

Transport actif en volume par diélectrophorèse et électro-osmose pour dépasser la limite de diffusion dans les capteurs plasmoniques

Marion Costella

▶ **To cite this version:**

Marion Costella. Transport actif en volume par diélectrophorèse et électro-osmose pour dépasser la limite de diffusion dans les capteurs plasmoniques. Autre. Université de Lyon; Université de Sherbrooke (Québec, Canada), 2020. Français. NNT : 2020LYSEC046 . tel-03870609v2

HAL Id: tel-03870609

https://theses.hal.science/tel-03870609v2

Submitted on 24 Nov 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.

N° d'ordre NNT : 2020LYSEC46

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
Opérée au sein de l'École Centrale de Lyon

En co-tutelle internationale avec
L'Université de Sherbrooke

Au sein de la
Faculté de génie, département de génie électrique et génie informatique

École Doctorale N° 160
Électronique, Électrotechnique et Automatique
Spécialité de doctorat : Génie Électrique

Soutenue publiquement le 14/12/2020, par :
Marion Costella

Transport de masse actif en volume par diélectrophorèse et électro-osmose pour dépasser la limite de diffusion dans les capteurs plasmoniques

---

Devant le jury composé de :

Marie-Caroline Jullien	Directrice de recherche CNRS, IPR	Rapportrice, Présidente du Jury
Anne-Claire Salaün	Professeur, Université Rennes 1	Rapportrice
Loïc Leroy	Maître de conférences, Université Grenoble Alpes	Examinateur
Julien Moreau	Maître de conférences, IOGS	Examinateur
Michael Canva	Directeur de recherche CNRS, LN2	Co-directeur de thèse
Pascal Simonet	Directeur de recherche CNRS, Ampère	Directeur de thèse

Résumé

Les biocapteurs sont des instruments permettant de détecter la présence d'objets biologiques (bactéries, cellules…) ou biochimiques (protéines, ADN…) dans un échantillon. Les biocapteurs à résonance des plasmons de surface utilisent une onde électromagnétique évanescente pour détecter des interactions moléculaires ou la présence d'objets à la surface d'un film métallique. L'ajout d'une fonctionnalisation chimique sur ce film métallique permet l'adhérence et donc la capture spécifique des espèces biologiques ou biochimiques d'intérêt. Cette technique permet une détection sensible, en temps réel et sans marquage, ce qui lui confère trois avantages clés par rapport à d'autres techniques disponibles. Ces dernières années, ces capteurs se sont perfectionnés, et leur sensibilité est désormais proche de leur limite théorique.

Cependant, la capacité d'un capteur à détecter des objets à faible concentration ne dépend pas seulement de ses performances intrinsèques, mais aussi du transport de masse des espèces. Une espèce chimique ou biologique ne sera détectée que si elle s'approche suffisamment du film métallique, ce qui peut prendre énormément de temps lorsque les concentrations sont infimes. Ainsi, le temps de détection sera toujours limité par la diffusion.

Pour pallier ce problème, il est possible d'agir sur le transport de masse des espèces de manière à les rapprocher de la surface de détection. La thèse de Quentin Avenas [1] a montré que le transport de masse peut être activé soit en créant une force qui attire les objets à détecter, soit en créant un flux les entraînant vers la surface de détection. Ce projet de doctorat s'inscrit dans la continuité de ces travaux. L'objectif est d'utiliser des champs électriques pour créer des phénomènes électro-hydrodynamiques favorables à la détection de particules (telles que des billes de latex utilisées comme modèle dans un premier temps), puis d'optimiser le design des puces développées pour obtenir un piégeage le plus efficace possible. Les phénomènes électrocinétiques mis en jeu ont été simulés grâce au logiciel multiphysique COMSOL.

Dans un deuxième temps, le capteur conçu a été testé pour la détection d'objets biologiques tels que des bactéries dans de l'eau, la surveillance de l'eau représentant un enjeu de santé publique majeur. Pour capturer sélectivement des bactéries, il sera nécessaire d'utiliser une chimie de surface qui permette d'immobiliser un élément de reconnaissance (un anticorps) sur la surface sensible du capteur. Enfin, la réponse du capteur en fonction de la concentration de bactéries a été caractérisée.

Abstract

Biosensors are monitoring tools that provide a quantification of chemical or biological species in a sample. Surface plasmon biosensors use an evanescent electromagnetic wave to detect molecular interactions or biological objects on a metallic film. Functionalizing this metallic film makes it adherent to certain biologic or chemical species, allowing their specific detection. Surface plasmon resonance biosensors provide real-time, label-free, and sensitive measurements, 3 advantages in comparison with other detection techniques. In the last decade, many improvements have been made to these types of detectors, which are now close to their theoretical limit.

However, the ability of a sensor to detect ultra-low concentrations does not depend only on its limit of detection, but also on the mass transport of the species to the detection zone. Indeed, a biological or chemical specie can be detected only if it reaches the sensing zone of the biosensor in sufficient quantity. At an ultra-low concentrations of target species, a long time may pass until the target binds to the sensing surface.

To address this problem, chemical or biological species can be trapped close to the detection surface by acting on mass transport. In his Ph.D. work, Q. Avenas showed that mass transport can be activated by creating a force which acts directly on the targets, or by creating a flow dragging targets to the sensing surface. This project follows this work. The objective is to use AC electric fields to create electro-hydrodynamic phenomena favorable to the detection of analytes or micro-objects (such as latex beads used as a model initially), then to optimize the chip design to obtain the most efficient trapping. The electrokinetic phenomena involved were simulated using the COMSOL multiphysics software.

Secondly, the designed sensor was tested for the detection of biological objects such as bacteria in water, water-monitoring representing a major public health issue. To selectively capture bacteria, it was necessary to use surface chemistry that allows a recognition element (an antibody) to be immobilized on the sensitive surface of the sensor. Finally, the response of the sensor as a function of the concentration of bacteria was characterized.

Remerciements

Avant de débuter ce manuscrit, je souhaiterais remercier mes directeurs de thèse de part et d'autre de l'Atlantique pour m'avoir accordé leur confiance pour la réalisation des travaux présentés dans ce manuscrit. Côté Québécois, je voudrais remercier Michael Canva pour sa passion contagieuse pour la science et ses innombrables idées concernant le projet. Je remercie également Paul Charette qui a su me faire prendre du recul sur le projet lorsque c'était nécessaire. Côté Lyonnais, je remercie Pascal Simonet qui a pris la direction de cette thèse. Je tiens également à remercier chaleureusement Marie Frénéa-Robin et Julien Marchalot de m'avoir fait découvrir le monde de la microfluidique. Les moments passés au laboratoire pour essayer de concrétiser nos idées et nos schémas dessinés resteront un excellent souvenir. La disponibilité de mon équipe d'encadrement et leur aide, tant sur un plan scientifique, administratif, qu'humain, m'a permis de mener à bout cette co-tutelle.

Je remercie également les membres de mon jury Marie-Caroline Jullien, Anne-Claire Saulaün, Dennis Machon, Loïc Leroy et Julien Moreau qui ont accepté d'évaluer ce manuscrit.

Cette thèse multidisciplinaire et internationale a bénéficié de nombreuses collaborations. Je souhaite remercier le Pr. Michel Grandbois et son équipe, en particulier Sophie Touchette et Ulrike Froehlich pour m'avoir fourni des cultures cellulaires. Au laboratoire Ampère, je remercie Laure Franqueville pour avoir répondu à mes nombreuses questions de biologiste débutante, et m'avoir formé à la culture cellulaire et bactérienne. La fabrication des échantillons n'aurait pas été possible sans la disponibilité et la gentillesse des personnels des salles blanches, et les formations et conseils prodigués pas Jean-François Bryche. Merci à lui pour son implication sans faille dans le groupe Biophotonique du LN2. Je tiens également à remercier Laurence Convert pour les discussions scientifiques, j'espère que les travaux présentés dans ce manuscrit pourront lui être utile pour les beaux projets à venir.

Je souhaite également remercier Julien Moreau qui m'a accueillie quelques sessions intensives de 3 jours de mesures SPR sur le banc optique du laboratoire Charles Fabry. Ces moments passés au LCF auront été parmi les plus productifs de mon doctorat, la qualité du travail rendu n'aurait pas été la même sans lui. Merci pour son expertise en SPR en en fonctionnalisation de surface qu'il a su partager, ainsi que sa pédagogie et son enthousiasme à chaque nouveau résultat. Je pense que les occasions de se recroiser à l'Institut d'Optique ne manqueront pas.

Je remercie les stagiaires et doctorants du LN2 et du laboratoire Ampère grâce à qui j'ai eu la chance de travailler pendant ces trois années dans une ambiance de travail stimulante et conviviale. Je pense aussi à mon prédécesseur Quentin Avenas qui a su initier les recherches sur la SPR combinée aux effets électro-cinétiques, et à mon successeur Oleh Andreiev qui saura, j'en suis sûre, amener très loin ce projet. Les copains de Sherbrooke avec qui j'ai pu

découvrir une partie du Québec ont rendu le dernier départ bien difficile. Je remercie Fanny, Olivier et Steph pour leur motivation toujours intacte à arpenter les sentiers du Québec, à pied ou en ski de fond. Je pense également à Yann et Valérie, les barbecues et les noëls chez vous m'ont donné l'impression d'une seconde maison. Je souhaite plein de courage à Zhor pour la fin de son doctorat, les longues sessions de travail au CHUS sont bien plus agréables en musique et en sa compagnie. Je remercie également tous les autres copains (Arthur, Tristan, Quentin, Michele, Arnaud, Gwen…), vous êtes inoubliables !

Un grand merci à tous mes proches, amis ou famille, qui sont venu me soutenir virtuellement à ma soutenance. Leur présence a été encourageante et étonnamment nombreuse malgré les contraintes. Je souhaite remercier ma famille et en particulier mes parents qui m'ont toujours soutenu dans ces longues études qui m'ont éloignées d'eux pendant ces huit années. Leur soutien a été une des clefs dans la réussite de cette aventure. Pour finir, je remercie Sylvain de me rendre un peu plus heureuse chaque jour, je mesure la chance que j'ai de t'avoir à mes côtés.

Abréviations

AC : courant alternatif

ACEO : électroosmose en courant alternatif

ADN : acide désoxyribo-nucléique

BSA : Albumine de sérum bovin

CFU : Unité formant colonie

CM : Clausius-Mossotti

DEP : Diélectrophorèse

DI : dé-ionisé

ITO : Indium Tin Oxyde

LN2 : Laboratoire des nanotechnologies et nanosystèmes

PECVD : Plasma-enhanced chemical vapor deposition

RIU : Refractive Index Unit

SERS : Surface Enhanced Raman Scattering

SPR : résonance de plasmon de surface

SPRI : imagerie par résonance de plasmon de surface

TE : Transverse électrique

TM : Transverse magnétique

Table des matières

Chapitre 1. Introduction 11

A. Contexte des biocapteurs SPR et problématique 11

B. Cadre de la thèse et acteurs du projet 14

C. Problématique, objectifs et organisation du manuscrit 15

1. Problématique et objectifs 15

2. Organisation du manuscrit 16

Chapitre 2. État de l'art 17

A. Fonctionnement d'un biocapteur SPR 17

1. De l'anomalie de Wood au premier biocapteur à résonance des plasmons de surface : un siècle de développement 17

2. Propagation d'un plasmon à l'interface diélectrique-métal 19

3. Excitation d'un mode plasmonique en réflexion totale interne 22

4. Application aux biocapteurs 24

5. Imagerie SPR 25

B. Limite des biocapteurs SPRI 26

1. Limite de sensibilité volumique 26

2. Nature surfacique de la détection 27

3. Limite de réaction 27

C. Transfert de masse appliqué à la biodétection 28

1. Limite de diffusion 28

2. Techniques disponibles pour le transport d'espèces en biodétection 29

3. Transport de masse dans le contexte des biocapteurs SPR 35

D. Description des forces en jeu lorsqu'un champ électrique alternatif est appliqué entre deux électrodes 37

1. Électro-osmose en courant alternatif 37

2. Force de diélectrophorèse 43

3. Flux électrothermique 47

E. Effets du champ électrique sur la mesure 49

1. Effets du champ électrique sur les objets biologiques étudiés 49

2. Effets de la polarisation des électrodes sur le signal SPR 50

F. Une application d'un capteur SPR avec transport de masse : la détection de bactéries pour des mesures en sécurité environnementale et alimentaire 52
G. Conclusion 53
Chapitre 3. Étude numérique de la géométrie du capteur 54
A. Introduction 54
B. Présentation du modèle 54
C. Modélisation de la diélectrophorèse 55
1. Choix des paramètres électriques dans le cas d'une bactérie *e.coli* 55
2. Modélisation de la diélectrophorèse : comparaison des électrodes face à face et coplanaires 57
D. Modélisation du flux électroosmotique 59
1. Présentation du problème 59
2. Fréquence optimale pour maximiser la vitesse électro-osmotique 62
3. Résultats de simulation du flux électro-osmotique dans le cas d'électrodes coplanaires et interdigitées 63
E. Bilan des forces 64
F. Influence de l'espacement entre les électrodes : cas des électrodes face-à-face 65
G. Influence d'un flux sur le piégeage de particules dans le cas d'électrodes face-à-face 69
H. Facteur de correction Λ 71
I. Conclusion 72
Chapitre 4. Étude expérimentale de la géométrie du capteur ... 75
A. Présentation des géométries d'électrodes étudiées 75
B. Protocole de fabrication 76
C. Piégeage de billes par diélectrophorèse et électroosmose : observation en microscopie 77
D. Observation du flux électroosmotique : comparaison des résultats numériques et expérimentaux 79
1. Observation de côté de vortex dus à l'électro - osmose (configuration électrodes face à face) 79
2. Reconstruction du champ de vitesse par PIV (Particle Image Velocimetry) et estimation du facteur de correction Λ 82
E. Mesure du signal SPR 84
F. Présentation des dispositifs d'imagerie SPR utilisés dans ce manuscrit 85

G. Piégeage et détection par SPR de cellules eucaryotes par diélectrophorèse négative 88
1. Montage expérimental 88
2. Piégeage et détection de cellules HEK 293 89
H. Détection SPR de micro-billes piégées par électro-osmose 92
1. Réponse du capteur en fonction de la concentration 92
2. Influence de l'espacement inter-électrodes 94
I. Conclusion 96
Chapitre 5. Application à la détection de bactéries 97
A. Piégeage de bactéries *e.coli* par pDEP et ACEO dans de l'eau DI 97
1. Piégeage statique 97
2. Piégeage sous flux 99
B. Fonctionnalisation chimique de la surface des électrodes 101
1. Intérêt d'une fonctionnalisation de surface 101
2. Protocole de fonctionnalisation de surface par BSA-biotine 102
3. Fonctionnalisation de surface par cystéamine 104
C. Stabilité de la fonctionnalisation de surface à un champ électrique alternatif 108
D. Détection de *e.coli* sur une biopuce fonctionnalisée avec transport de masse 109
E. Conclusion 110
Chapitre 6. Conclusions et perspectives 112
A. Conclusion générale 112
B. Perspectives 114
1. Détection de bactéries de type *Dickeya* 114
2. Points d'amélioration du capteur fabriqué 115
3. Détection de bactéries dans des milieux complexes 116
4. Fonctionnalisation de surface assistée par diélectrophorèse 117
5. Intégration des effets électrocinétiques sur des substrats nanostructurés 119
Chapitre 7. Annexes 120
Bibliographie 130

Chapitre 1. Introduction

A. Contexte des biocapteurs SPR et problématique

L'objectif de cette thèse est d'améliorer les performances des biocapteurs à résonance de plasmon de surface, ou biocapteurs SPR. Il existe une immense variété de biocapteurs, pour des utilisations dans le domaine de la santé, de l'environnement ou encore de l'agro-alimentaire. Quel que soit son type, un biocapteur est toujours constitué de trois éléments, représentés en Figure 1-1:

- Un élément de reconnaissance, parfois appelé sonde, qui fixe sélectivement l'espèce chimique ou biologique que l'on veut détecter ;
- Un transducteur, qui convertit l'accroche de l'espèce cible sur l'élément de reconnaissance en un signal physique (tension, intensité lumineuse, coloration…) ;
- Une chaîne de traitement du signal, pour l'acquisition de la mesure.

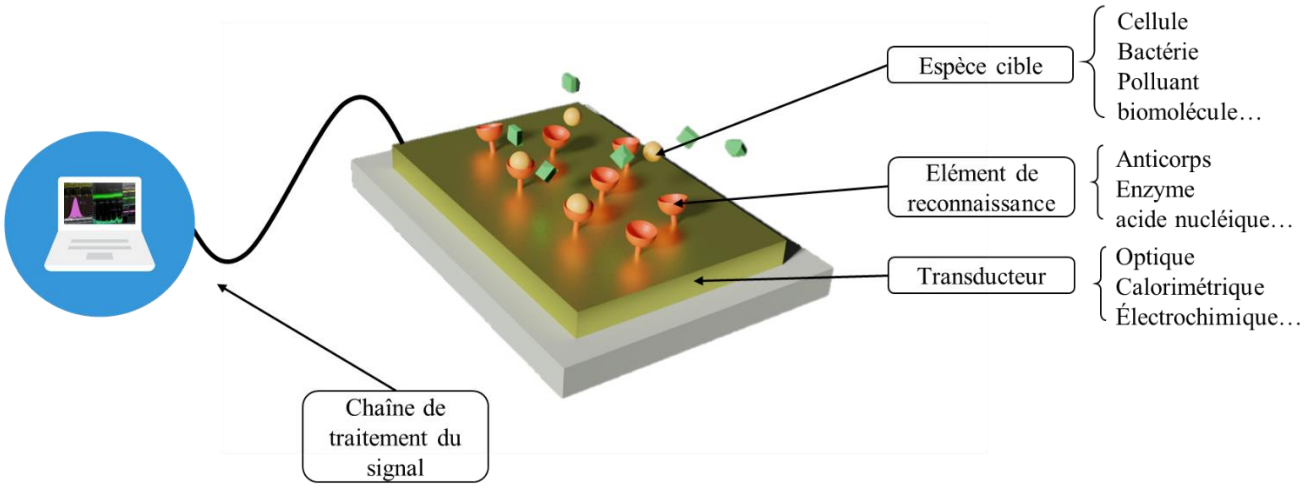


Figure 1-1 : Schéma de principe d'un biocapteur et de ses trois éléments caractéristiques

Ce projet concerne plus précisément les biocapteurs à résonance de plasmon de surface. Ce type de capteur utilise le champ évanescent à l'interface métal-diélectrique pour détecter des changements d'indice optique provoqués par d'objets (bactéries, bio-molécules…) à proximité immédiate d'un film métallique. Dans le cas des capteurs à résonance des plasmons de surface, l'élément de reconnaissance est fixé sur la partie sensible du capteur. Cet élément fixe sélectivement les espèces chimiques ou biologiques. La capture des espèces chimiques ou biologiques sur la surface du capteur et donc leur détection ne nécessite pas de marquage préalable, ce qui est le principal avantage de ce type de capteur. Une mesure sans marquage réduit les temps de préparation d'échantillons par rapport à d'autres techniques de biodétection utilisant des marqueurs fluorescents ou des billes

magnétiques par exemple. Le transducteur est un film métallique d'épaisseur nanométrique, éclairé par un faisceau lumineux, sur lequel sont immobilisés les éléments de reconnaissance.

Des biopuces SPR ainsi que leur banc optique correspondant sont déjà commercialisés par de nombreuses entreprises (Figure 1-2), et notamment présents dans les laboratoires de recherche en pharmacologie pour l'étude de cinétiques d'interactions moléculaires. Des informations complémentaires à propos de ces entreprises sont disponibles en Annexe 1.

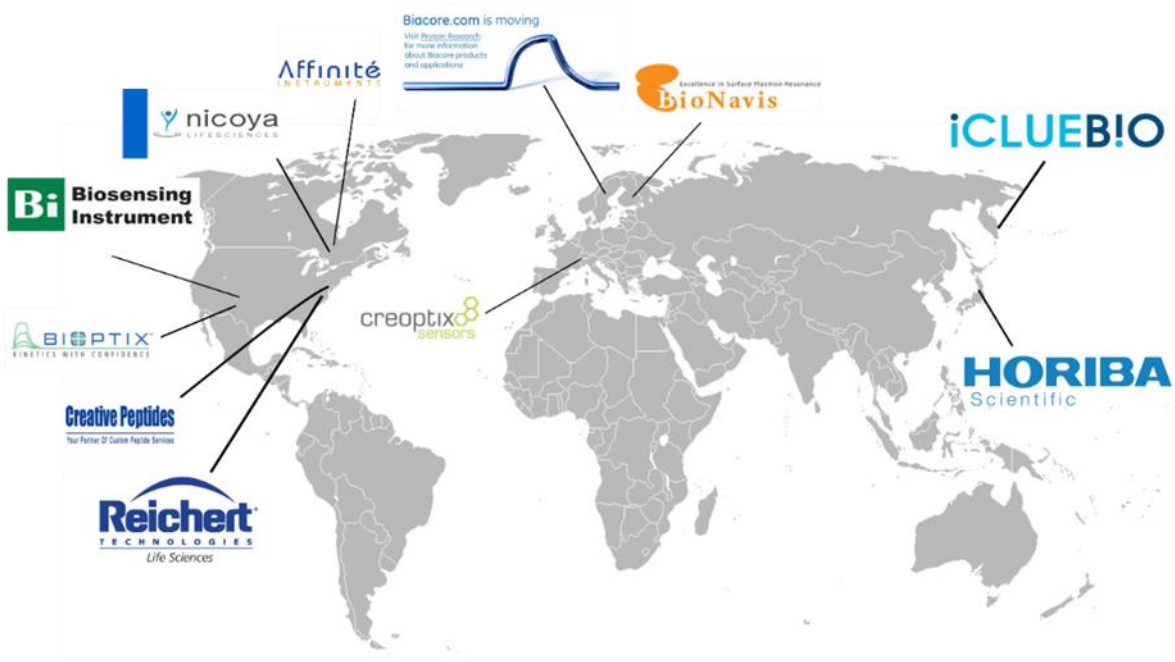


Figure 1-2 : Quelques entreprises commercialisant des capteurs SPR

En pratique, les biocapteurs à résonance des plasmons de surface sont surtout utilisés dans les laboratoires de pharmacologie [2], pour identifier la spécificité d'une interaction entre deux molécules, étudier les cinétiques d'association et de dissociation entre différentes molécules, ou déterminer l'affinité d'une réaction.

Un objet est détectable par le capteur lorsqu'il est en contact avec l'élément de reconnaissance et interagit avec lui. Le déplacement de l'objet vers la cible est généralement dominé par la diffusion. Lors de l'utilisation de la SPR dans le cadre de la biodétection, la concentration d'espèces cibles dans le milieu est en général faible. Or, une faible concentration d'analytes dans l'échantillon à tester réduit la probabilité d'interaction analyte-élément de reconnaissance, ce qui est la principale limite de ce type de capteur. Pour répondre à ce problème, l'approche qui concentre les efforts de recherche consiste à améliorer le transducteur, pour qu'un petit nombre d'interactions donne un fort signal. La

plupart des techniques impliquent l'utilisation de nanoparticules métalliques ou de substrats nano-structurés [3]–[5]. La SPR sensible à la phase [6] permet d'atteindre une sensibilité plus importante qu'un dispositif de SPR classique, mais nécessite un montage optique plus complexe. L'ajout d'une étape d'amplification secondaire après la capture des espèces cibles par la surface est une autre voie intéressante. Dans la littérature, cette méthode est nommée méthode « sandwich » : un anticorps secondaire est utilisé pour amplifier le signal mesuré en se greffant sur les analytes d'intérêt capturés sur la surface du capteur [7]. Pour une amplification plus importante, il est aussi possible d'utiliser des nano-particules métalliques fonctionnalisées [8], [9]. Par rapport à la SPR classique, cette méthode nécessite une étape supplémentaire d'amplification, et requiert un temps d'expérience plus long. En dépit d'une dynamique de recherche élevée, ces techniques ont du mal à s'implanter sur le marché. Comme le souligne cet édito de Nature Photonics [10], le transfert des technologies de plasmonique du laboratoire de recherche à l'industrie soulève deux problèmes. Le premier est l'incompatibilité des métaux utilisés en plasmonique (or et argent) avec les chaines de de micro-fabrication utilisées dans l'industrie, ces métaux étant des contaminants dans la plupart des procédés de micro-électronique et donc difficilement compatibles à une intégration sur puce. Le deuxième enjeu est la fabrication à grande échelle de substrats nanostructurés à un coût raisonnable.

L'approche complémentaire développée dans ce manuscrit propose d'agir sur le transport des espèces cibles plutôt que sur l'efficacité du transducteur. Dans une étude du marché de 2019 des capteurs à résonance des plasmons de surface [11], la diffusion des analytes vers la surface du capteur est considérée comme un point critique à améliorer :

« *The sample flowing over the SPR sensor area comes in contact with the surface for a limited time, thus detection of protein with low abundance becomes difficult. Coupling of electrophoresis with SPR allows the sample to be trapped over the surface, allowing diffusion of analyte on the surface area* »

Étonnamment, l'auteur met en avant l'électrophorèse pour améliorer le transport de masse qui n'est pas une technique adaptée aux capteurs SPR pour des raisons qui seront développées dans les paragraphes suivants. En effet, la bibliographie concernant l'intégration d'électrophorèse sur un capteur plasmonique est maigre. Cependant, ce rapport indique que l'amélioration du transport des analytes vers la surface sensible du capteur « *is expected to fuel growth of the SPR market globally ».*

Ce projet de recherche propose d'utiliser des champs électriques alternatifs appliqués sur le capteur SPR pour induire deux phénomènes électrocinétiques : la diélectrophorèse et l'électro-osmose en courant alternatif. Combinés, ces effets permettent de concentrer les espèces-cibles au plus près de la zone de détection du capteur SPR, et donc à la fois d'améliorer la limite de détection du capteur et de réduire la durée nécessaire à une mesure.

B. Cadre de la thèse et acteurs du projet

Ce travail de thèse porte sur l'amélioration des performances des capteurs à résonance des plasmons de surface (SPR: Surface Plasmon Resonance) grâce à l'intégration d'une fonction de transfert de masse. L'objectif final est de combiner sur une même puce un détecteur SPR et un actuateur basé sur la diélectrophorèse et l'électroosmose. Ce projet s'inscrit dans la continuité des travaux de thèse menés par Quentin Avenas [1]. Cette puce améliorée devrait nous permettre de détecter en très faible concentration des bactéries en milieux aqueux. Cette thèse s'est déroulée en co-tutelle entre l'École Centrale de Lyon et l'Université de Sherbrooke (Québec). Les expériences présentées dans ce manuscrit ont été principalement réalisées dans deux laboratoires :

- Le laboratoire Ampère, à Lyon (dirigé par Bruno Allard)
- L'unité mixte internationale Laboratoire des Nanotechnnologies et Nanosystèmes (LN2, dirigée par Michael Canva), au sein de l'Institut interdisciplinaire d'innovation (3IT), à Sherbrooke avec une partie du matériel situé dans le laboratoire du Pr. Michel Grandbois (l'Institut de pharmacologie de Sherbrooke), sur le site du centre hospitalier universitaire situé à Fleurimont.

À l'Ecole centrale de Lyon, j'ai réalisé mes travaux de recherche au laboratoire Ampère, au sein de la priorité T2 (Biomicrosystèmes, bioélectrochimie et bioélectromagnétisme). J'ai été encadrée par Marie Frénéa-Robin (directrice du département Bioingénierie et Maître de conférences à l'Université Lyon 1) et Julien Marchalot (Maître de conférences à l'INSA Lyon). Leur expertise en microfluidique, électricité et manipulation d'objets biologiques a été primordiale dans ce projet de recherche. Grâce à la proximité du laboratoire Ampère avec la plateforme Nanolyon située à l'Institut des Nanotechnologies de Lyon (INL), j'ai pu avoir accès à une salle blanche pour la fabrication d'échantillons.

Au sein du LN2, c'est dans l'équipe Biophotonique que j'ai effectué mes travaux. Cette équipe est dirigée par Michael Canva et Paul Charette, qui sont aussi co-directeurs de ces travaux. Cette équipe travaille sur la conception d'instruments pour des applications biologiques. Cela inclut la biophotonique, la photonique et l'acoustique. Le laboratoire possède une expertise reconnue dans le domaine des biocapteurs à résonance des plasmons de surface, qui font l'objet de cette thèse. Le LN2 est hébergé par le 3iT, ce qui garantit l'accès à une salle blanche que j'ai utilisée pour la fabrication d'échantillons. L'équipe biophotonique collabore avec le professeur Michel Grandbois (Institut de Pharmacologie de l'Université de Sherbrooke), également membre du LN2. Plusieurs bancs de SPR appartenant au LN2 sont installés dans son laboratoire, ce qui permet l'accès à des équipements présents dans le centre hospitalier universitaire comme une salle de culture cellulaire.

Certaines expériences ont été menées grâce à l'expertise de Julien Moreau, Maître de conférences au laboratoire Charles Fabry (Institut d'Optique Graduate School) à Palaiseau, notamment concernant l'instrumentation optique et la fonctionnalisation de surface. Sur ce dernier volet, j'ai également pu bénéficier des conseils et de l'expertise de Jean-Pierre Cloarec (INL), spécialiste du domaine à l'ECL.

Cette thèse a été majoritairement financée par une bourse ministérielle française (contrat doctoral ECL). Ce financement a été complété par une bourse de l'institut canadien MITACS et une bourse IDEX (label d'excellence universitaire détenu par l'université de Lyon) pour la période Mai-Octobre 2018 et Mai-Septembre 2019 via un programme de mobilité doctorale. Ce projet a fait l'objet de plusieurs demandes de financement dont une auprès de l'ANR (Agence Nationale de la Recherche), qui implique un consortium entre le LN2, laboratoire Ampère, l'INL et le LCF Un financement obtenu de la région Auvergne-Rhône-Alpes a permis d'équiper l'INL d'un banc SPR au mois de Juin 2020. Les projets Découvertes CRSNG de Michael Canva et Paul Charette ont également couvert une partie des couts.

C. Problématique, objectifs et organisation du manuscrit

1. Problématique et objectifs

Pour améliorer les performances des biocapteurs SPR, il est possible d'améliorer l'efficacité du transducteur, du système de reconnaissance biologique, ou du système d'acquisition et de traitement du signal. Ces axes ont été fortement explorés à ce jour. Cependant, à très faible concentration d'espèces-cibles, et quel que soit son niveau de perfectionnement, la performance du capteur est intimement liée au transport de masse des sondes vers les cibles en surface du capteur, ce qui gouverne, in fine, son temps de réponse. Pour passer outre la limite de diffusion, ce projet propose d'agir sur le transport des espèces-cibles en favorisant leur migration vers la zone de détection. Ce transport de masse est induit par des effets électrocinétiques, plus précisément la diélectrophorèse et l'électro-osmose en courant alternatif. La problématique est alors la suivante : comment améliorer les performances des biocapteurs SPR par rapport à l'état de l'art grâce à l'ajout d'une fonction d'un transfert de masse activé par diélectrophorèse? Pour répondre à cette problématique, plusieurs objectifs secondaires doivent être atteints :

- Déterminer quels sont les différents phénomènes qui entrent en jeu lors du transfert de masse en présence d'un champ électrique.
- Déterminer quel est le profil du champ électrique en fonction de la structuration des électrodes choisie, et quel est le design d'électrodes optimal pour la capture de particules dans une chambre microfluidique.
- Évaluer quel est l'impact de la structuration du film métallique et du champ électrique sur la réponse du transducteur SPR.

- Démontrer l'efficacité du transport de masse sur des micro-billes dans un premier temps, puis sur des objets biologiques.
- Rendre sélectif le capteur obtenu en prenant avantage du régime d'opération de la diélectrophorèse et de l'électro-osmose, puis évaluer l'impact d'un champ électrique sur une chimie de surface.

2. Organisation du manuscrit

Pour répondre à ces objectifs intermédiaires, le manuscrit est organisé en six chapitres, dont le chapitre d'introduction. Le Chapitre 2 présente un état de l'art ainsi que des notions théoriques de base sur le fonctionnement des biocapteurs à résonance de plasmon de surface. Ce développement permet de dégager les principales voies d'amélioration des capteurs SPR et souligne l'importance du transport de masse des espèces-cibles vers la surface du capteur pour dépasser la limite de diffusion. Ce chapitre décrit ensuite les moyens disponibles dans la littérature pour favoriser ce transport de masse et analyse lesquels sont les plus adaptés à l'intégration sur un capteur à résonance de plasmon de surface. Parmi ces méthodes, la diélectrophorèse et l'électro-osmose se distinguent par leur simplicité de mise en place, et leur compatibilité avec un capteur SPR.

Le Chapitre 3 décrit une étude numérique des phénomènes de diélectrophorèse et d'électro-osmose grâce à un modèle réalisé sur le logiciel COMSOL. Deux configurations d'électrodes sont comparées, une configuration d'électrode interdigitée, bien connue dans la littérature, et une configuration d'électrodes face-à-face. Ces simulations mettent en avant la plus grande efficacité de la configuration face-à-face pour le piégeage de particules.

Dans le but d'améliorer la précision des simulations réalisées, le Chapitre 4 présente une comparaison des vitesses électro-osmotiques simulées numériquement et observées expérimentalement. Ce chapitre présente également démonstration expérimentale de l'efficacité de piégeage sur des objets biologiques, dans le cas particulier des cellules eucaryotes.

Le Chapitre 5 décrit la détection de bactéries de type *e.coli* sous flux, puis la capture sélective de bactéries sur un capteur plasmonique. Enfin, le Chapitre 6 propose une conclusion générale et plusieurs pistes de recherche pour les futurs travaux.

Chapitre 2. État de l'art

A. Fonctionnement d'un biocapteur SPR

1. De l'anomalie de Wood au premier biocapteur à résonance des plasmons de surface : un siècle de développement

Pour comprendre comment améliorer les performances des capteurs à résonance des plasmons de surface, il est nécessaire de bien en comprendre le fonctionnement. Ce paragraphe présente un bref historique de la plasmonique, qui s'étend du début du XXème siècle à nos jours. La Figure 2-1 présente chronologiquement les concepts physiques développés parallèlement en plasmonique en électrohydrodynamique qui seront évoqués dans ce manuscrit. Ces découvertes, appartenant à deux domaines pendant longtemps bien distincts, feront émerger des concepts physiques qui seront associés sur le même biocapteur présenté dans ce projet de thèse. Les premiers pas en plasmonique datent du début du XX^{ème} siècle. En 1902, l'astronome américain Robert W. Wood observe le spectre d'une lampe à incandescence réfléchi par un réseau de diffraction métallique. Il découvre des bandes sombres inexpliquées dans les spectres observés [12] :

« On mounting the grating on the table of a spectrometer I was astounded to find that under certain conditions the drop from maximum illumination to minimum, a drop certainly of from 10 to 1, occurred within a range of wave-lengths not greater than the distance between the sodium lines »

Wood observe que la localisation de ces bandes sombres dans le spectre dépend de l'angle de l'onde incidente. De plus, ces bandes apparaissent seulement lorsque pour l'onde incidente, le vecteur champ électrique est perpendiculaire au réseau.

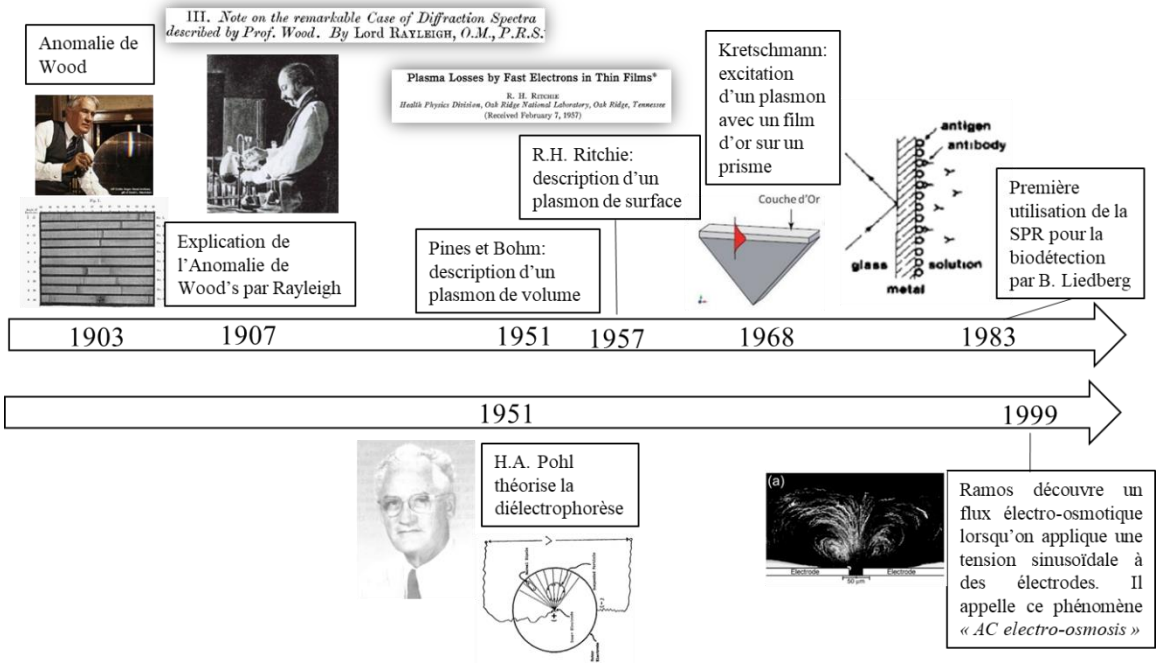


Figure 2-1 : Présentation chronologique de concepts physiques à travers le XXème siècle, qui sont utilisés dans ce manuscrit de thèse.

Dans la littérature, on parle d'anomalies de Wood pour désigner ce phénomène. Ce problème est pour le physicien *« One of the most interesting that I have ever met ».* Au tout début du XXème siècle, la théorie des réseaux de diffraction n'inclut pas la notion de polarisation de la lumière. Wood ne propose donc pas d'explication au phénomène observé, et les anomalies de Wood seront un sujet de curiosité pour les physiciens tout au long d'une grande partie du XXème siècle.

Peu après la première observation des anomalies de Wood, Rayleigh propose une première explication à ces chutes d'intensité lumineuse dans un spectre [13]. Pour un angle d'incidence θ_i et un ordre de diffraction *n*, l'équation d'un réseau est :

$$\sin\,\theta_n \;= \sin\,\theta_i \;+ n\frac{\lambda}{d} \qquad \textit{Équation 2-1}$$

Où θ_n est l'angle de diffraction correspondant à l'ordre *n*, λ est la longueur d'onde incidente, et *d* le pas du réseau. Il émet l'hypothèse que, dans un spectre, l'anomalie apparaît à une longueur d'onde qui correspond à un passage du spectre à un ordre plus élevé. C'est-à-dire que cette anomalie apparaît à une longueur d'onde pour laquelle une onde diffractée émerge tangentiellement à la surface du réseau. Le passage à un ordre *n* intervient quand $\sin(\theta_n) = \pm 1$. Cela permet de déterminer les longueurs d'ondes λ_r qui vérifient les anomalies de Wood, avec, d'après l'équation du réseau, $n\frac{\lambda_r}{d} = -\sin(\theta_i) \pm 1$. Grâce à cette équation, Rayleigh calcule des longueurs d'onde correspondant aux anomalies de Wood avec une

divergence de 5% par rapport aux données expérimentales, qu'il considère comme acceptable et qu'il attribue à l'incertitude du pas du réseau.

L'hypothèse de Rayleigh fait consensus dans la communauté scientifique pendant presque trente ans, jusqu'aux observations de John Strong [14] qui reproduit l'expérience de Wood avec des réseaux de diffraction identiques, mais faits de métaux différents (en argent et en aluminium notamment). Il observe que non seulement le type de métal influe sur la forme de l'anomalie (profondeur et étroitesse de la chute d'intensité), mais surtout sur sa localisation dans le spectre. Selon l'hypothèse de Rayleigh, le type de métal utilisé pour la fabrication du réseau ne devrait pas voir de conséquence sur la localisation des anomalies, car la formule du réseau est purement géométrique. Cette hypothèse est donc compromise, et les anomalies de Wood restent inexpliquées.

Fano [15] marque le point de départ de l'interprétation moderne de l'anomalie de Wood, en supposant que ces chutes d'intensité sont dues à la propagation d'une onde à la surface du réseau. Ces travaux sont confirmés dans les années 60 par Hessel et Oliner [16]. Le terme plasmon de surface est présenté par Ritchie, pour parler d'un quantum d'oscillation collective d'électrons libres dans un métal [17]. L'excitation d'un plasmon de surface par l'intermédiaire d'un prisme sur lequel est déposé un fin film métallique, proposée par Ketschmann [18], a grandement contribué à l'élaboration du premier capteur à résonance des plasmons de surface dans les années 80, pour la détection de gaz et de biomolécules [19], puis à sa commercialisation par Biacore dans les années 90.

2. Propagation d'un plasmon à l'interface diélectrique-métal

Un plasmon de surface est un mode de propagation particulier à l'interface entre un métal et un diélectrique. Il peut donc se caractériser par la résolution des équations de Maxwell en milieu linéaire, homogène et isotrope. Nous considérerons les milieux non-magnétiques, sans charge et sans courant. Dans un tel milieu, ces équations s'écrivent :

$$\varepsilon_0 \varepsilon \nabla \boldsymbol{E} = 0 \qquad \textit{Équation 2-2}$$

$$\nabla \times \boldsymbol{E} = -\mu_0 \frac{\partial \boldsymbol{H}}{\partial t} \qquad \textit{Équation 2-3}$$

$$\mu_0 \nabla \mathbf{H} = 0 \qquad \textit{Équation 2-4}$$

$$\nabla \times \boldsymbol{H} = \varepsilon_0 \varepsilon \frac{\partial \boldsymbol{E}}{\partial t}$$ *Équation 2-5*

Où ***E*** désigne le champ électrique, ***H*** le champ magnétique, ε_0 et ε les permittivités du vide et du matériau considéré, et μ_0 susceptibilité magnétique du vide. Compte tenu du fait que $\nabla \times \nabla \times \boldsymbol{E} = \nabla\ \nabla \bullet \boldsymbol{E}\ - \Delta \boldsymbol{E}$, on déduit l'équation de Helmholtz de l' Équation 2-3 et l'Équation 2-5, valable pour ***E*** et ***H*** :

$$\begin{cases} \Delta \boldsymbol{E} - \dfrac{\varepsilon}{c^2} \dfrac{\partial^2 \boldsymbol{E}}{\partial t^2} = 0 \\ \Delta \boldsymbol{H} - \dfrac{\varepsilon}{c^2} \dfrac{\partial^2 \boldsymbol{H}}{\partial t^2} = 0 \end{cases}$$ *Équation 2-6*

Où Δ représente l'opérateur Laplacien, et $\mathrm{c} = \sqrt{\frac{1}{\mu_0 \varepsilon_0}}$ la vitesse de la lumière dans le vide. Maintenant, considérons une onde plane, progressive et monochromatique. En notation complexe, une telle onde s'exprime par :

$$\boldsymbol{A}\ \boldsymbol{r}, t\ = \boldsymbol{A} e^{i(\boldsymbol{k}.\boldsymbol{r} - \omega t + \varphi_0)}$$ *Équation 2-7*

Où ***A*** représente indépendamment ***E*** ou ***H***, ***k*** le vecteur d'onde, ω sa pulsation et φ_0 sa phase. On considère que cette onde se propage à l'interface diélectrique-métal selon la direction *x*, est évanescente dans le métal et le diélectrique (selon l'axe z) et est invariante selon *y* (comme représenté en Figure 2-2). Selon ces conditions, en considérant la phase comme nulle, dans le milieu diélectrique (z < 0), une telle onde s'écrit :

$$\boldsymbol{A_d} = \boldsymbol{A_{0,d}}\ e^{k_{z,d} z}\ e^{i(k_{x,d} - \omega t)}$$ *Équation 2-8*

Où $k_{z,d}$ est la projection du vecteur d'onde dans le diélectrique selon l'axe *z*, et $k_{x,d}$ est la projection du vecteur d'onde dans le diélectrique selon l'axe x.

Dans le métal (*z > 0*), cette onde s'exprime :

$$\boldsymbol{A_m} = \boldsymbol{A_{0,m}}\ e^{-k_{z,m} z}\ e^{i(k_{x,m} - \omega t)}$$ *Équation 2-9*

Les conditions aux limites à l'interface métal-diélectrique imposent une continuité des composantes tangentielles de **E** et **H**. Cela se traduit par la conservation de la composante tangentielle du vecteur d'onde, c'est-à-dire $k_{x,m} = k_{x,d} = k_{SP}$, avec k_{SP} la constante de propagation du mode plasmonique de surface.

En notation complexe, $\frac{\partial}{\partial t} = i\omega$ et $\frac{\partial}{\partial z} = -ik_z$. En polarisation TM, Équation 2-5 pour *z = 0* donne :

$$\begin{cases} ik_{z,d}H_{0,y,d} = -\omega\varepsilon_0\varepsilon_d E_{x,d} \\ ik_{z,m}H_{0,y,m} = -\omega\varepsilon_0\varepsilon_m E_{x,m} \end{cases}$$ *Équation 2-10*

Pour que cette équation soit vérifiée, en respectant les conditions aux limites (***E**m* = ***E**d* et ***H**m* = ***H**d* pour *z = 0*)

$$\frac{\varepsilon_m}{k_{z,m}} = \frac{-\varepsilon_d}{k_{z,d}}$$ *Équation 2-11*

Cette égalité est vérifiée dans le cas d'un métal et un diélectrique. En effet, la permittivité d'un diélectrique est positive, alors que celle d'un métal est négative. En utilisant l'équation d'Helmholtz pour le champ magnétique, on peut exprimer la composante selon *z* du vecteur d'onde :

$$\begin{cases} k_{z,d} = \sqrt{k_{sp}^2 - \varepsilon_d \frac{\omega^2}{c^2}} \\ k_{z,m} = \sqrt{k_{sp}^2 - \varepsilon_m \frac{\omega^2}{c^2}} \end{cases}$$ *Équation 2-12*

En remplaçant $k_{z,d}$ et $k_{z,m}$ dans l'Équation 2-11 par les valeurs données dans Équation 2-12, on obtient une expression de la relation de dispersion du mode plasmonique :

$$k_{SP} = \frac{\omega}{c}\sqrt{\frac{\varepsilon_m \varepsilon_d}{\varepsilon_m + \varepsilon_d}}$$ *Équation 2-13*

Cette expression donne le vecteur d'onde du mode plasmonique de surface en fonction de la fréquence d'excitation de ce mode.

3. Excitation d'un mode plasmonique en réflexion totale interne

L'approche la plus répandue pour l'excitation d'un mode plasmonique de surface est la réflexion totale interne, proposée par Kretschmann [18]. Un film métallique d'une épaisseur de l'ordre de 50 nm [20] est illuminé à travers un prisme (Figure 2-2).

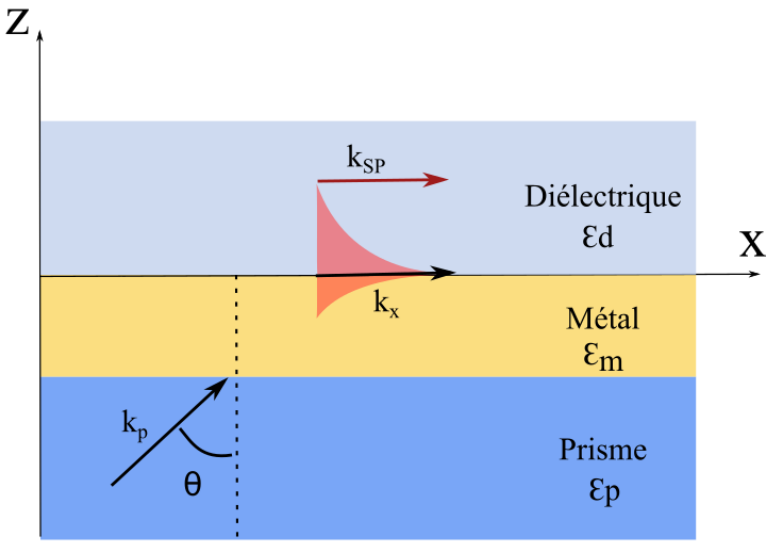


Figure 2-2: Excitation d'un mode plasmonique dans la configuration de Kretschmann.

La condition d'excitation du plasmon est l'égalité entre la constante de propagation du plasmon et la composante tangentielle du vecteur d'onde de l'onde incidente et:

$$k_{SP} = k_x \sin\,\theta_{résonance}$$ *Équation 2-14*

Pour que cette équation puisse être vérifiée, il faut que l'onde incidente provienne d'un milieu d'indice suffisamment élevé ($k > k_{SP}$), ce qui est généralement réalisé grâce à un prisme à indice élevé, avec couplage évanescent au travers du film métallique suite à la réflexion totale interne à l'interface prisme/métal. (Figure 2-3A). Pour un certain angle d'incidence $\theta_{résonance}$, les conditions de couplage sont satisfaites, et l'onde évanescente qui se propage à l'interface métal-diélectrique excite alors un plasmon de surface. Une perturbation de l'indice optique Δn du diélectrique change les conditions de couplage du plasmon, ce qui se traduit par une variation de l'intensité lumineuse réfléchie ΔR (Figure 2-3B). Une telle perturbation de l'indice optique se produit par exemple lors de l'accroche d'une molécule cible à la surface de film d'or, par l'intermédiaire d'un élément de reconnaissance spécifique à cette molécule cible.

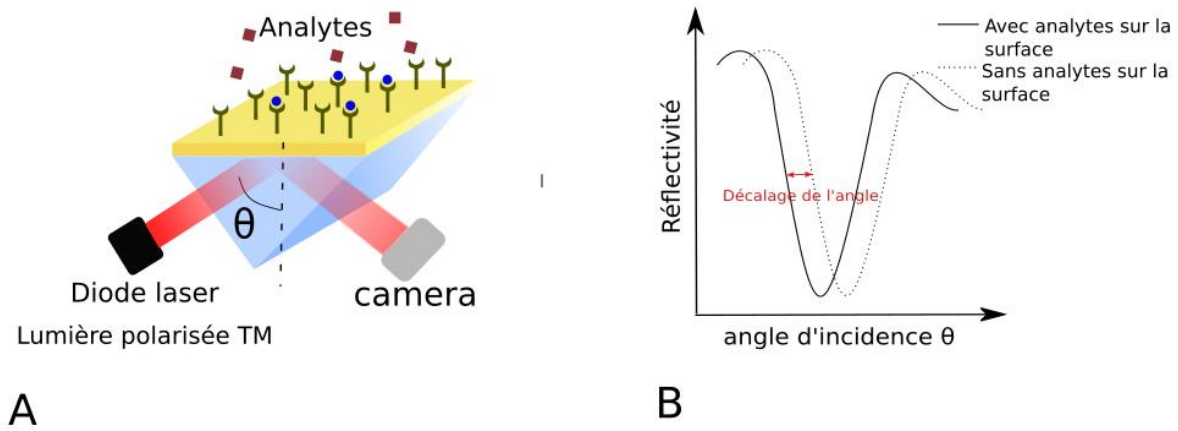


Figure 2-3A : schéma d'un capteur SPR à prisme dans la configuration de Kretschmann. B : réflectivité en fonction de l'angle d'incidence de la lumière. La présence d'analytes piégés sur la surface du capteur modifie les conditions de couplage et décale la courbe de réflectivité.

Le métal le plus largement utilisé est l'or, car il est stable chimiquement, biocompatible, a une gamme spectrale dans le visible et le proche infra-rouge pour la résonance plasmonique et il existe plusieurs protocoles de fonctionnalisation pour le greffage de sondes sur sa surface, notamment via des thiols. L'argent serait meilleur car sa résonance plasmon est plus aigüe (la partie imaginaire de la constante diélectrique est plus faible que celle de l'or), et offre donc une meilleure sensibilité. Mais la formation d'oxydes en surface le rend moins pratique pour la biodétection. Une solution consiste à passiver l'argent pas une fine couche d'or, quasi-transparente mais qui permet de protéger l'argent face à l'oxydation [21]. Dans ce cas, les coefficients de réflexion peuvent être calculés par la méthode de Rouard [22], utile lorsqu'on veut prédire un angle de résonance pour plusieurs couches métalliques déposées. La propagation d'un plasmon de surface ne se limite pas à

l'interface métal/diélectrique. On peut remplacer le métal par tout autre matériau ayant la partie réelle de sa constante diélectrique négative. Ainsi, la propagation d'un plasmon de surface a été observée dans des feuilles de graphène [23] pour des ondes THz [24] ou dans des oxydes métalliques tels que l'ITO [25].

4. Application aux biocapteurs

L'extrême sensibilité des capteurs à résonance des plasmons de surface à des changements d'indice optique opérant au-dessus de la surface d'un film métallique en ont fait des outils précieux pour l'étude des interactions intermoléculaires. Une des premières applications a été la détection et le séquençage d'ADN, grâce à des puces à ADN sur lesquelles des centaines d'oligonucléotides sont immobilisés afin de détecter par hybridation des séquences de gènes spécifiques [26]. Les capteurs à résonance des plasmons de surface restent très utilisés dans l'étude d'affinité intermoléculaire pour la découverte de nouvelles molécules en pharmacologie [2], [27]. Les capteurs à résonance des plasmons de surface ont aussi fait leurs preuves dans de nombreux domaines d'application comme le diagnostic médical [7], [28], la détection de pathogènes et d'allergènes pour la sécurité alimentaire, [29]–[32], le suivi de la qualité de l'eau [33], [34]. Un des principaux freins au déploiement des capteurs à résonance des plasmons de surface est le coût du banc optique nécessaire à l'analyse des puces, qui atteint 200 000 USD pour les systèmes vendus par Biacore (Figure 2-4A) et Bio-Rad Laboratories [11] permettant de tester un grand nombre de molécules à la fois.

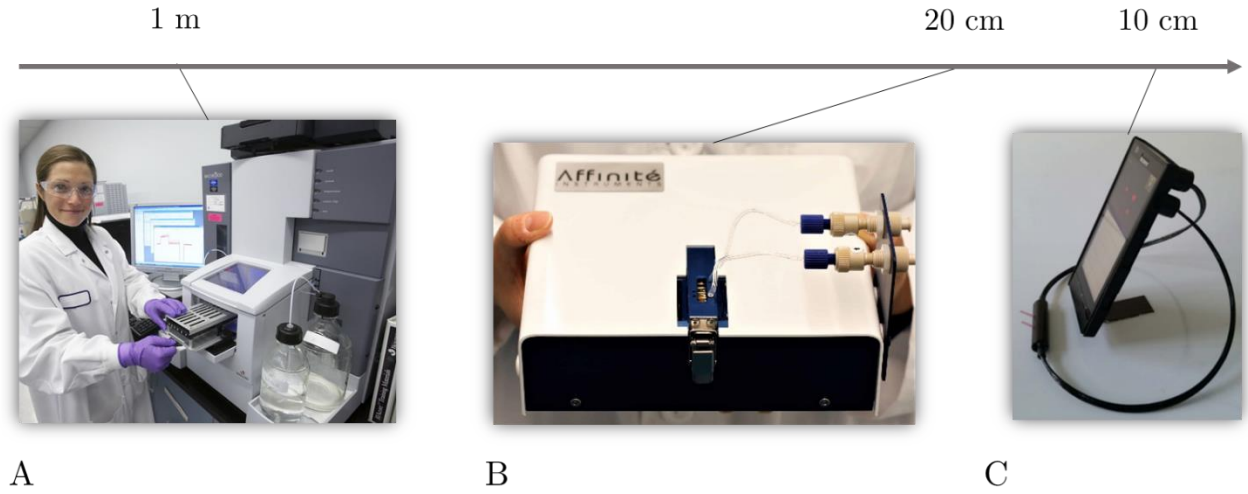


Figure 2-4 : Système vendu par Biacore (adapté du site de l'Institut Pasteur www.pasteur.fr). B : système vendu par Affinité Instrument (adapté du site www.affiniteinstruments.com) C : capteur SPR intégré sur un smartphone [35]

C'est pourquoi des entreprises comme Affinité Instruments développent des bancs optiques portables (Figure 2-4B) et peu onéreux pour des applications en santé par

exemple [36]. La miniaturisation va encore plus loin, avec des groupes de recherche qui proposent des plateformes SPR de quelques centimètres de côté [37], voire intégrées sur smartphone (Figure 2-4C).

5. Imagerie SPR

Plutôt que de mesurer une variation d'intensité moyenne sur la surface du capteur, il est possible de faire une image du film métallique pour observer des variations locales d'intensité lumineuse. On parle alors d'imagerie par résonance des plasmons de surface [38], [39]. Un exemple de configuration de banc d'imagerie SPR (SPRI) est présenté en Figure 2-5A. Ce type d'instrument représente les 3/5 du marché des capteurs à résonance des plasmons de surface [11]. Le principal intérêt de cette technique est la possibilité de réaliser plusieurs mesures parallèles, en déposant plusieurs types de sondes sur la même puce [40]. Pour cela, un *spotter* est utilisé pour déposer des sondes sur la surface d'or. Il en existe différents types plus ou moins performants. Dans les expériences présentées dans les chapitres suivants, un *spotter* à aiguille a été utilisé. Grâce à une aiguille, des sondes sont déposées sur une surface circulaire d'environ 300 µm de diamètre (Figure 2-5B). Le signal SPR peut ensuite être mesuré en temps réel sur chacun des plots. D'un côté, la taille des spots est limitée par le système optique d'imagerie. En effet, il faut que les spots apparaissent suffisamment grands sur l'image de sortie pour que le signal mesuré ait un rapport signal à bruit acceptable. D'un autre côté, la résolution de ce type d'imagerie est limitée par le caractère propagatif du plasmon de surface.

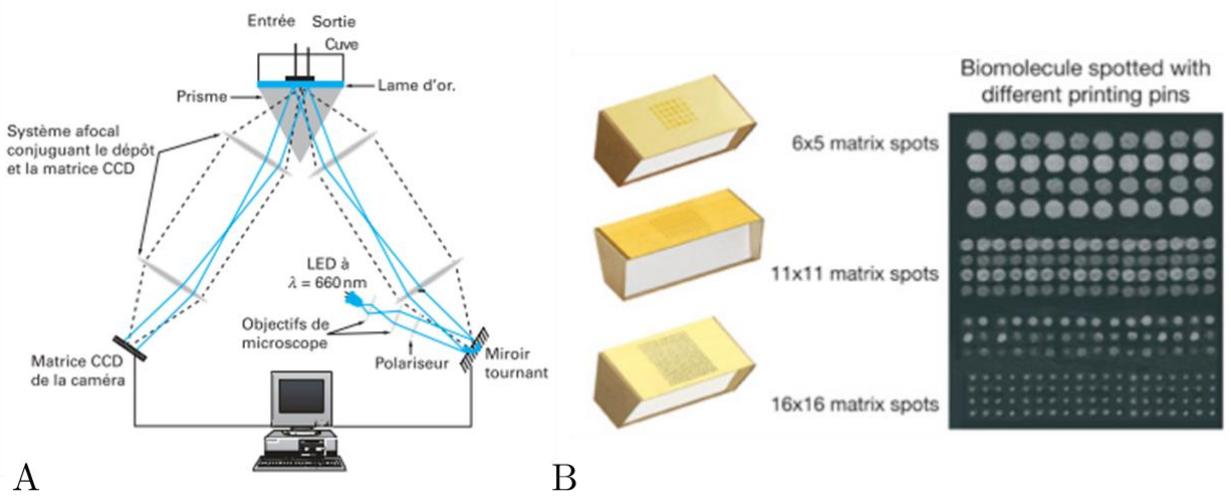


Figure 2-5A : Exemple de configuration d'un banc d'imagerie à résonance des plasmons de surface [41]. B : Exemples de puces SPR utilisées en imagerie, avec différents types de sondes déposées sur la surface d'or (adapté du site www.horiba.com)

En effet, un plasmon de surface se propage à l'interface métal-diélectrique avec une intensité qui décroit exponentiellement, sur une longueur caractéristique L_x qui s'exprime en fonction de la partie imaginaire de la constante de propagation k_{SP} :

$$L_x = \frac{k_0}{2\ Im(k_{sp})} \qquad \textit{Équation 2-15}$$

Dans le visible, cette longueur est de l'ordre de 10 µm, soit bien au-dessus du critère de Rayleigh, qui est de l'ordre de la longueur d'onde de la lumière incidente. La résolution d'un système d'imagerie à résonance des plasmons de surface est donc moins bonne que celle d'un microscope optique. Cela n'est pas gênant pour des applications de détection, où les sondes sont déposées sur une surface largement supérieure à cette longueur. D'autres applications d'imagerie SPR requièrent une résolution optimale, notamment l'observation des interactions entre une cellule adhérente et son substrat. Dans ce cas, la nano-structuration du film d'or pour limiter et moduler la longueur de propagation du plasmon est une piste prometteuse [42]. Cela a notamment permis d'imager des cellules endothéliales et étudier leur confluence [43]. Sans nano-structuration du film d'or mais avec un système d'imagerie adapté, il est possible de détecter une cellule eucaryote qui se lie spécifiquement à une surface fonctionnalisée [44] ou bien suivre individuellement une bactérie et ainsi mesurer la croissance d'une colonie [45].

B. Limite des biocapteurs SPRI

1. Limite de sensibilité volumique

La limite de détection en indice d'un capteur SPR est le plus petit changement Δn mesurable, n désignant l'indice optique du milieu. En imagerie SPR, le système de détection qui permet d'observer les variations de réflectivité sur une puce SPR est basé sur une caméra. Or tout détecteur optique (photodiode, CCD, CMOS…) est soumis au bruit quantique et numérique. De plus, l'indice optique de la plupart des matériaux est relié à la température. Les fluctuations de température du milieu liquide au contact de la biopuce induisent donc un bruit thermique. En tenant compte de ces bruits, la limite de détection des capteurs SPR sans structuration du film métallique se situe autour de 10^{-7} RIU, avec un système de contrôle précis de la température [46]. Les travaux de Sheehan *et al* [47] montrent que pour la détection de biomolécules en un temps raisonnable, sans transport de masse, la limite de détection est de l'ordre du picomolaire.

2. Nature surfacique de la détection

L'amplitude de l'onde évanescente dans le milieu diélectrique décroît exponentiellement dans la direction normale à l'interface. Un capteur à résonance des plasmons de surface est donc sensible aux changements d'indice optique qui interviennent proche de l'interface métal-diélectrique. En pratique, on définit cette profondeur de pénétration comme la distance sur laquelle l'amplitude du champ électrique du mode a diminué de $1/e$ de sa valeur initiale. Cette longueur s'exprime par :

$$L_z = \frac{2\pi}{\lambda}\sqrt{\frac{|\varepsilon'_m| + \varepsilon_d}{\varepsilon_d^2}} \qquad \textit{Équation 2-16}$$

Pour un film d'or et λ = 700 nm (ε'_m = -16,4 la partie réelle de la permittivité du métal) et de l'eau (ε_d =1,77), la profondeur de pénétration du mode plasmonique dans l'eau est de 268 nm. Cette profondeur définit la portée du capteur, au-delà de laquelle il est habituellement considéré qu'un changement d'indice optique n'est plus détecté. En pratique, les cuves fluidiques dans lequel les capteurs à résonance des plasmons de surface sont placées ont une hauteur de l'ordre de la centaine de micromètres. Cela signifie seuls les analytes qui se lient aux sondes en surface son détectés. Ajouter un transport de masse actif sur une biopuce SPR permettrait donc de passer outre la limite de diffusion, en accélérant la collecte de cibles vers les sondes en surface. Dans la partie suivante, nous décrirons plusieurs stratégies pour amener les espèces cibles vers le volume de détection d'un capteur surfacique.

3. Limite de réaction

Sur un biocapteur SPR, tout objet situé à la portée immédiate de la surface métallique peut être détecté. Pour une détection spécifique, la cible doit se fixer à la sonde située à la surface du capteur. À l'heure actuelle, la majorité des bancs d'imagerie SPR sont utilisés en pharmacologie, pour étudier la cinétique d'interaction entre une sonde et une cible [48]. Pour des applications de détection, une cinétique lente peut être un frein supplémentaire à la détection d'espèces dans le milieu testé. Ainsi, comme pour la plupart des biocapteurs, une des limites des biocapteurs SPR est la limite de réaction sonde-cible [49]–[51]. Cette limite dépend de plusieurs facteurs, résumés dans l'article de revue de Liu et al. [52]. Un premier facteur est la densité de sondes présentes sur la surface du capteur. Celle-ci est étroitement liée à la qualité de la chimie de surface : une fonctionnalisation de surface correctement réalisée doit être capable d'immobiliser un maximum de sondes. Le deuxième facteur est la cinétique de l'interaction sonde-cible. Cette cinétique dépend de la concentration en cible, mais aussi de l'affinité sonde-cible. Dans ce manuscrit, nous utiliserons seulement des protocoles déjà établis de fonctionnalisation de surface, sans travailler à leur amélioration. Cependant, nous collaborons avec J-P Cloarec et son équipe à

l'INL, qui participent activement à l'amélioration des procédés de fonctionnalisation de surface [53].

C. Transfert de masse appliqué à la biodétection

1. Limite de diffusion

La contribution des phénomènes de diffusion et de convection mis en jeu dans la capture de molécules sur une surface fonctionnalisée chimiquement a été étudiée par Squires et al. en 2008 [49]. Dans cet article, les auteurs étudient le modèle présenté en Figure 2-6A, décrivant un capteur de dimension L dans le sens de l'écoulement et de dimension W_s perpendiculairement à l'écoulement. Ce capteur est situé dans un canal de hauteur H et de largeur W_c. Le fluide circule dans le canal à un débit volumique Q. Ce fluide contient des molécules cibles en concentration C_0 et dont le coefficient de diffusion est noté D. Lorsqu'on étudie le transfert de masse, on utilise le nombre de Peclet, une grandeur sans dimension qui caractérise le rapport entre le temps de diffusion d'une molécule dans la hauteur du canal et le temps de convection sur la longueur du capteur. Le nombre de Peclet en rapport avec la hauteur du canal s'exprime de la façon suivante :

$$Pe_H = \frac{temps\ de\ diffusion}{temps\ de\ convection} \sim \frac{H^2/D}{H^2 W_c/Q} \sim \frac{Q}{DW_c} \qquad \text{Équation 2-17}$$

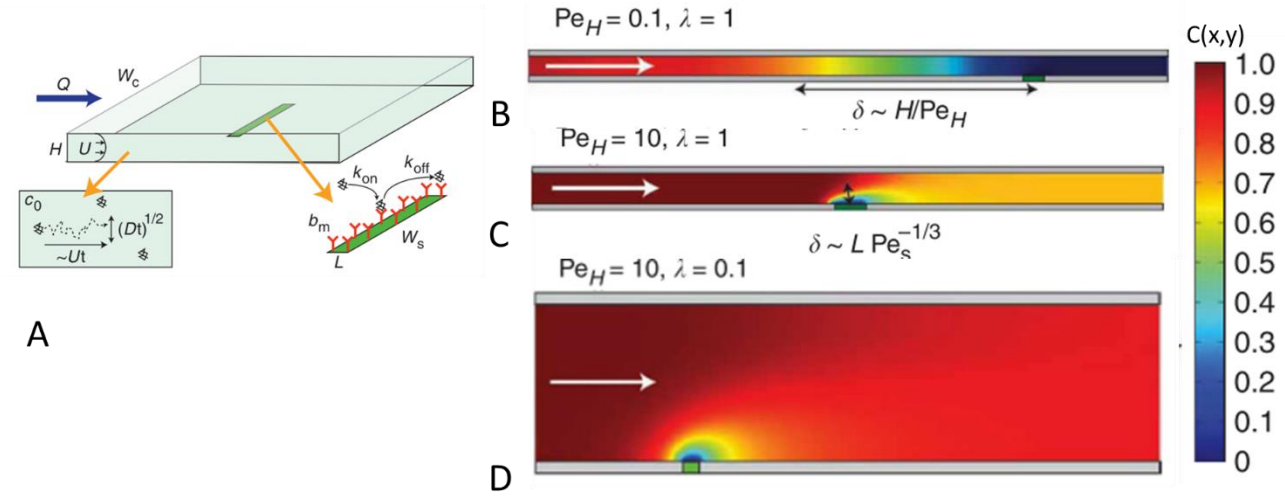


Figure 2-6 : Modèle de capteur dans un canal. B, C et D : concentration en espèces cibles C(x,y) pour différentes conditions de débit entrant et du rapport entre les dimensions du capteur et du canal λ=L/H. Ici, $Pe_s = 6\lambda^2 Pe_H$ est le nombre de Peclet selon al dimenstion du capteur. Adapté de [49].

Lorsque Pe_H est suffisamment petit ($Pe_H << 1$), le mouvement des molécules est dominé par la diffusion, même en amont du capteur (Figure 2-6B) sur une distance caractéristique δ. Toutes les molécules qui circulent dans le canal sont piégées sur la surface du capteur, en faisant l'hypothèse qu'une molécule touchant la surface y reste piégée. Si Pe_H est supérieur à 1, lorsqu'on augmente le débit entrant par exemple, la capture de molécules n'est que partielle. Deux cas différents peuvent intervenir, selon les dimensions du canal et du capteur. Dans le cas où la zone dépeuplée en espèces cibles est petite comparée à L et H (Figure 2-6C), la convection est dominante sur l'axe horizontal *x* et la diffusion est dominante sur l'axe vertical *y*. Dans le cas où la zone dépeuplée est petite par rapport à la hauteur du canal, mais grande par rapport à la longueur du capteur (Figure 2-6D), la diffusion est dominante dans toutes les directions. Dans la plupart des cas décrits expérimentalement dans les chapitres suivants, le flux sera nul ou très faible, et la hauteur du canal est comparable à la largeur du capteur. Le cas représenté en Figure 2-6D sera donc prédominant.

Cette analyse a été développée dans le but de quantifier la capture de molécules sur une surface active. Cependant, les travaux présentés dans ce manuscrit concernent le transport de particules vers une surface, et plus précisément de cellules ou de bactéries. Les bactéries ou les cellules, du fait de leur taille, diffusent beaucoup moins que les molécules. Il a été montré que le développement suivi dans ce paragraphe est également valide pour le transport de particules [54], avec toutefois un taux de capture mesuré expérimentalement plus faible que celui attendu, notamment pour des débits élevés.

2. Techniques disponibles pour le transport d'espèces en biodétection

Le paragraphe précédent nous a montré que quel que soit le régime convecto-diffusif, le transport d'espèces est en enjeu majeur de la bio-détection, d'autant plus que la détection SPR a un volume sensible extrêmement localisé sur une faible hauteur au-dessus d'un film métallique. Dans ce paragraphe, nous allons donc recenser différentes techniques de transport d'espèces chimiques et biologiques, pour gagner à la fois en temps et en limite de détection. Certaines techniques de transport de masse sont adaptées aux molécules, alors que d'autres sont plus adaptées aux particules. Dans le cadre de cette thèse, les objets cibles ont une taille de l'ordre du micromètre (micro-billes, bactéries). Les techniques de transport d'espèces peuvent être séparées en deux catégories : le transport passif et le transport actif. A l'inverse du transport de masse actif, le transport de masse passif ne nécessite pas d'apport d'énergie extérieur pour le déplacement des espèces cibles. On peut citer par exemple la diffusion, qui s'effectue naturellement. La concentration hydro-dynamique utilise deux fluides différents (un fluide de cœur et un fluide de gaine) qui ne se mélangent pas. L'interface entre les deux fluides peut être contrôlé par le débit de chaque fluide et le nombre de Reynolds [55] comme montré en Figure 2-7A, ce qui permet de

concentrer des particules dans une zone d'un canal microfluidique. Combinée à une détection par impédancemétrie comme le décrit la Figure 2-7B [56], cette technique peut permettre de rapprocher des cellules des électrodes pour améliorer leur détection.

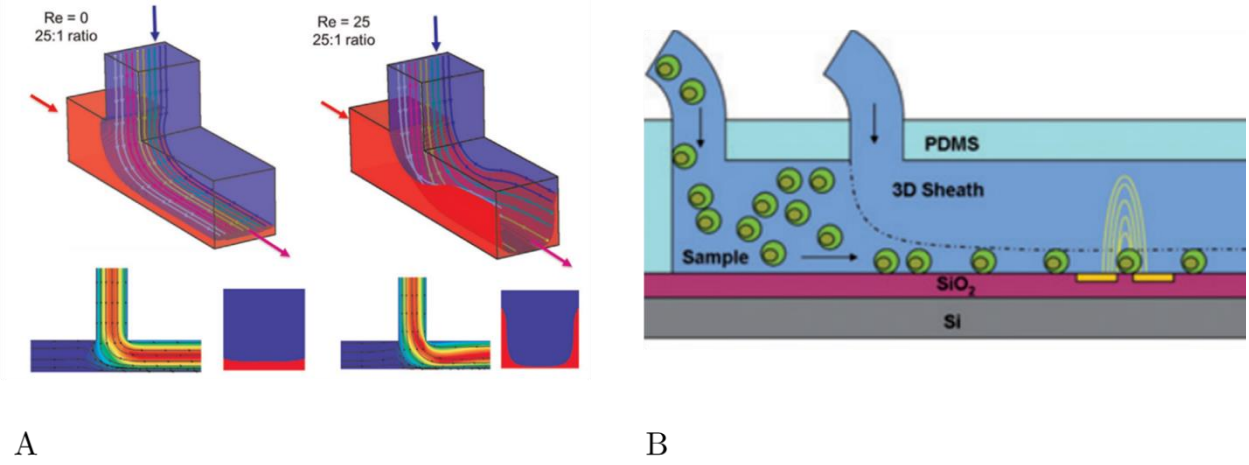


Figure 2-7A : Dépendance au nombre de Reynolds sur l'interface entre deux types de fluides [55]. B : Détection par impédancemétrie de cellules pré-concentrées par concentration hydrodynamique [56].

L'utilisation d'un ferro-fluide comme fluide de cœur peut également être un outil pour favoriser le transport de masse de molécules vers le bord d'un micro-canal [57]. L'évaporation permet également de concentrer des molécules sur une surface de quelques microns de largeur. C'est ce qu'a montré l'équipe de De Angelis et al. [58] en déposant une goutte de milieu faiblement concentré en ADN sur une surface nano-structurée donc très hydrophobe. L'évaporation de cette goutte au cours du temps (Figure 2-8A) concentre l'ADN sur une pointe servant de détecteur SERS (Figure 2-8B). Les auteurs ont montré que ce dispositif permet de détecter une protéine (la lyzozyme) à une concentration de 1 fM.

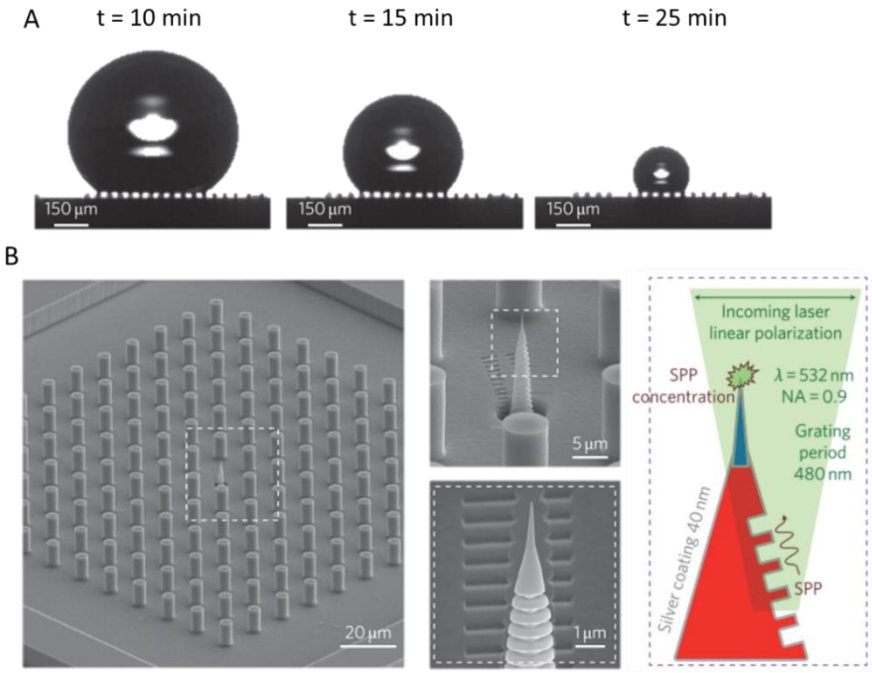
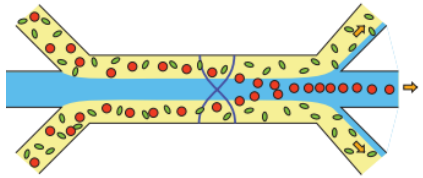
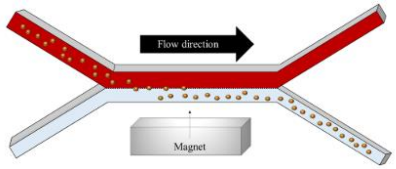
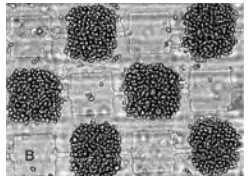


Figure 2-8 A : Évaporation d'une goutte de milieu contenant de l'ADN faiblement concentré sur une surface hydrophobe. B : vue au microscope de la surface hydrophobe constituée de nano-piliers et de la pointe servant à la détection SERS.

Bien que très performante, cette technique nécessite des procédés de salle banche de haut niveau.

Plusieurs techniques de transport de masse actif ont déjà été utilisées dans la littérature pour améliorer les performances des biocapteurs. Ce paragraphe a pour but de fournir une vue d'ensemble de ces techniques de transport de masse, et de déterminer lesquelles sont aptes à être intégrées sur un capteur à résonance des plasmons de surface. Ces techniques sont résumées dans le tableau suivant.

Technique	**Principe de fonctionnement**	**+Avantages/-inconvénient**
Acoustophorèse	la particule est piégée dans les nœuds d'une onde acoustique [59], [60] 	+ Sans marquage - Nécessite un matériau piézoélectrique pour créer l'onde acoustique ($LiNbO_3$ par exemple) [61]
Magnétophorèse	Un champ magnétique attire des particules aimantées [62], [63] 	- La particule piégée doit être magnétique, ou marquée par une particule magnétique + Efficace dans des milieux complexes, indépendamment de la conductivité de celui-ci.
Électrophorèse	Une particule chargée migre vers des électrodes dans un sens qui dépend de sa charge	- La particule doit être chargée - Utilise des champs DC : peut perturber le signal SPR
Diélectrophorèse	Une particule neutre mais polarisable est attirée vers des zones de faible ou fort champ électrique (selon ses propriétés électriques) [64] 	- Force proportionnelle au volume de la particule (marche de moins en moins bien lorsqu'on réduit la taille des objets à piéger) + Pas de marquage nécessaire + Force qui peut être sélective (dépendant des propriétés électriques des particules) + Utilise un champ AC donc ne perturbera pas le signal SPR

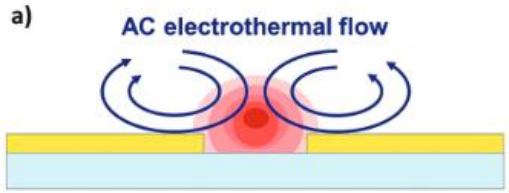
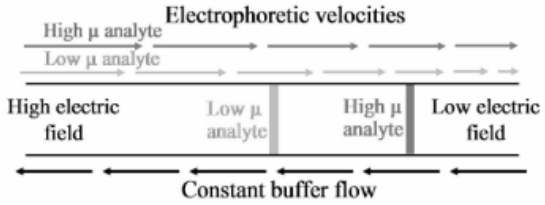
Électroosmose	Un champ électrique non uniforme met en mouvement la double couche ionique sur une électrode, ce qui créé un flux	- Efficace pour de faibles conductivités seulement + Utilise un champ AC donc ne perturba pas le signal SPR + Portée (effet sur de grandes distances)
Flux électrothermique	L'échauffement par effet Joule d'un fluide au dessus d'électrodes créé un gradient de température [65] 	- Nécessite une conductivité élevée du milieu - La hausse de température peut perturber la mesure, dépendamment du transducteur + Portée (effet sur de grandes distances)
Concentration par gradient de champ électrique *(Electric Field Gradient Focusing)*	[66] Un flux circule dans un sens opposé à un gradient de champ électrique. Selon la mobilité électrophorétique des espèces, celles-ci restent stationnaires, ou sont emportées par le flux. 	- Seules les espèces chargées sont piégées (comme pour l'électrophorèse) - Difficile de concentrer les espèces sur une surface comme un film métallique nécessaire à la détection SPR

Tableau 1 : Présentation de différentes techniques de transport de masse actif appliqué à des espèces chimiques ou biologiques

Le Tableau 1 présente différentes techniques actives de concentration d'espèces. Pour pouvoir être employée sur un capteur à résonance des plasmons de surface, la technique choisie devra être capable de concentrer les espèces chimiques sur une surface, tout en ne perturbant pas le signal SPR mesuré. Dans l'idéal, nous chercherons à conserver le caractère sans marquage de la détection SPR. De plus la technique employée doit être capable de piéger des espèces électriquement neutres.

Les ondes acoustiques de surface peuvent être utilisées soit pour piéger des particules dans les nœuds des ondes acoustiques, soit comme moyen de brassage pour favoriser la convection d'espèces cibles vers le capteur [60], [61] ou concentrer des particules sur une zone de détection [67], [68].

La magnétophorèse est un exemple de technique de transport de masse actif qui a été intégrée avec succès sur plusieurs types de biocapteurs. Les particules magnétiques peuvent être utilisées comme marqueur des espèces cibles pour leur triage et piégeage [69]–[72] ou bien pour entraîner un fluide et ainsi favoriser la convection à la surface d'un biocapteur [73]. L'utilisation de cette technique de transport de masse ferait perdre le caractère sans marquage de la détection SPR. En effet, les particules magnétiques ont besoin d'être fonctionnalisées pour s'accrocher sélectivement aux espèces-cibles ce qui nécessite un temps d'incubation.

La diélectrophorèse et l'électro-osmose nécessitent des électrodes pour produire un gradient de champ électrique. Ces électrodes peuvent être directement formées à partir du film métallique nécessaire à la propagation d'un mode plasmonique de surface. Ainsi, le transport de masse et la détection sont assurés par le même film d'or, ce qui limite les étapes de microfabrication. Pour la capture d'analytes dans des applications de biodétection, l'électroosmose a été étudiée spécifiquement pour s'affranchir de la limite de diffusion [74]. Ces phénomènes électrocinétiques parviennent avec succès à concentrer des nano-billes aussi bien que des bactéries [35], [75] dans des échantillons de sang dilué [76], ou encore des protéines (cytokines) [77], [78] pour une détection impédimétrique, électrochimique ou plasmonique. La diélectrophorèse permet d'immobiliser efficacement des objets biologiques et notamment des cellules [79] mais aussi des bactéries [80]–[82] jusqu'à la molécule unique [83] pour leur détection. La diélectrophorèse permet aussi de concentrer des nano-particules métalliques utilisées lors d'une mesure par SERS, et ainsi augmenter le rapport signal à bruit lors de la détection de polluants [84].

Bien que les effets thermiques aient déjà fait leurs preuves dans le transport d'espèces pour la biodétection [85]–[87], leur usage n'est pas adapté à notre système de détection par SPR en configuration de Kretschmann, car un changement de température du milieu pourrait perturber le signal mesuré. Cependant, un

paragraphe sera consacré à ces effets, car ils peuvent se produire lorsqu'on applique un champ électrique à des électrodes dans un milieu de mesure. Dans le cas d'un capteur plasmonique nano-structuré, le champ électromagnétique est fortement confiné proche des structures, ce qui peut induire un échauffement local, et donc un flux électrothermique, ce qui contribue au piégeage de particules sur la surface structurée [88].

Parmi les techniques présentées dans ce paragraphe, la diélectrophorèse et l'électro-osmose offrent l'avantage de ne pas nécessiter de marquage et d'être facilement compatibles avec une détection par SPR, car un film d'or structuré comme des électrodes peut servir à la fois d'actuateur et de capteur.

3. Transport de masse dans le contexte des biocapteurs SPR

Le problème du transport de masse sur les capteurs plasmoniques a fait l'objet d'études de la part de plusieurs groupes de recherche ces dernières années, avec des approches principalement basées sur du transport de masse actif. Le transport de masse d'analytes combiné à une détection plasmonique s'est d'abord développé sur des capteurs à réseaux de nano-trous, utilisant les plasmons localisés [89]–[91]. La concentration par gradient de champ électrique accumule des molécules près de la zone de détection du capteur [92]. Comme pour l'électrophorèse, cette technique ne permet que le piégeage d'espèces chargées électriquement. Ensuite, l'équipe de A. Barik [93] a repris un système plasmonique équivalent, pour y ajouter une contre-électrode parallèle au réseau de nano-trous (Figure 2-9A). L'application d'un champ électrique alternatif entre le film d'or et la contre-électrode induit l'attraction des analytes près des nano-trous par diélectrophorèse. Ainsi, le temps de détection est fortement réduit (par 1000) par rapport à un capteur plasmonique sans transport de masse, et ce capteur est capable de piéger des espèces électriquement neutres. Tai et al. [94] ont utilisé une fibre optique métallisée pour le couplage du plasmon de surface et le piégeage de particules par diélectrophorèse. Kuroda et al. [95], [96] ont utilisé un film d'or structuré pour piéger des bactéries par diélectrophorèse. Dans leurs travaux, la propagation d'un plasmon de surface sur le film d'or ne sert pas à la détection, mais à l'excitation de sondes fluorescentes greffées à des bactéries pour en améliorer la détection.

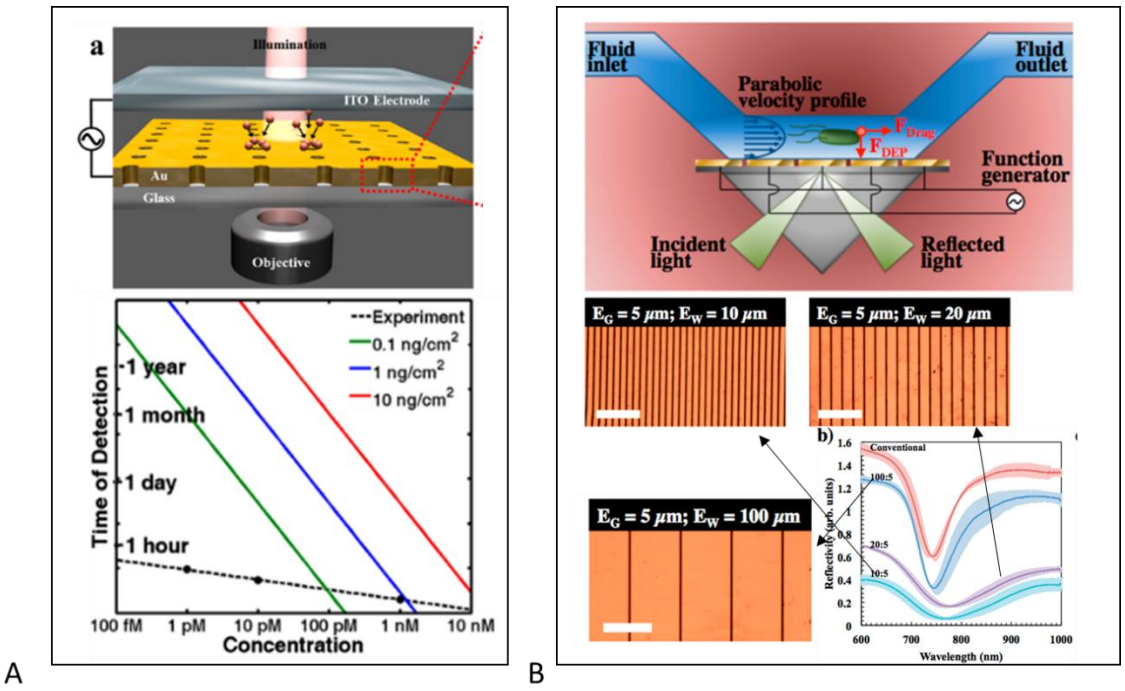


Figure 2-9 : A : schéma du montage expérimental utilisant la DEP combinée à une détection plasmonique par Barik et al [93], et comparaison des temps de détection de BSA sans transport de masse (courbes de couleur) et avec transport de masse (courbe en pointillés). B : Schéma du montage utilisé par Galvan et al. [97] et images en microscopie des électrodes utilisées, avec leurs résonances SPR correspondantes.

Récemment, Galvan et al. ont proposé un capteur à résonance de plasmon de surface qui intègre des électrodes créant un champ électrique non uniforme et piégeant des bactéries par diélectrophorèse (Figure 2-9B). Cependant, ce capteur n'utilise pas d'imagerie, donc la structuration du film d'or utilisé pour la détection réduit considérablement la sensibilité du capteur. Cela est démontré par l'aplatissement des courbes de réflectivité (Figure 2-9B) lorsque la proportion d'or est réduite dans le capteur. Dans le cadre de sa thèse menée au sein de notre consortium, Quentin Avenas [98] a proposé un capteur plasmonique combinant les avantages de l'imagerie SPR et du transport de masse par diélectrophorèse et électroosmose. Le capteur développé s'est montré efficace pour la détection de nano-billes avec une limite de détection de deux ordres de grandeur en dessous de celle mesurée pour un capteur similaire sans transport de masse [99].

Les travaux présentés dans ce manuscrit visent à étudier numériquement puis expérimentalement l'influence de la géométrie des électrodes sur l'efficacité du transport de masse et la réponse SPR du capteur. Nous proposerons une géométrie d'électrodes alternative pour le transport de masse par électro-osmose et

diélectrophorèse, en particulier dans le cadre de la détection d'objets biologiques (cellules, bactéries…)

D. Description des forces en jeu lorsqu'un champ électrique alternatif est appliqué entre deux électrodes

1. Électro-osmose en courant alternatif

a) Modèle de la double couche ionique

Pour comprendre le phénomène d'électroosmose en champ alternatif, il est d'abord nécessaire d'introduire la notion de double couche ionique à l'interface solide-liquide. Dans ce paragraphe, le modèle de la double couche électrique est décrit dans le cas particulier d'une électrode polarisée dont le potentiel est Φ_0 en contact avec un électrolyte. Ce modèle permet de déterminer le potentiel électrique dans l'électrolyte dans la direction perpendiculaire à la surface. Helmholtz a été le premier à en proposer un modèle, en assimilant la double couche électrique à un condensateur, qui correspond physiquement à une couche de contre-ions adsorbés sur la surface chargée. Plus tard, les expériences de Gouy et Chapman ont montré que la capacité de cette double couche électrique dépendait du potentiel appliqué et de la force ionique de la solution. Ils proposent l'existence d'une couche diffuse entre la couche d'ions adsorbée et le reste de l'électrolyte. Le modèle privilégié de nos jours est le modèle de Stern-Gouy-Chapman. Dans ce modèle, les contre-ions sont adsorbés à la surface de l'électrode du fait de sa polarisation. Ces contre-ions sont adsorbés par le métal sur une épaisseur de l'ordre de 5 Å en une couche dense appelée couche de Stern, représentée sur la Figure 2-10. La couche de Stern peut être subdivisée en deux partie. Dans la première partie, le potentiel décroît linéairement jusqu'à φ_d. Cette partie correspond à des ions non hydratés qui sont directement adsorbés sur la surface. La deuxième partie de la couche de Stern est constituée d'ions hydratés. Le potentiel à l'extérieur de la couche de Stern est noté ζ.

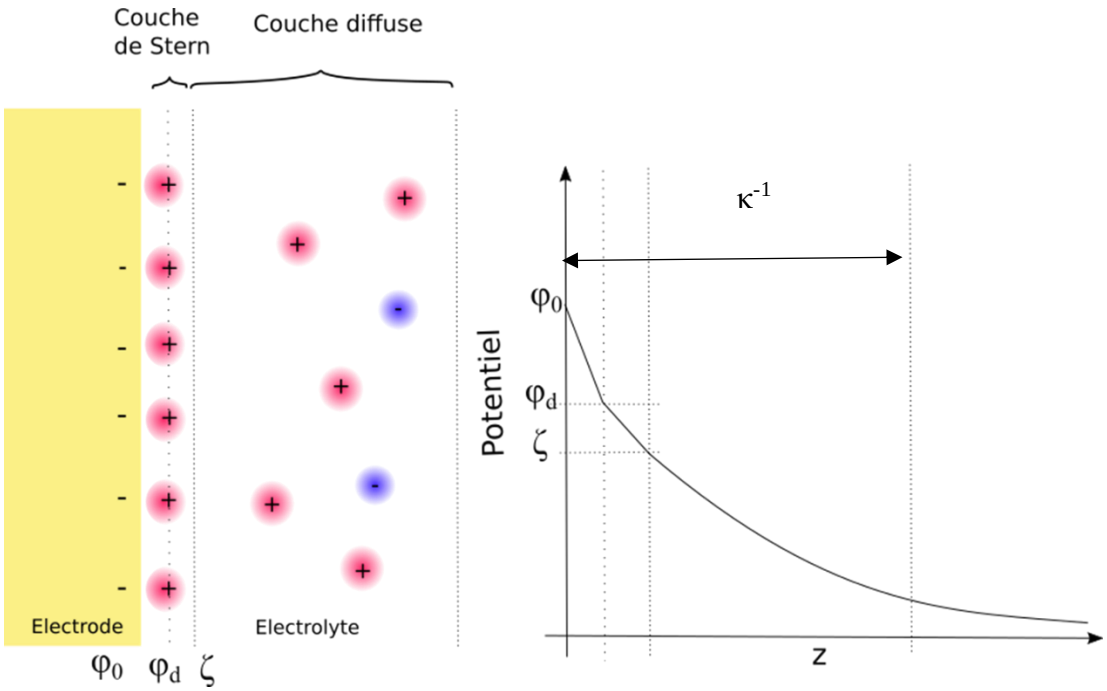


Figure 2-10 : Schéma de la double couche électrique et variation du potentiel dans la solution sur un axe perpendiculaire à la surface.

Entre la couche de Stern et le reste de la solution se trouve une couche diffuse, ou couche de Gouy-Chapman. Cette région proche de l'interface est plus dense en contre-ions que le reste de l'électrolyte. La distribution en espèces chargées dans la couche diffuse est dictée par les interactions électrostatiques entre les ions et la surface, ainsi que des mécanismes de diffusion et d'agitation thermique. L'épaisseur totale de la double couche électrique est la longueur de Debye, notée fréquemment κ^{-1} dans la littérature. Cette longueur s'exprime de la façon suivante :

$$\kappa^{-1} = \sqrt{\frac{D\,\varepsilon}{\sigma}} \qquad \textit{Équation 2-18}$$

Où D est le coefficient de diffusion des ions, ε la permittivité de la solution, et σ sa conductivité. Dans la couche diffuse, le potentiel électrique décroit exponentiellement selon κ.

La couche de Stern et la couche diffuse sont séparées par un plan dit plan de Helmholtz, dont le potentiel est noté ζ. Ce plan est un plan de glissement. Alors que la couche de Stern est considérée comme adsorbée sur la surface et donc immobile, la couche diffuse peut se déplacer par rapport à la surface. Cependant, cette hypothèse d'une couche de Stern rigide et figée est remise en cause par des observations expérimentales et des simulations numériques [100]. Le

comportement de la double couche électrique à la surface d'une électrode, et en particulier dans la couche de Stern, n'est donc pas totalement compris.

b) ACEO dans le cas d'électrodes interdigitées

Pour améliorer la capture de particules sur une surface, il est aussi possible d'induire des mouvements de fluide qui ramènent les particules vers cette surface. L'électroosmose en courant alternatif décrit la mise en mouvement de la couche diffuse présente à l'interface solide-liquide sous l'effet d'un champ électrique alternatif non uniforme. Ce phénomène a été décrit expérimentalement puis modélisé en 2000 par Ramos, Green et Gonzalez [101], [102], [103]. La présence d'une composante tangentielle du champ électrique à l'interface métal/liquide met en mouvement les ions de la double couche par la force de Coulomb, qui entraîne ensuite le fluide par contrainte visqueuse.

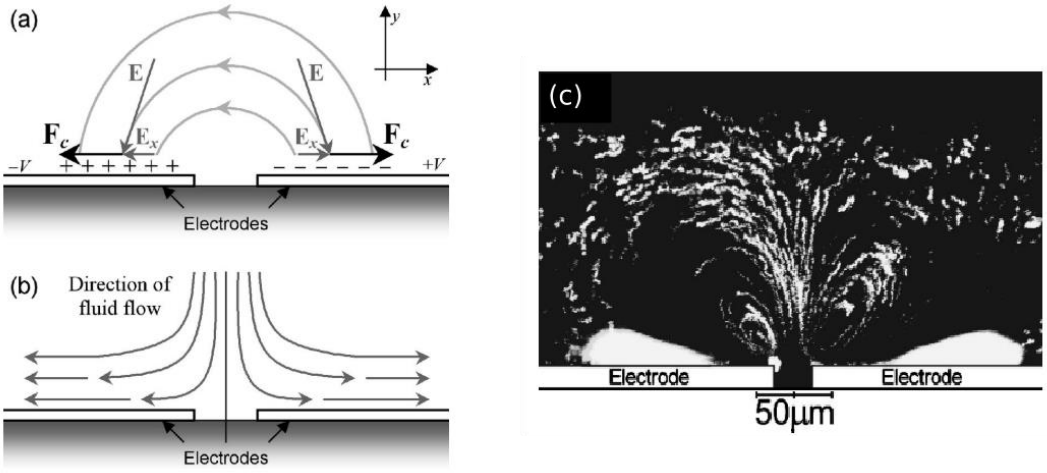


Figure 2-11 Principe de l'électroosmose. (a) : là où, et quand, l'électrode est polarisée positivement, des cations s'adsorbent à la surface. Là où elle est polarisée négativement, ce sont des anions qui s'adsorbent. La composante tangentielle du champ électrique repousse ces charges vers le centre des électrodes, ce qui engendre un déplacement du fluide par contrainte visqueuse (b). La symétrie du système maintient la même direction du flux lorsque la polarisation change (lors des cycles d'un courant AC). Des vortex sont ainsi formés aux extrémités des électrodes (c), avec une zone de piégeage sur les électrodes.

La Figure 2-11 décrit la direction du flux électroosmotique créé par deux électrodes coplanaires. Le flux électroosmotique est dirigé du bord des électrodes vers le

centre des électrodes. Il en résulte une accumulation de particules à la surface de chaque électrode, favorisée par l'interaction particule-particule.

c) Électro-osmose dans le cas d'électrodes coplanaires

Dans le cas de deux électrodes coplanaires semi-infinies, une expression de la vitesse moyenne électroosmotique à l'interface électrode-fluide a été proposée par Morgan et Green dans leur ouvrage de référence : *AC electrokinetics : colloid and nanoparticles* [104].

Dans ce modèle, représenté en Figure 2-12, pour un gap inter électrodes suffisamment petit, l'électrolyte peut être modélisé par des tubes de courant de largeur Δx alignés avec les lignes de champ électrique. Pour une largeur Δx, la double couche ionique est modélisée comme un condensateur de capacité $\Delta C = \varepsilon \kappa d \Delta x$, où d est la longueur d'une électrode.

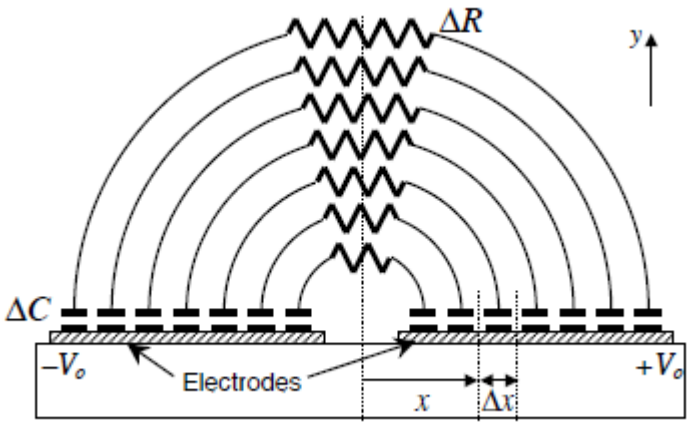


Figure 2-12 Schéma électrique équivalent de deux électrodes coplanaires plongées dans un électrolyte, pour des fréquences suffisamment basses.

Pour des fréquences suffisamment basses ($\omega << \sigma/\varepsilon$), l'électrolyte se comporte de manière résistive, et la résistance de chaque tube est $R\ x\ = \frac{\pi x}{\sigma d \Delta x}$.

Pour un tube de courant, on peut déduire la chute de potentiel dans la double couche ionique $\Delta\Phi_{DL}$ de l'équation d'un circuit RC en série, en notation complexe :

$$V_0 = 2\Delta\Phi_{DL} + \Delta R(x)\ \Delta C\ i\omega\Delta\Phi_{DL} \qquad \text{Équation 2-19}$$

On en déduit

$$\Delta\Phi_{DL} = \frac{V_0}{2 + i\omega\pi\frac{\varepsilon}{\sigma}\kappa x} \qquad \textit{Équation 2-20}$$

En posant Ω, fréquence sans dimension, $\Omega = \frac{\varepsilon\kappa}{2\sigma}\pi x$, on peut simplifier cette expression :

$$\Delta\Phi_{DL} = \frac{V_0}{2(1 + i\Omega)} \qquad \textit{Équation 2-21}$$

Maintenant, il faut déterminer la vitesse électro-osmotique moyenne sur une électrode à partir de la chute de potentiel obtenue précédemment. Cette vitesse *u* est proportionnelle au champ tangentiel E_t et à la charge surfacique dans la couche diffuse σ_q [105] **:**

$$u = \frac{E_t\sigma_q}{\eta\kappa} \qquad \textit{Équation 2-22}$$

Ce champ tangentiel intervient uniquement lorsque le champ est non-uniforme. Il peut aussi s'exprimer par $\frac{-\partial\Delta\Phi_{DL}}{\partial x}$ Dans la couche diffuse, la charge surfacique σ_q peut se décomposer en un terme constant et un terme dépendant du temps correspondant à un excès de charges $\Delta\sigma_q$ qui varie avec le champ électrique alternatif. Pour de petits potentiels, une approximation linéaire permet d'évaluer cet excès de charge en fonction de la chute de potentiel dans la double couche électrique :

$$\Delta\sigma_q = \varepsilon\kappa\Delta\Phi_{DL} \qquad \textit{Équation 2-23}$$

La vitesse moyenne temporelle de la vitesse de glissement sur une électrode est déduite de l'Équation 2-22 :

$$\langle u\rangle = \frac{1}{2}Re\left\{\frac{\Delta\sigma_q E_t^*}{\eta\kappa}\right\} \qquad \textit{Équation 2-24}$$

En remplaçant $\Delta\sigma_q$ et E_t par leurs expressions données en Équation 2-22 et en Équation 2-21, on obtient l'expression de la vitesse moyenne de glissement du fluide

sur les électrodes, en fonction de la position *x* avec le centre du gap inter électrodes, et du potentiel appliqué à cette électrode.

$$\langle u \rangle = \frac{1}{8}\frac{\varepsilon \Omega^2 V_0^2}{\eta x (1+\Omega^2)^2} \qquad \textit{Équation 2-25}$$

Cette expression de la vitesse à la surface des électrodes est la plus fréquemment rencontrée dans la littérature lorsqu'il s'agit de modéliser le flux électroosmotique sur des électrodes coplanaires [106]. Cette vitesse est dépendante de la chute de potentiel dans la double couche électrique, et donc de la conductivité du milieu. Elle est d'autant plus efficace que le milieu est peu conducteur.

d) ACEO dans cas d'électrode face-à-face

Il est possible de créer un gradient de champ avec des électrodes asymétriques situées en haut et en bas d'un canal microfluidique. Islam et al. [107] ont montré

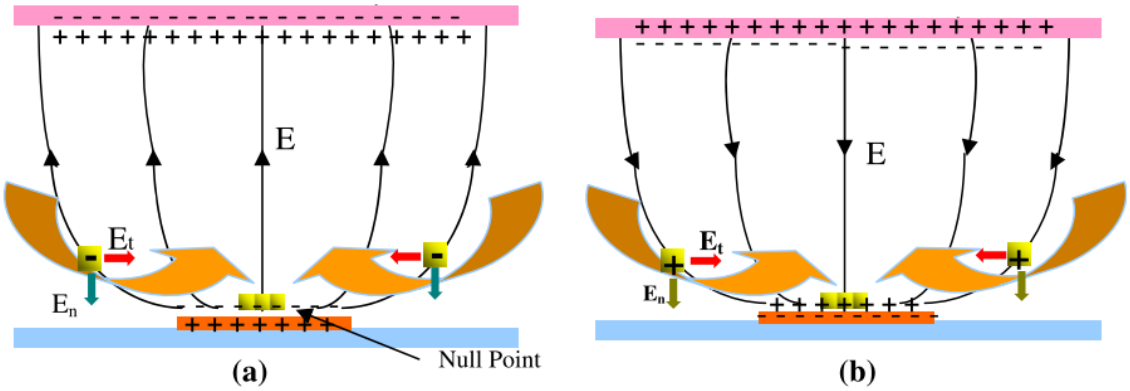


Figure 2-13 : Lignes de champ électrique et direction du flux électroosmotique lors d'un cycle de courant alternatif. (a) : durant la première moitié du cycle, l'électrode d'ITO (en haut) est polarisée négativement, l'électrode du bas positivement. (b) : les polarisations des électrodes sont inversées. Adapté de [107]

l'efficacité de cette configuration pour collecter des particules de latex de diamètre 200 nm à la surface d'un cantilever (Figure 2-13). Dans cet article, les fréquences utilisées se situent entre 5 et 10 kHz, pour une tension entre 0.5 et 5 V_{RMS}. Dans cette configuration, le flux électroosmotique créé des vortex sur toute la hauteur du canal, avec une vitesse nulle au centre de l'électrode du bas, ce qui permet le piégeage de particules à cet endroit. Dans le cas d'électrodes face-à-face, l'Équation 2-25 qui exprime la vitesse du flux électro-osmotique à la surface des électrodes n'est plus valide, car l'approximation géométrique sur laquelle elle repose devient fausse. Il

faudra donc déterminer un modèle valide quel que soit le type de géométrie d'électrodes.

2. Force de diélectrophorèse

a) Description théorique de la force de diélectrophorèse

Sous l'effet d'un champ électrique non uniforme, des particules neutres mais polarisables en suspension dans un liquide sont soumises à une force qui les attire ou les repousse des électrodes. Ce phénomène a été théorisé par Pohl dans les années 50 [108], qui lui donné le nom de diélectrophorèse (DEP). Cette force est basée sur la différence entre les propriétés électriques des particules (permittivité et conductivité), et celles de leur milieu. La plupart des objets biologiques se polarisent et se comportent ainsi comme des dipôles induits sous l'effet d'un champ électrique. La moyenne temporelle de la force diélectrophorétique $\boldsymbol{F_{DEP}}$ qui s'applique sur une particule sphérique de rayon *r* dans un champ électrique $\boldsymbol{E}$ est exprimée de la façon suivante :

$$\langle \boldsymbol{F_{DEP}} \rangle = 2\pi\varepsilon_m r^3 Re[CM] \nabla |\boldsymbol{E}|^2 \qquad \textit{Équation 2-26}$$

Où ε_m est la permittivité du milieu liquide, et *Re(CM)* est la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (CM), qui s'exprime de la façon suivante :

$$Re\ CM\ = Re\left(\frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}\right) \qquad \textit{Équation 2-27}$$

Avec

$$\varepsilon^* = \varepsilon - j\frac{\sigma}{\omega} \qquad \textit{Équation 2-28}$$

Où ε_p^* et ε_m^* représentent respectivement les permittivités complexes des particules et du milieu, qui dépendent des permittivités ε , des conductivités σ et de la fréquence angulaire du champ électrique ω. La DEP permet donc de manipuler sans contact des objets en suspension dans un milieu liquide, avec une force proportionnelle au gradient du champ au carré et dans un sens dépendant du signe de la partie réelle du facteur de CM (donc de la fréquence du champ électrique et des propriétés diélectriques de l'objet et de son milieu d'immersion).

La Figure 2-14 [109] illustre les deux cas de diélectrophorèse qui se présentent en fonction du signe de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti.

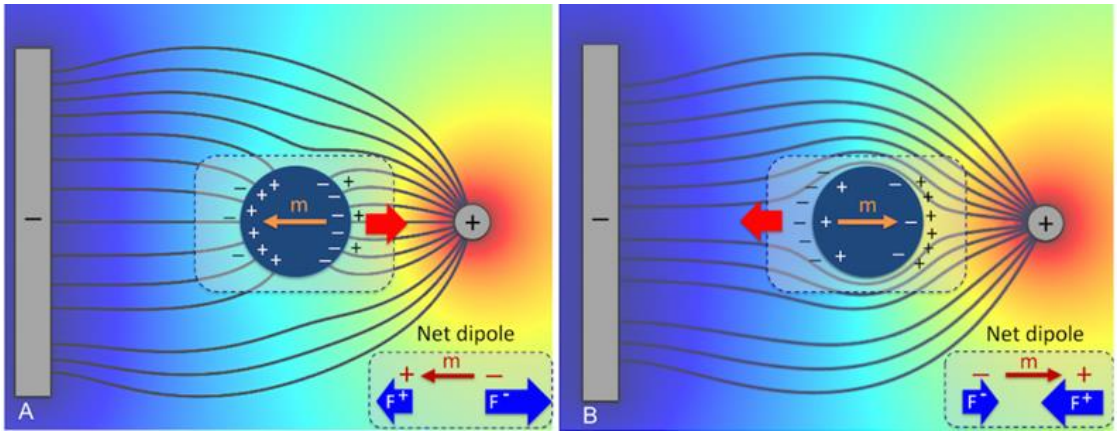


Figure 2-14 : pDEP, la particule est plus polarisable que son milieu d'immersion. Le champ électrique étant non uniforme, la force sur chaque pôle du dipôle induit est asymétrique. Il en résulte une force dirigée vers les zones de fort champ électrique. B : nDEP, la particule est moins polarisable que le milieu. La force de DEP est dirigée vers les zones de faible champ électrique. Adapté de [109]

Si ce terme est positif (particule plus polarisable que le milieu), le moment dipolaire est dirigé vers la zone de faible champ, et les objets sont attirés par la force de Coulomb vers les zones de fort champ électrique, c'est-à-dire à proximité de l'électrode la plus petite (Figure 2-14A). Lorsque ce terme est négatif, le moment dipolaire est dirigé vers la zone de fort champ et les objets sont repoussés vers les zones de faible champ électrique, c'est-à-dire loin de la petite électrode (Figure 2-14B). Ces cas sont respectivement nommés diélectrophorèse positive (pDEP) et diélectrophorèse négative (nDEP). La fréquence pour laquelle la courbe de la partie réelle du facteur de Clausius -Mossotti en fonction de la fréquence passe par zéro est appelée fréquence de transition. Pour cette fréquence, la force de DEP est nulle. Si deux types d'objets ont des propriétés électriques suffisamment différentes (i.e. un facteur de Clausius-Mossotti différent), il est possible de trouver une fréquence pour laquelle $\mathbf{F}_{\mathrm{DEP}}$ n'a pas le même sens pour chaque objet. Cet effet est utilisé pour le tri d'objets biologiques et la séparation de particules notamment [79], [110], [111]. Savoir évaluer le facteur de Clausius-Mossotti est donc essentiel si l'on veut modéliser le comportement d'objets biologiques sous l'effet de la diélectrophorèse. Pour des particules simples comme des billes de latex, l'Équation 2-27 suffit à estimer CM.

Pour des particules plus complexes comme des cellules, il faut prendre en compte le fait qu'une cellule n'est pas composée d'un seul matériau aux propriétés électriques uniformes, elle possède une structure hétérogène. En première approximation, une cellule est souvent présentée comme une membrane isolante entourant un cytoplasme conducteur, comme le décrit la Figure 2-15 [112].

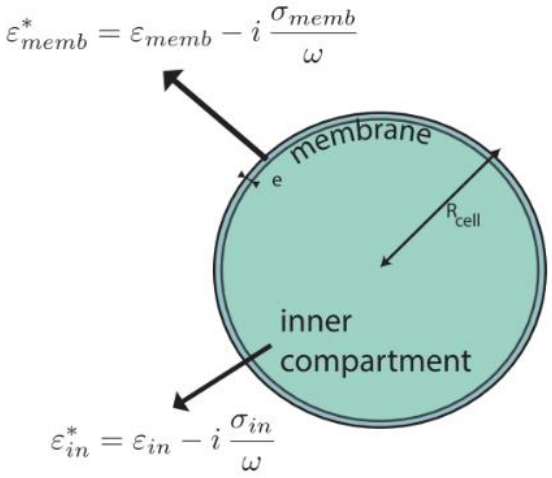


Figure 2-15 Modèle de la cellule monocoque composée d'une membrane et d'un cytoplasme. Adapté de [109]

Dans ce modèle, le cytoplasme ($\sigma_{in}, \varepsilon_{in}$) est contenu dans une membrane ($\sigma_{memb}, \varepsilon_{memb}$) d'épaisseur *e* et de rayon R_{cell}. La permittivité complexe de la cellule s'exprime de la façon suivante [113]:

$$\varepsilon^*_{cell} = \varepsilon^*_{memb} \left\{ \frac{\left(\frac{R_{cell}}{Rcell - e}\right)^3 + 2\left(\frac{\varepsilon^*_{in} - \varepsilon^*_{memb}}{\varepsilon^*_{in} + 2\varepsilon^*_{memb}}\right)}{\left(\frac{R_{cell}}{Rcell - e}\right)^3 - 2\left(\frac{\varepsilon^*_{in} - \varepsilon^*_{memb}}{\varepsilon^*_{in} + 2\varepsilon^*_{memb}}\right)} \right\} \qquad \textit{Équation 2-29}$$

Pour retrouver le facteur de Clausius-Mossotti et la force diélectrophorétique correspondante qui s'exerce sur une cellule, il suffit de remplacer ε^*_p par l'Équation 2-26 dans l'Équation 2-24. Dans ce manuscrit nous utiliserons le logiciel MyDEP [114], développé au laboratoire Ampère en collaboration avec l'EPFL, pour calculer ce facteur sur une plage de fréquences choisie.

Dans le cas des bactéries, la composition de leur membrane est très différente de celle des cellules. Le modèle d'une membrane entourant un cytoplasme ne suffit pas. Il faut utiliser un modèle à deux ou trois membranes, selon le type de bactérie

étudié. La modélisation de bactéries sera décrite plus en détail dans le chapitre consacré aux simulations.

b) Cas des petites particules : prise en compte de la conductivité de surface

Dans le paragraphe précédent, nous avons décrit la force diélectrophorétique comme dépendant des conductivités de la particule et du milieu seulement. Or, dans le cas de particules de taille inférieure à 1 µm, le comportement diélectrophorétique peut être fortement affecté par des effets de mouvements d'ions à la surface des particules. En 1999, Hughes et al. [115] étudient le comportement diélectrophorétique de billes de latex de 216 nm de diamètre dans le même milieu de suspension, mais avec différentes modifications chimiques de surface. Les trois types de billes étudiées dans cette expérience sont :

- des billes telles que fournies par le fabricant, sans modification
- des billes avec activation de surface par EDAC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbo- diimide)
- des billes fonctionnalisées avec des anticorps IgG.

Pour chaque type de bille, la Figure 2-16 montre la fréquence de transition déterminée expérimentalement en observant le mouvement des particules sur le bord d'électrodes crénelées. Pour des fréquences suffisamment basses, le champ électrique perturbe la charge de la double couche ionique à l'interface particule/milieu, ce qui affecte la polarisation de la particule. La conductivité effective d'une particule sphérique σ_p s'exprime en fonction de la conductivité interne la particule σ_{pbulk}, de la conductance de la couche diffuse K^d_s, et la conductance de la couche de Stern K^i_s :

$$\sigma_p = \sigma_{pbulk} + \frac{2K_s^i}{r} + \frac{2K_s^d}{r} \qquad \textit{Équation 2-30}$$

Dans le cas de billes de latex, σ_{pbulk} est négligeable. Les effets de conductivité de surface sont donc prépondérants dans l'expression de la conductivité effective.

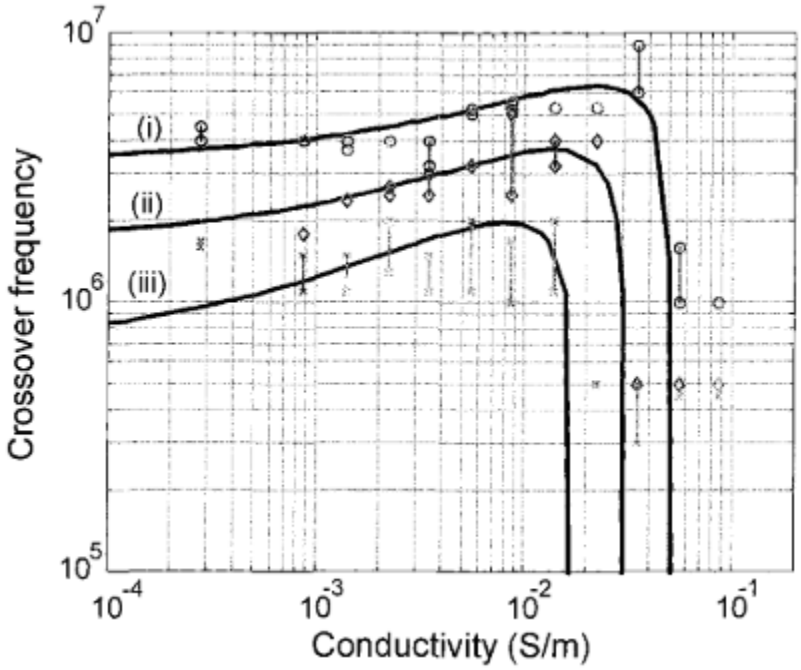


Figure 2-16 : Fréquence de transition en fonction de la conductivité pour des billes latex de 216 nm de diamètre. (i) : billes sans modification de surface. (ii) : billes avec activation par EDAC. (iii) : billes fonctionnalisées IgG. [115]

La modification chimique de surface d'une particule modifie sa charge surfacique, et donc l'adsorption de contre-ions dans la couche de Stern [116]. Cela explique les différences dans les fréquences de croisement observées en Figure 2-16.

Dans le cas d'objets biologiques de plusieurs microns de diamètre comme des cellules eucaryotes, la contribution de la conductance de surface à la conductivité totale de la cellule est négligeable. Cette conductivité devient prépondérante dans le cas de nano-objets tels que des virus, des brins d'ADN ou biomolécules. Les bactéries, qui ont une taille de l'ordre du micromètre, sont un cas intermédiaire. À notre connaissance, la conductance de surface des bactéries dans la littérature est négligée lorsque la force diélectrophorétique est calculée [117]. Négliger ce paramètre peut expliquer en partie les divergences entre la fréquence de croisement calculée théoriquement, et celle trouvée expérimentalement [118].

3. Flux électrothermique

L'application d'un potentiel électrique alternatif sur des électrodes plongées dans un électrolyte peut générer un échauffement par effet Joule. Dans le cas d'un champ électrique non-uniforme, l'échauffement par effet Joule est inhomogène, ce qui se traduit par une variation spatiale des propriétés électriques de fluide (conductivité

et permittivité) à l'origine des forces électrothermiques [119]. Ces variations de conductivité et de permittivité créent des vortex de fluide similaires à ceux induits par électroosmose (Figure 2-17A) Cependant, ce phénomène, appelé flux électrothermique, apparait à des fréquences plus élevées que celles qui impliquent l'électroosmose (Figure 2-17B). L'utilisation d'un milieu conducteur favorise l'apparition d'un flux électrothermique. L'échauffement du fluide par effet Joule s'exprime selon l'équation suivante [106] :

$$k\nabla^2 T + \sigma_m E^2 = 0 \qquad \textit{Équation 2-31}$$

Où k est la conductivité thermique du fluide, T est la température exprimée en Kelvin, et E est l'amplitude du champ électrique.

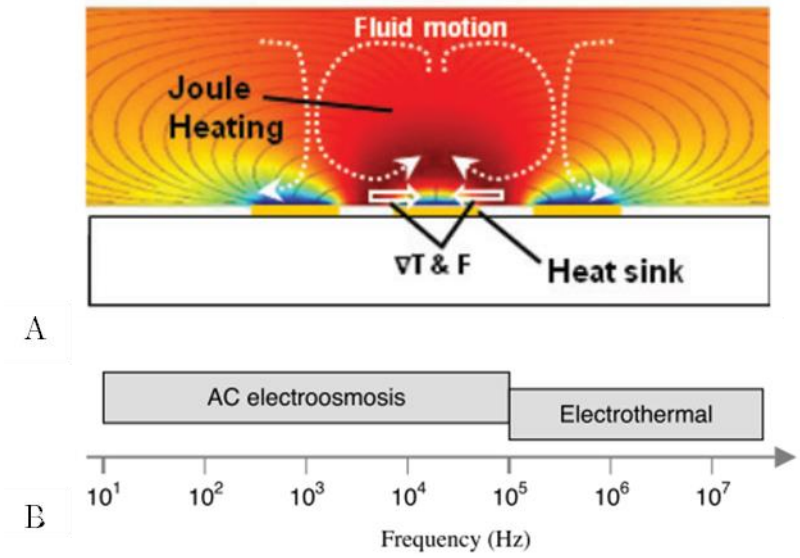


Figure 2-17 : A : Sens de circulation du fluide au-dessus des électrodes dans le cas d'un flux électrothermique [106]. B : domaines fréquentiels dans lesquels interviennent respectivement l'électro-osmose et le flux électrothermique [104].

Dans le contexte des biocapteurs, le flux électrothermique a notamment été utilisé pour améliorer les performances de teste d'immuno-dosage dans du sérum en brassant le milieu de test et donc en améliorant le transport des espèces-cibles vers la surface de détection [87]. Le flux électrothermique s'est aussi révélé intéressant pour la pré-concentration de bactéries [75]. Cependant, l'échauffement créé proche des électrodes peut perturber la mesure selon le type de transducteur choisi. C'est en effet le cas pour les biocapteurs SPR. En effet, la permittivité électrique d'un métal est reliée à sa température, et l'indice optique d'un diélectrique (un milieu

aqueux contenant les analytes par exemple) dépend aussi de sa température. Dans nos expérimentations, nous ne chercherons donc pas à exploiter ce phénomène et privilégierons les milieux de faible conductivité.

E. Effets du champ électrique sur la mesure

L'implantation d'un module de piégeage électrocinétique sur un capteur SPR pour la détection d'objets biologiques implique l'utilisation de champs électriques. Ces paragraphes ont pour but de mettre en lumière les différents effets que peut avoir l'ajout d'un champ électrique sur un capteur SPR, tant sur la mesure que sur les objets biologiques étudiés.

1. Effets du champ électrique sur les objets biologiques étudiés

Lorsqu'une cellule est soumise à un champ électrique, cela peut avoir des effets irréversibles sur sa membrane, dommageables pour sa viabilité. La conductance d'une membrane cellulaire, composée d'une bicouche phospholipidique, est faible [120]. Lorsqu'un champ électrique appliqué à la membrane dépasse sa rigidité diélectrique, sa conductivité augmente et des pores peuvent se former de façon réversible, ou irréversible, entraînant la mort cellulaire. Ce phénomène est appelé électroporation. La plupart du temps, l'électroporation est la conséquence d'une exposition d'une cellule ou d'une bactérie à un champ pulsé, dans le but de faire rentrer des espèces chimiques (médicaments ou matériel génétique) dans le cytoplasme.

Cependant, l'électroporation (réversible ou irréversible) peut aussi avoir lieu sous champ électrique alternatif. Dans ce paragraphe, je mettrai de côté l'abondante littérature traitant des effets des champs pulsés sur des objets biologiques, et décrirai plutôt l'effet des champs alternatifs sur les cellules, plus proche du cas rencontré dans les expériences de diélectrophorèse. Pour des fréquences inférieures à 100 kHz [121] (telles qu'utilisées dans ce projet), le potentiel transmembranaire en courant continu $\Delta\Psi_{membrane,DC}$ est équivalent à celui en courant alternatif $\Delta\Psi_{membrane,AC}$, avec :

$$\Delta\Psi_{memb} = 1.5 R_{cell} E_{appl} cos\theta \left(1 - e^{-t/\tau_{memb}}\right) \qquad \text{Équation 2-32}$$

et $\tau_{memb} = R_{cell} C_{memb}\ r_{int} + \frac{r_{ext}}{2}$ avec R_{cell} le rayon de la cellule, θ l'angle entre la normale au point où est calculé le potentiel et les lignes de champs électrique, C_{memb}

la capacité surfacique de la membrane, r_{int} et r_{ext} les résistivités du milieu intérieur et extérieur à la cellule. L'électroporation intervient lorsque le champ électrique impose un potentiel transmembranaire plus important que le seuil d'électroporation (généralement compris entre 0,2 et 1 V [122]). En pratique, les seuils d'électroporation ne sont pas atteints, et la viabilité des cellules est garantie lors d'une expérience de quelques minutes. En effet, le champ électrique nécessaire à l'électroporation d'une cellule de 10 µm est de l'ordre de quelques centaines de V/cm, valeur qui n'est pas atteinte dans les expériences présentées dans les chapitres suivants.

2. Effets de la polarisation des électrodes sur le signal SPR

a) Cas d'électrodes non fonctionnalisées

En SPR, l'angle de résonance est fortement dépendant de la constante diélectrique des matériaux à l'interface métal/liquide. Les techniques de transport de masse présentées dans les parties précédentes impliquent la polarisation d'un film d'or pour créer un gradient de champ électrique dans la chambre microfluidique. Or la polarisation d'une électrode modifie ses propriétés diélectriques, ce qui a pour conséquence un décalage de l'angle SPR. De plus, la formation d'une double couche électrique à l'interface métal/liquide décrite précédemment a une influence non négligeable sur l'angle SPR.

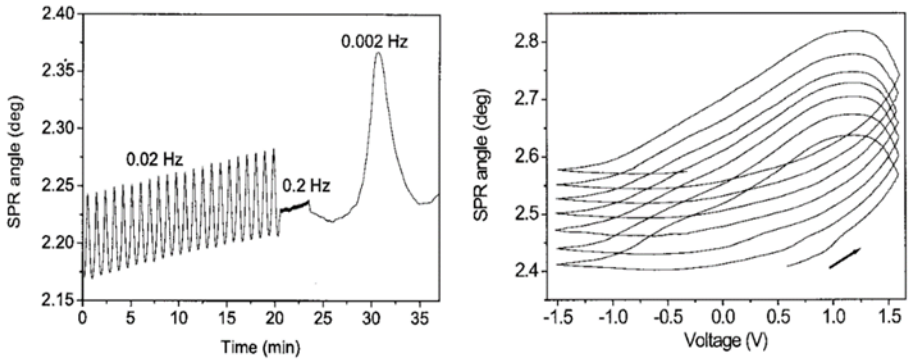


Figure 2-18 : Décalage de l'angle SPR pour une amplitude de 1,5V et différentes fréquences. B : Décalage de l'angle SPR pour une amplitude de 1,5V et une fréquence de 0,002 Hz. Les mesures ont été effectuées pour une électrode d'or dans de l'eau DI (conductivité non précisée). [123]

À partir d'un certain potentiel imposé à l'électrode d'or, les réactions d'oxydation et de réduction du métal peuvent également modifier cet angle. L'étude de l'influence du potentiel et de la solution utilisée sur l'angle SPR [123] montre que deux types de variations de l'angle SPR sont observées lorsqu'on applique un potentiel

périodique sur un film d'or plan. La première variation est une variation périodique qui suit les oscillations du potentiel imposé (Figure 2-18A). Le deuxième effet est la présence d'hystérésis entre chaque cycle de variation du potentiel (Figure 2-18B). Les auteurs ont interprété les oscillations comme résultat des changements dans la double couche ionique située à la surface de l'électrode d'or. En présence de cette double couche ionique, la constante diélectrique ε_m du métal peut être exprimée de la façon suivante :

$$\varepsilon_m = \varepsilon_{m0} + \Delta\varepsilon_m \qquad \text{Équation 2-33}$$

Où ε_{m0} est la constante diélectrique du métal non perturbée, et $\Delta\varepsilon_m$ décrit la variation de constante diélectrique induite par le changement de potentiel surfacique. McIntyre [124] a proposé un modèle qui décrit ce changement comme une variation de densité électronique :

$$\Delta\varepsilon_m = \epsilon_e - 1 \frac{\Delta n}{nL_z} \qquad \text{Équation 2-34}$$

Où ε_e est la contribution des électrons libres à la constante diélectrique du métal, Δn est l'excès de densité électronique dans la couche de Stern, n est la densité d'électrons libres dans le métal, et L_z est la profondeur de pénétration du champ électrique dans le métal. La présence d'hystérésis est quant à elle expliquée par la présence d'une réaction électrochimique au niveau du film d'or. En fonction de la solution utilisée, de la fréquence et de l'amplitude de la tension imposée entre les électrodes, l'oxydation de l'or peut se produire et créer l'oxyde Au_2O_3. L'équation bilan de la production de cet oxyde est la suivante :

$$Au_2O_3 + 6H^+ \leftrightarrow 2Au + 3H_2O$$

Dans cet article, les mesures de décalage de l'angle SPR ont été réalisées à de très basses fréquences comparées aux fréquences nécessaires à la DEP et l'ACEO (de l'ordre du kHz). La Figure 2-18A montre qu'à partir de 0,2 Hz, les oscillations de l'angle SPR dues aux perturbations de la double couche ioniques sont négligeables. Les réactions électrochimiques peuvent être quant à elles limitées lorsque la fréquence est augmentée. Ces résultats suggèrent qu'il est possible de trouver une fréquence à partir de laquelle les changements d'angle SPR induits par la

polarisation du film d'or sont négligeables, et ne vont donc pas interférer avec les mesures réalisées lors des expériences mises en œuvre dans le travail présenté.

b) Cas d'électrodes fonctionnalisées

Le paragraphe précédent précise que l'application d'un champ électrique sur des électrodes utilisées comme capteur SPR peut perturber le signal. Si ces électrodes sont fonctionnalisées chimiquement, un champ électrique pourrait modifier l'état des molécules greffées en surface, donc modifier localement l'indice optique près du film d'or, et perturber le signal SPR. Ces modifications peuvent être irréversibles (décrochage de molécules) ou bien réversibles (modification de leur conformation). À notre connaissance, l'endommagement par un champ alternatif d'une chimie de surface greffée sur un métal n'a pas étudié dans la littérature. S'il se produit, cet endommagement peut être observé grâce à la réponse SPR du capteur. Avant les expériences impliquant l'utilisation d'un champ électrique appliqué à des électrodes comportant une fonctionnalisation chimique, il sera nécessaire de vérifier que le champ électrique ne modifie pas le signal SPR lorsqu'il n'y a pas d'analytes sur les électrodes.

F. Une application d'un capteur SPR avec transport de masse : la détection de bactéries pour des mesures en sécurité environnementale et alimentaire

La détection de bactéries pathogènes dans l'eau potable et les aliments est une préoccupation majeure des acteurs de l'industrie agro-alimentaire. Quatre pathogènes bactériens sont principalement en cause dans les infections d'origine alimentaire : les salmonelles (*salmonella*), *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* et *Escherichia coli O157 :H7.* La méthode de référence pour la détection de ce type de bactéries repose sur une culture bactérienne en plusieurs étapes [125]. Durant l'étape de pré-enrichissement, un échantillon est prélevé, puis dilué dans un milieu nutritif non sélectif pour initier la croissance bactérienne. Cette étape dure environ 24 heures. Dans une deuxième étape appelée enrichissement sélectif, une partie du milieu pré-enrichi est dilué dans un milieu de croissance sélectif, choisi en fonction du pathogène visé. Lors de cette étape, les bactéries visées croissent préférentiellement, pendant une durée de 24 à 48h. La présence de bactéries pathogènes est ensuite validée par l'ensemencement d'un gel d'agarose spécifique par quelques µL du milieu enrichi, puis par une analyse biochimique.

Sans transport de masse, les pathogènes de type bactéries peuvent être détectés à des concentrations d'environ 10^5 à 10^7 CFU/mL [37], [126] par des capteurs à résonance de plasmon de surface. L'ajout d'un transport de masse efficace pour piéger des bactéries dans des conditions qui ne nécessitent pas de phase de pré-enrichissement serait un atout qui ouvrirait de nombreuses applications aux capteurs SPR en matière de sécurité environnementale et alimentaire, en particulier pour la détection de bactéries dans de l'eau potable. Dans l'eau potable, les conditions de conductivité sont compatibles avec un flux électro-osmotique [127], de même que la diélectrophorèse positive [128]. Ces effets électrocinétiques ont été utilisés pour le contrôle de la qualité de l'eau potable sur des dispositifs microfluidiques intégrant une détection par impédancemétrie [129], [130].

G. Conclusion

Ce chapitre nous a permis de mettre en avant les limites actuelles des biocapteurs à résonance des plasmons de surface, et proposer une solution basée sur le transport de masse actif des espèces cibles vers la zone de détection. L'ajout d'un transport de masse permettra ainsi de passer outre la limite de diffusion, et ainsi réduire sensiblement la limite en concentration et le temps de détection pour ce type de biocapteur. Le recensement et l'analyse de différentes techniques de transport de masse nous a permis de retenir deux effets liés à un champ électrique non-uniforme : la diélectrophorèse et l'électroosmose. Ces deux phénomènes physiques ne nécessitent pas de marquage préalable de l'espèce cible et peuvent agir sur des cibles électriquement neutres. Le champ électrique nécessaire à la diélectrophorèse et l'électroosmose sera produit par des électrodes, ces mêmes électrodes d'or serviront de transducteur pour la détection plasmonique.

Les chapitres suivants devront répondre à la problématique suivante : comment optimiser le transport de masse sur les biocapteurs SPR pour améliorer leurs performances par rapport à l'état de l'art ? Pour répondre à cette problématique, le chapitre suivant propose une analyse par la simulation numérique des phénomènes de transport mis en jeu lors de l'application de champs électriques alternatifs.

Chapitre 3. Étude numérique de la géométrie du capteur

A. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré que plusieurs techniques de transport de masse peuvent contribuer à l'amélioration des performances actuelles des biocapteurs SPR. Parmi ces techniques, la diélectrophorèse et l'électro-osmose sont particulièrement adaptées car elles impliquent l'utilisation de champ électriques alternatifs, limitant les perturbations du signal mesuré. De plus, il est possible d'utiliser le même film métallique comme transducteur pour une mesure SPR et comme électrode pour le transport de masse, ce qui est un avantage fondamental par rapport aux autres techniques de transport de masse, car cela simplifie la fabrication des capteurs. Dans ce chapitre, nous allons dans un premier temps déterminer le flux électro-osmotique et la force diélectrophorétique s'exerçant sur des particules en suspension dans de l'eau dé-ionisée (eau DI). Pour se rapprocher de la problématique de la détection de bactéries dans l'eau, nous avons choisi de modéliser la DEP en fonction des caractéristiques électriques correspondant à une bactérie *e.coli*. La trajectoire de particules dans une chambre fluidique sous l'effet de la diélectrophorèse et de l'électroosmose a été simulée, d'abord sans flux, puis avec un flux entrant variable. Les simulations sont réalisées avec le logiciel COMSOL, parfois avec l'aide du cluster de calcul NEWTON présent à l'ECL, si le temps de calcul est trop important sur un ordinateur de bureau. Ce cluster de calcul, hébergé au centre de ressources informatiques de l'Ecole centrale de Lyon, totalise 86 nœuds de calcul. Les simulations réalisées permettent dans un premier temps d'optimiser la fréquence du champ électrique. Une fois cette fréquence optimale déterminée, les modèles numériques permettent de comparer différentes configurations et géométries d'électrodes, afin de déterminer quel type d'électrodes piège le plus de particules. Enfin, l'influence d'un flux sur le piégeage de particules sera étudiée.

B. Présentation du modèle

Le logiciel COMSOL est un logiciel de modélisation et de simulation multiphysique, basé sur la méthode des éléments finis. Dans ce chapitre, nous étudierons deux configurations d'électrodes. La première configuration étudiée est la configuration face-à-face, représentée en Figure 3-1A. La deuxième configuration est celle la plus souvent rencontrée dans la littérature. Il s'agit d'électrodes coplanaires interdigitées représentée en Figure 3-1B. Deux peignes d'électrodes dans le même plan sont polarisés en opposition de phase. Pour chaque configuration, le Tableau 2 présente les forces prises en compte dans notre modèle, ainsi que le module COMSOL utilisé.

Force	Module(s) COMSOL utilisé(s)
Force diélectrophorétique	*Electric current, laminar Flow*
Force électroosmotique	*Laplace equation, Laminar flow*
Force de gravité	*Laminar flow*
Force de traînée	*Laminar flow*

Tableau 2: Modules du logiciel COMSOL utilisés pour modéliser les forces s'exerçant sur une particule en suspension dans un fluide, en présence d'un champ électrique alternatif.

Le modèle géométrique en 2 dimensions représenté en Figure 3-1 consiste en un rectangle dont la hauteur correspond à la hauteur de la cuve fluidique. Dans chaque modèle, les électrodes en or sont représentées par deux segments parfaitement polarisables d'une longueur de 100 µm, ces électrodes ayant une épaisseur très faible (50 nm) devant la hauteur de la cuve fluidique.

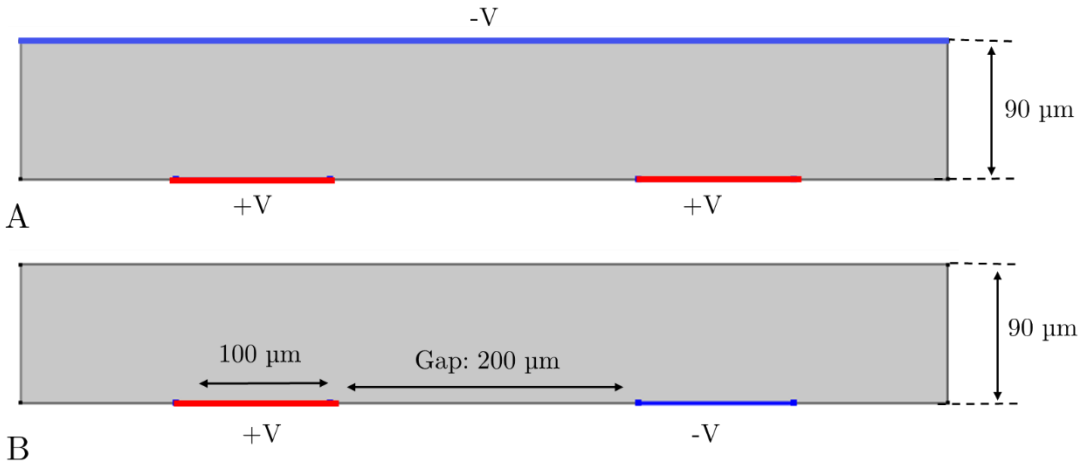


Figure 3-1 : Les deux configurations étudiées dans ce chapitre. Deux électrodes de la configuration face-à-face (A) sont situées en bas de la chambre fluidique, et ont le même potentiel. En opposition de phase, une contre électrode plane est située en haut de la chambre fluidique. Dans la configuration interdigitée, deux électrodes en opposition de phase sont situées en bas de la chambre fluidique (B).

C. Modélisation de la diélectrophorèse

1. Choix des paramètres électriques dans le cas d'une bactérie *e.coli*

La diélectrophorèse, présentée au Chapitre 2.D.2, est une force qui agit sur une particule neutre et polarisable en suspension dans un milieu liquide, sous l'effet d'un champ électrique alternatif et non uniforme. L'intensité de cette force dépend du rayon de la particule, du gradient de champ électrique, et du facteur de Clausius-Mossotti. Ce facteur dépend des paramètres électriques du la particule et du milieu de suspension, plus précisément de leurs permittivités complexes. Dans ce modèle, le milieu de suspension sera de l'eau DI. Pour rapprocher les résultats de simulation aux conditions expérimentales, nous choisirons des paramètres électriques se rapprochant le plus possible des paramètres électriques d'une bactérie de type *e.coli*.

Si dans le cas des cellules eucaryotes les paramètres électriques sont bien documentés dans la littérature, c'est moins le cas des bactéries. À basse fréquence, le facteur de Clausius-Mossotti dépend principalement de la conductivité de la membrane bactérienne, composée d'une membrane cytoplasmique et d'une membrane externe qui protège la cellule de la pression osmotique et évite la lyse de la bactérie. La membrane cytoplasmique, d'une épaisseur de 5 à 10 nm, est une bicouche lipidique, très peu conductrice. La composition de cette membrane est la même pour une bactérie de type Gram positif ou Gram négatif. Cependant, la composition de la membrane externe est différente pour des bactéries à Gram positif, ou à Gram négatif. Dans le cas des bactéries à Gram positif, la membrane externe est composée d'une couche de muréine [1] de 15 à 80 nm d'épaisseur, chargée négativement [131]. Plusieurs bactéries pathogènes pouvant contaminer l'eau, comme *E. coli*, *legionnella* ou la *salmonella* sont des bactéries de type Gram négatif. Leur membrane externe, plus complexe, est composée d'une paroi extérieure, d'une épaisseur pouvant aller de 6 à 15 nm d'épaisseur, ainsi que d'une fine couche de muréine de 1 à 3 nm. La Figure 3-2A présente un schéma simplifié de la composition de la paroi des bactéries à Gram positif et Gram négatif. Dans la littérature, cette fine membrane est le plus souvent négligée, et le modèle électrique d'une bactérie de type *E. coli* se compose de 2 membranes peu conductrices de forme elliptique entourant le cytoplasme plus conducteur. Ce modèle est représenté en Figure 3-2B. La partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (Figure 3-2C) a été calculée grâce au logiciel MyDep pour un milieu de conductivité de $5{,}5.10^{-6}$ S/m [114] (typique de l'eau DI), en prenant comme modèle une cellule de forme elliptique et une paroi composée de deux matériaux différents. Les paramètres électriques de la cellule correspondent aux paramètres mesurés pour une bactérie de type *e.coli*, mesurés par Castellarnau et al. [132]. Les paramètres utilisés dans les simulations de ce chapitre sont détaillés en Annexe 2.

[1] Ou peptidoglycane, constitué d'une partie glucidique (polysaccharide) et d'une partie peptidique

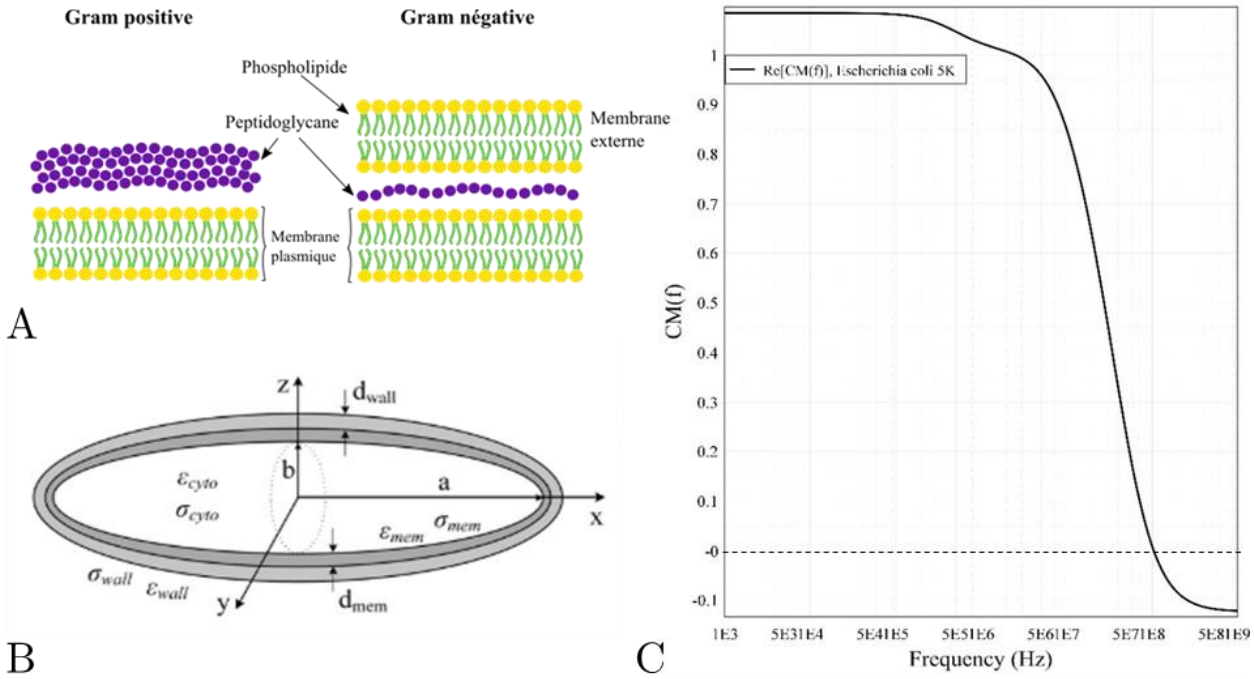


Figure 3-2A: Schéma de la membrane d'une bactérie de type Gram négatif ou Gram positif. B : Structure de la membrane retenue pour les simulations [132]. C : facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence, calculé avec le logiciel MyDEP pour une bactérie de type e.coli et une conductivité de 6,6 10^{-6} S/m.

En pratique, nous chercherons à rapprocher les bactéries des électrodes, donc les attirer vers des zones de fort champ électrique. Cette situation correspond à la diélectrophorèse positive. D'après le facteur de CM calculé, les bactéries sont soumises à la force de diélectrophorèse positive sur une large plage de fréquences allant de 1 kHz à plus de 50 MHz. Cette plage de fréquence est compatible avec celle favorisant le flux électro-osmotique : les effets de diélectrophorèse et d'électro-osmose sont donc susceptibles de se superposer pour certaines conditions expérimentales.

2. Modélisation de la diélectrophorèse : comparaison des électrodes face à face et coplanaires

La modélisation de la force de diélectrophorèse créée par une paire d'électrodes passe d'abord par le calcul du champ électrique. Sur le logiciel COMSOL, une étude fréquentielle permet de cartographier le champ électrique, en résolvant grâce à la méthode des éléments finis les équations suivantes :

Équation 3-1

$$\nabla . \boldsymbol{J} = Q_J$$

Équation 3-2

$$\boldsymbol{E} = -\nabla V$$

$$\boldsymbol{J} = \sigma \boldsymbol{E} + j\omega \boldsymbol{D} + \boldsymbol{J}_e \qquad \textit{Équation 3-3}$$

$$\boldsymbol{D} = \varepsilon_0 \varepsilon_r \boldsymbol{E} \qquad \textit{Équation 3-4}$$

où Q_J, σ, ω, $\boldsymbol{D}$, V, $\boldsymbol{J_e}$, $\varepsilon_0, \varepsilon_r$ sont respectivement la densité de charge, la conductivité, la fréquence angulaire, le champ de déplacement électrique, le potentiel appliqué, la densité de courant générée de l'extérieur, la permittivité du vide, et la permittivité relative du milieu. Dans notre calcul, Q_J and $\boldsymbol{J_e}$ sont nuls. Les conditions aux limites sur les électrodes fixent des potentiels +V et –V disposés comme en Figure 3-1. Entre les électrodes, le matériau est considéré comme parfaitement isolant, ce qui impose $\boldsymbol{n} \cdot \boldsymbol{J} = 0$, avec $\boldsymbol{n}$ vecteur unitaire normal.

La force diélectrophorétique exercée sur une bactérie de type *e.coli* est ensuite calculée pour des électrodes face-à-face (Figure 3-3A) et des électrodes interdigitées (Figure 3-3B) à partir de l'équation DEP (Équation 2-26) et du champ électrique déterminé précédemment. La tension aux bornes des électrodes est de 5 V_{pp}, et la fréquence choisie est de 1kHz. Cette force dépend du carré du gradient du champ électrique. Elle est donc très localisée et ses maximas sont localisés au bord des électrodes. La Figure 3-3C représente l'intensité de la force diélectrophorétique sur une ligne de coupe parallèle à l'axe horizontal, 5 µm au-dessus des électrodes. Ce graphique montre une force plus élevée dans le cas des électrodes face-à-face que dans le cas des électrodes interdigitées. Cette différence est d'environ un facteur dix. Ces résultats suggèrent que pour un potentiel appliqué équivalent et des dimensions d'électrodes similaires, la configuration face-à-face pourrait s'avérer plus efficace pour le piégeage de bactéries que la configuration coplanaire.

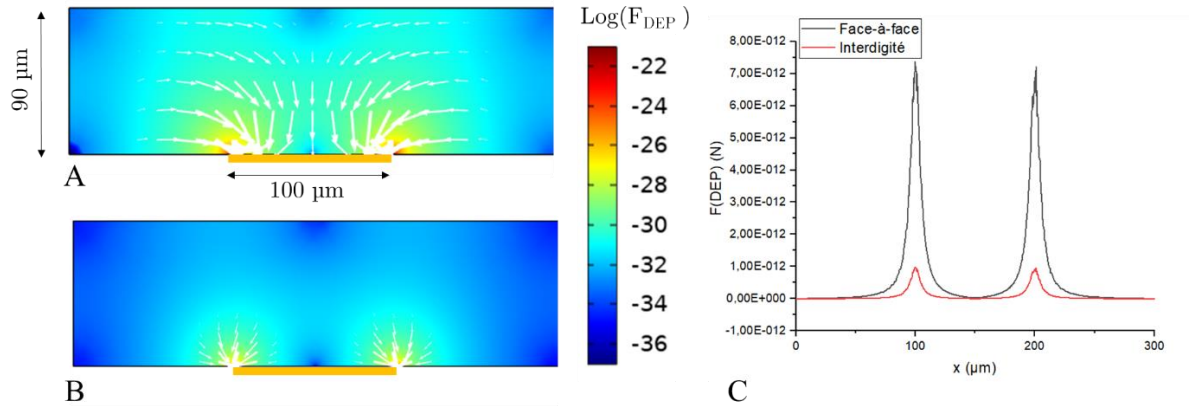


Figure 3-3 : Force diélectrophorétique exercée sur une bactérie dans le cas d'électrodes face-à-face (A) et interdigitées (B). Intensité de la force de diélectrophorèse sur une ligne 5 µm au dessus des électrodes, parallèles aux électrodes.

D. Modélisation du flux électroosmotique

1. Présentation du problème

La diélectrophorèse positive permet de capturer des particules sur le bord d'électrodes. Cependant, la détection par SPR de particules en bord d'électrodes n'est pas la meilleure solution, compte tenu des aberrations optiques qui peuvent exister à cet endroit. Pour centrer les particules sur les électrodes, il est possible d'induire un flux électroosmotique, dans des gammes de fréquences compatibles avec la diélectrophorèse. De plus, la force de diélectrophorèse est localisée au voisinage du bord des électrodes. Les flux électroosmotiques permettent de créer des mouvements de fluide dans toute la hauteur du micro-canal, et donc de ramener plus de particules vers la surface des électrodes. Dans le cas d'électrodes interdigitées, Ramos et al. [105] ont donné une solution analytique à la vitesse électroosmotique à la surface des électrodes. Cette solution donne la vitesse électroosmotique sur les électrodes, exprimée dans le Chapitre 2, par l'Équation 2-25. Cette expression a largement été reprise dans la littérature, en particulier par Oh. Et al [106], qui fait lui-même référence quand il s'agit d'étudier le comportement de particules sous des effets électrocinétiques. Si cette expression obtenue à partir d'une approximation géométrique est correcte pour deux électrodes coplanaires semi-infinies séparées par un petit espacement, l'utiliser dans le cas d'autres géométries conduirait à un calcul faux.

Dans la littérature, plusieurs articles proposent des simulations de flux électroosmotique dans le cas d'électrodes face-à-face [107], [133], [134]. La vitesse de glissement sur les électrodes est calculée à partir de l'équation de Helmholtz-Smoluchowski [134], et le potentiel ζ ainsi que la valeur de champ électrique tangentiel au niveau du plan de glissement est approximée. Or, Green et. al ont démontré qu'il était possible de calculer une solution numérique pour déterminer la chute de potentiel dans la double couche ionique puis en déduire la vitesse électroosmotique sur une électrode [102]. Une discussion avec A. Ramos, co-auteur de cet article, nous a orienté vers un calcul numérique de la vitesse du flux électro-osmotique sur les électrodes. La résolution de ce problème se décompose en deux parties. Dans une première partie, nous aborderons la résolution du problème électrique, pour déterminer le potentiel à l'extérieur de la double couche ionique sur toute la surface de l'électrode. La deuxième partie concerne la résolution du problème fluidique. Ces modèles ont été développés en partie dans le cadre du stage de master d'Oleh Andreiev que j'ai encadré.

a) Problème électrique

Pour des basses fréquence ($f<<f_c$), la double couche ionique à la surface des électrodes est en quasi-équilibre. La fréquence f_c est la fréquence de relaxation de charge, qui s'exprime [102] :

$$f_c = \frac{\sigma}{2\pi\varepsilon}$$ Équation 3-5

Dans ces conditions, la double couche se comporte comme deux condensateurs en série, tandis que le reste du fluide se comporte comme une résistance. Le potentiel dans la solution vérifie donc l'équation de Laplace :

$$\nabla^2 \Phi = 0$$ *Équation 3-6*

Cette équation sera résolue par le module *Laplace equation* de COMSOL. Pour cela, il faut déterminer les conditions aux limites sur l'électrode et sur le verre. A la surface de l'électrode, une condition aux limites est donnée par l'équation caractéristique d'un condensateur parfait :

$$\sigma \frac{\partial \Phi}{\partial y} = \frac{\partial q_{DL}}{\partial t}$$ *Équation 3-7*

Avec q_{DL} la charge surfacique dans la double couche. Cette équation suppose qu'il n'y a pas de courants latéraux dans la double couche. Si la chute de potentiel dans la double couche diffuse est petite, alors il existe une relation de linéarité entre la charge surfacique q_{DL} et le potentiel de l'électrode. On a alors :

$$q_{DL} = C_{DL}(\Phi - V)$$ Équation 3-8

En notation complexe, l'Équation 3-7 devient

$$\sigma \frac{\partial \Phi}{\partial y} = i\omega C_{DL}(\Phi - V)$$ *Équation 3-9*

Cette équation donne la condition aux limites de type Neumann, sur les électrodes :

$\frac{\partial \Phi}{\partial y} = \frac{i\omega C_{DL}}{\sigma}(\Phi - V)$ sur l'électrode où est appliqué un potentiel V, et $\frac{\partial \Phi}{\partial y} = \frac{i\omega C_{DL}}{\sigma}(\Phi + V)$ sur l'électrode où est appliqué un potentiel -V.

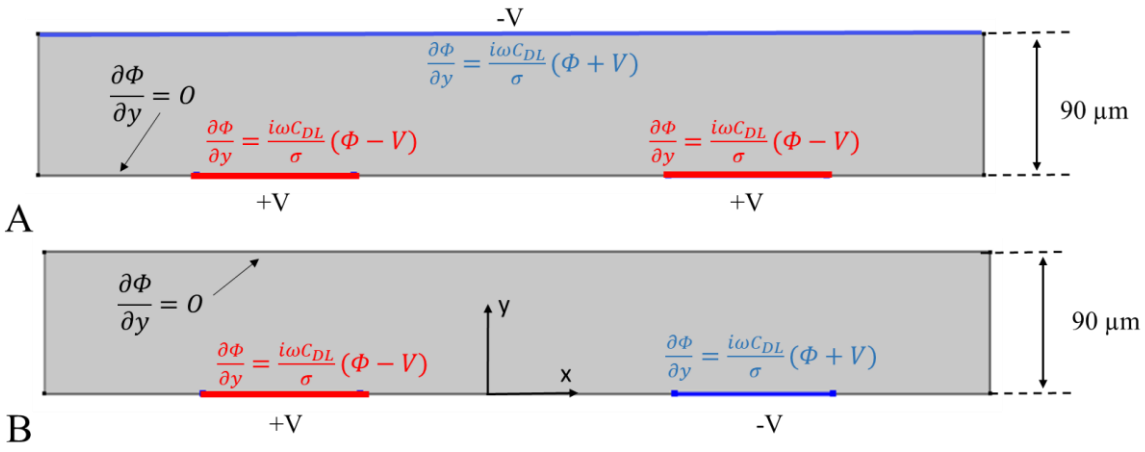


Figure 3-4 Conditions aux limites de type Neumann, appliquées dans le module COMSOL Laplace équation, pour des électrodes face-à-face (A) et interdigitées (B)

Sur le verre, on a $\frac{\partial \Phi}{\partial y} = 0$. Dans nos expériences, nous ne travaillerons pas sur une paire d'électrodes, mais sur un réseau d'une dizaine d'électrodes. Pour se rapprocher de ces conditions, une condition aux limites périodique pour le potentiel est appliquée sur les parois à droite et à gauche de la chambre fluidique pour simuler un réseau d'électrodes. Le potentiel calculé est représenté en Figure 3-5.

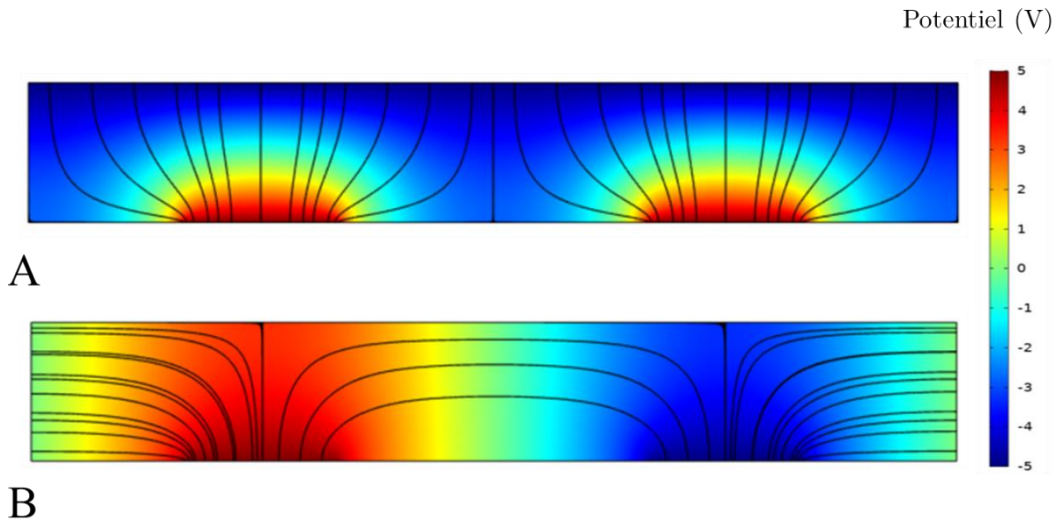


Figure 3-5 : Potentiel et lignes de champ calculés pour les électrodes face-à-face (A) et interdigitées (B).

b) Problème fluidique

Le potentiel Φ a été déterminé dans la partie précédente. Cela nous permet de calculer la vitesse moyenne sur les électrodes [103], qui s'exprime :

$$\langle u \rangle = -\frac{\varepsilon}{4\eta} \Lambda \frac{\partial}{\partial x} |\Phi - V|^2 \qquad \text{Équation 3-10}$$

Ou η est la viscosité du fluide, V est le potentiel de l'électrode sur laquelle la vitesse du fluide est calculée, Λ le rapport entre la capacité totale de la double couche électrique et la capacité de la couche diffuse :

$$\Lambda = \frac{C_s}{C_s + C_d} \qquad \textit{Équation 3-11}$$

Dans le module COMSOL *Laminar flow*, l'Équation 3-10 est utilisée comme vitesse de glissement sur les électrodes. Entre les électrodes et sur les parois, une condition de non-glissement est appliquée. Ces conditions aux limites sont résumées en Figure 3-6.

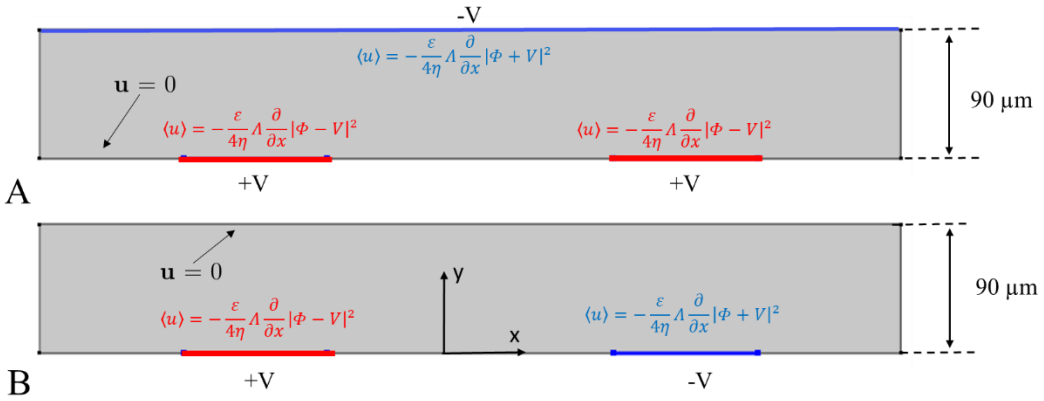


Figure 3-6 : Conditions aux limites utilisées pour l'étude fluidique, pour des électrodes face-à-face (A) et interdigitées (B)

La vitesse du fluide dans le reste de la chambre fluidique est déduite grâce à la résolution numérique de l'équation de Navier-Stokes, en faisant l'hypothèse que le fluide est incompressible. Cette méthode de calcul de la vitesse électroosmotique, qui consiste dans un premier temps à résoudre l'équation de Laplace sur les électrodes, puis à en déduire la vitesse de glissement sur celles-ci, s'adapte à n'importe quelle géométrie. En effet, la vitesse est calculée de façon numérique, et non pas par une formule déterminée de façon analytique à partir d'une approximation géométrique. Cette méthode de calcul convient donc à la fois pour des électrodes coplanaires et face-à-face.

2. Fréquence optimale pour maximiser la vitesse électro-osmotique

La fréquence du champ électrique appliqué aux électrodes modifie la capacité de la double couche ionique. Elle influe donc sur le potentiel de celle-ci. Pour des fréquences supérieures à quelques dizaines de kHz, la variation de potentiel est trop rapide pour que la double couche ait le temps de se former. Lorsque la fréquence est au contraire très basse, le potentiel appliqué aux électrodes chute presque entièrement dans la

double couche ionique. Dans ce cas, le champ électrique dans le milieu tend vers zéro, et la composante tangentielle du champ électrique tend aussi vers 0. La vitesse électro-osmotique devient donc nulle à très basse fréquence.

Il existe donc une fréquence optimale, qui permet de maximiser la vitesse tangentielle du fluide sur l'électrode. Pour un milieu correspondant à de l'eau DI (conductivité de $5{,}5.10^{-6}$ S/m), la vitesse tangentielle du fluide au bord de l'électrode en fonction de la fréquence est représentée sur la Figure 3-7. Cette courbe en forme de cloche est en adéquation avec la littérature concernant la dépendance fréquentielle de la vitesse électroosmotique [101], [102].

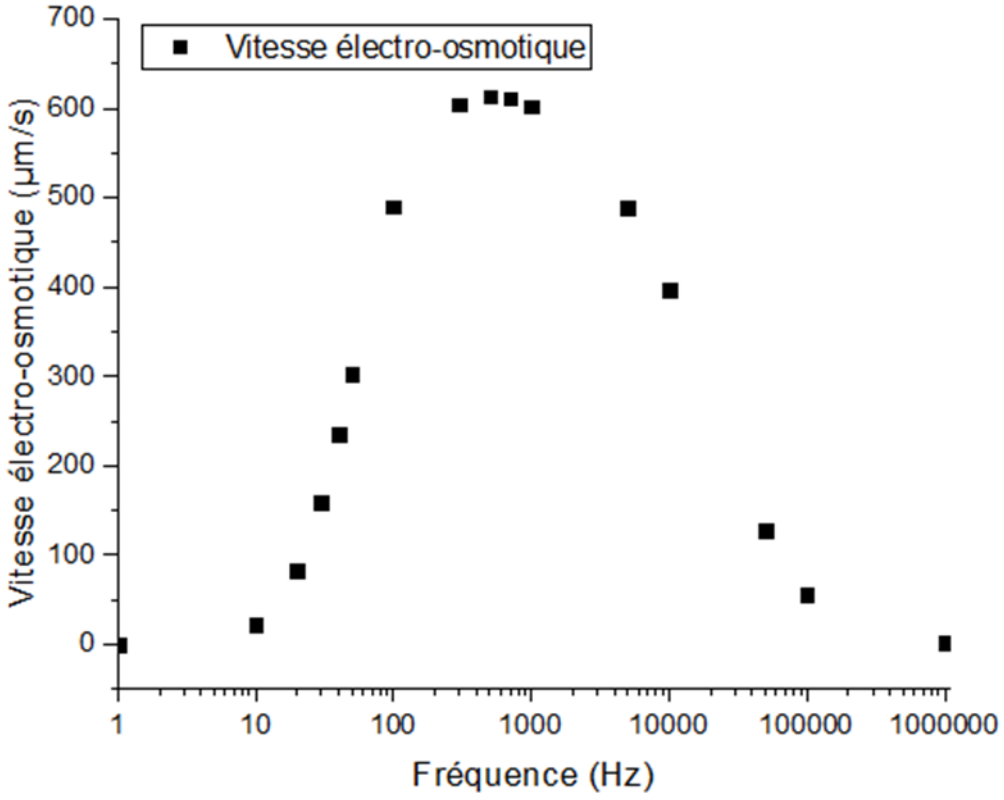


Figure 3-7 : Vitesse électro-osmotique au-dessus des électrodes pour différentes fréquences

3. Résultats de simulation du flux électro-osmotique dans le cas d'électrodes coplanaires et interdigitées

La Figure 3-8 représente la vitesse du fluide sur une électrode dans le cas d'électrodes face-à-face (haut) et interdigitées (bas). Des vortex se forment sur chaque bord de l'électrode. Les vecteurs vitesse sont dirigés de l'extérieur de l'électrode, vers l'intérieur de celle-ci. La vitesse du flux électroosmotique environ deux fois plus élevée dans le cas d'électrodes face-à-face que dans le cas d'électrodes interdigitées. Comme pour le paragraphe précédent, ces simulations suggèrent que, à potentiel équivalent, la

configuration face-à-face est plus efficace pour le piégeage de particules sur la surface des électrodes.

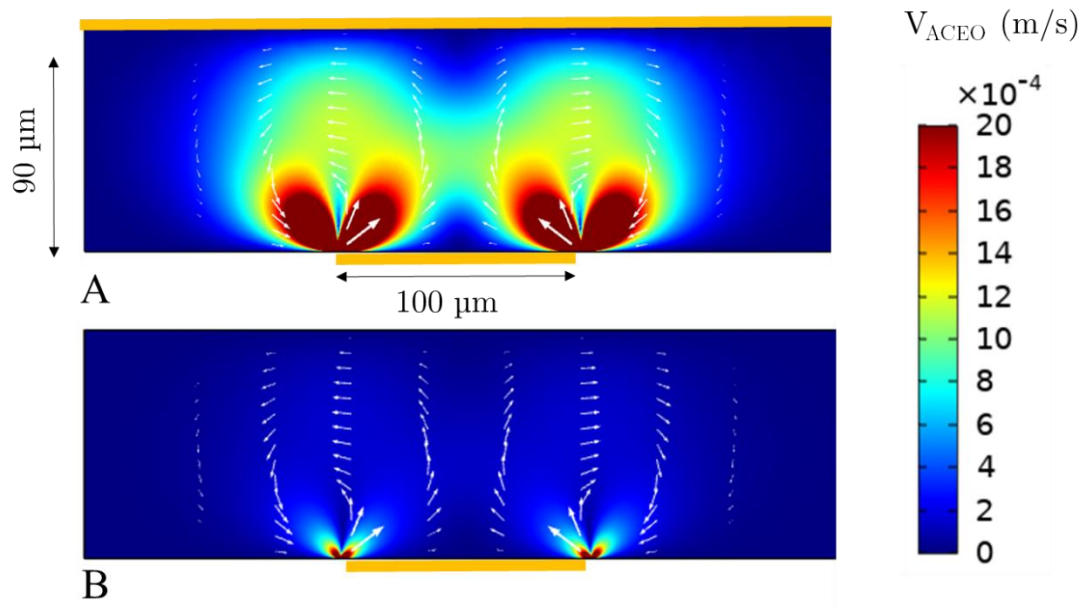


Figure 3-8 : Vitesse électroosmotique calculée dans le cas d'électrodes face a face (A) et interdigitées (B)

E. Bilan des forces

Les paragraphes précédents nous ont permis de déterminer la force diélectrophorétique qui s'exerce sur une particule, ainsi que la vitesse du flux électroosmotique dans la cellule fluidique. Or, la force totale exercée sur chaque particule est la somme de la force diélectrophorétique et de la force de traînée. La force totale qui s'exerce sur une particule s'exprime :

$$\boldsymbol{F}_{total} = \boldsymbol{F}_{DEP} + \boldsymbol{F}_{traînée} \qquad \textit{Équation 3-12}$$

La force de traînée est calculée à partie de la vitesse calculée pour le flux électroosmotique, en suivant la loi de Stokes pour une particule sphérique :

$$\boldsymbol{F}_{traînée} = -6\pi R_p \mu(\boldsymbol{v} - \boldsymbol{u}) \qquad \textit{Équation 3-13}$$

avec $\boldsymbol{v}$ la vitesse de la particule, et $\boldsymbol{u}$ la vitesse du fluide. Cette loi est valide uniquement dans le régime de Stokes, c'est-à-dire dans le cas d'un nombre de Reynolds très inférieur à 1. Le nombre de Reynolds s'exprime :

$$R_e = \frac{\rho U L_c}{\mu} \qquad \text{Équation 3-14}$$

Où L_c est la longueur caractéristique de système étudié. Dans notre cas, nombre de Reynolds est estimé à 0,1 ce qui valide le régime de Stokes. Le champ de forces qui s'exercent dans le canal est représenté en Figure 3-9. Comme le suggèrent les paragraphes précédents, la force exercée sur les particules en suspension dans le milieu est plus importante dans le cas d'électrodes face-à-face, donc le piégeage est plus efficace avec ce type d'électrodes. Dans ce chapitre, les simulations ne tiennent pas compte de l'interaction particule-particule. Or ces interactions jouent un rôle non négligeable en permettant l'agglomération des particules au centre des électrodes.

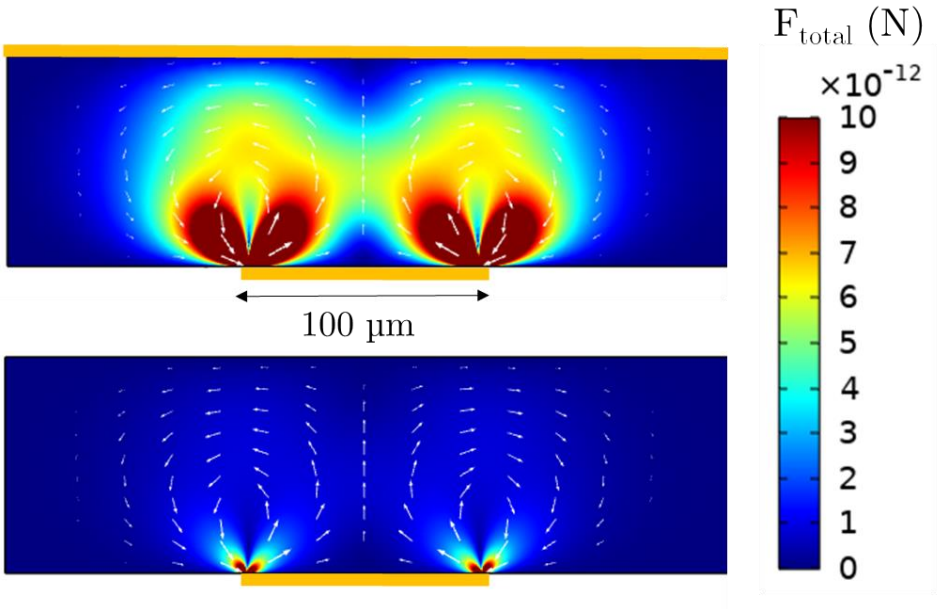


Figure 3-9 : Force totale exercée sur une bactérie pour des électrodes face-à-face (A) ou interdigitées (B)

De plus, le calcul du champ électrique ne tient pas compte de la présence de particules sur les électrodes. Une particule sur une électrode modifie localement son champ électrique, ce qui créé un gradient et donc de la diélectrophorèse. Ce phénomène participe donc à l'agglomération des particules.

F. Influence de l'espacement entre les électrodes : cas des électrodes face-à-face

Dans le cas d'électrodes interdigitées, l'espacement entre deux électrodes agit de 2 façons. La première est une diminution du gradient du champ électrique au voisinage des électrodes, si le potentiel appliqué aux électrodes reste inchangé. Le deuxième effet est le chevauchement de volumes de capture, qui diminue le nombre de particules piégées sur une électrode. Dans ce paragraphe, nous nous intéressons au cas d'électrodes face-à-face : l'espacement inter-électrodes n'affecte pas le champ électrique au voisinage des électrodes.

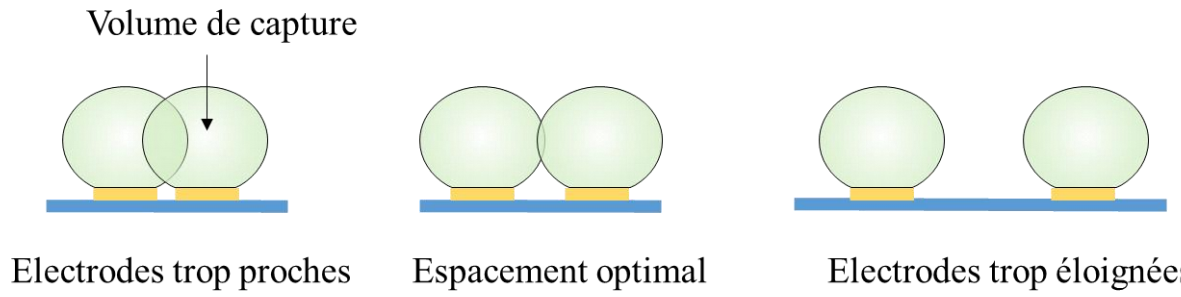


Figure 3-10 : Influence de l'espacement entre les électrodes sur le piégeage de particules. Les électrodes sont représentées en jaune et le volume de capture de chaque électrode est représenté en vert.

Le volume de capture d'une électrode peut être défini comme le volume dans lequel une particule sera piégée pour un temps donné. Le logiciel COMSOL permet de simuler grâce au module *particle tracing* la trajectoire de particules relâchées dans la chambre fluidique et ainsi visualiser l'effet de la force de diélectrophorèse et de la force de traînée induite par le flux électroosmotique. Cela nous permet de compter le nombre de particules qui entrent en contact avec une électrode, et qui seront donc détectées. Le suivi de particules est réalisé sur une étude temporelle de 60 secondes, avec un pas de 0,01 secondes. Les particules sont relâchées à l'instant t = 0 avec un espacement de 5 µm. La largeur des électrodes utilisées est de 100 µm et la hauteur de la cuve fluidique est de 90 µm. Ces paramètres ont été choisis pour être au plus près des conditions expérimentales utilisées dans les Chapitres 4 et 5. La Figure 3-11 décrit la position de particules à différents instants, dans le cas particulier d'un espacement inter-électrodes de 50 µm pour des électrodes face-à-face. Les électrodes servant au piégeage de particules puis à leur détection sont représentées en jaune.

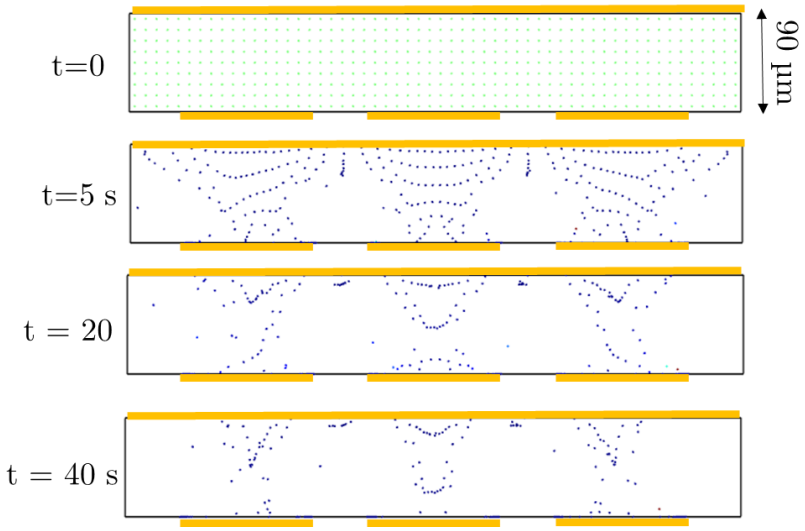


Figure 3-11 : Postition des particules à différents instants, dans le cas particuier d'électrodes espacées de 50 µm.

Ici, le potentiel électrique est choisi pour correspondre à une configuration face-à-face : les trois électrodes du bas sont au même potentiel, et un potentiel opposé est appliqué

sur le haut de la cuve fluidique. Dans le logiciel COMSOL, un compteur de particules permet de quantifier le nombre de particules piégées sur les électrodes. Pour des raisons de symétrie, seul le nombre de particules piégées sur l'électrode centrale est pris en compte. Le nombre de particules piégées en 60 secondes a été calculé pour plusieurs espacements inter-électrodes, allant de 50 µm à 300 µm. Le nombre de particules piégées sur cette électrode en fonction du temps est représenté en Figure 3-12A. Plus l'espacement inter-électrodes est grand, plus le nombre de particules piégées est important. Cela signifie que l'on se trouve dans le premier cas de la Figure 3-10. Les volumes de capture des électrodes se chevauchent, les particules situées dans l'intersection de ces volumes sont piégées soit par une électrode, soit par une autre, ce qui réduit la densité finale de particules sur une électrode. Le nombre de particules piégées pour un espacements inter-électrodes supérieur à 200 µm sont très proches. Cela signifie qu'on se rapproche du 2ème cas de la Figure 3-10. Si on augmente encore cet espacement, le nombre de particules piégées reste stable, mais les particules situées hors de la zone de capture ne seront pas piégées (3ème cas de la Figure 3-10). Sur la Figure 3-12B, cette limite du nombre de particules piégées est manifestée par un plateau atteint entre 250 et 450 µm pour la dimension de l'espacement inter-électrodes.

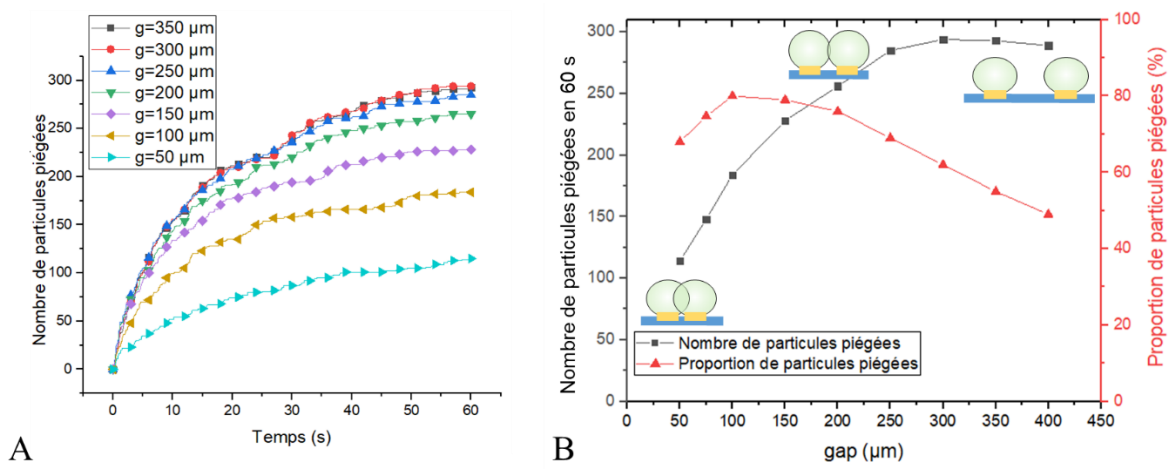


Figure 3-12A : Nombre de particules piégées sur l'électrode centrale pour différents espacements inter-électrodes en fonction du temps. B : Nombre et pourcentage de particules piégées sur l'électrode centrale en une minute, en fonction de l'espacement inter-électrodes.

Si on considère la proportion de particules piégées par rapport au nombre de particules présentes au début de la simulation (en rouge sur la Figure 3-12B), on observe un optimum de l'espacement inter-électrodes, qui se situe entre 100 et 150 µm.

G. Etude de la hauteur du canal : cas des électrodes face-à-face à champ électrique équivalent

Dans ce paragraphe, nous étudierons l'influence de la hauteur du canal microfluidique sur la capacité de piégeage d'une électrode en configuration face-à-face. Dans cette étude, la hauteur du canal microfluidique varie de 60 à 250 µm, et le champ électrique est constant. L'étude temporelle du nombre de particules capturées par une électrode (Figure 3-13A) montre que ce nombre augmente quand la hauteur du canal microfluidique augmente (jusqu'à atteindre un plateau lorsque toute les particules présentes dans le volume de capture d'une électrode ont été piégées) . Cela correspond à davantage de particules disponibles dans le volume de capture de l'électrode. Cependant, cette augmentation n'est plus effective pour une hauteur de canal supérieure à 200 µm, ce qui donne un ordre de grandeur de la hauteur du volume de capture.

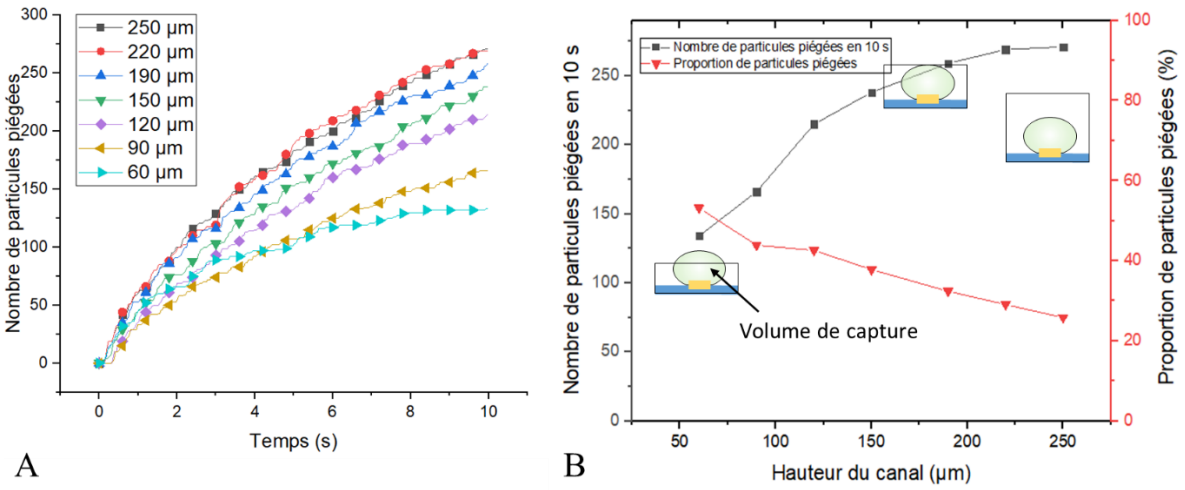


Figure 3-13A : Nombre de particules piégées sur l'électrode centrale pour différentes hauteurs du canal en fonction du temps. B : Nombre et pourcentage de particules piégées sur l'électrode centrale en 10 secondes, en fonction de la hauteur du canal.

Si on s'intéresse au pourcentage de particules piégées par rapport aux particules relâchées dans le canal fluidique (Figure 3-13B, courbe rouge) on observe que celui-ci décroit lorsque la hauteur du canal augmente. A champ électrique équivalent, augmenter la hauteur du canal augmente le signal SPR mesuré sur des électrodes, mais augmente également la part de particules présentes dans le canal fluidique mais non piégées.

Pour aller au-delà du plateau atteint lorsque toute les particules présentes dans le volume de capture d'une électrode ont été piégées, on peut envisager d'imposer un flux entrant dans la cellule fluidique renouveler en espèces-cibles la solution. C'est l'objet de l'étude conduite dans le paragraphe suivant.

H. Influence d'un flux sur le piégeage de particules dans le cas d'électrodes face-à-face

Pour une meilleur compréhension et représentation des forces exercées par la diélectrophorèse et le flux électroosmotique, les simulations précédentes sont réalisées sans flux. Le flux peut avoir deux conséquences. La première conséquence concerne le bilan des forces exercées sur une bactérie. Lors du calcul de la force de traînée, la vitesse utilisée dans l'Équation 3-13 doit tenir compte de la vitesse du flux électro-osmotique mais aussi du flux qui s'applique dans le canal microfluidique. Selon la vitesse du flux imposée et l'intensité de la force diélectrophorétique, les particules en suspension dans le canal peuvent être soit piégées sur les électrodes, soit être seulement déviées puis entrainées vers la sortie de la chambre fluidique

La deuxième conséquence, plus souhaitable lors de la détection d'espèces cibles en faible concentration, est le renouvellement du milieu contenant les bactéries. En effet, le paragraphe précédent montre que le nombre de particules piégées atteint un plateau

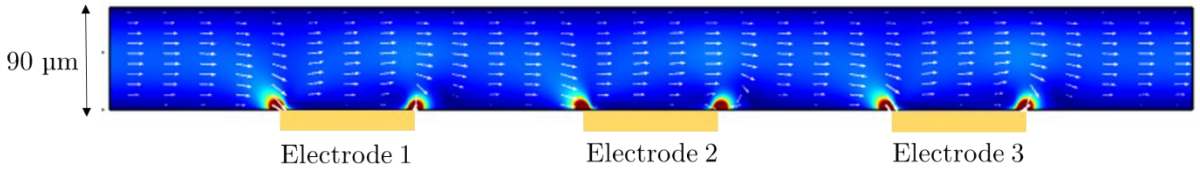


Figure 3-14 : Système modélisé dans ce paragraphe, composé de 3 électrodes de largeur 100 µm en configuration face-à-face

au bout d'un certain temps. Ce plateau est atteint lorsque toutes les particules présentes dans le volume de capture ont été piégées. Un léger flux permettrait de renouveler la solution contenant les particules cibles, et ainsi augmenter le nombre de particules susceptibles d'être piégées. À l'inverse, un flux trop important créerait une force de trainée dirigée vers la sortie du canal et supérieure à la force de diélectrophorèse et à la force induite par le flux électroosmotique. Pour quantifier ces effets, nous avons réalisé des simulations similaires au paragraphe précédent, mais en ajoutant un flux circulant de la gauche vers la droite à différentes vitesses. Pour cela, les conditions aux limites à l'entrée et à la sortie du canal ont été modifiées. En entrée, une vitesse de flux u est imposée. En sortie, la condition de non-glissement est remplacée par une condition de sortie ouverte (condition de pression nulle). Les simulations ont été réalisées en deux dimensions, et dans le calcul de l'écoulement, la profondeur du canal est considérée comme très grande par rapport à sa hauteur. Dû au grand nombre de trajectoires de particules simulées, les calculs présents dans ce paragraphe ont été réalisés sur le cluster de calcul NEWTON. Trois électrodes, représentées en Figure 3-14, sont reliées au même potentiel, en opposition de phase avec une contre-électrode plane sur le haut du canal.

La Figure 3-15A illustre la déformation des vortex par un flux circulant de la gauche vers la droite sur une électrode. Les images présentées sur cette figure sont un agrandissement centré sur l'électrode 2 de la figure précédente. Différentes vitesses moyennes *u* du fluide à l'entrée du canal sont imposées. Lorsque cette vitesse augmente, la capacité du flux électroosmotique à faire dévier de sa trajectoire un objet situé dans le volume de fluide diminue (Figure 3-15B). Dès 50 µm/s, une particule circulant dans le milieu du canal n'est que peu déviée vers les électrodes.

Pour évaluer la capacité de piégeage d'électrodes lorsqu'un flux est imposé en entrée du canal, une simulation de trajectoire de particules est effectuée pour différentes vitesses moyennes d'entrée *u* allant de 10 à 1210 µm/s. Pour les différentes vitesses moyennes d'entrée imposées, une étude temporelle permet de suivre la trajectoire de particules injectées dans le canal au cours du temps. Le nombre de particules piégées en fonction du temps sur l'électrodes 2 est représenté en Figure 3-16A.

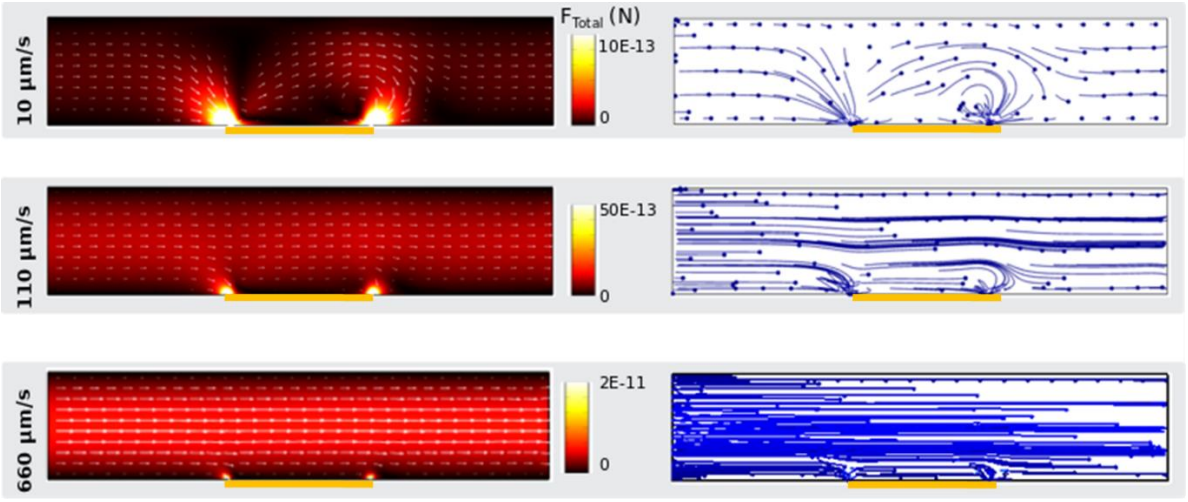


Figure 3-15: Force exercée sur une particule et position des particules pour différentes vitesses moyennes du flux entrant.

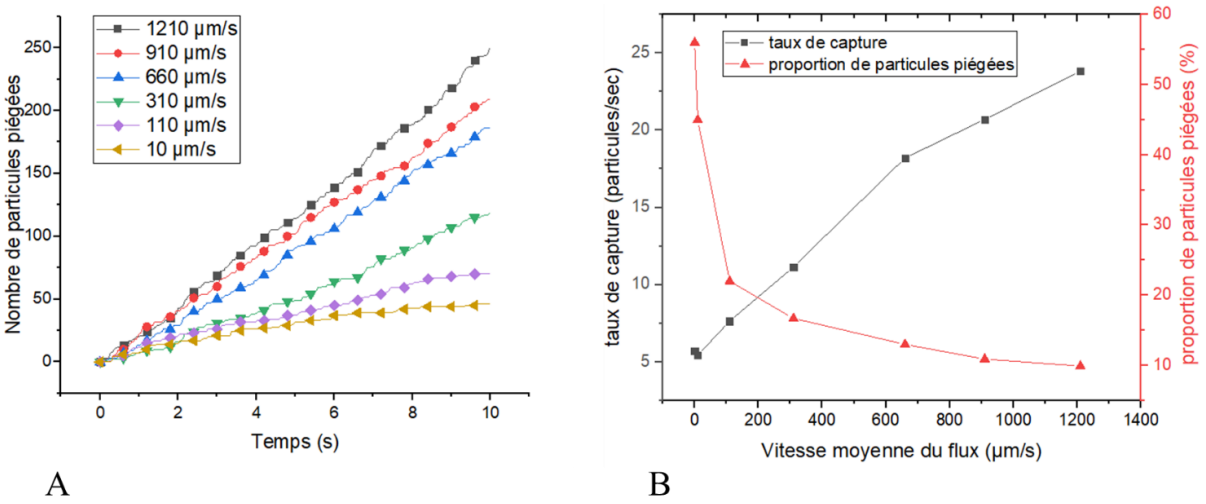


Figure 3-16A : Nombre de particules piégées sur l'électrode centrale pour différentes vitesses moyennes d'entrée du fluide. B : Taux de capture et proportion de particules piégées sur l'électrode centrale en 10 secondes, en fonction de la hauteur du canal.

Sur cette figure, on observe une progression linéaire du nombre de particules piégées. La Figure 3-16B représente le nombre de particules piégées par unité de temps sur les trois électrodes (en noir), ainsi que la proportion de particules piégées parmi les particules relâchées au cours de la simulation (en rouge). Cette proportion de particules piégées décroit fortement lorsqu'un flux est appliqué dans le canal. Ces résultats suggèrent de choisir le flux entrant selon la nature de l'échantillon étudié. Si l'on dispose d'une petite quantité d'échantillon, il est préférable d'utiliser un flux faible. Si la quantité d'échantillon disponible n'est pas critique, un flux entrant permet de renouveler en particules le volume de capture au-dessus des électrodes, et donc d'augmenter le signal SPR mesurable.

Les conditions utilisées lors de cette simulation imposent une adhésion parfaite des particules lorsqu'elles touchent une électrode. En réalité, lorsqu'une cible interagit avec une sonde déposée sur la surface d'une électrode, la cinétique de l'interaction sonde-cible est à prendre en compte. Les simulations présentées dans ce paragraphe montrent qu'augmenter la vitesse du flux entrant augmente toujours le nombre de particules piégées sur l'électrode. Ce résultat doit être nuancé par le fait que l'adhésion sonde-cible n'est pas immédiate, et une vitesse moyenne d'entrée trop élevée pourrait empêcher les bactéries d'adhérer à l'électrode, et donc d'être détectées.

I. Facteur de correction Λ

Les simulations réalisées dans ce chapitre permettent de comparer différentes configurations d'électrodes. Cependant, certains paramètres, en particulier le paramètre Λ présenté dans le paragraphe b) et qui intervient dans le calcul de la vitesse électroosmotique à la surface des électrodes est difficile à déterminer. Pour des milieux

très peu conducteurs comme l'eau DI, ce paramètre est proche de 1. Or, en réalité, de nombreux facteurs peuvent également réduire sa valeur, comme l'état d'oxydation, la présence d'objets cibles sur les électrodes par exemple, ou la conductivité du milieu. Dans la littérature, la valeur choisie pour ce paramètre est fréquemment 1. Cependant, certains auteurs essaient d'affiner leurs simulations choisissant un paramètre Λ le plus proche possible des conditions réelles. Pour cela les vitesses électroosmotiques calculées sont comparées à des valeurs mesurées expérimentalement, et ce facteur, aussi appelé facteur de correction, est ajusté pour que la vitesse simulée corresponde à la vitesse réelle. Dans la littérature, les valeurs typiques de ce facteur de correction Λ sont situées entre 0,01 et 0,5. Ces expériences sont décrites dans le Chapitre 4.D.

J. Conclusion

Pour pouvoir implanter avec efficacité le transport de masse par diélectrophorèse et électro-osmose sur un biocapteur, bien comprendre les spécificités de chaque phénomène de transport de masse est essentiel. Dans cette partie, nous avons simulé les effets de diélectrophorèse et d'électroosmose qui affectent la trajectoire d'une particule de type bactérie à l'intérieur d'une cellule fluidique de 90 µm de hauteur. En particulier, nous avons comparé deux configurations d'électrodes différentes. La première configuration, dite interdigitée, correspond à des électrodes avec un potentiel en opposition de phase dans le même plan, en bas d'un canal fluidique. La deuxième configuration testée, dite face-à-face, est caractérisée par des électrodes dans le bas du canal reliées au même potentiel. Une contre-électrode plane avec un potentiel opposé est située en haut du canal, et le fluide circule entre les électrodes et la contre-électrode. Les modélisations réalisées dans ce chapitre reposent sur la résolution d'équations par la méthode des éléments finis. Les équations électriques et fluidiques ont été résolues grâce au logiciel COMSOL. Dans un premier temps, nous avons évalué le champ électrique créé par une paire d'électrodes dans une configuration coplanaire et une configuration face-à-face. Le calcul du champ électrique nous a ensuite permis d'évaluer l'intensité de la force de diélectrophorèse positive s'exerçant sur des bactéries. Pour évaluer le facteur de Clausius-Mossotti nécessaire au calcul de la force de diélectrophorèse, nous avons choisis des paramètres électriques de bactéries de type *e.coli* mesurés expérimentalement et disponibles dans la littérature. Dans un deuxième temps, nous avons cherché à évaluer l'intensité du flux électro-osmotique. La vitesse de glissement de la couche diffuse sur les électrodes a été calculée numériquement en fonction de la chute de potentiel dans cette couche diffuse et du potentiel appliqué aux électrodes. Ensuite, la résolution de l'équation de Navier-Stokes permet de déduire la vitesse du fluide dans le reste du canal fluidique. Dans un premier temps, les simulations sont réalisées en statique, c'est à dire que le flux entrant dans le canal est nul. Dans ces conditions, nous avons déterminé la force de diélectrophorèse et la force de trainée qui s'exerce sur une bactérie en tout point de la cellule fluidique, et comparé la configuration d'électrodes face-à-face et la configuration coplanaire. La configuration d'électrodes

face-à-face se révèle plus avantageuse pour le piégeage de particules que la configuration interdigitée. L'écart entre électrodes est un paramètre géométrique clef pour maximiser la densité de particules piégées sur une électrode. En effet, si celles-ci sont trop rapprochées, les volumes de capture de chaque électrode se chevauchent, limitant la densité de particules piégées sur ces électrodes. Grâce au module *particle tracing* de COMSOL, nous avons déterminé que l'espacement inter-électrodes (dans le cas d'électrodes face-à-face de 100 µm de largeur et une hauteur de canal de 90 µm) optimal est de l'ordre de 250 µm.

Dans un second temps, nous avons étudié l'influence d'un flux entrant sur le nombre de particules piégées. Un flux entrant permet de renouveler en particules la solution, et donc d'augmenter le nombre de particules piégées par électrodes. Cependant, si le flux est trop fort, la force de diélectrophorèse et la force induite par le flux électro-osmotique ne sont plus suffisantes pour contrer le flux qui entraîne les particules vers la sortie du canal, et l'efficacité du piégeage diminue fortement. Dans le chapitre suivant, nous allons déterminer le facteur de correction Λ en corrélant aux résultats de simulation des vitesses de particules fluorescentes mesurées expérimentalement, puis démontrer l'efficacité du transport de masse dans le cas d'électrodes face-à-face appliqué à la détection d'objets biologiques.

Chapitre 4. Étude expérimentale de la géométrie du capteur

Dans la partie précédente, nous avons étudié numériquement l'influence de la géométrie du capteur. Pour un même potentiel appliqué aux électrodes, la configuration face-à-face permet de créer un gradient de champ électrique plus important, et donc de piéger un plus grand nombre de particules. Dans ce chapitre, nous allons étudier expérimentalement l'efficacité du piégeage de différents types d'électrodes pour des microbilles de polymère. L'étude se fera dans un premier temps par microscopie optique grâce à des billes fluorescentes, puis par SPR. Ensuite, nous démontrerons la faisabilité du piégeage sur des objets biologiques tels que des cellules eucaryotes ou des bactéries.

A. Présentation des géométries d'électrodes étudiées

Dans ce chapitre, trois configurations d'électrodes seront utilisées. La première est la configuration interdigitée, représentée en Figure 4-1A et largement décrite dans la littérature. La deuxième est la configuration face-à-face, étudiée numériquement au chapitre précédent et présentée en Figure 4-1B

Cette configuration est composée de deux parties. La première partie est un réseau

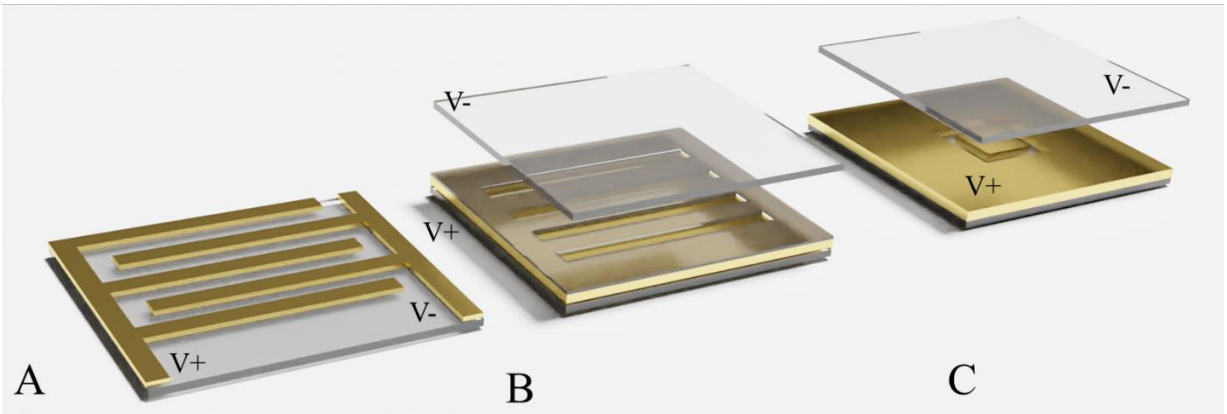


Figure 4-1 : Configurations d'électrodes étudiées dans ce chapitre. A : configuration interdigitée. B : Configuration face-à-face, pour la diélectrophorèse positive et l'électroosmose. C : Configuration face-a-face, pour la diélectrophorèse négative.

d'électrodes d'or rectangulaires, sur lesquelles seront piégées les microbilles ou bactéries par électro-osmose assistée par diélectrophorèse positive. La deuxième partie est une contre-électrode plane faite de verre recouvert d'ITO[2]. Ces deux parties sont espacées par une feuille de Mylar ou de parafilm d'épaisseur 90 µm dans laquelle une ouverture d'environ un centimètre de côté forme une cellule fluidique. Les électrodes d'or peuvent être formées de deux manières. La première est celle décrite en Figure

[2] Indium Tin Oxide (Oxyde d'indium-étain). Les lames de verre recouvertes d'ITO sont achetées chez Sigma (résistivité surfacique 8-12 Ω/□)

4-1B : un film de silice isolant est déposé sur la couche d'or, puis des ouvertures sont créées dans ce film pour former des électrodes. La seconde approche consiste à réutiliser les électrodes interdigitées en connectant les deux peignes au même potentiel, puis à placer une contre-électrode de la même manière qu'en Figure 4-1B. C'est cette approche qui sera privilégiée dans le chapitre suivant, car elle nécessite une étape de fabrication de moins, qui est le dépôt de silice sur l'or. Enfin, la Figure 4-1C représente une configuration d'électrodes face-à-face, mais adaptée comme nous le verrons au piégeage d'objets par diélectrophorèse négative. Le film d'or de l'électrode inférieure est gravé pour former des ilots carrés, sur lesquels les objets seront piégés par diélectrophorèse négative et détectés par SPR.

B. Protocole de fabrication

La dimension minimale des électrodes est dictée par le grossissement du système d'imagerie SPR. En effet, si les électrodes sont trop étroites, la résolution de l'image ne sera pas assez importante pour pouvoir mesurer le signal moyen sur cette électrode. Dans les expériences présentées dans ce chapitre, les électrodes ont une largeur de l'ordre de 100 µm. Structurer un film d'or à des dimensions de 100 µm ne présente pas de réelles difficultés techniques : les salles blanches disposent d'outils pour fabriquer des objets de taille inférieure au micromètre. Dans ce paragraphe, les étapes de fabrication seront brièvement décrites. Le détail des protocoles de nettoyage des substrats et de photolithographie sont disponibles en annexe.

Les substrats de verre (Fisher Scientific) sont préalablement nettoyés par une solution Piranha (H_2O_2/H_2SO_4 2 :1) pendant 10 min, puis rincés à l'eau DI. Ces substrats sont ensuite métallisés par évaporation, cette opération étant réalisée en salle blanche au sein de la plateforme Nanolyon de l'INL. Une couche d'accroche de chrome de 3 nm est d'abord déposée, suivie d'une couche d'or de 48 nm. La couche de chrome est indispensable, car sans elle, l'or n'adhèrerait pas sur le substrat. L'épaisseur de la couche de chrome est suffisamment faible pour qu'elle absorbe de façon négligeable l'onde plasmonique.

La deuxième étape est la structuration de cette couche métallique pour former des électrodes. Les électrodes sont obtenues par gravure chimique, après une étape de photolithographie. Les étapes de ce procédé sont résumées en Figure 4-2 et détaillées en Annexe 3. Une résine photosensible (AZ5414) est étalée par *spin-coating* sur l'échantillon, puis subit un recuit. Ensuite, cette résine est exposée aux UV à travers un masque. Les masques utilisés sont réalisés en acétate par impression haute résolution, suivant un procédé peu coûteux. Cela permet de tester rapidement un grand nombre de types d'électrodes. Finalement, l'échantillon est trempé dans un développeur.

La gravure des couches métalliques est faite dans un bain de *Gold Etchant* dans un premier temps, puis dans un bain de *Chrome Etchant* pendant quelques secondes. La résine est dissoute par immersion dans un bain d'acétone, suivie d'un rinçage à l'eau DI. Pour éliminer les derniers résidus de résine, une dernière étape de nettoyage au plasma O_2 est effectuée.

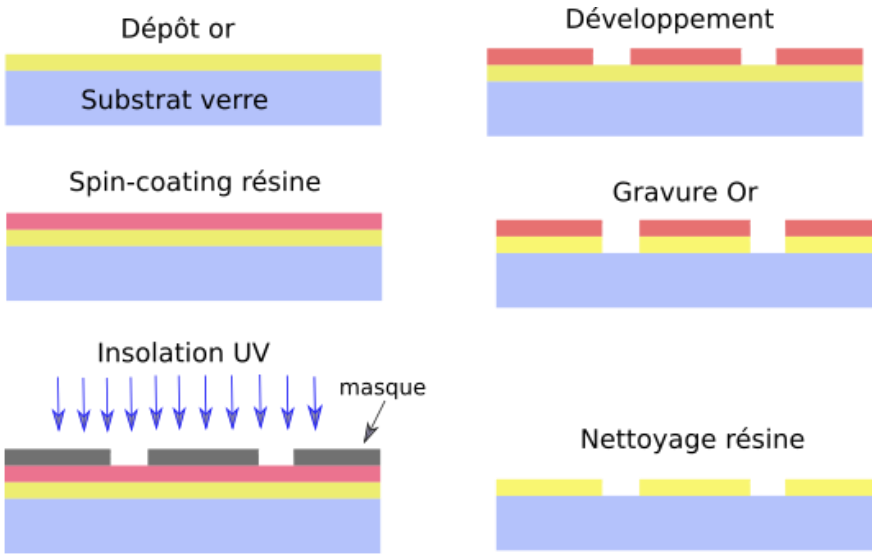


Figure 4-2 Protocole de fabrication des électrodes par photolithographie puis par gravure humide.

C. Piégeage de billes par diélectrophorèse et électroosmose : observation en microscopie

L'observation en microscopie par fluorescence permet de visualiser la position de billes sur des électrodes sous l'effet d'un champ électrique. Une électrode d'un peigne interdigité est représentée sur la Figure 4-4. Des billes fluorescentes (Fluorosphere, Polyscience) de diamètre 1,8 µm sont en suspension dans de l'eau déionisée. La Figure 4-3 représente le facteur de CM en fonction de la fréquence pour ce type de billes dans de l'eau DI. Jusqu'à une fréquence d'environ 1 MHz, le facteur de CM est positif, donc la diélectrophorèse est positive. C'est aussi le cas des bactéries dont les paramètres électriques ont servi de modèle dans le chapitre précédent.

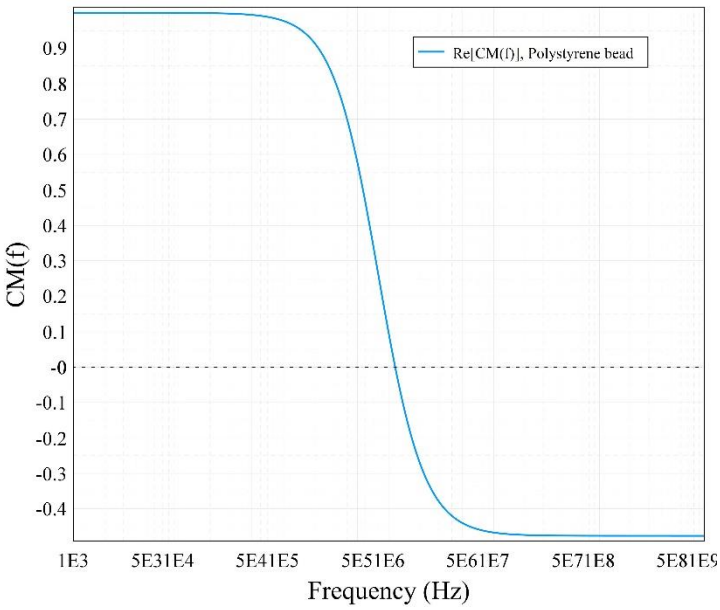


Figure 4-3 : Calcul du facteur de CM pour des billes de polystyrène de 1,8 µm de diamètre dans de l'eau DI

Sur la Figure 4-4, chaque image correspond à une fréquence donnée. Pour des fréquences inférieures ou égales à 1 kHz, les billes sont centrées sur l'électrode. Cela signifie que la force de trainée due à l'électroosmose est prédominante par rapport à la force de diélectrophorèse, conformément aux résultats obtenus par simulations au chapitre 2. À 5kHz, une partie des billes est attirée vers le bord de l'électrode, par diélectrophorèse positive. À 50 kHz, seule la force de diélectrophorèse positive intervient, la quasi-totalité des billes sont piégées vers le bord de l'électrode. Les deux images restantes (100 et 500 kHz) montrent que la fréquence de transition est dépassée, car il n'y a plus de diélectrophorèse positive.

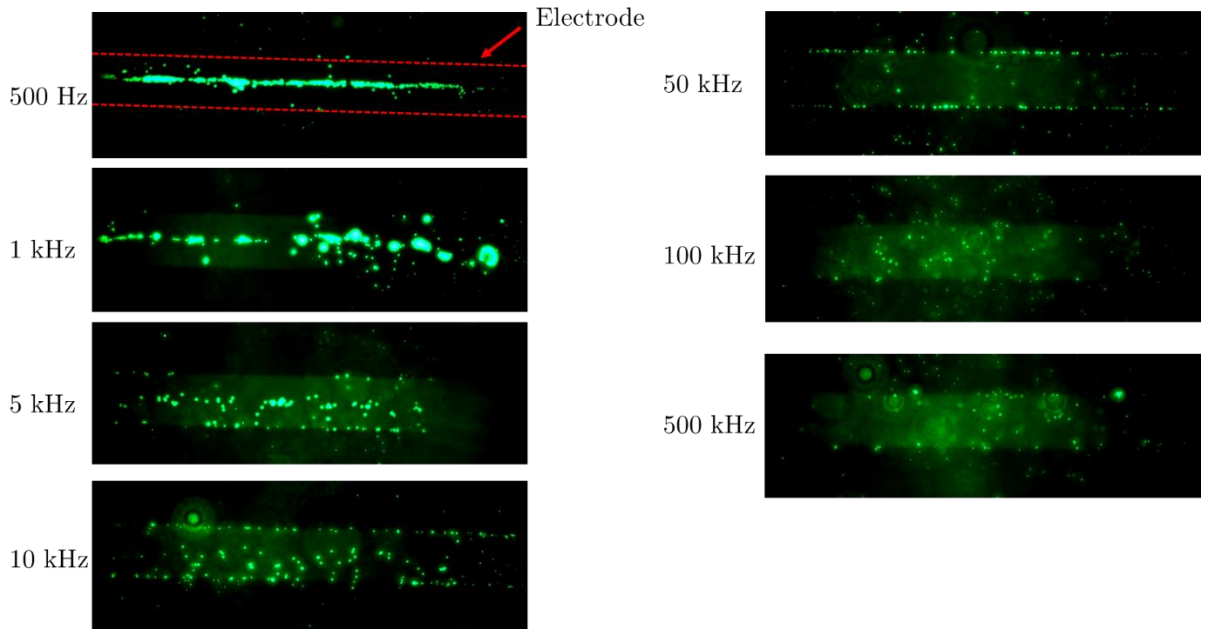


Figure 4-4 : Observation au microscope par fluorescence de la position de microbilles fluorescentes en suspension dans de l'eau DI sur une électrode pour différentes fréquences, et une tension de 10 V_{pp}. La configuration utilisée est la configuration interdigitée

Cette expérience permet de vérifier une partie de nos résultats de simulations obtenus au Chapitre 3, en particulier le comportement fréquentiel de la vitesse électroosmotique et de la force de diélectrophorèse. Pour compléter le modèle numérique développé dans le chapitre précédent, il nous manque le facteur de correction Λ qui intervient dans la vitesse tangentielle du fluide à la surface des électrodes. Ce paramètre Λ mesure la part de la capacitance de la couche diffuse dans la capacitance de la double couche ionique. Il dépend de la conductivité du milieu, mais aussi d'autres facteurs plus difficiles à déterminer, comme l'état de surface de l'électrode (oxydation, rugosité…). Une estimation expérimentale de ce facteur est donc nécessaire. C'est l'objet du paragraphe suivant, qui est consacré à la mesure de ce facteur de correction dans le cas particulier d'électrodes face-à-face.

D. Observation du flux électroosmotique : comparaison des résultats numériques et expérimentaux

1. Observation de côté de vortex dus à l'électro - osmose (configuration électrodes face à face)

Les observations en microscopie permettent d'avoir une vue de dessus du comportement de billes sous l'effet de la diélectrophorèse et de l'électro-osmose, dans un volume dont l'épaisseur est limitée à la profondeur de champ de l'objectif de microscope. Cependant, une vue de côté permettrait d'observer le comportement des espèces dans toute la hauteur du canal micro-fluidique, et ainsi permettre de comparer nos simulations avec des données expérimentales. Obtenir une image de côté de qualité

suffisante pour suivre des particules d'un micron en suspension dans un canal d'une hauteur d'une centaine de micromètres n'est pas simple. L'équipe de Green [103] a fait les premières images de vortex électroosmotiques grâce à l'ajout dans le fluide de nano-billes fluorescentes. Dans leur article, un objectif de microscope est placé horizontalement pour imager un plan d'observation vertical. Ce dispositif est représenté en Figure 4-5A. Peu de détails sont donnés sur la réalisation technique de ce système d'imagerie. Une image en pose longue permet de voir la trajectoire des billes fluorescentes sur deux électrodes coplanaires, et donc de visualiser les lignes de courant du fluide. Cependant, la résolution spatiale du système d'imagerie et la résolution temporelle de la caméra utilisée ne permettent pas de visualiser la trajectoire de billes de façon individuelle, et ainsi de remonter au champ de vitesse en tout point de la cellule fluidique.

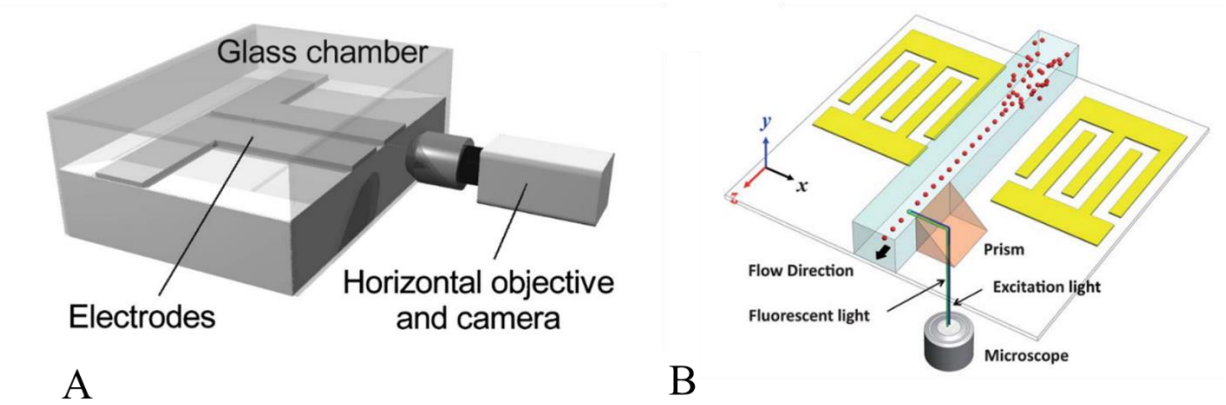


Figure 4-5 : Deux systèmes permettant une observation de côté d'une cellule fluidique. A repose sur l'observation directe grâce à un objectif de microscope [103]. B propose d'utiliser un prisme [67] pour imager le côté d'un canal fluidique.

L'équipe de Shi et al. [67] a réussi à imager le côté d'un canal microfluidique par l'intermédiaire d'un prisme (Figure 4-5B). Ce système d'imagerie a permis d'imager la position de micro-billes fluorescentes dans toute la hauteur d'un canal en PDMS. Une autre solution possible serait d'utiliser un miroir incliné à 45 degrés pour visualiser le côté du canal [135].

Dans un premier temps, nous nous sommes orientés vers l'imagerie de la cellule fluidique par un prisme. Cependant, cette méthode a été compliquée à mettre en place (il faut que les parois du micro-canal en PDMS soient parfaitement lisses), et les réflexions internes causées par les sauts d'indice air/PDMS/eau n'ont pas donné une qualité d'image satisfaisante. Nous avons alors changé de stratégie, en optant pour l'inclinaison à 90 ° des électrodes par rapport au plan d'observation d'un microscope optique. Pour obtenir une vue de côté de la cellule fluidique, un substrat de verre comportant des électrodes d'or gravées à sa surface a été collé verticalement sur une lame de microscope. Deux rectangles de scotch double face placés de part et d'autre des électrodes définissent l'espacement entre les électrodes d'or d'un côté, et une contre-

électrode plane d'un autre côté. La solution de billes est injectée par le haut de la cellule fluidique grâce à une micro-pipette. Le montage, schématisé en Figure 4-6A, est ensuite observé grâce à un microscope inversé à épifluorescence.

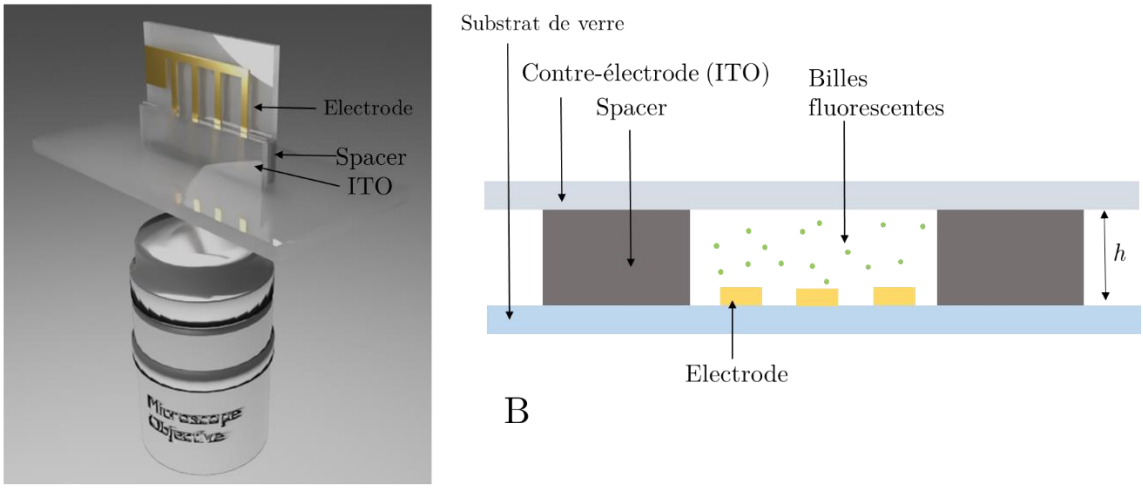


Figure 4-6 : Schéma de l'observation de côté de vortex d'électroosmose : la lame de verre sur laquelle sont gravées les électrodes est dosposée verticalement par rapport au plan d'observation d'un microscope inversé. B : Schéma de ce qui est observé à travers l'objectif de microscope.

L'acquisition des images se fait grâce à une caméra Photron Fastcam. La fréquence d'acquisition est de 50 images par secondes. La caméra utilisée permet d'enregistrer jusqu'à 100 000 images/secondes, selon la résolution choisie et les conditions de luminosité. Mais nous avons observé un « clignotement » de la fluorescence pour un taux d'acquisition supérieur à 50 images par seconde. La stabilité de l'alimentation de la source lumineuse utilisée pour l'excitation de la fluorescence est en cause. Cependant, un taux d'acquisition de 50 images par seconde permet de suivre avec une précision suffisante la trajectoire des particules, même sur le bord des électrodes, là où la vitesse de fluide est la plus rapide. La Figure 4-6B représente une vue schématique de ce qui est observé par la caméra. Cette vue permet d'observer sur toute la hauteur h de la cellule fluidique les mouvements de particules sous l'effet de la diélectrophorèse et de l'électroosmose.

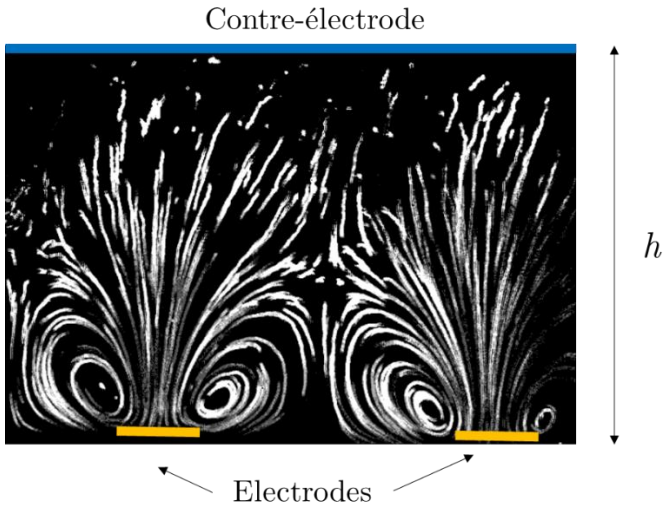


Figure 4-7 : Image de vortex dus au flux électro-osmotique sur des électrodes en configuration face-à-face obtenue par superposition d'images de particules fluorescentes sur un temps de 5 secondes. Ici, la largeur des électrodes est de 100 µm, et la hauteur h de la cellule fluidique est de 500 µm.

2. Reconstruction du champ de vitesse par PIV (Particle Image Velocimetry) et estimation du facteur de correction Λ

Dans le paragraphe précédent, nous avons montré l'observation de vortex induits par flux électroosmotique dans le cas d'électrodes face-à-face. La superposition d'images permet de visualiser la trajectoire de particules. Cependant, une telle image ne permet pas de se rendre compte du sens du vecteur vitesse, ni de sa norme. Pour déterminer la vitesse d'une particule, il est possible de la calculer à partir des coordonnées d'une particule sur deux images successives d'un film. Cependant, cette technique nécessite de pointer manuellement une particule, et donne la vitesse en un point précis seulement. Pour calculer la vitesse des particules en tout point, la technique de PIV peut s'avérer utile. Elle consiste à utiliser des particules en suspension dans un fluide comme traceurs pour en visualiser le champ de vitesse. La PIV a déjà été utilisée pour visualiser la concentration de particules, mais pour des électrodes coplanaires vues de dessus [78], [136] deux images sont nécessaires, à deux instants différents. L'inter-corrélation entre deux subdivisions de l'image à deux instants différents permet de déterminer le déplacement d'une particule et d'en déduire sa vitesse. Le logiciel de traitement d'image ImageJ dispose d'un module de PIV [137]. Ce module nous permet de retrouver le champ de vitesse à partir de deux images consécutives d'un film. La Figure 4-8A montre par une superposition d'images la trajectoire de microbilles fluorescentes.

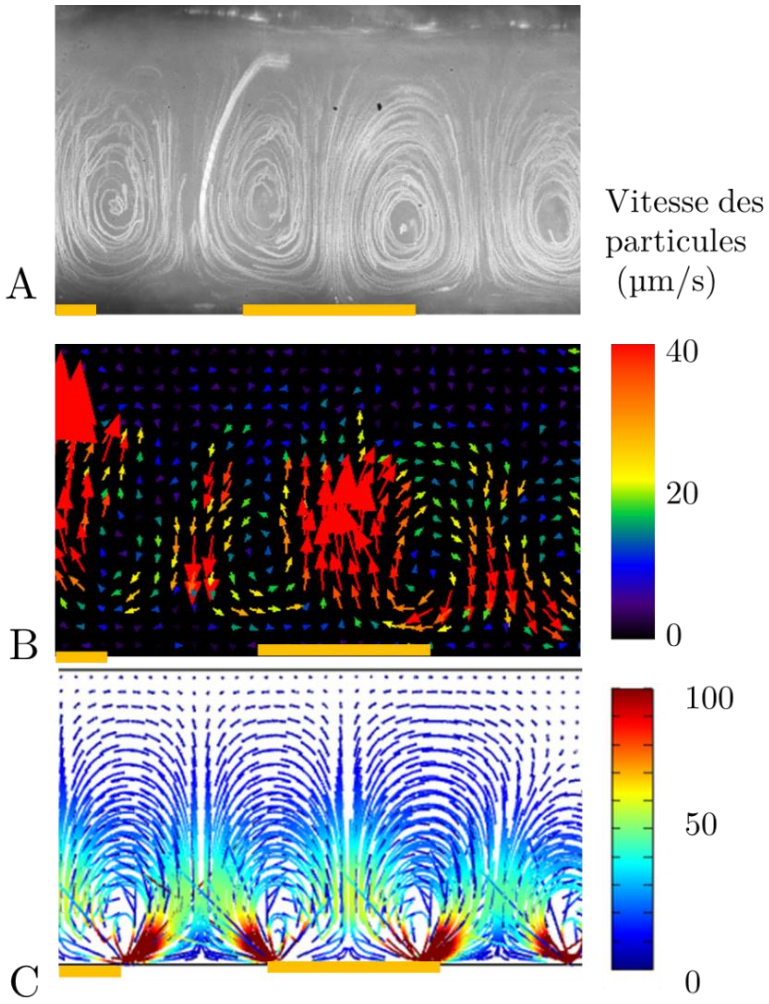


Figure 4-8 : A : Superposition d'images de billes fluorescentes montrant le flux électroosmotique. B : Même zone que sur la sous-figure A, après application du script PIV de ImageJ. C : trajectoire et vitesse des particules selon la simulation COMSOL après application du facteur de correction. (largeur des électrodes : 100 µm, hauteur du canal : 200 µm)

L'image du dessous (Figure 4-8B) montre la même zone après application du script de PIV d'ImageJ pour deux images avec un intervalle temporel de 1/50 secondes. Les flèches représentent le vecteur vitesse des particules. Sur cette image, le sens de déplacement des billes correspond bien à ce qui est attendu : il y a un vortex sur chaque côté de l'électrode, et les billes se déplacent du bord vers le centre de l'électrode. Au centre de l'image en Figure 4-8B, la vitesse mesurée est de 40 µm/s. En comparant cette vitesse avec une simulation COMSOL sur un système équivalent, on obtient un facteur de correction $\Lambda = 0{,}22$. Ce facteur est du même ordre de grandeur que celui mesuré par Green et al. [102], qui est de 0,25. Dans le modèle COMSOL présenté dans le chapitre précédent, le facteur de correction est appliqué à la vitesse de glissement sur les électrodes. La trajectoire et la vitesse des particules obtenues sont représentées en Figure 4-8C. On remarque que la vitesse sur le bord des électrodes obtenue par simulation numérique est plus importante que celle obtenue expérimentalement. Les électrodes ne sont parfaitement verticales dans le montage représenté en Figure 4-6A,

ce qui bloque une partie de la lumière nécessaire à la fluorescence des micro-billes. Il est donc difficile d'obtenir des images des billes au plus près des électrodes.

E. Mesure du signal SPR

Le but de ce paragraphe est de préciser la méthode de mesure du signal SPR sur les électrodes. Dans ce manuscrit, le signal mesuré est une variation de réflectivité, parfois appelé moins précisément « Signal SPR ». Pour mesurer ce signal, il est nécessaire de s'approcher des conditions de résonance de mode plasmonique de surface. Pour cela, l'intensité lumineuse réfléchie par le film métallique est mesurée pour la polarisation TE et TM, pour différents angles d'incidence. Un exemple de ce type de mesure est donné en Figure 4-9. On rappelle que seule une onde incidente en polarisation TM est capable d'exciter un mode plasmonique de surface. La polarisation TE n'est pas affectée par des effets plasmoniques : la réflectivité est donc calculée en divisant l'image TM par l'image TE.

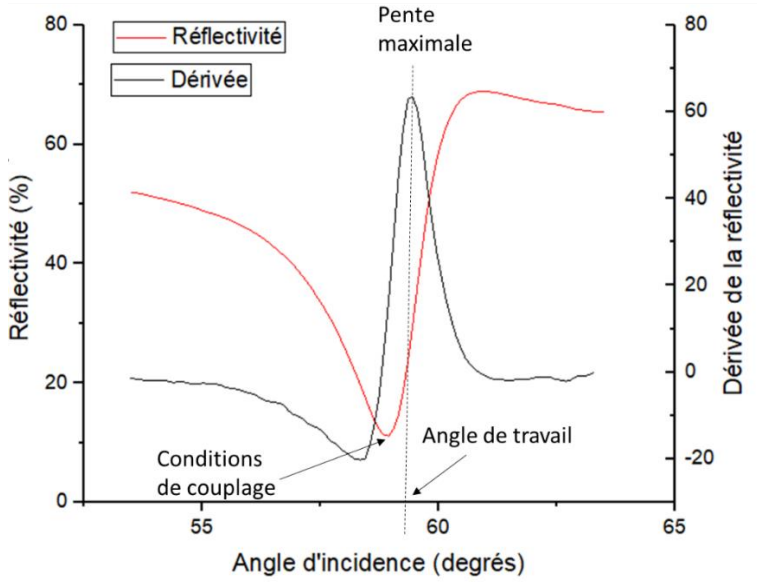


Figure 4-9 : Réflectivité (en rouge) mesurée sur la puce SPR en fonction de l'angle d'incidence de la lumière, et dérivée de la réflectivité (en noir)

Le minimum d'intensité réfléchie correspond aux conditions de couplage. Afin de garantir la meilleure sensibilité possible, l'angle de travail est choisi de sorte que la variation de réflectivité soit maximale pour une variation des conditions de couplage (au maximum de la dérivée).

Une fois l'angle de travail choisi, les images TM sont enregistrées à intervalles réguliers. La variation de réflectivité ΔR à l'instant t est calculée à partir de la valeur moyenne des pixels sur une région d'intérêt (ROI) de l'image TM à l'instant t, et des images TM et TE à l'instant t_0 :

$$\Delta R(t) = \frac{TM(t) - TM(t=0)}{TE(t)} \qquad \textit{Équation 4-1}$$

En pratique, on suppose que l'intensité de la source lumineuse est constante au cours du temps, et donc que l'intensité lumineuse de l'image TE est aussi constante au cours du temps, c'est à dire que *TE(t=0) = TE(t).* Cela permet d'utiliser seulement une image TE enregistrée en début de mesure, et ainsi limiter la quantité d'images enregistrées.

La variation de réflectivité en Figure 4-9 est calculée à chaque instant de l'acquisition avec le logiciel ImageJ, qui permet de faire les opérations (soustraction et division) sur les images. Pour chaque expérience, le signal est mesuré pendant quelques minutes avec le milieu utilisé (eau, PBS…) le temps de former une ligne de base. L'injection dans la cellule fluidique d'un milieu contenant des objets cibles (micro-billes, bactéries, adn…) entraîne alors une augmentation du signal ΔR, ce qui permet leur détection.

Parfois, dans la littérature, le signal SPR est exprimé en variation d'indice de réfraction Δn. Pour convertir le signal ΔR en $\Delta n_{équivalent}$, une solution d'indice connu est injectée. L'intensité du saut d'indice permet ensuite d'exprimer le signal SPR en $\Delta n_{équivalent}$ par une relation de proportionnalité.

F. Présentation des dispositifs d'imagerie SPR utilisés dans ce manuscrit

Dans cette thèse en co-tutelle, plusieurs bancs optiques pour les mesures SPR ont été utilisés dans différents laboratoires, répertoriés dans le Tableau 3 à la page suivante. Tous les bancs optiques utilisés utilisent la configuration de Kretschmann pour exciter un mode plasmonique.

En France, les expérimentations ont été conduites sur un banc à prisme du Laboratoire Charles Fabry (Institut d'Optique Graduate School, Palaiseau). Ce banc est désigné comme le « banc SPR 1 » dans le Tableau 3. La longueur d'onde du faisceau incident peut être ajustée grâce à un monochromateur. L'angle d'incidence du faisceau ainsi que l'angle du bras de la caméra sont choisis grâce à des moteurs. Le système fluidique est composé d'un dégazeur en amont d'une pompe péristaltique. La cellule fluidique est composée d'une feuille de Mylar d'épaisseur 90 µm avec une ouverture circulaire de 10 mm de diamètre, avec d'un côté la puce SPR, et d'un autre côté une pièce de titane par laquelle entre et sort le fluide. Par rapport aux bancs optiques décrits dans ce paragraphe, celui-ci a la particularité d'être monté verticalement : la puce et le prisme sont verticaux, et le fluide circule de bas en haut. Cette configuration limite l'adhésion non spécifique d'espèces biologiques due à la sédimentation. De plus, une valve d'injection de 500 µL permet d'injecter sans bulle le produit à analyser, tout en conservant le débit constant. L'acquisition des données peut se faire grâce au logiciel fourni par le constructeur. Mais il est possible d'enregistrer l'image TM de la puce SPR pour ensuite traiter les images avec un autre logiciel, de manière personnalisée.

À l'Université de Sherbrooke, deux bancs SPR différents ont été utilisés. Ces deux bancs sont installés dans le laboratoire du Pr. Michel Grandbois, au sein de l'IPS (au CHUS Fleurimont). Le premier est un banc développé au sein du LN2, noté « banc SPR 2 » dans

le Tableau 3. Il n'inclut pas de système fluidique permettant d'injecter avec un débit contrôlé différentes solutions. Cependant, le système d'imagerie fait d'objectifs de microscope interchangeables permet d'atteindre des grossissements qu'il ne serait pas possible d'obtenir avec les autres bancs optiques présentés ici. De plus, ce banc sera utilisé lors du piégeage et de la détection par SPR de cellules eucaryotes, présenté dans les paragraphes suivants. Le deuxième banc optique présent à l'IPS est un banc modèle « SPRI PLEX » commercialisé par l'entreprise HORIBA et en partie développé à l'Institut d'Optique (Palaiseau). Ce banc intègre un système fluidique qui permet d'injecter un liquide dans la cellule fluidique au débit voulu. Récemment (Juin 2020), l'INL a acquis un modèle équivalent très semblable au niveau optique, avec une différence dans le système de pompage au niveau fluidique. Cependant, cet appareil ne dispose pas de module de contrôle de température. Les expériences combinant effets électrocinétiques et détection SPR effectuées avec ce banc optique commercial n'ont été effectuées qu'avec des électrodes coplanaires interdigitées. Le système fluidique présent sur l'appareil ne permet pas d'installer une contre-électrode plane en haut de la cellule fluidique. Sans modification de la pièce mécanique constituant le haut de cette cellule fluidique (en ajoutant un matériau conducteur par exemple), la connexion électrique d'une contre-électrode et donc les expériences en configuration face-à-face sont impossibles.

Tableau 3 : Caractéristiques des différents bancs d'imagerie SPR utilisés dans ce manuscrit.

	Banc SPR 1 (Institut d'optique, Palaiseau	Banc SPR 2 (IPS, Sherbrooke)	Banc HORIBA SPRiPLEX (IPS, Sherbrooke) 	Banc HORIBA OpenPLEX (INL, Lyon) 
Système fluidique	Pompe péristaltique (Minipuls 3, Gilson), Dégazeur (Degasi Classic, Biotech), boucle d'injection (Cheminert) Cellule fluidique formée par une feuille de Mylar découpée	Pas de système fluidique	Pousse-seringue Cellule fluidique formée par un joint pressé sur la puce	Pompe péristaltique (Minipuls 3, Gilson) Dégazeur (Degasi Classic, Biotech) Cellule fluidique formée par un joint pressé sur la puce
Source lumineuse	Lumière blanche + monochromateur (400-800 nm)	Diode laser fibrée, 740 nm	Diode laser (longueur d'onde non fournie par le constructeur)	Diode laser (longueur d'onde non fournie par le conctructeur)
Contrôle des conditions de couplage du plasmon	Moteurs pour contrôler l'angle d'incidence Monochromateur pour contrôler λ	Moteurs pour contrôler l'angle d'incidence	Miroirs pour contrôler l'angle d'incidence	Miroirs pour contrôler l'angle d'incidence
Interface de commande	Logiciel LabVIEW	Logiciel LabVIEW, bientôt remplacé par une interface en Python	Logiciel fourni par HORIBA, fait à partir de LabVIEW	Logiciel fourni par HORIBA, fait à partir de LabVIEW
Stabilisation thermique	Peltier Pièce avec contrôle de température	Pas de contrôle de température	Peltier (précision du contrôle non fournie par le constructeur)	Pas de contrôle de température
Sensibilité	0,01% de réflectivité	0,05 % de réflectivité	0,05 % de réflectivité	0,05 % de réflectivité (donnée fournie par le constructeur)
Configuration d'électrodes compatibles	Face-à-face et interdigitée	Face-à-face et interdigitée	Interdigitée	Interdigitée

G. Piégeage et détection par SPR de cellules eucaryotes par diélectrophorèse négative

1. Montage expérimental

Les résultats précédents montrent l'efficacité du système pour piéger par diélectrophorèse et électroosmose des microbilles de polymère. Dans ce paragraphe, nous montrerons la possibilité de piéger des cellules eucaryotes dans des zones précises du film métallique, pour ensuite les détecter par mesure SPR. Les cellules choisies proviennent de la lignée HEK293 et sont cultivées selon le protocole détaillé en Annexe 4. Il s'agit d'une lignée de cellules adhérentes dont le protocole de culture, peu contraignant, est bien maitrisé au laboratoire Ampère et à l'Université de Sherbrooke. Nous les avons donc choisies comme objet d'étude pour cette expérience. Pour la détection de cellules eucaryotes, leur taille importante fait qu'elles sont préférentiellement attirées vers le bord des électrodes par diélectrophorèse positive. Cela rend leur détection par SPR difficile à cause des aberrations optiques qu'il peut y avoir au bord des électrodes. Pour cette raison, la diélectrophorèse négative se révèle plus avantageuse. De plus, les cellules eucaryotes sont sensibles aux champs électriques et leur membrane peut être endommagée de façon irréversible si elles sont exposées à des intensités de champ électrique trop importantes. Lorsqu'une cellule est soumise à la diélectrophorèse négative elle se dirige vers les zones de faible champ électrique. L'endommagement de cellules est donc moins probable si la fréquence du champ électrique choisie favorise la diélectrophorèse négative.

Les expériences concernant les cellules HEK293 ont été réalisées sur le banc SPR 2, présenté dans le paragraphe précédent. Ce banc ne comporte pas de système fluidique qui permette d'injecter des échantillons liquides. Pour pouvoir injecter une solution contenant des cellules, rincer sans bulles ni perturbation mécanique du banc optique, et garantir le contact électrique de chaque électrode, une carte électronique a été fabriquée spécialement. Sur cette carte schématisée en Figure 4-10A, des pointes de contact à ressort garantissent le contact électrique sur l'électrode du bas (en or) et sur l'électrode du haut (en verre avec un dépôt d'ITO). Ces électrodes sont ensuite reliées à la sortie d'un générateur. Une tension de 7 V_{pp} et 5 kHz est appliquée.

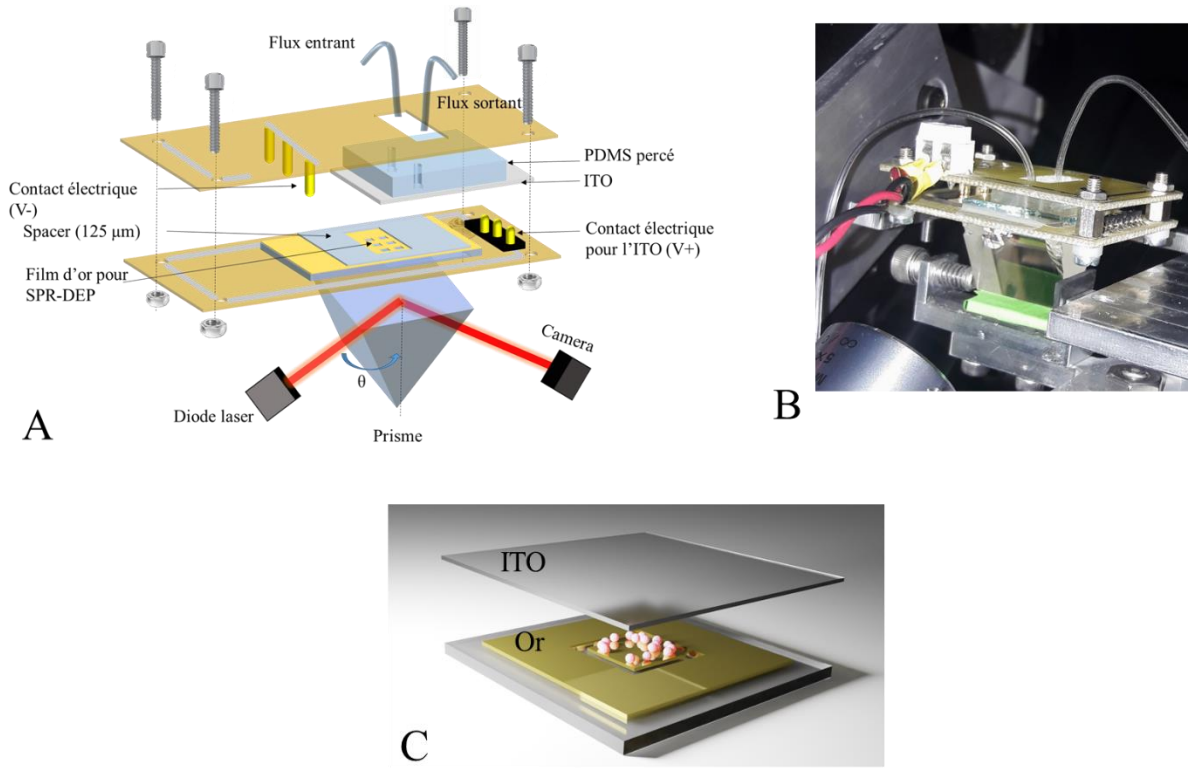


Figure 4-10 A : Schéma de la carte PCB qui encapsule de façon étanche la cellule fluidique, tout en permettant les contacts électriques pour des électrodes face-à-face. B : photo de la puce SPR-DEP sur le prisme, installée dans la carte PCB. C : schéma d'une électrode, sur laquelle les cellules sont piégées par diélectrophorèse négative.

2. Piégeage et détection de cellules HEK 293

Les électrodes pour la diélectrophorèse négative ont été utilisées dans la configuration face-à-face, présentée Figure 4-9C. La Figure 4-11A représente le facteur de CM pour des cellules HEK293 en suspension dans un milieu de conductivité de 0,04 S/m. La fréquence de transition est autour de 100 kHz : pour des fréquences inférieures à la fréquence de transition, la diélectrophorèse est négative. Chaque électrode est composée d'une ouverture carrée dans l'or. L'imagerie SPR nécessite que les objets à observer se situent sur un film métallique. C'est pourquoi un carré de métal est laissé apparent à l'intérieur de ces ouvertures. La norme du champ électrique pour cette configuration d'électrodes a été calculée Figure 4-11B. Selon ce calcul, le minimum de champ électrique est situé sur le carré d'or à l'intérieur dans ces ouvertures, dans lesquelles sont piégées les cellules. Dans nos simulations, une condition de potentiel flottant est imposée sur ce carré d'or qui n'est pas connecté.

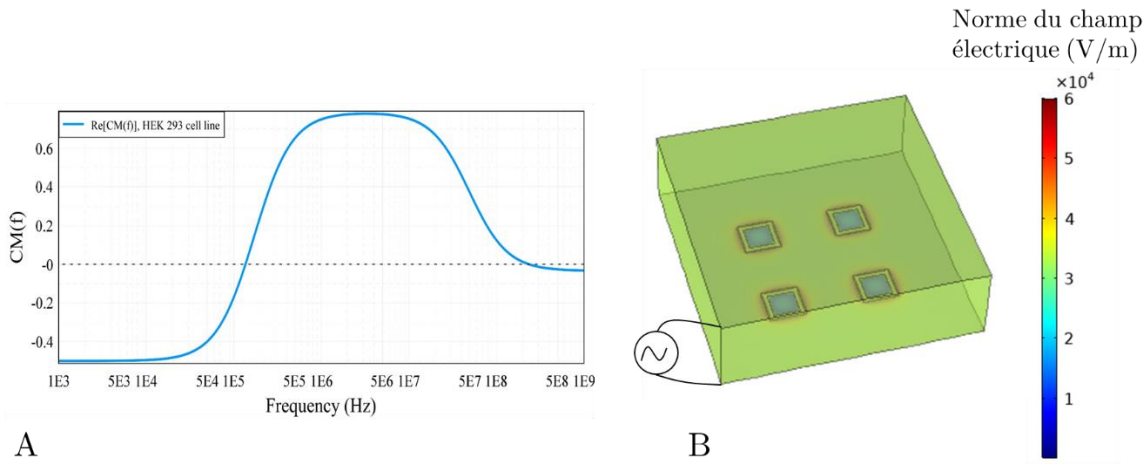


Figure 4-11A: partie réelle du facteur de CM pour des cellules HEK293 (r=7,5 µm, ε_{int} = 71, $\varepsilon_{membrane}$ = 6, épaisseur de la membrane = 6nm, σ_{int} = 0.53 S/m, $\sigma_{membrane}$ = 0 S/m) dans un milieu de conductivité 0.04 S/m. B : norme du champ électrique calculée avec COMSOL pour la géométrie d'électrodes étudiée dans cette partie.

La Figure 4-12 présente une vue au microscope (microscope inversé Zeiss Axiovert 200, avec caméra Axiocam MRM) de cellules piégées sur un réseau d'électrodes, dans la configuration d'électrodes décrite en Figure 4-10C. Sur cette image, toutes les cellules sont piégées dans les carrés, l'efficacité de piégeage est donc optimale. La diélectrophorèse négative parvient donc bien à piéger efficacement des cellules de type HEK293, sur une zone recouverte d'or, ce qui permettra leur détection par résonance de plasmon de surface.

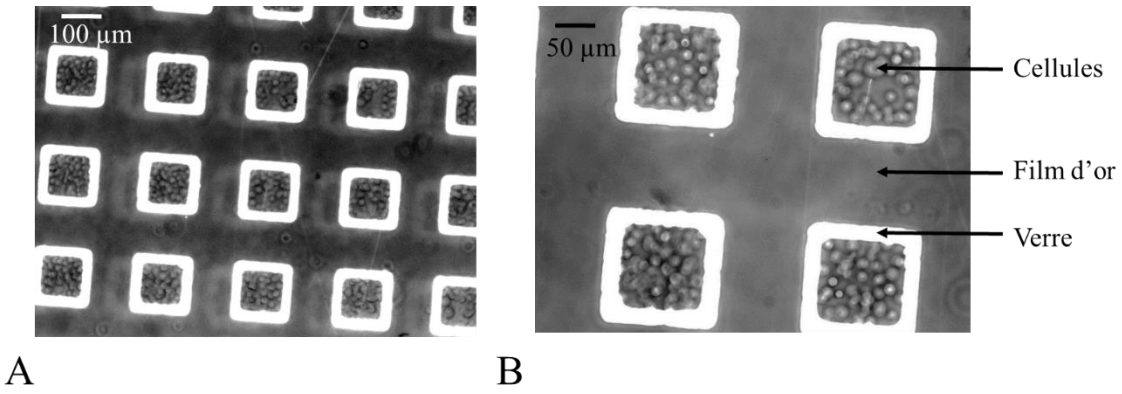


Figure 4-12 : Cellules piégées par diélectrophorèse négative pour deux grossissements de microscope

Après une période de stabilisation du signal, le milieu contenant les cellules est injecté grâce à une seringue dans la cellule fluidique formée par la lame de verre sur lesquelles les électrodes sont gravées, encapsulée dans la carte électronique présentée en Figure 4-10A. La variation de réflectivité est observée sur une région d'intérêt correspondant à une électrode, et une référence. La zone d'intérêt correspondant à l'électrode est le carré central sur lesquelles sont piégées les cellules, en rouge sur la Figure 4-13. Ce

signal est comparé avec une zone de référence en dehors des électrodes, où il n'y a pas d'effet de diélectrophorèse car le champ électrique est uniforme. Ce signal est représenté en noir sur la Figure 4-13. L'injection de milieu contenant les cellules provoque une variation de signal probablement due à un saut de pression, car l'injection se fait à la main avec une seringue, ce qui ne permet pas d'avoir un bon contrôle des paramètres microfluidiques (débit, pression). Ensuite, une tension de 5 kHz et 7 V_{pp} est appliquée entre le film métallique sur lesquelles sont gravées les électrodes, et une contre-électrode d'ITO. L'augmentation progressive du signal sur les électrodes puis sa stabilisation correspond à l'arrivée des cellules. Sur la partie servant de référence, le signal décroît légèrement. Cela peut correspondre au fait que des cellules initialement présentes sur la référence sont attirées vers les électrodes, entraînant une baisse du signal SPR. Lorsque la tension est coupée, le signal chute brusquement sur les électrodes. En effet, si la tension est coupée, les cellules se dispersent et ne restent pas centrées sur les électrodes. Cette expérience montre une claire augmentation du signal SPR grâce à l'application d'un champ électrique non uniforme, grâce à la diélectrophorèse négative. En effet, les cellules présentes dans le milieu ne sont pas détectées sur l'électrode de référence, contrairement à celles présentes sur les électrodes. Il est donc possible de piéger puis détecter des cellules de type HEK293 sur le même dispositif, sans les endommager. Les expériences précédentes visent à démontrer l'efficacité de la diélectrophorèse pour améliorer la limite de détection d'objets biologiques en suspension dans un milieu liquide. Elles ont été réalisées sans fonctionnaliser les électrodes d'or, ce qui ne permet pas de détecter sélectivement les objets piégés au-delà de la sélectivité obtenue grâce au choix d'un facteur de Clausius-Mossotti voulu. Une fonctionnalisation de surface serait nécessaire pour détecter sélectivement un type cellulaire, et ainsi détecter spécifiquement et sans marquage des cellules en milieu liquide. Ce type d'électrodes peut aussi être utile pour étudier par SPR la réponse cellulaire de cellules individuelles ou d'agrégats de cellules à des substances chimiques injectées dans la cellule fluidique, et évaluer l'efficacité de traitements [138].

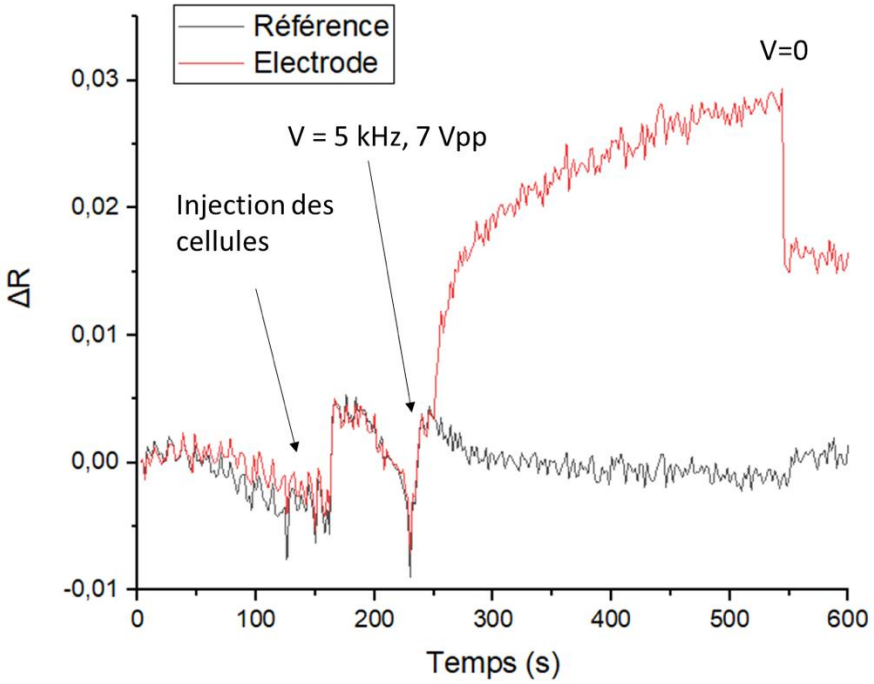


Figure 4-13 : Variation de réflectivité sur une électrode (en rouge) et sur une zone de référence (en noir).

H. Détection SPR de micro-billes piégées par électro-osmose

1. Réponse du capteur en fonction de la concentration

Les paragraphes précédents montrent que la diélectrophorèse négative est un outil efficace pour concentrer des bactéries sur des zones délimitées et faciliter leur détection par SPR. Or les simulations réalisées au chapitre précédent ainsi que les expériences avec des micro-billes fluorescentes dans le Chapitre 4.C montrent que pour des objets d'une taille de l'ordre du micromètre, l'électro-osmose en courant alternatif peut aussi contribuer à leur concentration sur des électrodes.

Hors saturation de la réponse d'un capteur à résonance de plasmon de surface, le signal mesuré est proportionnel à la densité d'objets en surface du film métallique, et donc à la concentration en analytes dans le milieu étudié. Dans ses travaux de thèse, Quentin Avenas a montré cette relation de proportionnalité pour le cas d'électrodes coplanaires. Il s'agit donc de vérifier si cette hypothèse est toujours valable dans le cas d'électrodes face-à-face. La Figure 4-14 montre le signal SPR mesuré sur une électrode après injection de billes de polystyrène de diamètre 1 µm (Polyscience) puis activation du transport de masse par diélectrophorèse et électroosmose sur des électrodes face-à-face.

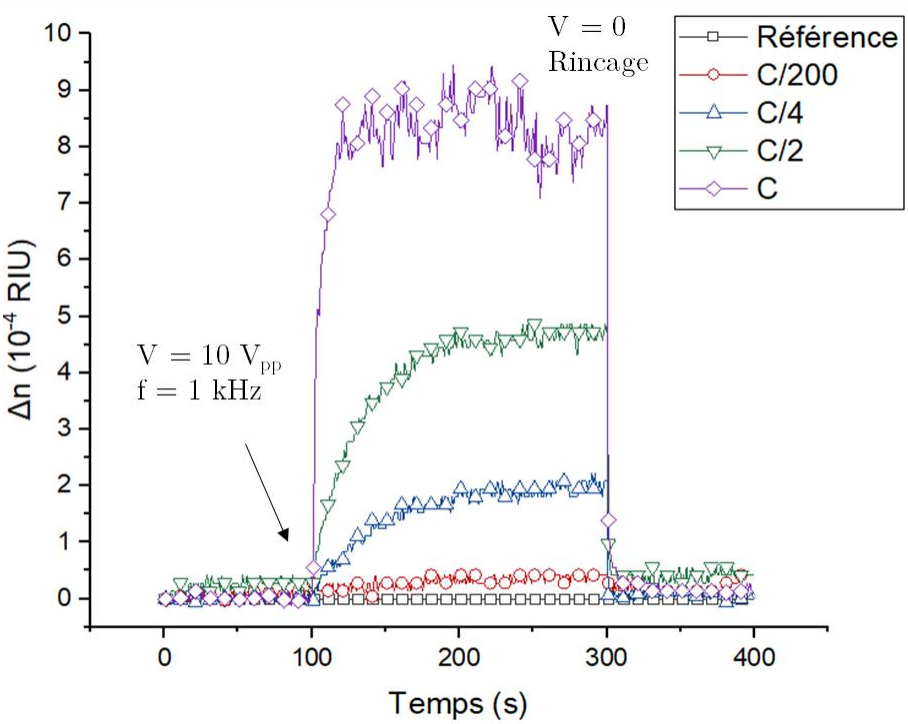


Figure 4-14 : Signal SPR mesuré sur une électrode dans la configuration race-à-face, pour différentes concentration de micro-billes de polystyrène dans de l'eau DI. Le signal de référence correspond au signal mesuré avec de l'eau seulement, et application d'un champ électrique. C = 9.10⁸ billes/mL

Cette expérience a été réalisée sur des électrodes face-à-face, dans le cadre des travaux de Master de Oleh Andreiev [139]. Elle a été menée sur le banc optique à prisme numéro 2, avec le système électrique et fluidique présenté en Figure 4-10. Une solution d'eau contenant des microbilles de diamètre 1 µm est préparée à une concentration C de 9.10^8 billes/mL, puis 3 dilutions sont faites, en divisant la concentration initiale par 2, 4, puis 200. La fréquence du champ électrique utilisé est de 1 kHz et la tension de 10 V_{pp}. La taille des électrodes est de 100 µm. Pour éviter les effets indésirables d'accroche non spécifique qui pourraient perturber les mesures, les solutions sont testées par ordre croissant de concentration. Pour évaluer les effets de la concentration en billes sur la réponse du capteur, nous avons ajusté les paramètres A et τ d'un modèle de cinétique d'accroche de type :

$$\Delta n(t) = A(1 - e^{-t/\tau}) \qquad \textit{Équation 4-2}$$

La modélisation des courbes obtenues en Figure 4-14 a été faite sur la partie où la tension est appliquée sur les électrodes. Les courbes modélisées obtenues pour chaque concentration sont représentées en Figure 4-15A.

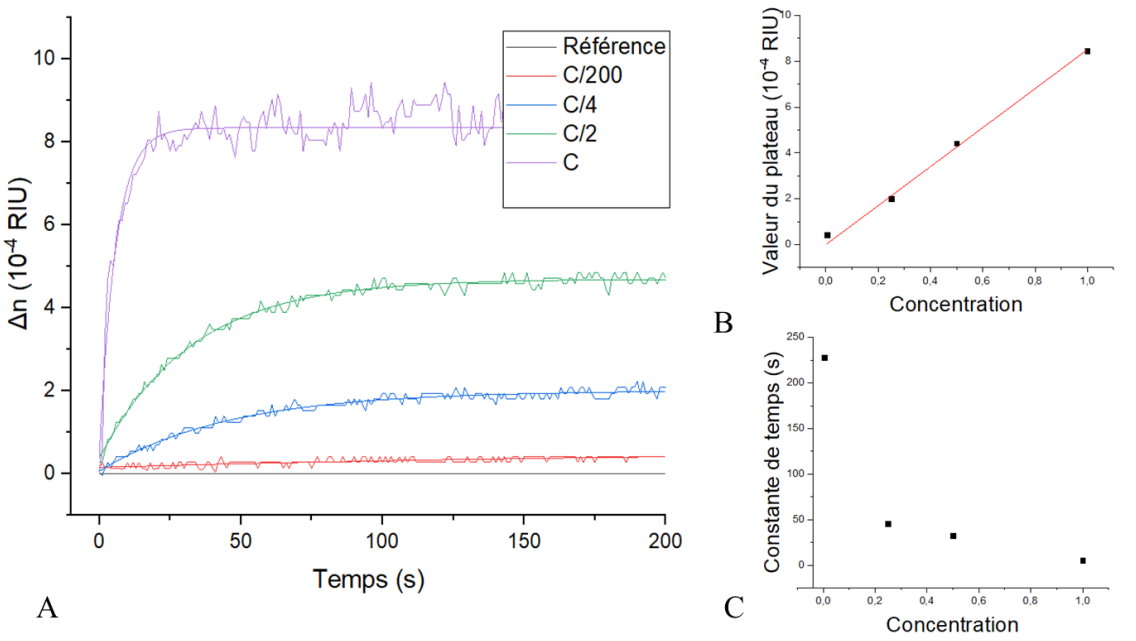


Figure 4-15A : Données et modèles de cinétiques du signal SPR mesuré sur une électrode pour différentes concentrations de billes lors de l'application d'un champ électrique. B : valeur du plateau atteinte dans la sous-figure A, pour les différentes concentrations testées. C : constante de temps du signal des courbes de la sous-figure A, pour les différentes concentrations testées.

Deux effets de la concentration en billes peuvent être observés. Le premier, attendu, est l'augmentation proportionnelle du signal SPR mesuré en fonction de la concentration en billes de la solution injectée dans la cellule fluidique. Pour chaque concentration, le signal augmente, jusqu'à atteindre un plateau qui correspond à la valeur A dans l'Équation 4-2. Les valeurs obtenues pour ces paramètres sont représentées en Figure 4-15B et suivent un régime linéaire. Le deuxième effet d'une augmentation de la concentration en analyte est une augmentation de la cinétique du régime transitoire : le plateau est d'autant plus vite atteint que la concentration est élevée. Ceci se traduit par une diminution de la constante de temps τ en fonction de la concentration, représentée en Figure 4-15C. Des mesures complémentaires seraient nécessaires pour confirmer la reproductibilité de ces expériences et obtenir des barres d'erreur sur les Figure 4-15B et Figure 4-15C, en particulier pour la concentration a plus faible (C/200).

2. Influence de l'espacement inter-électrodes

Dans le chapitre précédent consacré à la simulation numérique des effets électrocinétiques sur des particules, nous avons évoqué l'influence de l'espacement inter-électrodes sur le signal SPR mesuré lors de piégeage d'analytes. Dans ce paragraphe, la configuration d'électrodes face-à-face représentée en Figure 4-1B est choisie. Les électrodes, de largeur 100 µm, sont espacées de 100, 200 et 400 µm. Après injection d'une solution composée d'eau DI et de micro-billes de diamètre 3 µm, une

tension de 1,5 V_{pp} et de 1 kHz est appliquée entre les électrodes d'or et la contre-électrode d'ITO. Le signal SPR correspondant à chaque espacement inter-électrodes est représenté en Figure 4-16. Plus les électrodes sont espacées, plus la concentration en micro-billes atteinte à la surface de celles-ci est importante. Cela signifie que l'espacement inter-électrodes correspondant à la largeur du volume de capture n'a pas été atteint. Dans ce cas précis, il est donc supérieur à 400 µm.

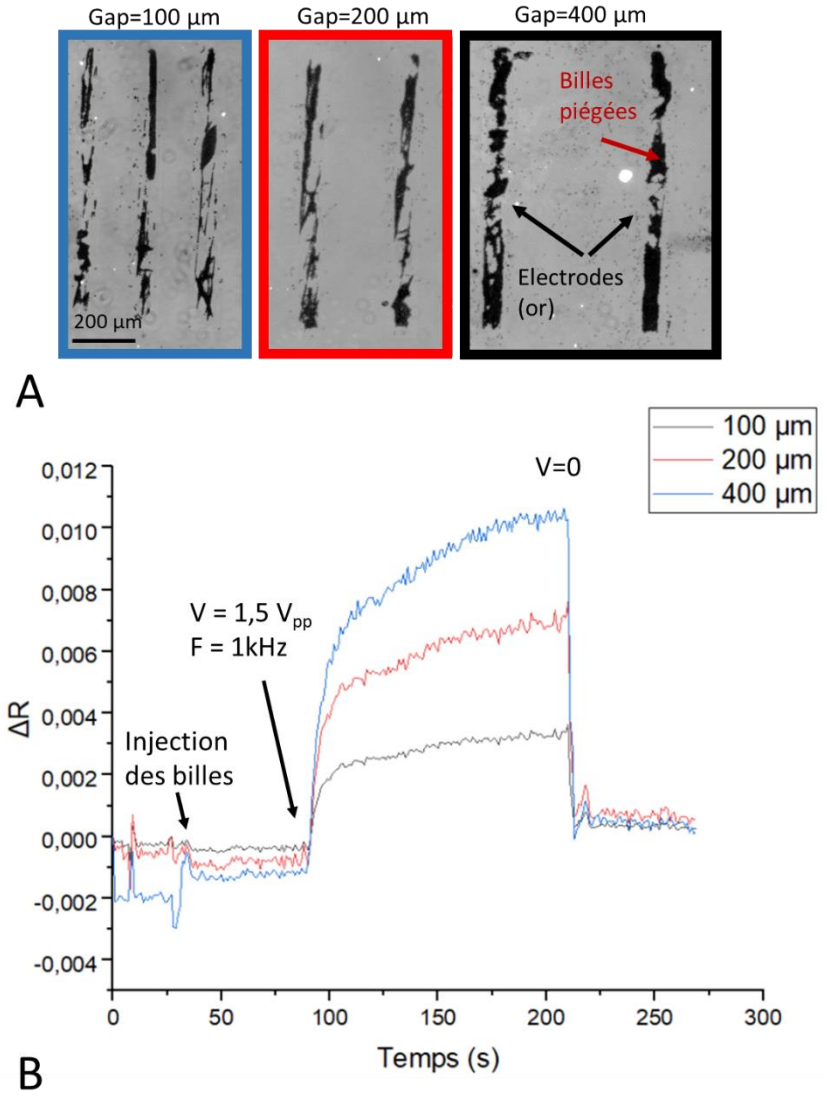


Figure 4-16A : Image en microscopie de micro-billes de 3 µm de diamètre piégées sur des électrodes face-à-face. Images prises à t = 1 min après application de la tension. B : Vatiation de réflectivité observée sur des électrodes de largeur 100 µm pour différents espacements inter-électrodes. A t=40 secondes, une solution contenant des billes de latex de 3 µm est injectée. A t=100 s, un signal sinusoïdal de fréquence 1 kHz et d'intensité 1.5 V_{pp} est appliqué.

I. Conclusion

Dans ce chapitre, le piégeage et le brassage de micro-billes de polystyrène respectivement par diélectrophorèse et par électro-osmose ont permis de détecter ces objets avec plus d'efficacité qu'un capteur classique. Lorsque le champ électrique est appliqué, l'arrivée des billes sur les électrodes peut être visualisée grâce à une forte augmentation du signal SPR, jusqu'à atteindre un plateau lorsque toutes les billes disponibles ont été piégées. La cinétique de capture de particules dépend de la géométrie de capteur (en particulier l'espacement entre les électrodes), mais aussi de la concentration à laquelle les cibles sont injectées. Nous avons ensuite démontré l'efficacité du transport de masse actif pour la détection d'objets biologiques, des cellules HEK293 dans un premier temps. En adaptant la forme des électrodes, il est ainsi possible de piéger plusieurs cellules sur une zone du film d'or puis de les détecter par SPR. Dans le chapitre suivant, nous allons étendre les protocoles développés ici à la détection de cellules bactériennes en suspension dans de l'eau, pour nous rapprocher des applications prioritairement visées à terme.

Chapitre 5. Application à la détection de bactéries

Dans le chapitre précédent, nous avons étudié les phénomènes de transport de masse actif en fonction de la géométrie des électrodes dans le cas de micro-billes de polystyrène. Nous avons démontré l'efficacité de la force de diélectrophorèse négative pour le piégeage de cellules HEK294 et leur détection par SPR. Ce chapitre est consacré à la détection de bactéries par association des phénomènes de diélectrophorèse et d'électro-osmose sur un capteur SPR et des électrodes face-à-face. Dans ce chapitre, les électrodes du bas sont de la même forme que les électrodes interdigitées, mais elles sont reliées au même potentiel, et une contre-électrodes plane forme le haut de la cellule fluidique.

A. Piégeage de bactéries *e.coli* par pDEP et ACEO dans de l'eau DI

1. Piégeage statique

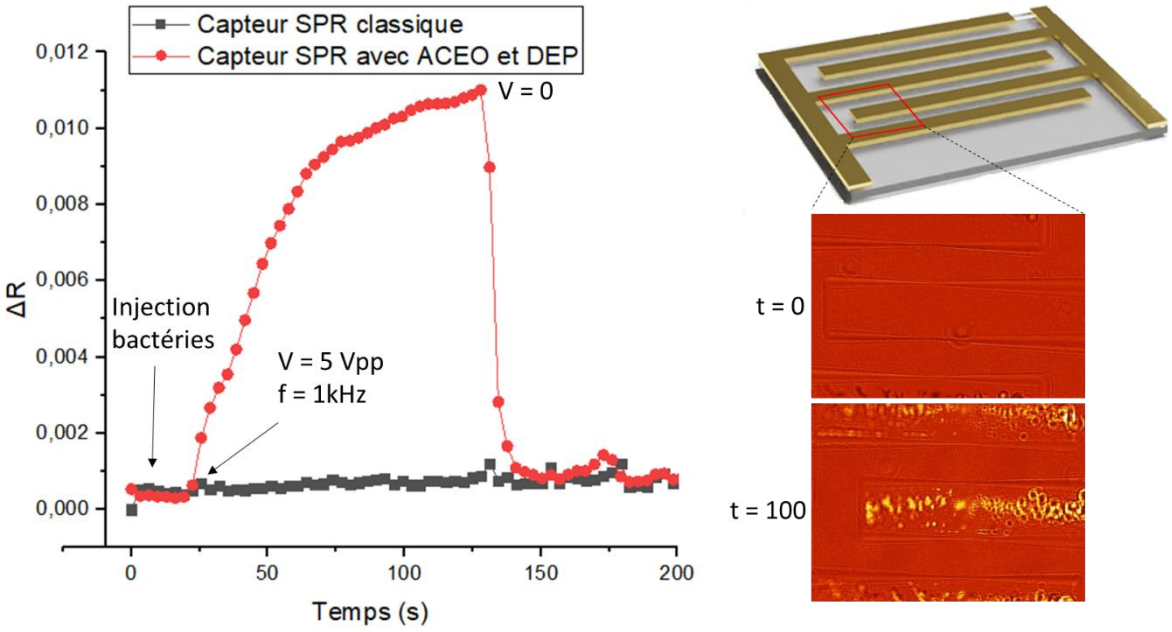
Dans le chapitre précédent, nous avons démontré l'efficacité de la diélectrophorèse négative pour piéger puis détecter par résonance de plasmon de surface des cellules eucaryotes. Or, ce type de cellule a un diamètre relativement gros (autour de 10 µm), et est donc visible par microscopie classique. L'imagerie par résonance de plasmon de surface, très sensible à un changement d'indice optique près de la surface d'un film métallique, permet de détecter sans marquage la présence d'objets difficilement ou pas observables en microscopie classique, comme des bactéries ou des biomolécules. Dans ce paragraphe, nous montrerons l'efficacité des effets électrocinétiques dans l'amélioration de la limite de détection de capteurs à résonance de plasmon de surface.

Les bactéries ont une taille de l'ordre de 10 fois moins importante que les cellules utilisées dans le paragraphe précédent. Or, la force de diélectrophorèse dépend du rayon au cube de l'objet que lequel elle s'applique. L'intensité de la force diélectrophorétique qui s'exerce sur une bactérie est donc bien plus faible que celle qui s'exerce sur une cellule. C'est pour cela que l'électroosmose, décrite en chapitre 1 et simulée en chapitre 2 est tout aussi importante pour le piégeage de bactéries. La configuration d'électrodes utilisée est la configuration face-à-face. Les électrodes inférieures utilisées sont celles montrées sur le schéma en Figure 5-1, les deux peignes d'électrodes étant au même potentiel. Une contre-électrode plane en haut du canal microfluidique est portée au potentiel opposé. La hauteur de la chambre fluidique correspond à l'épaisseur du Mylar qui est de 90 µm. Les expériences présentées dans ce paragraphe ont été réalisées sur le banc SPR 1 dont les caractéristiques sont données au Chapitre 3. Les bactéries utilisées sont des bactéries de type *e.coli*, en suspension dans de l'eau déionisée. La souche utilisée présente un risque de niveau 1 sur une échelle de 4, ce qui est relativement peu contraignant pour les manipulations en laboratoire. Le

protocole de culture ainsi que le protocole de préparation des échantillons sont détaillés en Annexe 5. Après stabilisation du signal, une solution contenant de l'eau et des bactéries *e.coli* est injectée dans la chambre fluidique via une valve d'injection. Le flux est coupé, puis une tension de 1 V_{pp} et de 1 kHz est appliquée entre les électrodes. Ces conditions permettent la création de vortex électroosmotiques, en plus de la diélectrophorèse positive. Comme pour l'expérience précédente, le signal SPR moyenné sur des ROI (Region of Interest) correspondant aux électrodes est comparé à celui obtenu sur une zone d'or non connectée, qui équivaut à un capteur SPR classique sans transport de masse.

Figure 5-1 : Variation de la réflectivité en fonction du temps sur une zone de référence (en noir) et sur une électrode de largeur 100 µm (en rouge). Deux images SPR à t = 0 et t =1 00 montrent l'accumulation de bactéries sur une électrode.

Après application de la tension, la variation de réflectivité augmente fortement, puis revient à 0 lorsque la tension est coupée. L'imagerie SPR permet de visualiser spatialement les changements de réflectivité sur le métal. Les images en Figure 5-1 montrent en couleur jaune les variations de réflectivité sur une électrode. Ces variations



correspondent à l'accumulation de bactéries sur l'électrode. Ces bactéries sont localisées plutôt sur le centre de l'électrode, ce qui confirme que l'électroosmose prédomine sur la diélectrophorèse dans ce cas, conformément à ce qui a pu être observé dans la littérature [140]. Cette expérience montre l'efficacité de l'ajout d'un transport de masse actif par diélectrophorèse et électroosmose dans le cadre de la détection de bactéries dans de l'eau.

2. Piégeage sous flux

Les simulations numériques de suivi de particules au Chapitre 3 nous ont montré deux effets d'un flux sur la détection d'objets en suspension dans un milieu. Le premier effet, négatif, est la force de traînée exercée sur ces objets qui, si elle est supérieure à la force induite par les effets électro-hydrodynamiques, entraîne les particules vers la sortie du micro-canal sans capture par les électrodes. Le deuxième effet, positif, est le renouvellement du milieu dans la cellule fluidique, et donc l'apport de nouveaux objets à détecter. Les simulations réalisées au Chapitre 3 nous ont montré qu'un léger flux entraînait une augmentation linéaire du signal en fonction du temps. Dans ce paragraphe, nous allons comparer ces résultats de simulation aux résultats acquis lorsqu'un faible flux est appliqué. Ces expériences ont été faites sur le banc SPR de l'IOGS (banc SPR 1). Un flux entrant constant de 10 µL/min est imposé dans la cellule fluidique au-dessus du capteur SPRI. Comme pour les expériences précédentes la variation de réflectivité ΔR est mesurée sur une zone de référence sur laquelle aucun potentiel n'est appliqué. Le signal est ensuite mesuré sur chaque électrode, numérotées comme sur la Figure 5-2, à des fins de comparaison.

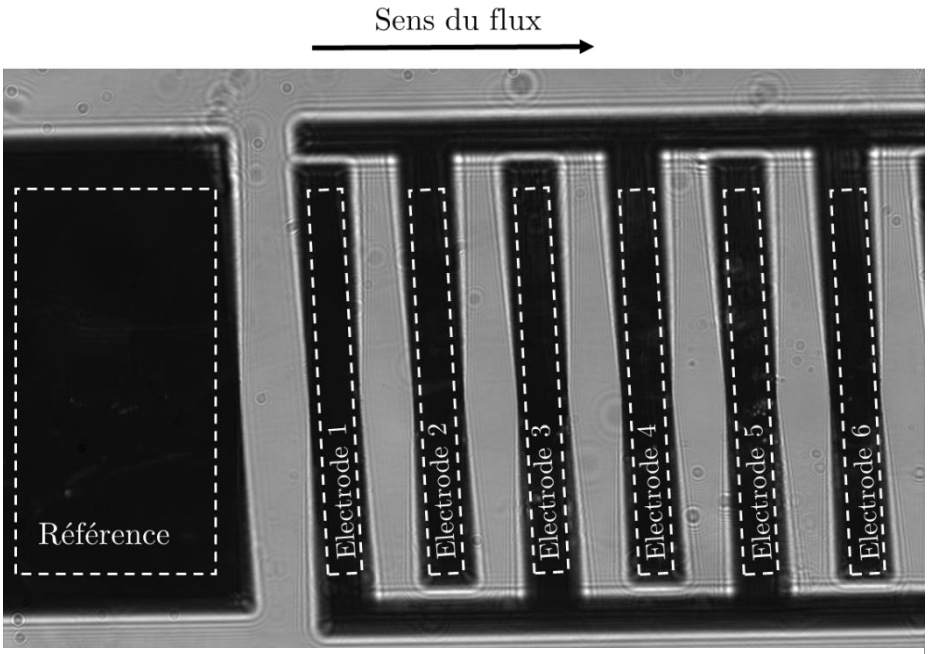


Figure 5-2 : Image TM des électrodes utilisées dans cette expérience. Un flux constant de 10 µL/min circule de la gauche vers la droite.

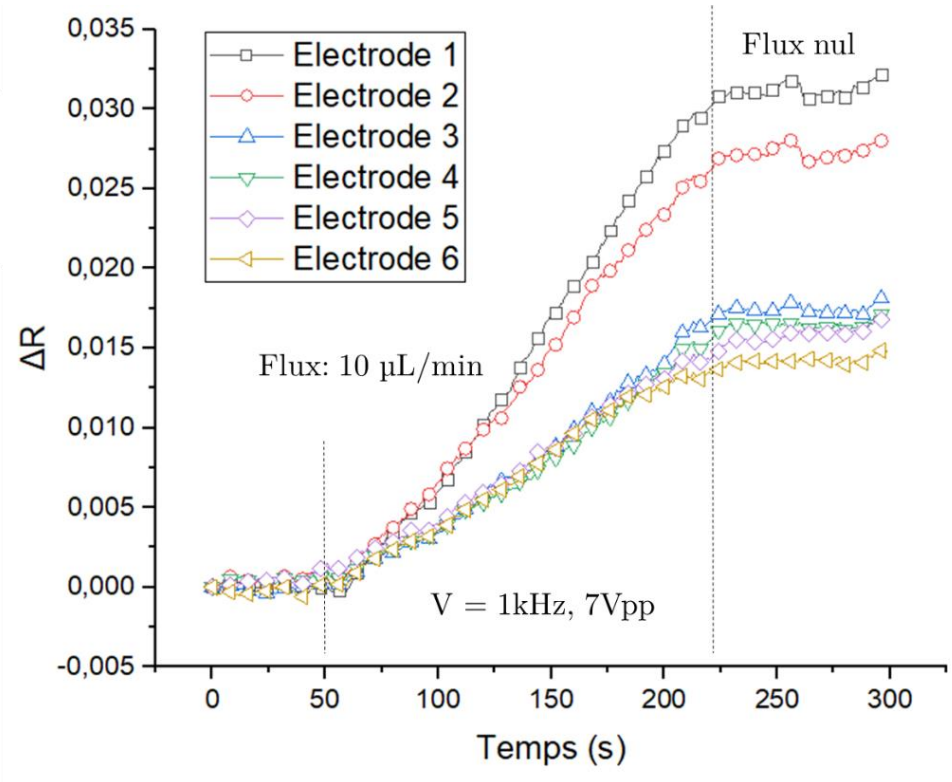


Figure 5-3 : Variation de réflectivité sur chaque électrode mesurée avec un flux de 10 µL/min

Une solution de bactéries *e.coli* à une concentration initiale de C ≈ 10^5 bact/mL est préparée. La concentration en bactéries de la solution est estimée par un comptage des bactéries sous une lame de Malassez en microscope à contraste de phase. Les incertitudes sur la concentration en bactéries peuvent exister, en particulier si des bactéries se situent en dehors du plan focal du microscope. Il est également difficile d'estimer le nombre exact de bactéries lorsque plusieurs d'entre elles forment un amas. Plusieurs dilutions sont ensuite effectuées. Le signal mesuré sur chaque électrode est représenté en Figure 5-3. Dans cette expérience, les bactéries sont injectées à une concentration de C/100 à 30 secondes sous un flux de 10 µL/min. A t = 50 secondes, le champ électrique est appliqué. Comme pour les simulations sous flux réalisées au Chapitre 3, le signal sur chaque électrode augmente de façon linéaire. A t = 225 s, le flux est coupé, l'arrivée de bactéries sur les électrodes est donc stoppée et le signal SPR arrête d'augmenter.

Comme dans les simulations présentées au Chapitre 3, la première électrode est celle qui capture le plus de bactéries. Cependant, l'écart de signal SPR entre cette première électrode et les suivantes est moins marqué, ce qui montre que la capture sur chaque électrode n'est que partielle. La même expérience a été répétée pour différentes dilutions de bactéries. La Figure 5-4A représente le signal SPR mesuré sur l'électrode 1. Au chapitre précédent, les expériences nous ont montré que le signal SPR mesuré sans flux était proportionnel à la concentration de billes injectées dans la cellule fluidique. La Figure 5-4B représente la pente du signal SPR mesurée pendant que la tension est

appliquée aux électrodes, en fonction du facteur de dilution choisi pour la préparation des solutions de bactéries.

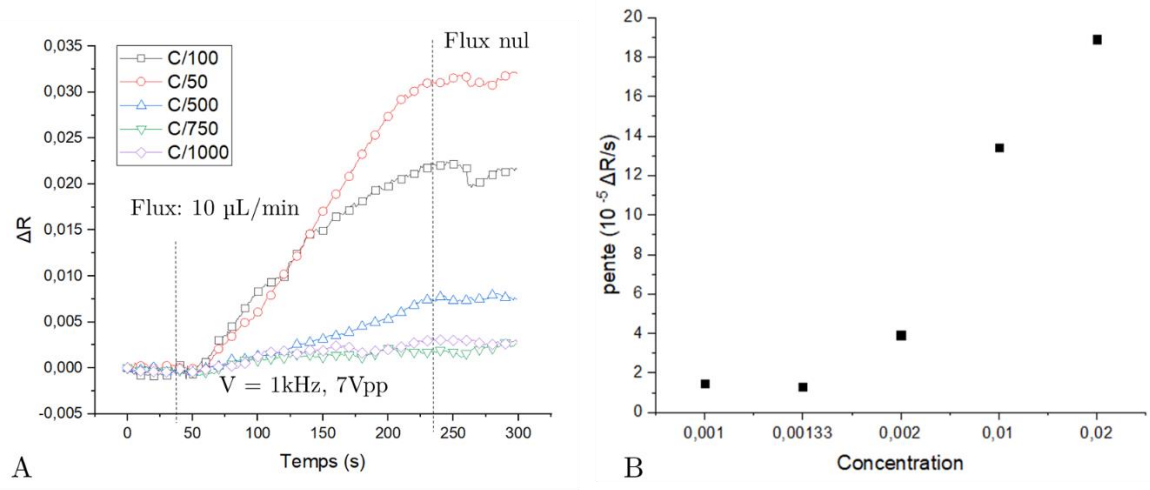


Figure 5-4A: Signal SPR mesuré sur l'électrode 1 pour plusieurs dilutions de bactéries. B : pente du signal SPR mesuré pendant que la tension est appliquée aux électrodes. L'axe des abscisses représente différentes concentrations de bactéries, qui correspondes à celles utilisées dans la sous-figure A.

Contrairement aux observations du chapitre précédent, ce signal mesuré n'est pas linéaire. Les deux premiers points de la courbe concernent les solutions de bactéries les plus concentrées. Dans ce cas, il est possible que l'électrode soit saturée de bactéries, ce qui expliquerait que le rapport entre le signal pour les concentrations C/50 et C/100 ne soit pas de deux. Pour les concentrations les plus faibles, (C/750 et C/1000), le signal mesuré est très proche de zéro, la limite de détection semble donc atteinte.

B. Fonctionnalisation chimique de la surface des électrodes

1. Intérêt d'une fonctionnalisation de surface

Les expériences précédentes ont montré l'efficacité d'un transport de masse actif pour améliorer la détection de bactéries dans de l'eau. Cependant, cette détection n'est pas spécifique : tout objet entrant dans le volume de détection des électrodes induit une variation de réflectivité, et donc un signal mesuré. Une fonctionnalisation de surface chimique de la surface du film d'or utilisée pour la détection SPR est donc nécessaire pour garantir une accroche spécifique des espèces-cibles sur le capteur [141]. Dans ce projet de thèse, il ne s'agira pas de développer de nouvelles méthodes de fonctionnalisation de surface de l'or, mais d'utiliser celles existantes pour rendre sélectif le capteur proposé. Dans ce chapitre, nous avons choisi d'utiliser des chimies de surface qui permettent d'immobiliser des sondes (oligonucléotides, anticorps…) conjugués avec de la biotine. Ce type de sonde est facilement disponible sur le marché, et toute sonde disposant d'une terminaison biotine peut être utilisée, ce qui permet de viser une grande

variété de cibles. Les chimies réalisées doivent donc se terminer par une couche d'avidine pour permettre l'immobilisation de ce type de sondes.

2. Protocole de fonctionnalisation de surface par BSA-biotine

La BSA (Bovine Serum Albumine) est très utilisée en chimie de surface et en biologie pour son faible coût, sa stabilité et son absence de réactivité dans de nombreuses réactions chimiques. Elle a la particularité de s'adsorber sur la plupart des surfaces. Si la BSA comporte un groupe biotine, il est ensuite possible d'utiliser la liaison avidine-biotine pour ajouter des couches de molécules ou fixer directement des sondes. La liaison avidine/biotine est basée sur des interactions faibles. Elle a une constante de dissociation $K \approx 10^{-15}$ mol/L, ce qui en fait la liaison non-covalente la plus forte connue. La fonctionnalisation de surface est un point clef de la reproductibilité des mesures en SPR. Il faudra trouver une chimie qui offre le meilleur compromis entre reproductibilité, coût, et faisabilité (en termes de matériel et de compétences disponibles).

Pour tester l'efficacité d'une monocouche de BSA biotinylée pour l'immobilisation de sondes conjuguées streptavidine, des micro-canaux de PDMS ont été fabriqués en suivant le protocole détaillé en Annexe 6. Ces micro-canaux sont présentés en Figure 5-5A. Deux solutions de fonctionnalisation ont été préparées. La première solution est une solution de BSA 2%, dans de l'eau DI. La deuxième solution est une dilution de BSA biotinylée dans de l'eau DI, à une concentration de 2 mg/mL. Dans un premier micro-canal, l'injection de la solution de BSA permet la formation d'une monocouche sur les parois du canal. Après un temps de repos de 10 minutes, le canal est rincé à l'eau DI. La même opération est répétée sur un autre micro-canal, en utilisant cette fois-ci la solution de BSA biotinylée.

Lors de cette expérience, nous avons utilisé des micro-billes de diamètre 1 µm pour tester leur accroche sur les monocouches formées dans chacun des canaux. La surface de ces billes est fonctionnalisée avec de la streptavidine. Dans chaque canal, une solution contenant des micro-billes en grande concentration a été injectée. Après un temps de repos permettant la décantation des billes sur le fond du canal, un rinçage a différents débits croissants a été fait grâce à un pousse seringue. Les images au microscope inversé en Figure 5-5B sont prises pour différents débits de rinçage.

Sur le premier canal, fonctionnalisé avec de la BSA biotinylée, on observe que la densité

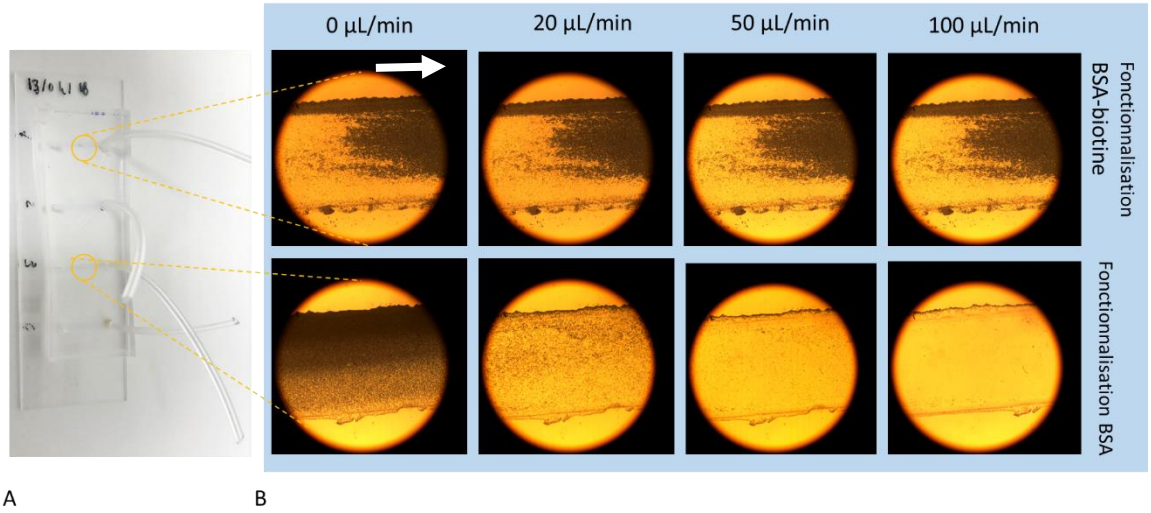


Figure 5-5A: Image des canaux de PDMS utilisés dans cette expérience. B : Images de microscopie de deux canaux avec une fonctionnalisation BSA biotinylée (ligne du haut) et un fonctionnalisation BSA (ligne du bas) La flèche indique le sens du flux.

de billes sur le fond du canal reste quasi constante, quel que soit le débit de rinçage imposé. Sur le deuxième canal, les billes sont rapidement emportées par le flux de rinçage. Ces densités ont été estimées grâce à un seuillage sur le logiciel Image J, et sont représentées en Figure 5-6.

Cette expérience montre que le protocole utilisé permet bien d'immobiliser une couche de BSA-biotinylée. De plus, cette couche est efficace pour piéger des objets de l'ordre du micromètre, même sous flux. L'avantage de cette technique est la facilité du protocole. Une seule étape de fonctionnalisation est nécessaire. De plus, les produits requis sont peu onéreux, et se conservent sans difficulté. Cependant, cette méthode présente l'inconvénient de fonctionnaliser toute la surface d'un canal, indifféremment des zones de PDMS, de verre, ou encore d'or. L'utilisation de cette méthode pour fonctionnaliser une puce SPR avec un transport de masse piègerait les analytes sur toute la surface de la puce, et non pas sur les électrodes seulement. Or, seuls les objets piégés sur l'or peuvent être détectés par SPR. Cela affecterait donc la densité d'analytes à la surface des

électrodes, car certains resteraient piégés hors de ces électrodes. Par conséquent cette méthode n'est pas idéale si on veut obtenir une limite de détection la plus faible possible.

3. Fonctionnalisation de surface par cystéamine

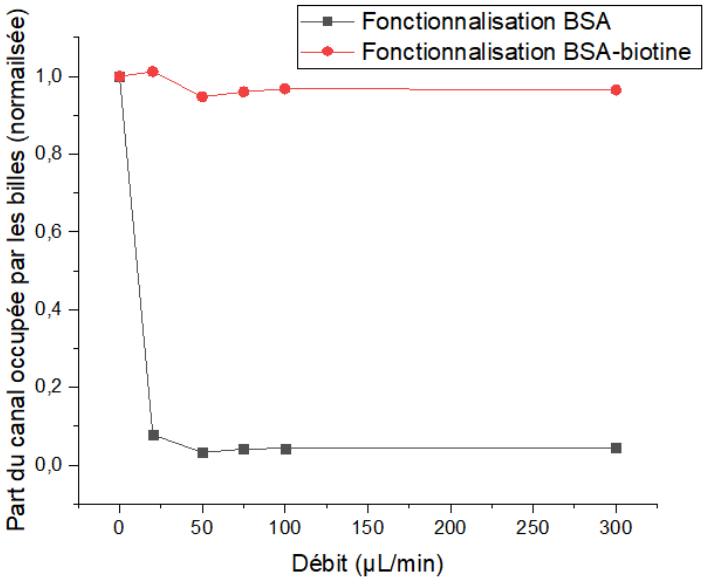


Figure 5-6 : Densité de billes sur le canal fonctionnalisé BSA (en noir) et BSA biotinylée (en rouge)

a) Fonctionnalisation de l'or par un thiol

Au paragraphe précédent, nous avons présenté une méthode simple mais non spécifique à l'or pour immobiliser des sondes biotinylées. Parmi les différentes chimies de surface consacrées à l'immobilisation de cibles sur une surface d'or, l'utilisation de thiols est une des plus répandues pour les applications liées aux capteurs SPR. Ce procédé de fonctionnalisation de l'or a été développé en 1983 par Nuzzo et Allara [142], à un époque qui coïncide avec le développement des puces SPR pour la détection et la quantification d'espèces chimiques et biologiques. Un thiol est une molécule organique de formule R-SH, avec SH qui désigne le groupe sulfhydrile, et R une chaîne carbonée. Ce type de molécule peut s'adsorber sur un film d'or, et former une monocouche auto-assemblée [143]. Le mécanisme de liaison entre un thiol et l'or communément admis est le suivant [144] :

$$Au_n + RSH \rightleftharpoons Au_{n-1}Au^+RS^{-1} + \frac{1}{2}H_2$$

Cependant, des controverses subsistent au sujet de ce mécanisme et de la nature exacte de la liaison or-thiol. En général, la formation de ces couches auto-assemblées se fait spontanément, lorsqu'un substrat d'or est trempé dans une solution diluée contenant des thiols. Cette formation se fait en deux étapes [145]. A l'issue d'une première étape de quelques minutes, les thiols sont adsorbés sur la surface. Dans une deuxième étape, qui peut durer quelques heures, les molécules assemblées s'organisent pour former une couche compacte et régulière, grâce aux interactions faibles de Van Der Waals. De

nombreux paramètres peuvent influer sur la couche formée : propreté du substrat, concentration en thiols, solvant choisi, température de la réaction, durée de la réaction… Ces paramètres peuvent affecter la densité et donc la stabilité de la monocouche auto-assemblée obtenue.

b) Protocole de la fonctionnalisation de surface par de la cystéamine

Le protocole de fonctionnalisation retenu utilise un thiol, le β-mercaptoethylamine (autrement appelé cystéamine) pour immobiliser une première couche de molécules sur les électrodes. Ce protocole développé à l'IOGS [146] est bien maîtrisé par Julien Moreau, avec qui nous avons collaboré pour ces travaux. Ce protocole a été développé à l'origine pour immobiliser des oligonucléotides conjugués biotine. Dans ce paragraphe, nous allons adapter ce protocole pour piéger non pas de l'ADN, mais des bactéries. La sonde ADN sera donc remplacée par un anticorps biotinylé.

La propreté du substrat d'or est primordiale pour avoir le moins de défauts possibles dans la monocouche de thiols, et ainsi garantir un taux de couverture maximal des sondes immobilisées. Le protocole de nettoyage comprend une exposition de 10 minutes à un plasma d'oxygène. Ensuite, les substrats sont plongés dans un mélange de 5 mL de peroxyde d'hydrogène et de 15 mL d'eau DI à 70°C pendant 10 minute. Les substrats sont rincés à l'eau DI, puis trempent dans de l'éthanol anhydre pendant 1h.

Pour former la monocouche de thiols (Figure 5-7, étape 1), les substrats d'or sont immergés face vers le haut pendant 12 h dans une solution contenant 4,5 mg de cystéamine dissoute dans 30 mL d'éthanol anhydre. Le substrat et la solution sont dans un bécher fermé hermétiquement et recouvert de papier aluminium pour éviter l'évaporation de l'éthanol et la dégradation de la cystéamine par la lumière. Pour enlever l'excès de thiols, Les substrats sont rincés à l'éthanol, puis à l'eau, et enfin séchés avec un flux d'azote. L'étape d'activation (Figure 5-7, étape 2) se fait par immersion des substrats dans du PDC (1,4 phenylenedi- isothiocyanate). Les substrats sont ainsi immergés pendant 2 heures dans une solution contenant 2,5 mL de pyridine et 22,5 mL de DMF (dimethylformamide), et 1 mg de PDC sous forme de poudre. Après cette étape, les substrats sont rincés au DMF puis à l'eau DI, et sont séchés sous un flux d'azote. La neutravidine est diluée à une concentration de 200 µg/mL dans une solution tampon à pH 9. Une goutte de cette solution est ensuite déposée sur le substrat, puis recouverte d'une lamelle de microscope propre, pour éviter l'évaporation (Figure 5-7, étape 3). Après 40 minutes, les substrats sont rincés à l'eau DI, puis séchés. Ce protocole prend 1 jour et demi. Après ces étapes, les substrats sont prêts à recevoir les sondes biotinylées.

Pour les puces SPR utilisées en imagerie, il est courant d'utiliser un *spotter* (ou « imprimante à biopuce ») pour déposer des micro-gouttes de cibles sur la surface d'or fonctionnalisée, et ainsi permettre une grande variété de cibles différentes sur le même substrat. L'IOGS possède ce type d'équipement, et les expériences faites au LCF ont donc utilisé un spotter pour déposer les cibles en gouttes d'environ 200 µm de diamètre à la surface de la puce. À l'université de Sherbrooke, cet équipement n'est pas disponible. Les gouttes ont donc été déposées à la main, avec une micro-pipette et des pointes de 1 µL. La taille des gouttes obtenues est plus grosse et irrégulière, les goutes faisant entre 1 et 3 mm de diamètre.

c) Test de la fonctionnalisation de surface par cystéamine

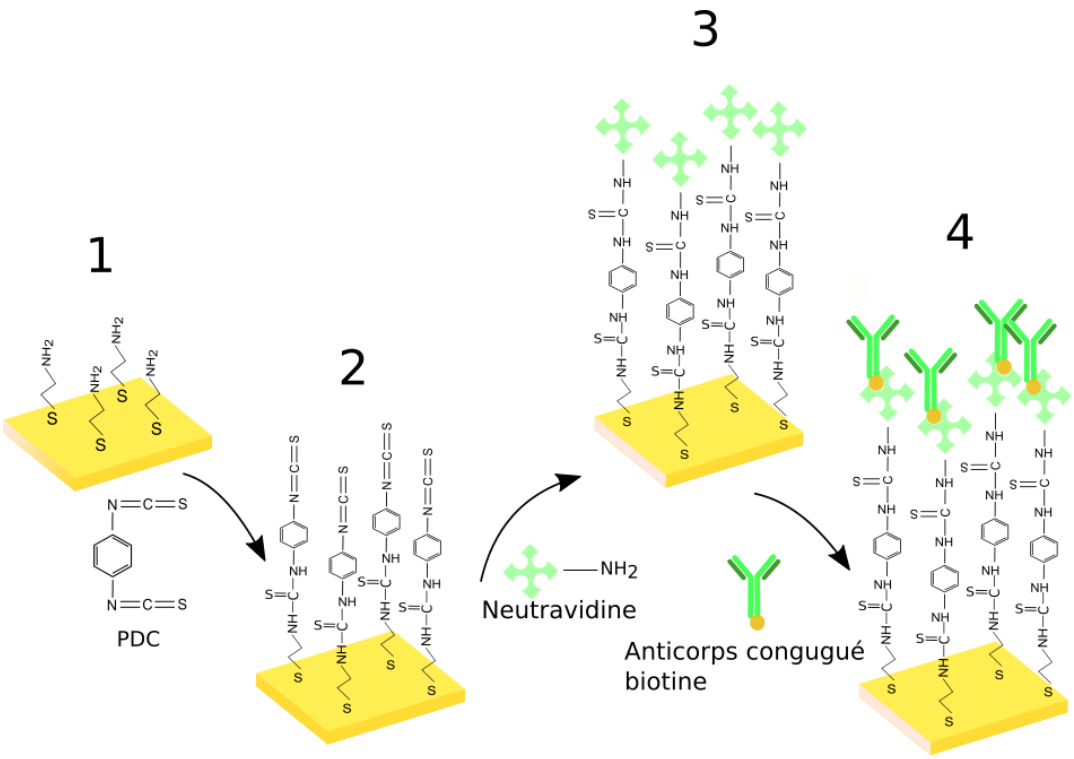


Figure 5-7: Etapes du protocole de fonctionnalisation de surface par la cystéamine pour l'immobilisation d'anticorps biotinylés

Le protocole décrit au paragraphe précédent pour la capture de bactéries dans de l'eau DI est tout d'abord appliqué sur une lame d'or plane, pour tester son efficacité. Le dépôt des anticorps à la surface du substrat nécessite de préparer une solution visqueuse et qui ne s'évapore pas afin que la pointe du *spotter* puisse prélever de la solution, puis la déposer sous forme de micro-gouttes sur la surface d'or. Dans ce paragraphe, nous cherchons à détecter des bactéries de type *e.coli.* L'anticorps choisi est un anticorps polyclonal (abcam, ab20765), qui cible les antigènes O et K situées sur la membrane bactérienne, ainsi que l'antigène H situé sur le flagelle. Cet anticorps possède une conjugaison biotine, qui peut se fixer sur l'un des quatre sites de la neutravidine.

La première étape est de déterminer quelle concentration d'anticorps est optimale lors du *spotting.* La solution déposée contient 6 µL de bétaïne, un volume V de solution mère

d'anticorps à 60 µM, et un volume 14-V µL d'eau DI. Le volume V est ensuite choisi pour avoir 3 différentes concentrations finales en anticorps de la solution de spotting (1, 5 et 10 µM). Une solution de référence ne contenant pas d'anticorps est également déposée sur la lame. L'interaction entre la partie biotine des anticorps et la neutravidine sur la surface est immédiate. Après avoir déposé les micro-gouttes de cibles et de référence (Figure 5-8A), l'échantillon est prêt à être utilisé.

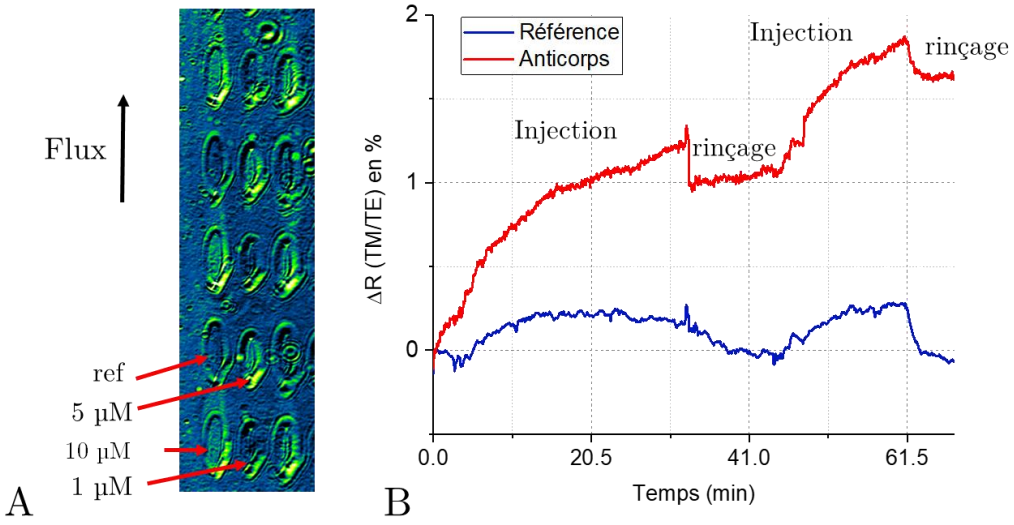


Figure 5-8 : A : Image correspondant à ΔR(TM/TE) après injection des bactéries, à t = 40 min. Les zones en jaune représentent les zones où la réflectivité a augmenté, c'est-à-dire les zones où sont piégées les bactéries. B : variation de réflectivité moyennée sur les plots sans anticorps (en bleu) et les plots avec anticorps (en rouge).

Une fois la puce SPR installée dans le banc SPR, une solution contenant de l'eau DI et des bactéries en grande concentration est injectée à faible flux (10 µL/min) pendant 30 minutes, puis de l'eau DI est injectée pour un rinçage de la puce pendant 10 minutes. La Figure 5-8B nous montre que la variation de réflectivité après rinçage sur les spots avec anticorps est de l'ordre de 1%, alors qu'elle revient à zéro sur les spots de référence. Cela signifie que les bactéries restent accrochées sur les plots avec anticorps, mais est emportée par le flux de rinçage sur les zones sans anticorps. Après cette étape de rinçage, la même opération est répétée : la solution d'eau contenant des bactéries est de nouveau injectée, ΔR augmente de nouveau, puis se stabilise après rinçage.

Sur la Figure 5-8A, les plots avec une concentration initiale d'anticorps de 10 µM donnent la variation de réflectivité la plus importante lors de la capture de bactéries. Cette concentration est suffisante pour que les bactéries puissent adhérer à la surface de la biopuce. C'est donc cette concentration qui sera privilégiée lors des expériences suivantes, elle correspond à un volume V = 3,3 µL de solution mère d'anticorps dilués dans le mélange eau/bétaïne lors du *spotting*. On peut également observer que les plots sont asymétriques : la variation de réflectivité est plus importante sur le bas du plot que

sur le haut. C'est peut-être un effet de la gravité, les puces et le prisme étant montés verticalement sur le banc SPR 1 utilisé pour cette expérience. Cette expérience valide donc le protocole de fonctionnalisation par la cystéamine et l'immobilisation d'anticorps biotinylés pour le piégeage de bactéries sur un capteur SPR.

C. Stabilité de la fonctionnalisation de surface à un champ électrique alternatif

Le Chapitre 2 nous a montré que l'application d'un champ électrique à un film d'or pouvait dans certaines conditions modifier le signal SPR de celui-ci, en créant des réactions d'oxydo-réduction à la surface du métal notamment. Dans le cas d'un film d'or fonctionnalisé chimiquement pour adhérer spécifiquement à un type de cible, le métal n'est pas directement en contact avec le milieu. En effet, une couche de molécules auto-assemblées est adsorbée sur le métal. Il n'est pas exclu que l'application d'un champ électrique sur cette couche puisse modifier la conformation voire l'endommager. Si cela se produisait, les sondes pourraient être arrachées de la surface, et les bactéries empêchées d'adhérer. De plus, le signal SPR mesuré pourrait alors correspondre à un phénomène de surface dû au champ électrique, et non à une arrivée de bactéries sur l'électrode.

Pour déterminer si un champ électrique peut affecter la variation de réflectivité sur une électrode fonctionnalisée chimiquement, le signal SPR mesuré sur une électrode fonctionnalisé est soustrait au signal SPR mesuré sur une zone de référence, où aucun champ électrique n'est appliqué. Le résultat obtenu est représenté en Figure 5-9. Lors de cette expérience, aucune tension n'est appliquée entre zéro et 250 secondes. Puis un champ électrique est imposé sur les électrodes. La tension est d'abord réglée à 1 V_{pp}, puis augmentée à 3 V_{pp} et enfin 7 V_{pp}. La différence entre les deux signaux mesurés ne

dépasse pas 0,1 % de variation de réflectivité, ce qui est dans le bruit de la mesure compte tenu des performances du système utilisé.

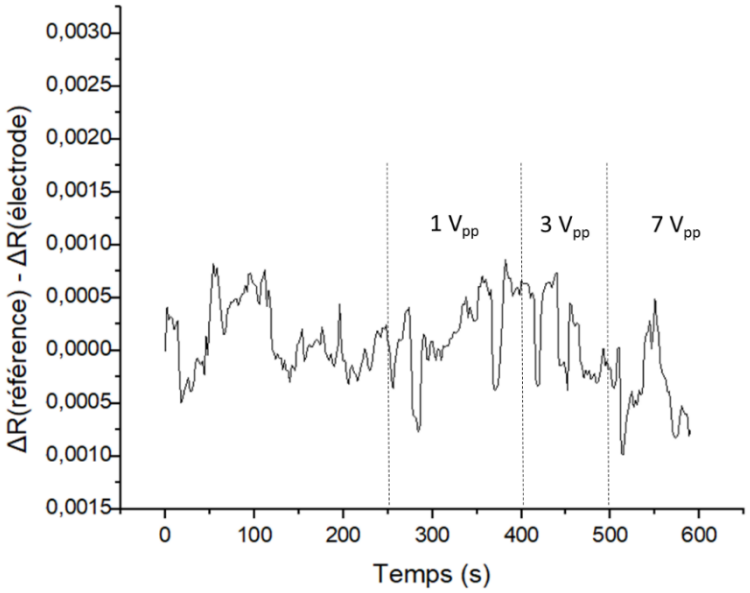


Figure 5-9 : Comparaison des signaux sur une zone de référence sans champ électrique, et une électrode sur laquelle est appliqué un signal sinuoïdal de fréquence 1kHz et de différentes amplitudes

D. Détection de *e.coli* sur une biopuce fonctionnalisée avec transport de masse

Le protocole de fonctionnalisation de surface présenté au paragraphe précédent appliqué sur des électrodes d'or nous permet, en choisissant bien l'anticorps déposé, de piéger sélectivement des bactéries sur ces électrodes. Dans cette expérience, seule une partie des électrodes a été fonctionnalisée avec des anti corps anti *e.coli*. Sur l'image SPR TM des électrodes utilisées dans cette expérience représentée sur la Figure 5-10A, les zones où sont accrochés les anticorps sont plus claires. Pour évaluer l'efficacité du transport de masse, une solution de bactéries *e.coli* à une concentration de 10^3 bactéries/mL est injectée dans la cellule fluidique. Dans cette expérience, aucun flux n'est appliqué autre que le flux de rinçage. Une tension de 7 V_{pp} à une fréquence de 1 kHz est appliquée sur des électrodes de largeur 120 µm. Le signal obtenu sur la partie fonctionnalisée des électrodes est ensuite comparé avec celui de la partie non fonctionnalisée. Du à la faible concentration en bactéries et donc du faible nombre de bactéries présentes sur une électrode après piégeage, le signal est moyenné sur l'ensemble des électrodes. Après rinçage, seules les bactéries ayant formé des liaisons avec l'anticorps restent à la surface de l'électrode, et sont donc détectées. Le signal mesuré sur chaque partie des électrodes est représenté en Figure 5-10B.

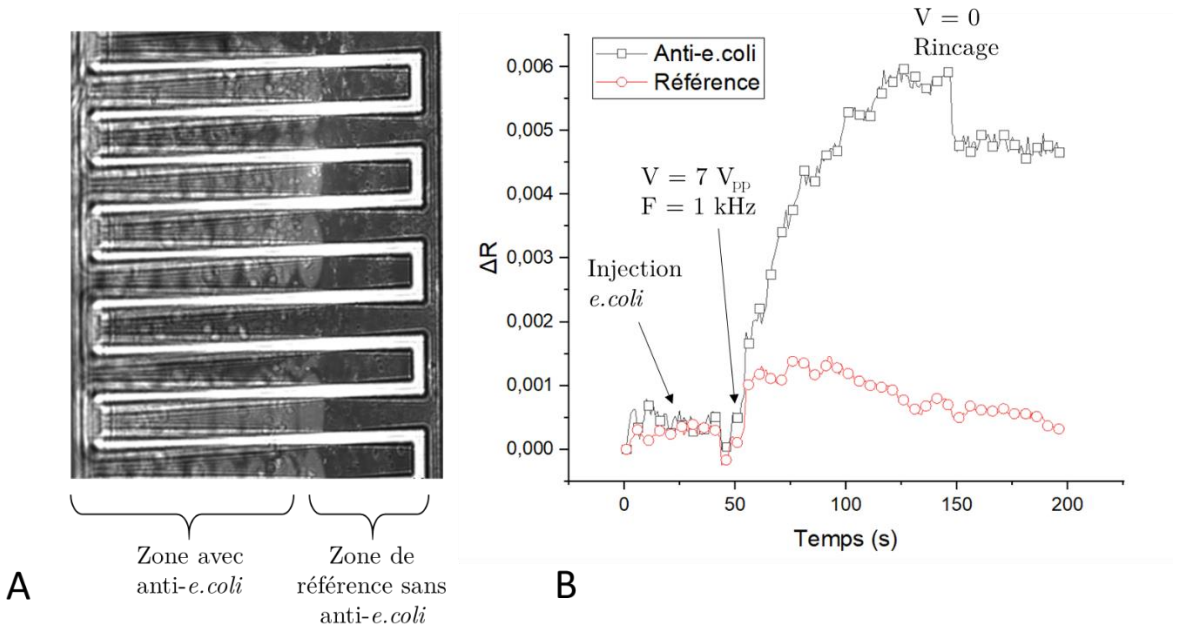


Figure 5-10A : Image SPR TM des électrodes avec la partie gauche fonctionnalisée avec des anticorps anti e.coli. B: Signal SPR mesuré sur une électrode fonctionnalisée avec des anticorps anti e.coli (en noir) et sur une électrode non fonctionnalisée (en rouge).

Lors du rinçage, une partie des bactéries qui étaient présentes sur les électrodes fonctionnalisées n'y reste pas piégée, comme la montre la chute du signal sur la courbe noire à 120 s. Après rinçage, la variation de réflectivité sur la partie fonctionnalisée des électrodes est de l'ordre de 0,45%, et reste stable. Sur la partie des électrodes non fonctionnalisée, la variation de réflectivité mesurée est de 0,1 %, ce qui est faible en comparaison des électrodes avec anti *e.coli*, mais non nul. Ceci tend à indiquer une faible adsorption non-spécifique des bactéries *e.coli* sur la partie fonctionnalisée.

E. Conclusion

Ce chapitre est consacré à la détection de bactéries de type *e.coli* dans de l'eau DI. Dans un premier temps, nous avons montré que les effets électrocinétiques induits par un champ électrique alternatif produit par des électrodes face-à-face permet de concentrer sur ces électrodes des bactéries dans de l'eau DI. La concentration de bactéries sur la zone centrale des électrodes montre que les effets électro-osmotiques prédominent par rapport à la force de diélectrophorèse. En effet, très peu de bactéries restent piégées sur le bord des électrodes, et l'essentiel des bactéries est entraîné vers le centre des électrodes par le flux électro-osmotique. Un protocole de fonctionnalisation de surface par cystéamine a été utilisé et appliqué sur les électrodes d'or afin de détecter sélectivement des bactéries de type *e.coli*. Ce protocole de fonctionnalisation de surface nous a permis d'immobiliser des sondes biotinylées (dans ce cas-ci des anticorps anti e.coli) sur la surface des électrodes. Dans l'eau seule, l'application d'un potentiel alternatif de 1 V_{pp} à 7 V_{pp} à des électrodes fonctionnalisées n'a pas induit de variations dans le signal SPR mesuré, ce qui indique que le champ électrique n'a pas dégradé les

sondes en surface. Enfin, nous avons testé le prototype de biocapteur SPR développé dans ce manuscrit pour la détection sélective de bactéries de type *e.coli* dans de l'eau DI. Nous avons injecté dans la cellule fluidique du banc SPR des bactéries *e.coli* à une concentration de 10^3 cellules/mL. Ces bactéries ont été piégées sur les électrodes grâce au flux électro-osmotique principalement, puis détectées avec succès par imagerie SPR. Ces expériences ont montré que, grâce aux effets électrocinétiques implantés sur un capteur SPR, il est possible de détecter des bactéries à une concentration deux ordres de grandeur plus faible que celle détectable par un capteur SPR classique sans transport de masse. Pour compléter les résultats obtenus dans ce chapitre, plusieurs expériences sont nécessaires, en particulier des tests de spécificité basés sur l'emploi de plusieurs anticorps, et d'un milieu liquide contenant plusieurs types de bactéries.

Chapitre 6. Conclusions et perspectives

A. Conclusion générale

Les biocapteurs à résonance de plasmon de surface sont des biocapteurs optiques qui reposent sur la propagation d'un mode électromagnétique à l'interface entre un film métallique et un milieu diélectrique dans lequel sont présentes des espèces cibles que l'on cherche à détecter et quantifier. La profondeur de pénétration de l'onde évanescente (ou « portée » du capteur) qui se propage à l'interface métal/diélectrique est de l'ordre de la centaine de nanomètres. Ainsi, tout objet (biomolécule, bactérie…) qui se trouve dans la portée du capteur sera détecté. Pour obtenir une détection spécifique à un certain type de cible, une fonctionnalisation de surface chimique est nécessaire. Grâce à la fonctionnalisation de surface, des sondes (anticorps, oligonucléotides…) qui forment des interactions faibles avec les cibles sont immobilisées sur la surface du capteur SPR. Ainsi, seules les espèces cibles adhèrent à la surface du capteur et sont détectées. La principale limite de ce type de capteur est le temps de diffusion des espèces-cibles vers la surface de détection. Lorsque les espèces cibles sont faiblement concentrées, leur temps de diffusion jusqu'au capteur SPR peut être extrêmement long, ce qui limite la sensibilité du capteur. Pour résoudre ce problème, nous proposons d'agir sur le transport de masse des espèces-cibles vers le capteur. Au Chapitre 1, nous avons présenté différentes techniques qui permettent de contrôler le transport des espèces chimiques ou biologiques dans le cadre de la bio-détection. Parmi ces techniques, la diélectrophorèse et l'électro-osmose en courant alternatif se révèlent particulièrement adaptées à l'intégration sur un capteur SPR. En effet, les électrodes nécessaires à la production d'un champ électrique non uniforme peuvent directement être gravées dans le film métallique qui sert de capteur SPR. Les électrodes sont à la fois un module de transport de masse et un détecteur.

Le développement d'une biopuce combinant les technologies de DEP et ACEO ainsi que la détection SPR passe premièrement par une compréhension approfondie des phénomènes qui rentrent en jeu lors du transport de masse via un modèle numérique. Les simulations réalisées avec le logiciel COMSOL ont permis dans un premier temps de calculer l'intensité des forces de DEP et d'ACEO en tout point de la chambre fluidique. Pour modéliser l'ACEO, nous avons adapté un modèle numérique proposé par Green et al. qui permet de calculer la vitesse de glissement de la couche diffuse sur les électrodes quelle que soit la géométrie utilisée, en résolvant numériquement l'équation de Laplace sur ces électrodes. Ensuite, les forces exercées sur des particules ayant les mêmes propriétés électriques que des bactéries ont été calculées. Ces calculs ont permis de simuler la trajectoire de particules circulant au-dessus des électrodes, sous l'effet des phénomènes électrocinétiques induits par le champ électrique non uniforme. Ils ont également permis de quantifier le nombre particules piégées sur les électrodes, et donc

d'évaluer l'efficacité de plusieurs configurations d'électrodes différentes. Il est ressorti que pour un design d'électrodes face-à-face, la force de diélectrophorèse et la force de traînée induite par le flux électro-osmotique sont plus importantes que dans une configuration interdigitée. Cela se traduit par une plus grande efficacité de piégeage de particules pour la configuration face-à-face. L'espacement inter-électrode est aussi un point important à maîtriser lors de la conception du capteur. En effet, si celles-ci sont trop rapprochées, il en résulte une baisse du nombre de particules piégées par électrode du fait du chevauchement du volume de capture des électrodes. De plus, les simulations réalisées suggèrent qu'un léger flux entrant permet de renouveler la solution en espèce-cibles, et donc d'augmenter le nombre de particules piégées sur les électrodes.

Dans le troisième chapitre, nous avons décrit la fabrication d'un prototype de capteur SPR en intégrant des effets de diélectrophorèse et d'électro-osmose. La fabrication d'électrodes a été faite par photolithographie suivie d'une gravure chimique. Des masques en acétate ont été utilisés. Ce type de masque est peu onéreux, ce qui permet un prototypage rapide de différentes configurations d'électrodes. Pour prouver l'efficacité de la DEP intégrée sur ce type de capteur, nous avons dans un premier temps observé le comportement de billes fluorescentes en suspension dans de l'eau DI sous l'effet d'un champ électrique créé par des électrodes interdigitées. Cette expérience nous a permis de vérifier les résultats de simulation qui prédisaient un flux électro-osmotique maximal autour de 1 kHz. Pour déterminer le facteur de correction appliqué à la vitesse de glissement de l'électro-osmose sur les électrodes, nous avons développé un système qui permet de visualiser de côté les effets électrocinétiques dans toute la hauteur du canal fluidique. Le suivi de particules à partir d'images enregistrées par caméra rapide nous a permis de déduire la vitesse des particules en tout point du canal microfluidique, et donc de déterminer le facteur de correction en comparant ces résultats expérimentaux aux simulations. Les simulations du Chapitre 3 nous ont suggéré l'utilisation d'électrodes face-à-face plutôt que interdigitées pour une efficacité maximale de piégeage de particules. Nous avons donc fabriqué ce type d'électrodes puis étudié la réponse SPR après activation du transport de masse en fonction de différentes concentrations de billes dans la solution testée. Après application du potentiel sur les électrodes, une forte augmentation du signal SPR est observée. Le signal atteint un plateau, dont la valeur est proportionnelle à la concentration de billes présentes dans la cellule fluidique.

L'un des principaux objectifs de ce projet de thèse était de démontrer l'efficacité du transport de masse actif pour l'amélioration des performances des capteurs SPR pour la détection d'objets biologiques. Un prototype d'électrodes face-à-face mettant à profit la diélectrophorèse négative pour le piégeage et la détection de cellules eucaryotes a été développé. Ces premières expériences avec des objets biologiques nous ont permis de concentrer des cellules HEK293 dans des zones de minimum de champ électrique, puis d'observer un signal SPR correspondant à l'arrivée de ces cellules dans la zone de détection. Nous avons étendu ces observations aux bactéries de type *e.coli*, avec une configuration d'électrodes différente comportant des électrodes face-à-face et une

fréquence favorisant la diélectrophorèse positive et l'électro-osmose. Ces phénomènes électrocinétiques permettent de concentrer au centre d'électrodes rectangulaires les bactéries, puis de les détecter par imagerie SPR. La sélectivité du capteur à des cibles bactériennes de type *e.coli* a été démontrée grâce à l'immobilisation d'anticorps anti *e.coli* à a la surface des électrodes. Ces anticorps ont été fixés grâce à un protocole de fonctionnalisation de surface basé sur des thiols (cystéamine). Les électrodes fonctionnalisées se sont révélées efficace pour la détection de bactéries dans de l'eau DI à une concentration de 10^3 cellules/mL. Les prototypes de capteurs SPR intégrant des électrodes développées dans ce projet sont facilement adaptables aux banc SPR commerciaux. La seule nécessité au niveau de l'instrument est de rajouter des connectiques électriques pour pouvoir appliquer un potentiel alternatif aux électrodes. Nous espérons que le transport de masse actif intégré sur les capteurs plasmoniques ouvrira ensuite de nouveaux domaines d'application aux puces SPR en atteignant des niveaux de détection qui n'étaient jusqu'alors pas accessibles à ce type de capteurs, comme la détection directe de bactéries dans de l'eau potable.

Ce projet a abouti à un prototype de biopuce SPR aux performances améliorées grâce à un module de transport de masse facile à implanter sur les biocapteurs existants. Ce travail est le fruit de la collaboration de deux laboratoires avec une expertise en microfluidique (le laboratoire Ampère à Lyon) et une expertise en plasmonique (le LN2 à Sherbrooke). L'éloignement géographique des laboratoires et le contexte international génère des défis organisationnels mais permet aussi une émulation scientifique forte. Les communications scientifiques (articles et communications dans des conférences) liées à ce travail sont listées en Annexe 8.

B. Perspectives

1. Détection de bactéries de type *Dickeya*

Les bactéries phytopathogènes telles que celles du genre *Dickeya* [147] sont responsables de maladies bactériennes chez les végétaux, dont l'impact économique peut être très important pour certaines cultures. Elles sont notamment à l'origine de la maladie de la « pourriture molle » engendrant des pertes de récoltes importantes (maïs, riz, pomme de terre, etc.). L'émergence d'espèces virulentes dans les cultures de pommes de terre entraîne un manque à gagner estimé à 2 millions d'euros par an en France. Dans ce contexte, il est essentiel de développer des outils d'étude du comportement bactérien et des méthodes de détection de pathogènes à la fois rapides et efficaces.

Pour répondre à cette problématique, nous proposons d'étendre les travaux présentés dans ce manuscrit à la détection de bactéries de type *Dickeya*. Ainsi, un appel à projet local a été remporté dans ce sens, en collaboration avec le laboratoire MAP

(Microbiologie, Adaptation et Pathogénie) rattaché à l'université Lyon 1. Des anticorps spécifiques à cette famille de bactéries ont été développés par le laboratoire MAP, et une souche bactérienne est actuellement en culture au laboratoire Ampère. Des travaux futurs devraient permettre d'adapter le protocole développé au chapitre précédent pour la détection de *dickeya* dans des échantillons d'eau, sans culture bactérienne préalable. L'équipe de Tameh et al. présente un biocapteur basé sur l'impédancemétrie capable de détecter des bactéries phytopathogènes dans de l'eau à une concentration de 10^4 CFU/mL [148]. Les travaux présentés dans le chapitre précédent suggèrent qu'il serait possible d'améliorer cette limite de détection d'au moins un ordre de grandeur.

2. Points d'amélioration du capteur fabriqué

a) Reproductibilité de la fonctionnalisation de surface

La fabrication d'un capteur SPR combinant des électrodes ainsi qu'une chimie de surface nous a montré que l'étape de fonctionnalisation de surface par la cystéamine a été la plus limitante dans nos expériences. En effet, la réussite du protocole dépend énormément de l'état de surface du dépôt métallique, ainsi que de nombreux autres paramètres expérimentaux (état de conservation des produits en particulier leur humidité, température…). L'Annexe 7 montre la comparaison de l'efficacité du protocole de fonctionnalisation par cystéamine sur des dépôts métalliques effectués à l'Université de Sherbrooke et sur des dépôts effectués par l'entreprise Schott (habituellement utilisés lors des expériences de SPR à l'IOGS). Une différence de signal SPR de l'ordre de 35 % est observée entre les dépôts testés, ce qui souligne l'importance de la qualité du substrat et de l'évaporation.

Bien maîtrisé à l'IOGS, le protocole de fonctionnalisation de surface par la cystéamine ne s'est pas montré pleinement satisfaisant au niveau de la reproductibilité lorsqu'il a été réalisé dans d'autres laboratoires. Dans ce manuscrit, seul ce protocole a été présenté pour la détection sélective de bactéries par SPR. Pour le futur projet concernant la détection de bactéries phytopathogènes dans l'eau, nous envisageons d'utiliser le protocole de fonctionnalisation par BSA-biotine, qui comporte moins d'étapes de chimies donc moins de sources d'erreurs. Malgré l'adsorption non-spécifique de bactéries en dehors des électrodes, cette méthode reste intéressante pour l'obtention de résultats préliminaires du fait de sa rapidité et sa simplicité de mise en place.

b) Régénération du capteur

La capture de bactéries sur des anticorps liés chimiquement à la surface des électrodes est irréversible. Les bactéries restent accrochées même si le débit de flux de rinçage est augmenté, ce qui fait que le capteur est à usage unique. Il serait donc intéressant de déterminer des conditions (pH, température…) dans lesquelles la liaison anticorps-bactérie puisse être rompue pour permettre aux bactéries de se détacher sans endommager les sondes, et donc d'obtenir un capteur réutilisable.

3. Détection de bactéries dans des milieux complexes

Les travaux présentés dans ce manuscrit présentent le piégeage et la détection de bactéries dans de l'eau DI, très peu conductrice. Pouvoir piéger et détecter des bactéries dans tout type de milieu permettrait d'étendre les applications des capteurs SPR avec transport de masse par DEP et ACEO [149]. Or, les milieux biologiques ont souvent des conductivités élevées. Les effets diélectrophorétique (sens et intensité de la force) sont fortement affectés par la conductivité du milieu, comme le montre le facteur de Clausius-Mossotti calculé pour différentes conductivités en Figure 6-1A.

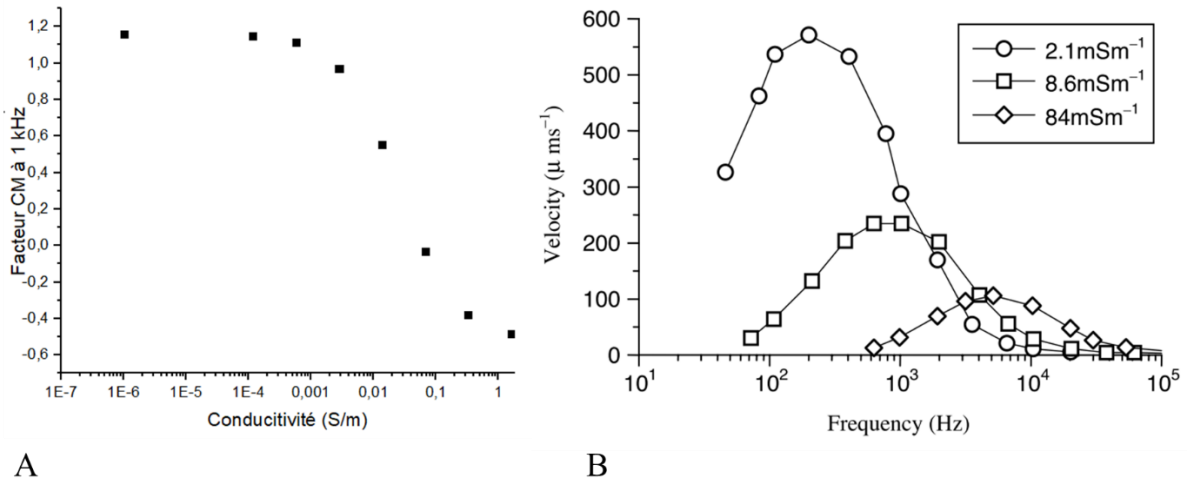


Figure 6-1A: Facteur de Clausius-Mossotti calculé à 1 kHz pour des bactéries de type e.coli pour différentes conductivités du milieu. B : Vitesse électroosmotique sur le bord d'électrodes de 100 µm espécées de 100 µm calculée pour différentes conductivités [104]

À l'inverse de la diélectrophorèse positive, la diélectrophorèse négative est favorisée par les milieux conducteurs. Pour piéger des bactéries dans ce type de milieu, on pourrait envisager d'utiliser la diélectrophorèse négative pour repousser les bactéries sur des zones d'or isolées comme décrit au Chapitre 4 pour le cas de cellules eucaryotes.

Concernant l'électro-osmose, une augmentation de la conductivité du milieu mène à un décalage vers les hautes fréquences de la fréquence correspondant à une vitesse de glissement sur les électrodes optimales (Figure 6-1B). Pour une conductivité de 0,1 S/m, cette fréquence optimale est de plusieurs dizaines de kHz, contre 1 kHz pour de l'eau DI (conductivité de l'ordre du µS/m). Cependant, les valeurs présentées en Figure 6-1B sont des valeurs calculées théoriquement d'après le modèle présenté au Chapitre 3. Or, il a été observé expérimentalement qu'augmenter la conductivité du milieu diminuait fortement la vitesse électro-osmotique. Lorsqu'un milieu est conducteur, l'épaisseur de la couche diffuse devient fine par rapport à celle de la couche de Stern. La chute de potentiel a donc lieu majoritairement dans la couche de Stern. Or la vitesse électro-

osmotique dépend de la densité de charges libres dans la couche diffuse, qui dépend de la chute de potentiel dans cette couche diffuse. Par conséquent, augmenter la conductivité d'une solution diminue la vitesse sur les électrodes.

De plus, les hautes conductivités favorisent le flux électrothermique. Ce flux intervient à des fréquences élevées (plus de 100 kHz), compatibles avec la diélectrophorèse négative pour des bactéries. De plus, les vortex de fluide induits par flux électrothermique sont dirigés du centre de l'électrode vers l'extérieur, repoussant les particules des électrodes. Ceci est donc compatible avec la configuration d'électrodes pour la diélectrophorèse négative utilisées au Chapitre 4 pour les cellules eucaryotes, avec une zone d'or non polarisée sur laquelle la détection SPR est faite. Pour piéger des bactéries dans des milieux complexes, il est donc envisageable d'utiliser la diélectrophorèse négative et le flux électrothermique comme méthode de transport de masse sur un capteur plasmonique.

4. Fonctionnalisation de surface assistée par diélectrophorèse

Au Chapitre 1, nous avons vu que la qualité de la fonctionnalisation de surface est un des point clés pour une détection sensible et spécifiques d'espèces chimiques ou biologiques. En particulier, un taux de couverture élevé de sondes sur la surface sensible du capteur garantit un nombre élevé de cibles capturées, donc une sensibilité optimale pour le biocapteur. Les effets d'un champ électrique sur la fonctionnalisation chimique de films métalliques ont été peu étudiés. Un article récent suggère que l'utilisation d'un champ électrique continu permet de contrôler l'orientation de sondes sur une surface [150]. De plus, la capture d'anticorps par diélectrophorèse sur des électrodes est possible, en utilisant des fréquences supérieurs à 100 kHz [151]. Cependant, la diélectrophorèse est une force de courte portée, dont l'intensité diminue avec la taille des objets cibles. Il serait donc plus intéressant d'utiliser le flux électro-osmotique pour immobiliser un plus grand nombre de sondes sur la surface des électrodes. Les effets combinés de diélectrophorèse et d'électro-osmose ont permis de piéger sur des électrodes des molécules de BSA [99]. Si des molécules de BSA peuvent être piégées, cela signifie qu'il est potentiellement possible de piéger d'autres molécules utilisées comme sondes lors des étapes de fonctionnalisation de surface comme des anticorps par exemple. Cela permettrait d'atteindre une haute densité de cibles sur la surface de l'électrode, et ainsi gagner en sensibilité. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons réalisé le protocole de fonctionnalisation de surface décrit en Figure 5-7 jusqu'à l'étape numéro 3. Ensuite, le substrat fonctionnalisé est installé dans le banc optique commercial Horiba, et un léger flux de 10 µL/min est appliqué. Les connexions électriques sont effectuées en configuration interdigitée, car ce banc optique ne permet pas l'utilisation d'une contre-électrode plane en haut de la cellule fluidique. Le signal SPR mesuré sur des électrodes et sur une zone sans champ électrique est représenté en Figure 6-2. Une solution d'eau DI contenant des anticorps biotinylés à une concentration de 1 µM est injectée, puis une tension de 5 V_{pp} est appliquée entre les électrodes. Après

rinçage à l'eau DI, une variation de la réflectivité de 3 % est observée sur les électrodes, alors que cette variation n'est que de 0,2 % sur la zone sans champ électrique.

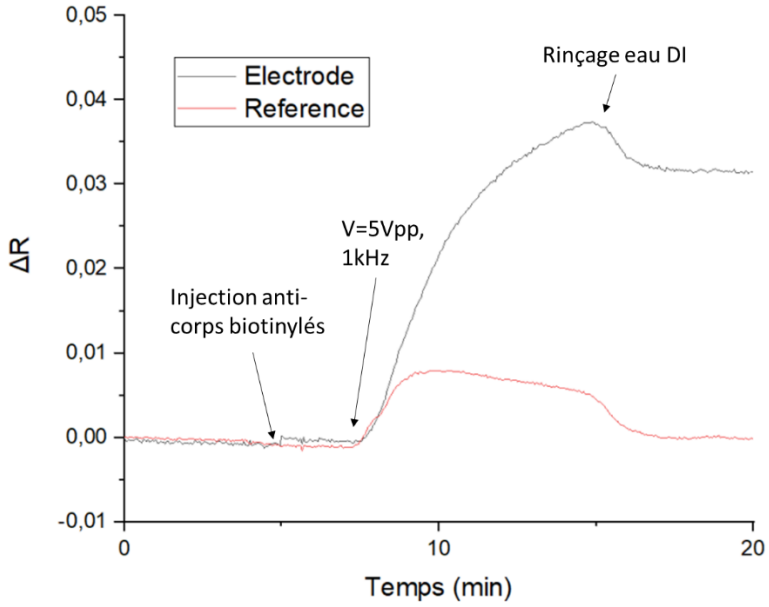


Figure 6-2 : Comparaison su signal SPR mesuré avec champ électrique (en noir) et sans champ électrique (en rouge) après injection d'anticorps biotinylés sur une lame

Ces résultats préliminaires suggèrent que le brassage électro-osmotique ainsi que la force de diélectrophorèse permettent d'augmenter la densité de sondes sur une électrode, et donc d'obtenir une meilleure sensibilité lors de la détection de cibles. De plus, l'imagerie SPR des électrodes permet de visualiser en temps réel l'accroche des sondes sur la surface métallique, et donc d'évaluer l'homogénéité de la fonctionnalisation sur surface, ainsi que la densité de sondes déposées. Des expériences complémentaires sont nécessaires pour confirmer ce résultat et mieux comprendre la contribution de chaque effet (DEP et ACEO) dans l'immobilisation de sondes sur un substrat fonctionnalisé.

5. Intégration des effets électrocinétiques sur des substrats nanostructurés

Dans ce manuscrit, nous avons uniquement travaillé avec des plasmons de surface propagatifs, c'est-à-dire que les structures d'or utilisées comme électrodes ont une taille largement supérieure (≈ 100 µm) à la longueur de propagation du mode plasmonique de surface (≈ 10 µm). Dans ces conditions, le mode plasmonique se propage à l'interface entre un métal et un diélectrique. Si la dimension des structures d'or est de l'ordre de la longueur d'onde de la lumière incidente, le plasmon est dit localisé [3], [5]. Un plasmon localisé est une oscillation stationnaire des charges de surface d'une nanoparticule métallique. De nombreuses études mettent aujourd'hui en avant l'utilisation de plasmons localisés via des nano-particules métalliques car d'un point de vue instrumental, ce type d'expérience ne nécessite pas de montage optique complexe, et offre donc plus de possibilité de miniaturisation. En effet, les plasmons localisés ne nécessitent pas de prisme et peuvent être excités par une lumière se propageant en espace libre, sans angle préférentiel. De plus, la force de diélectrophorèse dépend du gradient du champ électrique. Or celui-ci augmente si la taille des électrodes diminue, permettant de capturer des objets de petite taille comme des molécules. Combiné à une fonctionnalisation de surface assistée par diélectrophorèse et électro-osmose présentée au paragraphe précédent, un tel dispositif (présenté en Figure 6-3) pourrait attirer vers les zones de fort champ électrique à la fois les sondes (les anticorps) et les espèces cibles.

Il est aussi envisageable d'utiliser l'augmentation locale de champ électrique due à la présence d'un plasmon pour à la fois piéger et détecter des molécules [92], [152], [153]. L'excitation d'un plasmon localisé peut être réalisée sur un substrat nano-structuré, ou bien sur des nano-particules métalliques [154]. Ajouter des effets électrocinétiques pour favoriser le brassage des espèces cibles avec les nano-particules pourrait

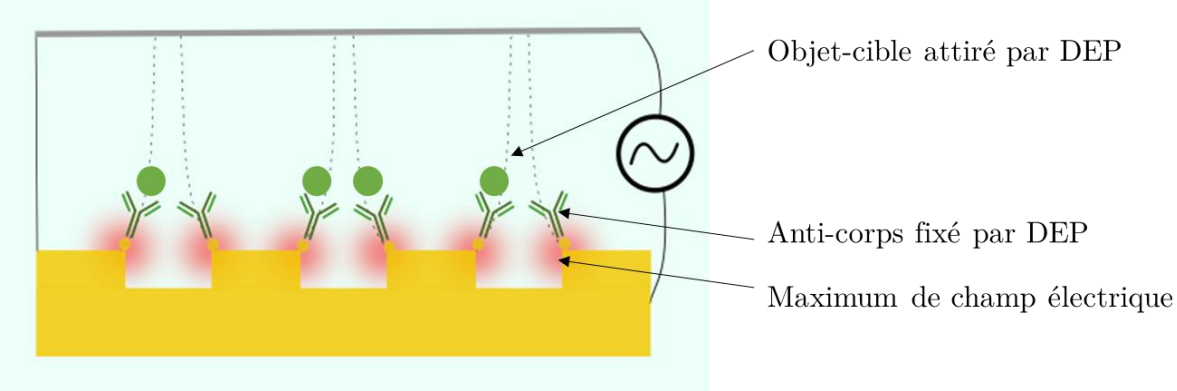


Figure 6-3 : nano-structures d'or permettant à la fois le piégeage de sondes (anticorps) par DEP, et le piégeage ainsi que la détection de cibles sur les zones de fort champ électrique.

contribuer à une détection plus rapide et plus sensible.

Chapitre 7. Annexes

Annexe 1 : Liste des entreprises commercialisant des capteurs SPR

Entreprise	**Domaine d'expertise**	**Coordonnées**
BioNavis	Science des matériaux Sciences de la vie	http://www.bionavis.com/ BioNavis Ltd, Hermiankatu 6-8 H 33720 Tampere Finland
iClueBio	Détection de nanomatériaux, protéines, ADN, diagnostic du cancer (en développement)	http://www.icluebio.com/ 1204, Ace High-end 1-cha, 5, Digital-ro 26-gil, Guro-gu, Seoul, South Korea
Nicoya Lifesciences	Recherche pharmacologique, intéraction protéine/anticorps	https://nicoyalife.com/ 226-283 Duke St West Kitchener, ON, Canada N2H 3X7
Biosensing Intrument	Sciences de la vie, électrochimie, environnement	http://biosensingusa.com/ 1007 E. Warner Road, Suite 102, Tempe, AZ 85284, USA
Bioptix	Recherche pharmacologique, intéraction protéine/anticorps	http://www.bioptixanalytical.com/
Creative Peptides	Service de SPRI	https://www.creative-peptides.com/ 45-16 Ramsey Road, Shirley, NY 11967, USA
Reichert technologies	Recherche pharmacologique, analyse cellulaire	https://www.reichertspr.com/
Creoptix sensors	Recherche pharmacologique	https://www.creoptix.com/ Einsiedlerstrasse 34 CH-8820 Wädenswil Switzerland
Horiba	SPRI, intéraction moléculaire	www.horiba.com
Affinité Instruments	Bancs SPR compacts et abordables	https://affiniteinstruments.com/ Montréal

Annexe 2 : Paramètres des simulations COMSOL

Paramètres utilisés pour le calcul du facteur CM (pour des bactéries)

Conductivité du milieu	$5{,}5.10^{-6}$ S/m
Permittivité relative du milieu	78
Diamètre de la particule	1 µm
Conductivité cytoplasme	0,48 S/m
Permittivité cytoplasme	49,8 SMm
Épaisseur de la membrane	8 nm
Conductivité de la membrane	$2{,}59.10^{-4}$ S/m
Permittivité de la membrane	9,8
Épaisseur de la paroi	50 nm
Conductivité de la paroi	0,058 S/m
Permittivité de la paroi	78

Paramètres électriques

Potentiel appliqué aux électrodes	5 V
Fréquence du champ électrique	1 kHz
Épaisseur de la double couche électrique	1 µm

Maillage

Taille minimale d'élément sur les électrodes : 5nm. Taille maximale : 0,1 µm.

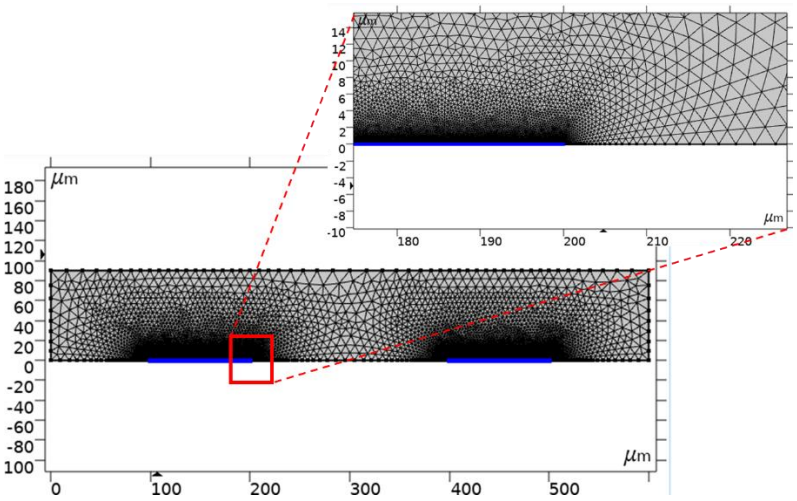


Figure 7-1 : Maillage triangulaire libre utilisé pour les simulations du Chapitre 3.

Annexe 3 : Fabrication des électrodes

Nettoyage des substrats de verre

- Les lames Fisher Premium 75 mm*25 mm (Fisher Scientific) sont pongées 5 min dans un bain bain à ultrasons d'isopropanol (5 min), dans un bain d'acétone (5 min) puis rincées à l'eau ultrapure
- Elles sont ensuite plongées dans une solution Piranha (H_2O_2/H_2SO_4 1 :2) pendant 10 min, puis rincées abondamment à l'eau ultrapure

Évaporation

Les dépôts métalliques sont faits par l'équipe technique de la salle blanche du 3iT, sur un évaporateur Edwards (canon à électrons).

- Une couche d'accroche de 3 nm de chrome est déposée à uen vitesse de 0,1 nm/s
- Une couche d'or de 50 nm d'épaisseur est déposée à une vitesse de 0,3 nm/s

Photolithographie

Les étapes de la photolithographie pour la formation des électrodes sont les suivantes :

- Spin coating résine AZ5214 (Michrochemicals) pendant 30 secondes, à 1500 tours/minute
- Recuit 110 °C, 1 min 30
- Exposition aux UV avec le masque, 4 secondes
- Développement 1 minute dans un bain d'AZ MIF 326 (Michrochemicals)

Gravure humide

- Les échantillons sont plongés dans un bain de Gold Etchant standard (sigma aldrich pendant 30 secondes
- Puis dans un bain de Chromium Etchant pendant 5 secondes.
- Rinçage eau ultrapure
- Enfin, les échantillons sont passés dans un bain d'acétone aux ultrasons pendant 5 min, puis rincés à l'eau ultrapure et séchés sous flux d'azote.

Annexe 4 : Protocole de culture cellulaire : cellules HEK293

Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées dans un incubateur à 37°C et 5% de CO_2, dans un milieu de DMEM (Dulbecco's modified Eagle's Medium) contenant :

-10% de sérum de veau fœtal

-100 µg/mL de streptomycine

-100 unités/mL de peniciline.

Préparation des échantillons avant les expériences SPR-DEP

Avant chaque expérience, les cellules sont détachées avec une solution de PBS contenant 0.05% de trypsine et 0.02% d'EDTA.

Ensuite, les cellules sont centrifugées, puis re-suspendues dans un milieu peu conducteur fait d'eau DI, de 8,5% de sucrose et de de 0.3% de dextrose pour respecter les conditions d'osmolarité.

Annexe 5 : Protocole culture bactérienne

Conservation des bactéries

Les bactéries sont des bactéries *e.coli* de souche NEB 5-α. Elles sont conservées dans un mélange 50 % LB-Broth (ThermoFisher) et 50 % glycérol à -80 °C

Culture bactérienne et préparation des échantillons

Les bactéries sont cultivées en milieu liquide (LB Broth) avec 100 µg/mL d'ampiciline, à 37 °C pendant 24 heures.

Pour la préparation des expériences de DEP et ACEO, une partie du milieu contenant les bactéries est centrifugée. Après retrait du surnageant, les bactéries sont re-suspendues dans de l'eau DI. Une deuxième étape de centrifugation est effectuée pour rincer une nouvelle fois les bactéries. Ensuite, les bactéries sont diluées à la concentration voulue dans de l'eau DI.

Annexe 6 : Protocole de fabrication des canaux en PDMS

Fabrication du moule

Les étapes suivantes décrivent la formation du moule d'un canal sur une lame de verre.

- Le dessin des canaux est dans un premier temps imprimé sur un masque en acétate. Un film sec photosensible (Laminar™ E92200 dry film) est laminé sur une lame de microscope en verre de 75*25 mm. Ce film a une épaisseur de 50 µm.
- La lame de verre et le film sont exposés aux UV pendant 10 secondes à travers le masque.
- Puis, un recuit de 3 minutes à 100 °C est effectué
- Le développement se fait par immersion dans une solution aqueuse de carbonate de calcium à une concentration de 0,85% (m/m)

Fabrication du PDMS

- L'élastomère de silicone (Sylgard 184, sigma-aldrich) et l'agent réticulant sont mélangés dans des proportions 90% et 10%.
- Pour enlever les bulles, le PDMS est transféré dans un tube de 50 mL et centrifugé à 2400 tours/minute pendant 5 minutes
- Le PDMS est ensuite coulé sur le moule fabriqué précédemment, et cuit à 80°C pendant 2 heures

Fabrication des canaux

- Le PDMS durci est décollé du moule
- Une entrée et une sortie sont percées dans le PDMS à chaque extrémité des canaux moulés
- Une lame de verre propre ainsi que le PDMS sont placés dans la chambre d'un nettoyeur plasma, et exposés pendant 30 secondes à un plasma d'air.
- Dans les secondes qui suivent l'extraction du PDMS et de la lame de verre du nettoyeur plasma, le PDMS et déposé sur la lame de verre. Le collage est immédiat.
- Des tuyaux en Tygon sont connectés aux trous formant les entrées et sorties des canaux, le tuyau d'entrée est connecté à une seringue montée sur un pousse-seringue.

Annexe 7 : Comparaison des substrats pour la fonctionnalisation de surface

Pour déterminer l'influence du substrat sur l'efficacité du protocole de fonctionnalisation, deux substrats de différentes provenances ont été utilisés

- Un substrat habituellement utilisé par le LCF, ce sont des lames de verre commercialisées par Schott, dont le dépôt d'or par évaporation a été réalisé par la même entreprise spécialement pour cette commande
- Un substrat de verre de marque Fisher, nettoyé puis dont le dépôt de chrome (5nm) puis d'or (47 nm) ont été effectués dans la salle blanche du 3iT (Université de Sherbrooke). Ce type de substrat a été utilisé dans toutes les expériences présentées aux chapitres précédents

Des cibles d'oligonucléotides ont été immobilisées sur chaque substrat grâce au protocole de fonctionnalisation de surface par cystéamine présenté au Chapitre 4. Deux séquences de cibles ayant différentes cinétiques d'interaction avec les sondes sont injectées successivement, et le signal SPR sur chaque substrat est représenté en Figure 7-2. Dans un premier temps, des sondes s'hybridant en bas de la séquence sonde sont injectées lors d'une étape de calibration durant les 10 premières minutes. Ensuite, des cibles s'hybridant avec la partie haute de l'oligonucléotide, appelées WT, sont injectées entre 10 et 18 minutes. La différence de signal SPR mesuré à t = 16 minutes, après hybridation des cibles WT est de l'ordre de 35 % plus faible pour les dépôts faits au 3iT à Sherbrooke.

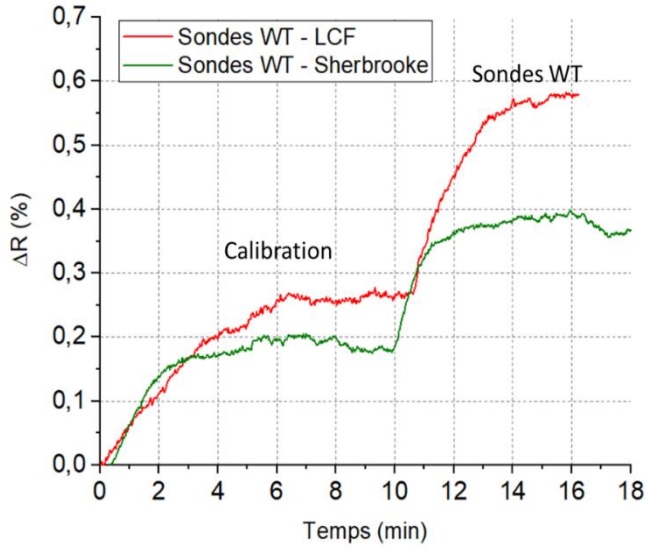


Figure 7-2 : Signal SPR mesuré sur deux échantillons différents (fabrication Université de Sherbrooke en vert, fabrication par Schott en rouge) lors de l'injection d'une séquence d'oligonucléotides de calibration et d'une séquence de test

Plusieurs facteurs peuvent expliquer cette importante différence. Le premier facteur ne dépend pas de la chimie de surface, mais de la sensibilité du capteur SPR, qui dépend de l'épaisseur d'or déposée. Les deux lames sont supposées avoir une épaisseur de dépôt d'or déposées de 50 nm, mais des variations sont possibles, selon le protocole de dépôt utilisé. Ensuite, pour de faibles épaisseurs d'or déposé, la rugosité de base du substrat de verre se retrouve sur la rugosité du film métallique, ce qui peut dégrader la qualité de la monocouche auto-assemblée de thiols sur l'or. D'éventuelles impuretés dans l'or déposé peuvent également affecter la régularité de cette couche. Différents types de défauts et leur influence sur la monocouche auto-assemblée sont représentés en Figure 7-3.

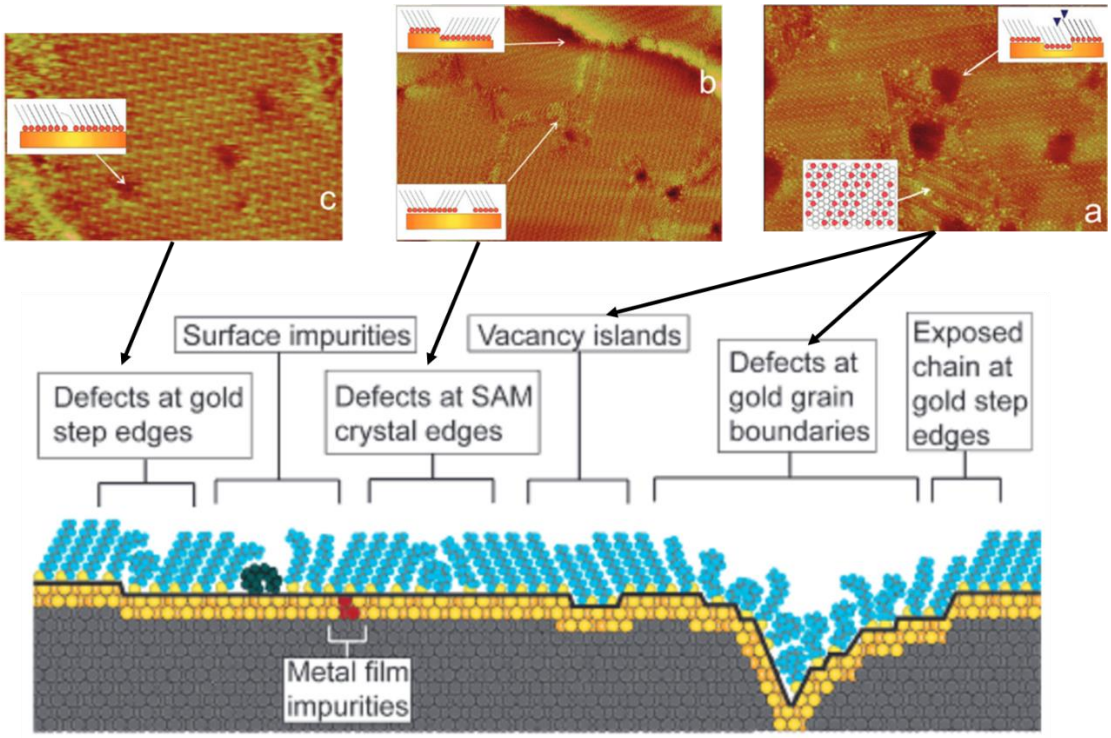


Figure 7-3 : Représentation schématique de différents défauts d'une monocouche auto assemblée de thiol sur une surface d'or (adapté de [155]), ainsi que des images en microscopie à effet tunnel correspondant à ces défauts (adapté de [156])

Annexe 8 : Liste des communications scientifiques

Articles dans des revues internationales (RI) à comité de lecture

[RI-1] **M. Costella**, Q. Avenas, M. Frénéa-Robin, J. Marchalot, J. Moreau, P. Bevilacqua, P. Charette, and M. Canva. *Electrophoresis*, **2019**, *40*, 1417-1425, Dielectrophoretic cell trapping for enhanced Surface Plasmon Resonance Imaging Sensing.

[RI-2] Q. Avenas , J. Moreau, **M. Costella**, A. Maalaoui, A. Souifi, P. Charette, J. Marchalot, M. Frénéa-Robin, M. Canva, *Electrophoresis*, **2019**, *40*, 1426-1435, Performance improvement of plasmonic sensors using a combination of AC electrokinetic effects for (bio)target capture.

Proceedings

[P-1] **M. Costella**, M. Frénéa-Robin, J. Marchalot, J. Moreau, O. Andreiev, P. Charette, and M. Canva. *Proc. SPIE. 11257, Plasmonics in Biology and Medicine XVII,* **2020**, Surface Plasmon Resonance imaging enhanced by active mass transport.

Communications dans des conférences internationales (CI) à comité de lecture

- **Communications orales (l'auteur orateur est souligné)**

[CI-1] **M. Costella**, J. Marchalot, M. Frénéa-Robin, J. Moreau, O. Andreiev, P. Charette, and M. Canva. ***Dielectrophoresis 2020****, July 20-22, Flagstaff (USA).* Sensitive detection of bacteria with surface plasmon resonance imaging enhanced with AC electrokinetic mass transport.

[CI-2] **M. Costella**, M. Frénéa-Robin, J. Marchalot, J. Moreau, O. Andreiev, P. Charette, and M. Canva. ***Photonics Europe****, March 2020 Strasbourg (France).* Surface plasmon resonance imaging enhanced by dielectrophoresis and AC-electroosmosis for rapid and label-free bacteria detection.

[CI-3] **M. Costella**, M. Frénéa-Robin, J. Marchalot, J. Moreau, O. Andreiev, P. Charette, and M. Canva. ***SPIE BIOS****, February 2020, San Francisco (USA).* Surface Plasmon Resonance imaging enhanced by active mass transport.

[CI-4] **M. Costella**, M. Frénéa-Robin, J. Marchalot, J. Moreau, O. Andreiev, P. Charette, and M. Canva. ***Photonics North****, May 2019, Québec (Canada).* Surface Plasmon Resonance biosensors enhanced by active mass transport.

- **Présentations par affiche**

[CI-5] O. Andreiev, **M. Costella**, M. Frénéa-Robin, J. Marchalot, A. Ramos, P. Charette, J-P. Cloarec, M. Canva. ***Dielectrophoresis 2020****, July 20-22, Flagstaff*

(USA). A study of optimal electrode design for electric field driven target capture in SPR biosensors.

[CI-6] **M. Costella**, M. Frénéa-Robin, J. Marchalot, J. Moreau, O. Andreiev, P. Charette, and M. Canva, *23rd International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (**µTAS 2019**), October 2019, Bâle (Suisse).* Surface plasmon resonance imaging enhanced by dielectrophoresis and AC-electroosmosis.

[CI-7] **M. Costella**, Quentin Avenas, Marie Frénéa-Robin, Julien Marchalot, Paul Charette and Michael Canva, ***Dielectophoresis 2018**, July 2018, Surrey (UK).* Dielectrophoretic cell trapping for improved surface plasmon resonance sensing. https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01945997.

Prix du meilleur poster

Participation à des colloques nationaux (CN)

[CN-1] **M. Costella**, Quentin Avenas, Marie Frénéa-Robin, Julien Marchalot, Paul Charette and Michael Canva, *Colloque du LN2, Avril 2018, Autrans (France).* Dielectrophoretic cell trapping for improved surface plasmon resonance sensing.

Bibliographie

[1] Q. Avenas, “Intégration d’une fonction d’actuation électrohydrodynamique sur capteur plasmonique,” 2017.

[2] M. A. Cooper, “Optical biosensors in drug discovery,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. 7, pp. 515–528, 2002.

[3] B. Sepúlveda, P. C. Angelomé, L. M. Lechuga, and L. M. Liz-Marzán, “LSPR-based nanobiosensors,” *Nano Today*, vol. 4, no. 3, pp. 244–251, 2009.

[4] G. Raschke *et al.*, “Biomolecular recognition based on single gold nanoparticle light scattering,” *Nano Lett.*, vol. 3, no. 7, pp. 935–938, 2003.

[5] J. R. Mejia-Salazar and O. N. Oliveira, “Plasmonic Biosensing,” *Chem. Rev.*, vol. 118, no. 20, pp. 10617–10625, 2018.

[6] S. Deng, P. Wang, and X. Yu, “Phase-sensitive surface plasmon resonance sensors: Recent progress and future prospects,” *Sensors*, vol. 17, no. 12, 2017.

[7] J. W. Chung, S. D. Kim, R. Bernhardt, and J. C. Pyun, “Application of SPR biosensor for medical diagnostics of human hepatitis B virus (hHBV),” *Sensors Actuators B*, vol. 111–112, pp. 416–422, 2005.

[8] S. Kim and H. J. Lee, “Gold Nanostar Enhanced Surface Plasmon Resonance Detection of an Antibiotic at Attomolar Concentrations via an Aptamer-Antibody Sandwich Assay,” *Anal. Chem.*, vol. 89, no. 12, pp. 6624–6630, 2017.

[9] Y. Zeng *et al.*, “Recent advances in surface plasmon resonance imaging: Detection speed, sensitivity, and portability,” *Nanophotonics*, vol. 6, no. 5, pp. 1017–1030, 2017.

[10] “Commercializing plasmonics,” *Nat. Photonics*, vol. 9, no. 8, p. 477, 2015.

[11] P. Singh, “Surface plasmon resonance market,” *Future Market Insights*, 2019.

[12] R. W. Wood, “On a remarkable case of uneven distribution of light in a diffraction grating spectrum,” *Proc. Phys. Soc. London*, vol. 18, pp. 269–275, 1902.

[13] Lord Rayleigh, “ III. Note on the remarkable case of diffraction spectra described by Prof. Wood ,” *London, Edinburgh, Dublin Philos. Mag. J. Sci.*, vol. 14, no. 79, pp. 60–65, 1907.

[14] J. Strong, “Effect of evaporated films on energy distribution in grating spectra,” *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 49, p. 291, 1936.

[15] U. Fano, “The Theory of Anomalous Diffraction Gratings and of Quasi-Stationary Waves on Metallic Surfaces (Sommerfeld’s Waves),” *J. Opt. Soc. Am.*, vol. 31, pp. 213–222, 1941.

[16] A. Hessel and A. A. Oliner, “A New Theory of Wood’s Anomalies on Optical

Gratings," *Appl. Opt.*, vol. 4, no. 10, p. 1275, 1965.

[17] R. H. RITCHIE, "Plasma Losses by Fast Electrons in Thin Films," *Phys. Rev.*, vol. 106 N.5, no. 5, p. 8, 1956.

[18] E. Kretschmann and H. Raether, "Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light," *Z. Naturforsch.*, vol. 23, no. November 1968, pp. 2135–2136, 1968.

[19] B. Liedberg, C. Nylander, and I. Lundstrom, "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing," *Sensors and actuators*, vol. 4, pp. 299–304, 1983.

[20] Y. Xinglong, W. Dingxin, and Y. Zibo, "Simulation and analysis of surface plasmon resonance biosensor based on phase detection," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 91, no. 1–3, pp. 285–290, 2003.

[21] Z. Wang *et al.*, "Stable and sensitive silver surface plasmon resonance imaging sensor using trilayered metallic structures," *Anal. Chem.*, vol. 86, no. 3, pp. 1430–1436, 2014.

[22] P. Lecaruyer, E. Maillart, M. Canva, and J. Rolland, "Generalization of the Rouard method to an absorbing thin film stack and application to surface plasmon resonance," *Appl. Opt. Opt. Soc. Am.*, vol. 45, no. 33, pp. 8419–8423, 2006.

[23] S. Ogawa, S. Fukushima, and M. Shimatani, "Graphene plasmonics in sensor applications: A review," *Sensors (Switzerland)*, vol. 20, no. 12, pp. 1–21, 2020.

[24] B. Wang, X. Zhang, F. J. García-Vidal, X. Yuan, and J. Teng, "Strong coupling of surface plasmon polaritons in monolayer graphene sheet arrays," *Phys. Rev. Lett.*, vol. 109, no. 7, pp. 1–5, 2012.

[25] C. Rhodes *et al.*, "Surface plasmon resonance in conducting metal oxides," *J. Appl. Phys.*, vol. 100, no. 5, 2006.

[26] N. Bassil *et al.*, "One hundred spots parallel monitoring of DNA interactions by SPR imaging of polymer-functionalized surfaces applied to the detection of cystic fibrosis mutations," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 94, no. 3, pp. 313–323, 2003.

[27] C. Walgama *et al.*, "Label-Free Real-Time Microarray Imaging of Cancer Protein-Protein Interactions and Their Inhibition by Small Molecules," *Anal. Chem.*, vol. 88, no. 6, pp. 3130–3135, 2016.

[28] M. Trzaskowski, A. Napiórkowska, E. Augustynowicz-Kopeć, and T. Ciach, "Detection of tuberculosis in patients with the use of portable SPR device," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 260, pp. 786–792, 2018.

[29] J. Homola, "Surface plasmon resonance sensors for detection of chemical and biological species," *Chem. Rev.*, vol. 108, no. 2, pp. 462–493, 2008.

[30] A. D. Taylor, J. Ladd, Q. Yu, S. Chen, J. Homola, and S. Jiang, "Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor," *Biosens. Bioelectron.*, 2006.

[31] M. Piliarik, L. Párová, and J. Homola, "High-throughput SPR sensor for food safety," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 24, no. 5, pp. 1399–1404, 2009.

[32] F. C. Dudak and I. H. Boyaci, "Rapid and label-free bacteria detection by surface plasmon resonance (SPR) biosensors," *Biotechnol. J.*, vol. 4, no. 7, pp. 1003–1011, 2009.

[33] T. Brulé *et al.*, "A field-deployed surface plasmon resonance (SPR) sensor for RDX quantification in environmental waters," *Analyst*, vol. 142, no. 12, pp. 2161–2168, 2017.

[34] S. Herranz, M. Bocková, M. D. Marazuela, J. Homola, and M. C. Moreno-Bondi, "An SPR biosensor for the detection of microcystins in drinking water," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 398, no. 6, pp. 2625–2634, 2010.

[35] X. Liu, C. Cheng, J. Wu, S. Eda, and Y. Guo, "A low cost and palm-size analyzer for rapid and sensitive protein detection by AC electrokinetics capacitive sensing," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 90, no. August 2016, pp. 83–90, 2017.

[36] D. Abdelhadi *et al.*, "A Rapid and Quantitative Serum Test for SARS-CoV-2 Antibodies with Portable Surface Plasmon Resonance Sensing," *chemRxiv*, no. 1, pp. 0–13, 2020.

[37] O. Tokel *et al.*, "Portable Microfluidic Integrated Plasmonic Platform for Pathogen Detection," *Sci. Rep.*, vol. 5, pp. 1–9, 2015.

[38] C. L. Wong and M. Olivo, "Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors: A Review," *Plasmonics*, vol. 9, no. 4, pp. 809–824, 2014.

[39] M. Bockovaacute, J. Slabyacute, T. Scaronpringer, and J. Homola, "Advances in Surface Plasmon Resonance Imaging and Microscopy and Their Biological Applications," *Annu. Rev. Anal. Chem.*, vol. 12, pp. 151–176, 2019.

[40] E. Fu, T. Chinowsky, K. Nelson, and P. Yager, "SPR Imaging for Clinical Diagnostics," in *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, RCS Publishing, 2008, pp. 313–332.

[41] P. Lecaruyer and M. Canva, "Biopuces dynamiques et imagerie en mode de plasmon de surface," *Tech. l'ingénieur*, vol. 33, no. 0, p. 15, 2008.

[42] F. A. Banville, J. Moreau, M. Sarkar, M. Besbes, M. Canva, and P. G. Charette, "Spatial resolution versus contrast trade-off enhancement in high-resolution surface plasmon resonance imaging (SPRI) by metal surface nanostructure design," *Opt. Express*, vol. 26, no. 8, p. 10616, 2018.

[43] F. A. Banville *et al.*, "Nanoplasmonics-enhanced label-free imaging of endothelial cell monolayer integrity," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 141, no.

March, p. 111478, 2019.

[44] E. Suraniti *et al.*, "Real-time detection of lymphocytes binding on an antibody chip using SPR imaging.," *Lab Chip*, vol. 7, no. 9, pp. 1206–1208, 2007.

[45] M. Boulade *et al.*, "Early detection of bacteria using SPR imaging and event counting: Experiments with: Listeria monocytogenes and Listeria innocua," *RSC Adv.*, vol. 9, no. 27, pp. 15554–15560, 2019.

[46] M. Piliarik and J. Homola, "Surface plasmon resonance (SPR) sensors: approaching their limits?," *Opt. Express*, vol. 17, no. 19, p. 16505, 2009.

[47] P. E. Sheehan and L. J. Whitman, "Detection limits for nanoscale biosensors," *Nano Lett.*, vol. 5, no. 4, pp. 803–807, 2005.

[48] P. Schuck, "Reliable determination of binding affinity and kinetics using surface plasmon resonance biosensors," *Curr. Opin. Biotechnol.*, vol. 8, pp. 498–502, 1997.

[49] T. M. Squires, R. J. Messinger, and S. R. Manalis, "Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors," *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, no. 4, pp. 417–426, Apr. 2008.

[50] J. Moreau, J.-P. Cloarec, P. Charette, M. Goossens, M. Canva, and T. Vo-Dinh, "Surface Plasmon Resonance Imaging Sensors: Principle, Development, and Biomedical Applications— Example of Genotyping," in *Biomedical Photonics Handbook: Biomedical Diagnostics*, CRC Press., 2010, pp. 159–175.

[51] T. Gervais and K. F. Jensen, "Mass transport and surface reactions in microfluidic systems," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 61, no. 4, pp. 1102–1121, 2006.

[52] C. Liu, F. Hu, W. Yang, J. Xu, and Y. Chen, "A critical review of advances in surface plasmon resonance imaging sensitivity," *TrAC - Trends Anal. Chem.*, vol. 97, pp. 354–362, 2017.

[53] J. Zhang *et al.*, "What can orthogonal surface functionalizations provide to point-of-care testing?," in *Biophotonics in Point-Of-Care, vol 11351*, 2020.

[54] D. Mottin, F. Razan, M. Jullien, D. Mottin, F. Razan, and M.-C. Jullien, "Capture de particules solides par une surface en microcanal," in *24ème Congrès Français de Mécanique*, 2019.

[55] M. A. Daniele, D. A. Boyd, D. R. Mott, and F. S. Ligler, "3D hydrodynamic focusing microfluidics for emerging sensing technologies," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 67, pp. 25–34, 2015.

[56] N. Watkins, B. M. Venkatesan, M. Toner, W. Rodriguez, and R. Bashir, "A robust electrical microcytometer with 3-dimensional hydrofocusing," *Lab Chip*, vol. 9, no. 22, pp. 3177–3184, 2009.

[57] M. Hejazian, D. T. Phan, and N. T. Nguyen, "Mass transport improvement in microscale using diluted ferrofluid and a non-uniform magnetic field," *RSC*

Adv., vol. 6, no. 67, pp. 62439–62444, 2016.

[58] F. De Angelis *et al.*, "Breaking the diffusion limit with super-hydrophobic delivery of molecules to plasmonic nanofocusing SERS structures," *Nat. Photonics*, vol. 5, no. 11, pp. 682–687, 2011.

[59] P. Ohlsson, K. Petersson, P. Augustsson, and T. Laurell, "Acoustic impedance matched buffers enable separation of bacteria from blood cells at high cell concentrations," *Sci. Rep.*, vol. 8, pp. 1–11, 2018.

[60] E. Galopin, M. Beaugeois, B. Pinchemel, J. C. Camart, M. Bouazaoui, and V. Thomy, "SPR biosensing coupled to a digital microfluidic microstreaming system," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 23, no. 5, pp. 746–750, 2007.

[61] A. Renaudin, V. Chabot, E. Grondin, V. Aimez, and P. G. Charette, "Integrated active mixing and biosensing using surface acoustic waves (SAW) and surface plasmon resonance (SPR) on a common substrate," *Lab Chip*, vol. 10, no. 1, pp. 111–115, 2010.

[62] P. L. Guo, M. Tang, S. L. Hong, X. Yu, D. W. Pang, and Z. L. Zhang, "Combination of dynamic magnetophoretic separation and stationary magnetic trap for highly sensitive and selective detection of Salmonella typhimurium in complex matrix," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 74, pp. 628–636, 2015.

[63] J. Gómez-Pastora, I. H. Karampelas, E. Bringas, E. P. Furlani, and I. Ortiz, "Numerical Analysis of Bead Magnetophoresis from Flowing Blood in a Continuous-Flow Microchannel: Implications to the Bead-Fluid Interactions," *Sci. Rep.*, vol. 9, pp. 1–13, 2019.

[64] S. Menad *et al.*, "From bipolar to quadrupolar electrode structures: An application of bond-detach lithography for dielectrophoretic particle assembly," *Langmuir*, vol. 30, no. 19, pp. 5686–5693, 2014.

[65] M. L. Y. Sin, T. Liu, J. D. Pyne, V. Gau, J. C. Liao, and P. K. Wong, "In situ electrokinetic enhancement for self-assembled-monolayer-based electrochemical biosensing," *Anal. Chem.*, vol. 84, no. 6, pp. 2702–2707, 2012.

[66] R. T. Kelly and A. T. Wooley, "Electric field gradient focusing," *J. Sep. Sci.*, vol. 28, no. 15, pp. 1985–1993, 2005.

[67] J. Shi *et al.*, "Three-dimensional continuous particle focusing in a microfluidic channel via standing surface acoustic waves (SSAW)," *Lab Chip*, vol. 11, no. 14, pp. 2319–2324, 2011.

[68] J. J. Hawkes, M. J. Long, W. T. Coakley, and M. B. McDonnell, "Ultrasonic deposition of cells on a surface," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 19, no. 9, pp. 1021–1028, 2004.

[69] P. L. Guo, M. Tang, S. L. Hong, X. Yu, D. W. Pang, and Z. L. Zhang, "Combination of dynamic magnetophoretic separation and stationary magnetic trap for highly sensitive and selective detection of Salmonella typhimurium in

complex matrix," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 74, pp. 628–636, 2015.

[70] F. Chen, N. Haddour, M. Frenea-Robin, Y. Chevolot, and V. Monnier, "Electroactive magnetic nanoparticles under magnetic attraction on a microchip electrochemical device," *J. Magn. Magn. Mater.*, vol. 475, no. June 2018, pp. 345–351, 2019.

[71] A. T. Reiner, N. G. Ferrer, P. Venugopalan, R. C. Lai, S. K. Lim, and J. Dostálek, "Magnetic nanoparticle-enhanced surface plasmon resonance biosensor for extracellular vesicle analysis," *Analyst*, vol. 142, pp. 3913–3921, 2017.

[72] Q. Wu *et al.*, "Ultrasensitive magnetic field-assisted surface plasmon resonance immunoassay for human cardiac troponin I," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 96, no. February, pp. 288–293, 2017.

[73] M. Fratzl *et al.*, "Magnetophoretic induced convective capture of highly diffusive superparamagnetic nanoparticles," *Soft Matter*, vol. 14, no. 14, pp. 2671–2681, 2018.

[74] A. Salari and M. Thompson, "Recent advances in AC electrokinetic sample enrichment techniques for biosensor development," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 255, pp. 3601–3615, 2018.

[75] A. Frkonja-Kuczin, L. Ray, Z. Zhao, M. C. Konopka, and A. Boika, "Electrokinetic preconcentration and electrochemical detection of Escherichia coli at a microelectrode," *Electrochim. Acta*, vol. 280, pp. 191–196, 2018.

[76] I. F. Cheng, T. Y. Chen, and W. C. Chao, "Increasing local density and purity of molecules/bacteria on a sensing surface from diluted blood using 3D hybrid electrokinetics," *Biomicrofluidics*, vol. 10, no. 3, p. 034116, 2016.

[77] Y. Song, K. Goto, A. Stephens, M. T. Chung, Y. G. Park, and K. Kurabayashi, "Breaking the diffusion limit of the nano-plasmofluidic biosensing with two regimes of AC electrohydrodynamic flow," in *IEEE 19th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems*, 2017, pp. 858–861.

[78] Y. Song *et al.*, "AC Electroosmosis-Enhanced Nanoplasmofluidic Detection of Ultralow-Concentration Cytokine," *Nano Lett.*, vol. 17, no. 4, pp. 2374–2380, 2017.

[79] C. Iliescu, G. Tresset, L. Yu, and G. Xu, "3D dielectrophoretic chips: Trapping and separation of cell populations," *Rom. J. Inf. Sci. Technol.*, vol. 13, no. 1, pp. 49–64, 2010.

[80] R. Hamada, H. Takayama, Y. Shonishi, L. Mao, M. Nakano, and J. Suehiro, "Sensors and Actuators B : Chemical A rapid bacteria detection technique utilizing impedance measurement combined with positive and negative dielectrophoresis," *Sensors Actuators B. Chem.*, vol. 181, pp. 439–445, 2013.

[81] C. Páez-Avilés *et al.*, "Combined dielectrophoresis and impedance systems for

bacteria analysis in microfluidic on-chip platforms," *Sensors*, vol. 16, no. 1514, 2016.

[82] L. Yang, "A Review of Multifunctions of Dielectrophoresis in Biosensors and Biochips for Bacteria Detection," *Anal. Lett.*, vol. 45, no. 2–3, pp. 187–201, 2012.

[83] K. J. Freedman, L. M. Otto, A. P. Ivanov, A. Barik, S. H. Oh, and J. B. Edel, "Nanopore sensing at ultra-low concentrations using single-molecule dielectrophoretic trapping," *Nat. Commun.*, vol. 7, pp. 1–9, 2016.

[84] S. Cherukulappurath, S. H. Lee, A. Campos, C. L. Haynes, and S. H. Oh, "Rapid and sensitive in situ SERS detection using dielectrophoresis," *Chem. Mater.*, vol. 26, no. 7, pp. 2445–2452, 2014.

[85] H. Cui *et al.*, "Rapid and sensitive detection of small biomolecule by capacitive sensing and low field AC electrothermal effect," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 226, pp. 245–253, 2016.

[86] J. Garcia-Guirado *et al.*, "Overcoming Diffusion-Limited Biosensing by Electrothermoplasmonics," *ACS Photonics*, vol. 5, no. 9, pp. 3673–3679, 2018.

[87] S. Li, Y. Ren, and H. Jiang, "Convection and mass transfer enhanced rapid capacitive serum immunoassay," *RSC Adv.*, vol. 4, no. 18, pp. 9064–9071, 2014.

[88] J. C. Ndukaife, A. Mishra, U. Guler, A. G. A. Nnanna, S. T. Wereley, and A. Boltasseva, "Photothermal heating enabled by plasmonic nanostructures for electrokinetic manipulation and sorting of particles," *ACS Nano*, vol. 8, no. 9, pp. 9035–9043, 2014.

[89] T. Sannomiya, O. Scholder, K. Jefimovs, C. Hafner, and A. B. Dahlin, "Investigation of plasmon resonances in metal films with nanohole arrays for biosensing applications," *Small*, vol. 7, no. 12, pp. 1653–1663, 2011.

[90] A. A. Yanik *et al.*, "An optofluidic nanoplasmonic biosensor for direct detection of live viruses from biological media," *Nano Lett.*, vol. 10, no. 12, pp. 4962–4969, 2010.

[91] A. G. Brolo, R. Gordon, B. Leathem, and K. L. Kavanagh, "Surface Plasmon Sensor Based on the Enhanced Light Transmission through Arrays of Nanoholes in Gold Films," *Langmuir*, no. 20, pp. 4813–4815, 2004.

[92] C. Escobedo, A. G. Brolo, R. Gordon, and D. Sinton, "Optofluidic concentration: Plasmonic nanostructure as concentrator and sensor," *Nano Lett.*, vol. 12, no. 3, pp. 1592–1596, 2012.

[93] A. Barik, L. M. Otto, D. Yoo, J. Jose, T. W. Johnson, and S. H. Oh, "Dielectrophoresis-enhanced plasmonic sensing with gold nanohole arrays," *Nano Lett.*, vol. 14, no. 4, pp. 2006–2012, 2014.

[94] Y. Tai, D. Chang, M. Pan, D. Huang, and P. Wei, "Sensitive Detection of Small

Particles in Fluids Using Optical Fiber Tip with Dielectrophoresis," *Sensors*, vol. 16, no. 303, pp. 1–9, 2016.

[95] C. Kuroda, R. Iizuka, Y. Ohki, and M. Fujimaki, "Development of a dielectrophoresis-assisted surface plasmon resonance fluorescence biosensor for detection of bacteria," *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 57, no. 5, pp. 1–5, 2018.

[96] C. Kuroda, Y. Ohki, and M. Fujimaki, "Dielectrophoresis-assisted SPRF Illumination Biosensor for Selective Detection of Biological Substances," *IEEE*, pp. 253–256, 2017.

[97] D. D. Galvan, V. Parehk, E. J. Liu, E.-L. Liu, and Q. Yu, "Sensitive Bacterial Detection via Dielectrophoretic Enhanced Mass Transport Using Surface Plasmon Resonance Biosensors," *Anal. Chem.*, vol. 90, pp. 14635–14642, 2018.

[98] Q. Avenas, "Intégration d'une méthode d'actuation électrocinétique sur biocapteur plasmonique," INSA Lyon, Université de Sherbrooke.

[99] Q. Avenas *et al.*, "Performance improvement of plasmonic sensors using a combination of AC electrokinetic effects for (bio)target capture," *Electrophoresis*, vol. 40, no. 10, pp. 1426–1435, 2019.

[100] J. Lyklema, S. Rovillard, and J. De Coninck, "Electrokinetics: The properties of the stagnant layer unraveled," *Langmuir*, vol. 14, no. 20, pp. 5659–5663, 1998.

[101] A. González, A. Ramos, N. G. Green, A. Castellanos, and H. Morgan, "Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. II. A linear double-layer analysis," *Phys. Rev. E*, vol. 61, no. 4, pp. 4019–4028, 2000.

[102] N. G. Green, A. Ramos, A. González, H. Morgan, and A. Castellanos, "Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes.," *Phys. Rev. E*, vol. 61, no. 4, pp. 4011–4018, 2000.

[103] N. G. Green, A. Ramos, A. González, H. Morgan, and A. Castellanos, "Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. III. Observation of streamlines and numerical simulation," *Phys. Rev. E - Stat. Physics, Plasmas, Fluids, Relat. Interdiscip. Top.*, vol. 61, no. 4, pp. 4011–4018, 2000.

[104] M. Hywel and N. G. Green, *AC Electrokinetics: colloids and nanoparticles*. 2003.

[105] A. Ramos, H. Morgan, N. G. Green, and A. Castellanos, "AC Electric-Field-Induced Fluid Flow in Microelectrodes During the AC electrokinetic manipulation of particles in sus," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 422, no. 2, pp. 420–422, 1999.

[106] J. Oh, R. Hart, J. Capurro, and H. (Moses) Noh, "Comprehensive analysis of particle motion under non-uniform AC electric fields in a microchannel," *Lab Chip*, vol. 9, no. 1, pp. 62–78, 2009.

[107] N. Islam, M. Lian, and J. Wu, "Enhancing microcantilever capability with integrated AC electroosmotic trapping," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 3, pp. 369–375, 2007.

[108] H. A. Pohl, "The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields," *J. Appl. Phys.*, vol. 22, no. 7, pp. 869–871, 1951.

[109] M. Frénéa-Robin and B. Le Pioufle, "Chap 6: Electricity for fluidics and Biology," in *Engineering of micro/nano bio systems: fundamentals and applications*, 2019.

[110] G. P. RC and V. Jody, "Particle separation by dielectrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 13, pp. 1973–1983, 2002.

[111] P. R. C. Gascoyne, J. Noshari, T. J. Anderson, and F. F. Becker, "Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis," *Electrophoresis*, vol. 30, no. 8, pp. 1388–1398, 2009.

[112] Y. Huang, R. Holzel, R. Pethig, and Xiao-B.Wang, "Differences in the AC electrodynamics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies," *Phys. Med. Biol.*, vol. 37, no. 7, pp. 1499–1517, 1992.

[113] Z. R. Gagnon, "Cellular dielectrophoresis: Applications to the characterization, manipulation, separation and patterning of cells," *Electrophoresis*, vol. 32, no. 18, pp. 2466–2487, 2011.

[114] J. Cottet, O. Fabregue, C. Berger, F. Buret, P. Renaud, and Marie Frénéa-Robin, "MyDEP : A New Computational Tool for Dielectric Modeling of Particles and Cells," *Biophys. J.*, vol. 116, pp. 12–18, 2019.

[115] M. P. Hughes, H. Morgan, and M. F. Flynn, "The dielectrophoretic behaviour of submicron latex spheres: Influence of surface conductance," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 220, no. 2, pp. 454–457, 1999.

[116] M. P. Hughes and N. G. Green, "The influence of stern layer conductance on the dielectrophoretic behavior of latex nanospheres.," *J. Colloid Interface Sci.*, vol. 250, no. 1, pp. 266–8, Jun. 2002.

[117] A. Sanchis *et al.*, "Dielectric Characterization of Bacterial Cells Using Dielectrophoresis," *Bioelectromagnetics*, vol. 28, pp. 393–401, 2007.

[118] K. Asami, T. Hanai, and N. Koizumi, "Dielectric analysis of escherichia coli suspensions in the light of the theory of interfacial polarization," *Biophys. J.*, vol. 31, pp. 215–228, 1980.

[119] A. Salari, M. Navi, T. Lijnse, and C. Dalton, "AC electrothermal effect in microfluidics: A review," *Micromachines*, vol. 10, no. 11, pp. 1–27, 2019.

[120] D. Zimmerman *et al.*, "A Combined Patch-Clamp and Electrorotation Study of the Voltage- and Frequency-Dependent Membrane Capacitance Caused by

Structurally Dissimilar Lipophilic Anions," *J. Membr. Biol.*, vol. 221, pp. 107–121, 2008.

[121] T. Y. Tsong, "Electroporation of cell membranes," *Biophys. J.*, vol. 60, no. 2, pp. 297–306, 1991.

[122] C. Chen, S. W. Smye, M. P. Robinson, and J. A. Evans, "Membrane electroporation theories: A review," *Med. Biol. Eng. Comput.*, vol. 44, pp. 5–14, 2006.

[123] V. Lioubimov, A. Kolomenskii, A. Mershin, D. V Nanopoulos, and H. a Schuessler, "Effect of varying electric potential on surface-plasmon resonance sensing.," *Appl. Opt.*, vol. 43, no. 17, pp. 3426–3432, 2004.

[124] J. D. E. McIntyre, "Electrochemical modulation spectroscopy," *Surf. Sci.*, vol. 37, pp. 658–682, 1973.

[125] K. M. Lee, M. Runyon, T. J. Herrman, R. Phillips, and J. Hsieh, "Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety," *Food Control*, vol. 47, pp. 264–276, 2015.

[126] J. Chen and B. Park, "Label-free screening of foodborne Salmonella using surface plasmon resonance imaging," *Anal. Bioanal. Chem.*, vol. 410, no. 22, pp. 5455–5464, 2018.

[127] E. M. Melvin, B. R. Moore, K. H. Gilchrist, S. Grego, and O. D. Velev, "On-chip collection of particles and cells by AC electroosmotic pumping and dielectrophoresis using asymmetric microelectrodes," *Biomicrofluidics*, vol. 5, no. 3, 2011.

[128] R. E. Fernandez, A. Rohani, V. Farmehini, and N. S. Swami, "Review: Microbial analysis in dielectrophoretic microfluidic systems," *Anal. Chim. Acta*, vol. 966, pp. 11–33, 2017.

[129] J. Wu, Y. Ben, and H. C. Chang, "Particle detection by electrical impedance spectroscopy with asymmetric-polarization AC electroosmotic trapping," *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 1, no. 2, pp. 161–167, 2005.

[130] M. Kim *et al.*, "A microfluidic device for label-free detection of Escherichia coli in drinking water using positive dielectrophoretic focusing, capturing, and impedance measurement," *Biosens. Bioelectron.*, vol. 74, pp. 1011–1015, 2015.

[131] B. H. Lapizco-encinas, B. A. Simmons, E. B. Cummings, and Y. Fintschenko, "Insulator-based dielectrophoresis for the selective concentration and separation of live bacteria in water," *Electrophoresis*, vol. 25, pp. 1695–1704, 2004.

[132] M. Castellarnau, A. Errachid, C. Madrid, A. Juarez, and J. Samitier, "Dielectrophoresis as a Tool to Characterize and Differentiate Isogenic Mutants of Escherichia coli," *Biophys. J.*, vol. 91, no. November, pp. 3937–3945, 2006.

[133] P. Y. Chiou, A. T. Ohta, A. Jamshidi, H. Y. Hsu, and M. C. Wu, "Light-actuated AC electroosmosis for nanoparticle manipulation," *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 17, no. 3, pp. 525–531, 2008.

[134] T. Honegger and D. Peyrade, "Comprehensive analysis of alternating current electrokinetics induced motion of colloidal particles in a three-dimensional microfluidic chip," *J. Appl. Phys.*, vol. 113, 2013.

[135] S. Stanke, F. F. Bier, and R. Hölzel, "Fluid streaming above interdigitated electrodes in dielectrophoresis experiments," *Electrophoresis*, vol. 32, no. 18, pp. 2448–2455, 2011.

[136] P. K. Wong, C. Y. Chen, T. H. Wang, and C. M. Ho, "Electrokinetic bioprocessor for concentrating cells and molecules," *Anal. Chem.*, vol. 76, no. 23, pp. 6908–6914, 2005.

[137] Q. Tseng, "Study of multicellular architecture with controlled microenvironment," Université de Grenoble, 2011.

[138] I. Stojanović, Y. van Hal, T. J. G. van der Velden, R. B. M. Schasfoort, and L. W. M. M. Terstappen, "Detection of apoptosis in cancer cell lines using Surface Plasmon Resonance imaging," *Sens. Bio-Sensing Res.*, vol. 7, pp. 48–54, 2016.

[139] O. Andreiev, "SPR sensor structuration for dielectrophoretic trapping of biological objects," 2019.

[140] J. Wu, Y. Ben, D. Battigelli, and H. C. Chang, "Long-range AC electroosmotic trapping and detection of bioparticles," *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 44, no. 8, pp. 2815–2822, 2005.

[141] E. T. Gedig, "Surface Chemistry in SPR Technology," in *Handbook of Surface Plasmon Resonance*, 2008, pp. 173–220.

[142] R. G. Nuzzo and D. L. Allara, "Adsorption of Bifunctional Organic Disulfides on Gold Surfaces," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 105, no. 13, pp. 4481–4483, 1983.

[143] R. Holze, "The adsorption of thiophenol on gold - A spectroelectrochemical study," *Phys. Chem. Chem. Phys.*, vol. 17, no. 33, pp. 21364–21372, 2015.

[144] P.-Y. Blanchard, "Monocouches mixtes auto-assemblées électroactives: transduction électrochimique en l'absence de lien covalent entre l'unité redox et l'entité complexante," Université d'Angers, 2013.

[145] C. D. Bain, E. B. Troughton, Y. T. Tao, J. Evall, G. M. Whitesides, and R. G. Nuzzo, "Formation of Monolayer Films by the Spontaneous Assembly of Organic Thiols from Solution onto Gold," *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 111, pp. 321–335, 1989.

[146] J. Spadavecchia, J. Moreau, J. Hottin, and M. Canva, "New cysteamine based functionalization for biochip applications," *Sensors Actuators, B Chem.*, vol. 143, no. 1, pp. 139–143, 2009.

[147] N. Hugouvieux-Cotte-Pattat, C. Jacot-Des-Combes, and J. Briolay, "Dickeya

lacustris sp. nov., a water-living pectinolytic bacterium isolated from lakes in France," *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, vol. 69, no. 3, pp. 721–726, 2019.

[148] M. Hashemi Tameh, E. Primiceri, M. S. Chiriacò, P. Poltronieri, M. Bahar, and G. Maruccio, "Pectobacterium atrosepticum Biosensor for Monitoring Blackleg and Soft Rot Disease of Potato," *Biosensors*, vol. 10, no. 6, pp. 1–12, 2020.

[149] S. Park, Y. Zhang, T. Wang, and S. Yang, "Continuous dielectrophoretic bacterial separation and concentration from physiological media of high conductivity †," *Lab Chip*, vol. 11, pp. 2893–2900, 2011.

[150] L. J. Martin, B. Akhavan, and M. M. M. Bilek, "Electric fields control the orientation of peptides irreversibly immobilized on radical-functionalized surfaces," *Nat. Commun.*, vol. 9, no. 1, 2018.

[151] S. Otto, U. Kaletta, F. F. Bier, C. Wenger, and R. Hölzel, "Dielectrophoretic immobilisation of antibodies on microelectrode arrays," *Lab Chip*, vol. 14, no. 5, pp. 998–1004, 2014.

[152] A. Morita, A. Uesugi, K. Sugano, and Y. Isono, "Manipulation of Biomolecules into Nanogap by Plasmonic Optical Excitation for Highly Sensitive Biosensing," *2019 20th Int. Conf. Solid-State Sensors, Actuators Microsystems Eurosensors XXXIII, TRANSDUCERS 2019 EUROSENSORS XXXIII*, vol. 2, no. June, pp. 166–169, 2019.

[153] M. A. Zaman, P. Padhy, P. C. Hansen, and L. Hesselink, "Dielectrophoresis-assisted plasmonic trapping of dielectric nanoparticles," *Phys. Rev. A*, vol. 95, no. 2, pp. 1–8, 2017.

[154] A. Belushkin, F. Yesilkoy, and H. Altug, "Nanoparticle-Enhanced Plasmonic Biosensor for Digital Biomarker Detection in a Microarray," *ACS Nano*, vol. 12, no. 5, pp. 4453–4461, 2018.

[155] J. C. Love, L. A. Estroff, J. K. Kriebel, R. G. Nuzzo, and G. M. Whitesides, *Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology*, vol. 105, no. 4. 2005.

[156] C. Vericat, M. E. Vela, G. Benitez, P. Carro, and R. C. Salvarezza, "Self-assembled monolayers of thiols and dithiols on gold: new challenges for a well-known system," *Chem. Soc. Rev.*, vol. 39, no. 5, pp. 1805–1834, 2010.