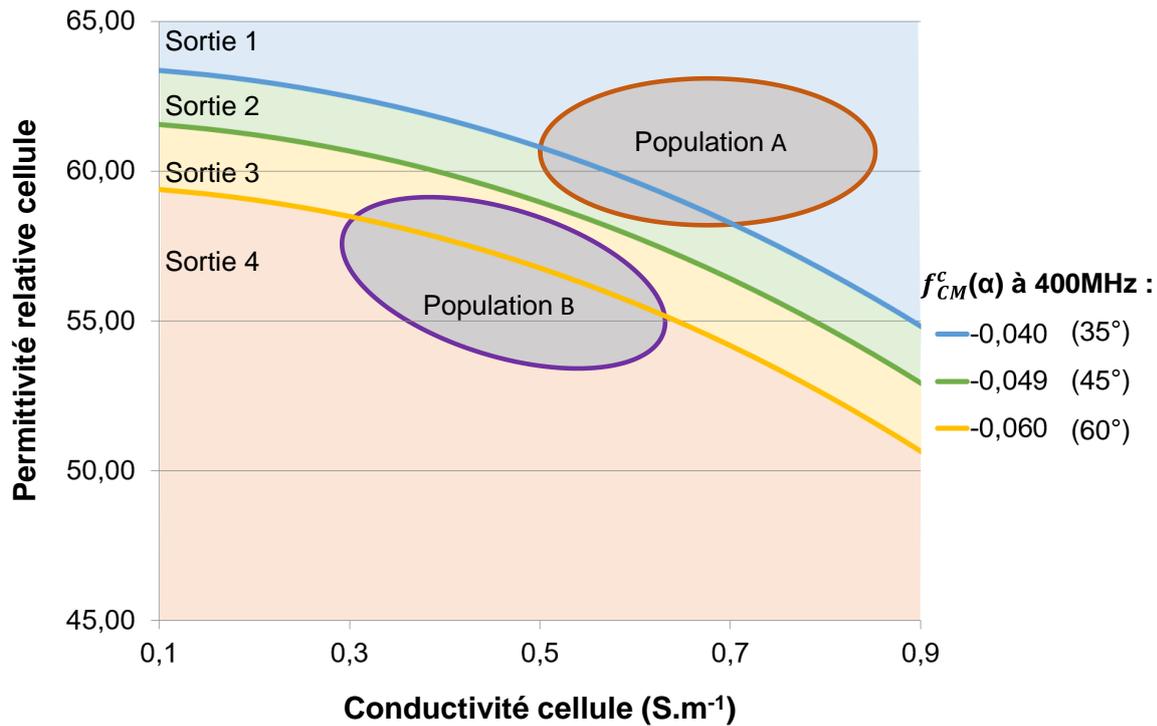


Figure.95 : Tri de deux populations cellulaires distinctes présentant des caractéristiques biologique différentes. En appliquant une tension de 10,1 V à 400 MHz et une vitesse de flux de 5 mm.s⁻¹ et avec des angles de 35°, 45° et 60° nous obtenons une séparation.

Comme présenté dans le chapitre 2 (cf. § II.1.3.2), pour une valeur de f_{CM} correspond plusieurs couples permittivité-conductivité possibles. Une cellule présente un f_{CM} plus grand qu'une valeur de f_{CM} donnée si ses caractéristiques diélectriques sont au-dessus de la courbe formée par les couples de valeurs diélectriques renvoyant à cette valeur de f_{CM} . Par exemple, pour la courbe verte (Figure.95), toutes les valeurs diélectriques qui la constituent permettent d'avoir un f_{CM} de -0,049 à 400 MHz. Des cellules qui posséderaient un couple permittivité-conductivité situé au-dessus possèdent un f_{CM} supérieur à -0,049. Au contraire, toutes les cellules dont les constantes diélectriques se situent en-dessous de cette courbe correspondent à des cellules ayant un f_{CM} plus petit. Ainsi, si nous fixons des conditions de tri pour avoir un f_{CM} critique de valeur -0,049, alors à 400 MHz la courbe verte de la Figure.95, présente les couples permittivité-conductivité maximums que doit avoir une cellule pour être déviée. Ainsi, toutes les cellules de la population B seront déviées puisqu'elles présentent des caractéristiques diélectriques en dessous de cette courbe. Au contraire, toutes celles de la population A ne seront pas déviées par le champ électrique le long du tronçon d'électrodes inclinées à 45° puisqu'elles ont des caractéristiques diélectriques situées au-dessus de cette courbe.

Ainsi, en utilisant le système décrit précédemment avec des électrodes disposées à 35°, 45° et 60°, nous pouvons cibler des conditions de tri pour avoir une contrainte de déviation avec un f_{CM} critique de -0,049 pour la pente de 45° à 400 MHz afin de séparer les populations A et B. Une telle condition est possible avec une vitesse de flux de 5 mm.s⁻¹ et une tension inter électrodes de 10,1 V. Nous aurions dans ces conditions, la population A guidée jusqu'aux sorties 1 et 2, car les cellules de cette population ne présentent pas des intensités de force DEP suffisantes pour être déviées et conduites jusqu'aux autres sorties. La population B elle, est guidée jusqu'aux sorties 3 et 4, les cellules pouvant être repoussées par les électrodes le

long des pentes de 35° et 45°. Une partie de la population serait même déviée le long de la pente de 60° jusqu'à la sortie 4.

Grace à ces deux représentations, fréquentielle ou par les caractéristiques diélectriques, il est possible de trouver une valeur critique de f_{CM} optimale qui permettrait la séparation des cellules ciblées et de déterminer les conditions de tri optimales nécessaires. Bien entendu, si des populations présentent d'importants recouvrements de caractéristiques diélectriques internes, il ne sera pas possible de les séparer en utilisant la diélectrophorèse aux fréquences UHF à moins qu'elles possèdent une différence de taille suffisante.

Au cours de cette partie, au travers de l'étude de la trajectoire de la cellule soumise au champ électrique et des forces qui l'influencent durant sa déviation, nous avons pu évaluer les caractéristiques minimales (facteur de Clausius-Mossotti critique (f_{CM}^c)) que doivent présenter une cellule pour que celle-ci soit efficacement déviée par le champ électrique.

A partir de l'équation de f_{CM}^c , nous avons montré que l'intensité du champ électrique et la vitesse du flux ont un rôle essentiel sur le tri effectif des cellules. En effet, nous avons vu qu'il devenait plus facile pour une cellule d'être déviée si l'intensité du champ électrique augmentait et/ou si la vitesse du flux diminuait. Ainsi, par la modulation de ses deux conditions, il est possible de modifier les contraintes de déviation et donc de guider les populations cellulaires d'intérêt dans les sorties souhaitées.

De plus, dans une zone de tri donnée, il est possible de subdiviser une population de cellules en différentes sous-populations en utilisant plusieurs segments d'électrodes d'inclinaison croissante. Ainsi, pour chaque angle d'électrode, il est possible de collecter une sous population pour laquelle les cellules présentent un f_{CM}^c trop faible pour être déviées par les électrodes. Toutes ces cellules traverseront alors le champ pour être collectées vers une sortie dédiée. Les autres cellules seront déviées et guidées jusqu'à un autre segment où l'angle présenté par les électrodes est plus obtus. Ainsi certaines cellules traverseront le champ électrique pour être collectées dans une autre sortie et d'autres continueront à être déviées jusqu'à un autre tronçon avec un angle plus obtus encore ou une dernière sortie.

Sur la base des conditions de tri que nous venons de voir et de l'influence des différents paramètres, nous allons, dans la partie qui suit, proposer un nouveau microsystème optimisé pour le tri cellulaire. Nous détaillerons ensuite le matériel expérimental utilisé pour réaliser les expériences qui nous ont permis de valider son fonctionnement.

III.3. Mise en place des expériences

Au cours de cette partie, vont être présentées deux implémentations de cytomètre en flux qui mettent à profit la diélectrophorèse exclusivement répulsive, pour trier les cellules en quatre sous-populations. Leur conception et fabrication étant très similaires au microsystème présenté au chapitre précédent, seules les différences de conception seront détaillées ici.

Nous étudierons également, les différentes trajectoires possibles lorsque les cellules parcourent ces nouveaux microsystèmes au travers d'expérimentations avec un focus spécifique sur l'impact des changements d'angles présentés par les géométries d'électrodes implémentées. Enfin, pour terminer cette partie, les équipements utilisés pour réaliser nos expériences seront présentés ainsi que la population de cellules choisie comme référence pour démontrer l'efficacité de notre système de tri.



III.3.1. Conception et fabrication d'un microsystème de tri optimisé

La nouvelle forme que prend le microsystème proposé présente le même nombre d'entrées et de sorties fluidiques que précédemment :

- 2 entrées (sur la droite Figure.96) : une pour injecter les cellules en suspension et une autre pour le buffer servant à focaliser les cellules.
- 1 sortie (sur la gauche Figure.96) : cette sortie unique est connectée à 4 canaux implémentés en sortie de la zone de tri.

Une ligne CPW 50 Ω , de 2 μm d'épaisseur permet d'amener le signal électrique jusqu'aux électrodes d'or disposées dans la zone de tri. Deux géométries de paires d'électrodes espacées de 30 μm ont été testées. Ces deux formes d'électrodes présentent 3 segments successifs à angles croissants : 35°, 45° et 60°. La zone de tri est munie d'un canal principal de 780 μm de large, le flux ne présente pas un profil parabolique selon l'axe appelé y précédemment à plus de 60 μm des bords. De plus, du fait de la longueur des électrodes qui est inférieure au millimètre, le signal électrique ne devrait pas perdre en puissance et permettre de maintenir un champ électrique d'intensité constante tout au long de ces dernières. Ainsi, la séparation des suspensions de cellules en quatre sous-populations devrait être uniquement liée au changement des angles des électrodes.

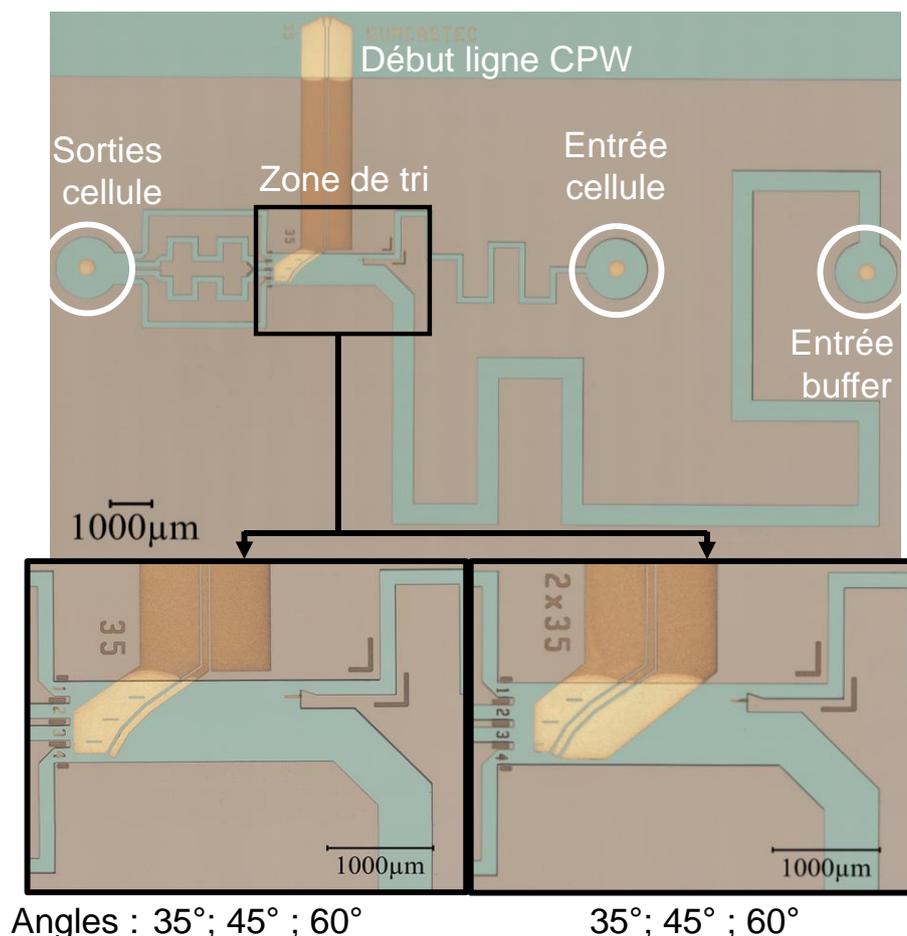


Figure.96 : Photographie d'une puce microfluidique avec zoom sur la zone de tri où deux formes d'électrodes sont présentées. Les canaux microfluidiques sont identiques pour les deux géométries.

Durant les expériences, la fréquence du signal DEP utilisé a été maintenue toujours supérieure à la plus haute fréquence de transition f_{x02} présentée par les cellules. Cela nous

permet de privilégier une influence nDEP en induisant majoritairement des réactions de répulsion sur les cellules grâce au système d'électrodes. En effet, nous avons vu dans le chapitre précédent que nous cherchions à éviter de travailler en pDEP.

Pour l'une des géométries, seules deux électrodes de la ligne CPW se prolongent dans le canal. En revanche pour la seconde, la ligne CPW continue dans le canal formant une double paire d'électrodes à 3 conducteurs présentant ainsi deux gaps au lieu d'un seul dans le canal microfluidique. Ces deux gaps présentent différents intérêts. Le premier est d'éviter une forte discontinuité dans la transmission du signal en maintenant une structure CPW tout au long de la propagation du signal DEP dans le microsysteme. Ainsi nous réduisons l'intensité de signal réfléchi avant d'entrer dans le canal en partie liée au changement de milieu (polymère vers milieu aqueux) et au changement de type de ligne de transmission s'il y a. Le second avantage est que cette seconde ligne de déviation ne perturbe en rien le fonctionnement visé (Figure.97) tout en offrant une seconde barrière de répulsion au cas où la première ne dévie pas une cellule qui aurait dû l'être.

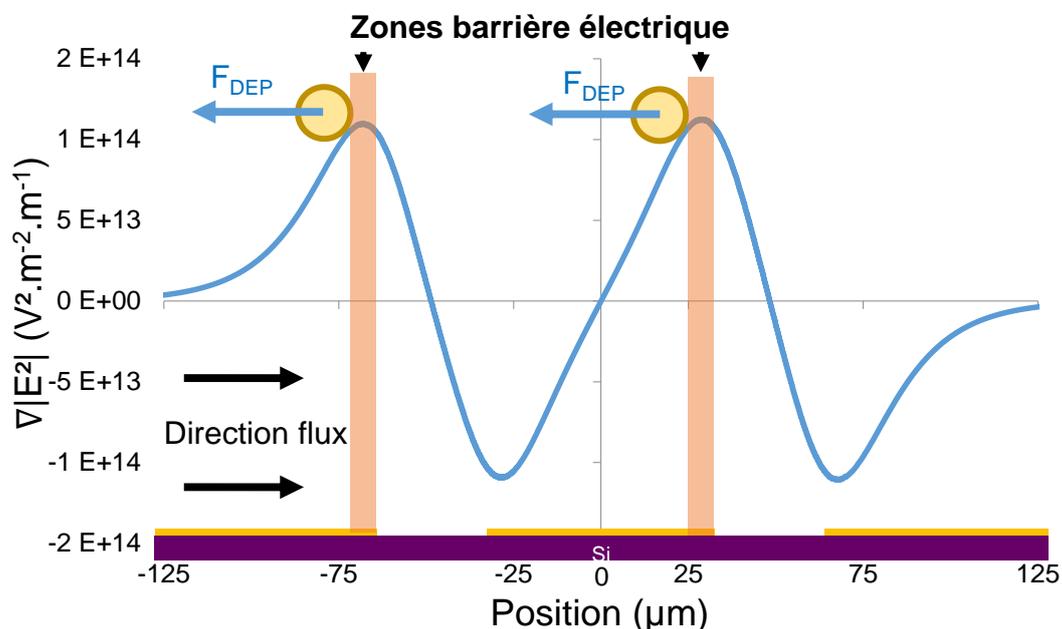


Figure.97 : Gradient de champ à la perpendiculaire de la ligne CPW immergée dans le canal. Les maximums de champs positifs vont être les zones qui vont permettre de dévier le plus efficacement les cellules. En jaune sont représentées les électrodes polarisées à 600 MHz par un signal de 5 Vpp. Hauteur observée : 20 µm. Simulation réalisée avec COMSOL Multiphysics.

Sur la Figure.97, nous pouvons observer que le gradient de champ reprend par deux fois la même forme avec un maximum juste en amont de chaque gap (cf. § II.2.1). En implémentant une électrode centrale de 65 µm de large, les maximums et minimums de gradient de champ sont de même intensité. Ceci n'est pas le cas si nous considérons une électrode centrale plus petite que 50 µm, les électrodes disposées de chaque côté de celle-ci étant de même polarité, le champ se retrouve comprimé. Dans cette situation, minimum et maximum situés au-dessus de l'électrode centrale présentent une intensité plus faible comme nous pouvons le voir sur la Figure.98 avec une électrode centrale de 40 µm de large. Les autres pics eux ne sont pas modifiés.

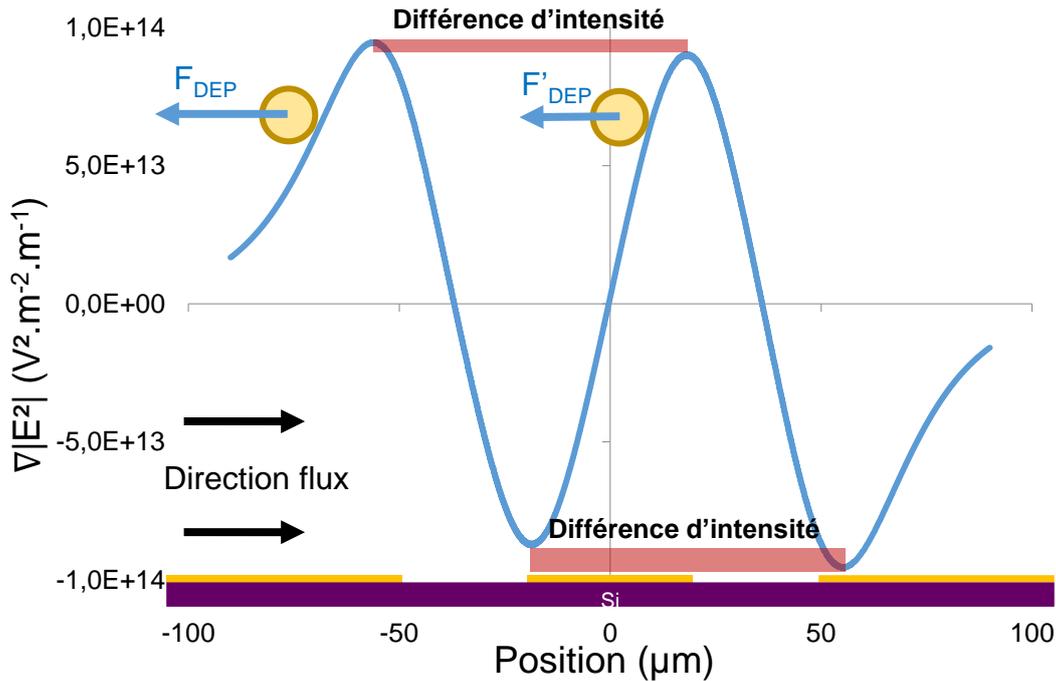


Figure.98 : Perte d'intensité des maximums de gradient de champ centraux avec une électrode centrale de 40 μm . En jaune sont représentées les électrodes polarisées à 600 MHz par un signal de 5 Vpp. Hauteur observée : 20 μm . Simulation réalisée avec COMSOL Multiphysics.

Lorsque le gradient de champ est positif, la force DEP s'opposera au flux ralentissant la cellule voir l'arrêtant. Au contraire, si le gradient de champ est négatif, la cellule est accélérée dans le même sens que le flux. Du fait de la présence des deux gaps successifs de part et d'autre de l'électrode centrale de 65 μm de large, cette géométrie d'électrodes CPW présente deux zones de déviations efficaces pour les cellules et de même intensité de champ électrique.

Sur le même principe que le premier prototype présenté au cours du chapitre 2, les résistances fluidiques des deux entrées sont identiques et largement supérieures aux résistances fluidiques de chaque sortie ; ces dernières sont identiques entre elles. Concernant les largeurs des canaux, la zone centrale fait 780 μm , l'entrée buffer 510 μm , tous les autres canaux microfluidiques font 150 μm .

Le procédé de fabrication des électrodes est identique à celui utilisé pour le prototype présenté durant le précédent chapitre (cf. § II.4.3), les canaux microfluidiques, quant à eux, ont été réalisés avec une autre approche. Cette fois-ci, les canaux ont été structurés par photolithographie UV d'un film sec de 50 μm d'épaisseur (Figure.99). Ce film DF-1050, produit par l'entreprise EMS, est une résine négative qui a été laminée sur la puce après réalisation des électrodes. Les canaux sont définis par photolithographie et gravés au moyen d'une solution de cyclohexanol. Ils sont ensuite fermés au moyen d'un capot amovible de PDMS qui est pressé contre la puce. La pression appliquée sur le PDMS fait varier la hauteur des canaux entre 35 et 45 μm .

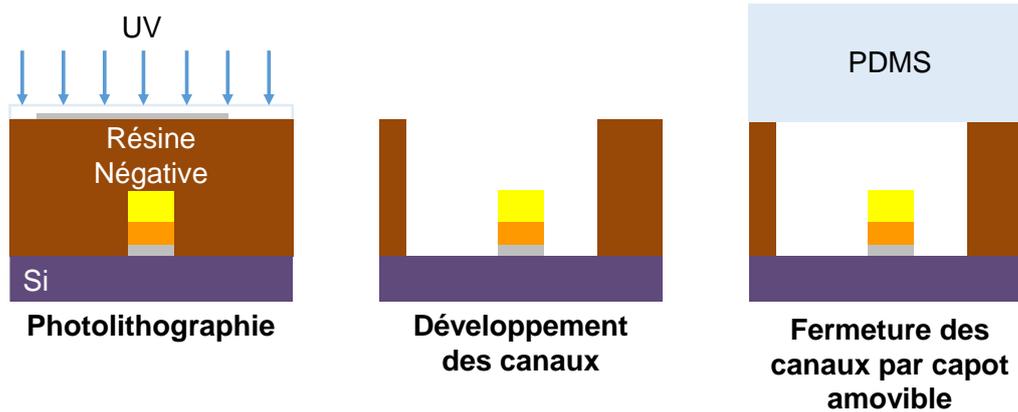


Figure.99 : Réalisation des canaux par lithographie UV d'un film sec de résine négative laminée au-dessus des électrodes.

Cette nouvelle méthode de fabrication permet de faciliter l'alignement du capot de PDMS avec le reste de la puce. En effet, avec des canaux imprimés directement dans le capot PDMS, un mauvais alignement peut changer l'angle du flux par rapport aux électrodes. En définissant directement les canaux sur la puce, un décalage avec les électrodes n'est plus possible après la fabrication, ce qui permet d'améliorer fortement la reproductibilité des expériences. De plus, le laminage d'un film sec permet d'avoir une épaisseur de résine plus homogène qu'un étalement de résine à la tournette qui génère pour de fortes épaisseurs des effets de bords souvent problématiques.

III.3.2. Trajectoires des cellules et conditions de traversée du champ électrique

Nous pouvons observer sur la Figure.100 la répartition des cellules selon les 4 sorties. Ces images sont la compilation de deux enregistrements vidéo de deux manipulations durant lesquelles les conditions de tri n'ont pas été modifiées. Les différentes sorties collectent les cellules selon leur différence d'intensité de réaction au champ électrique. La sortie 1 (tout à gauche Figure.100) collecte les cellules possédant les plus faibles intensités de réaction nDEP, tandis que la sortie 4 (tout à droite Figure.100) collecte les cellules présentant les plus fortes réactions. Plus le numéro de la sortie est grand plus l'intensité de force DEP nécessaire pour l'atteindre doit être importante.

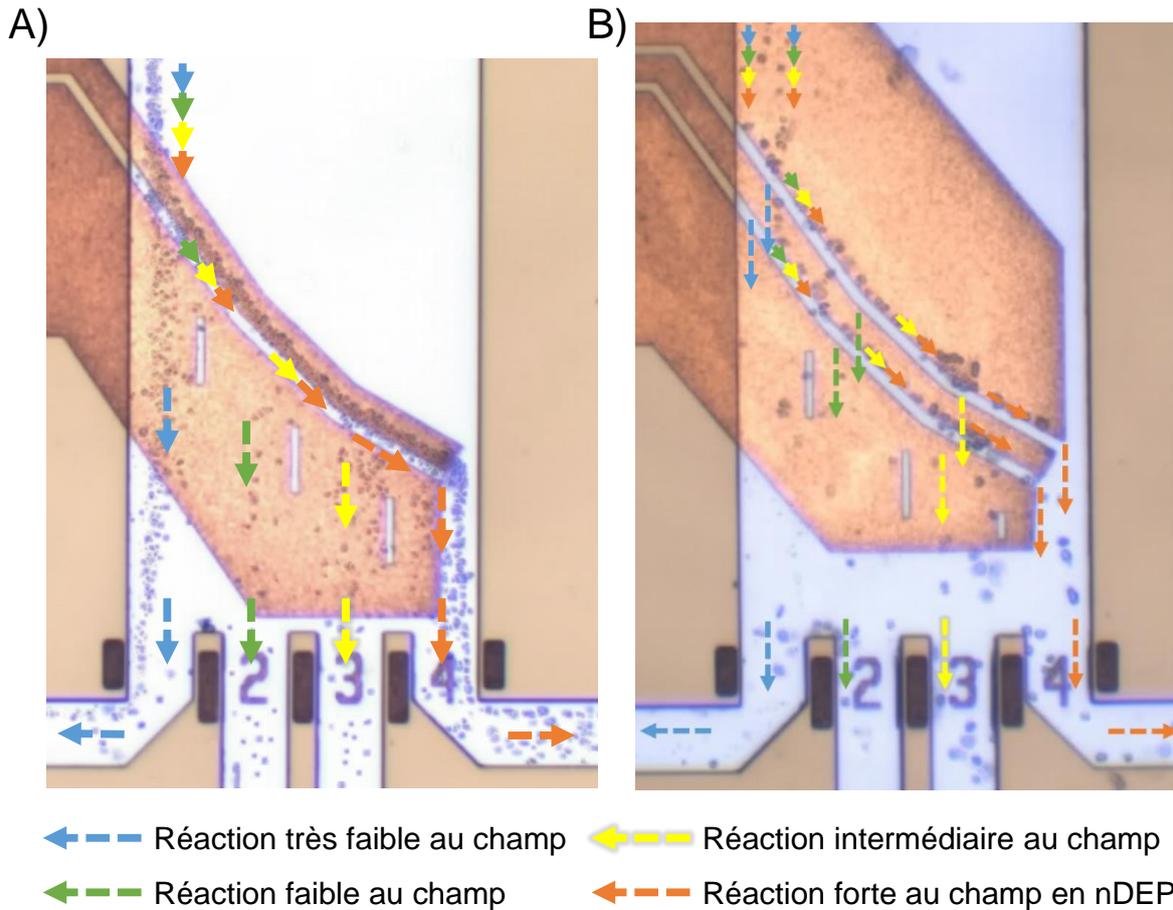


Figure.100 : Compilation d'images des trajectoires possibles des cellules en fonction de leur réaction répulsive au champ.

En considérant la même vitesse de flux sur la largeur du canal et la même intensité de champ électrique s'exerçant tout au long des électrodes, seuls les angles d'inclinaison des différents segments d'électrodes impactent la valeur de f_{CM}^c nécessaire à la déviation des cellules (cf. équation (14)). L'impact des modifications d'inclinaison des électrodes sur les f_{CM}^c correspondants peut être au préalable évalué comme décrit par l'équation (15). Ainsi, pour un angle d'inclinaison α donné, nous aurons $f_{CM}^c(\alpha)$ qui peut être comparé à un angle de référence α_{ref} :

$$\frac{f_{CM}^c(\alpha)}{f_{CM}^c(\alpha_{ref})} = \frac{\frac{-3 v_f \mu_f \sin(\alpha)}{r^2 \cdot \epsilon_f \cdot \nabla |E^2|}}{\frac{-3 v_f \mu_f \sin(\alpha_{ref})}{r^2 \cdot \epsilon_f \cdot \nabla |E^2|}} = \frac{\sin(\alpha)}{\sin(\alpha_{ref})} \quad (15)$$

Au final, le rapport d'intensité nécessaire permettant de dévier efficacement une cellule en réponse au champ électrique entre deux segments, est le rapport du sinus de leurs angles d'inclinaison respectifs. Si nous utilisons le premier angle de 35° comme référence, nous obtenons les résultats de la Figure.101. De ces calculs nous pouvons voir que pour suivre l'inclinaison de 45° , la valeur minimale de f_{CM}^c permettant à une cellule d'être déviée est 23% supérieure à celle de l'angle de 35° . Pour ce qui est de l'intensité minimale de f_{CM}^c pour l'inclinaison de 60° , c'est une intensité 51% supérieure que pour l'angle de 35° .

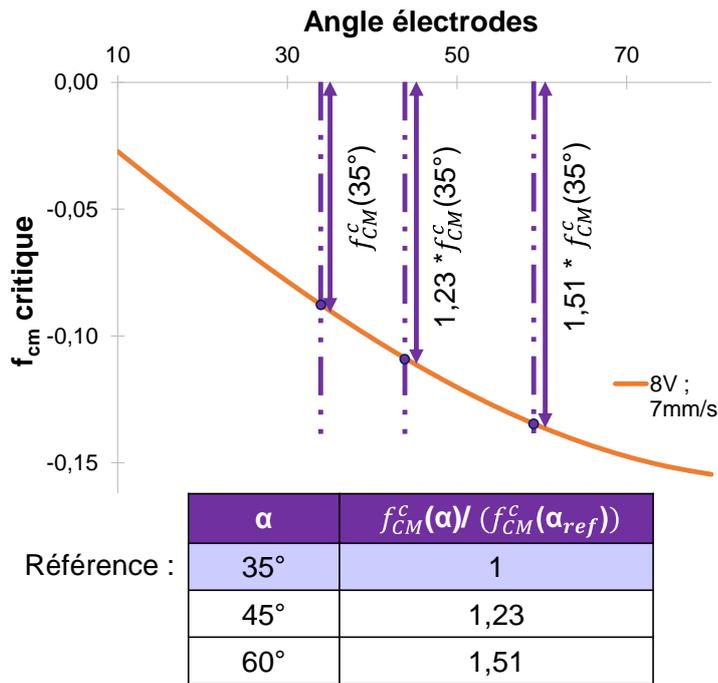


Figure.101 : Impact de l'inclinaison des trois segments de la zone de tri sur la séparation des cellules. L'angle du premier segment est l'angle de référence utilisé pour calculer le rapport entre les f_{CM}^c .

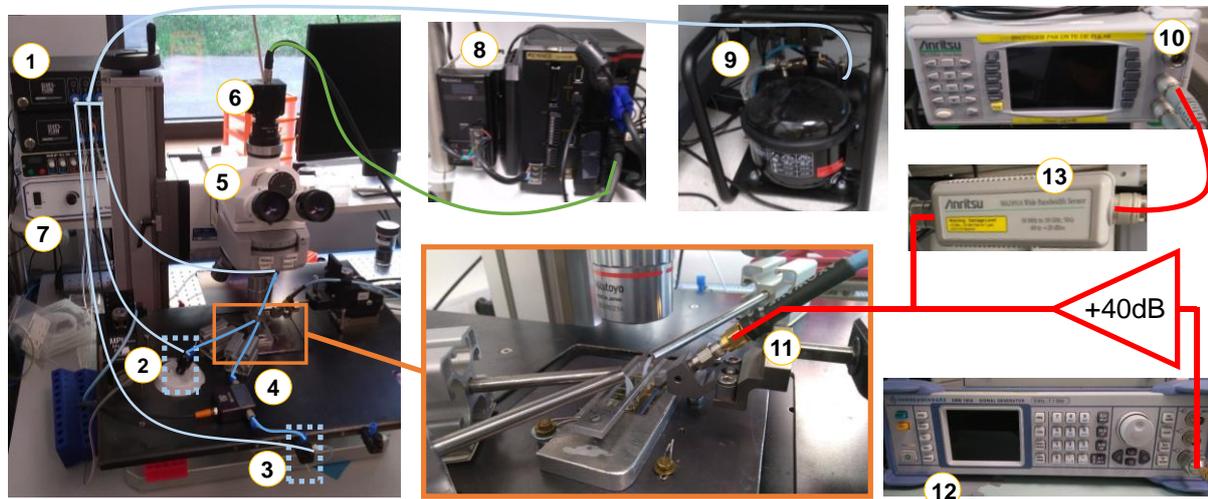
Ainsi, quelles que soient les conditions de manipulation, la sortie 1 collecte les cellules dont le rapport entre leur facteur de Clausius-Mossotti et $f_{CM}^c(\alpha_{ref})$ est inférieur à 1 ($\frac{f_{CM}^{cellule}}{f_{CM}^c(\alpha_{ref})} < 1$). La sortie 2 capte les cellules présentant un rapport entre f_{CM} et $f_{CM}^c(\alpha_{ref})$ compris entre 1 et 1,23. La sortie 3 celles dont le rapport est entre 1,23 et 1,51. Enfin la sortie 4 collecte toutes les cellules dont le rapport est supérieur à 1,51.

III.3.3. Banc expérimental

Le matériel utilisé pour mettre en œuvre les manipulations est présenté dans la Figure.102. Certains de ces équipements sont utilisés spécifiquement pour établir et contrôler les conditions fluidiques, d'autres pour paramétrer et ajuster les conditions électriques et appliquer le signal DEP aux microsystèmes. Un ensemble d'outils de visualisation optique et de suivi automatisé des trajectoires complète le banc expérimental.

Du point de vue fluide : un compresseur (Figure.102.(9)) apporte la surpression nécessaire au contrôleur de pression pour fonctionner (Figure.102.(1)). Celui-ci possède quatre voies indépendantes permettant d'imposer des pressions jusqu'à 200 mbar avec une précision de 0,01 mbar. Deux de ces voies serviront pour pressuriser les entrées de notre système, et une troisième pour appliquer une contre pression sur la sortie unique du microsystème. Des tuyaux (représentés en bleu clair) acheminent cette surpression d'air jusqu'à des microtubes Eppendorf® (Figure.102.(2)) où se trouvent les solutions liquides et suspensions cellulaires à injecter dans le cytomètre ou à collecter à sa sortie. Des capillaires de petit diamètre (bleu foncé) relient les microtubes Eppendorf® au microsystème ; leur diamètre intérieur est de 500 μm pour le buffer et la sortie, et de 150 μm pour l'entrée des cellules. En effet, un diamètre plus fin est utilisé pour l'injection des cellules afin de réduire le

volume de suspension nécessaire pour remplir le microtube et ainsi limiter les effets de volume mort et de sédimentation à faible flux. Sur le microtube d'injection du buffer est installé un flux mètre (Figure.102.(4)) afin d'avoir une mesure en temps réel du débit qui arrive au niveau de la zone de tri. Un débitmètre ne pourrait pas être placé de la même manière pour l'autre entrée, car de par leur présence, les cellules peuvent gêner la bonne mesure ou même en adhérant au système l'endommager.



- | | | | |
|---|--|---|--|
| ① Contrôleur de pression ELVFLOW OB1 MK3 | ④ Fluxmètre ELVEFLOW 0,4 - 7 $\mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ | ⑦ Source de lumière du microscope | ⑩ Puissance mètre Anritsu M1.2496A |
| ② Eppendorf suspension de cellules ($\approx 4 \text{ M/mL}$) | ⑤ Microscope | ⑧ Système de visualisation CV-X470F Keyence | ⑪ Pointe RF sur micro manipulateur |
| ③ Eppendorf buffer | ⑥ Caméra couleur 21Mpx CA- H2100C Keyence | ⑨ Compresseur Pression assurée : 5 bar | ⑫ Générateur de signal RF R&S SMB 100A |
| | ⑬ Sonde de puissance Anritsu Bande de mesure : 10 MHz- 18 GHz | | |

Figure.102 : Photographies du banc expérimental. Les équipements de 1 à 4 et 9 permettent le contrôle des conditions fluidiques. Les équipements de 6 à 8 permettent l'observation et le suivi visuel des expériences, et les équipements de 10 à 12 complétés par un amplificateur puissance de gain 40 dB permettent d'appliquer le signal électrique DEP au microsystème.

D'un point de vue électrique : Un générateur de signaux CW (Figure.102.(12)) génère un signal monofréquence ajustable. Dans notre cas, les fréquences utilisées varient entre 250 MHz et 500 MHz. La puissance maximale que peut délivrer le générateur, sans effet de saturation, étant insuffisante (inférieure à 10 dBm), une amplification de +40 dB est réalisée. Une sonde de puissance (Figure.102.(13)) prélève une faible partie de cette puissance pour l'envoyer au puissance mètre (Figure.102.(10)) qui permet une mesure temps réel, quelle que soit la fréquence du signal DEP, de l'amplitude de tension appliquée aux électrodes grâce à une pointe RF de probing (Figure.102.(11)) qui est posée en contact avec la ligne CPW du microsystème.

D'un point de vue de l'observation et du suivi optique : Un microscope (Figure.102.(5)) équipé d'une caméra au capteur CMOS 21 MPixels (Figure.102.(6)) permet d'observer la zone de tri avec un zoom de l'ordre de $\times 100$. L'éclairage est fait par réflexion grâce à une source de lumière blanche (Figure.102.(7)). Les images de la caméra sont récupérées par le système de traitement d'images automatique paramétrable CV-X470F (Figure.102.(8)) qui permet le comptage automatique des cellules comme nous le verrons par la suite.



III.3.4. Population cellulaire de référence utilisée

Les résultats d'expériences que nous allons présenter ont été réalisés sur des cellules humaines de glioblastome de la lignée ATCC U87-MG. Notre intérêt pour ces cellules est lié à la forte hétérogénéité biologique [8] que celles-ci présentent. Grâce à cette hétérogénéité biologique, nous disposons d'une large dispersion des propriétés diélectriques qui se retrouvent au niveau des fréquences de transition mesurées sur ces cellules comme en témoigne la Figure.103. Il est donc aisément possible de mettre en évidence l'impact des propriétés diélectriques dans la déviation des cellules vers les différentes sorties de notre système.

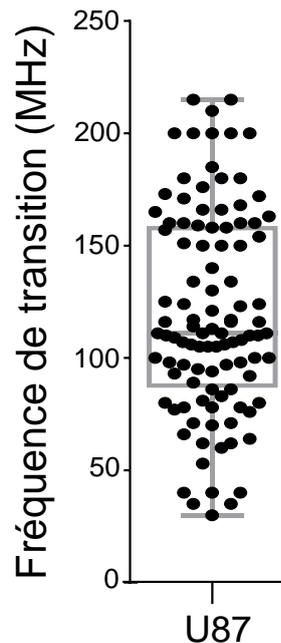


Figure.103 : Deuxième fréquence de transition f_{x02} des cellules de lignée U87-MG. La moyenne des fréquences f_{x02} est de 111 MHz, la plus haute fréquence est de 215 MHz et la plus basse fréquence est de 30 MHz. La population présente un écart type de 45 MHz. [9]

Pour rappel, le système de tri développé fonctionne exclusivement en nDEP, ainsi, la fréquence du signal appliqué entre les électrodes sera toujours supérieure à 215 MHz qui représente la plus haute f_{x02} enregistrée sur cette population cellulaire.

Les cellules de la lignée U87-MG ont été approvisionnées auprès de l'« American Type Culture Collection » (ATCC, Manassas, Virginie, Etats Unis). Elles ont étéensemencées dans des flasques appropriées avec une concentration de $5 \cdot 10^5$ cellules viables/ml et ont été cultivées par l'équipe CAPTuR de l'EA3842 de l'Université de Limoges durant 5 jours dans un milieu DMEM complété par 10% de SVF, 1% d'antibiotiques PEN / STREP, 1% de non-essentiels acides aminés MEM (venant de Gibco) et 1% de bicarbonate de sodium (venant de Gibco). La culture a été maintenue dans un incubateur à 37 °C dans un air humidifié à 5% et sous 95% de CO₂. Ensuite, ces cellules adhérentes sont détachées sous l'action de 3 ml de trypsine à 37 °C et cela durant 5 minutes. Après deux lavages et centrifugations, les cellules sont mises en suspension dans le milieu non ionique spécifiquement utilisé pour nos manipulations.

La concentration des cellules est ajustée entre 3,5 et 4 millions de cellules/ml afin de limiter l'agglomération des cellules entre elles. Ainsi les cellules passeront dans notre système de tri avec une densité permettant des acquisitions de plus d'une centaine d'évènements sur

une minute, sans gêner le tri par la formation d'agglomérats cellulaire par l'effet de sédimentation dans Eppendorf®.

Le milieu de suspension utilisé lors des expérimentations est un milieu de survie, présenté précédemment au cours du chapitre II (cf. § II.2.2). Il présente une osmolarité de 304 mOsm/L du fait de la présence du saccharose dans l'eau dé-ionisée. Ainsi, le milieu présente un pH de 7,4, une permittivité relative de 72 et une conductivité de 38 mS/m. Dans ce milieu, les cellules prennent une forme sphérique (Figure.104.B et Figure.104.C) qu'elles ne possèdent pas dans leur milieu de culture où elles ont tendances à devenir adhérentes (Figure.104.A). Après quelques heures dans ce milieu de survie, les cellules présentent une plus faible capacité d'adhérence entre elles ou vis-à-vis des surfaces [10].

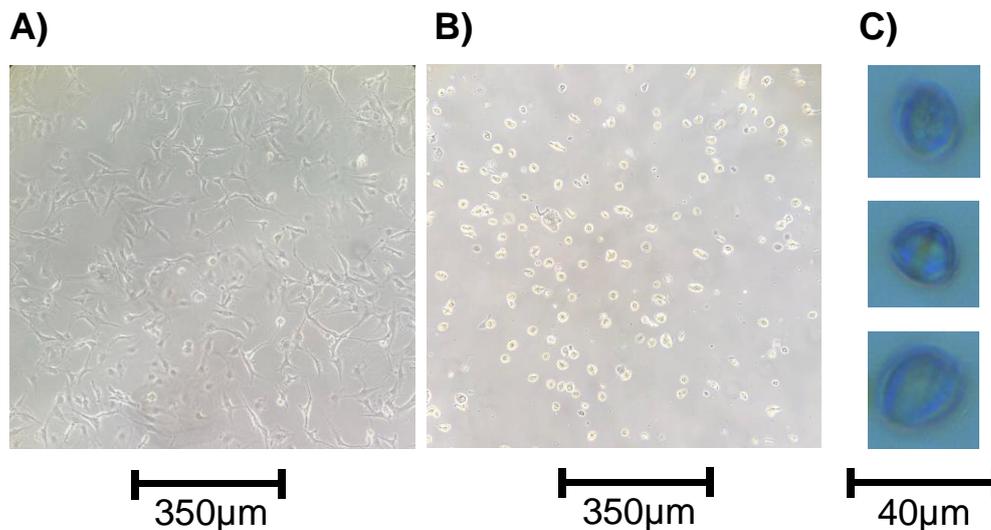


Figure.104 : Photos de cellules U87-MG. A) cellules dans leur milieu de culture ; B) cellules après plusieurs minutes dans le milieu de manipulation ; C) zoom sur des cellules dans le milieu de manipulation soumises à un champ électrique.

Ces cellules présentent une distribution de taille de forme gaussienne (histogramme bleu Figure.105) avec un diamètre moyen de 16,97 µm mesuré par l'équipe CAPTuR au moyen d'un Coulter Counter Beckman. Les événements de tailles inférieures à 9 µm présents dans l'histogramme, correspondent à des événements qui ne sont pas à considérer car ils sont essentiellement générés par des débris cellulaires et non des cellules. Nous retrouvons la présence de ces débris au cours de nos manipulations qui, comme nous le verrons par la suite, nécessiterait l'implémentation d'un filtre pour ne pas les considérer lors de nos manipulations.

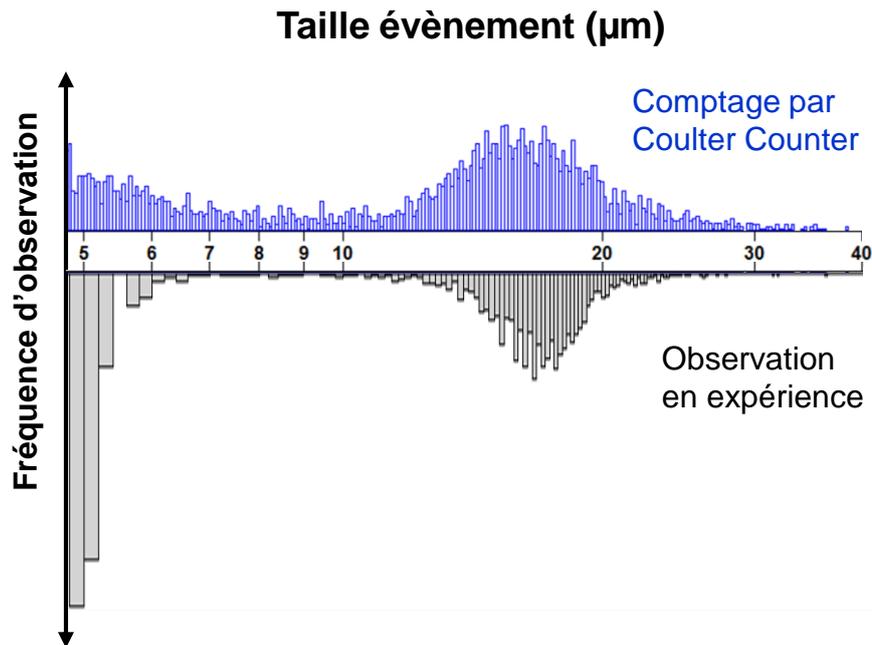


Figure.105 : Histogramme de la répartition de la taille des cellules mesurées au Coulter Counter classique (bleu) sur 11000 évènements dans le milieu de survie et les tailles constatées au cours de nos manipulations (noir) sur 4000 évènements.

La Figure.105 est complétée par l'histogramme des tailles observées lors d'une de nos manipulations (histogramme noir) à l'aide du système de traitement d'images automatique (CV-X470F) qui enregistre la taille des évènements détectés. Cet outil étant central à l'analyse des résultats, la comparaison des tailles observé avec un outil de référence permet de vérifier son bon fonctionnement.

Dans les comptages, nous retrouvons des évènements de petites tailles en grande quantité qui s'apparentent à des débris cellulaires et les cellules de tailles supérieures à 10 µm. Nous retrouvons sur les plus grosses particules une distribution de tailles de forme gaussienne assez similaire entre notre outil et les mesures au Coulter Counter, la répartition de taille au cours de nos expériences est légèrement plus resserrée. La moyenne que nous avons enregistrée est légèrement supérieure avec un diamètre moyen de 17,08 µm. Du fait de leur taille moyenne proche de 17 µm, les cellules subissent une accélération moyenne de l'ordre de 40 µs nous permettant de rester dans des conditions permettant de négliger l'accélération.

En revanche, la distribution gaussienne des tailles fait que la majorité de la population s'étale sur ± 3 µm autour de la médiane. Ainsi, la dispersion de taille de la population cellulaire pourra influencer la force DEP au maximum de $\pm 33\%$ par rapport au diamètre moyen mesuré pour la population cellulaire.

Au cours de cette seconde partie, de nouveaux prototypes de cytomètres sur puce ont été présentés en introduisant de nouvelles géométries d'électrodes de déviations et une nouvelle approche pour fabriquer les canaux microfluidiques par laminage d'une résine négative directement sur les électrodes. Cette méthode permet ainsi d'obtenir une meilleure homogénéité de la hauteur des canaux comparés aux précédents canaux directement

imprimés dans le PDMS, mais surtout de faciliter le bon alignement des électrodes et des canaux et d'assurer une reproductibilité des performances de tri entre chaque manipulation.

Le banc expérimental utilisé lors des expérimentations a été également présenté. Un suivi de la puissance du signal DEP transmise au système d'électrodes est réalisé en temps réel ainsi que le débit du flux de buffer permettant un contrôle des conditions de tri lors de nos expériences.

Nous avons pu en particulier voir que les changements d'inclinaison des différents segments constituant les électrodes ont un impact majeur sur les trajectoires possibles des cellules. Ceci peut être mis à profit pour ainsi générer la séparation des cellules selon leur degré de répulsion par rapport au champ électrique généré entre les électrodes. Du fait de cette géométrie, nous pouvons collecter ces groupes de cellules isolés les uns des autres entre les différentes sorties de la zone de tri. Ainsi, sur ce principe, de nouveaux prototypes ont été fabriqués et doivent permettre de trier des suspensions cellulaires en constituant jusqu'à quatre sous-populations. Leur fonctionnement se base exclusivement sur l'utilisation de forces DEP répulsives. Dans les expériences qui ont été réalisées à partir de suspensions de cellules U87-MG, nous utiliserons des fréquences de signaux DEP comprises entre 250 MHz et 500 MHz. En effet cette gamme de fréquence prend en compte que les fréquences de transition les plus hautes de ce type cellulaire (Figure.14) se situent autour de 215 MHz, garantissant le fonctionnement du cytomètre en nDEP exclusivement.

Dans la prochaine partie, nous allons nous intéresser aux derniers éléments nécessaires pour la réalisation des expériences liés au système dédié au traitement d'images qui nous permet de réaliser un comptage et un suivi automatique des particules en temps réel.

III.4. Conditions expérimentales et observations optiques

Dans cette troisième partie, nous détaillerons les conditions dans lesquelles se déroulent les manipulations et la confiance que nous pouvons avoir dans celles-ci. Nous présenterons en premier lieu le système automatisé CV-X470F (Figure.102.(8)) qui permet de compter et d'estimer la taille des cellules collectées à chaque sortie. Puis, nous détaillerons comment nous avons pu estimer l'erreur statistique obtenues au cours de nos expériences de tri cellulaire. En effet, il n'est pas possible, pour chaque condition de tri, d'observer toute la population cellulaire traitée, ainsi ce que nous observons n'est qu'une petite proportion de sa diversité biologique et cela entraîne ainsi un pourcentage d'erreur à considérer dans nos résultats. Nous expliquerons donc quelles sont les tailles d'échantillons nécessaires pour rendre l'acquisition représentative de la population. Enfin, nous présenterons les conditions de manipulation à respecter pour le bon déroulement du tri. Sur ces bases, nous présenterons des premiers résultats pour lesquels la reproductibilité de notre comptage nous a permis d'opérer avec des conditions de tri similaires.

III.4.1. Suivi automatisé

Au cours des expériences que nous avons pu mener, plus d'une centaine de cellules par minute peuvent passer par la zone de tri. Cela rend le comptage manuel des cellules complexe voire laborieux malgré l'enregistrement vidéo fait au niveau de la zone de tri au cours des expériences. Afin d'assurer un suivi de ces cellules précis et rapide, le contrôleur CV-X470F (CVX) de Keyence analyse les images de la caméra d'observation. La Figure.106 présente la fenêtre de suivi du CVX. Nous y retrouvons l'image prise par la caméra



(Figure.106.(3)). Dans cette image, six zones sont encadrées en rouges, une au niveau des quatre sorties du système à gauche, une sur la largeur du canal et enfin une dernière zone au début de la zone de tri, là où les cellules sont focalisées dans la largeur du canal.

C'est dans ces zones définies que le système CVX analyse l'image prise par la caméra, à l'aide d'outils de détection, afin de réaliser une reconnaissance automatique de forme et de taille. Ces outils, détaillés plus bas, modifient leur zone d'image afin de faciliter la détection. Ensuite, l'image modifiée est analysée, permettant de récolter des informations sur les événements qui sont détectés, dans notre cas les cellules, indiquant, s'il y en a, le nombre d'évènements observés et pour chacun précise leur position, taille, etc... Nous pouvons voir une partie de ces informations sur la Figure.106.(4). Toutes ces informations peuvent être récupérées dans un fichier enregistré sur le CVX que nous traiterons pour extraire nos résultats expérimentaux.



Figure.106 : Interface du système CVX et zones de détections pour notre microsysteme. 6 zones sont configurées : une pour chaque sortie, une en entrée et une avant les sorties.

Cette détection en temps réel fonctionne lors du lancement d'une acquisition. Au cours d'une acquisition, les données sur les évènements sont récoltés pour les conditions de tri (vitesse du flux, puissance et fréquence du signal DEP) maintenues constantes et sur une période de plusieurs minutes jusqu'à ce qu'un nombre représentatif de cellules soient détectés. Ensuite, l'acquisition est stoppée, les conditions de tri changées, permettant de lancer une nouvelle acquisition. Les résultats sont récupérés dans le même fichier que la précédente acquisition,

ce qui permet d'analyser l'ensemble des acquisitions à la fin de l'ensemble des expérimentations.

Tout le long de l'acquisition, une image est prise par la caméra et affichée à l'écran. Cette image est analysée, les informations sur les événements ou leur absence sont enregistrées, et le processus recommence pour une nouvelle image et ainsi de suite jusqu'à l'arrêt de l'acquisition. Le CVX cadence ainsi la prise d'image à un rythme qui dépend principalement du temps de traitement de l'image. Celui-ci dure de l'ordre de plusieurs dizaines de millisecondes et est variable d'une image à l'autre. Durant ce temps les six zones encadrées en rouge de l'image sont traitées par des outils d'analyse.

Chaque outil d'analyse, est lié à une seule zone de détection (cadres rouges Figure.106.(3)). Différents types d'outils existent suivant si des formes ou des amas veulent être détectés. Dans notre cas, c'est l'outil « nombre d'amas sombres (lumineux) » qui nous sert à compter les amas de pixels d'intérêt présents dans la zone au moment d'une capture d'image. Pour notre utilisation, 4 zones de détections sont indispensables : une par sortie. Les deux autres zones sont également utilisées mais elles auront une importance moindre dans nos résultats.

A chaque outil est attribué un filtre. Le filtre modifie l'image qui est étudiée par le CVX afin de faire ressortir ou d'améliorer le contraste dans les zones d'intérêt. Pour notre outil, qui reprend l'image actuelle en nuance de gris, nous avons besoin du filtre « soustraction » qui permet de faire ressortir les pixels qui diffèrent entre l'image actuelle et une image de référence. Cette image de référence est prise en début d'expérience quand aucune cellule n'est visible dans le microsysteme.

Ainsi si l'image acquise durant la manipulation ne présente pas de cellule, alors aucune différence n'existera avec l'image de référence, et ainsi aucune détection ne sera faite (Figure.107.A)).

Dans le cas contraire, si une cellule est présente dans la zone de détection (Figure.107.B)), alors celle-ci apparaîtra en blanc dans la zone, un amas sera reconnu par le CVX et à l'écran une croix est ajoutée au-dessus de l'amas de pixel pour indiquer le centre de gravité de la cellule. Il est important de bien faire attention à ce que l'image acquise soit la plus proche possible de celle de référence sinon des erreurs de détection surviennent (Figure.107.C)).

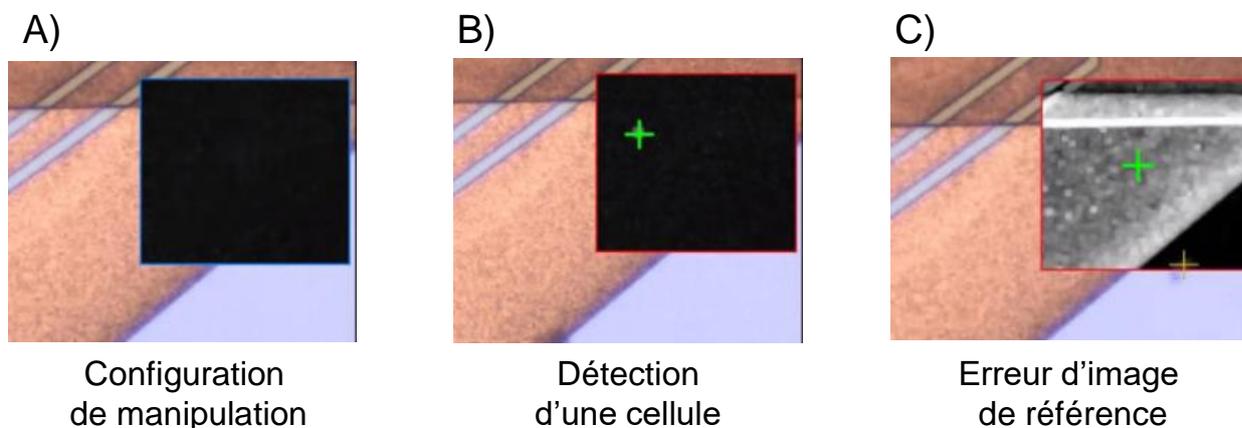
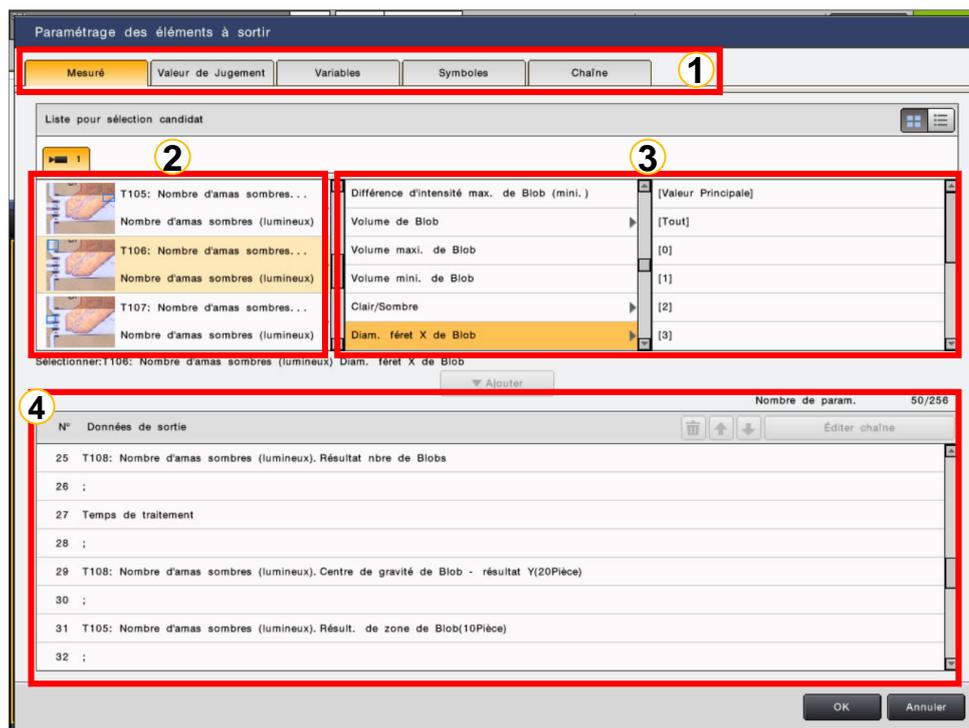


Figure.107 : Fonctionnement d'une zone de détection configurée. A) l'image de référence est identique à l'image actuelle : aucune détection faite ; B) Une cellule passe, elle ressort en tant que tache blanche et le CVX la marque d'une croix ; C) décalage de l'image de référence par rapport à l'image acquise, l'or est détecté, aucune acquisition n'est possible.

Une fois que la configuration des zones de détection est faite, il est nécessaire de configurer les données récupérées. Différentes options sont possibles, par exemple : récupérer la totalité des images acquises ou uniquement l'image prise au moment où une détection d'amas est réalisée, envoyer un signal électrique en sortie du CVX, ... Dans notre cas, nous récupérerons un fichier tableur dans lequel, chaque ligne représente une image traitée et où sont inscrites les informations souhaitées tel que l'instant de traitement et des informations sur les amas détectés.

La Figure.108 illustre qu'un nombre important de données qui sont disponibles grâce au système de traitement d'images. En particulier, pour chacun des outils utilisés, il est possible de récupérer le nombre d'évènements vu par l'outil dans sa zone de détection, les coordonnées dans le plan de l'image des évènements identifiés dans la zone de détection, leur taille ou leur intensité de gris. Les informations qui nous seront les plus utiles sont les suivantes :

- Taille des évènements détectés dans chaque zone (en pixel)
- Date et heure de la capture (au plus précis à la seconde près)
- Le temps de traitement (précision de 0,1 milliseconde)
- Le nombre d'évènements détectés
- Leur taille
- Leurs coordonnées



- ① Différents types de données De sortie ③ Informations accessibles pour l'outil sélectionné en (2)
- ② Sélection des outils ④ Informations collectées à chaque temps

Figure.108 : Interface de sélection des données qui sont mémorisées dans un fichier.

Le fichier compilant toutes les données des acquisitions récupérées, est post traité à partir des tailles des événements recensés. En effet, des débris sont détectés au cours des acquisitions mais nous ne souhaitons pas les comptabiliser. Ces débris ne sont pas sensibles au champ électrique haute fréquence et se retrouvent évacués de la zone de tri via la sortie 1 et se rajoutent aux événements détectés au niveau de cette sortie faussant les proportions de cellules récoltées entre chaque sortie. Selon la taille des événements détectés, il nous est possible de faire le compte des cellules réellement détectées dans chaque zone et de les distinguer des débris cellulaires présents dans les suspensions cellulaires. Ainsi, nous filtrons le comptage de tous les événements selon une taille minimale définie afin de ne pas comptabiliser les débris.

De plus, pour la zone de détection de l'entrée et sur la largeur du canal, des erreurs de détection engendrées par une mauvaise interprétation de l'image de références au niveau des surfaces recouvertes par les métallisations rugueuses d'or (électrolytique) peuvent être assez fréquemment comptabilisées. Certaines sont difficilement différenciables des cellules à comptabiliser ce qui nous a amené à définir un « cutoff » pour ne choisir que les événements présentant une surface supérieure à 500 pixels. Cela revient à ne considérer que les événements de 8,8 μm de diamètre et plus (conversion estimée par le CVX).

L'heure de la capture nous permet de connaître la chronologie précise des acquisitions et de les relier aux vidéos qui sont faites en parallèles et contiennent les données du débit du flux et du signal DEP. Ainsi il est possible de relier les conditions de tri (qui ne sont pas connues du CVX) aux données du comptage des cellules triées. La vidéo nous permet aussi de réaliser une vérification des résultats de comptabilisation obtenus.

Le temps de traitement de l'image nous permet de connaître le temps entre deux images traitées par le CVX. Dans notre configuration, le traitement dure en moyenne 94 ms et peut aller de 60 ms à 103 ms. Ce temps varie en fonction du nombre d'événements détectés dans les zones analysées. C'est pourquoi au final nous avons de l'ordre de 640 lignes inscrites dans le fichier de résultat pour chaque minute d'acquisition réalisée. Ces lignes contiennent donc l'heure de la prise de l'image analysée et son temps de traitement. Mais aussi pour les 6 zones analysées le nombre d'événements détectés, leur taille et leurs coordonnées s'il y en a.

III.4.2. Traitement statistique des résultats

Au cours des différents tris, nous ne pouvons observer toute l'hétérogénéité de l'échantillon cellulaire, car il serait trop long de trier les plusieurs millions de cellules qui le constitue et cela pour chaque condition de tri réalisées. Il est donc important d'évaluer un nombre d'événements minimal nécessaire pour rendre statistiquement viables les acquisitions. Si ce nombre minimal de cellules comptabilisées n'est pas atteint, cela signifiera que les pourcentages obtenus ne seront pas représentatifs de la population de cellules triées. Les équations présentées ici viennent des lois normales de probabilité valides pour des probabilités continues de forme gaussienne comme attendu pour la population cellulaire.

En statistique, la taille de la population totale est notée N , et n est la taille de notre échantillon. Dans un cadre idéal le nombre de cellules observées n est très proche de N , mais dans une condition réelle, n , de l'ordre de quelques milliers de cellules, est très inférieur aux plusieurs millions de cellules présentes dans un tube Eppendorf® de quelques millilitres.



Nous sommes donc dans le cas où le facteur d'exhaustivité $\left(\sqrt{\frac{N-n}{N-1}}\right)$ tend vers 1. Ainsi ce facteur est négligeable et dans ce cas, la marge d'erreur e , appelée aussi erreur standard, est calculée ainsi selon l'équation (16) [11].

$$e = Z_{\alpha} \cdot \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}} \quad (16)$$

Avec Z_{α} le seuil de confiance lié à α qui est notre taux de confiance en l'acquisition. Le taux de confiance est un pourcentage qui indique la probabilité que ce qui est observé soit réellement dans le pourcentage d'erreur attendu et pas au-delà. Celui-ci doit typiquement être compris entre 95% et 99% donnant ainsi des valeurs de Z_{α} de respectivement 1.960 et 2.576. La variable p est la probabilité de l'évènement, donc ici cela correspond à la probabilité qu'une cellule prenne la sortie considérée. Cette équation de la marge d'erreur nous permet de calculer le nombre d'évènements souhaité :

$$n = \frac{Z_{\alpha}^2}{e^2} \cdot p(1-p) \quad (17)$$

Dans ce calcul, p n'est pas prédictible, nous nous plaçons donc dans le cas le moins favorable, où $p=50\%$, donnant ainsi à $p(1-p)$ sa valeur maximale, augmentant ainsi le nombre d'évènements minimal nécessaire pour obtenir un pourcentage et un taux de confiance donné. Différentes valeurs sont évaluées dans le Tableau.7.

Tableau.7 : Nombres d'évènements nécessaires pour obtenir différents pourcentages d'erreurs à un taux de confiance donné.

Taux de confiance	%Erreur	Evènements nécessaires
95%	10,0%	97
95%	7,5%	171
95%	5,0%	385
95%	2,5%	1537
Taux de confiance	%Erreur	Evènements nécessaires
99%	10,0%	166
99%	7,5%	295
99%	5,0%	664
99%	2,5%	2655

Ainsi, à partir des résultats du Tableau.7, nous allons cibler des acquisitions dans des conditions données, enregistrant au minimum 100 évènements afin de minimiser le pourcentage d'erreur à maximum 10%.

Les acquisitions qui sont présentées dans les Figure.112, Figure.113 et Figure.114 présentent entre 100 et 390 évènements sur des temps d'acquisition de l'ordre de 2 minutes. La moyenne d'évènements observés est supérieure à 190, pour une moyenne d'erreur de 5,2%. Les pourcentages d'erreurs, qui seront dorénavant appelés erreurs statistiques, sont calculés à partir de la formule (16) et sont chaque fois disposés sur les graphiques présentant les résultats des acquisitions.

III.4.3. Procédure de manipulation

Avant chaque acquisition, il convient d'appliquer les grandeurs fluidiques et électriques qui seront maintenues constantes durant celle-ci. Pour cela, nous commençons par régler les conditions fluidiques avec le signal électrique éteint. Dans cette étape, un équilibre entre l'entrée du buffer et l'entrée des cellules est recherché afin de réaliser le focus des cellules dans la zone verte Figure.109. Ce focus vise à guider toutes les cellules dans la sortie 1 (zone verte). Lorsque le focus ne permet pas d'avoir toutes les cellules dans la zone verte, nous parlons alors d'un relâchement du focus, et dans ce cas l'équilibre fluidique est à revoir impérativement.

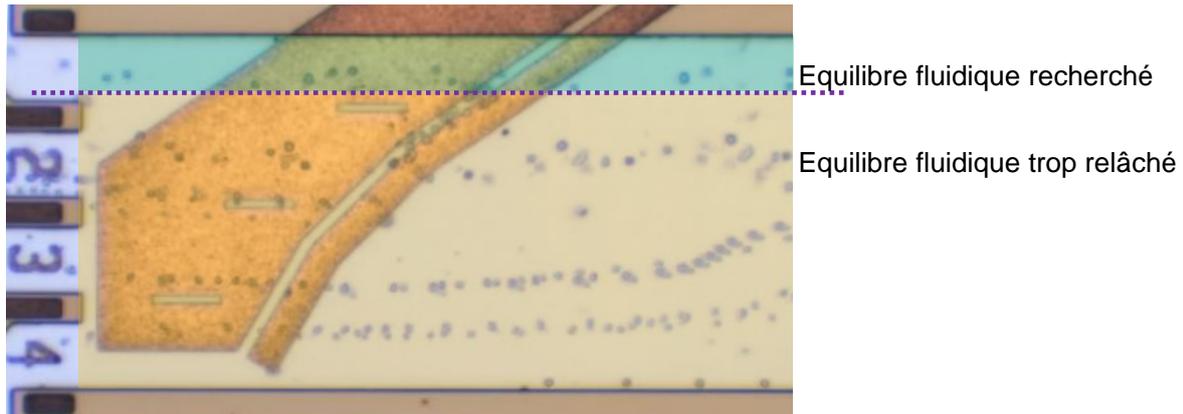


Figure.109 : Recherche de l'équilibre entre la vitesse du flux des cellules et de celle du buffer afin que les cellules, sans application du champ électrique, aillent toutes dans la sortie 1. Si des cellules vont dans les autres sorties, le focus des cellules est trop relâché.

Si cet équilibre fluidique n'est pas assuré, alors les résultats du tri seront faussés. En effet, dans le cas où le focus des cellules est trop relâché (zone jaune), des cellules sont en dehors de la zone de focus et n'entrent donc pas au bon endroit dans la zone attendue de déviation. Cela a pour conséquence que des cellules pourront être collectées dans une autre sortie que la sortie 1 alors même qu'elles n'ont pas été déviées sous l'action du champ électrique. Ceci diminue le nombre de cellules attendues en sortie 1 et augmente de façon artificielle le nombre de cellules dans les autres sorties, essentiellement la sortie 2 (Figure.110.A), par rapport aux conditions normales c'est-à-dire lorsque l'équilibre fluidique a été correctement établi (Figure.110.B).

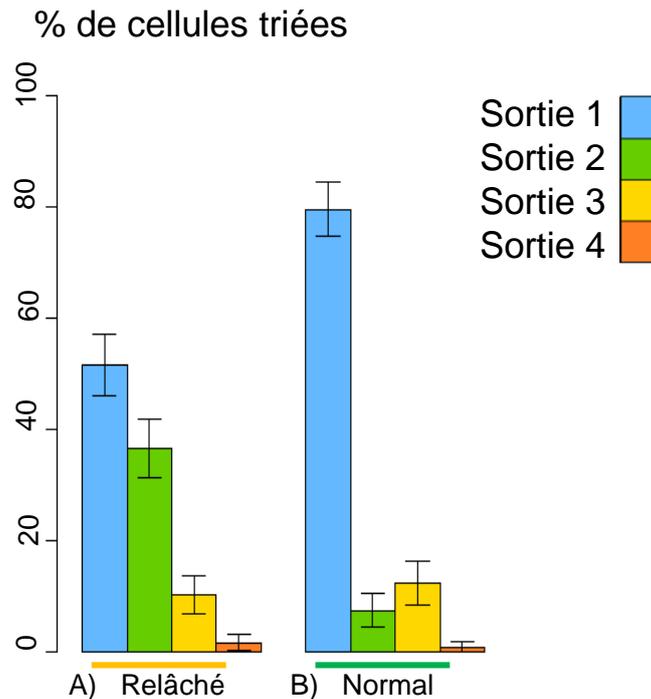


Figure.110 : Impact de l'équilibre buffer et flux de cellules à un même débit au niveau du buffer ($0,21 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$) et une même puissance ($29,98 \text{ dBm}$) à 500 MHz . A) le focus des cellules est trop relâché et donc des cellules qui auraient dû être collectées dans la sortie 1 vont dans la sortie 2 ; B) L'équilibre fluide a correctement été établi.

Lorsque l'équilibre fluide est établi, le signal électrique est appliqué aux électrodes. La première fréquence appliquée est comprise entre 500 MHz et 400 MHz afin que les cellules réagissent fortement au champ en nDEP. Un balayage de la puissance transmise est ensuite réalisé afin de cibler l'ordre de grandeur d'intensité à utiliser pour la suite des expériences. Le balayage commence à partir d'une faible intensité pour monter graduellement jusqu'à une amplitude donnée où une forte proportion des cellules est déviée jusqu'à la dernière sortie.

Une fois cette calibration de puissance effectuée, des acquisitions successives peuvent être menées avec différentes fréquences, puissances et/ou vitesses de flux. Chaque acquisition est en parallèle filmée afin de recouper les données du CVX avec les conditions d'expérimentation. Ces vidéos permettent aussi de réaliser une vérification du comptage réalisé par le CVX.

III.4.4. Reproductibilité des conditions de manipulation

Avant de présenter nos résultats, la reproductibilité des conditions de manipulation est à confirmer. La Figure.111 présente les proportions de cellules collectées selon trois conditions de tri différentes pour lesquelles les combinaisons de valeurs de fréquence, de vitesse des cellules et de puissance du signal DEP ont été modifiées. Chaque expérience a été enregistrée pour permettre le traitement par le CVX et a été répétée deux fois, mais pas à la suite, les conditions ont été changées entre chaque doublet.

Pour une même combinaison de paramètres de tri, nous pouvons ainsi constater que les tendances de distribution des cellules entre chaque sortie sont conservées. Il existe des petites variations dans la proportion de cellules collectées par chacune des sorties du cytomètre mais elles restent à chaque fois dans la marge d'erreur.

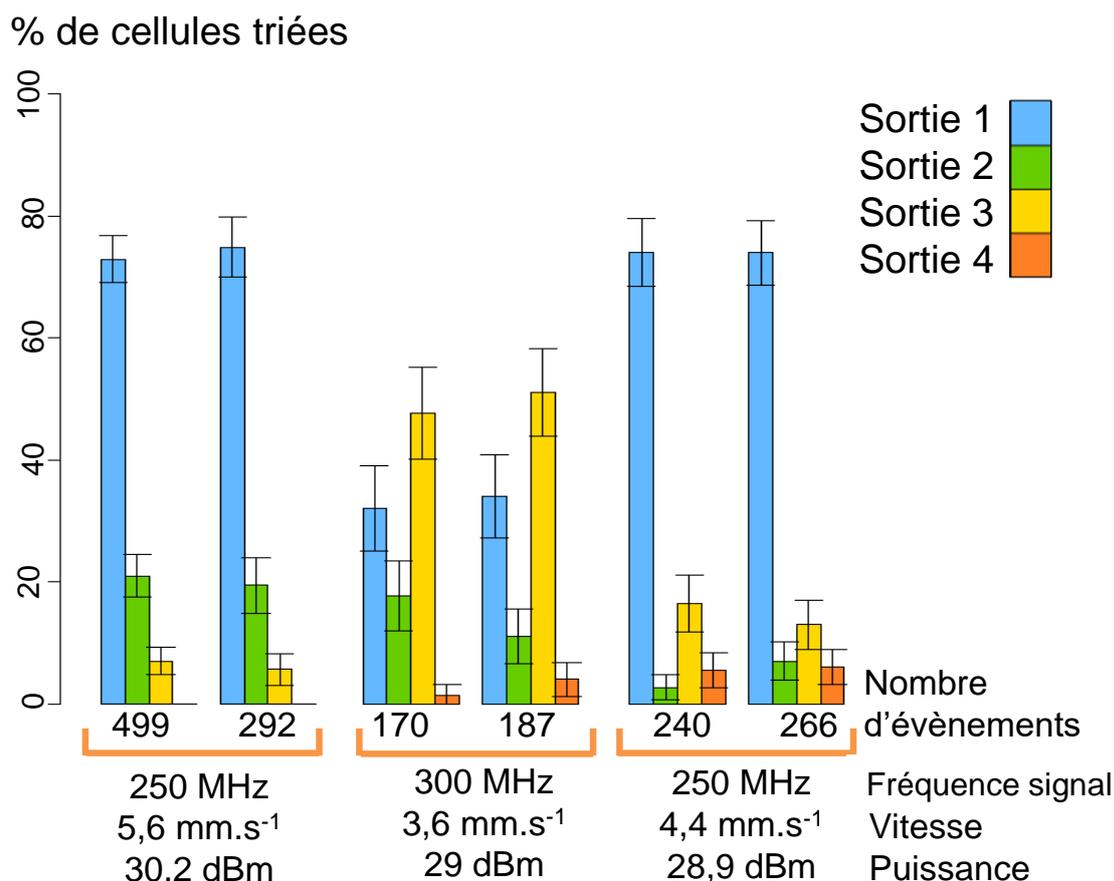


Figure.111 : Illustration de 6 acquisitions de tri menées sur des cellules de type U87 pour lesquelles trois combinaison de paramètres de tri ont été appliqués.

La vitesse des cellules est évaluée à partir de deux images prises par le CVX où nous pouvons suivre la progression d'une même cellule dans le canal. Le temps entre ces deux images est donné avec une précision de 0,1 ms par le système CVX, grâce à la mesure, sur un logiciel de traitement d'image, de la distance parcourue par la cellule dans ce laps de temps. Ainsi, la vitesse de la cellule peut être extraite. Il faut noter que cette vitesse est toujours évaluée dans des sections du canal où les cellules ne sont pas à proximité du champ électrique afin de déterminer uniquement la vitesse acquise sous l'effet du fluide s'écoulant dans le canal.

Dans cette troisième partie, nous nous sommes intéressés à l'obtention et l'analyse des données de manipulation au travers de la présentation du système qui permet le décompte des cellules, mais aussi en calculant une erreur statistique liée au fait que nous n'observons qu'une partie de la population cellulaire. Nos étapes de préparation des conditions de tri, ont été également détaillées avant de montrer des premiers résultats permettant d'assurer une reproductibilité des manipulations. A partir de ces connaissances, nous pouvons présenter et commenter dans la partie qui suit nos résultats expérimentaux.

III.5. Résultats expérimentaux

Dans cette dernière partie seront présentés les résultats obtenus lors des différentes expériences de tri cellulaire réalisées avec le microsystème présentant deux gaps (Figure.100.B) dans la zone de déviation. Nous observerons dans un premier temps l'impact



des conditions électriques et fluidiques sur la répartition de la population entre les différentes sorties. Puis, dans des conditions fixes, la fréquence sera ajustée permettant de mettre en avant l'importance de la valeur du facteur de Clausius-Mossotti dans le tri des cellules. Sur la base de à nos expériences, l'impact de la taille des cellules sera discuté.

Enfin, nous utiliserons nos résultats expérimentaux pour présenter un moyen d'observer la dispersion de la susceptibilité diélectrophorétique (basée sur la taille et le facteur de Clausius-Mossotti) de la population de cellules grâce au système, et ainsi trouver les conditions pour les répartir dans les différentes sorties selon notre choix.

III.5.1. Tri d'une population de cellules de glioblastomes issues de la lignée U87-MG

III.5.1.1. Influence de la puissance du signal DEP

Comme nous l'avons vu avec la Figure.92, à un flux fixe, modifier la tension inter électrodes influence le f_{CM} critique nécessaire à la déviation effective des cellules. D'après l'équation de f_{CM} critique (14), en augmentant la tension il devient plus facile de dévier la trajectoire des cellules. C'est ce qui est observé en pratique et que nous retrouvons illustré sur la Figure.112.

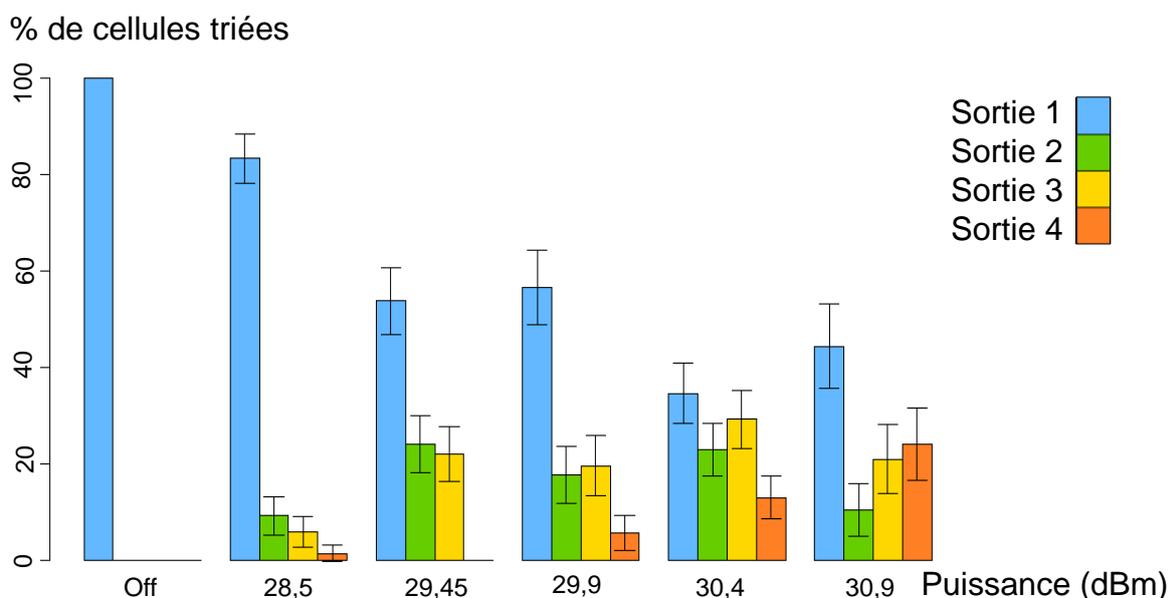


Figure.112 : Impact de la variation de la puissance du signal DEP appliqué lors du tri d'une population de cellules U87-MG. Débit du buffer: $0,14 \mu\text{L}/\text{min}$ ($4,7 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$); Fréquence du signal DEP : 500 MHz; taux de confiance : 95% ; 1183 événements détectés au total ; 30 minutes d'écart entre la première et la dernière acquisition.

La première acquisition est faite avec le signal DEP éteint afin de vérifier que l'équilibre fluidique est correct et que les cellules, sans l'influence du champ électrique se dirigent bien jusqu'à la sortie 1. Les autres acquisitions de la Figure.112 ont toutes été réalisées pour un signal DEP de fréquence 500 MHz pour laquelle les cellules U87 considérées sont loin de leurs fréquences de transition.

A partir d'une puissance de 28,5 dBm générée à la sortie de l'amplificateur nous observons que près de 17% des événements observés réagissent au champ électrique et sont déviés jusqu'aux sorties suivantes. En augmentant la puissance du signal envoyé aux électrodes, ce pourcentage de cellules allant vers une autre sortie que la première ne fait qu'augmenter pour représenter plus de 50% des événements observés à partir de 30,4 dBm.

L'augmentation des évènements dans la sortie 1 pour 30,9 dBm, par rapport à 30,4 dBm, laisse penser à une diminution de puissance, mais les proportions entre les trois sorties suivantes et l'augmentation de 11% au niveau de la sortie 4 contredit cette hypothèse. Cette augmentation du nombre de cellules en sortie 1, alors qu'une diminution aurait dû être observée, peut s'expliquer par le fait que nous n'observons qu'une partie de la diversité de la population comme le prennent en compte les erreurs statistiques estimées. Or, nous pouvons supposer qu'à ce pourcentage d'erreur statistique prêt, la tendance reste cohérente

Nous observons aussi cette augmentation du pourcentage de cellules en sortie 1 entre 29,45 dBm et 29,9 dBm mais plus légère cette fois. La tendance à une plus forte réaction des cellules au champ n'est ici non plus pas contredite, car à 29,9 dBm 5,7% des cellules sont déviées jusqu'à la sortie 4 alors qu'à 29,45 dBm aucune ne l'étaient.

III.5.1.2. Influence de la vitesse du flux

Comme nous l'avons vu au travers de l'équation (14) et comme l'illustre la Figure.93, il est plus facile pour dévier les cellules, à une puissance de signal DEP donnée, de réduire la vitesse du flux. Cette vitesse est identique à celles des cellules sans effet du champ. La vitesse des cellules sans l'effet du champ électrique est identique à celle du flux qui est principalement dépendant du débit du buffer. Pour que l'équilibre fluide soit atteint, le débit du flux de l'entrée des cellules doit rester légèrement plus lent que celui du buffer et est toujours réajusté par rapport à lui lors des changements de vitesse de flux.

Ainsi, à puissance constante de 29,98 dBm, nous constatons sur la Figure.113 qu'en imposant aux cellules une vitesse de $6,75 \text{ mm.s}^{-1}$, uniquement 6,5% des cellules sont déviées lorsqu'elles arrivent à proximité des électrodes du cytomètre. En revanche, à un débit bien moindre de $0,12 \text{ }\mu\text{L.min}^{-1}$ (43% plus faible), ce sont 88% des cellules qui le sont. Avec la diminution de la vitesse du flux, nous constatons que de plus en plus de cellules sont déviées par les électrodes et ce plus efficacement pour être collectées sur les sorties nécessitant une réaction en nDEP plus forte, avec une augmentation progressive du nombre de cellules détectée à la dernière sortie et une diminution logique de celles récoltées à la première sortie.

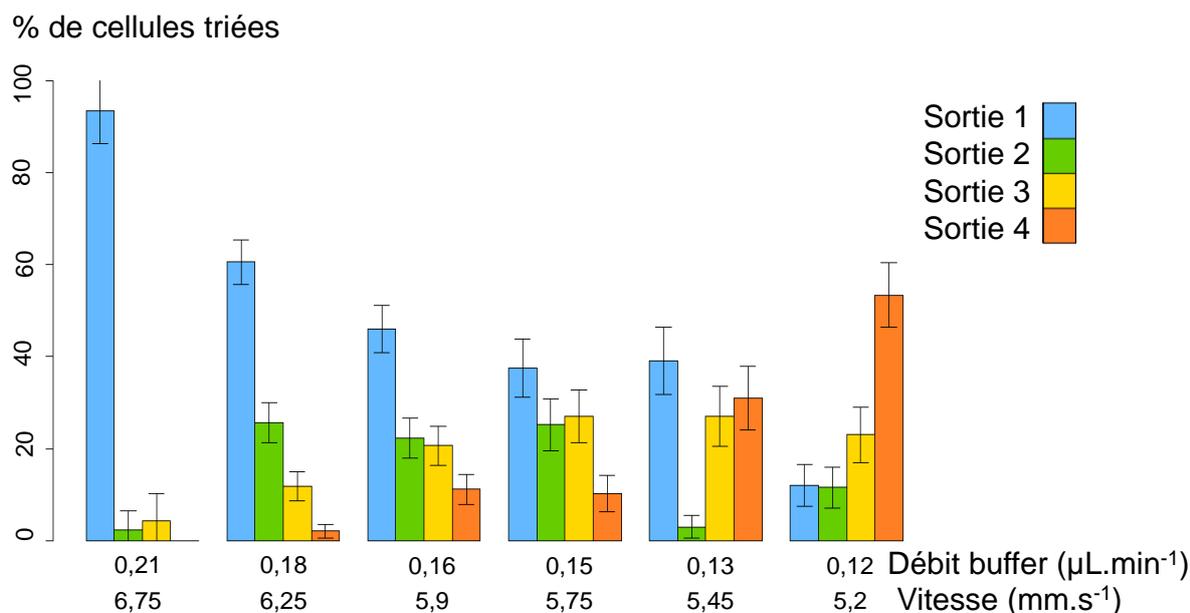


Figure.113 : Impact de la variation de la vitesse du flux sur le tri sur une population de cellules U87-MG Puissance du signal DEP : 29,98 dBm ; Fréquence du signal DEP : 500 MHz ; taux de confiance : 95% ; 1602 événements détectés au total ; 30 minutes d'écart entre la première et la dernière acquisition.

Le fait qu'entre les vitesses de 5,75 mm.s⁻¹ et 5,45 mm.s⁻¹, la proportion relative de cellules collectées dans la sortie 1 varie peu (respectivement 37,6% et 39,1%), peut être lié comme précédemment au pourcentage d'erreur statistique tout comme aussi au fait que la répartition des caractéristiques biologiques de l'échantillon de cellules triées au court de ces deux expériences n'est pas linéaire. C'est pourquoi, malgré une réduction de la vitesse, un changement simultané pour toutes les sorties n'est pas forcément observable. Ce constat se retrouve sur la sortie 4 entre les vitesses de 5,9 mm.s⁻¹ et 5,75 mm.s⁻¹ qui présentent des proportions relatives de cellules collectées également plutôt constantes (respectivement 11,1% et 10,2%) entre les deux conditions de tri.

Au travers des Figure.112 et Figure.113, nous pouvons conclure que la vitesse du flux et de la puissance du signal DEP influencent bien tous les deux l'efficacité de déviation des cellules comme nous pouvions nous y attendre. En revanche, il est difficile de conclure sur la base de ces graphiques sur la dépendance à priori linéaire de leur impact respectif sur la déviation des cellules. En effet, les cellules mises en jeu durant ces expériences ne présentent pas une distribution de caractéristiques diélectriques strictement identique et connue lors des différentes acquisitions.

III.5.1.3. Influence de la fréquence du signal DEP

Au travers des deux séries d'acquisitions précédentes, nous avons mis en évidence la possibilité de modifier la répartition d'une population cellulaire donnée entre les différentes sorties du système grâce à l'ajustement des conditions fluidiques et de la puissance du signal DEP. Dans le cadre de ces travaux de cette thèse, nous cherchons à trier les cellules sur la base de leurs caractéristiques diélectriques internes et donc en se référant à leur facteur de Clausius-Mossotti aux fréquences UHF. Or comme nous l'avons vu précédemment la valeur de f_{CM} dépend de la fréquence du signal appliqué pour polariser les électrodes du cytomètre. Ainsi, si le microsysteme développé permet effectivement de

discriminer les cellules par rapport à leur f_{CM} , modifier la fréquence du signal électrique impactera la distribution des cellules dans les différentes sorties.

% de cellules triées

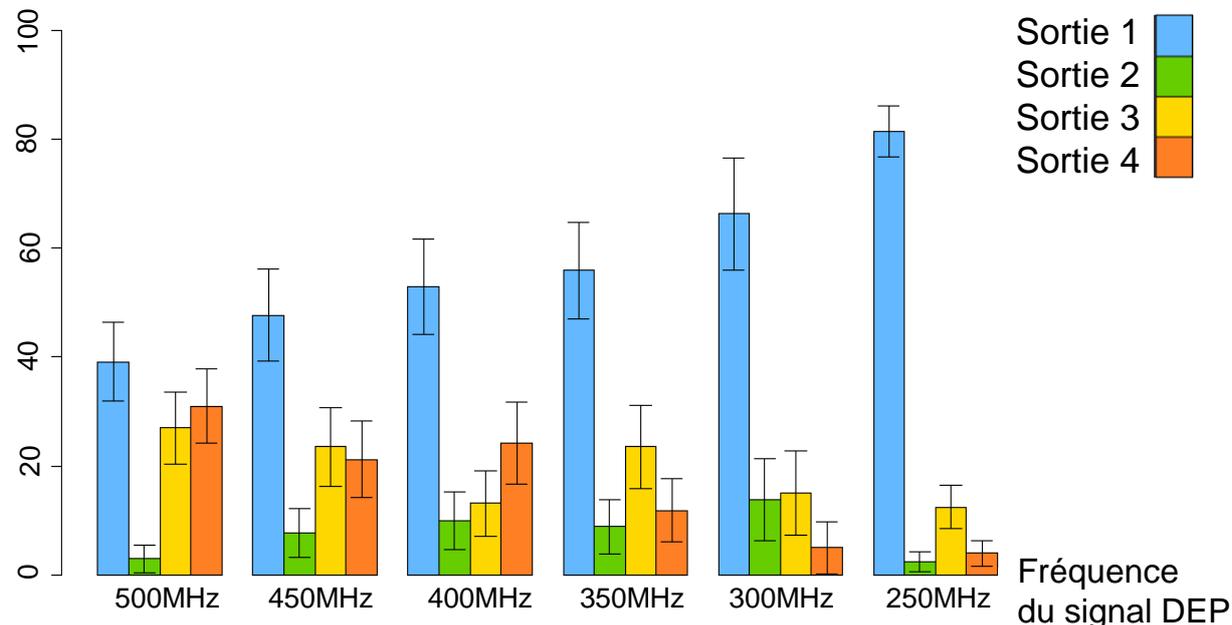


Figure.114 : Impact de la variation de la fréquence du signal DEP sur le tri sur une population de U87-MG. Puissance : 28,9 dBm ; Débit buffer : $0,13 \mu\text{L}\cdot\text{min}^{-1}$ ($4,4 \text{ mm}\cdot\text{s}^{-1}$); taux de confiance : 95% ; 1154 évènements détectés au total ; 50 minutes d'écart entre la première et la dernière acquisition.

Typiquement, plus la fréquence du signal utilisé s'approche de la fréquence de transition d'une cellule, plus la valeur de son f_{CM} sera faible. Ainsi dans la Figure.114, nous présentons un premier tri réalisé toujours sur une population de cellules U87-MG à 500 MHz où 60,9% des évènements observés sont déviés par les électrodes et dont 31% sont collectées dans la sortie 4. Avec la diminution de la fréquence, ce pourcentage de cellules déviées diminue jusqu'à 18,5% lorsque la fréquence du signal est de 250 MHz avec seulement 3,9% collectées dans la sortie 4 et cela malgré le maintien constant de la puissance du signal appliqué aux électrodes et de la vitesse de flux dans le canal principal du dispositif de tri.

En effet, le seul paramètre qui varie entre chaque acquisition de la Figure.114 est la fréquence. Ainsi, la variation de la distribution des cellules entre les différentes sorties est due à la diminution des valeurs de leur f_{CM} lorsque la fréquence du signal appliquée se rapproche des fréquences de transition f_{X02} des cellules.

Si dans les précédentes pages nous nous sommes attachés à considérer en premier lieu l'évolution de l'influence du champ sur la trajectoire des cellules seulement en terme de pourcentage de cellules déviées et par rapport aux différences de proportion collectées aux sorties 1 et 4, c'est que les pourcentages de cellules présentent dans les sorties 2 et 3 sont plus difficiles à prédire. En effet, la sortie 1 collecte toutes les cellules ne réagissant pas ou peu au champ. Ainsi s'il est attendu une diminution de la force DEP, une augmentation des cellules dans cette sortie est espérée. En parallèle, la sortie 4 collecte toutes les cellules réagissant fortement au champ électrique. Ainsi une augmentation de la force DEP entraîne une augmentation du nombre de cellules dans cette sortie. Ainsi ces deux sorties sont utiles pour décrire des tendances avec la variation des conditions de tri.

Pour ce qui est des sorties 2 et 3, toutes deux sont des sorties qui collectent des cellules dans un intervalle de susceptibilité diélectrophorétique (lié à la taille et f_{CM} de la cellule). Elles représentent ainsi plus une image de la proportion de la population présentant une susceptibilité donnée, qu'une tendance d'augmentation ou diminution des contraintes de tri. Typiquement, malgré la baisse de la fréquence entre 450 MHz et 350 MHz, les proportions de cellules au niveau des sorties 2 et 3 restent stables : 7,6% des cellules à 350 MHz, contre 8,8% à 450 MHz des cellules collectées dans la sortie 2. La sortie 3 capte quant à elle 23,5% de la population observée pour les deux fréquences considérées. Alors que la répartition des cellules entre les sorties 2 et 3 semble rester stable entre l'expérience menée à 350 MHz et celle à 450 MHz, à 400 MHz les pourcentages observés diffèrent de cette tendance : 9,9% de la population est collectée en sortie 2, et uniquement 13,1% de la population l'est en sortie 3.

De ce fait, ces deux sorties pourraient être utilisées pour isoler précisément une portion de la population de cellule à partir d'un réglage optimisé des conditions plutôt que d'utiliser les sorties 1 et 4 selon leurs propriétés diélectriques internes.

III.5.2. Influence de la taille des cellules sur le tri

Comme nous avons pu le constater dans l'équation (14) donnant l'expression du f_{CM} critique, la taille des cellules devrait avoir également une influence sur le tri des cellules. Cette influence peut même être supérieure à celle de f_{CM} , car intervient au carré dans l'équation (14). C'est ce que nous allons vérifier.

Toutes populations cellulaires présentent une dispersion de taille plus ou moins marquée, qui, pour le cas des cellules U87-MG suit une distribution gaussienne (Figure.105) autour d'un diamètre moyen de 16,97 μm . Le CVX, dans son traitement automatique d'images, permet de mesurer la surface des objets détectés en pixel et peut le convertir pour estimer le diamètre surfacique des cellules dans le microsysteme. Ainsi, à partir de l'équation de l'aire d'un disque nous pouvons évaluer les valeurs des diamètres surfaciques de chaque cellule comme le montre la Figure.115. Cette figure comptabilise pour l'entrée et chaque sortie de la zone de tri du système, les diamètres surfaciques de toutes les cellules détectées lors de l'ensemble des acquisitions présentées dans la Figure.114.

Nous observons à partir des diagrammes en boîtes des entrées (boites violettes) que les échantillons des cellules détectées ne sont pas tous composés de cellules de même taille mais présentent des diamètres moyens compris entre 15,4 μm et 16,8 μm . La quasi-totalité des diamètres des cellules observées sont compris entre 9 μm et 25 μm .

Ce que nous pouvons voir rapidement, c'est que la moyenne des tailles des cellules observées en sortie 4 est toujours au-dessus de celle de la sortie 1. En dehors de l'acquisition à 350 MHz, la moyenne des tailles de la sortie 4 reste même supérieure à celle de toutes les autres sorties, aucune cellule inférieure à 15 μm n'est collectée dans cette sortie. Au contraire, au niveau de la sortie 1, les cellules collectées présentent un diamètre moyen inférieur aux autres sorties et la quasi-totalité des cellules dont le diamètre est inférieur à 12 μm y sont collectées. Ceci est en accord avec le fait qu'une petite cellule est plus difficile à dévier par effet DEP qu'une plus grande cellule.

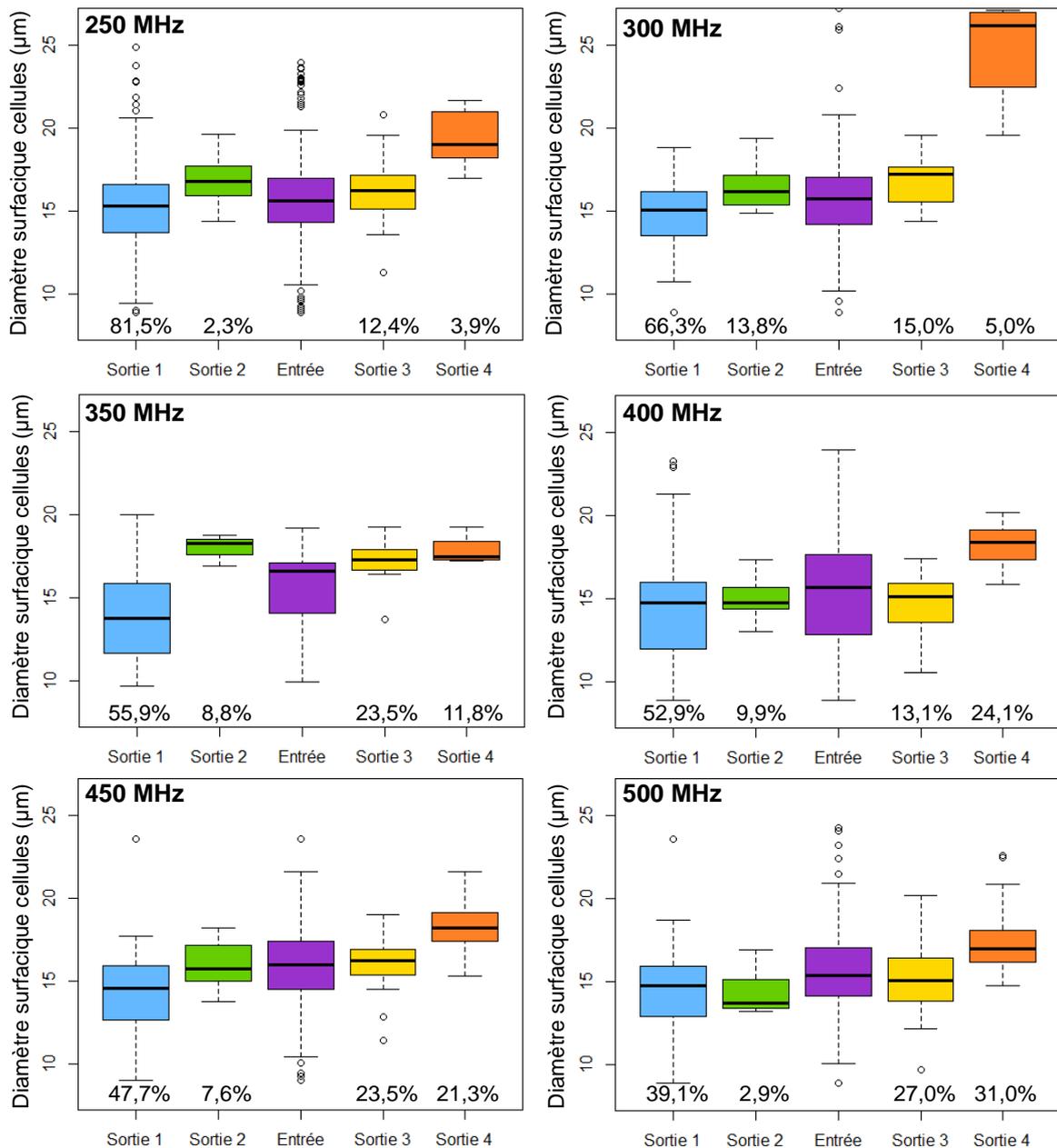


Figure.115 : illustration de la répartition des diamètres surfaciques des cellules observées dans chaque sortie et pour l'entrée de la zone de tri pour les 6 acquisitions de la Figure.114.

Nous pouvons observer aussi que le diamètre cellulaire n'est pas le seul paramètre qui influence le tri, et c'est pour cela que nous pouvons observer que les tailles des cellules collectées dans les sorties 2 et 3 sont très similaires. Si l'influence de la taille des cellules était prépondérante, nous observerions la configuration de l'acquisition à 500 MHz où la sortie 3 collecte des cellules plus grandes que la sortie 2 et pourtant, à 250 MHz, 350 MHz et 400 MHz ce n'est pas le cas, au contraire la sortie 3 collecte des cellules plus petites que la sortie 2. De plus, une quantité non négligeable de cellules collectées dans la sortie 1 sont de même taille que les cellules collectées en sortie 4. En dehors de l'acquisition à 450 MHz, dans la sortie 1 sont collectées des cellules dans les 25% des cellules les plus grandes injectées en entrée du système. Ainsi, une cellule de grand diamètre, du fait de son f_{CM} , ne sera pas forcément dévié par le champ jusqu'à la sortie 4 et pourra être aussi collecté en sortie 1. L'acquisition à 400 MHz en est la parfaite illustration : alors qu'il y a 24,1% de la population qui est collectée en sortie 4, c'est dans la sortie 1, que sont collectées les cellules



les plus grandes, et 13,2% de la population triée de taille similaire à celles collectées dans la sortie 4 le sont dans la sortie 1.

Ainsi, nous pouvons voir de ses acquisitions que comme attendu avec l'équation (14), la taille a une influence sur la déviation des cellules, faisant qu'une plus forte proportion de cellules sont déviées vers une sortie autre que la première, et que celle-ci capte les plus petites cellules. En revanche, l'influence de la taille de la cellule n'est pas suffisante pour expliquer la répartition des cellules dans les différentes sorties. Leur répartition est liée à leurs caractéristiques diélectriques internes qui, au travers de leur f_{CM} influencent de façon importante la déviation des cellules par l'effet du champ électrique.

Du fait de ces résultats, nous ne pouvons conclure si la taille ou les caractéristiques diélectriques de la cellule prédominent dans le tri d'un échantillon cellulaire : tous deux sont à considérer. Ne pouvant dissocier f_{CM} et la taille des cellules nous les lierons dorénavant sous le nom de « susceptibilité diélectrophorétique » qui est l'influence des caractéristiques de la cellule sur l'intensité de la force DEP. Ainsi, en calibrant le cytomètre en fonction de la susceptibilité diélectrophorétique des cellules cibles, il est possible de les trier et de les isoler. C'est pourquoi, nous allons dans la partie suivante nous allons chercher à extraire la susceptibilité diélectrophorétique des cellules collectées lors de nos précédentes expérimentations.

III.5.3. Susceptibilité diélectrophorétique d'une population cellulaire

Comme il a été évoqué précédemment, l'effet d'un champ électrique sur les cellules d'une population cellulaire donnée n'est pas le même pour toutes. L'intensité à laquelle les cellules d'une population donnée réagissent au champ, soit leur susceptibilité diélectrophorétique (χ_{DEP}), est comprise entre un minimum et un maximum avec une probabilité non linéaire qu'une cellule exprime une susceptibilité donnée entre ses bornes. Ceci rend difficilement prédictible le nombre relatif de cellules collectées dans chaque sortie pour une condition de tri donnée. En revanche, nos différentes acquisitions précédentes donnent une image de la répartition de la susceptibilité diélectrophorétique que peut avoir la population de cellules d'intérêt, et nous allons ici chercher à retrouver cette répartition. Pour cela, nous allons faire correspondre aux contraintes de déviation une susceptibilité diélectrophorétique dépendante des propriétés intrinsèques des cellules.

A partir de l'équation de f_{CM} critique déterminé précédemment grâce à l'équation (14), tous les paramètres qui dépendent des contraintes de déviation (soit la puissance du champ électrique et la vitesse du flux), sont isolées des caractéristiques cellulaires et du milieu de suspension. Ce qui nous donne l'égalité suivante :

$$K \cdot f_{CM}^c \cdot r^2 = - \frac{v \cdot \sin(\alpha)}{\nabla |E^2|} \quad (18)$$

Avec $K = \frac{\epsilon_f}{3 \cdot \mu_f}$ qui équivaut à une constante durant les manipulations uniquement dépendante du milieu dans lequel les cellules sont suspendues.

La partie gauche de l'égalité (18) correspond à ce que nous appellerons la susceptibilité diélectrophorétique (χ_{DEP}) des cellules. Cela correspond à la force DEP, normalisé par rapport au gradient du champ au carré, auquel est soumise la cellule polarisée face à un champ électrique. Cette susceptibilité dépend de la taille de la cellule et de son f_{CM} lorsqu'elle est immergée dans un milieu donné. La trajectoire d'une cellule présentant une χ_{DEP} faible



sera par conséquent plus difficile à dévier le long des électrodes que celle d'une cellule avec une χ_{DEP} forte.

La partie droite de l'égalité (18) correspond à ce que nous appelons la contrainte de déviation. Comme définie auparavant, elle est liée aux conditions électriques et fluidiques et à l'angle d'inclinaison des électrodes. Cet indicateur renseigne sur la difficulté à dévier de sa trajectoire initiale une cellule au moyen du champ électrique. Plus la contrainte de déviation sera forte, plus il sera difficile de dévier une cellule le long de l'électrode, ou de l'immobiliser si les électrodes sont disposées à la perpendiculaire du flux.

Pour avoir une évaluation de la contrainte de déviation il faudrait connaître exactement l'intensité du gradient de champ pour une puissance du signal DEP donnée. Dans notre cas, n'ayant pas connaissance de la tension inter électrode dans la zone de tri, il n'est pas possible d'estimer précisément la puissance du signal DEP auxquelles sont soumises les cellules. En revanche, comme nous l'avons vu dans le paragraphe II.3.1, nous savons que le gradient de champ ($\nabla|E^2|$) est proportionnel à la tension au carré appliquée aux électrodes, et évolue donc linéairement avec la puissance du signal DEP injectée ($P=V^2/Z$ soit P la puissance du signal, V sa tension et Z l'impédance du système). Ainsi nous pouvons définir l'égalité suivante :

$$\nabla|E^2| = P_{(mW)} \cdot \nabla|E^2|_{1mW} \quad (19)$$

Soit $P_{(mW)}$ la puissance du signal DEP appliquée aux électrodes en mW, et $\nabla|E^2|_{1mW}$ l'intensité du gradient de champ lorsque 1mW est injecté dans le système, c'est donc une valeur qui est liée à la géométrie des électrodes et leur écartement. Ce qui nous permet de normaliser l'égalité (18) de la manière suivante :

$$K \cdot f_{CM}^c \cdot r^2 = - \frac{v \cdot \sin(\alpha)}{P_{(mW)} \cdot \nabla|E^2|_{1mW}} \quad (20)$$

$$(K \cdot \nabla|E^2|_{1mW}) \cdot f_{CM}^c \cdot r^2 = - \frac{v \cdot \sin(\alpha)}{P_{(mW)}} \quad (21)$$

Nous utiliserons l'égalité (21) pour les définitions de χ_{DEP} (partie gauche de l'équation) et de la contrainte de déviation (partie droite). Toutes les deux auront la même unité qui sera en $m \cdot s^{-1} \cdot mW^{-1}$, soit une vitesse par une unité de puissance du signal DEP. Ce lien donné par l'égalité (21) permet à partir de la contrainte de déviation normalisée à 1 mW imposée lors des différentes expérimentations d'évaluer la susceptibilité diélectrique des cellules et donc leurs caractéristiques à une constante près : $K \cdot \nabla|E^2|_{1mW}$. Cette constante est liée à la géométrie des électrodes du microsysteme et aux caractéristiques du fluide.

Ainsi, à un angle d'électrode donné, pour une puissance du signal DEP et une vitesse fluide données, nous pouvons définir une contrainte de déviation normalisée qui pourra être utilisée comme référence. Une contrainte de déviation de $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1} \cdot \text{W}^{-1}$ par exemple correspondrait à l'arrêt des cellules par une paire d'électrodes alimentées avec 1 W et disposées à la perpendiculaire du fluide circulant dans la zone de tri à une vitesse de $1 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$. Une même contrainte de déviation serait établie avec les mêmes électrodes pour une puissance de 6 W à une vitesse de $6 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$; ou encore la déviation des cellules par une paire d'électrodes disposées à 30° ($\sin(30^\circ) = 0,5$) alimentées par un signal DEP de 3 W avec une vitesse de flux de $6 \text{ mm} \cdot \text{s}^{-1}$.

Au final, il faut retenir que toutes cellules présentant une χ_{DEP} normalisée à 1 mW supérieure ou égale à cette contrainte de déviation normalisée seront bloquées ou seront déviées par le



champ électrique. Toutes les cellules présentant une χ_{DEP} inférieure à cette valeur seront capables de traverser le champ électrique.

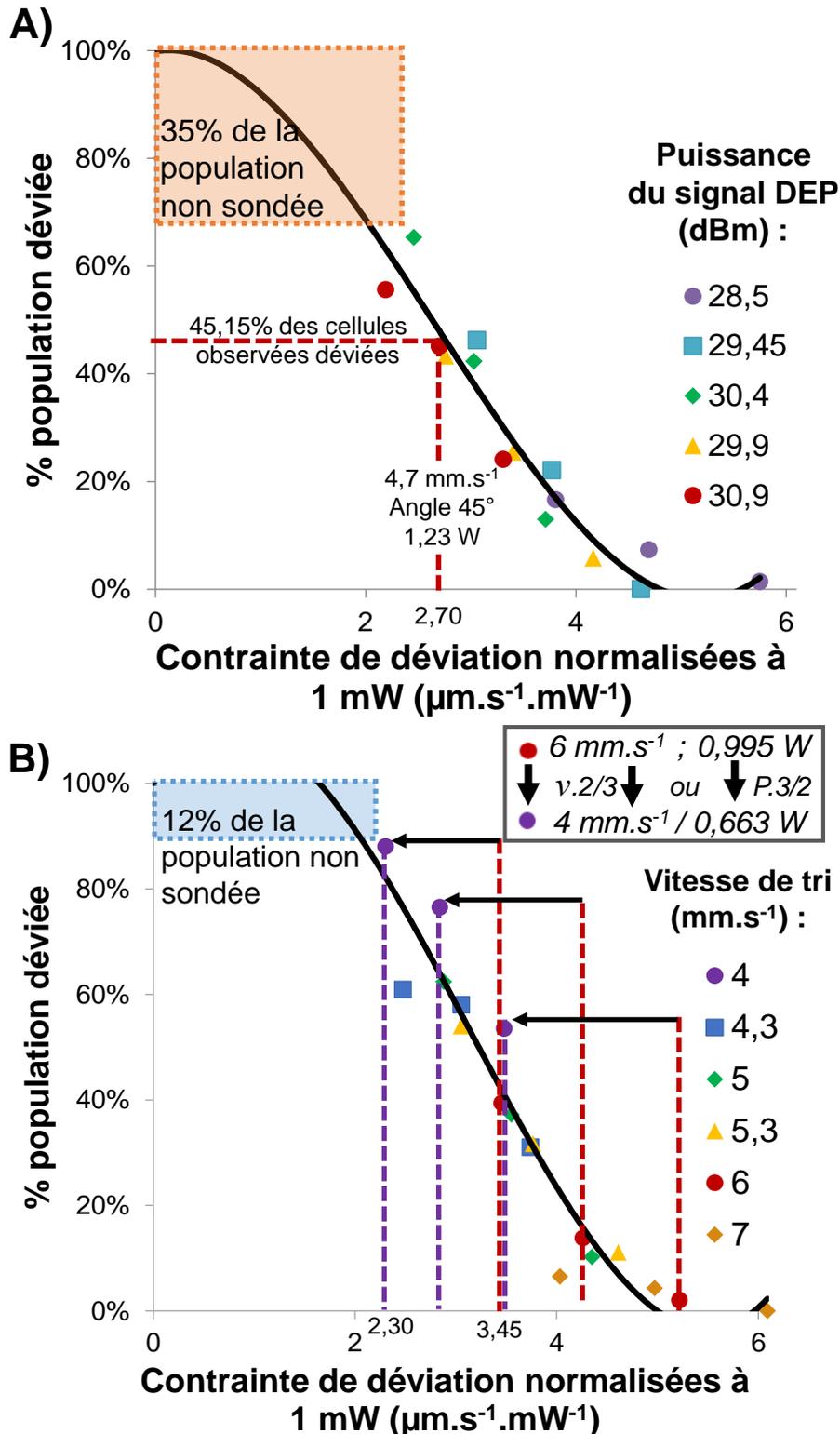


Figure.116 : A) Compilation des données des 5 acquisitions de la Figure.112 en lien avec les contraintes de déviation obtenues en faisant varier la puissance du signal DEP utilisé. 35% de la population n'a pas été déviée lors de ces acquisitions et donc ne peuvent correctement être évaluée; B) Compilation des données des 6 acquisitions de la Figure.113 en lien avec les différentes contraintes de déviations obtenues en faisant varier la vitesse du flux. 12% de la population n'a été déviée lors des acquisitions donc ne peut correctement être évaluées.

A partir des différentes expérimentations de tris que nous avons réalisées, nous connaissons quel est le pourcentage de cellules de la population qui, pour une contrainte de déviation donnée, a été déviée par le champ électrique. Cela nous a permis d'établir la Figure.116 en compilant l'ensemble des données de la Figure.112 et Figure.113. Nous ne pouvons réaliser la même courbe pour les expérimentations de la Figure.114, car en faisant varier uniquement la fréquence du signal DEP, nous faisons varier la susceptibilité diélectrophorétique χ_{DEP} de la population au travers de f_{CM} , pour les mêmes contraintes de déviation. Il faut noter également que diminuer la fréquence du signal en se rapprochant de la plus haute fréquence de transition f_{X02} de la population de cellules en question diminue la χ_{DEP} de la population sans pour autant forcément garder la même probabilité de répartition autour d'une valeur de χ_{DEP} moyenne.

Afin d'évaluer la variation des valeurs de contrainte de déviation exprimées par la population, une courbe de tendance basée sur un polynôme du troisième degré est utilisée. Cette courbe permet d'estimer facilement pour une contrainte donnée quel est le pourcentage de la population de cellules qui devrait être déviée ou non. Il faut noter que pour tracer ces courbes, nous considérons un point supplémentaire à une contrainte de déviation de $0 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mW}^{-1}$ pour laquelle aucune des cellules ne peuvent traverser le champ électrique. C'est un cas idéal pour lequel il n'y aurait pas de vitesse de flux ou une puissance de champ infiniment grande.

Les zones orange (Figure.116.A) et bleu (Figure.116.B) correspondent aux valeurs de contrainte de déviation qui n'ont pas été atteintes lors de nos acquisitions. Ainsi, un certain pourcentage de la population n'a pas été dévié par le champ électrique et donc nous n'avons pas d'information sur celle-ci.

A partir de ces courbes de tendances il est possible d'évaluer la densité de population des cellules U87 selon leur χ_{DEP} à 500 MHz (Figure.117). La densité d'une population selon sa χ_{DEP} correspond à un pourcentage de la population qui présente un petit intervalle de susceptibilité donnée. Pour la Figure.117, cette densité est calculée comme la dérivée des courbes de tendance de la Figure.116 pour un intervalle de χ_{DEP} normalisé à 1 mW de $0,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mW}^{-1}$.

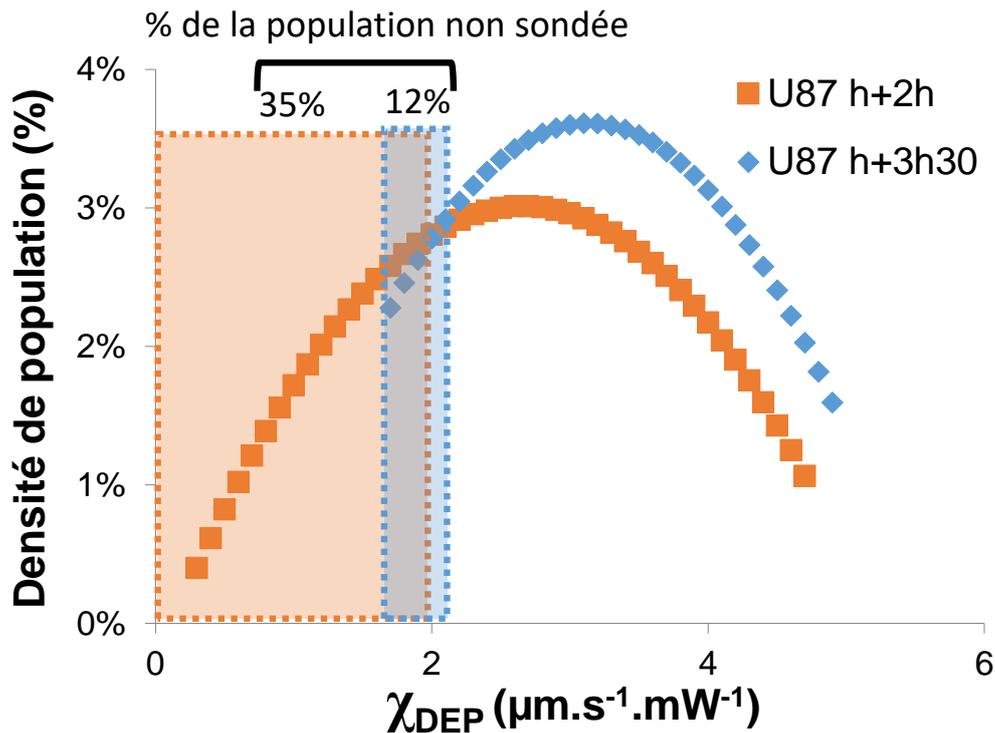


Figure.117 : Répartition de la population de cellules U87-MG soumise à un signal DEP de fréquence 500 MHz selon leur susceptibilité diélectrophorétique normalisée sur des intervalles d'intensité de $0,1 \mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{mW}^{-1}$. La courbe bleue est obtenue à partir de la courbe de tendance de la Figure.112.A et la courbe rouge à partir de la courbe de tendance de la Figure.113.B. 1h30 séparent les débuts des deux séries d'acquisitions qui ont commencées 3h après la mise en suspension des cellules dans le milieu DEP.

Nous remarquons en premier lieu que ces deux courbes ne se superposent pas. En effet, étant basées sur la même population cellulaire et à la même fréquence de signal, nous pouvons nous attendre à ce que les deux densités de population soient similaires. L'hypothèse la plus plausible pour expliquer cette différence est qu'il faut tenir compte qu'entre le début de ces deux caractérisations de cette population de cellules, 1h30 s'est écoulée. Comme les cellules sont suspendues dans un milieu de survie, il est fort probable que les fréquences de transitions des cellules aient évolué [12] sur ce laps de temps, ceci se reflétant aussi dans leur χ_{DEP} . Cette évolution des caractéristiques diélectriques des cellules est liée à l'utilisation d'un milieu de survie. Comme le décrit C. Chug dans sa thèse, cette modification des cellules qu'il suit au travers des deux fréquences de transition peut être faible sur les premières heures après le changement de milieu ou même une journée entière selon le milieu de suspension et la température de celui-ci. Dans notre cas les cellules étaient déjà en suspension depuis 3h lors de la première série d'acquisitions et depuis 4h30 pour la seconde série d'acquisition. Pour éviter cette variation de la susceptibilité diélectrophorétique des cellules, l'adaptation de notre milieu de suspension est à faire, bien qu'un tri sur 2 à 3 heures après la mise en suspension dans le milieu DEP reste possible sans ajustement.

Ensuite nous remarquons que les deux courbes présentent une forme gaussienne. Ceci valide l'utilisation des lois normales que nous avons utilisées pour évaluer l'erreur statistique de nos acquisitions.

A partir de la Figure.117, il est à présent possible de choisir les conditions optimales pour isoler une partie de la population. En effet, connaissant la densité de la population selon leur

χ_{DEP} , il devient facile de trouver une configuration de flux et d'intensité du signal DEP appropriées pour les inclinaisons d'électrodes de notre système de façon à isoler la partie de la population d'intérêt et l'isoler des autres cellules dans la sortie souhaitée.

Afin de réaliser cette sélection sur une population cellulaire donnée, il est donc nécessaire de la caractériser en amont à l'image de la Figure.117 pour connaître sa répartition de χ_{DEP} . Pour cela, il convient de commencer par trouver les conditions fluidiques et électriques qui permettent la déviation de quelques de cellules (une partie de la population inférieure à 5%) jusqu'à la sortie 2 ou 3 de notre système et en faire une acquisition. Cela permet de connaître les χ_{DEP} les plus fortes exprimées dans la population sondée. Ensuite, il faut réaliser différentes acquisitions en augmentant chaque fois la puissance du signal DEP jusqu'à arriver à une puissance où presque plus aucune cellule n'est collectée dans la sortie 1.

Autrement, de manière moins générale, la Figure.118 présente un cas possible de 6 acquisitions de données à mener afin de réaliser une évaluation de la χ_{DEP} d'une population inconnue de cellules entre 0,65 et 7,07 $\text{mm.s}^{-1}.\text{W}^{-1}$ en faisant varier uniquement la puissance du signal DEP avec une vitesse de flux constante de 4 mm.s^{-1} ou en faisant varier la vitesse à une puissance fixe de 29 dBm. Chaque fois, cette évaluation de la population n'est valide que pour la fréquence unique qui a été utilisée lors de ces acquisitions.

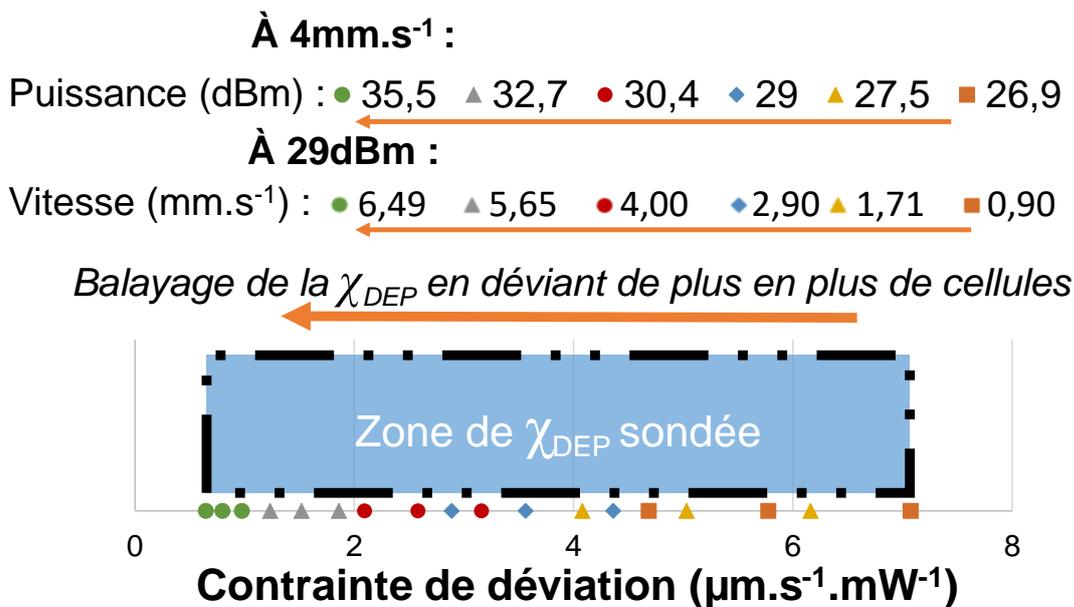


Figure.118 : Pour connaître le comportement des cellules soumises au champ électrique, un balayage des intensités de contrainte de déviation est nécessaire. En partant de contraintes fortes déviant peu de cellules jusqu'à des contraintes faibles déviant le plus de cellules possibles.

Il faut noter que pour la géométrie du cytomètre considérée, i.e. première inclinaison des électrodes à 35° et dernière à 60°, il suffit d'augmenter la puissance du signal DEP de 1,79 dBm pour que la contrainte de déviation qu'avait précédemment le premier angle devienne celle du dernier angle. En conséquence, toutes les cellules précédemment déviées et collectées à une sortie autre que la première sont maintenant toutes déviées jusqu'à la sortie 4.

Ainsi il est possible d'effectuer un scan de la susceptibilité diélectrophorétique de l'ensemble de la population cellulaire, par tranches successives en incrémentant par pas la puissance du signal DEP utilisé. Pour illustrer ce principe, observons les données de la Figure.112. Si

nous comparons la mesure effectuée à 28,5 dBm où $16,7\% \pm 5,1\%$ de la population est déviée par la première zone d'électrodes de 35° d'inclinaison et que nous considérons à présent celle réalisée à 30,4 dBm, pour laquelle $13,1\% \pm 4,4\%$ de la population est déviée jusqu'à la sortie 4, nous observons donc bien, sur la Figure.116.A (ronds violets, losanges verts) pour un pas de puissance de 1,9 dBm, la continuité de susceptibilité diélectrique des deux segments mesurés aux pourcentages d'erreurs statistiques près.

Le même principe peut également se décliner en ajustant la vitesse des cellules dans la zone de tri (Figure.116). Cependant en pratique cela s'avère plus complexe à mettre en œuvre. En effet, pour chaque modification des conditions fluidiques, il est nécessaire de rétablir le bon équilibre entre le flux du buffer et celui de la suspension de cellules afin de focaliser les cellules pour que leur trajectoire les amène bien sur la première inclinaison d'électrode. Dans notre cas, n'ayant qu'un débitmètre pour établir le bon réglage de cet équilibre entre les deux entrées, la mesure de la vitesse du flux reste bien plus imprécise que notre mesure de la puissance du signal DEP appliqué aux électrodes.

Au cours de cette dernière partie, nous avons analysé de manière approfondie les résultats les plus pertinents obtenus lors de nos expérimentations. Nous avons pu valider les conclusions de l'étude théorique que nous avons menée de l'impact, sur la déviation des cellules, respectivement de l'inclinaison des électrodes, de la vitesse du flux et de l'intensité du champ électrique appliqué. De plus, par une variation de la fréquence du signal, l'effet de f_{CM} sur la déviation des cellules dans nos conditions de tri a été montré. La taille elle aussi a une influence notable sur l'intensité de la force DEP, et c'est pourquoi nous retrouvons dans nos résultats la tendance que les cellules les plus petites sont collectées au niveau de la première sortie et les plus larges dans la dernière. Cette tendance est également impactée par f_{CM} . Ainsi, dans la suite de notre étude, nous avons considéré ces deux caractéristiques cellulaires sous le nom de susceptibilité diélectrophorétique.

Sur la base de la bonne corrélation entre l'étude théorique et les données expérimentales obtenues, nous avons pu proposer une utilisation du microsysteme développé pour caractériser la susceptibilité diélectrophorétique d'une population cellulaire donnée. Cette analyse préalable de la population cellulaire globale permet en effet de cibler de manière plus aisée et efficace la collecte d'une portion de la population de cellules d'intérêt au niveau d'une sortie souhaitée.

III.6. Conclusion

A partir du bilan des forces qui avait été mené au cours du chapitre 2, nous avons proposé un modèle décrivant l'accélération des cellules et les conditions entraînant une cellule à suivre un mouvement rectiligne uniforme le long des électrodes où le champ électrique est le plus intense. Il est apparu que ce phénomène d'accélération avait un impact négligeable dans les conditions où nous souhaitons travailler avec les microsystèmes de tri envisagés. De ce modèle nous avons pu également établir une formule permettant d'évaluer une valeur critique du facteur de Mossotti au-delà de laquelle le système sera en mesure d'agir sur la trajectoire des cellules. Ce f_{CM} critique permet de prédire si une cellule d'une taille donnée de par son facteur f_{CM} intrinsèque, donc de ses caractéristiques diélectriques internes, sera effectivement déviée par le champ pour les conditions de tri fixées.

A partir de cette formule, l'influence des conditions de déviation sur la séparation des cellules en quatre sous-populations, aux caractéristiques diélectriques moins hétérogènes que celles de la population originelle, a été analysé. Une méthode permettant de choisir des conditions optimales pour trier des populations cellulaires ayant des caractéristiques diélectriques connues a été également présentée. Basé sur cette approche théorique, un second prototype a été conçu et réalisé, ce qui nous a permis de valider la faisabilité de l'approche de tri sans marquage sur la seule base des propriétés physiques intracellulaires des cellules investiguées. Contrairement au premier prototype présenté lors du second chapitre de ce manuscrit, ce nouveau microsystème n'utilise que des forces DEP répulsives. La géométrie des électrodes implémentées présentent non plus un seul mais trois angles de déflexion par répulsion par rapport à la direction d'écoulement du flux de cellules dans le canal microfluidique, avec des inclinaisons respectivement de 35°, 45° et 60°. Nous avons pu également mettre en lumière comment ces différents segments d'électrodes en fonction de leur inclinaison agissaient sur la trajectoire des cellules.

Les performances de ce microsystème et son aptitude à séparer efficacement une population cellulaire aux caractéristiques hétérogènes ont été testées sur des cellules de la lignée U87-MG, issue d'une pathologie de Glioblastome qui présentent une grande diversité biologique se traduisant, comme nous l'avons illustré au travers la caractérisation de leur fréquence de transition diélectrophorétique UHF, par une forte hétérogénéité diélectrique. Les tris qui ont été réalisés sur ces cellules ont été enregistrés et analysés au moyen d'un système d'analyse d'images par reconnaissance de forme. Grâce à un traitement en temps réel des images, de l'ordre de 11 images par secondes, ce système facilite grandement l'analyse des données des expériences menées sur plusieurs dizaines de minutes. L'erreur statistique qu'implique l'observation de seulement quelques centaines de cellules sur l'ensemble d'une population cellulaire a été également discutée pour permettre une analyse plus objective de nos résultats.

Enfin, les résultats expérimentaux parmi les plus représentatifs, ont été présentés et commentés. Les tendances observées sont claires et permettent de valider qu'avec un angle d'électrodes plus fort, les cellules nécessitent effectivement d'être soumises à une force DEP plus intense afin d'être efficacement déviées de leur trajectoire initiale. Il faut également noter que l'augmentation de la puissance du signal DEP facilite cette déviation et qu'au contraire une grande vitesse du fluide transportant les cellules facilite le franchissement de la

barrière de déviation établie par le champ électrique. Ces constatations sont en bon accord avec les calculs théoriques que nous avons établis auparavant.

De plus, une susceptibilité diélectrophorétique (χ_{DEP}) des cellules a pu être définie afin de pouvoir prendre en compte la contribution globale du facteur de Clausius-Mossotti et de la taille des cellules. Cette χ_{DEP} a pu être calculée dans le cadre de nos expérimentations car notre système de tri nous permet, par un balayage de l'amplitude du signal DEP, d'observer relativement facilement celle-ci pour des contraintes de déviation différentes et donc de la caractériser pour des populations cellulaires.

Ainsi, la limitation principale à l'utilisation de notre système qui était de ne pas connaître précisément à priori les caractéristiques diélectriques des cellules, est dépassée. En l'état il nous permet de caractériser une population cellulaire inconnue. A partir de la mesure de la susceptibilité diélectrophorétique, la séparation des cellules en 4 sous-populations souhaitées devient possible. Ces sous populations pourront par la suite être analysées selon des critères biologiques avec des techniques classiques de microbiologie afin de déterminer quelle sous-population présente le plus les caractéristiques du type cellulaire cible. Ainsi après un étalonnage du système incluant quelques étapes successives de collecte puis tests, il sera tout à fait possible d'associer la χ_{DEP} avec les caractéristiques biologiques recherchées et donc de réaliser un tri qui permettra d'isoler et de collecter les cellules d'intérêt au niveau de la ou les sorties souhaitées.



Partie IV. Conclusion générale et perspectives :

IV.1. Conclusion

Durant les travaux présentés dans ce manuscrit, nous avons conçu et réalisé un microsystème utilisant le phénomène de diélectrophorèse (DEP) pour trier des cellules selon leurs caractéristiques diélectriques afin de séparer des cellules souches cancéreuses qui sont indifférenciées des cellules malignes différenciées. Nous avons choisis pour ces travaux l'utilisation de la gamme de fréquences UHF, car il existe à ces fréquences une plus grande sensibilité aux spécificités intra-cytoplasmiques par rapport à des fréquences plus basses.

Au cours de notre étude bibliographique, nous avons mis en avant les aptitudes de la DEP-UHF pour identifier les cellules souches cancéreuses (CSC) sur la base de différences de propriétés diélectriques intracellulaires. Grâce à cela, et sur la base d'une caractérisation préalable des fréquences de transition des cellules, l'architecture d'un premier cytomètre en flux continu a été proposé et présenté. Celui-ci réalise la séparation des cellules selon l'attraction, la répulsion, ou l'absence de modification de leur trajectoire une fois mises en interaction avec un champ électrique haute fréquence. Le fonctionnement est le suivant : selon la fréquence de transition f_{x02} des cellules par rapport à celle du signal DEP appliqué, celles-ci seront collectées dans une sortie donnée. Une première sortie collecte les cellules ayant une f_{x02} proche de la fréquence du signal DEP utilisée donc assujetties à de faibles forces DEP. Une seconde récupèrera celles attirées par le champ électrique, donc ayant leur f_{x02} inférieure à la fréquence du signal DEP. Enfin, la troisième sortie collecte les cellules repoussées par le champ électrique, donc ayant leur f_{x02} supérieure à la fréquence du signal DEP.

A la suite des validations expérimentales réalisées avec ce premier microsystème, nous avons fait le choix d'écarter l'utilisation de la DEP positive essentiellement par rapport aux risques qu'elles adhèrent aux électrodes, et engendre une défaillance du système. Basé sur une modélisation appropriée, il est possible de trouver des conditions fluidiques et électriques optimales permettant de dévier les cellules aux caractéristiques diélectriques ciblées le long d'électrodes présentant une inclinaison donnée vis à vis du sens de déplacement du flux de cellules circulant dans le canal microfluidique du microsystème. Un second cytomètre électromagnétique a été ainsi conçu et réalisé pour opérer sur ce principe. Ce dernier permet, grâce à une géométrie d'électrodes structurée en 3 sections avec chacune une inclinaison distincte, de séparer les cellules en quatre sous population selon leurs différences de propriétés physiques (taille et permittivité diélectrique complexe).

Ce second microsystème nous a permis de confirmer l'influence des conditions de réglage du système notamment la vitesse d'écoulement, ainsi que l'amplitude et la fréquence du signal DEP appliqué aux électrodes du trieur de cellules. L'influence des caractéristiques diélectriques ciblées se reflète dans la variation des résultats des collectes lorsque la fréquence du signal DEP change dans des conditions fluidiques et électriques identiques. D'autre part, la taille des cellules a aussi son importance dans la collecte des sous-populations et entraîne une modulation dans le ciblage des caractéristiques diélectriques des cellules. Ne cherchant plus à dissocier en l'état ces deux caractéristiques, nous avons fait le choix de baser nos tris sur ce que nous appelons la « susceptibilité diélectrophorétique » des cellules, qui représente l'intensité de réaction des cellules à un champ électrique donné.



A partir de la caractérisation de cette susceptibilité diélectrophorétique pour une population donnée, nous pouvons définir les conditions fluidiques et électriques de notre système afin d'orienter précisément une partie de la population dans une sortie souhaitée. Nous avons constaté qu'en plus de sa fonction de cytomètre, il est possible d'utiliser notre système pour obtenir une caractérisation des populations cellulaires. En effet, il est possible, à partir de tris à différentes puissances de signal DEP réalisés avec notre système, de retrouver la susceptibilité diélectrophorétique des cellules. Notre système peut ainsi être utilisé pour caractériser puis dans un second temps pour trier un échantillon donné.

IV.2. Perspectives :

La lignée de glioblastome qui nous a servi de modèle d'étude est très hétérogène et possède une très faibles proportions de cellules qui présentent des caractéristiques indifférenciées : les cellules souches cancéreuses (CSCs) [13]. Celles-ci n'ont pas pu être identifiées au travers de la susceptibilité diélectrophorétique au cours de la partie III.5.3, du fait que leur nombre est très réduit au sein de la population. En réalisant et comparant deux caractérisations au travers de notre système avant et après un enrichissement de la population en CSCs [9] nous pouvons identifier leur susceptibilité diélectrophorétique et ainsi les cibler lors de tris futurs. L'enrichissement de la population en CSCs peut être réalisé en mettant les cellules dans des conditions de culture strictes où seules les plus résistantes et présentant des caractéristiques agressives peuvent survivre et se multiplier. L'enrichissement peut aussi être réalisé par SdFFF (Sédimentation Field Flow Fractionation) pour obtenir une fraction présentant une concentration plus forte en CSCs. Dans les deux cas, l'échantillon récupéré présente un pourcentage de CSCs supérieur par rapport à la population totale de cellules. La population enrichie en CSCs présente donc une hétérogénéité moins grande que la population complète, et reflète plus les caractéristiques des CSCs.

Pour réaliser ces caractérisations, des tris plus longs doivent donc être menés afin d'avoir une meilleure précision. De plus, dans un microsystème présentant contrairement à nos prototypes quatre sorties disjointes, des collectes d'échantillons de plusieurs dizaines de milliers de cellules par sorties doivent être mises en place pour permettre aux biologistes de réaliser des tests fonctionnels tels que la clonogénicité et l'essai en dilution limite. Ces tests permettent, en observant la croissance de neurosphères dans différents échantillons, d'identifier ceux présentant le plus de CSCs. Nous pouvons ainsi connaître les susceptibilités diélectrophorétiques associées à des cellules présentant des caractéristiques de forte agressivité tumorale et d'aptitudes à régénérer des tumeurs à une fréquence du signal DEP donnée. Certaines fréquences UHF pouvant se révéler plus appropriées que d'autres pour cibler les CSCs, ces mêmes analyses sont donc à mener sur des échantillons triés avec d'autres fréquences de signal DEP pour identifier la plus pertinente.

Les manipulations que nous avons pu réaliser lors de nos travaux présentent en moyenne de l'ordre de 2 cellules triées par seconde pouvant aller jusqu'à 5 cellules par secondes. Réaliser tous les tests et surtout avec un nombre de cellules collectées en quantité suffisante demanderait un temps de tri sans discontinuité que nous ne sommes en l'état pas en capacité de réaliser, sans parler du risque de dégradation de la viabilité des cellules en restant trop longtemps dans le milieu de survie. La durée cumulée d'une expérience sans besoin d'intervention est limitée par différents phénomènes : en premier lieu, la



sédimentation des cellules qui requière d'avoir à remettre en suspension les cellules toutes les demi-heures pour qu'un flot suffisant de cellules arrive bien de manière continue à la zone de tri. En second lieu, l'adhérence ponctuelle des cellules sur les électrodes, qui entraîne des perturbations importantes lors le tri du fait de la formation à la longue d'agglomérats.

Deux développements spécifiques ont besoin d'être menés : une permettant l'augmentation du nombre de cellules traitées par unité de temps et l'autre, un traitement de surface pour réduire voire faire disparaître les risques d'adhérence des cellules sur les électrodes.

Pour permettre une caractérisation d'un échantillon cellulaire très concentré, il a aussi été envisagé d'avoir recours à une autre géométrie d'électrodes, actuellement à l'état de concept. Des cellules seraient injectées dans un canal microfluidique de forme circulaire et mises en circulation dans un canal circulaire (Figure.119 sens de rotation indiqué par les flèches blanches). Lors de leur parcours, les cellules rencontreraient un champ électrique généré entre des électrodes qui serait dans un premier temps faible. Du fait de ce champ électrique, seules les cellules réagissant fortement au champ seraient déviées et guidées jusqu'à la sortie. Après que toutes les cellules aient été exposées au champ électrique, plus aucune ne réagirait assez pour être menée jusqu'à la sortie. L'intensité du champ électrique serait alors augmentée, imposant une nouvelle contrainte de tri permettant de sortir de la boucle les cellules présentant une susceptibilité DEP plus faible.

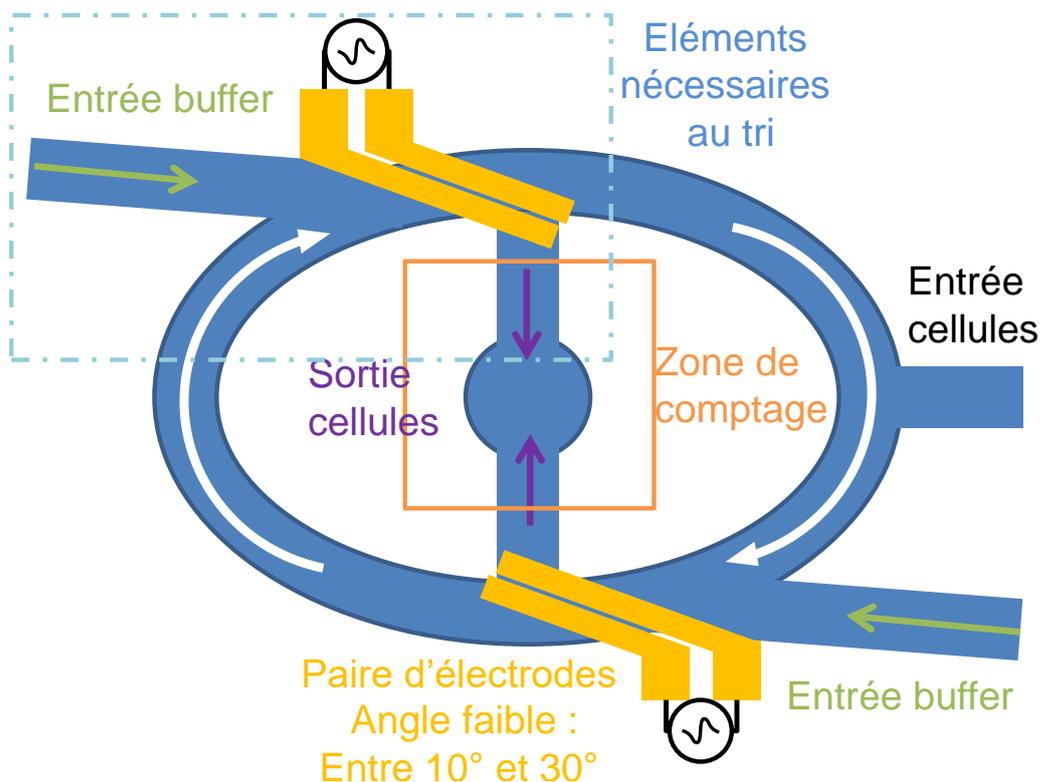


Figure.119 : Concept de système de caractérisation de la susceptibilité diélectrophorétique des cellules. Des cellules initialement injectées par l'entrée cellules tournent dans le canal central (flèches blanches) du fait du flux imposé par les entrées buffer. Si leur susceptibilité est suffisante, le champ les guidera vers la sortie. En augmentant graduellement la puissance du signal DEP, un large panel de susceptibilité sera sondé et à chaque intensité, un certain nombre de cellules sortira du dispositif électro-fluidique. Leur comptabilisation dans la zone de comptage permettrait de construire un histogramme.

En augmentant ainsi graduellement l'intensité du champ et en comptant combien de cellules sont sorties pour une intensité donnée, un histogramme de la susceptibilité DEP pourrait être réalisé.

Cette caractérisation se déroulerait selon le sens de flux présenté par la Figure.120.A. Le sens de rotation serait imposé par les entrées de buffer qui, par la forme réalisée, permettra à une partie du milieu de sortir mais pas aux cellules, pendant que le reste du milieu sera en rotation dans la zone de caractérisation. L'entrée des cellules est dans cette phase bloquée. En effet, si des cellules rentrent dans le microsystème alors que le tri a commencé, elles n'auront pas eu la totalité du balayage des susceptibilités sondées, ce qui fausserait le comptage.

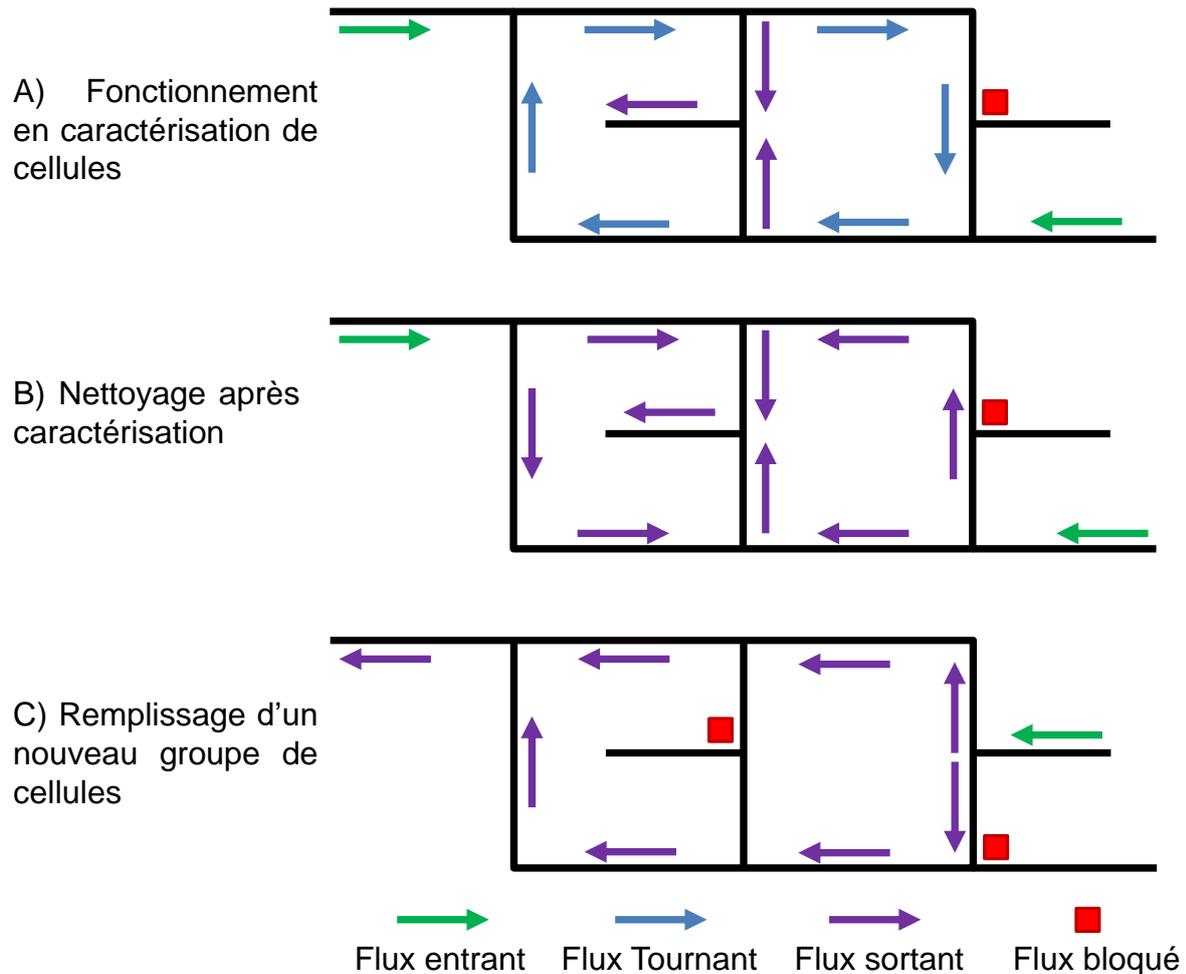


Figure.120 : Différents sens de circulation du flux selon les étapes de caractérisation. Avant chaque nouvelles caractérisation (circulation A), un nettoyage des débris restant de la précédente caractérisation doit être fait (circulation B)) avant de faire venir les nouvelles cellules à caractériser (circulation C). Ceci permet de recommencer la caractérisation à 0 (circulation A).

Une fois toutes les cellules triées, il restera très probablement des débris cellulaires qui n'auront pas réagi au champ électrique. Ainsi une étape de nettoyage sera nécessaire (Figure.120.B). Le champ électrique sera coupé et l'équilibre fluide précédent sera modifié en diminuant par exemple la contre pression mise en sortie. Ainsi le flux tournant disparaîtra et les débris seront aspirés en sortie. Une fois cette étape réalisée, il deviendra nécessaire d'introduire de nouvelles cellules (Figure.120.C). Cette fois-ci, une contre pression importante sera imposée au niveau de la sortie centrale et au buffer le plus proche

de l'entrée des cellules. L'entrée du buffer la plus éloignée de l'entrée des cellules deviendra dans cette phase une sortie. Par cette manipulation, les canaux centraux seront à nouveau remplis de la suspension cellulaires.

Après cette étape, l'équilibre permettant la configuration Figure.120.A sera rétabli. Sans champ électrique toujours, les cellules seront mises en rotation dans la boucle jusqu'à ce que les cellules qui avaient été jusqu'à l'entrée du buffer opposée à l'entrée des cellules, soient toutes ramenées dans le canal circulaire. Cela fait, la caractérisation pourra de nouveau commencer en appliquant le champ comme précédemment. Il faut noter qu'il est préférable d'avoir un angle d'électrodes pour la déviation des cellules plutôt faible, entre 10° et 30° par exemple, afin de plus facilement sonder des susceptibilités faibles sans trop avoir à augmenter l'intensité du champ électrique.

La sortie du système est située au centre afin de n'avoir qu'une seule zone de comptage, mais à pouvoir ajouter tout de même plusieurs canaux de sorties. Ici, seules deux sorties sont présentées, mais en disposant N zones de tri à la suite (encadrées en pointillés), nous diminuerions le temps de caractérisation d'autant de fois. En effet, s'il n'existe qu'une sortie, les cellules devront toutes faire un tour complet du système avant que la tension inter-électrode ne soit changée. Or avec 2 sorties, ce n'est plus que 1/2 tour qui est nécessaire aux cellules pour chaque puissance du signal DEP, diminuant ainsi par deux la distance à parcourir et donc le temps de caractérisation.

Plusieurs paramètres sont à optimiser en plus du dimensionnement de ce système :

Un équilibre des pressions des entrées et sortie permettant la mise en rotation des cellules sans que celles-ci naturellement sortent de la boucle, mais que malgré tout, une partie du milieu sorte pour transporter les cellules guidées par les électrodes. Au cours de leurs travaux, A. R. Abhyankar *et al* [14] ont cherché à évaluer si des flux tournants peuvent apparaître au sein d'un réseau fluide. Pour réaliser cela, ils proposent une mise en équation et une modélisation simulant le système considéré qui nous permettrait ainsi d'évaluer les conditions nécessaires pour la circulation A.

En plus de cela, il peut être intéressant pour imposer facilement le sens de rotation, de modifier la forme des canaux afin de réaliser des buses de diffusions (diffuser/nozzle) [15]. Celles-ci offrent une résistance fluide plus faible dans un sens d'écoulement que dans l'autre et peuvent permettant ainsi que le canal présente une plus grande résistance fluide dans le sens inverse du sens de circulation souhaité.

Ce système permettrait de répondre aux besoins actuels de caractérisation d'un volume de cellules plus important. Grâce à cette caractérisation au préalable, il devient plus aisé d'utiliser le cytomètre présenté dans ces travaux, ce qui permettra de réaliser des collectes de sous populations ciblées permettant d'analyser biologiquement et reconnaître les caractéristiques diélectriques des cellules souches cancéreuses.

Références bibliographiques du chapitre III et des Conclusion générale et perspectives

- [1] L. Chen, S. Li, H. Cui, et X. Zheng, « Numerical simulation about trapping two particles in microfluidic dielectrophoretic chip », in *2012 International Conference on Manipulation, Manufacturing and Measurement on the Nanoscale (3M-NANO)*, Xi'an, China, août 2012, p. 288-291. doi: 10.1109/3M-NANO.2012.6472944.
- [2] A. Castellanos, A. Ramos, A. González, N. G. Green, et H. Morgan, « Electrohydrodynamics and dielectrophoresis in microsystems: scaling laws », *J. Phys. Appl. Phys.*, vol. 36, n° 20, p. 2584-2597, oct. 2003, doi: 10.1088/0022-3727/36/20/023.
- [3] B. Çetin et D. Li, « Dielectrophoresis in microfluidics technology », *ELECTROPHORESIS*, vol. 32, n° 18, p. 2410-2427, sept. 2011, doi: 10.1002/elps.201100167.
- [4] S. Hashimoto et F. Iwata, « Measurement of shear force and adhesion force of a single adhesion cell using atomic force microscopy with a self-sensitive cantilever », in *2015 International Symposium on Micro-NanoMechatronics and Human Science (MHS)*, Nagoya, Japan, nov. 2015, p. 1-6. doi: 10.1109/MHS.2015.7438278.
- [5] J. A. Oguntuase, « ON AN INEQUALITY OF GRONWALL », p. 6, 2001.
- [6] J. H. Nieuwenhuis, A. Jachimowicz, P. Svasek, et M. J. Vellekoop, « Optimization of microfluidic particle sorters based on dielectrophoresis », *IEEE Sens. J.*, vol. 5, n° 5, p. 810-816, oct. 2005, doi: 10.1109/JSEN.2005.844333.
- [7] U. Kim, J. Qian, S. A. Kenrick, P. S. Daugherty, et H. T. Soh, « Multitarget Dielectrophoresis Activated Cell Sorter », p. 6.
- [8] M.-E. Oraiopoulou, « Integrating in vitro experiments with in silico approaches for Glioblastoma invasion: the role of cell-to-cell adhesion heterogeneity », *Sci. Rep.*, p. 13, 2018.
- [9] R. Manczak *et al.*, « UHF-Dielectrophoresis Crossover Frequency as a New Marker for Discrimination of Glioblastoma Undifferentiated Cells », *IEEE J. Electromagn. RF Microw. Med. Biol.*, vol. 3, n° 3, p. 191-198, sept. 2019, doi: 10.1109/JERM.2019.2895539.
- [10] S. V. Puttaswamy, S. Sivashankar, R.-J. Chen, C.-K. Chin, H.-Y. Chang, et C. H. Liu, « Enhanced cell viability and cell adhesion using low conductivity medium for negative dielectrophoretic cell patterning », *Biotechnol. J.*, vol. 5, n° 10, p. 1005-1015, oct. 2010, doi: 10.1002/biot.201000194.
- [11] D. J. Biau, S. Kernéis, et R. Porcher, « Statistics in Brief: The Importance of Sample Size in the Planning and Interpretation of Medical Research », *Clin. Orthop.*, vol. 466, n° 9, p. 2282-2288, sept. 2008, doi: 10.1007/s11999-008-0346-9.
- [12] C. Chung, « Dielectrophoretic Investigations of Internal Cell Properties », p. 167.
- [13] T. Saydé *et al.*, « Characterization of Glioblastoma Cancer Stem Cells Sorted by Sedimentation Field-Flow Fractionation Using an Ultrahigh-Frequency Range Dielectrophoresis Biosensor », *Anal. Chem.*, vol. 93, n° 37, p. 12664-12671, sept. 2021, doi: 10.1021/acs.analchem.1c02466.
- [14] A. R. Abhyankar, S. A. Khaparde, et S. A. Soman, « Multiple solutions approach to tackle circular flows in real power tracing », in *2006 IEEE Power Engineering Society General Meeting*, Montreal, Que., Canada, 2006, p. 8 pp. doi: 10.1109/PES.2006.1708967.

- [15] P. C. Sousa, F. T. Pinho, M. S. N. Oliveira, et M. A. Alves, « Efficient microfluidic rectifiers for viscoelastic fluid flow », *J. Non-Newton. Fluid Mech.*, vol. 165, n° 11-12, p. 652-671, juin 2010, doi: 10.1016/j.jnnfm.2010.03.005.

Productions scientifiques

- **Revue à comité de lecture :**

R. Manczak, S. Saada, T. Provent, C. Dalmay, B. Bessette, G. Begaud, S. Battu, P. Blondy, M.O. Jauberteau, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, F. Lalloue, A. Pothier, « **HF-Dielectrophoresis Crossover Frequency as a New Marker for Discrimination of Glioblastoma Undifferentiated Cells** », IEEE Journal of Electromagnetics, RF and Microwaves in Medicine and Biology, On page(s): 1-8, feb 2019, Doi : 10.1109/JERM.2019.2895539

- **Conférences invitées dans des congrès :**

A.Pothier, E.Lambert, R. Manczak, T. Provent, C Dalmay, E. Bartout, S. Saada, T.Sayde, B Bessette, S. Battu, M. Mathonet, F. Lalloué, « **Champs électromagnétiques et diélectrophorèse haute fréquence: des nouvelles approches permettant de discriminer et isoler les Cellules Souches Cancéreuses** », 1^{ères} journées de l'Oncosphère Nouvelle Aquitaine, 23-24 Septembre 2021, La Rochelle

A. Pothier, R. Manczak, S. Saada, T. Provent, C. Dalmay, B. Bessette, G. Begaud, S. Battu, P. Blondy, M.O. Jauberteau, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, F. Lalloue, « **Discriminating and isolating CSC and immature cells from heterogeneous glioblastoma population thanks to high frequency Electromagnetic fields and Dielectrophoresis On-Chip** », Workshop Organ on Chip Cancéropole GSO, 1^{er} juin 2021, Virtuel

E.Lambert, E. Barthout, T. Provent, R. Manczak, S. Saada, C. Dalmay, B. Bessette, F. Lalloué, A.Pothier, « **Microfluidic device for high-frequency dielectrophoresis characterization and single-cell discrimination Single Cell Analysis** », Conference 20 april 2021, Online

A. Pothier, R. Manczak, S. Saada, T. Provent, M. Tanori, A. Casciati, E. Porcù, E. Rampazzo, C. Dalmay, B. Bessette, G. Begaud, S. Battu, C. Merla, B. Tanno, L. Persano, P. Blondy, M.O. Jauberteau, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, G.Viola, M. Mancuso, F. Lalloue, « **Progress in dielectric spectroscopy for biological cell characterization and cell sorting at MHz frequencies** », Workshop on Technologies and modelling for electromagnetically mediated medical treatments; Européan Microwave Conference Week (EUMW) 30 septembre 2019, Paris Présentation Invitée

A. Pothier, R. Manczak, S. Saada, T. Provent, M. Tanori, A. Casciati, E. Porcù, E. Rampazzo, C. Dalmay, B. Bessette, G. Begaud, S. Battu, C. Merla, B. Tanno, L. Persano, P. Blondy, M.O. Jauberteau, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, G.Viola, M. Mancuso, F. Lalloue, « **UHF-Dielectrophoresis Crossover Frequency Measurements do Allow**



Discriminating Cancerous Stem Cells From Differentiated Cells », Workshop on Biomedical Applications of Electromagnetic Energy 7 juillet 2019, Bath Présentation Invitée

A. Pothier, R. Manczak, S. Saada, T. Provent, M. Tanori, A. Casciati, E. Porcù, E. Rampazzo, C. Dalmay, B. Bessette, G. Begaud, S. Battu, C. Merla, B. Tanno, L. Persano, P. Blondy, M.O. Jauberteau, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, G. Viola, M. Mancuso, F. Lalloue, « **Electromanipulate biological cells with high frequency signals: a new way to characterize cell aggressiveness in the frame of cancer treatment** », IMS 2019 Workshop on Electroceuticals: Technologies and Modeling for Electromagnetically-Mediated Medical Treatments 7 June 2019, Boston Présentation Invitée

A. Pothier, R. Manczak, S. Saada, T. Provent, M. Tanori, A. Casciati, E. Porcù, E. Rampazzo, C. Dalmay, B. Bessette, G. Begaud, S. Battu, C. Merla, B. Tanno, L. Persano, P. Blondy, M.O. Jauberteau, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, G. Viola, M. Mancuso, F. Lalloue, « **Des ondes électromagnétiques peuvent-elles être utilisées pour identifier et neutraliser des cellules souches cancéreuses? Vers de nouveaux laboratoires sur puces instrumentées en technologies CMOS** », 21^{ème} Journées Nationales des Microondes 2019 17 may 2019, Caen, France Présentation thématique Invitée

Actes de colloques à comité de lecture :

- **Compte rendu de Congrès internationaux avec comité de lecture :**

Thomas Provent, Audrey Mauvy, Rémi Manczak, Sofiane Saada, Claire Dalmay, Barbara Bessette, Fabrice Lalloué, Arnaud Pothier, « **A High Frequency Dielectrophoresis Cytometer for Continuous Flow Biological Cells Refinement** », 50nd European Microwave Conference (EuMC), Utrecht, Janvier 2021 Doi : 10.23919/EuMC48046.2021.9338228

C. Dalmay, R. Manczak, S. Saada, T. Provent, B. Bessette, A. Casciati, M. Tanori, E Porcù, E Rampazzo, L Persano, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, G. Viola, C. Merla, M. Mancuso, F. Lalloue, A. Pothier, « **Immature cancer cell discrimination using combined high frequency Electromagnetic Fields and dielectrophoresis forces** », BioEM2020, Joint Meeting of the BioElectroMagnetics Society and the European BioElectromagnetics Association, Jun 2020, Oxford, United Kingdom

Roberta Bortolozzi, Elena Mariotto, Elena Rampazzo, Elena Porcù, Sofiane Saada, Thomas Provent, Fabrice Lalloué, Arnaud Pothier, Giampietro Viola and Luca Persano, « **Dielectric Characterization of Glioblastoma Cancer Stem Cells** », International Conference on Molecular Targets and Cancer Therapeutics; 2019 Oct 26-30; Boston, MA. Doi : 10.1158/1535-7163.TARG-19-A058

T. Provent, R. Manczak, S. Saada, C. Dalmay, B. Bessette, P. Blondy, G. Begaud, S. Battu, M.O. Jauberteau, F. Lalloué, A. Pothier, « **Ultra-High Frequencies continuous biological**



cell sorting based on repulsive and low dielectrophoresis forces », IEEE MTT-S Int. Microwave Symp. Dig, Boston 11-15 June 2019, Doi : 10.1109/MWSYM.2019.8701063

R. Manzack, S. Saada, T. Provent, F. Hjeij, C. Dalmay, B. Bessette, G. Begaud, A. Bessaudou, Pierre Blondy, M.O. Jauberteau, F. Lalloue, M, Inac, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, A. Pothier, « **Discrimination of Glioblastoma Cancer Stem Cells by measuring their UHF-Dielectrophoresis Crossover Frequency** », IEEE IMBIOC, Philadelphia 16 June 2018

- **Compte rendu de congrès internationaux avec comité de lecture mais sans acte :**

T. Provent, R. Manczak, S. Saada, C.Dalmay, B. Bessette, P. Blondy, G. Begaud, S. Battu, M.O. Jauberteau, F. Lalloué, A. Pothier, « **Microsystem and Lab-On-Chip technologies might promote future generation of new tools for biological analysis** », Biomedical Applications of Electromagnetic Energy Workshop, Bath, UK 17 July 2019. Poster

- **Compte rendu de congrès nationaux avec comité de lecture :**

T. Provent, R. Manczak, S. Saada, C.Dalmay, B. Bessette, P. Blondy, G. Begaud, S. Battu, M.O. Jauberteau, F. Lalloué, A. Pothier, « **Cytomètre électromagnétique pour tri continu de cellules biologiques basé sur l'effet de forces diélectrophoretiques hautes fréquences** », Journées nationales des Microondes, JNM,Caen Mai 2019

R. Manczak, S. Saada, T. Provent, C. Dalmay, B. Bessette, G. Begaud, S. Battu, P. Blondy, M.O. Jauberteau, C. Baristiran Kaynak, M. Kaynak, C. Palego, F. Lalloue, A. Pothier, « **Discrimination Cellulaire par Dielectrophorèse Ultra Haute Fréquence : Etude des Fréquences de Transition de Cellules de Glioblastomes.**», Journées nationales des Microondes, JNM,Caen Mai 2019

T. Provent, R. Manczak, S. Saada, C.Dalmay, B. Bessette, P. Blondy, G. Begaud, S. Battu, M.O. Jauberteau, F. Lalloué, A. Pothier, « **Continuous Cell Sorting by High Frequencies Dielectrophoresis** », Colloque francophone PLUridisciplinaire sur les Matériaux, l'Environnement et l'Electronique : PLUMEE, Limoges 10 - 12 Avril 2019. 10.5281/zenodo.2652342



Développement et caractérisation de capteurs électromagnétiques utilisant la diélectrophorèse haute fréquence pour l'isolation rapide de cellules souches cancéreuses sur puce

Résumé : Les techniques de tri cellulaire sont variées et permettent des progrès pour la recherche en biologie cellulaire. Parmi celles-ci, l'électro-manipulation par « diélectrophorèse » a prouvé, implémentée au sein de différents microsystemes, son aptitude à trier des cellules. Lors de notre étude, nous avons exploité le domaine des Ultra Hautes Fréquences pour le développement d'un cytomètre électromagnétique microfluidique afin de pouvoir cibler, trier et isoler des cellules souches cancéreuses présentes au sein d'une population de cellules pathologiques au phénotype différencié. La conception du cytomètre est liée à une analyse menée sur les différentes forces qui déterminent la trajectoire de celles-ci et nous permet un contrôle de l'influence des conditions de tri. L'objectif étant de séparer les cellules selon leurs propriétés diélectriques intracellulaires, nous verrons comment il est possible de cibler celles-ci selon leurs caractéristiques diélectrophorétiques dans la gamme des Ultra Hautes Fréquences.

Mots-clés : Diélectrophorèse haute fréquence, microsysteme microfluidique et laboratoire sur puce, tri cellulaire, cellules souches cancéreuses, fréquences de transitions, facteur de Clausius-Mossotti.

Development and characterization of EM sensors based on Ultra High Frequency Dielectrophoresis techniques for fast isolation of Cancer Stem Cells.

Summary: A lot of technologies exist to sort biological cells, and allow great advances in cell biology research. Among these technologies, the development of microsystems for the electro-manipulation of cells by dielectrophoresis (DEP) has demonstrated great capabilities to sort cells. This work aims at demonstrating the ability of ultra-high frequencies DEP to target, sort and isolate cancerous stem cells from a population of pathological cells with differentiated phenotype. The development of a specific microsystem is proposed. The design of the cytometer is linked to the different forces acting on cells and so to determine cells' trajectories during the sorting enabling the controls of the sorting conditions. The work demonstrates how to target cells' dielectrophoretic characteristics in the range of Ultra High Frequencies in order to separate cells based on their intrinsic intercellular dielectric properties.

Key words: High frequencies dielectrophoresis, microfluidics microsystem and lab-on-a-chip, biological cells sorting, cancerous stem cells, crossover frequencies, Clausius-Mossotti factor.