



HAL
open science

Micro-dispositifs pour la biopsie liquide : vers la capture et détection intégrées de biomarqueurs cellulaires tumoraux

Elise Bou

► **To cite this version:**

Elise Bou. Micro-dispositifs pour la biopsie liquide : vers la capture et détection intégrées de biomarqueurs cellulaires tumoraux. Biologie cellulaire. INSA de Toulouse, 2020. Français. NNT : 2020ISAT0038 . tel-03934774

HAL Id: tel-03934774

<https://theses.hal.science/tel-03934774>

Submitted on 11 Jan 2023

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

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

Université Fédérale



Toulouse Midi-Pyrénées

THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA de Toulouse)

Présentée et soutenue par

Elise BOU

Le 15 Décembre 2020

Micro-dispositifs pour la biopsie liquide : vers la capture et détection intégrées de biomarqueurs cellulaires tumoraux

École doctorale et discipline ou spécialité:

ED SDM : Nano-physique, nano-composants, nano-mesures - COP 00

Unité de recherche

LAAS - Laboratoire d'Analyse et d'Architecture des Systèmes

Directeur/trice(s) de Thèse :
Christophe VIEU et Aline CERF

Jury

Sylvie RENAUD, Rapportrice

Olivier FRANCAIS, Rapporteur

Orphée CUGAT, Examineur

Franck MOLINA, Examineur

Gilles FAVRE, Examineur

Jérémie GRISOLIA, Examineur et Président

Christophe VIEU, Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens en premier lieu à remercier mes encadrants, **Aline Cerf** et **Christophe Vieu**, pour leur confiance et pour m'avoir confié un sujet de thèse qui me tenait à cœur. Je voue une grande admiration à chacune de leur personne ainsi qu'à leurs activités de recherche respectives. Avant de rencontrer le chercheur passionné qu'est Christophe, c'est le remarquable enseignant Pr Vieu qui a été à l'origine de ma curiosité pour le domaine des micro et nanotechnologies. Ses cours captivants ont éveillé mon attrait pour ce domaine dès le début de mon parcours à l'INSA, il y a huit ans déjà. Depuis ma rencontre avec Aline, son optimisme à toute épreuve et sa détermination m'impressionnent. Je trouve très inspirant son parcours de jeune chercheuse entrepreneuse engagée pour rendre accessible des outils de diagnostic oncologique innovants au sein du milieu médical. Je suis profondément reconnaissante d'avoir eu l'opportunité d'être encadrée par ce duo aux qualités complémentaires que forment Aline et Christophe.

Ma thèse CIFRE a été menée entre l'équipe **ELiA** du **laboratoire LAAS-CNRS** et la **société SmartCatch**, je remercie à ce titre ces trois institutions pour leur accueil.

Merci à l'ensemble des doctorants et permanents de l'équipe ELiA pour l'environnement de travail agréable et bienveillant, dans lequel je me suis épanouie au fil des ans. Je suis heureuse d'avoir fait partie de cette équipe dynamique grâce à laquelle j'ai beaucoup appris sur les plans humain et scientifique. De façon plus générale, avoir effectué mes travaux au sein du LAAS-CNRS a été une expérience enrichissante du point de vue des apprentissages scientifiques et techniques mais aussi pour la diversité des rencontres que j'ai eu l'occasion de faire. Je remercie les collègues devenus de véritables amis Roberto, Gozde, Elise, Irem, Victor, Victor, Alexiane, Bastien, Marianne, Lucie, Adrian, Aurore, Angelo, Kevin, Mouhanad, Arushee, Mathieu, Pierre, Lucien et Douglas pour nos échanges ainsi que leur compagnie quotidienne au déjeuner et/ou (nombreuses et nécessaires) pauses café.

J'ai eu la chance de mener un projet de thèse pluridisciplinaire et pour cela de solliciter et travailler avec des personnes expertes de différents domaines. Je remercie **Aliou Ly** et **Olivier Llopis** de l'équipe MOST pour m'avoir épaulée sur une partie de mon projet, acceptant de sortir de leur environnement habituel en venant travailler à mes côtés en salle de biologie (avec du sang !). Concernant la deuxième majeure partie de mes travaux, un grand merci aussi à **Hervé Aubert** de l'équipe MINC pour son expertise, son enthousiasme et ses conseils.

Merci aux ingénieurs des différentes plateformes techniques du LAAS pour l'aide précieuse apportée à mon projet. A ce titre, je tiens ainsi à remercier les ingénieurs du service TEAM, Adrian, Laurent M., Aurélie, Laurent B., Ludovic et Benjamin, de la salle blanche du laboratoire pour leur réactivité. Plus particulièrement, je remercie très chaleureusement **David Bourrier** pour m'avoir accompagnée lors des développements technologiques qui ont été au cœur de mes travaux de thèse. J'ai énormément appris à ses côtés et je le remercie pour son dynamisme, son souci du détail, ses idées brillantes et sa forte implication pour le projet. Merci aux ingénieurs du service I2C, Charline, Louisa, Julien et Nicolas pour le soutien lors des manip en salles de caractérisation électrique et biologique, ainsi que Julie et Xavier pour les réalisations menées au sein de la plateforme d'impression 3D. Je remercie particulièrement **Pierre Lacroix** pour son fidèle accompagnement lors des longues séances de mesures électriques, son intérêt et sa patience, ainsi que son aide pour le traitement des données.

Merci évidemment à l'équipe SmartCatch. Faire partie de l'aventure de cette jeune entreprise a été très instructif pour moi, ayant été aux premières loges pour suivre son évolution et sa maturation

au fil des années de ma thèse. Merci notamment à mon collègue et ami **Kayum Jiménez**, avec qui j'ai eu la chance de faire équipe lors de mon stage de fin d'étude. J'ai beaucoup appris grâce à Kayum qui m'a transmis ses connaissances et son intérêt sur le sujet et a grandement participé à mon envie de poursuivre et de me lancer dans l'aventure de la thèse. Merci aussi à **Matthieu Sagot** avec qui j'ai eu le plaisir de travailler au cours de la fin de cette thèse dans le cadre de son projet de fin d'études, pour sa bonne humeur quotidienne et sa motivation.

Enfin, sur une note personnelle, je tiens à remercier mes proches. L'expérience de la thèse s'est montrée par moments prenante et éprouvante, et je suis reconnaissante d'être entourée de personnes chères, présentes et à l'écoute. Mon entourage est un pilier solide sur lequel je peux toujours m'appuyer et auprès duquel j'ai trouvé le réconfort nécessaire pour faire face dans certains moments difficiles. A ce titre je remercie mes parents **Nicole** et **David**, mon frère **Lucien**, et **Rémi** pour l'amour et le soutien qu'ils m'apportent au quotidien, je vous aime. Je remercie aussi mes amies proches et ex-colocs **Laura** et **Maréva** d'être toujours là pour moi et pour leur joie de vivre communicative. Merci aussi au reste de mes amis pour tous les bons moments passés ensemble et qui ont rythmé ces dernières années passées à une vitesse folle.

Table des matières générale

Lexique	1
Introduction générale	3
Chapitre 1	
Micro-dispositifs pour la capture de cellules tumorales circulantes.....	7
Chapitre 2	
Intégration d'un système de détection des cellules capturées.....	51
Chapitre 3	
Intégration d'un dispositif de mesure de la vitesse d'écoulement par effet Doppler.....	125
Conclusion générale	177
Annexe : Production scientifique	181

Lexique

- **CPE** : Élément d'impédance à phase constante (utilisé notamment pour modéliser les effets de capacités de membrane plasmique des cellules et de double couche électrique)
- **CTC** : Cellules tumorales circulantes
- **CVD** : Dépôt chimique en phase vapeur
- **EpCAM** : Molécule membranaire épithéliale d'adhérence cellulaire
- **DEP** : Diélectrophorèse (technique électrocinétique)
- **Dispositifs exploratoires 2D** : Dispositifs planaires comportant des microélectrodes pour la détection de cellules dans un milieu statique
- **EMT** : Transition épithélio-mésenchymateuse
- **Holder** : Porte-dispositif adapté accueillant les micro-dispositifs de capture (S-MDCs) permettant de les intégrer au sein d'un montage fluide
- **MEB** : Microscope électronique à balayage
- **PBMC** : Cellules mononuclées du sang périphérique
- **PBS** : Solution tampon phosphate salin, sérum physiologique utilisé pour les expériences employant du matériel biologique
- **PC-3** : Lignée cellulaire humaine de cancer de la prostate
- **PC-9** : Lignée cellulaire humaine de cancer du poumon non à petites cellules
- **PDMS** : Poly-Diméthyl-Siloxane, polymère utilisé pour la conception de puces fluidiques
- **PTV** : Vélométrie par suivi de particule
- **PVD** : Dépôt physique en phase vapeur effectué sous vide
- **RIE** : Gravure ionique réactive
- **ROT** : Électro-rotation (technique électrocinétique)
- **S-MDC** : Micro-dispositif de capture de cellules tumorales circulantes dans le sang développé par la société SmartCatch. Ces dispositifs sont appelés dispositifs 2,5 D car ils sont constitués de deux éléments :
 - **Membrane filtrante** : Fine membrane dotée de pores contrôlés en dimension et géométrie pour isoler des cellules tumorales circulantes dans le sang sur le principe de la microfiltration
 - **Partie supportrice** : Élément de maintien épais du micro-dispositif de capture comportant des ouvertures latérales qui permettent de laisser une partie du sang circuler librement
- **S-MDC à électrodes intégrées** : Micro-dispositif de capture de cellules tumorales circulantes à micro-électrodes intégrées pour la détection électrique de cellules tumorales circulantes *in situ*, objet de développement d'une partie des travaux de cette thèse
- **TEM** : Transition mésenchymo-épithéliale

Introduction générale

☞ Le contexte oncologique

Le cancer désigne une famille de maladies dont le point commun est un comportement anormal de certaines cellules pour lesquelles les mécanismes de prolifération et de mort programmée ne sont plus contrôlés. Ces anomalies sont à l'origine du développement de tumeurs qui peuvent s'initier à partir de différents organes du patient. L'apparition du cancer est le fruit de changements au sein d'une cellule, gouvernés par des mutations de son matériel génétique. Ce dysfonctionnement cellulaire est à l'origine de maladies reportées depuis le début du XX^{ème} siècle mais une nette augmentation des cas a été observée au fil des dernières décennies, comme le montre une étude récente sur l'évolution des cas et décès aux Etats Unis par exemple ¹. Aujourd'hui le cancer se présente sous une immense diversité et est devenu une cause de mortalité majeure à travers le monde, touchant toutes les régions du monde sans distinction de leur niveau de développement. Concernant les pays à revenus élevés, il est reconnu que son développement est en grande partie liée à l'émergence de certains comportements sociétaux, tels que le tabagisme qui est actuellement le principal facteur de risque connu. Une pluralité d'autres facteurs liés au style de vie et à l'environnement sont identifiés tels que la consommation excessive de certains aliments, l'abus d'alcool, le contact avec certains produits chimiques, la pollution pour n'en citer que quelques-uns ². Plus de 18 millions de nouveaux cas de cancer et 9 millions de décès ont été recensés en 2018 ³ à l'échelle mondiale. L'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer prévoit une augmentation de 60% du nombre de cas d'ici 2040 ¹.

L'oncologie ou cancérologie est une branche de la médecine spécialisée dans l'étude, le diagnostic et le traitement des cancers. Le dépistage des cancers concerne aujourd'hui principalement une population ciblée présentant des facteurs de risque. Le diagnostic peut être effectué à partir d'imagerie médicale ou de marqueurs tumoraux, molécules pouvant être associées à la présence de tumeurs malignes au sein de l'organisme. A ce jour la confirmation de la maladie s'effectue majoritairement par l'analyse d'un prélèvement tissulaire effectué sur la tumeur, appelé biopsie. Différentes modalités de thérapies sont possibles et à adapter en fonction du type de cancer et de son agressivité. Il est souvent nécessaire de recourir à plusieurs traitements pour une même personne, on peut par exemple citer la chimiothérapie, la radiothérapie, l'immunothérapie et la chirurgie. Face à l'hétérogénéité des pathologies provoquées par le cancer, il existe un besoin pour une personnalisation de la prise en charge des patients, qui n'est actuellement pas envisageable au regard des outils à disposition dans le domaine médical. Pour répondre à cette problématique, le développement d'outils médicaux fiables et peu invasifs est nécessaire. Ainsi, des informations pourraient être collectées tout au long du traitement *via* des analyses fréquentes. Ceci permettrait d'établir des prises de décision médicales davantage adaptées à l'évolution de la pathologie pour un patient donné à un moment donné.

☞ Le concept de biopsie liquide

L'émergence de la biopsie liquide, par opposition à la biopsie traditionnelle qualifiée de biopsie solide, présente un fort potentiel pour répondre au besoin de suivi individualisé des patients. Son principe repose sur le prélèvement de fluides corporels tels que le sang, la lymphe, le liquide céphalorachidien ou les urines pour la détection de marqueurs tumoraux. Elle présente l'avantage d'être moins invasive que la biopsie solide et permettrait ainsi d'augmenter la fréquence de l'analyse de façon à améliorer le suivi de l'évolution des tumeurs et des mutations dans le temps. De cette façon,

¹ <https://gco.iarc.fr/tomorrow/home>

la biopsie liquide permettrait aussi la validation de l'efficacité d'un traitement ainsi que le suivi des patients après traitement pour surveiller le risque de rechute. Les marqueurs utilisés peuvent être de l'ADN circulant, des cellules tumorales circulantes (CTCs) ou des exosomes, petites vésicules dérivées des cellules.

L'isolement de CTCs à partir de sang est un champ de recherche très actif depuis ces dernières décennies. Ces biomarqueurs présentent un fort potentiel pour les applications citées précédemment en termes de suivi du traitement chez un patient atteint de cancer mais aussi pour le test de nouveaux médicaments, l'étude de la résistance face à certains traitements, la compréhension des mécanismes d'initiation du cancer. La présence de cellules tumorales dans le sang correspond à des événements extrêmement rares et leur prélèvement dans ce milieu complexe contenant une diversité de cellules sanguines saines largement majoritaires, constitue un véritable défi technologique.

Les avancées en biologie moléculaire et microfabrication de la fin du XX^{ème} siècle ont permis le développement de nombreux dispositifs d'isolement de cellules tumorales à partir d'échantillons sanguins reposant sur différents modes opératoires. Ces techniques sont décrites dans la première section du Chapitre 1 de ce manuscrit. Certains de ces dispositifs sont à l'état de recherche et développement dans le milieu académique et d'autres sont devenus le cœur de métier de nouvelles entreprises et sont déjà commercialisés tels que CellSearch[®] (Menarini Silicon Biosystems, Italie), seul dispositif d'énumération de cellules tumorales circulantes approuvé par l'administration américaine des denrées alimentaires et des médicaments (FDA, Food and Drug Administration), AccuCyte[®] (RareCyte, Etats-Unis), ISET[®] (Rarecells, France) et Parsortix[®] (Angle, Royaume-Uni) pour citer quelques exemples. Les technologies développées ont montré qu'une variation du nombre de CTCs détectées par unité de volume sanguin fournit une valeur pronostique et prédictive permettant un suivi du traitement et une stratification des risques du patient. Cependant, les dispositifs commercialisés visent actuellement principalement le marché de la recherche. En effet, il existe aujourd'hui un manque de preuves pour l'utilité et la plus-value de ces dispositifs quant à la prise de décision sur le plan thérapeutique. Ceci est majoritairement lié aux faibles nombres de cellules isolées à partir desquels il est difficile de baser un diagnostic fiable. Face à la diversité des technologies mises en œuvre, il n'existe actuellement pas de protocole standardisé et de consensus quant au processus d'isolement, de détection et d'analyse des CTCs, ce qui rend la mise en pratique en routine clinique d'autant plus difficile. Ces nouvelles technologies doivent aussi se conformer aux différentes normes en vigueur pour la mise sur le marché d'un dispositif médical, ce qui peut participer à un retard de la mise sur le marché et d'utilisation en milieu hospitalier.

☞ L'entreprise SmartCatch

C'est dans ce contexte qu'un projet de développement de micro-dispositifs pour la biopsie liquide, plus particulièrement pour la capture de CTCs, est mené depuis 2012 au sein du Laboratoire d'Architecture et d'Analyse des Systèmes (LAAS-CNRS) sous la direction d'Aline Cerf, chargée de recherche au CNRS. La start-up SmartCatch créée en 2016 est le fruit d'un transfert technologique de ce projet à l'issue de quelques années de recherche aux résultats prometteurs. Elle a été fondée par 4 associés qui sont Aline Cerf, porteuse du projet citée précédemment, Christophe Vieu, professeur à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse (INSA) et chercheur au LAAS-CNRS, Bernard Malavaud, chirurgien urologue à l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse (IUCT) et Sylvain Sanson, chirurgien urologue à l'Uropôle de Montauban. La start-up est actuellement hébergée au sein de l'institut Claudius Régaud (ICR) à l'Institut Universitaire du Cancer de Toulouse (IUCT) et son effectif est constitué de son Président et de quatre salariés.

Le cœur de l'innovation repose sur la conception d'un piège micrométrique qui par son design permet d'isoler les CTCs de manière spécifique en une seule étape dans du sang complet. Les cellules tumorales sont isolées sur la base de critères physiques (taille, déformabilité) dans des conditions fluidiques douces permettant de préserver leur viabilité et l'intégrité de l'information biologique que ces cellules contiennent. La précision et la fiabilité de l'information sont des critères importants, mais SmartCatch s'attache aussi aux critères de rapidité et de facilité d'accès à l'information quantitative de capture. Dans cette optique, les produits sont conçus afin de permettre la capture optimale des CTCs mais également pour que ces dispositifs soient connectés et capables de restituer l'information d'énumération de la capture à l'oncologue en temps réel. Ainsi, SmartCatch développe une gamme de produits compacts et portables pour équiper les cabinets de consultation et pour une utilisation en routine clinique. L'objectif de la start-up est de démocratiser la biopsie liquide afin de pouvoir l'inscrire véritablement comme le geste médical essentiel pour le diagnostic, le suivi et la personnalisation des soins en oncologie médicale.

Le socle technologique développé par la start-up est le Micro-dispositif De Capture de cellules tumorales circulantes qui se base sur le principe de la microfiltration du sang et dont le design est le fruit de 7 ans de recherche. Dans la suite de ce manuscrit, nous appelons ce dispositif S-MDC. Le S-MDC peut être embarqué sur deux types de plateformes fluidiques pour effectuer la capture cellulaire qui constituent deux lignes de produits :

- S-Station

Un équipement de paillasse portable permettant, de manière automatisée, l'isolement de CTC à partir de prélèvements sanguins sans pré-traitement, en une seule étape et en quelques minutes. Les CTC isolées sont viables avec de faibles niveaux de contamination, compatibles avec les technologies de séquençage de l'ADN/ARN sur cellule unique. Ce produit sera commercialisé à destination des laboratoires pharmaceutiques et académiques pour la recherche de cibles thérapeutiques, pour des études sur la résistance aux médicaments ou l'hétérogénéité cellulaire, ou encore comme kit compagnon des nouveaux traitements comme l'immunothérapie.

- S-Pheresis

Un système d'isolement de CTC aphasique extravasculaire permettant de collecter en continu les CTCs directement à partir d'une veine périphérique, au chevet du patient. Le système filtre le sang *via* un dispositif S-MDC, puis le réinjecte dans la veine. Il échantillonne ainsi un volume sanguin beaucoup plus important. Ce produit intégré au sein des systèmes de prélèvement hospitaliers actuels sera utilisé au chevet du patient, en routine clinique.

C'est dans le contexte du développement de la technologie SmartCatch que s'inscrit le travail de ce projet de thèse CIFRE en collaboration entre SmartCatch et l'équipe ELiA (Engineering for Life Applications) du LAAS-CNRS.

☞ Les objectifs du projet de thèse

Les travaux menés dans le cadre du projet de thèse sont centrés sur le développement des S-MDCs pour une évolution vers des dispositifs capables de fournir des informations sur le processus de capture en temps réel à l'utilisateur. Les informations ciblées sont la détection des événements de capture cellulaire *in situ* ainsi qu'un suivi de la vitesse de l'écoulement sanguin au voisinage des S-MDCs. L'accès à ces informations en temps réel permettrait d'établir une calibration et un protocole d'utilisation précis, nécessaires à l'introduction de ces dispositifs en routine clinique.

La mesure de vitesse de l'écoulement sanguin est importante car elle présente un paramètre déterminant pour l'efficacité de capture *via* les S-MDCs. Cette information permettrait d'obtenir un

paramètre de référence au voisinage du S-MDC de manière à pouvoir tenir compte des variabilités intra et inter-patients au niveau de l'écoulement sanguin dans le cas d'une utilisation en aphérèse et afin de pouvoir adapter le débit au sein de la plateforme fluide en conséquence. L'information de capture cellulaire en temps réel permettrait d'obtenir une information additionnelle pour éviter la saturation du filtre et pour ajuster le temps de capture. Par ailleurs, l'énumération et la possibilité d'identification de différents types cellulaires fourniraient des informations cliniques utiles dans le cadre de la biopsie liquide basée sur la détection de CTCs. L'accès à ces informations en temps réel permettrait de s'affranchir d'étapes de traitement et d'analyse de l'échantillon supplémentaires et faciliterait ainsi son utilisation dans le contexte clinique.

Dans cette perspective, les objectifs de cette thèse sont les suivants :

- Intégrer des microélectrodes aux S-MDCs existants pour permettre la détection électrique en temps réel des cellules capturées.

- Intégrer un système de vélocimétrie Doppler pour le suivi en temps réel de l'évolution de la vitesse d'écoulement au voisinage du S-MDCs.

Le Chapitre 1 de ce manuscrit introduit le contexte et l'état de l'art en lien avec l'isolement de CTCs à partir du sang. Le concept et le design des S-MDCs en tant que dispositifs de capture sont décrits ainsi que le procédé de microfabrication tel que mis au point au sein de la plateforme de micro et nanotechnologies du LAAS-CNRS. Enfin les résultats expérimentaux de capture menés à l'IUCT sur lignées de cellules tumorales dans du sang complet et sur sang de patient seront présentés.

Le Chapitre 2 s'attache à présenter les propriétés diélectriques particulières des cellules tumorales et le principe de détection électrique. Un procédé de microfabrication permettant l'intégration de microélectrodes aux S-MDCs est présenté ainsi que des résultats préliminaires de détection électrique de cellules appartenant à une lignée cellulaire tumorale.

Le Chapitre 3 est relatif à la vélocimétrie laser à effet Doppler. En premier lieu, un état de l'art présente les techniques permettant de mesurer la vitesse de l'écoulement sanguin de manière précise et localisée. Un système de mesure compact pour la mesure de l'écoulement sanguin *in situ* par vélocimétrie laser à effet Doppler est ensuite introduit. Des premiers tests de vélocimétrie sont présentés à partir d'écoulement de suspensions de microbilles et de sang complet au sein d'une puce fluide d'étude.

Nous concluons ce travail en validant deux pistes d'instrumentation des micro-dispositifs de capture pour leur évolution vers la détection et le contrôle *in situ* en temps réel. Les procédés technologiques associés sont décrits, discutés et éprouvés. Leur validation en laboratoire est démontrée et leur principe de fonctionnement est discuté en détail. Leur industrialisation au sein de la société partenaire devient désormais envisageable et constitue une nouvelle étape indispensable pour leur mise en œuvre clinique.

Références

1. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2019. *CA. Cancer J. Clin.* **69**, 7–34 (2019).
2. Islami, F. *et al.* Proportion and number of cancer cases and deaths attributable to potentially modifiable risk factors in the United States: Potentially Preventable Cancers in US. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 31–54 (2018).
3. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).

Micro-dispositifs pour la capture de cellules tumoraes circulantes

Table des matières

Éléments de Contexte	10
1. L'isolement de CTCs pour la biopsie liquide	11
1.1. Le concept de biopsie liquide	11
1.2. Les CTCs en tant que biomarqueurs tumoraux.....	12
1.2.1. Les CTCs au sein de la circulation sanguine.....	12
1.2.2. Les CTCs et potentielles applications en utilisation clinique.....	13
1.3. Les caractéristiques spécifiques des CTCs.....	15
1.3.1. Caractéristiques phénotypiques.....	15
1.3.2. Caractéristiques physiques des CTCs	17
1.4. Les facteurs de performance des dispositifs d'isolement de CTCs	20
1.5. Technologies pour l'isolement de CTCs dans le sang.....	21
1.5.1. Les techniques d'immunoaffinité.....	22
1.5.2. Les techniques basées sur les propriétés physiques.....	24
1.5.3. Techniques mixtes.....	26
1.5.4. Techniques de détection directe	27
1.6. Dispositif idéal pour l'isolement de CTCs dans le sang	27
2. Conception des micro-dispositifs de capture « S-MDCs »	28
2.1. Principe de fonctionnement.....	28
2.1.1. L'approche de la microfiltration	28
2.1.2. Utilisation des S-MDCs	29
2.2. Géométrie et dimensions du S-MDC.....	30
2.3. Conception et fabrication du réceptacle ou « holder »	31
3. Procédé de fabrication	32
4. Protocole expérimental de capture	34
4.1. Le système fluidique.....	34
4.2. Le matériel de biologie	36
4.2.1. Lignées cellulaires et culture	36
4.2.2. Prélèvements biologiques	36
4.2.3. Marquages des cellules	36
5. Exemple de résultat d'expérience de capture	37
5.1. Capture de cellules PC-9 dans du sang de donneur sain.....	37
5.2. Perspectives d'optimisation du processus de capture.....	39
6. Développements envisagés pour le système de capture	40

6.1. Estimation du volume effectif analysé	40
6.2. Exploration de nouveaux matériaux et géométries	40
Conclusions	44
Bibliographie	46

Chapitre 1

Micro-dispositifs pour la capture de cellules tumorales circulantes

Éléments de Contexte

La jeune pousse Toulousaine SmartCatch développe des micro-dispositifs de capture (S-MDC) exploitant les **propriétés physiques particulières des cellules tumorales circulantes (CTCs)** pour leur isolement à partir d'échantillons de sang complet. Le principe de capture repose sur la microfiltration permettant **de retenir les CTCs sur une membrane filtrante**. Les cellules sanguines de taille inférieure et plus déformables traversent la membrane filtrante des S-MDCs. Ces dispositifs sont au cœur des travaux de recherche et développement présentés dans le cadre de ce projet de thèse.

Dans un premier temps, les dispositifs ont été développés dans l'environnement académique du LAAS-CNRS. Un **procédé de microfabrication** a été mis au point au sein de la plateforme de micro et nanotechnologies. Ce procédé permet d'obtenir des **dispositifs métalliques robustes à la résolution micrométrique**. Plusieurs centaines de dispositifs sont conçus par lot de fabrication. La mise au point de **ce procédé est favorable au transfert industriel** pour une production parallélisée et à faible coût. Par ailleurs, une preuve de concept et des premiers résultats encourageants de capture de cellules de lignées tumorales en suspension dans un milieu simple puis dans du sang complet a motivé le transfert technologique vers un développement industriel de ces dispositifs afin de les rendre accessibles pour **une utilisation en routine clinique**.

Le principe de fonctionnement de ces dispositifs repose sur la capture de cellules dans des conditions proches de celles de l'environnement physiologique afin de les préserver dans les meilleures conditions pour les analyses post capture. Un autre paramètre déterminant est l'analyse de volumes sanguins élevés afin de pouvoir extraire un nombre important de CTCs. Ceci est nécessaire pour obtenir un **échantillon représentatif de la population de CTCs** ainsi que du matériel biologique en quantité suffisante pour les étapes d'analyse biologiques effectuées à l'issue du processus de capture.

L'intégration à une plateforme fluide et l'optimisation de plusieurs paramètres influant sur la capture sont toujours en cours d'étude au sein de l'équipe de recherche de SmartCatch. Des premiers essais ont été effectués sur des échantillons sanguins de patients atteints de cancer de la prostate à un stade métastatique.

1. L'isolement de CTCs pour la biopsie liquide

Cette section met en perspective les enjeux des biomarqueurs et de la biopsie liquide, plus particulièrement de l'isolement des CTCs, pour les avancées de la médecine de précision dans le domaine oncologique. Les propriétés spécifiques des CTCs et les différentes techniques mises en œuvre pour leur isolement à partir du sang sont introduites dans cette partie.

1.1. Le concept de biopsie liquide

Un biomarqueur est une caractéristique biologique qui peut être mesurée avec précision chez un individu. Il est utilisé en médecine comme indicateur pour le suivi d'un processus physiologique normal ou pathologique, ou également pour le suivi de la réponse à un traitement thérapeutique. La recherche dans le domaine des biomarqueurs liés aux cancers évolue rapidement. Aujourd'hui, certains biomarqueurs du cancer sont déjà utilisés en milieu hospitalier pour le diagnostic de certains cancers. C'est le cas par exemple de l'antigène spécifique de la prostate (*Prostate Specific Antigen*, *PSA*) dont un taux anormalement élevé dans le sang peut être un potentiel indicateur de cancer.

Afin d'accéder aux biomarqueurs choisis pour leur analyse, il est possible d'effectuer un prélèvement tissulaire à partir de l'organe d'intérêt. Ce geste médical est appelé biopsie. L'intervention est adaptée en fonction de l'accessibilité de la zone ciblée et peut être réalisée sur différents types d'organes au moyen d'une aiguille, par endoscopie ou chirurgie classique. L'analyse de ces prélèvements n'est pas toujours représentative de l'état pathologique du patient car elle est le reflet d'un instantané, dans l'espace et le temps, de l'hétérogénéité de la masse tumorale. Des biopsies répétées régulièrement sur le patient seraient requises afin d'apporter les informations nécessaires à l'évaluation et au suivi de l'évolution de la maladie. Cependant cette procédure médicale présente un certain degré de risques et complications incluant de la douleur au niveau du site de prélèvement, un risque d'endommagement des tissus environnants et d'infection. En pratique les biopsies sont limitées pour éviter les risques et certains sites de prélèvements restent inaccessibles.

Depuis quelques décennies et les récentes avancées technologiques, les recherches se focalisent sur des **biomarqueurs circulants**, disséminés dans les fluides corporels tels que le sang, la lymphe, les urines ou le liquide céphalo-rachidien. La recherche de biomarqueurs au sein de ces biofluides est appelé **biopsie liquide** par opposition au terme de biopsie solide qualifiant la biopsie classique de prélèvement de tissus. Ce type de biopsie **moins invasive** peut être effectuée de façon répétée dans le temps. De plus cette technique permet l'accès à des marqueurs circulants issus de différents sites de l'organisme. Ainsi la biopsie liquide représenterait un outil plus approprié que la biopsie solide pour évaluer l'hétérogénéité de la masse tumorale^{1,2}. Cette technique présente un fort potentiel pour répondre au besoin clinique d'un accès à une information biologique représentative vis-à-vis de l'état pathologique d'un patient tout au long d'un parcours de soins. La biopsie liquide permettrait un **suivi de l'évolution** des tumeurs primaire et métastatiques ainsi que le suivi de la réponse à un traitement thérapeutique, permettant ainsi d'adapter à l'échelle individuelle la prise en charge des patients. Ces perspectives sont qualifiées par la communauté du milieu médical de **médecine personnalisée ou de précision**.

De nombreuses techniques sont en cours de développement pour l'extraction et l'analyse de biomarqueurs sanguins. Dans le domaine de l'oncologie, les principaux biomarqueurs d'intérêt sont essentiellement du matériel biologique issu de tumeurs tels que des fragments d'ADN^{3,4} et ARN⁵, des vésicules extracellulaires, ou exosomes, dérivant de cellules tumorales⁶, et des cellules tumorales circulantes (CTCs).

1.2. Les CTCs en tant que biomarqueurs tumoraux

Les CTCs ont été documentées pour la première fois en 1869 par un médecin australien, Thomas Ashworth, à partir d'observations de sang d'un patient atteint d'un cancer métastatique ⁷. Bien qu'elles aient été découvertes il y a près de 150 ans, elles ont été le sujet de peu d'études avant le milieu des années 1990. Ceci s'explique par leur détection qui relève du défi technique. Avec les avancées dans des disciplines telles que la médecine et l'oncologie, la biologie, la science des matériaux et la chimie, la détection de CTCs est devenue un domaine de recherche très actif. Leur détection au sein du sang périphérique est notamment étudiée dans de nombreux travaux, car ce fluide corporel constitue un intermédiaire abondant et simple d'accès pour la biopsie liquide.

1.2.1. Les CTCs au sein de la circulation sanguine

Dans le cas des carcinomes, des cellules épithéliales se détachent d'une tumeur primaire pour rejoindre la circulation sanguine, la lymphe, la moelle osseuse ou le liquide céphalo-rachidien par le biais d'un processus appelé **Transition Epithélio-Mésenchymateuse (Epithelial to Mesenchymal Transition, EMT)**. Ce processus décrit en détail par D. Shook et R. Keller en 2003 ⁸ a été pour la première fois rapporté dans les années 1980 comme acteur du développement embryonnaire ⁹ puis à partir de 2005 comme mode de dissémination de cellules tumorales au sein de l'organisme ¹⁰. Le processus d'EMT est un processus transitoire durant lequel les cellules épithéliales subissent une reprogrammation génétique associée à des modifications phénotypiques pour acquérir des propriétés mésenchymales et devenir mobiles. Ainsi, les cellules cancéreuses acquièrent la capacité d'évoluer au sein de la circulation sanguine pour coloniser des tissus à distance. Il a été mis en évidence que les une partie des cellules cancéreuses ayant subi le processus d'EMT conservent des caractéristiques épithéliales permettant de les différencier des cellules sanguines saines ¹¹. Les cellules infiltrant ainsi la circulation sanguine lors de l'intravasation et voyagent librement au sein du biofluide. Le processus inverse est la **Transition Mésenchymo-Epithéliale (Mesenchymal to Epithelial Transition, MET)** permettant aux cellules de passer de la circulation sanguine à un tissu, c'est l'extravasation. Certaines de ces cellules peuvent former des tumeurs secondaires ou métastases à des sites distants de la tumeur primaire. Les CTCs sont ainsi associées au **développement métastatique** ^{11,12}, première cause de décès par cancer ¹³. Le processus complet est présenté **Figure 1**.

Les CTCs présentes au sein de la circulation sanguine ne sont pas toutes identiques en raison des transformations phénotypiques qu'elles ont subi. Il existe une diversité de CTCs qui diffèrent les unes des autres soit par une évolution différente au sein de la tumeur primaire, ce qui traduit une hétérogénéité de la tumeur, soit par une transformation différente lors de l'EMT. La capture de ces CTCs afin qu'elle soit représentative doit permettre de capturer de manière exhaustive toutes les variétés possibles de CTCs. Les variabilités morphologiques et phénotypiques des CTCs et les différentes approches technologiques mises en œuvre à ce jour sont présentées en section 1.3 et 1.5 de ce chapitre respectivement.

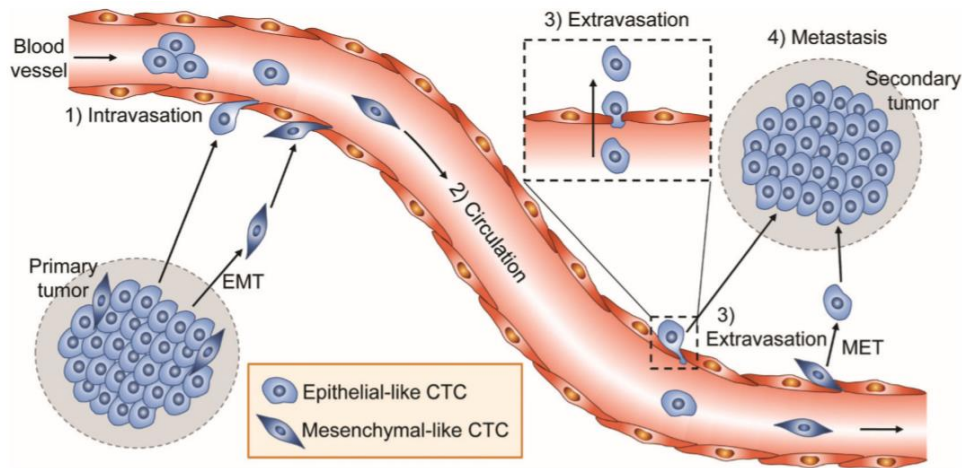


Figure 1 Intravasation de CTCs issues de tumeurs primaires au sein de la circulation sanguine par le processus d'EMT. Le processus inverse de MET permet l'extravasation des cellules vers des tissus distants où elles sont capables d'initier des métastases. Schéma extrait de la revue sur les technologies microfluidiques pour l'isolement de CTCs par K. Han et al. ¹⁴.

Lorsqu'elles se retrouvent dans la circulation sanguine, les CTCs sont au contact de cellules appelées éléments figurés du sang périphérique. Ces cellules que nous appelons *cellules sanguines* pour simplification comprennent les leucocytes ou globules blancs, acteurs du système immunitaire, les érythrocytes ou globules rouges permettant le transport de gaz (O_2 et CO_2) et les thrombocytes ou plaquettes responsables de la coagulation. La circulation sanguine constitue un environnement agressif et défavorable aux cellules tumorales, particulièrement celles d'origine épithéliale exposées à des conditions de non adhérence, et un nombre important de cellules accédant à la circulation meurent en quelques heures ¹⁵. Cependant, certaines CTCs présentant un fort potentiel tumoral interagissent avec certaines cellules sanguines telles que les leucocytes ou plaquettes et survivent dans le milieu sanguin. La présence de CTCs dans la circulation sanguine représente néanmoins un événement rare. En effet, des premières études dans le domaine suggèrent la présence d'une CTC parmi 10^6 cellules mononuclées dans le sang périphérique de patients de cancer du sein métastatique, soit environ 1 CTC par millilitre de sang ¹⁶. Des études plus récentes ont dénombré jusqu'à quelques milliers de CTCs dans un millilitre de sang pour un cancer métastatique du sein ¹⁷ ou dans une étude sur patients de cancer du poumon à petites cellules ¹⁸. Cependant ces valeurs élevées paraissent être des cas isolés et le nombre de **1 à 10 CTCs par millilitre de sang** pour un cancer métastatique est généralement accepté dans la littérature^{4,19}, ce nombre variant avec le stade plus ou moins avancé de la maladie. Ainsi l'extraction de ces cellules à partir de sang complet présente un défi technologique. Les CTCs peuvent être retrouvées sous forme de clusters dans la circulation sanguine. Ces clusters présenteraient un potentiel métastatique 100 fois plus élevé en comparaison de CTCs individuelles ²⁰. Cependant ces clusters restent rares dans la circulation sanguine présentant seulement 2 à 5% de la population totale de CTCs ²¹. Le nombre de cellules formant les clusters peut atteindre jusqu'à 100 cellules mais les clusters existent en majorité sous la forme d'agrégats de 2 à 4 cellules ²².

1.2.2. Les CTCs et potentielles applications en utilisation clinique

En comparaison d'autre biomarqueurs tel que l'ADN circulant, l'isolement de CTCs viables offre une large gamme d'applications pour des analyses biologiques. Des études structurales et morphologiques peuvent être menées sur des cellules intactes provenant de tumeurs. Un séquençage du génome dans sa totalité peut être effectué ainsi que des analyses moléculaires de protéines et ARN (acide ribonucléique). L'accès aux CTCs offre aussi l'avantage de mettre en place des modèles *in vitro* et *in vivo*, afin d'étudier les mécanismes d'initiation métastatique par exemple ²³.

Sur le plan clinique, les CTCs peuvent être utilisées pour un **diagnostic précoce** du cancer, un **pronostic** ou en tant que **marqueur prédictif** pour le suivi ou l'adaptation du traitement thérapeutique.

- Diagnostic précoce et diagnostic de la maladie résiduelle

Des CTCs ont été observées à des stades précoces du cancer^{24,25}. Elles représentent donc un outil potentiel pour le diagnostic précoce du cancer, lorsque les tumeurs ne sont pas encore visibles par le biais des techniques de diagnostic actuelles incluant les techniques d'imagerie. Selon une approche similaire, les CTCs pourraient aussi être utilisées comme indicateurs d'éventuelles rechutes post traitement. Pour effectuer un diagnostic fiable, la méthode adoptée doit être **suffisamment sensible**. De plus en raison de très faibles concentrations de CTCs dans le sang de patients aux stades précoces de la maladie, il est nécessaire d'accéder à **d'importants volumes de sang** pour permettre une détection fiable. Différentes solutions techniques sont étudiées pour répondre à cette problématique. Une étude propose par exemple de combiner la technique de leucaphérèse afin d'isoler les cellules mononuclées d'importants volumes sanguins (25L) pour augmenter significativement le nombre de CTCs détectées par la technologie CellSearch® à partir d'échantillons de 7,5 mL. Le nombre de CTCs capturées sur une cohorte de 29 patients atteints de différents types de cancer est de 0,7 en moyenne en utilisant le dispositif CellSearch® sur un prélèvement sanguin classique contre 7 CTCs capturées en moyenne en utilisant un échantillon ayant préalablement subi une leucaphérèse. De plus des CTCs ont été identifiées pour 28% des patients de la cohorte en utilisant le dispositif CellSearch® de façon classique et pour 72% en combinant les deux techniques²⁶. Une autre solution est l'utilisation de dispositifs de détection *in vivo* tel que le dispositif commercial GILUPI CellCollector® (GILUPI GMBH, Allemagne) pour augmenter le volume sanguin analysé. Il comprend une tige fonctionnalisée d'anticorps anti-EpCAM (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), protéine exprimée sur la surface membranaire de certaines CTCs (voir 1.3.1), qui s'insère dans la veine du patient par le biais d'un cathéter²⁷. Les techniques *in vivo* présentent le potentiel d'accéder à de faibles limites de détection (en anglais *Limit Of Detection*, LOD) (voir 1.4). La meilleure performance rapportée pour une technique d'isolement de CTCs *in vivo* est de 0,12 cellule par mL à comparer à 1 cellule par mL et 2,2 cellules par mL pour les meilleures performances des dispositifs basés sur les techniques d'immunoaffinité ou sur les critères physiques (voir 1.5) respectivement²⁸. Cependant ces dispositifs restent invasifs et le temps d'analyse relativement long (environ 30 min pour le dispositif GILUPI CellCollector®) ce qui peut freiner leur utilisation dans le cadre du diagnostic. Les CTCs isolées peuvent ensuite être identifiées par des techniques d'immunoaffinité ou par caractérisation moléculaires d'ARN, ADN ou de protéines¹⁹.

- Pronostic

Le nombre de CTCs par unité de volume de sang a été corrélé à la survie moyenne d'un patient métastatique, un nombre anormalement élevé de CTCs traduisant une probabilité de survie globale plus courte pour de nombreux cancers tels que le cancer du poumon à petite cellules¹⁸ ou le cancer de l'œsophage²⁹ par exemple. Cette valeur pronostique a été validée pour les cancers métastatiques du sein, de la prostate, du colon et les mélanomes¹⁹. A titre d'exemple, des études ont montré que la détection d'une valeur seuil de 5 CTCs/7,5 mL de sang a été associée à de faibles taux de survie pour le cancer du sein³⁰. Le défi pour l'utilisation de CTCs comme marqueurs pronostiques est **l'énumération exhaustive de la population hétérogène de CTCs** dans un échantillon de sang. Aujourd'hui la seule technologie utilisée à cet effet est le dispositif CellSearch®. Cependant il est basé sur le principe de l'immunoaffinité en ciblant la protéine EpCAM uniquement, ce qui peut ne pas être représentatif de la population totale de CTCs (voir 1.3.1). Il est donc nécessaire de développer des techniques permettant d'extraire l'ensemble de la population de CTCs, en tenant compte de leur diversité phénotypique.

- Marqueur prédictif et suivi médical

Des études ont mis en évidence que le profil génomique de CTCs est comparable à celui de tumeurs primaires et métastatiques³¹, suggérant que les CTCs peuvent fournir un instantané des caractéristiques de la masse tumorale au moment du prélèvement sanguin. Elles peuvent donc offrir la perspective de guider des choix de traitement de façon personnalisée pour un patient à un moment donné. Le nombre de CTCs détectées en circulation peut par ailleurs être directement corrélé à l'efficacité du traitement dans le cas de cancers métastatiques et non métastatiques^{24,32}. Ces études témoignent de leur utilisation possible en tant qu'outils pour le suivi ou l'adaptation du traitement de la pathologie cancéreuse. De plus, les CTCs isolées peuvent permettre d'établir des lignées cellulaires³³ ou des modèles de xénogreffes³⁴ et d'organoïdes³⁵ afin de tester l'efficacité des traitements pharmacologiques. Cette perspective est prometteuse pour le traitement personnalisé du cancer car les CTCs peuvent ainsi fournir des informations prédictives sur l'état de la maladie d'un patient donné. Pour cette application, le défi repose sur l'isolement de **toute la diversité des CTCs et ceci en nombre suffisant pour être statistiquement représentatif**. Il faut par ailleurs être capable de récupérer des **cellules viables** à l'issue du processus de capture.

De nombreuses études évaluent le potentiel de l'utilisation des CTCs pour des applications cliniques³⁶⁻³⁹. Cependant les techniques d'isolement doivent encore évoluer pour permettre davantage de sélectivité et de précision et l'analyse d'importants volumes sanguins. Afin d'introduire l'usage de ce biomarqueur en routine clinique, il est important de développer des plateformes automatisées qui combindraient isolement et énumération avec des analyses biologiques subséquentes des CTCs. Cela éviterait de combiner l'usage de différents dispositifs et de multiplier les étapes du processus, et permettrait à un personnel non spécifiquement qualifié d'utiliser cet outil en routine.

1.3. Les caractéristiques spécifiques des CTCs

L'hétérogénéité au sein de la population de CTCs complique la mise en place de techniques d'extraction spécifiques à partir d'échantillons sanguins. On peut distinguer des hétérogénéités sur deux plans principaux que sont les plans immunologiques et physiques.

1.3.1. Caractéristiques phénotypiques

Les CTCs expriment des molécules particulières à la surface de leur membrane plasmique qui sont des marqueurs utilisés pour leur détection parmi les cellules sanguines ou pour confirmation de leur nature cancéreuse. On appelle propriétés immunologiques des CTCs l'expression globale de ces antigènes surfaciques membranaires. Les marqueurs le plus largement utilisés appartiennent à trois familles d'antigènes qui sont les marqueurs épithéliaux, mésenchymateux ou associés aux cellules souches.

Cependant il **n'existe pas de marqueur universel** commun à toutes les CTCs permettant leur discrimination parmi les cellules sanguines. L'identification des CTCs repose ainsi systématiquement sur l'analyse de différents marqueurs. Dans la littérature relative à la capture de CTCs à partir d'échantillons sanguins, certains critères de base sont utilisés pour affirmer que les cellules isolées sont bien d'origine épithéliale et donc potentiellement cancéreuses. Il s'agit de :

- La présence d'un **noyau**
- L'**absence d'expression de l'antigène CD45**, glycoprotéine membranaire propre aux cellules mononuclées périphériques sanguines (globules blancs)

- **L'expression de l'antigène cytokératine**, protéine du cytosquelette des cellules épithéliales, confirmant la présence de cellules non habituellement circulantes dans le sang et donc potentiellement de nature cancéreuse pour les cancers d'origine épithéliale, les carcinomes.
- **L'expression de la protéine EpCAM** (*Epithelial Cell Adhesion Molecule*), glycoprotéine transmembranaire caractéristique de cellules épithéliales et exprimée par des CTCs issues de nombreux cancers d'origine épithéliale et qui conservent leur phénotype épithélial.

Parmi les critères de la liste précédente, l'utilisation des marqueurs épithéliaux, bien que très répandue dans la littérature pour l'identification de CTCs, est à nuancer. La protéine EpCAM par exemple est exprimée par les CTCs qui conservent leur phénotype épithélial, mais son niveau d'expression est hétérogène au sein de la population de CTCs. En effet l'expression de cette protéine peut être fortement réduite lors de l'EMT, processus largement associé à la mobilité des CTCs pour leur insertion dans la circulation sanguine. Il est rare que les CTCs présentent un phénotype purement mésenchymateux à l'issue de la transition. Cependant des **phénotypes hybrides** peuvent aussi apparaître lors de ce processus transitoire ¹¹. Pour les phénotypes hybrides présentant à la fois les caractéristiques du phénotype épithélial et mésenchymateux, la protéine EpCAM peut être toujours exprimée mais son niveau d'expression dépend de l'avancée du processus de transition et elle peut être co-exprimée avec des marqueurs mésenchymateux telles que les protéines N-cadhérine et vimentine par exemple (voir **Figure 2**). La protéine EpCAM peut aussi complètement disparaître à l'issue de la transition.

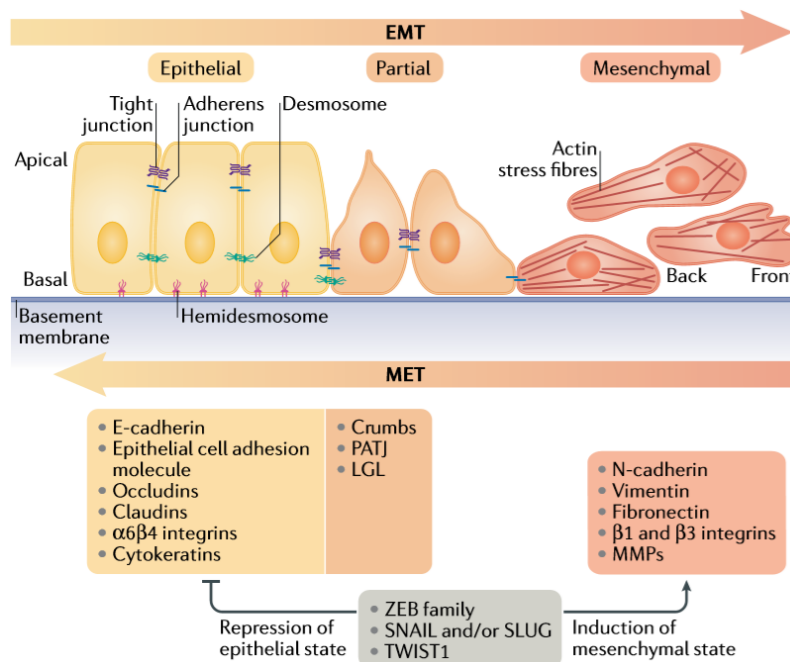


Figure 2 Transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et son processus inverse la transition mésenchymato-épithéliale (MET). Le schéma indique les différences entre phénotypes épithéliaux, mésenchymateux et hybrides des cellules, ainsi que les protéines exprimées associées à chaque phénotype. Lors de l'EMT, les cellules deviennent mobiles et acquièrent des propriétés invasives. L'EMT est un processus réversible et les cellules peuvent retourner à l'état épithélial par la transition MET. Ces transitions EMT et MET peuvent se produire lors d'un développement normal ou lors de la progression du cancer. Cependant, il est très rare que des cellules tumorales issues de carcinomes atteignent complètement le stade mésenchymateux. Le schéma est extrait d'une revue sur les mécanismes des transitions épithéliales mésenchymales et de leurs implication pour le cancer par A. Dongre et R. A. Weinberg ⁴⁰.

D'autres marqueurs épithéliaux spécifiques de différents cancers peuvent être utilisés pour la détection de CTCs. C'est le cas par exemple des protéines HER2 et EGFR pour les cancers du sein et du

colon respectivement. Ces marqueurs épithéliaux ne peuvent pas être utilisés dans le cas de tumeurs qui ne sont pas des carcinomes comme les mélanomes, tumeurs du système pigmentaire de la peau, ou les glioblastomes, tumeurs cérébrales, par exemple.

Certaines cellules dites à **propriétés souches** présentent la capacité de s'auto renouveler et de se différencier pour créer de nouvelles tumeurs à des sites distants de celui de la tumeur primaire ⁴¹. Une infime partie de la population des CTCs a été identifiée comme présentant les caractéristiques particulières de ces cellules souches cancéreuses (CSC). Elles présentent un fort intérêt sur le plan clinique, étant responsables de la **formation de métastases** et développant des phénomènes de **résistance aux traitements** ⁴². Leur isolement permettrait de mieux comprendre les mécanismes de l'initiation du cancer et d'étudier des méthodes pour les éliminer. La population de CTCs identifiée comme CSC présente généralement à la fois des propriétés de cellules souches, épithéliales et mésenchymateuses ce qui peut aboutir à une augmentation de la diversité des marqueurs à la surface membranaire de ces cellules. Des marqueurs spécifiques aux cellules souches sont étudiés pour les cibler spécifiquement tels que les antigènes CD44, CD24 et l'enzyme aldéhyde déshydrogénase (ALDH1) ⁴³.

Ainsi, les **profils d'expression d'antigènes membranaires des CTCs sont très hétérogènes**. Les outils développés pour la capture de CTCs basés sur leurs propriétés immunologiques doivent mettre en œuvre une large gamme d'anticorps pour couvrir l'ensemble des phénotypes référencés en circulation. Les propriétés immunologiques sont utilisées pour isoler les CTCs à partir du sang ou confirmer leur nature cancéreuse mais seule une caractérisation génomique permet la détection des aberrations chromosomiques ou les mutations propres aux cellules tumorales et ainsi confirmer l'origine tumorale des cellules observées.

1.3.2. Caractéristiques physiques des CTCs

Outre leurs caractéristiques immunologiques spécifiques, les CTCs présentent aussi des aspects physiques particuliers, utilisés pour les différencier des cellules sanguines. Cependant, malgré leurs caractéristiques distinctives, les CTCs détectées dans le sang présentent une **grande diversité morphologique**. Les CTCs peuvent être trouvées dans la circulation sanguine sous forme de cluster, comme évoqué précédemment, sous forme de cellule intacte ou sous forme apoptotique ¹⁷.

- Ratio noyau/cytoplasme (N/C)

Des caractérisations microscopiques ont révélé que les CTCs conservent les caractéristiques morphologiques de cellules appartenant aux tumeurs solides, distinguées par un **ratio noyau/cytoplasme (N/C) élevé**, ainsi qu'une **forme et taille irrégulières** par rapport aux cellules épithéliales normales ^{44,45}. Les cellules cancéreuses ont été identifiées avec des noyaux de taille très élevée et parfois multinucléés en signe de division anormale ⁴⁶. Cependant, à l'instar de nombreux traits caractéristiques des CTCs, le ratio (N/C) varie parmi la population de CTCs. Une étude de cas montre cette variation parmi 659 CTCs détectées à partir de 10 mL de sang d'une patiente atteinte de cancer du sein métastatique ⁴⁷. Une autre étude intéressante corrèle le paramètre (N/C) de CTCs de patients atteints de cancer de la prostate à leur statut métastatique ⁴⁸. La **Figure 3** présente les résultats de cette étude.

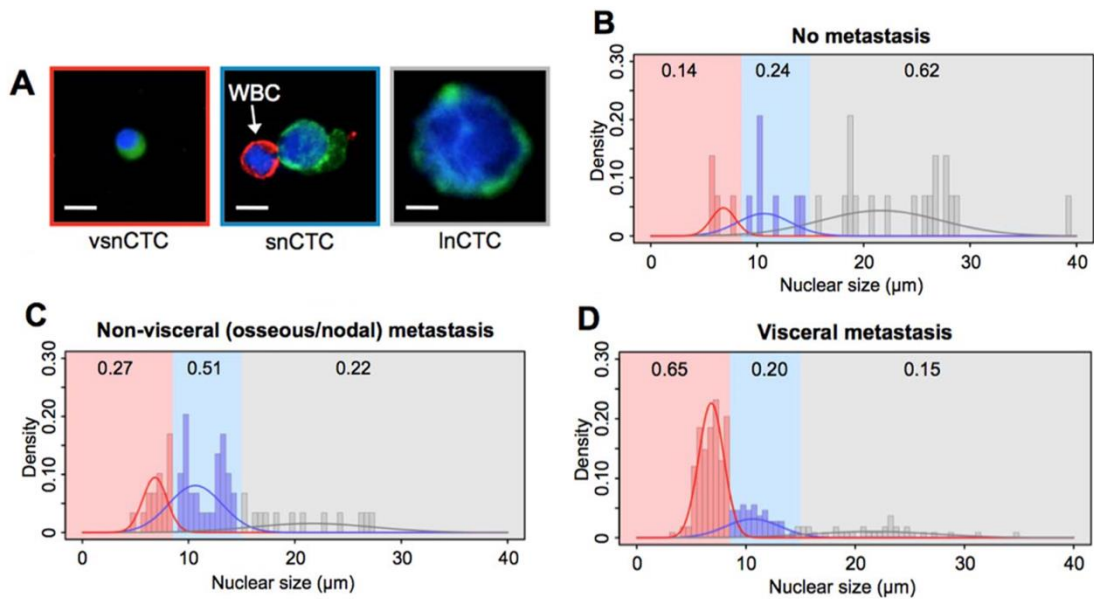


Figure 3 Relation entre la taille du noyau de CTCs et le statut métastatique. a) Représentation de CTCs avec une taille de noyau élevée (large nuclear CTCs, InCTC), avec une taille de noyau faible (small nuclear CTCs, snCTC) et avec une taille de noyau très faible (very small nuclear CTC, vsnCTC). b) Statut non métastatique pour lequel les InCTC représentent 62% de la population de CTCs. c) Statut métastatique non viscéral pour lequel les snCTC représentent la majeure sous population de CTCs avec un taux de 52%, suivi par les vsnCTC qui représentent 27% de la population totale. d) Statut métastatique viscéral pour lequel les vsnCTC représentent la majorité de CTCs avec un taux de 65% suivi d'un taux de 20% de snCTCs. Les images sont extraites de l'étude par J-F Chen et al.⁴⁸ L'étude a été menée sur des patients de cancer de la prostate parmi les différents statuts métastatiques cités. La capture et l'énumération des CTCs a été effectuée avec le dispositif NanoVelcro chip ou Cyto TrapNano™ (CytoLumina, Etats-Unis).

- Déformabilité

La déformabilité des CTCs est un sujet peu référencé dans la littérature, probablement en raison de la difficulté d'effectuer ce type de mesures sur des cellules en général et sur des CTCs viables en particulier. Certaines études ont montré que les cellules tumorales ont une déformabilité augmentée en comparaison des cellules non tumorales extraites du même tissu^{49,50}. Il a aussi été suggéré que la déformabilité des cellules tumorales est potentiellement liée à leur potentiel métastatique⁵¹. Par contre si les CTCs sont comparées à des cellules sanguines normales, le résultat opposé est généralement obtenu. Il est aujourd'hui accepté dans la littérature d'attribuer une déformabilité plus importante aux cellules sanguines normales en comparaison des CTCs. Dans une cellule le noyau est l'élément le moins déformable ainsi, cette caractéristique de moindre déformabilité des CTCs peut découler des ratios (N/C) évoqués dans le paragraphe précédent, permettant de comparer la déformabilité relative des cellules sanguines par rapport aux CTCs, un ratio moins élevé indiquant une déformabilité supérieure. Une étude rapporte un ratio (N/C) de 0,8 et 0,55 pour les CTCs et leucocytes respectivement⁵². Cependant comme évoqué précédemment, les CTCs présentent aussi de larges variations au niveau des ratios (N/C). Il est néanmoins globalement accepté que **ces ratios anormalement élevés leur confèrent une rigidité augmentée en comparaison des cellules sanguines.**

- Taille

La taille des CTCs rapportée dans la littérature s'étend sur une large gamme. Parmi les différentes références disponibles à ce sujet et selon le type de cancer concerné, le diamètre des CTCs détectées **peut varier de 3 à 32 μm dans le cas de carcinomes** ^{53,54}. Ces valeurs dépendent du tissu d'origine ainsi que du patient. Des diamètres variant de 4 à 30 μm au sein de la population de CTCs détectée ont aussi été rapportés pour un seul et même patient ¹⁷. En comparaison des cellules sanguines, le diamètre des CTCs est généralement plus important que celui des globules rouges et plaquettes alors qu'un chevauchement existe avec le diamètre des leucocytes. Cependant, la majorité des CTCs présentent une taille supérieure à celle des leucocytes ¹⁹ bien qu'il a été également montré que les CTCs peuvent présenter des similitudes avec les leucocytes en terme de taille ⁵⁵. La **Figure 4** présente les tailles rapportées dans la littérature pour les CTCs par rapport aux cellules sanguines ainsi que le nombre des différents types cellulaires contenu dans un millilitre de sang.

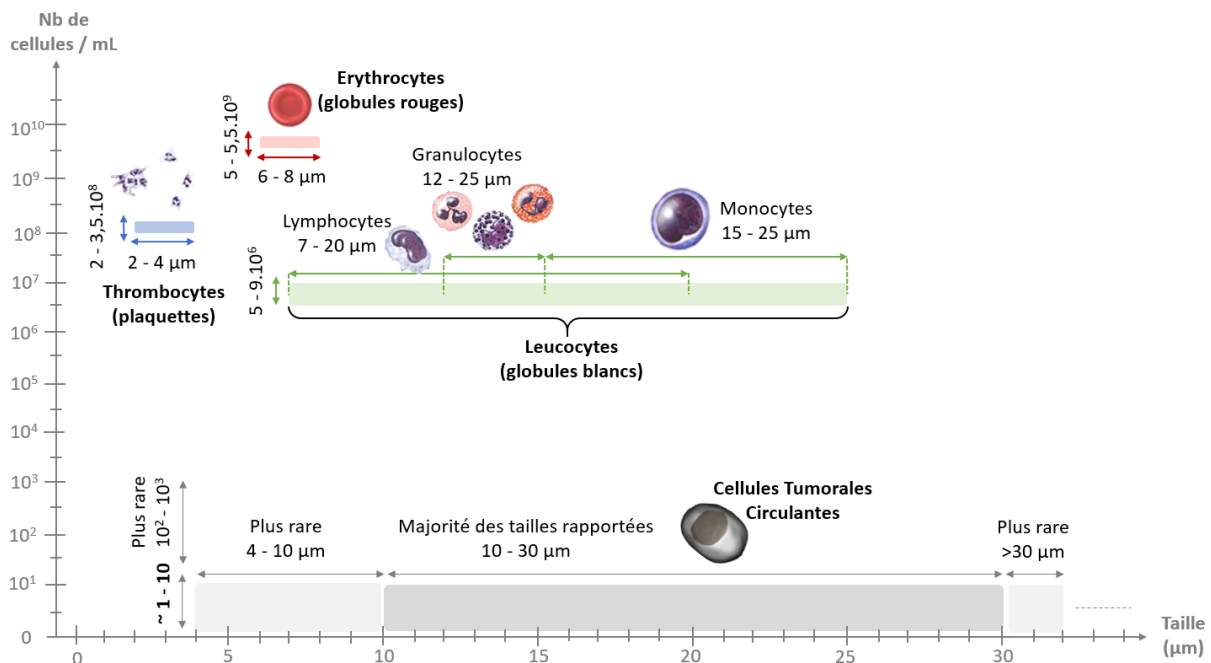


Figure 4 Graphique comparant la taille des CTCs à celle des cellules sanguines[†], ainsi que le nombre de chaque type cellulaire par millilitre de sang.

- Propriétés électriques

De nombreuses études ont aussi mis en avant que les CTCs présentent des **propriétés diélectriques particulières** (voir Chapitre 2 de ce manuscrit). Il a notamment été rapporté que les cellules tumorales présentent une capacité de la membrane plasmique plus élevée que celle des cellules sanguines ⁵⁶. D'autres études ont aussi montré que la membrane plasmique de certaines cellules cancéreuses présente une conductivité augmentée conférée par la surexpression de protéines spécifiques ⁵⁷. Des techniques telles que l'impédancemétrie ou la diélectrophorèse exploitent ces caractéristiques particulières pour les différencier des cellules sanguines.

Que ce soit sur le plan immunologique ou physique, les CTCs présentent une grande **diversité phénotypique** qui rend complexe la mise en place d'outils pour leur isolement et identification.

[†] Les données relatives aux tailles et nombre de cellules sanguines proviennent du site : <https://www.anatomyatlases.org/MicroscopicAnatomy/Section04/Section04.shtml>

Néanmoins, cette hétérogénéité leur confère aussi le potentiel de représentativité de la masse tumorale solide dans son ensemble.

1.4. Les facteurs de performance des dispositifs d'isolement de CTCs

Avec la multiplication de prototypes pour la détection de CTCs, la détermination de **facteurs de performance** vise à permettre une comparaison des différents dispositifs développés. Généralement le dispositif de référence adopté dans la littérature est le dispositif CellSearch®, seul outil ayant reçu l'agrément de la FDA à ce jour pour un usage en clinique, avec valeur de pronostic pour les cancers métastatiques de la prostate, du sein et du colon. Cependant, la variété des techniques et configurations des dispositifs employés peut biaiser la comparaison directe de leurs performances entre eux ou vis-à-vis d'un dispositif de référence. Il faut noter que ces paramètres sont évalués à partir de cellules issues de lignées cellulaires tumorales mises en suspension dans un milieu simple tel qu'un tampon phosphate salin par exemple (*Phosphate Buffered Saline, PBS*) ou dans du sang de donneur sain. Ces cellules modèles ont des propriétés physico-chimiques qui diffèrent de celles des CTCs. Par exemple une étude compare la morphologie de cellules PC3 (lignée cellulaire de cancer de la prostate humaine) à des CTCs de patients de cancer de la prostate isolées avec le dispositif CellSearch et montre que ces dernières ont un ratio N/C plus important et une taille inférieure aux cellules appartenant à la lignée PC3⁵⁸. Par ces différences, les paramètres déterminés peuvent ne pas être représentatifs de la capacité des dispositifs à isoler des CTCs à partir du sang. Néanmoins, certains de ces paramètres peuvent toutefois être déterminés à partir d'échantillons cliniques et l'ensemble de ces paramètres sont acceptés par la communauté scientifique pour l'évaluation du potentiel de détection des CTCs dans le sang des différents dispositifs.

Pour la description qui suit des facteurs de performance, nous appelons *CT* les cellules de lignées tumorales mises en suspension au sein d'un échantillon pour évaluer les performances d'un dispositif. Les dénominations *GB* et *GR* correspondent aux globules blancs et globules rouges présents dans un échantillon lorsque le modèle choisi est un prélèvement de sang de donneur sain.

- L'efficacité de capture

L'efficacité de capture est un des critères les plus importants pour caractériser le système. Elle traduit la capacité du dispositif à **capturer un maximum de cellules tumorales** au sein du dispositif. Ce paramètre correspond alors au nombre de cellules capturées parmi le nombre total de cellules tumorales mises en suspension au sein d'un échantillon. L'efficacité de capture est exprimée en pourcentage par le biais de la relation suivante :

$$Efficacité (\%) = \frac{CT \text{ capturées}}{CT \text{ total}} \times 100 \quad (1)$$

- La sélectivité

La sélectivité d'un dispositif reflète sa capacité à **cibler spécifiquement des cellules tumorales** parmi les cellules interférant dans le milieu sanguin, notamment les leucocytes pouvant présenter des similitudes avec les caractéristiques des cellules tumorales exploitées par la technique d'isolement. Ce paramètre peut être évalué à partir d'échantillons cliniques en prenant en compte le nombre de CTCs capturées. Ce paramètre permet d'évaluer la contamination du dispositif par des cellules non tumorales telles que les leucocytes. Il s'exprime en pourcentage avec la relation suivante :

$$Sélectivité (\%) = \frac{CT \text{ capturées}}{GB \text{ capturés}} \times 100 \quad (2)$$

- Le facteur d'enrichissement

Le facteur d'enrichissement est un paramètre qui reflète le **facteur d'augmentation des cellules tumorales par rapport aux contaminants**, principalement les leucocytes, avant et après le processus de capture dans un volume donné. La relation est la suivante :

$$\text{Facteur d'enrichissement} = \frac{CT \text{ capturées} / GB \text{ capturés}}{CT \text{ total} / GB \text{ total}} \quad (3)$$

- Autres facteurs de performance

D'autres facteurs de performance généralement utilisés sont le **taux de viabilité** désignant le nombre de cellules tumorales viables capturées au sein du dispositif, ainsi que le **taux de récupération** désignant le nombre de cellules tumorales qu'il est possible de récupérer à l'issue du processus de capture. La **pureté** de la capture se rapproche du paramètre de sélectivité et désigne le taux de CTCs capturées sur le nombre total de cellules capturées. L'indicateur inverse est le taux de contamination. La **limite de détection** (en anglais *Limit Of Detection*, LOD) correspond au nombre minimal de cellules tumorales pouvant être détecté par unité de volume. Le **volume analysé et le débit effectif**, soit le volume analysé par unité de temps, représentent aussi des critères de performance des dispositifs. Enfin la **reproductibilité** des mesures intra et inter opérateur est un critère général de performance pour tout type de capteur, et d'autant plus important dans le contexte de prise de décision médicale.

1.5. Technologies pour l'isolement de CTCs dans le sang

L'**isolement** des CTCs fait généralement référence à la **capture** et à l'**enrichissement** de CTCs à partir d'un échantillon de sang, prétraité ou non. La capture désigne le traitement de l'échantillon par la méthode d'interaction choisie entre les CTCs et les matériaux, qui se base sur la liaison avec des anticorps spécifiques ou sur leurs propriétés physiques particulières. Successivement à l'acte de capture, l'enrichissement signifie le fait d'obtenir un échantillon avec un nombre de CTCs augmenté vis-à-vis du nombre de cellules sanguines à partir d'un échantillon sanguin de départ. Une étape d'**analyse des CTCs** peut être effectuée suite à leur isolement. L'analyse peut comprendre l'**identification ou détection** des CTCs qui vise à confirmer la nature tumorale des cellules capturées. Cette identification peut être effectuée par des analyses phénotypiques en visualisant des marqueurs membranaires spécifiques par immunofluorescence par exemple. Ces analyses peuvent être effectuée directement au sein des plateformes d'isolement des CTCs. Des analyses génotypiques plus poussées telles que la transcriptomique pour l'étude de l'ARN par exemple nécessitent un **détachement ou une collecte** des CTCs du dispositif de capture.

Les technologies pour l'isolement de CTCs peuvent se différencier selon deux approches principales. Une première approche est l'**isolement par immunoaffinité** et se base sur les marqueurs spécifiques exprimés à la surface des membranes plasmiques des CTCs ou des cellules sanguines. Les méthodes ciblant spécifiquement les CTCs sont dites positives alors que celles ciblant les cellules sanguines sont négatives. Une autre approche rassemble les techniques se basant sur **des critères physiques spécifiques** des CTCs pour les extraire du milieu sanguin. Différents dispositifs ont été développés basés sur l'une des deux approches ou combinant des étapes appartenant à chacune de ces approches.

Certaines technologies nécessitent une étape de **traitement du sang** précédant l'étape de capture. Il s'agit souvent d'une centrifugation ou d'une lyse des globules rouges, dans le but de réduire le nombre de cellules sanguines interférant avec les CTCs et ainsi faciliter la capture en réduisant la contamination. C'est par exemple le cas du dispositif CellSearch® qui requiert une étape de

centrifugation pour l'extraction du plasma et l'ajout d'un tampon adapté pour diluer les cellules sanguines. Bien qu'elles améliorent potentiellement la pureté de la capture, ces étapes de traitement du sang peuvent altérer les CTCs et compromettre leur analyse subséquente voire même éliminer certaines CTCs de l'échantillon⁵⁹ ce qui est problématique compte tenu du faible nombre présent au départ au sein du prélèvement sanguin. De plus, ces traitements représentent une étape supplémentaire dans le processus de capture, ce qui complexifie l'utilisation du dispositif et allonge le temps de la manipulation. C'est dans cette optique que nous allons nous intéresser dans ce manuscrit uniquement aux techniques et dispositifs permettant **l'isolement de CTCs à partir de sang complet**. Nous centrerons ainsi le champ de recherche et d'applications dans la lignée de la stratégie développée dans le cadre de la capture par le biais des S-MDCs développés par la société SmartCatch.

Le schéma présenté **Figure 5** répertorie les différentes techniques selon les deux approches capture par immunoaffinité et capture basée sur les critères physiques. Ce schéma est adapté de la revue de Banko *et al.*⁵⁹ qui met en perspective le défi de l'isolement des CTCs à partir de sang complet, les applications qu'elles offrent en tant que biomarqueurs dans le domaine de l'oncologie ainsi qu'un comparatif des différentes techniques d'isolement à partir de sang complet et le potentiel des dispositifs présentés pour leur utilisation en routine clinique. Les efficacités de capture obtenues avec les différents dispositifs commerciaux et en cours de développement présentés dans cette revue sont comprises entre 42 et 98%.

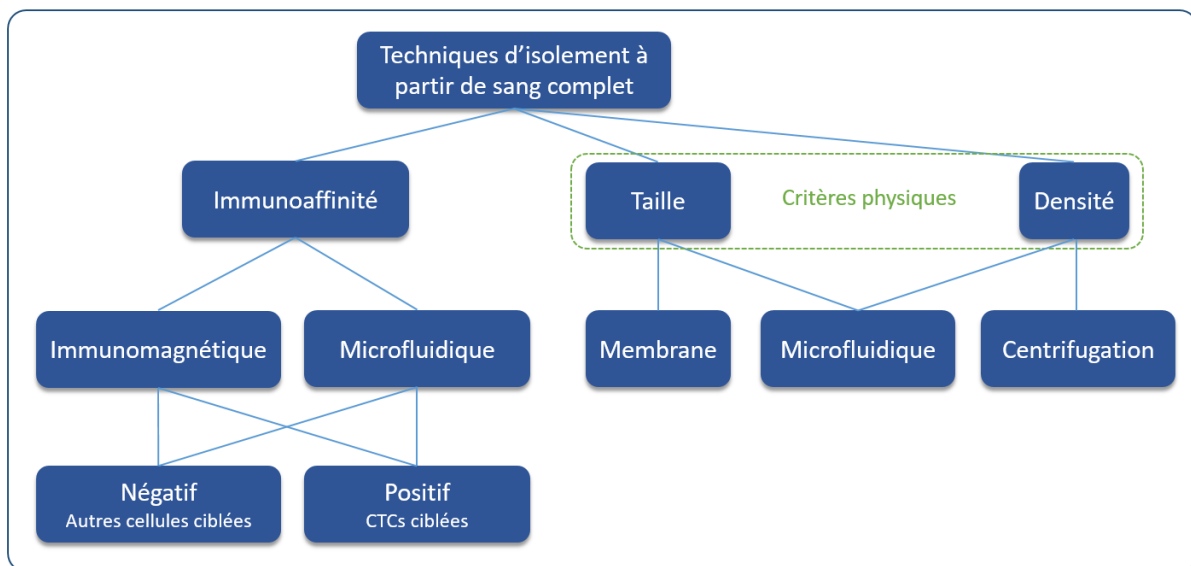


Figure 5 Arborescence des techniques d'isolement de CTCs à partir de sang complet selon les deux approches que sont l'immunoaffinité et l'exploitation des critères physiques. Certains dispositifs peuvent combiner les approches d'immunoaffinité et les approches basées sur des critères physiques au sein d'un même dispositif. Le graphique est adapté de la revue de Banko *et al.*⁵⁹.

1.5.1. Les techniques d'immunoaffinité

Les techniques d'immunoaffinité consistent en l'utilisation **d'anticorps ciblant les antigènes spécifiques** exprimés à la surface des membranes plasmiques des CTCs (voir 1.3.1). L'antigène largement ciblé est l'EpCAM pour les CTCs d'origine épithéliale comme c'est le cas pour le cancer du sein, du colon, de la prostate et du poumon par exemple. Des études ont cependant montré que des cellules épithéliales non tumorales présentant les mêmes antigènes ciblés ont été détectées chez des patients présentant des maladies bénignes du colon, du pancréas et du sein⁵². La présence de cellules épithéliales non tumorales dans le sang de sujets sains a aussi été rapportée⁶⁰. Ceci constitue un risque de faux positif lorsque l'anticorps anti-EpCAM est utilisé pour la détection de CTCs. De plus comme

mentionné précédemment, certaines CTCs peuvent potentiellement perdre le marqueur EpCAM pendant l'EMT et il est aussi important de tenir compte des cellules aux propriétés souches. Dans ce cas-là, le risque dans l'utilisation d'anticorps anti-EpCAM est le faux négatif. C'est pourquoi, de façon à inclure d'autres sous populations de CTCs, des techniques ont été développées employant des cocktails d'anticorps pour cibler des antigènes exprimés par différents types de cancers. Des anticorps ont aussi été développés afin de cibler spécifiquement des marqueurs exprimés par les cellules souches ou les cellules mésenchymateuses. Une revue rapporte les différents antigènes ciblés par les technologies d'isolement par immunoaffinité de CTCs et le type de cellules auquel ils se réfèrent ⁶¹.

- Méthodes immunomagnétiques

Ces méthodes utilisent des micro- ou nanobilles magnétiques fonctionnalisées avec des anticorps qui sont mélangées à l'échantillon sanguin. Les **billes se lient spécifiquement aux CTCs** dans le cas des méthodes d'isolement positives ou aux cellules sanguines dans le cas des méthodes d'isolement négatives. L'utilisation de champs magnétiques permet de manipuler les cellules capturées par les billes magnétiques et de les isoler vers une région particulière de la plateforme alors que le reste des cellules, non liées, sont évacuées. Cette technique présente l'avantage de récupérer facilement les cellules ciblées pour les analyses subséquentes en comparaison de techniques de fonctionnalisation de surface pour lesquelles les cellules adhèrent aux parois des dispositifs. La plateforme non commercialisée **MagSweeper** (Université de Stanford, Etats Unis) comporte des cuvettes dans lesquelles sont disposés l'échantillon de sang et les billes fonctionnalisées ⁶². Des bâtonnets magnétiques permettent de manipuler les billes et d'isoler ainsi les CTCs. Une autre plateforme non commercialisée (Université de Wuhan, Chine) combine l'immunomagnétisme avec la technologie **Strep-Tag**[®], un peptide lié aux anticorps utilisés pour cibler les cellules ⁶³. Les billes magnétiques sont fonctionnalisées avec une protéine présentant une forte affinité pour le peptide. Les cellules capturées à partir de sang complet sont immobilisées sur les microbilles au travers de la liaison peptide-protéine. Cette liaison est dégradable en présence de biotine, ce qui permet de libérer les cellules capturées dans des conditions douces. Un autre avantage de cette plateforme est la fonctionnalisation de différents anticorps tels qu'anti-EpCAM, anti-HER2 et anti-EGFR afin de cibler différentes populations de CTCs.

Des stratégies utilisant le principe d'immunomagnétisme sont aussi utilisées pour un **isolement négatif**. Il s'agit par exemple du dispositif commercial **EasySep**[™] (StemCell[™], France) employant des anticorps ciblant les antigènes CD45 et des billes magnétiques de différentes tailles. L'avantage est l'obtention de CTCs à partir de sang complet **sans biais de marquage spécifique, non marquées et viables** pour les analyses subséquentes. Cependant **la pureté est généralement très inférieure** à celle obtenue avec un isolement positif.

- Méthodes microfluidiques

Les méthodes microfluidiques utilisent des dispositifs conçus par des techniques de microfabrication présentant des structures de dimensions comparables aux tailles des cellules. Dans le cas des techniques se basant sur l'immunoaffinité, la surface des dispositifs est fonctionnalisée avec les anticorps ciblant les antigènes de la surface membranaire des cellules d'intérêt. Les structures microfabriquées visent à augmenter l'interaction entre les cellules et les anticorps. Un exemple de plateforme non commercialisée est le dispositif **CTC-Chip** présentant un réseau de micropiliers fonctionnalisés avec des anticorps anti-EpCAM qui augmentent la surface active du dispositif et dont l'arrangement est optimisé pour favoriser l'interaction avec les cellules ²⁵. Basé sur le même principe, le dispositif non commercialisé **HTMSU (High Throughput Micro Sampling Unit)** est un dispositif comprenant plusieurs microcanaux dont les parois sont fonctionnalisées avec des anticorps ⁶⁴. Les

cellules capturées à partir de sang complet sont ensuite libérées en utilisant de la trypsine et maintenues viables pour des analyses subséquentes. Ce dispositif possède par ailleurs une caractéristique unique qui est l'intégration d'un capteur de conductivité en platine pour la détection des propriétés électriques des CTCs et leur énumération. Toutefois, ce dispositif n'a pas encore été testé lors d'essais cliniques contrairement à ceux cités précédemment. Les principaux inconvénients des méthodes basées sur la microfluidique sont les **faibles volumes analysés et les débits effectifs** rapportés entre 1 et 2 mL/h⁵⁹, limitant le nombre de CTCs capturées.

Les techniques basées sur le principe de l'immunoaffinité présentent une **haute spécificité** et aboutissent en général à des **niveaux élevés de pureté** des CTCs isolées. Une revue sur les différentes techniques d'isolement de CTCs, non limitée aux échantillons de sang complet, rapporte par exemple les meilleurs taux de pureté référencés pour ces techniques à 84% en comparaison à des taux inférieurs à 10% pour des techniques n'utilisant pas d'interaction avec des ligands particuliers pour la capture de CTCs²⁸. Cependant, cette performance peut aussi traduire l'incapacité des techniques d'immunoaffinité à refléter l'hétérogénéité de la population de CTCs par **la non sensibilité à certaines populations durant le processus de capture**. Un autre inconvénient de ces techniques est souvent l'adhésion des CTCs à la surface des dispositifs par le biais des anticorps et la difficulté de les récupérer sans les altérer par des modifications biochimiques notamment⁶⁵. Enfin les kits d'anticorps utilisés pour chaque processus de capture sont relativement coûteux.

1.5.2. Les techniques basées sur les propriétés physiques

Des dispositifs ont été développés qui exploitent certaines caractéristiques physiques distinguant les cellules tumorales des cellules sanguines. Il s'agit, tel qu'évoqué précédemment, de la taille et de la déformabilité, de la densité ou des propriétés diélectriques des CTCs.

- Centrifugation par gradient de densité

La centrifugation par gradient de densité est une des premières méthodes rapportées pour l'isolement de CTCs. En 1959, S. H. Seal observe des gravités spécifiques de 1,092, 1,065 et 1,056 pour des globules rouges, leucocytes et cellules tumorales respectivement⁶⁶. La centrifugation du sang complet résulte en une division de ses constituants en trois couches avec le plasma dans la couche supérieure et les globules rouges au niveau de la couche inférieure. La couche du milieu comprend un mélange de globules blancs, plaquettes et CTCs. Le dispositif commercialisé **OncoQuick®** (Greiner Bio-One, Allemagne) combine la centrifugation par gradient de densité avec l'intégration d'une barrière poreuse retenant spécifiquement les CTCs à sa surface⁶⁷. L'avantage de cette méthode est qu'elle offre un isolement des CTCs simple et rapide. Cependant, la **contamination est importante** avec la présence de plaquettes et de certains globules blancs partageant des caractéristiques similaires aux CTCs. Cette technique est souvent utilisée en tant qu'étape de traitement du sang pré-capture. Cependant, comme évoqué précédemment, cette méthode **peut altérer les CTCs ainsi qu'en perdre certaines** qui migrent vers la couche de plasma, ou qui, sous forme d'agrégats, rejoignent la couche du bas de l'échantillon⁶⁸.

- Membranes de microfiltration

Etant donné que la majorité des CTCs rapportées présentent une taille supérieure aux cellules sanguines ainsi qu'une rigidité plus importante, des microfiltres ont été conçus pour séparer les CTCs à partir de sang complet. Le développement de ce type de dispositifs va de pair avec les avancées en microfabrication. Les microfiltres peuvent être fabriqués à partir de polycarbonate gravé par bombardement ionique à très haute énergie (*track-etching*) permettant d'obtenir des pores de taille contrôlée. Ce procédé de fabrication est peu coûteux et permet une production de masse. Cependant

les pores obtenus sont distribués de manière aléatoire, l'ouverture est faible et certains pores peuvent être fusionnés, ce qui réduit l'efficacité de capture ⁵⁹. Les technologies commercialisées **ISET**[®] (RareCells, France) et **ScreenCell**[®] (ScreenCell, France) emploient des microfiltres fabriqués selon ce procédé mais ne sont pas adaptées pour analyser des échantillons de sang complet. La pureté est un facteur de performance d'autant plus important dans le cas de la microfiltration afin d'éviter l'obstruction de la membrane filtrante. Cependant, il est difficile d'optimiser ce paramètre compte-tenu du chevauchement en taille des CTCs et globules blancs. Le dispositif **FAST** (Fluid-Assisted Separation Technology) comprenant une membrane filtrante avec des pores de 8 μm de diamètre, fabriquée à partir de polycarbonate selon la technique mentionnée ci-dessus, a récemment été développé et commercialisé (Clinomics, Corée du Sud). Une solution aqueuse maintenue au sein d'une chambre en aval de la membrane de microfiltration permet de diminuer son obstruction et la contamination à sa surface, atteignant ainsi de bons niveaux de pureté ⁶⁹. D'autres membranes de microfiltration sont fabriquées à partir de différents matériaux (polymères, silicium, métaux) en utilisant des techniques de photolithographie ⁷⁰. C'est le cas du dispositif non commercialisé **FMSA** (Flexible Micro Spring Array), un dispositif comprenant des microstructures flexibles sur un film de parylène présentant une importante ouverture. Ce dispositif permet d'atteindre des débits et volumes de sang analysés importants, 45 mL/h et 7,5 mL respectivement ⁴⁶. Le dispositif comporte un système de régulation de pression afin d'éviter de soumettre les cellules à de trop fortes contraintes mécaniques lors de la filtration. La récupération de cellules viables peut être effectuée par inversion du flux. Récemment, une nouvelle version du dispositif comportant plusieurs membranes filtrantes placées en tandem avec des tailles d'ouvertures décroissantes a été développée afin de séparer jusqu'à quatre sous populations de cellules en fonction de la lignée cellulaire, du cycle cellulaire ou de la viabilité cellulaire notamment ⁷¹. Cependant l'isolement des différents types de cellules cités précédemment n'a pas été effectué à partir de sang. Différents types de leucocytes, granulocytes et leucocytes mononucléaires, ont toutefois été isolés à partir de sang dilué.

- Méthodes de tri microfluidique

La microfiltration peut aussi être effectuée selon une configuration latérale au sein de puces microfluidiques microstructurées pour séparer les CTCs en fonction de leur taille. C'est le cas de la plateforme commercialisée **Parsortix**[™] (Angle, UK) présentant une structure à paliers afin de retenir des CTCs de taille supérieure ou égale à 10 μm de diamètre. Le dispositif est entièrement automatisé et a été développé afin de récupérer les CTCs hors de la puce suite au processus de capture ^{72,73}. Un autre dispositif non commercialisé, le **MCA** (Micro Cavity Array), présente différentes tailles de cavités variables circulaires ou rectangulaires. Il a été utilisé afin d'isoler des CTCs à partir de sang de patient de cancer du poumon à petites cellules de 12,5 μm de diamètre ⁷⁴. Ce dispositif a aussi été utilisé pour l'isolement de clusters de CTCs ⁷⁵. Ces plateformes présentent des débits plus élevés que les puces microfluidiques utilisées pour l'isolement de CTCs par immunoaffinité, avec des débits de 5 et 36 mL/h respectivement pour les deux dispositifs précédemment cités. Des puces microfluidiques ont aussi été conçues de façon à isoler spécifiquement des clusters de CTCs. C'est le cas d'un dispositif exploitant le principe de déplacement latéral déterministe (DLD) afin d'isoler des clusters de 2 à plus de 100 CTCs en exploitant les propriétés de taille et asymétrie à partir de sang complet ⁷⁶.

- Méthodes hydrodynamiques

Des canaux microfluidiques sont utilisés avec des géométries variées et des flux contrôlés pour créer des forces hydrodynamiques afin de séparer les CTCs en se basant sur des différences de taille et de densité. Le principe repose sur le profil de vitesse de l'écoulement développé entre les parois du micro-canal et les forces de portée et d'inertie auxquelles sont soumises les cellules qui dépendent de leur taille et densité. Les cellules et autres particules en suspension sont ainsi entraînées selon

différentes lignes de courant ⁷⁷. Le dispositif commercialisé **VTX-1 Liquid Biopsy System** (Vortex Biosciences) est un exemple de dispositif utilisant les forces d'inertie afin de positionner les CTCs le long d'un micro-canal et de les capturer au sein de vortex générés dans des zones où les dimensions du canal sont soudainement élargies.

Les avantages des techniques exploitant les propriétés physiques des CTCs reposent sur la séparation de **cellules non marquées** et l'isolement exhaustif des **différentes populations de CTCs** indépendamment du type de cancer. Ces méthodes requièrent en général des **temps d'analyse réduits** en comparaison des techniques basées sur l'immunoaffinité, et sont aussi moins coûteuses. Cependant **le facteur limitant est l'interférence des leucocytes** présentant des similitudes en terme de dimensions avec une partie de la population de CTCs. Un compromis doit être établi au niveau de la conception géométrique des dispositifs entre contamination de leucocytes et perte des populations de CTCs de petite taille.

1.5.3. Techniques mixtes

Un exemple de technique mixte est le dispositif non commercialisé **CTC-iChip** (The Center for Surgery, Innovation and Bioengineering, Etats-Unis) consistant en une puce dont le mode opératoire repose sur trois technologies différentes. Un premier compartiment présente un réseau de microstructures afin de séparer les cellules nucléées, CTCs et leucocytes, à l'aide des forces hydrodynamiques sur le principe du déplacement latéral déterministe. Les cellules sont ensuite triées au sein d'un micro canal en utilisant les forces d'inertie. Enfin l'isolement de CTCs, ou des leucocytes par isolement négatif, est effectué par immunomagnétisme ⁷⁸.

Un second exemple de dispositif est la **plateforme RIA (Reversible bead attachment for cell Isolation and Analysis)** non commercialisée combinant l'utilisation de méthodes d'immunoaffinité et de microfiltration. Une membrane de microfiltration comportant une densité importante de pores uniformes de 8 μm de diamètre est utilisée pour la capture de CTCs selon le critère de taille. Des microbilles fonctionnalisées se lient à la surface membranaire des CTCs ciblées par des anticorps spécifiques. La combinaison de ces méthodes permet d'augmenter l'efficacité de capture de 30% en augmentant artificiellement la taille de CTCs qui ont une taille comparable à celle des leucocytes et qui sont de dimension inférieure à celle des pores ⁷⁹. Les microbilles peuvent être détachées des cellules tumorales capturées par irradiation sans affecter leur viabilité. Les autres avantages de cette plateforme sont une bonne pureté et la possibilité de procéder à des analyses d'expression protéique *in situ*, c'est-à-dire directement sur les cellules capturées à la surface de la membrane filtrante.

De façon générale, la combinaison de différentes techniques au sein d'une plateforme d'isolement de CTCs **augmente l'efficacité de capture, l'hétérogénéité des cellules capturées ainsi que la pureté**. Mais cette option reste encore peu étudiée et référencée dans la littérature. Par ailleurs, la multiplication des technologies engendrant parfois l'utilisation de plusieurs puces interconnectées **augmente le temps du processus de capture et sa complexité**, ce qui peut être inadapté pour un usage en routine clinique.

Le champ des **techniques d'isolement de CTCs est vaste** et le développement de multiples dispositifs est référencé dans la littérature relative à ce domaine. Des techniques sont développées pour la capture *in vivo*, qui sont actuellement principalement basées sur des techniques d'immunoaffinité à notre connaissance. Un exemple est l'utilisation de nanoparticules magnétiques pour cibler des CTCs au sein de la circulation sanguine avec des ligands spécifiques. La détection est ensuite effectuée *in vivo* par concentration des cellules capturées *via* un aimant et imagerie photoacoustique ⁸⁰. Les techniques *in vivo* permettent d'atteindre des niveaux de sensibilité élevés et

d'analyser d'importants volumes sanguins, ce qui est prometteur pour l'application de diagnostic précoce. Cependant ces techniques sont très invasives. Afin de remédier au caractère invasif, un type de dispositif basé sur le principe de la circulation sanguine déportée a été développé. Le système connecte la circulation sanguine à un module effectuant la capture de CTCs basée sur une combinaison de microstructures et fonctionnalisation de surface avec des anticorps spécifiques au sein d'une puce fluïdique⁸¹. Bien qu'elles présentent l'avantage d'accéder à d'importants volumes sanguins, les méthodes *in vivo* ou à circulation déportée présentent des temps d'analyses relativement longs au regard de la volémie d'un humain avec par exemple environ 17 mL analysés en une heure pour le dispositif précédemment cité sur un modèle canin. Concernant les dispositifs *in vitro*, différentes pistes sont explorées pour améliorer les performances des technologies existantes comme par exemple l'utilisation de nanomatériaux pour augmenter l'efficacité de capture⁸², des fonctionnalisations de surface avec des matériaux actifs pour améliorer la récupération des CTCs capturées, tels que les polymères thermoréactifs⁸³, l'impression 3D pour la fabrication de dispositifs microfluidiques à surface active augmentée⁸⁴, la mise au point de surfaces empêchant l'adhésion de globules rouges pour améliorer l'efficacité de capture et la pureté dans le domaine de la microfiltration⁸⁵, etc. D'autres revues récentes comparent les techniques d'isolement de CTCs de façon plus générale^{19,28,52,86,87}.

1.5.4. Techniques de détection directe

Certains outils de détection de CTCs sont dits de **détection directe** telles que les techniques optiques par diffusion Raman exaltée en surface (*Surface-Enhanced Raman Scattering, SERS*) ou la microscopie confocale par exemple²⁸. Ces techniques ne permettent pas l'extraction et l'accès aux cellules pour des analyses moléculaires subséquentes mais présentent l'avantage d'être des techniques rapides avec une limite de détection basse pouvant atteindre la cellule par millilitre. Ces techniques nécessitent de marquer les cellules avec des marqueurs spécifiques, en fluorescence par exemple, pour pouvoir les détecter. D'autres dispositifs de détection directe sont basés sur des techniques d'impédancemétrie et exploitent les propriétés diélectriques particulières des CTCs (voir **Chapitre 2** de ce manuscrit).

1.6. Dispositif idéal pour l'isolement de CTCs dans le sang

A partir de l'état de l'art introduit dans cette section nous pouvons identifier les critères auxquels doit répondre un dispositif idéal pour l'isolement de CTCs dans le sang. Tel qu'évoqué précédemment, le type d'échantillon à privilégier pour l'isolement de CTCs est du **sang complet**, de préférence fraîchement prélevé au patient. Toute étape de prétraitement du sang est à éviter afin d'éviter d'endommager les cellules d'intérêt et d'allonger le processus global d'isolement et d'identification.

Un dispositif idéal permet une capture **sans dénaturer les cellules**, à ce titre une capture sur la **base de critères physiques des CTCs** est préférable. De plus les méthodes basées sur les critères physiques s'affranchissent du biais de marqueurs spécifiques qui ne ciblent pas la totalité des CTCs dont l'expression dans antigènes membranaires est très variable. Si le critère physique choisi est la taille, le dispositif doit permettre **d'isoler une gamme de taille étendue de façon à tenir compte de l'hétérogénéité des CTCs**. Différents dispositifs peuvent éventuellement être développés pour différents types de cellules tumorales.

La contamination de capture par les autres cellules sanguines doit être réduite afin de ne pas interférer avec les étapes d'identification de CTCs ou les analyses biologiques subséquentes et éviter d'avoir recours à des étapes de traitement post capture.

Le système doit permettre l'analyse **d'important volumes sanguins** afin de maximiser le nombre de CTCs capturées et avoir ainsi suffisamment de matériel pour effectuer les analyses subséquentes. Un nombre maximal de CTCs capturées est aussi important afin d'obtenir un poids statistique assurant une analyse représentative.

Le temps de traitement de l'échantillon sanguin doit être limité afin d'éviter des effets de coagulation ou de sédimentation des éléments figurés du sang et permettre la capture dans les meilleures conditions.

Le dispositif doit pouvoir permettre de **recupérer facilement les cellules isolées** ou proposer une méthode d'identification ou d'analyse des CTCs *in situ*.

Afin de faciliter son utilisation dans le milieu hospitalier notamment, le dispositif doit proposer **un processus automatisé pour la capture**. Ce point, peu adressé par les technologies actuelles, est critique dans le développement de dispositifs pour l'isolation de CTCs comme outils généralisés de biopsie liquide.

Dans la perspective d'une utilisation clinique et plus particulièrement pour l'application de suivi de traitement notamment, un **dispositif portable** pouvant effectuer l'analyse au chevet du patient est à privilégier. Une **communication immédiate de données à l'utilisateur telles que l'énumération en temps réel de CTCs capturées** serait très avantageuse pour inscrire le dispositif dans une logique de routine clinique.

2. Conception des micro-dispositifs de capture « S-MDCs »

L'isolement des CTCs *via* les S-MDCs est basée sur une approche par microfiltration. Le principe de fonctionnement de ces micro-dispositifs et les détails géométriques de leur conception sont décrits dans cette section. Les travaux de recherche et développement menés dans le cadre de cette thèse reposent en premier lieu sur l'utilisation des S-MDCs au sein de la plateforme *in vitro*, le produit S-Station de SmartCatch. Pour une utilisation des S-MDCs au sein de cette plateforme, ils sont accueillis au sein d'une pièce adaptée permettant de les maintenir sous flux, cette pièce peut être appelée *réceptacle* mais nous privilégierons le terme anglais « *holder* » tout au long de ce manuscrit.

2.1. Principe de fonctionnement

2.1.1. L'approche de la microfiltration

Tel qu'évoqué lors de la section précédente, la microfiltration est l'une des techniques employées afin d'isoler les CTCs en exploitant leur taille et rigidité. Ainsi de nombreux dispositifs emploient des membranes filtrantes 2D comportant des pores micrométriques disposés aléatoirement fabriquées par bombardement ionique ou *via* des techniques impliquant une étape de lithographie, cette dernière permettant de contrôler, la forme, la dimension et la disposition des pores. La diversité des matériaux et des formes de pores est grande. Parmi les matériaux utilisés, nous pouvons citer des métaux, polymères ou silicium, et les formes de pores principales référencées sont circulaires ou allongées sous forme de fentes⁷⁰. Ces micro-filtres sont positionnés de façon perpendiculaire au flux et obstruent le lumen du canal fluïdique, de façon à ce que la totalité du volume transite à travers la membrane filtrante. Les membranes filtrantes sont souvent insérées au sein de réceptacles adaptés et l'échantillon est mis en circulation en utilisant la gravité, des seringues, des pompes ou des systèmes de vide.

La différence de pression en amont et aval de la membrane filtrante est appelée pression transmembranaire ΔP . Un des inconvénients de cette technique est **l'exposition des CTCs capturées à de fortes contraintes mécaniques** lorsque cette pression transmembranaire est trop importante. Dans la littérature, les pressions transmembranaires rapportées pour l'isolement de CTCs à partir de sang complet ou ayant subi un traitement préliminaire, est comprise entre 0,7 et 100 kPa. Ces valeurs relativement élevées sont dues à la présence de la membrane filtrante avec des taux d'ouverture relativement limités rapportés entre 2 et 36% qui augmentent la résistance hydraulique du système⁸⁸. Ces valeurs de pressions sont à mettre en regard des valeurs physiologiques rapportées au sein du système vasculaire, qui présentent un maximum de pression d'environ 16 kPa systolique pour le réseau artériel⁸⁹ et une pression maximale d'environ 1,3 kPa au sein du système veineux⁹⁰. Des valeurs de pressions ΔP trop élevées peuvent aussi avoir pour effet de déformer les CTCs et donc d'en perdre certaines qui finiraient par passer au travers des pores au bout d'un certain temps. En pratique, le débit doit être limité afin de réduire cette pression transmembranaire, ce qui résulte en des temps d'analyse plus longs et des volumes sanguins analysés réduits. Les débits rapportés dans la littérature pour des systèmes de microfiltration se situent entre 10 et 2000 $\mu\text{L}/\text{min}$ ⁷⁰. Si certains dispositifs emploient des pressions relativement peu élevées afin de préserver les CTCs, l'échantillon sanguin subit généralement une étape de traitement préalablement au processus de filtration afin d'éviter une obstruction de la membrane filtrante par un nombre trop élevé de cellules sanguines.

Afin d'apporter une solution technologique répondant aux défis précédemment évoqué de filtration de CTCs, SmartCatch a développé sa propre technologie pour l'isolement de CTCs *via* des micro-dispositifs de capture innovants appelés S-MDCs tout au long de ce manuscrit. Les S-MDCs comportent une membrane mince planaire dotée de pores de filtration de forme et de diamètre contrôlés par microfabrication et d'un élément de maintien d'épaisseur plus importante. L'ensemble de ces deux parties constitue ce que nous appelons un **micro-filtre 2,5D**. Ils ont été conçus pour permettre la filtration de **sang complet**, limitant ainsi les étapes pré-analytiques pour l'utilisateur et permettant de préserver les CTCs au sein d'un environnement proche des conditions physiologiques de flux sanguin.

Les S-MDCs ont été développés pour l'isolement de CTCs avec une pression transmembranaire et une vitesse d'écoulement réduites au voisinage de la membrane filtrante. Ainsi, les S-MDCs permettent la capture d'une **population hétérogène de CTCs**, en termes de phénotypes et tailles supérieures à une taille seuil de CTCs capturées, dans des **conditions dites douces**, ce qui permet de **conserver leur viabilité** pour des analyses biologiques subséquentes au processus de capture.

2.1.2. Utilisation des S-MDCs

Les S-MDCs peuvent être embarqués sur deux types de plateformes fluidiques. Une première configuration est une **plateforme *in vitro*** qui permet l'analyse de prélèvements de sang complet. Il s'agit du produit S-Station de SmartCatch. Afin de **maximiser le volume analysé**, le sang circule en boucle fermée pour une durée définie. La plateforme comprend une pompe permettant d'établir précisément un débit consigne au sein du montage fluidique. La seconde plateforme est le produit S-Pheresis. Ce dispositif est destiné à être utilisé *ex vivo*, à partir d'une dérivation extracorporelle de la circulation sanguine du patient, sur le principe de **l'aphérèse**. Cette configuration, plus invasive qu'un prélèvement sanguin, présente toutefois l'avantage d'accéder à de plus importants volumes sanguins et ainsi de maximiser la capture de CTCs. Le dispositif est ainsi utilisé au chevet du patient, permettant de **répéter régulièrement l'acte de biopsie liquide** pour un suivi rapproché de l'évolution de la pathologie cancéreuse.

Les S-MDCs sont conçus de façon à être **robustes** afin de supporter la pression de l'écoulement sanguin lors du processus de capture. Ils doivent aussi supporter la manipulation pour leur insertion au sein des différentes plateformes auxquelles ils peuvent être intégrés ainsi que celle requise pour l'analyse subséquente des cellules capturées et leur récupération éventuelle. Les matériaux choisis pour la fabrication présentent une cytotoxicité réduite afin de préserver la viabilité cellulaire. Enfin le procédé de fabrication est relativement faible coût et permet une fabrication parallélisée afin d'envisager l'utilisation des S-MDCs comme consommables pour les systèmes décrits précédemment. Le choix technologique a été porté sur un procédé basé sur l'électrochimie pour la fabrication de micro-dispositifs métalliques. Il serait judicieux d'envisager une récupération et/ou recyclage des dispositifs et réceptacles usagés afin d'inscrire leur utilisation dans une logique de système de production circulaire.

2.2. Géométrie et dimensions du S-MDC

Le micro-filtre est composé d'une **partie supportrice** ainsi que d'une **membrane filtrante solide** et positionnée en aval de la partie supportrice. La membrane filtrante est constituée de **pores circulaires uniformément répartis** afin de retenir les cellules de dimensions plus importantes que le diamètre des pores. De larges ouvertures, que nous qualifions d'**ouvertures latérales** dans la suite du manuscrit, sont présentes sur les côtés de la membrane filtrante afin de laisser circuler une partie du sang, diminuant ainsi la résistance hydraulique du système et donc sa pression transmembranaire ΔP . Les S-MDCs sont disposés perpendiculairement au flux au moyen d'un réceptacle adapté. Le positionnement du S-MDC vis-à-vis du flux est présenté **Figure 6**. Des analyses par simulation fluide ainsi que des données expérimentales ont validé la configuration 2,5D pour une réduction de la vitesse du flux à l'approche de la membrane filtrante.

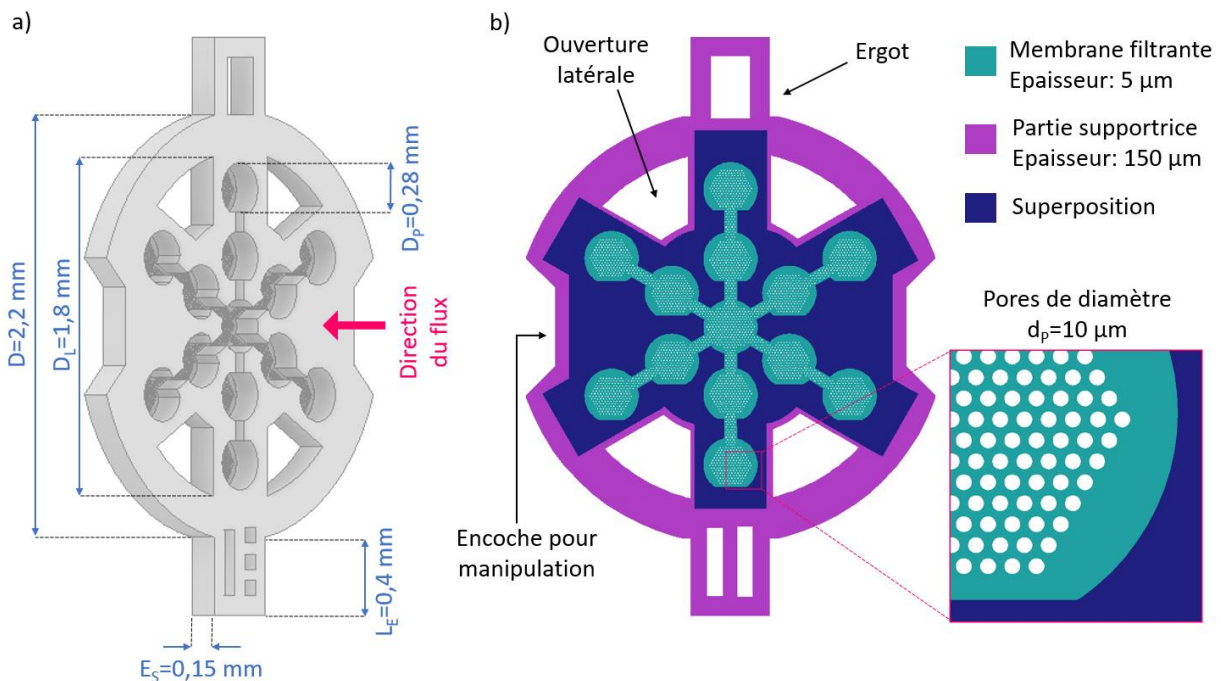


Figure 6 Représentations schématiques du S-MDC. a) Représentation 3D et dimensions typiques du S-MDC. b) Représentation 2D avec mise en évidence des deux parties formant le micro-dispositif, la partie supportrice et la membrane filtrante ainsi que la zone de superposition des deux couches.

Les détails géométriques du design du S-MDC décrits en suivant sont représentés en **Figure 6**. Le S-MDC présente un diamètre $D=2,2$ mm. Des ergots latéraux de longueur $L_E=400 \mu\text{m}$ sont ajoutés

afin de permettre un placement verrouillé des dispositifs au sein des réceptacles comportant des empreintes complémentaires. La géométrie du pourtour du S-MDC présente des encoches latérales afin de permettre une manipulation facilitée à l'aide d'une pince.

Le diamètre du lumen au sein duquel le fluide circule est $D_L=1,8$ mm. Des ouvertures latérales permettent de maintenir une pression transmembranaire peu élevée tout en évitant l'obstruction de la membrane filtrante par les cellules sanguines. Ces **ouvertures latérales représentent environ 17% de la surface du lumen**. Ainsi, une partie du sang circule au travers de ces ouvertures latérales tandis que la partie restante est filtrée au travers de la membrane filtrante. La membrane filtrante est répartie selon 13 puits cylindriques de diamètre $D_P=280$ μm . Ces puits sont formés par la couche supportrice d'épaisseur $E_S=150$ μm constituant le S-MDC. Les puits confèrent une topographie 2,5D à la membrane filtrante, ayant pour effet de limiter la vitesse de l'écoulement à l'approche de la membrane filtrante et d'éviter ainsi de soumettre les cellules à des contraintes mécaniques trop élevées. L'épaisseur de la membrane est $E_M=5$ μm . Les épaisseurs E_S et E_M choisies représentent un compromis entre tenue mécanique suffisante du dispositif pour sa manipulation et résistance hydraulique limitée.

Chaque puits contient en moyenne 169 pores, les 12 artères de connexion entre les puits en contiennent chacune 45. La membrane filtrante comporte ainsi un **total de 2717 pores**, correspondant à environ **8% de la surface du lumen**. La configuration choisie permet de faciliter la caractérisation post capture par microscopie à fluorescence, un puits pouvant être imagé en totalité via un objectif x10. Le diamètre des pores est $d_P=10$ μm et ils sont disposés en nid d'abeille avec un espacement de 5 μm entre eux bord à bord. **L'ouverture totale du S-MDC est d'environ 25%**.

2.3. Conception et fabrication du réceptacle ou « holder »

Un holder sert à positionner le S-MDC de façon perpendiculaire au flux de façon stabilisée. La version la plus simple permettant de contenir un S-MDC est composée de deux pièces qui maintiennent le S-MDC de façon hermétique. Le holder peut être adapté afin d'accueillir plusieurs S-MDCs positionnés en série, permettant ainsi d'**augmenter la probabilité de capture de CTCs**. La **Figure 7a** présente un exemple de holder à trois pièces permettant d'accueillir deux S-MDCs positionnés en série. Des holders pouvant contenir jusqu'à dix S-MDCs en série ont ainsi été fabriqués. Une distance de 10 mm est prévue entre chaque S-MDC afin que le flux se restabilise en aval de chaque membrane filtrante (voir **Figure 7b**).

Le holder présente un canal de diamètre égal à celui du lumen du S-MDC afin de réduire les zones de perturbation du flux en aval et en amont de la zone de microfiltration. La dimension du canal est maintenue constante sur l'ensemble des pièces du réceptacle (voir **Figure 7b**). Ainsi le holder est conçu de façon à obtenir un **flux stabilisé à son entrée et entre les dispositifs** positionnés en série. Des embouts adaptés sont prévus sur les deux pièces du réceptacle pour permettre une connexion standardisée de type Luer lock avec les tubes fluidiques compatibles (voir **Figure 7a** et **7b**).

La pièce sur laquelle est positionné le dispositif face arrière présente une empreinte adaptée pour accueillir le S-MDC et verrouiller sa position en le déplaçant légèrement selon un mouvement de rotation, selon le principe « twist lock » (voir **Figure 7c**). Les différentes pièces comportant les S-MDCs présentent des filetages et taraudages adaptés afin de les verrouiller en les vissant entre elles. Un joint torique (4 et 6 mm de diamètres intérieur et extérieur) placé au niveau de chaque pièce accueillant un S-MDC assure l'étanchéité du système.

Le design du réceptacle est créé avec un logiciel CAO (Conception Assistée par ordinateur) (CATIA V5). La fabrication est ensuite effectuée par impression 3D avec l'imprimante DWS J29+. Cet équipement permet de fabriquer les pièces avec la résolution requise, critique au niveau de l'empreinte accueillant le S-MDC qui présente une profondeur de 150 μm compatible avec l'épaisseur du dispositif. Le matériau choisi est une résine photosensible (DIGITALWAX® DL 260) présentant des propriétés mécaniques permettant une manipulation du réceptacle et une tenue mécanique permettant une bonne étanchéité lorsque les deux pièces sont correctement verrouillées. Les détails des dimensions du réceptacle ainsi que le positionnement du S-MDC sont présentés en **Figure 7**.

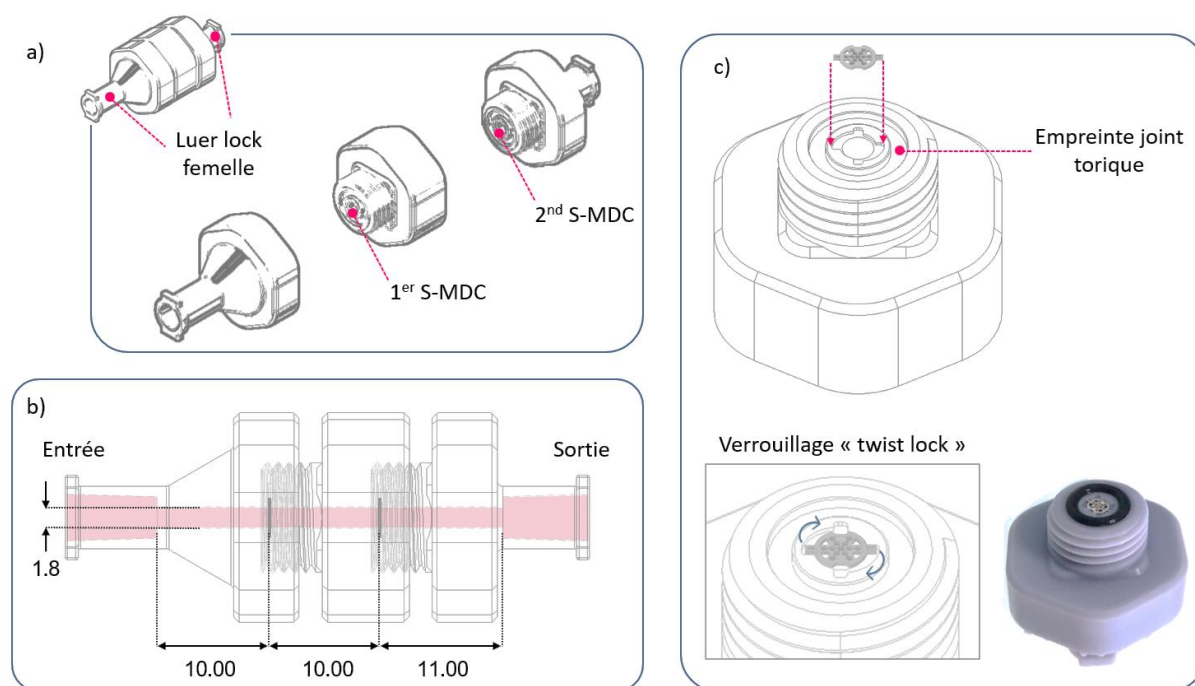


Figure 7 Principe et dimensions du holder. a) Exemple de holder accueillant deux S-MDCs positionnés en série. b) Vue de coupe d'un holder accueillant deux S-MDCs positionnés en série et dimensions typiques du canal. Les dimensions sont exprimées en mm. c) Empreinte permettant de positionner le S-MDC et de le verrouiller selon le principe « twist lock ».

3. Procédé de fabrication

Les S-MDCs sont fabriqués par le biais de techniques de micro-fabrication conventionnelles utilisées dans le domaine de la microélectronique. Un **procédé de fabrication planaire en deux étapes d'électrochimie**, ou **dépôt par croissance électrolytique**, ou encore **électroformage** lorsqu'il s'agit de mise en forme 2,5D ou 3D, a été mis au point. Ce procédé a été développé au sein de la plateforme de micro et nanotechnologies du LAAS-CNRS, en collaboration avec David Bourrier, ingénieur d'étude du service TEAM du LAAS-CNRS, et spécialiste en électrochimie. Parmi les différents matériaux disponibles pour le dépôt électrolytique, nous avons choisi le **nickel**. Ce matériau est largement utilisé en électrochimie et a déjà été rapporté pour des utilisations biomédicales^{91,92}, cependant lorsqu'utilisé *in vivo*, son temps d'exposition doit être limité afin que la quantité d'ions relargués ne soit pas toxique^{93,94}. Les dépôts électrolytiques sont effectués avec l'équipement RENA et le bain électrolytique NB SEMIPLATE NI 100 (MicroChemicals GmbH) avec une densité de courant de 5 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour la couche de 5 μm formant la membrane filtrante et 20 $\text{mA}\cdot\text{cm}^{-2}$ pour la couche de 150 μm formant la partie supportrice. En pratique, les dispositifs sont fabriqués en 4 étapes principales qui comprennent 2

étapes de photolithographie accompagnées de dépôt électrolytique dans les moules de résine photosensible. Ainsi deux niveaux de masques ont été réalisés pour la conception des S-MDCs. Le premier niveau (N1) définit la géométrie de la membrane filtrante et le niveau (N2) correspond à la partie supportrice des S-MDCs. Le procédé complet a été réalisé en environnement salle blanche et est résumé comme suit :

1. **Préparation du substrat.** Un wafer de silicium 4 pouces est nettoyé en utilisant un plasma O₂ (800 W, 5 min). Un dépôt de couche conductrice comprenant 50 nm de titane comme couche d'accroche et 200 nm de cuivre est déposé par évaporation. Le premier niveau (N1) définit la partie supportrice des dispositifs.
2. **Dépôt de la membrane filtrante (N1).** Une résine photosensible positive, AZ4562 (MicroChemicals GmbH), est déposée à la tournette pour obtenir une couche de 10 µm, un recuit est ensuite effectué pendant 2 min à 105°C. La résine est exposée aux UV large bande avec une dose de 230 mJ/cm² en utilisant un aligneur de masque (MA150 Mask Aligner, Karl Suss) et développée dans un bain de MFCD26 (MicroChem Corp). Une étape de nettoyage au plasma est effectuée afin de retirer d'éventuels résidus de résine polymérisée et de solvants. Un dépôt électrolytique de 5 µm de nickel est réalisé. La résine est retirée à l'acétone. Le diamètre moyen des pores est mesuré à $d_p=10,0\pm 0,5$ µm.
3. **Dépôt de la partie supportrice (N2).** Une étape de nettoyage au plasma (CF₄ + O₂, 200 W, 2 min) est réalisée en premier lieu afin de retirer d'éventuels résidus de résine et de solvants, et d'assurer une bonne adhésion de la couche de résine suivante. Une solution de 1% H₂O₂ + 1% H₂SO₄ + 98 % H₂O est utilisée afin de graver l'oxyde formé à la surface de la couche de Nickel précédemment déposée. Deux couches de résine négative sous forme de films secs, WBR-2100 (DuPont), sont laminées sur le substrat afin d'obtenir une couche de 200 µm d'épaisseur. La résine est exposée aux UV à 365 nm avec une dose de 1100 mJ/cm². La résine est développée avec une solution de Na₂CO₃ chauffée à 28°C dans un bain à ultrasons (35 kHz sweep mode) pendant 15 min. Un autre plasma (CF₄ + O₂) est effectué pour s'assurer du retrait de résidus de résine qui empêcheraient l'adhésion entre les deux couches de nickel définies par les niveaux N1 et N2. Ensuite, un dépôt électrolytique de 150 µm de nickel est réalisé. La résine est retirée en utilisant une solution de NF52 (ref) chauffée à 90°C pendant environ 40 min. L'inhomogénéité du dépôt est de 7%, résultant en des épaisseurs comprises entre 144,7 et 155,2 µm en fonction du positionnement sur le wafer.
4. **Libération des micro-dispositifs.** Le wafer en silicium est gravé chimiquement en utilisant une solution de KOH et les micro-dispositifs sont libérés. La couche d'amorce (*seed layer*) est gravée sur les dispositifs en suspension par gravure humide. Une solution HF à 5% et ensuite une solution de 1% H₂O₂ + 1% H₂SO₄ + 98 % H₂O pour graver le titane puis le cuivre sont utilisées respectivement.

Une image typique de microscopie électronique à balayage (MEB) du S-MDC après fabrication est présentée **Figure 8d**. La mise au point du procédé a nécessité des études spécifiques au niveau des couches d'amorce conductrices requises pour effectuer les dépôts électrolytiques. Parmi les métaux disponibles, nous avons préférentiellement utilisé le cuivre qui s'est révélé être celui qui permettait d'obtenir une meilleure adhésion de la résine photosensible. Nous avons aussi optimisé la dose d'insolation de la résine photosensible afin d'obtenir des structures conformes au design pour la formation de la membrane filtrante (voir **Figures 8a** et **8b**). Une étape critique du procédé repose sur l'adhésion entre les deux couches de nickel afin d'obtenir la résistance mécanique nécessaire pour l'utilisation du S-MDC. Il est nécessaire pour cela d'effectuer le plasma de nettoyage tel que mentionné dans la description du procédé ci-dessus ainsi que l'attaque de l'oxyde de la première couche de nickel. Sans cela les deux couches de nickel ne sont pas solidaires (voir **Figure 8c**). La rugosité Ra (moyenne

arithmétique) de surface obtenue pour le dépôt électrolytique de nickel a été mesurée entre 20 et 60 nm. Cette rugosité peut éventuellement jouer en faveur du processus de capture de CTCs, compte tenu des études menées sur l'adhérence préférentielle de CTCs sur des surfaces présentant une rugosité à l'échelle nanométrique de l'ordre de 150 nm⁹⁵.

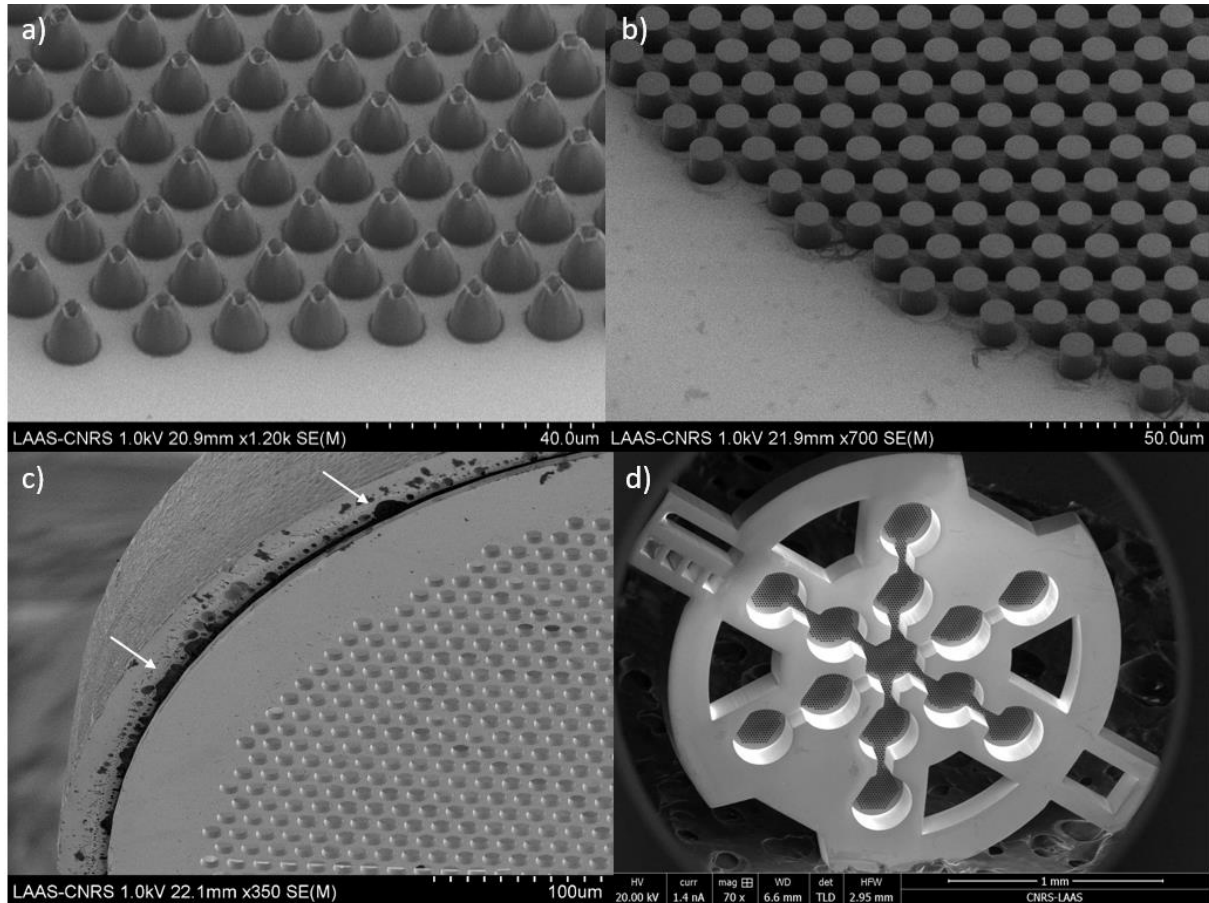


Figure 8 Caractérisation du procédé de microfabrication. a) Résine AZ4562 exposée à une dose de 270 mJ/cm² sans détourage. b) Résine AZ4562 exposée à une dose de 230 mJ/cm² avec détourage. c) Image des deux couches de nickel (membrane filtrante et partie supportrice) non solidaires. Les flèches pointent des résidus de résines responsables de la mauvaise adhésion entre les deux couches. d) Image du S-MDC face avant à la fin du procédé de microfabrication.

4. Protocole expérimental de capture

Les travaux de R&D au sein de SmartCatch sont réalisés en utilisant des **cellules issues de lignées tumorales mises en suspension dans du sang complet** de donneur sain afin d'évaluer et d'optimiser les performances de capture des S-MDC. Cette section présente le protocole expérimental en termes de préparation du système fluide, du matériel biologique, du processus de capture de CTCs ainsi que de la caractérisation des cellules capturées.

4.1. Le système fluide

Le système fluide utilisé pour la capture est constitué d'une pompe permettant de régler le débit pour les différents fluides utilisés lors du processus de capture. La pompe est reliée au tube de sang ou autre solution et au réceptacle des dispositifs *via* des tubulures appropriées (Masterflex L/S C-Flex Tubing 50 A, L/S 14, 25 ft, Cole Parmer). Le **banc fluide est versatile**, permettant la mise en

circulation des fluides nécessaires au processus de capture en boucle fermée ou ouverte et d'alterner le sens de circulation. Les S-MDCs sont déposés à l'intérieur du réceptacle dont les deux parties sont vissées afin de verrouiller le système de façon hermétique. L'entrée et la sortie du réceptacle sont connectées aux tubulures du système fluide (voir **Figure 9a**).

Avant chaque capture, le système est rincé avec 15 mL d'éthanol (éthanol absolu $\geq 99.8\%$, AnalaR NORMAPUR® ACS) pour une pré-humidification du canal. Une solution de 15 mL de tampon phosphate salin (phosphate buffered saline, PBS) permet ensuite de diluer l'éthanol et préparer le canal avec un tampon adapté aux cellules biologiques. Ces deux solutions circulent en boucle ouverte à un débit de 2 mL/min dans le sens inverse à celui établi pour la circulation du sang à analyser (voir **Figure 9b**), afin de ne pas contaminer la membrane filtrante sur sa face avant si d'éventuels résidus se trouvent en solution. L'échantillon de sang à analyser (5 mL) est ensuite mis en circulation au sein du montage fluide en boucle fermée à un débit de 4 mL/min pour une durée déterminée. Lorsque le temps de capture est écoulé, une solution de 15 mL PBS circule en boucle ouverte afin de rincer le dispositif dans le sens de circulation de capture. Les cellules capturées sont ensuite fixées avec 2 mL de paraformaldehyde (PFA) 4% (Formalin Solution 10% Neutral Buffered, Sigma-Aldrich). Une solution de PBS (2 X 15 mL) est enfin utilisée pour le rinçage du système avant caractérisation des cellules capturées. La circulation de ces solutions de rinçage s'effectue à un débit de 2 mL/min. Ces différentes étapes sont présentées en **Figure 9b**. Il est nécessaire de veiller à ce qu'aucune bulle d'air ne s'infilte au sein du montage fluide lors du passage des différentes solutions, afin de ne pas compromettre la capture. L'ensemble du matériel consommable (tubes, tubulures...) est renouvelé pour chaque capture. Les réceptacles peuvent être, si besoin, nettoyés pour une réutilisation ultérieure. Le système complet est en cours de développement afin de permettre l'automatisation des cycles de préparation, de capture et de rinçage décrits précédemment.

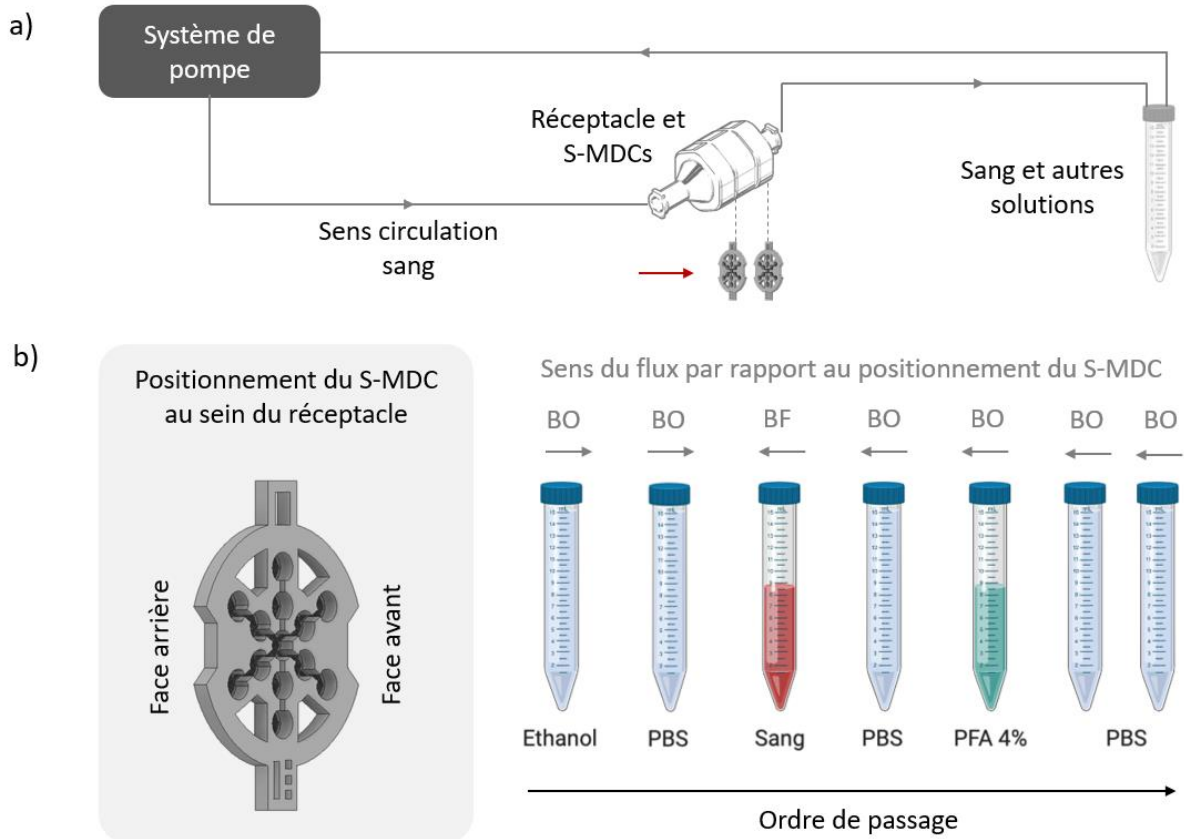


Figure 9 Représentation schématique du système fluïdique et des différentes étapes du processus de capture. a) Schématisation du montage fluïdique, dans le cas d’une expérience de capture incluant deux S-MDCs en série. b) Représentation des différentes solutions utilisées lors du processus de capture. Les acronymes « BO » et « BF » signifient boucle ouverte et boucle fermée respectivement.

4.2. Le matériel de biologie

4.2.1. Lignées cellulaires et culture

La lignée cellulaire PC-9, provenant de l’équipe du Pr. Gilles Favre du Centre de Recherche en Cancérologie de Toulouse (CRCT), est utilisée pour l’étude de performance de capture du système. Ces cellules sont une lignée de cellules du cancer du poumon humain et leur taille moyenne est de 16,0 μm de diamètre. Les cellules sont maintenues dans du milieu de culture RPMI (RPMI 1640, GIBCO), 10% SVF (Sérum de Veau Fœtal), à l’incubateur à 37°C, 5% CO₂ en atmosphère humide. Le renouvellement des cellules est réalisé tous les mois ou après 20 passages.

4.2.2. Prélèvements biologiques

Les tubes de sang (tubes BD Vacutainer®) de donneur sain sont obtenus auprès de l’Établissement Français du Sang (EFS, agrément n°73187). Ils sont maintenus sous agitation à température ambiante, et manipulés dans les 4 heures. Les parois de ces tubes sont recouvertes d’EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) agissant comme anticoagulant.

4.2.3. Marquages des cellules

Les **marquages immunofluorescents** emploient des **anticorps ciblant des protéines spécifiques** (ou des marqueurs nucléiques ou cytoplasmiques) conjugués à des molécules

fluorescentes pouvant être visualisées par microscopie à fluorescence en utilisant un filtre d'excitation/émission adapté. Par un signal de fluorescence, ils permettent ainsi de révéler certaines caractéristiques spécifiques des cellules biologiques en fonction de la protéine membranaire ciblée, ou de visualiser simplement le noyau ou le cytoplasme des cellules afin d'observer des différences de tailles par exemple. Afin de pouvoir les identifier, les cellules PC-9 sont ainsi colorées au Cell Tracker™ DeepRed (Invitrogen™) à 5µM, 30 minutes à 37°C, et Hoechst (Hoechst 33342, Trihydrochloride, Trihydrate, 100 mg, Invitrogen™) à 5µg/mL, 10 minutes à température ambiante. **Le cytoplasme et le noyau des cellules sont marqués** avec le Cell Tracker™ et le Hoechst respectivement. Un nombre contrôlé de PC-9 colorées est ensuite isolé grâce à l'utilisation d'un cytomètre en flux (BD FACSMelody™ Cell Sorter, BD Biosciences), et ajouté à 5mL de sang de donneur sain. Cet échantillon contenant une concentration définie de cellules PC-9 marquées est alors soumis au protocole de capture au sein du montage fluïdique décrit précédemment. La **Figure 10** présente un plan d'expérience typique, avec un circuit fluïdique comportant trois S-MDCs montés en série au sein d'un réceptacle adapté.

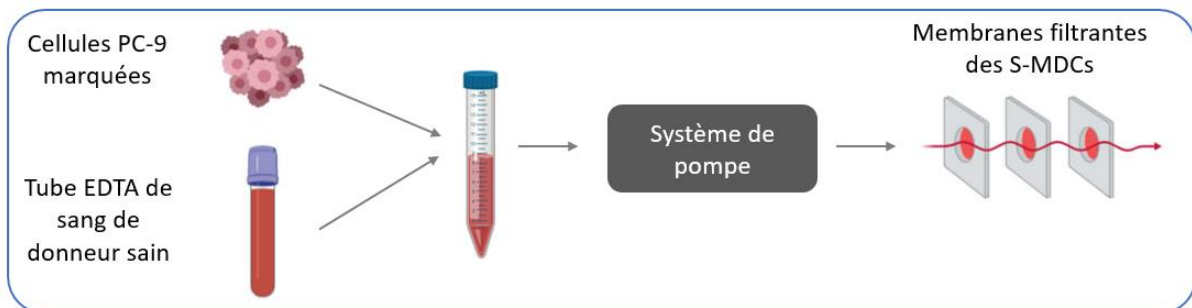


Figure 10 Schéma représentatif du protocole expérimental avec un exemple d'expérience de capture de PC-9 mises en suspension dans du sang de donneur sain avec trois S-MDCs en série.

Après chaque expérience de capture, les dispositifs sont montés entre lame et lamelle, dans une goutte de milieu de montage avec marqueur nucléique. Il sera ainsi possible de visualiser **l'ensemble des cellules capturées** à la surface de la membrane filtrante, c'est-à-dire **les cellules PC-9 ainsi que la contamination correspondant à la présence de PBMCs** (cellules mononuclées du sang périphérique). Une image entière de la surface de capture est obtenue au microscope digital à épifluorescence Nikon 90i Eclipse avec objectif 4X. L'objectif 20X permet d'imager chaque puits de la membrane filtrante afin de compter précisément les cellules. La superposition des images est réalisée à *via* le logiciel ImageJ, ainsi que le comptage du nombre de PC-9 capturées.

5. Exemple de résultat d'expérience de capture

Les expériences de capture avec les S-MDCs sont effectuées au sein de SmartCatch. Les éléments présentés dans cette section ont pour objet d'illustrer des exemples de résultat de capture obtenus *via* les S-MDCs et de mettre en perspective les paramètres influant ces résultats. Le protocole de capture est à ce jour en cours d'optimisation par l'équipe de recherche de SmartCatch.

5.1. Capture de cellules PC-9 dans du sang de donneur sain

L'utilisation du filtre DAPI permet l'identification de toutes les cellules nucléées (PBMC et PC-9). Ces cellules apparaîtront en bleu dans les images suivantes. L'utilisation du filtre TexasRed permet

d'apprécier le nombre de PC-9 colorées capturées. Ces cellules apparaîtront en rouge dans les images suivantes.

La **Figure 11** montre une image représentative d'une expérience de capture menée avec des systèmes comprenant 3 S-MDCs en série pour un volume de 6 mL de sang à une concentration cellulaire de 1000 PC-9 colorées/mL, circulant à un débit de 4 mL/min pendant 20 minutes. Les expériences sont menées en triplicat.

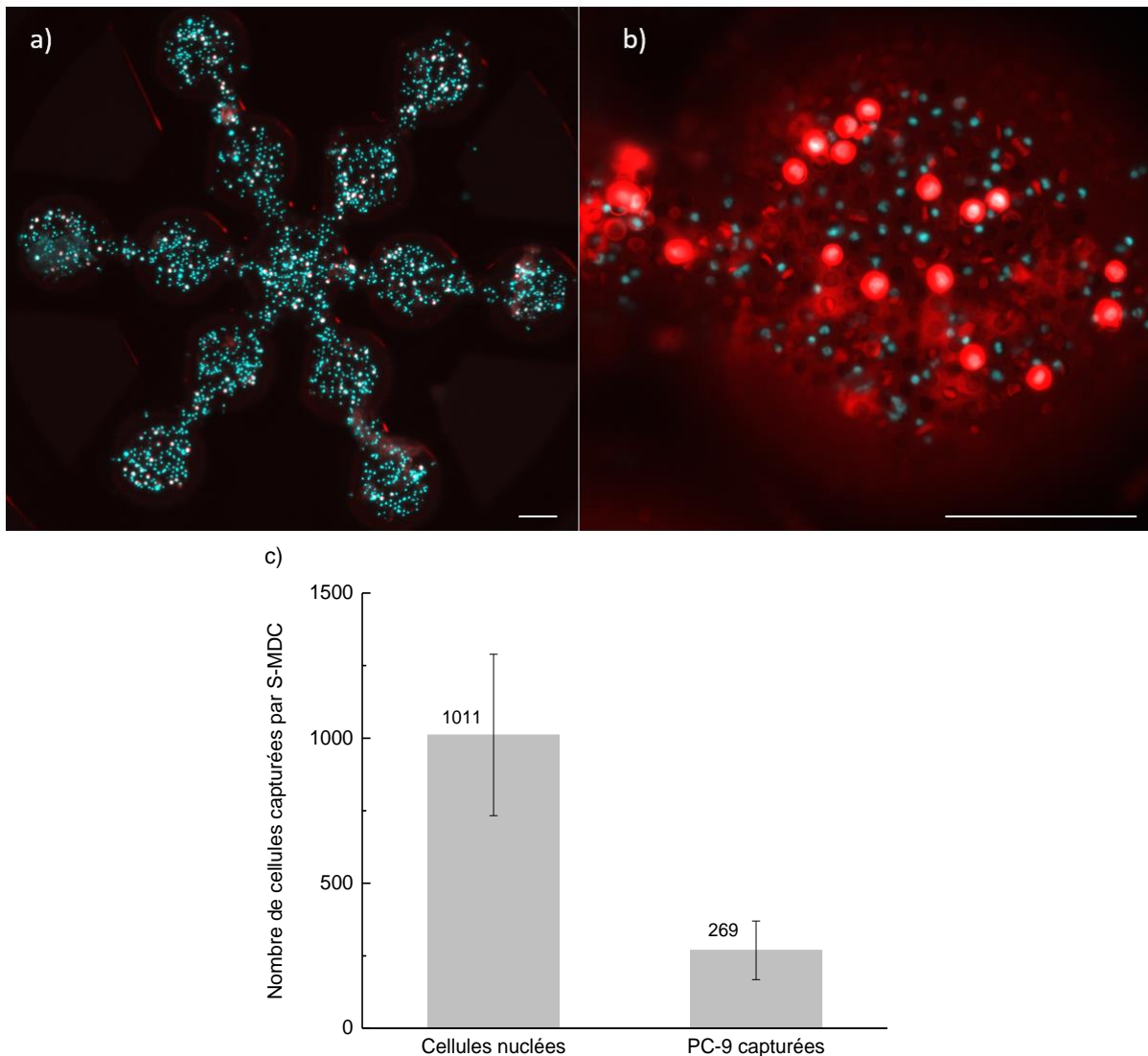


Figure 11 Etude de la capture de cellules PC-9 en milieu sanguin à une concentration de 1000 cellules PC-9/mL. a) Exemple d'image représentative de capture pour un S-MDCs du système de capture au grossissement 4X au microscope à épifluorescence. Les noyaux de toutes les cellules apparaissent en bleu. La barre d'échelle correspond à 100 μ m. b) Exemple d'image représentative de capture pour un S-MDCs du système de capture au grossissement 20X au microscope à épifluorescence. A plus fort grandissement le cytoplasme des cellules tumorales PC-9 est visible en rouge. La barre d'échelle correspond à 100 μ m. c) Histogramme représentant le nombre moyen de cellules nucléées et de PC-9 colorées capturées par dispositif. Les barres d'erreurs représentent l'écart-type de 3 expériences indépendantes.

Nous pouvons observer la présence de cellules PC-9 ainsi que la présence de PBMCs à la surface de la membrane filtrante du S-MDC. Dans cette expérience, le nombre moyen de cellules PC-9

capturées par S-MDC est de 269 ± 101 ($n=9$) et le nombre de cellules nucléées, incluant la capture de PC-9 et PBMCs est de 1011 ± 278 ($n=9$). A partir de ces résultats, une efficacité de capture et une sélectivité peuvent être calculées selon la formule énoncée dans la section 1.4 en considérant que la totalité du volume sanguin a été filtré pendant le temps de capture. Nous obtenons ainsi une efficacité de capture moyenne par S-MDC de $4,4 \pm 1,6\%$ ($n=9$) et une sélectivité de $36,2 \pm 32,1\%$ ($n=9$).

5.2. Perspectives d'optimisation du processus de capture

Les résultats présentés précédemment ont été obtenus avec une première version du montage fluïdique et sont des exemples ayant pour objet d'illustrer la capture de cellules tumorales effectuée avec les S-MDCs. Ces résultats de capture vont évoluer avec une optimisation du montage fluïdique ainsi que le choix d'une combinaison des paramètres permettant d'obtenir les meilleures performances de capture en termes d'efficacité et de sélectivité de la capture.

Un paramètre étudié est **l'influence du temps de capture**. Le temps de capture est la durée pendant laquelle la pompe assure la circulation du sang au sein du système fluïdique et à travers le dispositif de capture. Des temps de capture variant entre 10 et 40 minutes ont été testés pour effectuer la capture. Il a été montré que l'augmentation du temps de capture s'accompagne d'une augmentation de cellules PC-9 capturées sans que la contamination soit significativement affectée. Ainsi ce paramètre du temps de capture présente un potentiel pour augmenter à la fois l'efficacité et la sélectivité de la capture. Ce temps reste à optimiser en tenant compte des autres paramètres influant la capture et dans la limite d'un temps trop élevé risquant d'altérer l'échantillon sanguin (environ 1h).

Un autre paramètre prometteur pour l'augmentation de l'efficacité d'un système de capture est **l'utilisation de multiples dispositifs en série**. La capture a été effectuée avec des systèmes comprenant jusqu'à 6 S-MDCs en série. Les premiers résultats montrent que l'intégration de plusieurs S-MDCs en série au sein du système de capture n'affecte pas significativement le nombre moyen de PC-9 capturées par S-MDC ni la contamination par S-MDC mais que l'effet est bien cumulatif. Ainsi, en intégrant plusieurs S-MDCs en série, la sélectivité est constante mais l'efficacité de capture du système global se trouve augmentée.

D'autres paramètres doivent être étudiés afin d'optimiser le processus de capture, comme par exemple **le débit**. En effet, l'augmentation du débit pourrait permettre d'augmenter l'efficacité de capture tout en réduisant le temps de capture. Il faut cependant veiller à ne pas dépasser un certain seuil de pression transmembranaire de façon à préserver la viabilité cellulaire tel qu'évoqué dans la section 2.1.1 présentant l'approche de microfiltration implémentée *via* les S-MDCs. La viabilité cellulaire post capture est un critère primordial qui doit aussi être étudié pour les différentes conditions de temps et de débits testés. Ainsi une combinaison de paramètres optimum pourra être choisie pour effectuer la capture dans les meilleures conditions possibles tout en maximisant le nombre de cellules capturées. L'influence de la concentration en cellules modèles issues de lignées tumorales doit aussi être étudiée. La comparaison de capture de PC-9 à différentes concentrations dans le sang permettrait d'étudier l'efficacité du dispositif dans des conditions se rapprochant de l'utilisation clinique. En effet, les CTCs étant très rares dans le sang des patients de l'ordre de 1 à 10/mL de sang en fonction du stade de la maladie (voir 1.2.1), il est primordial que le dispositif puisse capturer des cellules à faible concentration. Les facteurs de performance des S-MDCs pourront aussi être déterminés à partir de cellules tumorales issues de différentes lignées afin d'évaluer l'impact de la distribution en taille des cellules. L'influence de ces paramètres est en cours d'étude par l'équipe R&D de SmartCatch.

6. Développements envisagés pour le système de capture

Les objectifs de cette thèse en lien avec les développements du système de capture reposent principalement sur deux axes. Le premier est l'estimation du volume effectif filtré par un S-MDC pour un débit de flux sanguin à l'entrée du système et un temps de capture donné. Cette donnée permettrait d'évaluer le facteur de performance d'efficacité de capture en tenant compte du **volume sanguin réellement filtré** qui constitue une information clé pour le positionnement des S-MDCs face aux autres outils de biopsie liquide. Un second axe est l'exploration du procédé de fabrication des S-MDCs et des possibilités d'évolution de design en vue de **l'intégration de microélectrodes** sur la surface de la membrane filtrante pour une **détection de la capture cellulaire en temps réel**.

6.1. Estimation du volume effectif analysé

Le calcul de l'efficacité de capture est basé sur le **nombre total de cellules tumorales** en suspension dans l'échantillon sanguin. Pour les dispositifs rapportés dans la littérature servant de référence, tel que CellSearch®, le volume total de l'échantillon est analysé donc l'ensemble des cellules tumorales mises en suspension interagissent avec le dispositif de capture. Dans notre cas, une partie réduite du volume sanguin total traverse la membrane filtrante. En effet celle-ci représente **31% de la surface du lumen** et son **ouverture représente 8% de la surface du lumen**. La circulation du sang en boucle fermée augmente le volume filtré. Malgré cela, le volume effectif analysé selon les temps de capture et débits de circulation utilisés, qui sont ceux optimisés pour la préservation de la viabilité cellulaire, reste très inférieur au volume total. Il n'est donc pas adéquat de comparer l'efficacité de capture obtenue avec les S-MDCs aux résultats présentés dans la littérature, lorsque celle-ci est calculée à partir du volume total de sang mis en circulation.

Afin de comparer l'efficacité de capture de façon plus appropriée aux données rapportées pour les dispositifs considérés comme références dans le domaine, il serait intéressant d'**estimer le volume effectif traversant la membrane filtrante** pour un temps de capture et un débit de circulation de sang donnés. Cette estimation n'est pas triviale car le débit est réduit à l'approche de la membrane filtrante de par la structure 2,5D du S-MDC. De plus le débit du fluide traversant la membrane filtrante diminue avec l'obstruction progressive des pores de la membrane filtrante. Ceci peut être investigué par le biais de simulations fluidiques fines. La corrélation entre cinétique de capture expérimentale et simulations permettant d'extraire les débits pour les taux d'obstruction correspondants permettrait d'estimer une valeur du volume sanguin filtré pour une concentration de cellules tumorales, un temps de capture et un débit de circulation à l'entrée du système fluide donnés. Cependant, ces investigations par simulations fluidiques sont lourdes et ne permettent pas de rendre compte de façon fidèle le comportement hydrodynamique du sang, **fluide complexe aux propriétés non newtoniennes**. Un système permettant la **mesure de la vitesse d'écoulement du sang en temps réel au voisinage de la membrane filtrante** permettrait d'estimer un volume effectif analysé sur un temps donné. La piste de la vélocimétrie laser par effet Doppler a été explorée dans le cadre des travaux de cette thèse et fait l'objet du Chapitre 3 de ce manuscrit.

6.2. Exploration de nouveaux matériaux et géométries

D'autres matériaux peuvent être utilisés pour la fabrication des S-MDC dans la perspective de maximiser la viabilité cellulaire. Un compromis est à trouver entre **cytotoxicité réduite et propriétés**

mécaniques du matériau. En effet, des expériences précédentes ont montré que des S-MDCs fabriqués en or offrent une meilleure viabilité des cellules capturées que les S-MDCs fabriqués en nickel, avec des taux de viabilité des cellules capturées de 90% et 67% respectivement. En revanche, les dispositifs en or sont beaucoup plus fragiles et difficiles à manipuler. Des dispositifs bi-matériau peuvent aussi être réalisés en utilisant deux matériaux distincts pour la partie supportrice et la membrane filtrante des S-MDCs. Un matériau présentant le moins de cytotoxicité possible peut alors être privilégié pour la membrane filtrante en contact avec les cellules et un matériau présentant une bonne tenue mécanique peut être choisi de façon préférentielle pour la partie supportrice pour permettre la manipulation du dispositif. Dans ce cas, l'adhésion entre les deux matériaux doit être suffisante pour résister aux contraintes imposées par la manipulation et la circulation du sang au travers du S-MDC. Dans le cadre de cette thèse, un procédé de fabrication de S-MDCs bi-matériau a été mis au point avec la partie supportrice formée en nickel et la membrane filtrante en oxyde de silicium et de nitrure (voir **Figure 12**). La bicouche oxyde de silicium et nitrure de silicium confère des propriétés intéressantes telle que la transparence qui peut éventuellement faciliter la caractérisation des cellules post capture. Cette bicouche est aussi intéressante du point de vue de ses propriétés mécaniques. En effet, constituée d'une épaisseur de 0,8 μm d'oxyde de silicium et 0,6 μm d'oxyde de nitrure, elle présente une fine épaisseur totale de 1,4 μm . Cette bicouche particulière a été mise au point afin de réduire les contraintes internes et présente une résistance mécanique élevée. Ainsi la faible épaisseur de la membrane filtrante permet de **réduire la résistance hydraulique du dispositif tout en assurant sa tenue sous flux**. La mise au point de ce procédé a servi de base pour l'exploration technologique de l'intégration de microélectrodes à la surface de la membrane filtrante du S-MDC faisant l'objet du Chapitre 2 de ce manuscrit. Enfin, dans le cas où le matériau est choisi pour ses propriétés mécaniques au détriment de propriétés non cytotoxiques, il peut aussi être envisageable d'effectuer un revêtement du dispositif avec un matériau aux propriétés biocompatibles reconnues afin de maximiser la viabilité cellulaire. Par exemple, nous pourrions revêtir un S-MDC fabriqué en nickel d'une couche de parylène, polymère biocompatible largement utilisé pour des applications biomédicales ⁹⁶.

Une variété de designs peut être imaginée afin de concevoir la membrane filtrante. La disposition des ouvertures latérales peut être modifiée, une ouverture plus large pourrait éventuellement être placée au centre du dispositif, toujours dans la perspective d'une réduction de la pression transmembranaire. Des simulations fluidiques peuvent aider à choisir le design le plus approprié. Le design peut aussi être amplement investigué du point de vue de la conception des pores. **Le diamètre du pore influe sur l'efficacité de capture du dispositif ainsi que le taux de contamination.** Un compromis est ainsi à effectuer afin de retenir la part la plus importante de la population de CTCs dans toute sa diversité, tout en limitant le taux de contamination et risquer une obstruction de la membrane filtrante. Des expériences précédentes menées avec des S-MDCs de diamètre de pore de 12, 11 et 10 μm ont montré que l'efficacité de capture augmente lorsque le diamètre des pores est réduit tout en maintenant une contamination relativement constante. Ainsi une différence de géométrie pouvant apparaître comme minime, telle que la différence de 2 μm au niveau du diamètre des pores, influe significativement sur l'efficacité de capture. D'autres expériences sont à réaliser afin d'évaluer le diamètre minimal des pores permettant de maximiser la capture des cellules tumorales sans pour autant augmenter trop fortement la contamination. Cette étude sera pertinente lors des essais cliniques notamment, étant donné les disparités importantes des CTCs au niveau de la taille et leurs dimensions réduites en comparaison des cellules issues de lignées tumorales. A titre indicatif, les systèmes de microfiltration rapportés dans la littérature pour l'isolement de CTCs présentent des pores

de diamètres compris entre 8 et 20 μm ⁷⁰. Il est nécessaire de rappeler que **la conjonction de la taille du pore, le débit et le temps de capture influe sur la sélectivité du système**. Le montage fluidique préalablement optimisé, il est nécessaire de jouer sur chacun de ces paramètres afin d'atteindre un le ratio CTCs/contaminants idéal. En outre, une étude a montré qu'une forme conique des pores augmente la spécificité de capture⁹⁷. Une autre montre qu'une forme de fente associée à des bords d'ouverture inclinés réduit la contrainte mécanique exercée sur les cellules capturées⁹⁸. Ainsi, d'autres formes peuvent être étudiées pour les pores de la membrane filtrante des S-MDCs. Un prototype préliminaire de S-MDC présentant des ouvertures en forme de fentes a été réalisé via le procédé de fabrication bi-matériau nickel et oxyde de silicium/oxyde de nitrure évoqué dans le paragraphe précédent (voir **Figures 12c** et **12d**). Avec ce design, à surface filtrante identique, l'ouverture a été augmentée de 8% à 15% en comparaison du design des S-MDCs aux pores circulaires disposés en nid d'abeille. **L'augmentation de la surface d'ouverture de la membrane filtrante permet de réduire la résistance hydraulique** du système ainsi que d'augmenter potentiellement l'efficacité de capture. Cependant le matériau utilisé pour former la membrane filtrante doit présenter de **bonnes propriétés mécaniques** afin de résister au flux sanguin en présentant une ouverture augmentée. C'est le cas de la bicouche oxyde de silicium/oxyde de nitrure employée pour l'investigation d'un procédé de fabrication bi-matériau des S-MDCs. Ces dispositifs doivent être testés lors d'expériences de capture de cellules tumorales mises en suspension dans du sang complet afin d'évaluer leurs performances.

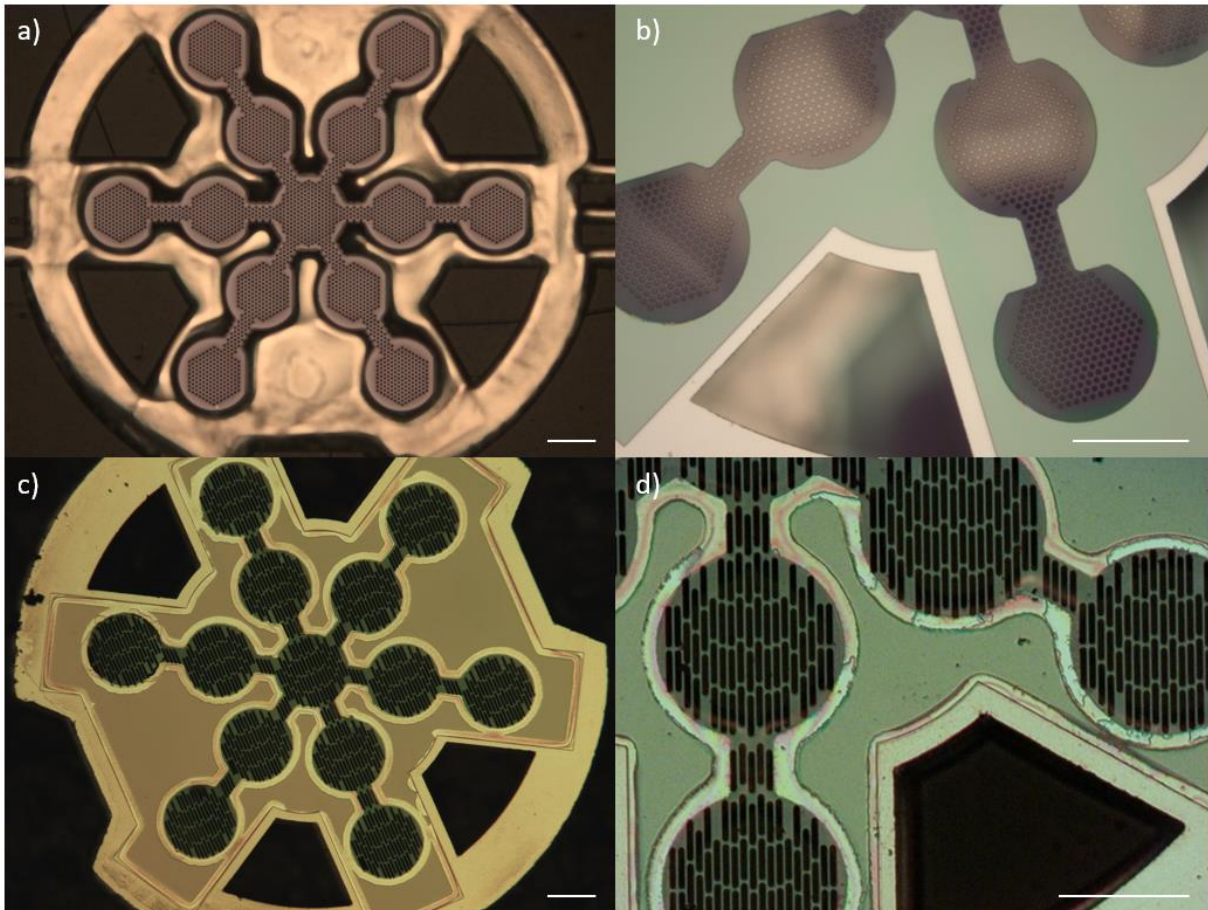


Figure 12 Images de prototypes S-MDCs bi-matériau partie supportrice en nickel et membrane filtrante en bicouche oxyde de silicium/oxyde de nitrure. Les barres d'échelle correspondent à 200 μm . a) Face avant, design aux pores circulaires disposées en nid d'abeille. b) Face arrière, design aux pores circulaires disposées en nid d'abeille. c) et d) Face arrière, design aux pores à la forme de fentes.

Conclusions

Les S-MDCs ont été conçus selon le principe de la microfiltration afin d'isoler les CTCs sur la base du critère combiné de la taille et de la rigidité dans des conditions dites douces. La méthode de capture développée permet de conserver la viabilité et l'intégrité des informations biologiques portées par les CTCs, permettant ainsi des analyses phénotypiques et génotypiques fines et fiables. Les S-MDCs présentent une membrane filtrante et de larges ouvertures latérales afin de laisser une partie du sang circuler librement et éviter d'augmenter la pression transmembranaire qui endommage les cellules à partir d'un certain seuil. Ce seuil de pression transmembranaire a été observé à 1,8 kPa dans l'étude de D. L. Adams *et al.* sur la microfiltration de cellules MCF-7 issues d'une lignée tumorale de cancer du sein afin de préserver la morphologie des cellules et de leur noyaux⁸⁸. Ainsi le design particulier des S-MDC, présentant une membrane filtrante dont la surface représente environ 30% de la surface du lumen et dont l'ouverture est de 8%, ne permet pas de comparaison directe avec les performances des dispositifs existants en terme d'efficacité de capture, étant donné que la totalité du volume sanguin n'est pas analysée. L'estimation du volume effectif analysé représente un axe clé pour une meilleure description de notre système et l'évaluation de ses performances.

La capture la plus intéressante est celle qui permettrait de maximiser le nombre de CTCs capturées tout en préservant leur viabilité et limitant la contamination. Nous avons vu que l'augmentation du temps de capture permet d'augmenter l'efficacité de capture sans nuire à la sélectivité. Cependant, ce temps ne doit pas dépasser une certaine limite, fixée à une heure, afin de ne pas dégrader l'échantillon sanguin et d'éviter que le processus de capture ne soit trop lourd à implémenter pour une utilisation en routine clinique. En revanche, dans la perspective de l'utilisation des S-MDCs au sein d'un système extra-corporel, le seul facteur limitant pour l'augmentation du temps de capture, hormis le confort du patient, est l'obstruction de la membrane filtrante par la contamination. Il pourra alors être envisagé d'augmenter le temps de capture jusqu'à une limite de temps pour laquelle la capture atteint un seuil maximal. Toutefois, le risque de thrombose en cas de saturation des dispositifs est à évaluer.

D'autres pistes peuvent être suivies pour améliorer l'efficacité de capture, notamment l'optimisation de tous les paramètres de capture évoqués au sein de ce chapitre. Une autre de nos stratégies repose sur le positionnement en série de plusieurs S-MDCs, dont le nombre peut être multiplié dans la limite du concevable, pour augmenter le volume effectif analysé et ainsi maximiser la capture de CTCs. Cette approche est également judicieuse pour accroître les chances de capture pour des faibles concentrations de CTCs et donc augmenter la sensibilité du système. L'étude clinique préliminaire décrite dans ce chapitre révèle que les dispositifs de capture sont capables de capturer des CTCs dans du sang de patient et appuie le potentiel qu'ils présentent pour leur utilisation comme outils de biopsie liquide.

Dans la perspective de l'introduction des S-MDCs en routine clinique et de l'optimisation du processus de capture, il serait intéressant de développer un système permettant le suivi en temps réel de la capture *in situ*. Couplé à ce système, une mesure en temps réel de la vitesse d'écoulement au voisinage de la membrane filtrante permettrait d'estimer le volume effectif analysé. Ces deux informations combinées permettraient au praticien d'obtenir l'information instantanée du nombre de

CTCs capturées par mL de sang analysé. L'obtention de ce paramètre clé en temps réel sans étapes successives de caractérisation de la capture cellulaire constitue un enjeu majeur pour l'introduction pratique de ce type de dispositifs dans l'environnement médical. Par ailleurs, l'énumération *in situ* présente l'avantage de limiter la déperdition de l'information lors d'étapes successives de collecte et/ou traitement de l'échantillon. La mesure de la vitesse de l'écoulement du sang simultanément à la capture permettrait d'établir une calibration et d'associer pour chaque capture un taux de capture à un débit effectif à travers la membrane filtrante du S-MDC. Un accès systématique à ces données qui pourraient être centralisées et analysées de manière globale permettrait d'étudier la dynamique de relargage des CTCs au sein de la circulation sanguine et d'adapter nos systèmes sur la base des résultats cliniques.

Bibliographie

1. Russano, M. *et al.* Liquid biopsy and tumor heterogeneity in metastatic solid tumors: the potentiality of blood samples. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **39**, (2020).
2. Tellez-Gabriel, M., Heymann, M.-F. & Heymann, D. Circulating Tumor Cells as a Tool for Assessing Tumor Heterogeneity. *Theranostics* **9**, 4580–4594 (2019).
3. Li, X. *et al.* Liquid biopsy of circulating tumor DNA and biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* **126**, 596–607 (2019).
4. Haber, D. A. & Velculescu, V. E. Blood-Based Analyses of Cancer: Circulating Tumor Cells and Circulating Tumor DNA. *Cancer Discov.* **4**, 650–661 (2014).
5. Lianidou, E. & Pantel, K. Liquid biopsies. *Genes. Chromosomes Cancer* **58**, 219–232 (2019).
6. Li, P., Kaslan, M., Lee, S. H., Yao, J. & Gao, Z. Progress in Exosome Isolation Techniques. *Theranostics* **7**, 789–804 (2017).
7. Krebs, M. G., Hou, J.-M., Ward, T. H., Blackhall, F. H. & Dive, C. Circulating tumour cells: their utility in cancer management and predicting outcomes. *Ther. Adv. Med. Oncol.* **2**, 351–365 (2010).
8. Shook, D. & Keller, R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial–mesenchymal transitions in early development. *Mech. Dev.* **120**, 1351–1383 (2003).
9. GREENBURGt, G. & Hay, E. D. Cytoskeleton and thyroglobulin expression change during transformation of thyroid epithelium to mesenchyme-like cells. **18**.
10. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).
11. Tsubakihara, Y. & Moustakas, A. Epithelial-Mesenchymal Transition and Metastasis under the Control of Transforming Growth Factor β . *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 3672 (2018).
12. Micalizzi, D. S., Maheswaran, S. & Haber, D. A. A conduit to metastasis: circulating tumor cell biology. *Genes Dev.* **31**, 1827–1840 (2017).
13. Dillekås, H., Rogers, M. S. & Straume, O. Are 90% of deaths from cancer caused by metastases? *Cancer Med.* **8**, 5574–5576 (2019).
14. Cho, H. *et al.* Microfluidic technologies for circulating tumor cell isolation. *The Analyst* **143**, 2936–2970 (2018).
15. Kim, J. *et al.* Rapid apoptosis in the pulmonary vasculature distinguishes non-metastatic from metastatic melanoma cells. *Cancer Lett.* **213**, 203–212 (2004).
16. Ross, A. *et al.* Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques [see comments]. **8**.
17. Allard, W. J. *et al.* Tumor Cells Circulate in the Peripheral Blood of All Major Carcinomas but not in Healthy Subjects or Patients With Nonmalignant Diseases. *Clin. Cancer Res.* **10**, 8 (2004).
18. Naito, T. *et al.* Prognostic Impact of Circulating Tumor Cells in Patients with Small Cell Lung Cancer. *J. Thorac. Oncol.* **7**, 512–519 (2012).
19. Chen, L., Bode, A. M. & Dong, Z. Circulating Tumor Cells: Moving Biological Insights into Detection. *Theranostics* **7**, 2606–2619 (2017).
20. Au, S. H. *et al.* Clusters of circulating tumor cells traverse capillary-sized vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **113**, 4947–4952 (2016).
21. Fabisiwicz, A. & Grzybowska, E. CTC clusters in cancer progression and metastasis. *Med. Oncol.* **34**, (2017).
22. Sarioglu, A. F. *et al.* A microfluidic device for label-free, physical capture of circulating tumor cell clusters. *Nat. Methods* **12**, 685–691 (2015).
23. Sharma, S. *et al.* Circulating tumor cell isolation, culture, and downstream molecular analysis. *Biotechnol. Adv.* **36**, 1063–1078 (2018).
24. Ried, K., Eng, P. & Sali, A. Screening for Circulating Tumour Cells Allows Early Detection of Cancer and Monitoring of Treatment Effectiveness: An Observational Study. *Adv. Cancer Prev.* **02**, (2017).

25. Nagrath, S. *et al.* Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* **450**, 1235–1239 (2007).
26. Fischer, J. C. *et al.* Diagnostic leukapheresis enables reliable detection of circulating tumor cells of nonmetastatic cancer patients. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **110**, 16580–16585 (2013).
27. Ližičke, K. A novel method for the in vivo isolation of circulating tumor cells from peripheral blood of cancer patients using a functionalized and structured medical wire. *Int. J. Oncol.* (2012) doi:10.3892/ijo.2012.1557.
28. Shen, Z., Wu, A. & Chen, X. Current detection technologies for circulating tumor cells. *Chem. Soc. Rev.* **46**, 2038–2056 (2017).
29. Qiao, Y. *et al.* Prognostic value of circulating tumor cells in the peripheral blood of patients with esophageal squamous cell carcinoma. *OncoTargets Ther.* **Volume 10**, 1363–1373 (2017).
30. Hayes, D. F. Circulating Tumor Cells at Each Follow-up Time Point during Therapy of Metastatic Breast Cancer Patients Predict Progression-Free and Overall Survival. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4218–4224 (2006).
31. Lohr, J. G. *et al.* Whole-exome sequencing of circulating tumor cells provides a window into metastatic prostate cancer. *Nat. Biotechnol.* **32**, 479–484 (2014).
32. Mu, V., Goetz, A. & Ja, F. Circulating Tumor Cells in Breast Cancer: Correlation to Bone Marrow Micrometastases, Heterogeneous Response to Systemic Therapy and Low Proliferative Activity. *Clin Cancer Res* **9** (2005).
33. Brungs, D. *et al.* Establishment of novel long-term cultures from EpCAM positive and negative circulating tumour cells from patients with metastatic gastroesophageal cancer. *Sci. Rep.* **10**, (2020).
34. Wang, R. *et al.* Cultured circulating tumor cells and their derived xenografts for personalized oncology. *Asian J. Urol.* **3**, 240–253 (2016).
35. Yang, C., Xia, B.-R., Jin, W.-L. & Lou, G. Circulating tumor cells in precision oncology: clinical applications in liquid biopsy and 3D organoid model. *Cancer Cell Int.* **19**, (2019).
36. Sundling, K. E. & Lowe, A. C. Circulating Tumor Cells: Overview and Opportunities in Cytology. *Adv. Anat. Pathol.* **26**, 56–63 (2019).
37. Moon, D. H., Lindsay, D. P., Hong, S. & Wang, A. Z. Clinical indications for, and the future of, circulating tumor cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* (2018) doi:10.1016/j.addr.2018.04.002.
38. Heidrich, I., Ačkar, L., Mohammadi, P. M. & Pantel, K. Liquid biopsies: potential and challenges. *Int. J. Cancer* (2020) doi:10.1002/ijc.33217.
39. Lozar, T., Gersak, K., Cemazar, M., Kuhar, C. G. & Jesenko, T. The biology and clinical potential of circulating tumor cells. *Radiol. Oncol.* **53**, 131–147 (2019).
40. Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 69–84 (2019).
41. Li, F., Tiede, B., Massagué, J. & Kang, Y. Beyond tumorigenesis: cancer stem cells in metastasis. *Cell Res.* **17**, 3–14 (2007).
42. Hollier, B. G., Evans, K. & Mani, S. A. The Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Cancer Stem Cells: A Coalition Against Cancer Therapies. *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia* **14**, 29–43 (2009).
43. Li, W. *et al.* Unraveling the roles of CD44/CD24 and ALDH1 as cancer stem cell markers in tumorigenesis and metastasis. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
44. Marrinucci, D. *et al.* Circulating Tumor Cells From Well-Differentiated Lung Adenocarcinoma Retain Cytomorphologic Features of Primary Tumor Type. *Arch Pathol Lab Med* **133**, 4 (2009).
45. Marrinucci, D. *et al.* Cytomorphology of Circulating Colorectal Tumor Cells: A Small Case Series. *J. Oncol.* **2010**, 1–7 (2010).
46. Harouaka, R. A. *et al.* Flexible Micro Spring Array Device for High-Throughput Enrichment of Viable Circulating Tumor Cells. *Clin. Chem.* **60**, 323–333 (2014).
47. Marrinucci, D. *et al.* Case study of the morphologic variation of circulating tumor cells. *Hum. Pathol.* **38**, 514–519 (2007).

48. Chen, J.-F. *et al.* Subclassification of prostate cancer circulating tumor cells by nuclear size reveals very small nuclear circulating tumor cells in patients with visceral metastases: vsnCTCs and Visceral Metastases in PC. *Cancer* **121**, 3240–3251 (2015).
49. Remmerbach, T. W. *et al.* Oral Cancer Diagnosis by Mechanical Phenotyping. *Cancer Res.* **69**, 1728–1732 (2009).
50. Gossett, D. R. *et al.* Hydrodynamic stretching of single cells for large population mechanical phenotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109**, 7630–7635 (2012).
51. Martinez Vazquez, R. *et al.* An optofluidic constriction chip for monitoring metastatic potential and drug response of cancer cells. *Integr. Biol.* **7**, 477–484 (2015).
52. Ferreira, M. M., Ramani, V. C. & Jeffrey, S. S. Circulating tumor cell technologies. *Mol. Oncol.* **10**, 374–394 (2016).
53. Zhao, W. *et al.* Tumor antigen-independent and cell size variation-inclusive enrichment of viable circulating tumor cells. *Lab. Chip* **19**, 1860–1876 (2019).
54. Moreno, J. G. *et al.* Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status. *Urology* **58**, 386–392 (2001).
55. Ozkumur, E. *et al.* Inertial Focusing for Tumor Antigen-Dependent and -Independent Sorting of Rare Circulating Tumor Cells. *Sci. Transl. Med.* **5**, 179ra47-179ra47 (2013).
56. Gascoyne, P. & Shim, S. Isolation of Circulating Tumor Cells by Dielectrophoresis. *Cancers* **6**, 545–579 (2014).
57. Dharmasiri, U. *et al.* Highly efficient capture and enumeration of low abundance prostate cancer cells using prostate-specific membrane antigen aptamers immobilized to a polymeric microfluidic device. *ELECTROPHORESIS* **30**, 3289–3300 (2009).
58. Park, S. *et al.* Morphological Differences between Circulating Tumor Cells from Prostate Cancer Patients and Cultured Prostate Cancer Cells. *PLoS ONE* **9**, e85264 (2014).
59. Bankó, P. *et al.* Technologies for circulating tumor cell separation from whole blood. *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol* **12**, (2019).
60. Ring, A. E., Zabaglo, L., Ormerod, M. G., Smith, I. E. & Dowsett, M. Detection of circulating epithelial cells in the blood of patients with breast cancer: comparison of three techniques. *Br. J. Cancer* **92**, 906–912 (2005).
61. Kowalik, A., Kowalewska, M. & Gózdź, S. Current approaches for avoiding the limitations of circulating tumor cells detection methods—implications for diagnosis and treatment of patients with solid tumors. *Transl. Res.* **185**, 58-84.e15 (2017).
62. Talasz, A. H. *et al.* Isolating highly enriched populations of circulating epithelial cells and other rare cells from blood using a magnetic sweeper device. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**, 3970–3975 (2009).
63. Lu, N.-N. *et al.* Biotin-Triggered Decomposable Immunomagnetic Beads for Capture and Release of Circulating Tumor Cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **7**, 8817–8826 (2015).
64. Adams, A. A. *et al.* Highly Efficient Circulating Tumor Cell Isolation from Whole Blood and Label-Free Enumeration Using Polymer-Based Microfluidics with an Integrated Conductivity Sensor. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 8633–8641 (2008).
65. Shah, A. M. *et al.* Biopolymer System for Cell Recovery from Microfluidic Cell Capture Devices. *Anal. Chem.* **84**, 3682–3688 (2012).
66. Seal, S. H. Silicone flotation: A simple quantitative method for the isolation of free-floating cancer cells from the blood. *Cancer* **12**, 590–595 (1959).
67. Balic, M. *et al.* Comparison of two methods for enumerating circulating tumor cells in carcinoma patients. *Cytometry B Clin. Cytom.* **68B**, 25–30 (2005).
68. Zhang, J., Chen, K. & Fan, Z. H. Circulating Tumor Cell Isolation and Analysis. in *Advances in Clinical Chemistry* vol. 75 1–31 (Elsevier, 2016).
69. Kim, T.-H. *et al.* FAST: Size-Selective, Clog-Free Isolation of Rare Cancer Cells from Whole Blood at a Liquid-Liquid Interface. *Anal. Chem.* **89**, 1155–1162 (2017).

70. Khetani, S., Mohammadi, M. & Nezhad, A. S. Filter-based isolation, enrichment, and characterization of circulating tumor cells: KHETANI ET AL. *Biotechnol. Bioeng.* **115**, 2504–2529 (2018).
71. Yeh, Y.-T., Harouaka, R. A. & Zheng, S.-Y. Evaluating a novel dimensional reduction approach for mechanical fractionation of cells using a tandem flexible micro spring array (tFMSA). *Lab. Chip* **17**, 691–701 (2017).
72. Hvichia, G. E. *et al.* A novel microfluidic platform for size and deformability based separation and the subsequent molecular characterization of viable circulating tumor cells: Harvest and Molecular Characterization of Viable CTCs. *Int. J. Cancer* **138**, 2894–2904 (2016).
73. Miller, M. C., Robinson, P. S., Wagner, C. & O’Shannessy, D. J. The Parsortix™ Cell Separation System—A versatile liquid biopsy platform. *Cytometry A* **93**, 1234–1239 (2018).
74. Yagi, S. *et al.* Development of an automated size-based filtration system for isolation of circulating tumor cells in lung cancer patients. *PLOS ONE* **12**, e0179744 (2017).
75. Hosokawa, M. *et al.* Size-Based Isolation of Circulating Tumor Cells in Lung Cancer Patients Using a Microcavity Array System. *PLoS ONE* **8**, e67466 (2013).
76. Au, S. H. *et al.* Microfluidic Isolation of Circulating Tumor Cell Clusters by Size and Asymmetry. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
77. Zhang, J., Chen, K. & Fan, Z. H. Circulating Tumor Cell Isolation and Analysis. in *Advances in Clinical Chemistry* vol. 75 1–31 (Elsevier, 2016).
78. Fachin, F. *et al.* Monolithic Chip for High-throughput Blood Cell Depletion to Sort Rare Circulating Tumor Cells. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
79. Lee, H. J. *et al.* Efficient Isolation and Accurate In Situ Analysis of Circulating Tumor Cells Using Detachable Beads and a High-Pore-Density Filter. *Angew. Chem. Int. Ed.* **52**, 8337–8340 (2013).
80. Galanzha, E. I. *et al.* In vivo magnetic enrichment and multiplex photoacoustic detection of circulating tumour cells. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 855–860 (2009).
81. Kim, T. H. *et al.* A temporary indwelling intravascular aphaeretic system for in vivo enrichment of circulating tumor cells. *Nat. Commun.* **10**, (2019).
82. Gribko, A. *et al.* Is small smarter? Nanomaterial-based detection and elimination of circulating tumor cells: current knowledge and perspectives. *Int. J. Nanomedicine* **Volume 14**, 4187–4209 (2019).
83. Rawal, S., Ao, Z., Datar, R. H. & Agarwal, A. Microfilter-Based Capture and Release of Viable Circulating Tumor Cells. in *Circulating Tumor Cells* (eds. M. Magbanua, M. J. & W. Park, J.) vol. 1634 93–105 (Springer New York, 2017).
84. Chen, J. *et al.* 3D printed microfluidic devices for circulating tumor cells (CTCs) isolation. *Biosens. Bioelectron.* **150**, 111900 (2020).
85. Li, T. *et al.* A blood cell repelling and tumor cell capturing surface for high-purity enrichment of circulating tumor cells. *J. Mater. Chem. B* **7**, 6087–6098 (2019).
86. Murlidhar, V., Rivera-Báez, L. & Nagrath, S. Affinity Versus Label-Free Isolation of Circulating Tumor Cells: Who Wins? *Small* **12**, 4450–4463 (2016).
87. Jiménez-Zenteno, A. K. & Cerf, A. Liquid Biopsy Based on Circulating Cancer-Associated Cells: Bridging the Gap from an Emerging Concept to a Mainstream Tool in Precision Medicine. *Adv. Biosyst.* **4**, 1900164 (2020).
88. Adams, D. L. *et al.* The systematic study of circulating tumor cell isolation using lithographic microfilters. *RSC Adv* **4**, 4334–4342 (2014).
89. Zhou, B. *et al.* Worldwide trends in blood pressure from 1975 to 2015: a pooled analysis of 1479 population-based measurement studies with 19.1 million participants. *The Lancet* **389**, 37–55 (2017).
90. Tansey, E. A., Montgomery, L. E. A., Quinn, J. G., Roe, S. M. & Johnson, C. D. Understanding basic vein physiology and venous blood pressure through simple physical assessments. *Adv. Physiol. Educ.* **43**, 423–429 (2019).

91. Sun, T., Smallwood, R. & MacNeil, S. Development of a mini 3D cell culture system using well defined nickel grids for the investigation of cell scaffold interactions. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **20**, 1483–1493 (2009).
92. Harouaka, R. A., Nisic, M. & Zheng, S.-Y. Circulating tumor cell enrichment based on physical properties. *J. Lab. Autom.* 2211068213494391 (2013).
93. Sevcikova, J. & Pavkova Goldbergova, M. Biocompatibility of NiTi alloys in the cell behaviour. *BioMetals* **30**, 163–169 (2017).
94. Sonofuchi, K. *et al.* Quantitative in vivo biocompatibility of new ultralow-nickel cobalt-chromium-molybdenum alloys: NEW ULTRALOW-Ni Co-Cr-Mo ALLOY BIOCOMPATIBILITY. *J. Orthop. Res.* **34**, 1505–1513 (2016).
95. Chen, W. *et al.* Nanoroughened Surfaces for Efficient Capture of Circulating Tumor Cells without Using Capture Antibodies. *ACS Nano* **7**, 566–575 (2013).
96. Golda-Cepa, M., Engvall, K., Hakkarainen, M. & Kotarba, A. Recent progress on parylene C polymer for biomedical applications: A review. *Prog. Org. Coat.* **140**, 105493 (2020).
97. Tang, Y. *et al.* Microfluidic device with integrated microfilter of conical-shaped holes for high efficiency and high purity capture of circulating tumor cells. *Sci. Rep.* **4**, (2015).
98. Kang, Y.-T., Doh, I. & Cho, Y.-H. Tapered-slit membrane filters for high-throughput viable circulating tumor cell isolation. *Biomed. Microdevices* **17**, (2015).

Intégration d'un système de détection des cellules capturées

Table des matières

Éléments de contexte	54
1. La détection électrique de cellules tumorales	55
1.1. Introduction aux propriétés diélectriques	55
1.2. Caractérisation électrique des cellules biologiques	56
1.2.1. Description biologique simplifiée	56
1.2.2. Propriétés électriques explorées à partir de mesures d'impédance	57
1.2.3. Propriétés diélectriques de différents types cellulaires.....	59
1.2.4. Modèles électriques simplifiés	60
1.3. La spectroscopie d'impédance	63
1.3.1. La spectroscopie d'impédance parmi les techniques de caractérisation électrique de la cellule biologique	63
1.3.2. Principe de la spectroscopie d'impédance.....	63
1.3.3. Interface électrode-milieu.....	65
1.3.4. Systèmes de mesure.....	68
1.4. Les biocapteurs à spectroscopie d'impédance	70
1.4.1. Les différents types de biocapteurs	70
1.4.2. Etat de l'art des biocapteurs à impédancemétrie pour la détection de cellules biologiques	70
1.4.3. Biocapteurs à électrodes coplanaires.....	74
1.4.4. Facteurs de performance	74
2. Concept et design du S-MDC à électrodes intégrées	77
2.1. Concept d'intégration d'électrodes pour la détection de cellules tumorales.....	77
2.2. Proposition de design de S-MDC à électrodes intégrées	78
2.2.1. Structure générale du S-MDC à électrodes intégrées	78
2.2.2. Stratégie d'intégration des microélectrodes.....	80
2.2.3. Géométrie des microélectrodes	81
3. Procédé de microfabrication des S-MDCs à électrodes intégrées	81
3.1. Choix des matériaux	81
3.2. Description des techniques de microfabrication employées.....	83
3.2.1. Dépôt CVD pour la formation de la membrane filtrante	84
3.2.2. Lift off pour la formation des microélectrodes et pistes de connexion	84
3.2.3. Gravure RIE pour l'ouverture des pores.....	84
3.2.4. Dépôt électrolytique pour la formation de la partie supportrice et des vias de connexion	85

3.3.	Procédé de microfabrication	86
3.4.	Caractérisation du procédé de microfabrication	87
4.	Principe de la mesure	90
4.1.	Instrumentation	90
4.3.	Montage expérimental.....	92
5.	Modélisation et circuit électrique équivalent	93
5.1.	Circuit électrique équivalent	93
5.1.1.	Perturbation induite par la cellule.....	93
5.1.2.	Circuit équivalent global.....	94
5.2.	Éléments analytiques	95
5.2.1.	Capacité électrodes coplanaires.....	95
5.2.2.	Capacité double couche électrique	96
5.2.3.	Modèle de la cellule	97
5.2.4.	Expression de l'impédance entre les microélectrodes.....	97
6.	Caractérisation électrique dans un milieu simple	98
6.1.	Dispositifs exploratoires 2D.....	99
6.1.1.	Concept et description générale	99
6.1.2.	Description des différents designs	100
6.2.	Caractérisation électrique par spectroscopie d'impédance	101
6.2.1.	Précisions sur les mesures et protocole expérimental	102
6.2.2.	Influence du nombre de puits sondés.....	102
6.2.3.	Microélectrodes contournant la totalité de la surface de la membrane filtrante	106
6.2.4.	Confrontation au modèle analytique	107
6.3.	Premières mesures en présence de cellules	109
6.3.1.	Protocole expérimental.....	109
6.3.2.	Exemple de résultat de mesure.....	110
6.3.3.	Discussion sur les résultats de détection de cellules via les dispositifs 2D	114
7.	Perspectives pour le développement du S-MDC à électrodes intégrées.....	115
7.1.	Mesures expérimentales avec les S-MDCs à électrodes intégrées	115
7.2.	Optimisation du système de détection	115
7.3.	Interrogation à distance du S-MDC à électrodes intégrées	116
	Conclusions	117
	Bibliographie	118

Chapitre 2

Intégration d'un système de détection des cellules capturées

Éléments de contexte

Dans la perspective de développer une nouvelle génération de dispositifs capables de caractériser la capture *in situ*, nous cherchons à intégrer une mesure de la population cellulaire retenue sur la membrane filtrante du S-MDC lors de son exposition au flux sanguin.

Des spécifications doivent être respectées pour l'intégration d'un système de mesure aux S-MDCs de façon à ne pas altérer leur fonction première d'isolement de cellules tumorales. Le système doit en premier lieu **maintenir la viabilité cellulaire**, il est primordial d'éviter la détérioration des cellules capturées de façon à ne pas compromettre l'analyse biologique ultérieure. Par ailleurs, l'intégration du système de mesure ne doit pas impacter l'efficacité de capture. Pour cela, il est important **d'éviter la perturbation du flux au voisinage du S-MDC** et de **minimiser l'encombrement** de la membrane filtrante.

Nous avons identifié la mesure des **propriétés diélectriques** de l'environnement en contact avec la surface de la membrane filtrante comme piste potentielle de réponse à la problématique de caractérisation de la capture *in situ*. Par l'intégration d'un circuit électrique comportant un dipôle au niveau des pores de la membrane filtrante, il serait possible de détecter la présence de cellules retenues sur cette membrane filtrante au travers de la mesure des variations de l'impédance de ce dipôle. L'ambition du projet est donc l'intégration de microélectrodes à la membrane filtrante pour la détection en temps réel de la présence de cellules au sein des S-MDCs par impédancemétrie. Cette mesure étant électrique et potentiellement intégrable au S-MDC, elle pourrait donc être effectuée *in situ*, lors de l'exposition au flux sanguin, de façon à caractériser et suivre la population cellulaire capturée au cours du temps.

L'objectif est donc l'intégration d'un biocapteur pour permettre l'évolution des S-MDCs vers des dispositifs **électrosensibles**, capables de détecter les cellules biologiques capturées en exploitant leurs propriétés diélectriques spécifiques. Dans un premier temps, la mesure permettrait la **détection de l'obstruction** progressive de la membrane filtrante afin de pouvoir ajuster la durée de la capture et de l'interrompre lorsque la membrane est saturée. Plus ambitieusement, la mesure pourrait permettre le **dénombrement des cellules capturées** sur la membrane filtrante, voire la **discrimination** entre des cellules tumorales piégées et des cellules sanguines saines potentiellement retenues par la membrane.

Que ce soit la détection d'obstruction, l'énumération ou la discrimination de différents types cellulaires, ces informations sont précieuses pour l'introduction des S-MDCs en routine clinique. En effet, communiquées en temps réel, ces informations participeront à la mise en place d'un protocole d'utilisation précis, nécessaire pour entrer dans le cadre des exigences et normes cliniques pour la mise en vigueur du dispositif médical. L'information sur l'obstruction de la membrane filtrante est requise pour optimiser le temps d'exposition du S-MDC au flux sanguin et effectuer la capture dans les meilleures conditions. La quantification et discrimination des cellules capturées permettraient d'obtenir instantanément l'information du nombre de cellules tumorales capturées sur un temps d'analyse donné en s'affranchissant d'étapes successives de manipulation des S-MDCs et de caractérisation de la masse tumorale capturée. Cette fonction permettrait d'inscrire les S-MDCs parmi les dispositifs de tests médicaux POC « *Point of Care* », permettant une analyse rapide et à proximité du patient, facilitant ainsi le diagnostic et le suivi du traitement de la pathologie cancéreuse.

1. La détection électrique de cellules tumorales

1.1. Introduction aux propriétés diélectriques

La réponse d'un matériau à un champ électrique est décrite par deux paramètres intrinsèques que sont la conductivité (σ , exprimée en S/m) et la permittivité diélectrique (ϵ , exprimé en F/m). La conductivité d'un milieu traduit sa capacité à conduire le courant électrique avec un minimum de pertes. Pour simplification, nous appellerons simplement *permittivité* la permittivité diélectrique dans la suite du manuscrit. La permittivité décrit les effets de polarisation intervenant dans le milieu en réponse à un champ électrique. Les effets de polarisation s'observent par l'orientation des particules chargées ou des dipôles ainsi que par la création de dipôles induits au sein d'un milieu.

Les relations liant conductivité et permittivité au champ électrique sont les suivantes :

$$\vec{J} = \sigma \vec{E} \quad (1)$$

$$\vec{D} = \epsilon \vec{E} \quad (2)$$

Avec \vec{E} le vecteur champ électrique (exprimé en V/m), \vec{J} le vecteur densité de courant (exprimée en A/m²) et \vec{D} le vecteur induction électrique ou champ de déplacement électrique (exprimé en C/m²). La permittivité est définie par le produit suivant :

$$\epsilon = \epsilon_0 \epsilon_r \quad (3)$$

Où ϵ_0 correspond à la permittivité du vide ($8,85 \cdot 10^{-12}$ F/m) servant de référence pour exprimer la permittivité relative du milieu ϵ_r .

Les matériaux diélectriques sont des milieux sans charges libres, des isolants électriques, qui peuvent être polarisés lorsque soumis à un champ électrique. La polarisation macroscopique du milieu résulte de polarisations à différentes échelles que sont la polarisabilité électronique, ionique, d'orientation et d'interface.

La polarisation d'un milieu diélectrique ne peut pas être directement mesurée mais peut-être étudiée par une mesure de capacité (exprimée en F). La capacité est caractéristique d'un condensateur constitué d'un milieu diélectrique placé entre deux armatures conductrices. Lorsqu'une tension alternative sinusoïdale est appliquée, un condensateur idéal délivre un courant alternatif sinusoïdal en quadrature de phase (déphasage de 90°). Ce courant résulte des cycles de charge et décharge du condensateur. Pour un condensateur idéal de géométrie planaire (plans des électrodes supposés infinis), dont les armatures sont parallèles et séparées par une distance d (exprimée en m) avec une surface en regard A (exprimée en m²), la capacité proportionnelle à la permittivité du milieu diélectrique est donnée par la relation suivante :

$$C = \epsilon \frac{A}{d} \quad (4)$$

Cette capacité dans les cas pratiques s'avère dépendre de la fréquence du champ exciteur. Cette dépendance ne pouvant se traduire par une variation de la géométrie du système (A et d) elle trouve son origine dans la variation de la permittivité avec la fréquence. Ainsi, la dispersion diélectrique traduit la dépendance de la permittivité d'un matériau diélectrique à la fréquence du champ électrique appliqué et son étude permet la caractérisation des propriétés de polarisation de ce matériau. Lorsqu'un champ électrique est appliqué, la polarisation du milieu présente un retard par rapport au champ électrique alternatif par effet de causalité. Ce retard induit des pertes énergétiques. Pour cette

raison, la permittivité est décrite comme une fonction complexe dépendant de la fréquence f du champ électrique appliqué :

$$\varepsilon_r^*(f) = \varepsilon_r'(f) - i\varepsilon_r''(f) \quad (5)$$

La partie réelle de la permittivité $\varepsilon_r'(f)$ correspond à un stockage d'énergie dans le matériau diélectrique et la partie complexe $\varepsilon_r''(f)$ traduit des dissipations d'énergie. Aux basses fréquences ($< 1\text{GHz}$), des phénomènes de relaxation responsables des pertes d'énergie sont observés. Ils concernent principalement les polarisations d'orientation et d'interface. Le modèle de la relaxation dipolaire a été introduit par le physicien Peter Debye (1913). Selon ce modèle, la relaxation se manifeste par une augmentation de la partie imaginaire ε_r'' et une diminution de la partie réelle ε_r' , correspondant à une réduction de la capacité du matériau à se polariser et donc stocker de l'énergie. La perte d'énergie liée aux phénomènes de relaxation est indiscernable de celle liée à la conduction des charges libres quantifiée par la conductivité σ . Les matériaux peuvent être classés selon une comparaison entre les valeurs des parties réelles et complexes de leurs permittivités, ou de façon équivalente par leurs conductivités. Des matériaux diélectriques parfaits, c'est-à-dire ne présentant pas de pertes, présentent un ratio $\varepsilon_r''/\varepsilon_r'$ proche de 0. Lorsque le ratio est très inférieur à 1, le milieu est faiblement conducteur et est qualifié de bon diélectrique, c'est un matériau qui présente de faibles pertes. Au contraire lorsque le ratio est très supérieur à 1, le milieu est un bon conducteur et présente de faibles propriétés diélectriques induisant des pertes importantes d'énergie. L'angle de perte δ est utilisé pour exprimer la qualité d'un matériau diélectrique. La tangente de cet angle est définie comme le ratio de la composante avec pertes à la composante sans pertes de la permittivité à une pulsation ω donnée ($\omega = 2\pi f$) :

$$\tan\delta = \frac{\omega\varepsilon_r'' + \sigma}{\omega\varepsilon_r'} \quad (6)$$

Ce paramètre est souvent référencé pour les matériaux diélectriques utilisés dans le domaine des hyperfréquences. Un matériau avec de bonnes propriétés diélectriques présentant de faibles pertes possède un angle de perte $\delta \ll 1$ et $\tan\delta \approx \delta$. La tangente de l'angle de perte est aussi qualifiée de facteur de pertes et son inverse parfois qualifiée de facteur de qualité. Dans le cas où le matériau présente des pertes importantes et dans lequel le courant de conduction ne peut pas être négligé, la permittivité complexe peut être exprimée comme suit :

$$\varepsilon_r^* = \varepsilon_r - i\frac{\sigma}{\omega} \quad (7)$$

1.2. Caractérisation électrique des cellules biologiques

1.2.1. Description biologique simplifiée

Les cellules eucaryotes des tissus biologiques sont composées de nombreux organites et, par opposition aux cellules procaryotes, elles possèdent un noyau compartimenté enveloppé d'une membrane nucléaire. Le diamètre des cellules eucaryotes est compris entre 10 et 100 μm ¹. Dans la suite du manuscrit, nous ne considérerons que des cellules eucaryotes que nous appelons simplement *cellules*. Une cellule est constituée d'une membrane plasmique qui sépare les milieux intra et extracellulaire. Le contenu de la cellule, appelé cytoplasme, est composé à 80% d'eau², de sels minéraux et d'organites permettant d'assurer les fonctions de la cellule. Le noyau de la cellule contient l'information génétique contenue dans les molécules d'acide désoxyribonucléique (ADN). Parmi les organites présentant des rôles importants, les mitochondries stockent et produisent l'énergie

nécessaire pour le fonctionnement de la cellule, l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique stockent et sécrètent les protéines et les lysosomes sont acteurs de la digestion cellulaire.

La membrane plasmique est constituée d'une bicouche lipidique de phospholipides d'une épaisseur entre 4 et 10 nm³. Les protéines transmembranaires traversent la bicouche lipidique et certaines forment des canaux étroits pour la circulation d'eau ou d'ions.

Cette architecture complexe rend la modélisation des propriétés électriques d'une cellule particulièrement délicate. Cependant, il est possible de décrire grossièrement la cellule comme un matériau diélectrique présentant des pertes. Ainsi, l'analyse de la dispersion diélectrique au sein d'un milieu contenant des cellules s'est avéré un moyen expérimental de prédilection dans ce domaine. Les études biophysiques portant sur les propriétés électriques de la matière vivante se sont donc rapidement orientées vers l'acquisition de données expérimentales.

1.2.2. Propriétés électriques explorées à partir de mesures d'impédance

Les propriétés électriques des cellules et tissus biologiques sont étudiées depuis le début du XX^{ème} siècle. Rudolf Höber (1910) fut le premier à mesurer l'impédance électrique d'érythrocytes (globules rouges) jusqu'à des fréquences de 10 MHz⁴. Les mesures se traduisant par une baisse d'impédance avec une augmentation de la fréquence, ces travaux ont fait émerger le premier modèle électrique de la cellule dominé par une mince membrane isolante enveloppant un milieu intracellulaire (le cytoplasme) conducteur et par conséquent un comportement de type capacitif. Hugo Fricke (1925) détermine pour la première fois la capacité spécifique de la membrane plasmique d'érythrocytes en suspension⁵. La valeur obtenue de 8,1 mF/m² lui permet, en faisant l'hypothèse d'une permittivité relative $\epsilon_r = 3$, d'estimer l'épaisseur de la membrane plasmique à 3,3 nm.

L'approche classique dans l'étude électrique des cellules biologiques consiste généralement à travailler sur une suspension comprenant un grand nombre de cellules, et à extraire les propriétés électriques de ces cellules à partir d'une mesure sur le système global moyennée sur la population cellulaire étudiée. La permittivité des cellules en suspension peut être décrite à l'aide de la théorie des mélanges de Maxwell Garnett⁶ établissant le lien entre la permittivité équivalente d'une suspension homogène de particules et la permittivité d'une particule individuelle comme suit :

$$\tilde{\epsilon}_{mix} = \tilde{\epsilon}_m \frac{1 + 2\Phi\tilde{f}_{CM}}{1 - \Phi\tilde{f}_{CM}} \quad (8)$$

Avec, $\tilde{\epsilon}_{mix}$ la permittivité complexe du mélange, $\tilde{\epsilon}_m$ la permittivité complexe du milieu contenant les particules, Φ la fraction volumique de particules par rapport au milieu de suspension et \tilde{f}_{CM} , le facteur de Clausius-Mossotti. Cette relation est valable pour une fraction volumique des cellules inférieure à 10%⁷. Le facteur de Clausius-Mossotti est un coefficient traduisant la différence de polarisation sous l'effet d'un champ électrique appliqué entre une particule et le milieu dans lequel elle est placée. Ce facteur est défini pour une particule diélectrique homogène et sphérique par la relation suivante :

$$\tilde{f}_{CM} = \frac{\tilde{\epsilon}_p - \tilde{\epsilon}_m}{\tilde{\epsilon}_p + 2\tilde{\epsilon}_m} \quad (9)$$

Avec $\tilde{\epsilon}_p$ la permittivité complexe de la particule. Si la particule est plus polarisable que le milieu ($\tilde{\epsilon}_p > \tilde{\epsilon}_m$) les lignes de champ la traversent, dans le cas contraire ($\tilde{\epsilon}_p < \tilde{\epsilon}_m$), les lignes de champ contournent la particule⁸.

Kenneth S. Cole introduit en 1940 un modèle simplifié de la cellule dit modèle à deux éléments (en anglais *single shell*), qui ne tient compte que des propriétés de la membrane plasmique et du

cytoplasme. Il propose le modèle d'élément d'impédance à phase constante afin de modéliser électriquement la membrane plasmique se comportant comme un condensateur imparfait ⁹ (voir 1.2.4). La première mesure électrique sur une cellule unique a été réalisée par Howard J. Curtis et Kenneth S. Cole en 1937 ¹⁰.

Herman Schwan (1957) a été un pionnier de l'étude du spectre diélectrique sur une large gamme de fréquence et a notamment caractérisé des suspensions de cellules et des tissus biologiques jusqu'à des fréquences de 1GHz ¹¹. Il a identifié les principales dispersions α , β et γ décrivant la dépendance en fréquence des propriétés diélectriques des tissus biologiques et des suspensions de cellules. Ces types de dispersion sont présentées dans la **Figure 1a**.

- La dispersion α se manifeste aux basses fréquences jusqu'à quelques kilohertz. Lorsqu'un champ électrique est appliqué, une diffusion ionique apparaît à la surface de la membrane plasmique. La membrane plasmique présente un comportement capacitif qui empêche le courant électrique d'atteindre le milieu intracellulaire.

- La dispersion β se manifeste dans la gamme de fréquence 500 kHz - 20 MHz. Cette dispersion est principalement due à la polarisation de la membrane plasmique. Cette dispersion est reconnue comme liée à la relaxation Maxwell-Wagner à l'interface de la membrane cellulaire. La relaxation Maxwell-Wagner est liée à une polarisation d'interface typique des milieux diélectriques hétérogènes. A ces fréquences, la membrane plasmique ne se comporte plus comme un isolant, le courant électrique peut la traverser et circuler dans le milieu intracellulaire.

- La dispersion γ se manifeste dans la gamme des micro-ondes (1 GHz à 300 GHz). Cette dispersion est due à la présence d'eau dans les cellules. L'orientation dipolaire des molécules d'eau se relaxe à 20 GHz. A ces fréquences, la membrane plasmique est électriquement transparente et donne accès au milieu intracellulaire.

Ainsi, nous pouvons noter que les propriétés diélectriques de la membrane plasmique prédominent sur les propriétés électriques du reste de la cellule aux basses fréquences. Celle-ci se comporte comme un isolant empêchant le courant de pénétrer l'intérieur de la cellule. Lorsque la fréquence augmente, les effets isolants de la membrane plasmique diminuent. A haute fréquence, les propriétés conductrices du milieu intracellulaire prédominent (voir **Figure 1b**).

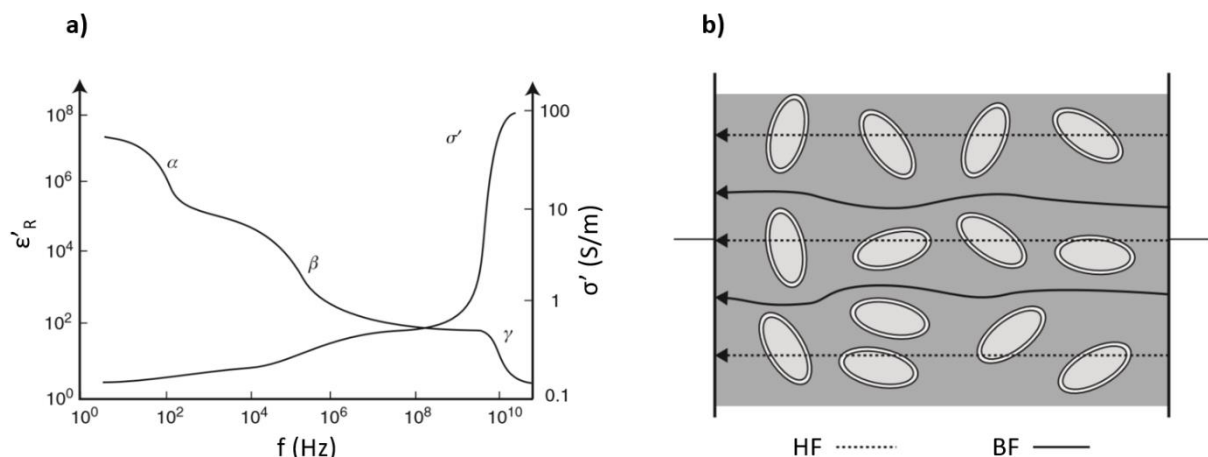


Figure 1 Réponse des tissus biologiques en fonction de la fréquence de l'excitation électrique appliquée. a) Evolution de la partie réelle de la permittivité relative (ϵ'_R) et de la conductivité (σ'_R) en fonction de la fréquence et mise en évidence des dispersions α , β , γ . b) Illustration du comportement des lignes de courant à basse et haute fréquences, les cellules sont symbolisées par des ellipses entourées d'une bicouche. Représentations a) et b) extraites d'une revue par G. Martisen et S. Grimnes ¹².

A la fin des années 1990, une base de données a été mise en place répertoriant les propriétés électriques de conductivité et permittivité de différents tissus humains et animaux dans une gamme de fréquence de 10 Hz à 20 GHz à température ambiante en utilisant des analyseurs d'impédance ¹³.

1.2.3. Propriétés diélectriques de différents types cellulaires

La variabilité des propriétés diélectriques entre différents types cellulaires a été mise en évidence par des techniques d'électrocinétique telles que l'électro-rotation (ROT) ou la diélectrophorèse (DEP) (voir 1.3.1). Ces techniques étudient le mouvement de particules dans les champs électriques. Elles ont été largement utilisées à partir des années 1980 pour déterminer les propriétés diélectriques de cellules biologiques ^{3,14,15}. Ces méthodes sont sensibles aux propriétés diélectriques spécifiques des différents types cellulaires et ont permis la comparaison des propriétés diélectriques entre cellules saines et tumorales notamment. Frederick F. Becker et ses collègues (1994) ont utilisé l'électro-rotation pour mettre en avant les différences significatives entre propriétés diélectriques de cellules appartenant à la lignée cellulaire de cancer du sein MDA231 et de cellules sanguines saines en termes de capacité spécifique de la membrane plasmique. Les valeurs rapportées sont $26 \pm 4,2$ mF/m², $11 \pm 1,1$ mF/m² et $9 \pm 0,8$ mF/m² pour les cellules MDA231, lymphocytes T et erythrocytes respectivement ¹⁶.

Des travaux plus récents décrivent les corrélations entre propriétés diélectriques et morphologie de la membrane plasmique ¹⁷. Une comparaison est effectuée entre les résultats issus d'une technique électrocinétique combinant forces diélectrophorétique, hydrodynamique et de sédimentation (en anglais *Dielectrophoretic-field flow fractionation*, DEP-FFF) et la caractérisation de la morphologie de la cellule par microscopie électronique. De façon très pertinente au regard du sujet de cette thèse il a été montré que les propriétés diélectriques de cellules issues de lignées tumorales diffèrent de celles des cellules sanguines. En effet, la membrane plasmique des cellules tumorales présente une surface caractérisée par des structures de plis et microvillosités. En tenant compte d'une surface idéale sphérique pour modéliser les cellules, cette morphologie particulière des cellules tumorales est décrite par une capacité spécifique (exprimée en F/m²) plus importante que celle de cellules de taille similaire présentant une membrane lisse. Les propriétés diélectriques d'un large panel de cellules NCI-60[‡] ont ainsi été caractérisées. La capacité totale de la membrane plasmique des lignées de cellules tumorales varie mais est constamment plus élevée que celle des cellules sanguines. Le **Tableau 1** présente des exemples de mesures de capacité spécifique de la membrane plasmique et de la capacité totale correspondante pour une cellule qui sont rapportées dans cette étude.

Une autre étude a mis en avant la corrélation entre le caractère tumorigène et les propriétés diélectriques de cellules souches cancéreuses ¹⁸. L'étude a été menée sur une lignée de cellules de carcinome à cellules squameuses oral (en anglais *oral squamous cell carcinoma*, OSCC). Il est apparu que les cellules au plus fort potentiel tumorigène possèdent davantage de filopodes à la surface de leur membrane plasmique et présentent une capacité totale de membrane plus importante.

Ainsi lorsque des cellules de lignées tumorales sont comparées aux cellules sanguines, leur capacité totale membranaire est plus importante. Ceci résulte à la fois d'un effet de taille mais également d'un effet d'augmentation de la capacité spécifique résultant d'une différence morphologique de la membrane plasmique. La transposition directe de ce résultat à des cellules tumorales circulantes ayant quitté *in vivo* la tumeur primaire par intravasation serait hasardeuse mais laisse néanmoins entrevoir une potentialité de discrimination intéressante. En effet, des études ont

[‡] Le panel de lignées cellulaires NCI-60 regroupe 60 lignées cellulaires tumorales humaines utilisées par l'institut national du cancer (en anglais *National Cancer Institute*, NCI, institut américain de recherche contre le cancer) pour l'étude de substances présentant un potentiel thérapeutique.

mis en avant la présence de protrusions membranaires, les micro-tentacules, à la surface de la membrane plasmique de cellules tumorales circulantes qui contribueraient au processus métastatique¹⁹⁻²¹. Nous pouvons donc imaginer, que de la même façon que cela a été démontré pour les cellules issues de lignées tumorales, cette morphologie particulière résulterait en une capacité totale de membrane très supérieure à celle de cellules sanguines saines.

	Cellule	Capacité spécifique membranaire (mF/m ²)	Capacité totale de la membrane (pF)	Méthode
Cellules sanguines	Erythrocyte	9 ± 0,8	0,9 ± 0,1	ROT
	Lymphocyte B	12,6 ± 3,5	1,7 ± 0,5	ROT
	Neutrophil	9,8 ± 0,1	2,0 ± 0,0	DCO
	Monocytes	15,3 ± 4,3	4,1 ± 1,2	ROT
Cellules tumorales	MCF7	22,2 ± 3,6	23 ± 3,8	DEP-FFF
	SKOV-3	19,7 ± 3,3	27 ± 4,5	DEP-FFF
	K-562	20,9 ± 5,2	9,1 ± 2,3	DEP-FFF
	PC3	22,4 ± 3,7	37 ± 6,1	DEP-FFF

Tableau 1 Capacités membranaires spécifiques et totales déterminées par électro-rotation (ROT), diélectrophorèse (Dielectrophoretic Crossover, DCO) ou fractionnement d'écoulement par diélectrophorèse (DEP-FFF)¹⁷. Les érythrocytes sont des globules rouges, les lymphocytes B, granulocytes, et monocytes sont différents types de leucocytes ou globules blancs. MCF7 est une lignée cellulaire de cancer du sein, SKOV-3 est une lignée cellulaire de cancer de l'ovaire, K-562 est une lignée cellulaire de leucémie, PC3 est une lignée cellulaire de cancer de la prostate. Notez que la lignée K-562 n'est pas d'origine épithéliale.

1.2.4. Modèles électriques simplifiés

Le modèle électrique de la cellule biologique apparaît sous diverses formes dans la littérature. Il est plus ou moins complexifié selon le nombre d'éléments constitutifs de la cellule biologique apparaissant dans le modèle et leurs couples de propriétés électriques (permittivité, conductivité) pris en compte. On distingue ainsi des modèles multi éléments (qualifiés en anglais de *multishell*) prenant en compte les propriétés électriques de la paroi cellulaire, de la membrane plasmique, du cytoplasme³ (voir **Tableau 2**) et jusqu'aux propriétés du noyau²². Le modèle à deux éléments (qualifié en anglais *single shell*) tient seulement compte des propriétés électriques de la membrane plasmique et du cytoplasme. Très souvent, la résistance de la membrane plasmique très élevée est négligée ainsi que la capacité du cytoplasme, devant sa conductivité élevée. Ainsi, selon le modèle à deux éléments, les deux composants électriques représentant la cellule biologique sont la capacité de sa membrane (liée à la partie réelle de la permittivité) et la résistance du cytoplasme (liée à la conductivité ou à la partie imaginaire de la permittivité).

	Conductivité σ S/m	Permittivité relative ϵ_R
Enveloppe nucléaire	0,01 - 1	60
Membrane plasmique	10^{-8} - 10^{-4}	2 - 10
Cytoplasme	2 - 10	50 -120

Tableau 2 Conductivité et partie réelle de la permittivité relative des éléments constitutifs de la cellule biologique selon le modèle « multi-couche » extraites de la revue par G. H. Markx et C. L. Davey³.

Les modèles de Fricke et Cole ont été proposés dans la première partie du 20^{ème} siècle afin de décrire le comportement des tissus biologiques soumis à des champs électriques alternatifs. Ces modèles sont largement utilisés dans la littérature pour commenter la caractérisation électrique des cellules et tissus biologiques. Pour ces deux modèles, la cellule biologique est représentée comme une bicouche constituée d'une membrane capacitive et du cytoplasme résistif. Ces deux modèles sont illustrés dans la **Figure 2**.

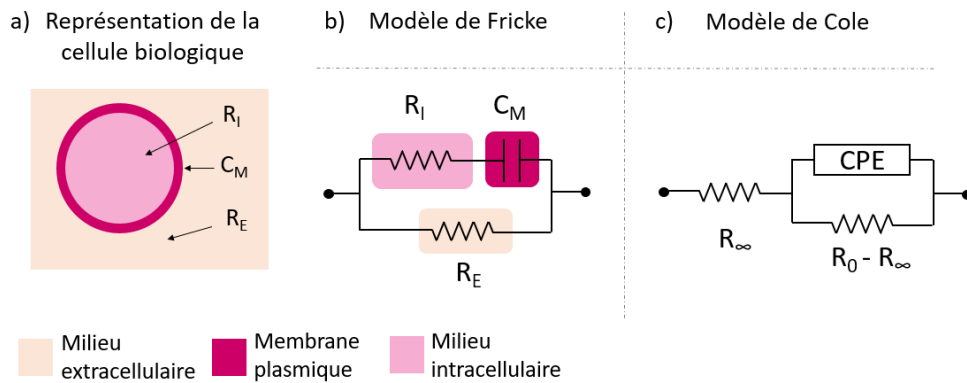


Figure 2 Modélisation électrique de la cellule biologique. a) Représentation de la cellule à deux éléments, en considérant seulement la capacité de membrane et la résistance du cytoplasme. b) Schémas électriques équivalents de Fricke. c) Modèle électrique équivalent de Cole.

- Le modèle de Fricke

Hugo Fricke (1925) a développé une théorie de l'impédance (voir définition section 1.3.2) des suspensions de particules diélectriques sphériques modélisant le comportement des cellules dans un milieu extracellulaire qui est un électrolyte. Cette théorie a abouti à un modèle traduisant le comportement électrique de la cellule biologique dans la gamme de fréquences 1 kHz - 1 MHz²³. L'impédance de la cellule est constituée de deux résistances R_E et R_I qui représentent les résistances des milieux extra et intracellulaires respectivement. Une capacité C_M en parallèle avec la résistance R_E traduit le comportement capacitif de la membrane plasmique (voir **Figure 2a** et **2b**).

Selon ce modèle, le courant ionique contourne la cellule en passant par le milieu extracellulaire à basse fréquence. Avec l'augmentation de la fréquence, la membrane plasmique représentée par la capacité C_M est court circuitée et le courant ionique traverse alors les canaux ioniques de celle-ci et circule alors à l'intérieur de la cellule. L'expression de l'impédance correspondant à ce modèle est la suivante :

$$Z_{cellule}(\omega) = R_e \frac{1 + iR_I C_M \omega}{1 + i(R_I + R_E) C_M \omega} \quad (10)$$

Ce modèle comportant une capacité pure indépendante de la fréquence s'est montré satisfaisant pour la description des propriétés électriques de suspensions de globules rouges²³. En revanche d'autres tissus biologiques, dont la plupart des tissus humains, présentant des comportements plus complexes n'ont pas pu être représentés avec succès par ce modèle. En effet les tissus biologiques présentent un comportement dépendant de la fréquence et ne peuvent donc pas être représentés par un modèle dans lequel la permittivité est supposée constante. Ceci est dû aux différents constituants présentant des caractéristiques hétérogènes, le milieu extracellulaire, la membrane plasmique et les différents organites contenus dans le milieu intracellulaire qui contribuent chacun à l'impédance totale.

- Le modèle de Cole

Kenneth S. Cole propose dans ses travaux (1940) un modèle de la cellule biologique tenant compte de la dispersion de la permittivité. Dans un milieu diélectrique, le phénomène de relaxation dipolaire se produisant à basse fréquence a été décrit par Peter Debye (1929) comme suit :

$$\varepsilon = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + i\omega\tau} \quad (11)$$

Avec ε_0 et ε_∞ les permittivités à fréquence nulle et infinie respectivement et τ le temps de relaxation. Cette relation est valable pour des dipôles libres sans interaction mutuelle. Dans le cas où le milieu présente des interactions entre dipôles ou ions, comme c'est le cas dans le matériel biologique, Kenneth S. Cole se base sur le modèle de Debye pour décrire la permittivité comme suit :

$$\varepsilon = \varepsilon_\infty + \frac{\varepsilon_0 - \varepsilon_\infty}{1 + (i\omega\tau)^{1-\alpha}} \quad (12)$$

Avec α variant entre 0 et 1. Dans le cas où $\alpha = 0$, la relation correspond à celle du modèle de relaxation dipolaire de Debye. En posant $n = 1 - \alpha$, cette formulation se traduit par une association de composants électriques dont l'un d'entre eux présente une impédance de la forme :

$$Z_{CPE} = K(i\omega)^{-n} \quad (13)$$

Avec K est une constante correspondant au module de l'impédance exprimée en Ωs^{-n} et n un exposant compris entre 0 et 1. Cette impédance est appelée élément d'impédance à phase constante (en anglais *constant phase element*, CPE). La phase constante est $\theta_{CPE} = -\pi n/2$. Le cas $n = 1$ décrit un condensateur idéal et l'inverse de la constante K est alors une capacité. Le cas $n = 0$ décrit une résistance pure de valeur K. Ce composant électrique caractérise le comportement de condensateurs imparfaits utilisés pour modéliser électriquement la membrane plasmique des cellules biologiques ou d'une double couche électrique se formant à l'interface électrode électrolyte (voir 1.3.3). Ainsi, dans le cas de la membrane plasmique, la capacité de la membrane n'est plus considérée constante, elle varie en fonction d'une puissance de la fréquence.

Selon l'approche du modèle de Cole, le circuit équivalent représentant la cellule biologique du modèle de Fricke est modifié en remplaçant le condensateur modélisant la membrane plasmique par un élément à phase constante (voir **Figure 2c**). L'impédance décrivant le comportement d'une cellule biologique proposée est alors :

$$Z_{cellule}(\omega) = R_\infty + \frac{R_0 - R_\infty}{1 + (i\omega\tau)^n} \quad (14)$$

Avec R_0 et R_∞ les résistances à fréquences nulle et infinie respectivement et τ la constante de temps, définie par la relation :

$$\tau = \left(\frac{R_0 - R_\infty}{K} \right)^{\frac{1}{n}} \quad (15)$$

Les modèles de Fricke et Cole sont équivalents lorsque $n=1$. Dans ce cas-là, l'égalité entre les deux impédances donne :

$$R_0 = R_E \quad (16)$$

$$R_\infty = \frac{R_E R_I}{R_E + R_I} \quad (17)$$

$$\tau = (R_E + R_I) * C_M \quad (18)$$

Les termes R_0 , R_∞ et τ peuvent donc être identifiés par rapport aux composantes électriques du modèle de Fricke associés au milieu intra et extracellulaires et à la membrane plasmique. En revanche, le terme n n'a pas de signification physiologique concrète. Ce modèle est de nature descriptive, et ne permet pas de corrélation aux constituants physiologiques.

1.3. La spectroscopie d'impédance

1.3.1. La spectroscopie d'impédance parmi les techniques de caractérisation électrique de la cellule biologique

Différentes méthodes sont utilisées pour déterminer les propriétés diélectriques d'une suspension de cellules et des tissus biologiques de façon non invasive. Les propriétés diélectriques sont généralement étudiées par spectroscopie d'impédance (aussi qualifiée de spectroscopie diélectrique) ou par des techniques électrocinétiques.

Les techniques électrocinétiques utilisées pour déterminer les propriétés diélectriques des cellules sont la diélectrophorèse (DEP) et l'électro-rotation (ROT). La diélectrophorèse consiste en l'étude du mouvement de particules polarisées évoluant dans un champ électrique non uniforme. L'électro-rotation se manifeste par la rotation de particules polarisées soumises à des champs électriques tournants. L'extraction de la fréquence caractéristique de DEP (celle marquant l'inversion de la direction du mouvement) est liée à la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti alors que l'étude du spectre en fréquences des propriétés d'électro-rotation dépend de sa partie imaginaire. Ces deux techniques permettent de déterminer les propriétés diélectriques de cellules biologiques ²⁴.

Comme nous l'avons vu précédemment ces mesures électrocinétiques ont permis de caractériser les propriétés diélectriques de différents types cellulaires et notamment, de comparer les propriétés diélectriques de cellules de lignées tumorales à celles des cellules sanguines (voir **Tableau 1**). Ces techniques requièrent une manipulation des cellules biologiques par un champ électrique et présentent de ce fait des temps de mesure relativement longs. Typiquement, une acquisition d'électro-rotation prend plusieurs secondes par cellule ⁶. Notons que la DEP est aussi largement mise en œuvre couplée à des dispositifs fluidiques pour la manipulation des cellules biologiques et le tri cellulaire ^{25,26}.

La spectroscopie d'impédance permet d'effectuer une mesure plus rapide et moins invasive que les méthodes électrocinétiques et la mesure de l'impédance contient les informations sur les propriétés diélectriques complexes de l'élément étudié. Cependant, la mesure d'impédance est une mesure globale du système entre les paires d'électrodes et dépend fortement de la géométrie de ces électrodes et de la chambre contenant l'élément à étudier. Il est donc nécessaire de confronter les résultats à une analyse numérique ou analytique afin d'extraire les propriétés diélectriques de l'élément analysé. L'entité biologique étant généralement une structure complexe du point de vue électrique, l'enjeu est d'établir un modèle se rapprochant au maximum de la réalité afin d'interpréter correctement les résultats de spectroscopie d'impédance. Cette technique a d'abord été appliquée à des systèmes comportant un nombre important de cellules en suspension. Récemment avec l'évolution de l'instrumentation couplées au développement de la microfluidique, des systèmes de mesures ont été mis au point pour la mesure de propriétés diélectriques de cellules à l'échelle unique et à haute vitesse.

1.3.2. Principe de la spectroscopie d'impédance

La spectroscopie d'impédance ou spectroscopie diélectrique, impédancemétrie, ou encore bio-impédancemétrie lorsqu'elle est employée pour l'étude d'entités biologiques, est utilisée pour la caractérisation électrique des tissus biologiques ou suspensions de cellules sujets à une excitation électrique alternative de faible amplitude. Le principe est la mesure directe des propriétés électriques de l'échantillon en explorant la relation entre courant et tension par le biais d'électrodes. L'impédance complexe du système $\underline{Z}(w)$ (exprimée en Ω) est définie par la loi d'Ohm généralisée :

$$\underline{Z}(\omega) = \frac{U(\omega)}{I(\omega)} = Z_{RE} + iZ_{IM} \quad (19)$$

Avec Z_{RE} et Z_{IM} les parties réelles et imaginaires de l'impédance complexe respectivement. La partie réelle est appelée résistance et la partie imaginaire est appelée réactance. Si la réactance est positive, le système est de type inductif, si elle est négative, le système est de type capacitif, si elle est nulle, le système est purement résistif.

Le module et la phase de l'impédance complexe sont exprimés comme suit :

$$|Z| = \sqrt{Z_{RE}^2 + Z_{IM}^2} \quad (20)$$

$$\varphi = Arg(Z) = \arctan\left(\frac{Z_{IM}}{Z_{RE}}\right) \quad (21)$$

Dans un modèle empirique très simplifié où l'on assimile le matériel biologique à un milieu homogène, la mesure de l'impédance permet d'identifier la partie réelle de l'impédance complexe à une résistance R et la partie imaginaire à une capacité C (exprimée en F), les phénomènes inductifs étant absents au sein des tissus et des cellules biologiques ⁴. L'impédance est alors exprimée comme suit :

$$\underline{Z}(\omega) = R + \frac{1}{i\omega C} \quad (22)$$

La conductance G (exprimée en S) correspond à l'inverse de la résistance R (exprimée en Ω) et est liée à la conductivité σ du milieu global sondé. La capacité est quant à elle liée à la permittivité de ce même milieu. Lorsqu'une spectroscopie d'impédance est effectuée sur des entités biologiques, la complexité des tissus et des cellules avec les nombreux composants dont ils sont constitués (organites, membrane, cytoplasme, matrice extra cellulaire, etc...) rend cette description moyenne par un milieu homogène très vite limitative. Les propriétés électriques de ces différents composants n'étant pas mesurées directement, il faut avoir recours à des modélisations simplifiées du système et de leurs paramètres afin d'extraire des paramètres électriques propres aux entités. Les modèles tels que celui de Fricke ou de Cole sont un premier pas dans cette démarche. Notons qu'il faut également modéliser tout l'environnement électrique autour du matériel biologique (résistance des électrodes, résistances de contact, capacité des doubles couches, capacités de couplage, conductivité du substrat etc...). Moyennant l'ensemble de ces modélisations du matériel biologique sondé et de l'environnement de mesure, la réponse en impédance du système relativement à la fréquence du champ électrique appliqué fait apparaître des caractéristiques particulières de l'échantillon biologique analysé et permet ainsi d'obtenir une information de nature biologique à partir de ces mesures électriques.

Les mesures peuvent être effectuées dans le domaine fréquentiel ou dans le domaine temporel grâce à l'analyse de Fourier. Le système peut ainsi être excité avec un signal sinusoïdal contenant une seule composante fréquentielle pendant un temps donné, puis un balayage peut être effectué en fréquences qui peut être linéaire ou logarithmique. Cette technique peut être chronophage en fonction de la gamme de fréquences choisie pour le balayage et du nombre de périodes effectuées pour chaque fréquence. Cependant elle permet d'obtenir des informations sur l'ensemble du domaine fréquentiel étudié et donc d'obtenir un spectre d'impédance. Le système peut également être excité à l'aide d'un signal contenant de multiples fréquences, l'analyse de Fourier de la réponse temporelle du système permet alors d'obtenir également un spectre d'impédance. Cette technique est intéressante car elle permet d'étudier la réponse d'un système à une combinaison fréquentielle et elle permet aussi de suivre la réponse dynamique du système (évolutive au cours du temps) en observant des variations de la réponse électrique à une excitation toujours identique. La

Figure 3 présente des exemples de représentation d'un signal en domaine fréquentiel et temporel grâce à l'analyse de Fourier.

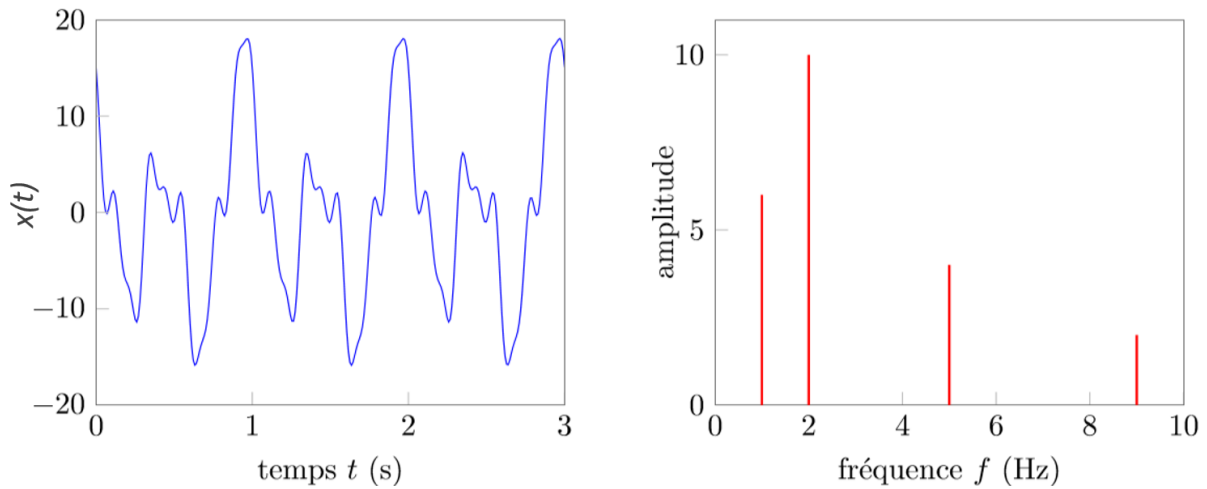


Figure 3 Représentation d'un signal harmonique (à plusieurs fréquences) extraites de S. Kojtych²⁷. a) Représentation temporelle. b) Représentation fréquentielle.

1.3.3. Interface électrode-milieu

Dans le cas de la caractérisation de matériel biologique, le milieu contenant les échantillons d'intérêt est généralement un électrolyte, liquide conducteur contenant des ions mobiles.

- Double couche électrique

De façon spontanée, lorsqu'un solide est en contact avec une solution, sa surface se charge suite aux échanges électroniques s'effectuant entre les atomes de surface et ceux de la solution. Le modèle de la double couche électrique est utilisé afin de décrire la variation du potentiel électrique aux abords d'une surface solide immergée dans un électrolyte. Le modèle électrique initial attribué à Hermann von Helmholtz (1879) se base sur une couche de contre ions attirés par les charges fixes. Ce modèle simple est alors assimilable à un condensateur, les contre-ions adsorbés à la surface écrantant complètement le potentiel électrique des charges de surface. Georges Gouy et David Chapman (1913) font évoluer le modèle en développant le modèle d'une couche de contre ions diffuse liée à l'agitation thermique. Dans ce modèle plus réaliste, le potentiel électrique n'est pas totalement écranté et il décroît alors de façon exponentielle depuis la surface vers la solution. La Figure 4a présente ces deux modèles. Le terme de double couche électrique se réfère à la présence conjointe d'une couche d'ions dense correspondant au modèle initial d'Helmoltz (désormais appelée couche de Stern) et d'une couche d'ions plus diffuse appelée couche de Gouy-Chapman (voir Figure 4b).

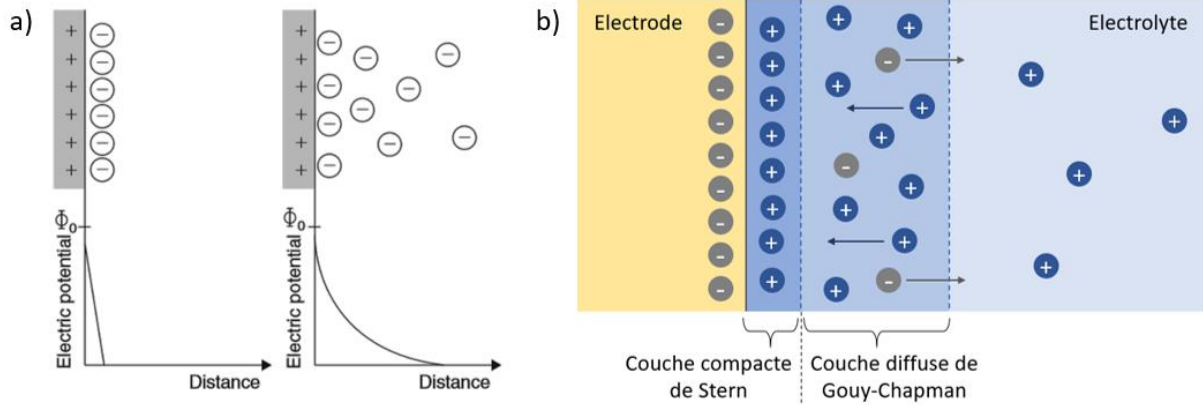


Figure 4 a) Représentations schématiques du modèle d'Helmoltz (gauche) et de Gouy-Chapman (droite) et du potentiel électrique en fonction de la distance de la surface de l'électrode pour chacun des modèles. Schémas extraits de S. Grimnes et O. G. Martinsen¹². b) Représentation schématique de la double couche électrique combinant les deux modèles précédents.

L'épaisseur totale de la double couche électrique constituée d'une couche dense fixe et d'une couche diffuse distinctes est appelée longueur de Debye et est typiquement comprise entre 0,1 et 10 nm²⁸. L'épaisseur de la couche fixe ne dépend pas de la concentration de l'électrolyte contrairement à celle de la couche diffuse²⁹. La relation permettant de calculer la longueur de Debye pour une solution saline monovalente est la suivante* :

$$L_D = \sqrt{\frac{\epsilon_0 \epsilon_r kT}{2n_0(e)^2}} \quad (23)$$

Avec n^0 la concentration en sel de la solution, e la charge élémentaire, z la valence de l'ion en solution, ϵ_r la permittivité relative du milieu, k la constante de Boltzman et T la température en degré Kelvin. La longueur de Debye à température ambiante du tampon phosphate salin PBS (1X), contenant 137 mM de chlorure de sodium, est de 0,7 nm à température ambiante. Cette distance très courte indique que l'épaisseur de la couche diffuse tend vers 0 et que le modèle d'Helmoltz en fournit à ces concentrations ioniques une bonne description. L'ensemble de la double couche peut être électriquement représentée par une capacité C_{DL} (en anglais *double layer capacitance*). La valeur de cette capacité dépend alors de la longueur de Debye L_D et est exprimée comme suit :

$$C_{DL} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{L_D} \quad (24)$$

Où ϵ_r est la permittivité de l'électrolyte, A la surface active de l'électrode (exprimée en m²) et L_D la longueur de Debye (exprimée en m) de l'électrolyte à une concentration donnée. Cette capacité de double couche par unité de surface dans le cas d'un électrolyte typique tel que le PBS (1X) est de l'ordre de 1F/m². Pour une surface d'électrode typique de 100 μm^2 (ordre de grandeur des réalisations présentées dans cette thèse), cela donne une capacité de double couche de 100 pF. Cette valeur doit être comparée aux valeurs de capacité de la membrane plasmique des cellules tumorales de l'ordre de 10 pF (voir **Tableau 1**). Ainsi nous en déduisons que cette capacité jouera un rôle important pour nos dispositifs.

* On suppose ici par souci de simplification une seule espèce saline monovalente en solution (exemple NaCl dans un solvant).

Plutôt que celui du condensateur, un modèle plus approprié pour le comportement électrique de cette interface est celui de l'élément d'impédance à phase constante introduit dans la section 1.2.4. de ce chapitre pour la description du modèle de Cole. La réactance correspondante pour la capacité de double couche électrique est alors la suivante :

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega C_{DL})^n} \quad (25)$$

A noter que C_{DL} exprimé de cette façon n'est pas homogène à une capacité. Le terme n est une constante comprise entre 0 et 1 qui dépend de la nature de la surface de l'électrode et prend en compte sa rugosité notamment. Pour $n=1$, l'impédance de l'élément d'impédance à phase constante correspond à une capacitance. La valeur de C_{DL} apparaissant dans cette expression ne peut donc pas être obtenue par une relation simple de capacité planaire.

La double couche influence le spectre d'impédance obtenu à partir d'une cellule de mesure électrochimique composée de deux électrodes immergées dans un électrolyte²⁹. Le circuit équivalent comporte trois composantes que sont la capacité de double couche C_{DL} , (qui peut être modélisée par un élément à phase constante), la capacité de la cellule de mesure C_M , c'est-à-dire du milieu entre les électrodes, et la résistance de la solution R_S . Le circuit équivalent est présenté **Figure 5a** et le spectre d'impédance correspondant **Figure 5b**. Il a été montré que la capacité de double couche C_{DL} domine la mesure d'impédance à des fréquences inférieures à la fréquence de coupure f_B . A haute fréquence, pour des fréquences supérieures à f_H , la composante C_M domine. Entre les deux fréquences de coupures précédentes, une portion de l'impédance est indépendante de la fréquence car dominée par la résistance de la solution R_S . Les fréquences de coupure correspondantes sont les suivantes :

$$f_B = \frac{1}{R_S C_{DL}} \quad (26)$$

$$f_H = \frac{1}{R_S C_M} \quad (27)$$

Le positionnement de ces fréquences de coupure indique que la valeur de C_{DL} est plus importante que celle de C_M . En effet, la double couche présentant une épaisseur relativement faible de l'ordre du nm résulte en une valeur de capacité élevée en comparaison de la capacité du milieu entre les électrodes coplanaires. Par une corrélation de mesures expérimentales au modèle analytique mis en place, l'étude estime par exemple des valeurs de 938 pF et 0,403 pF pour C_{DL} et C_M respectivement pour une paire de microélectrode coplaire de titane d'épaisseur 220 nm, de longueur 100 μm , de largeur 20 μm et d'espacement de 100 μm pour un électrolyte constitué d'une solution tampon Tris-EDTA communément utilisée en biologie moléculaire²⁹. L'étude montre l'influence de la concentration de l'électrolyte et des géométries d'électrodes (largeur et distance entre les électrodes coplanaires) sur les composantes R_S , C_{DL} , et C_M . Ces facteurs influencent donc les fréquences de coupures f_B et f_H et ainsi les plages de fréquences sur lesquelles les composantes R_S , C_{DL} , et C_M dominent. Les valeurs de C_{DL} et C_M dépendent chacune des paramètres géométriques des microélectrodes en contact avec l'électrolyte. Les relations utilisées pour déterminer les valeurs de ces capacités seront explicitées dans la section de ce chapitre où sont effectués les calculs avec les dimensions des microélectrodes de notre système. Les propriétés diélectriques du milieu entre les électrodes, et donc la détection éventuelle d'une cellule basée sur ses propriétés diélectriques spécifiques, sont ainsi accessibles sur une gamme de fréquence supérieure à f_H et inférieure à 1 MHz pour exploiter les propriétés diélectriques de la membrane plasmique.

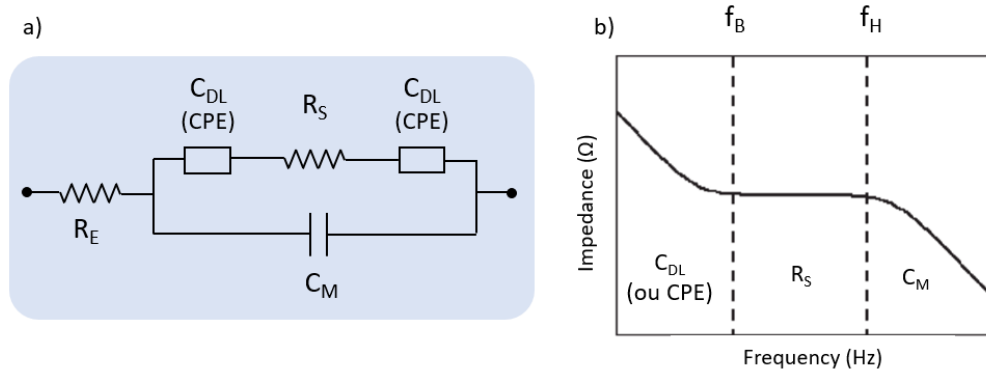


Figure 5 Phénomènes d'interface électrode - électrolyte. a) Circuit équivalent de la double couche électrique avec R_E la résistance des électrodes, C_{DL} la capacité de double couche, R_S la résistance de la solution et C_M la capacité du milieu entre les électrodes. b) Spectre d'impédance illustratif représentant l'influence de C_{DL} , R_S et C_M sur la mesure. a) et b) reproduits de J. Hong et al. ²⁹. Suivant les modèles, C_{DL} peut être modélisée par un condensateur ou un élément d'impédance à phase constante.

1.3.4. Systèmes de mesure

Pour acquérir un spectre d'impédance, l'excitation appliquée peut être une tension $\underline{U}(\omega)$ et le courant $\underline{I}(\omega)$ est alors mesuré, ou inversement l'excitation peut être un courant appliqué à l'échantillon $\underline{I}(\omega)$ et la chute en tension correspondante au travers de l'échantillon est mesurée $\underline{U}(\omega)$. La cellule de mesure pour la spectroscopie d'impédance peut être réalisée selon différentes configurations comprenant généralement 2 à 4 électrodes (voir **Figure 6**). Dans la configuration la plus basique à 2 électrodes, la stimulation électrique et la mesure sont réalisées en utilisant la même paire d'électrodes dont l'une est qualifiée d'électrode de travail (ET) et l'autre de contre électrode (CE). Dans ce cas, la mesure de l'impédance inclut les effets à l'interface échantillon/électrode, notamment ceux liés à la formation d'une double couche électrique, aussi appelé phénomène de polarisation des électrodes. Afin de réduire l'influence des effets d'interface, une 3^{ème} électrode appelée électrode de référence (REF) peut être ajoutée. Dans cette configuration souvent mise à l'œuvre pour les systèmes électrochimiques, l'excitation électrique est appliquée entre l'électrode de travail (ET) et l'électrode de référence (REF), tandis que la réponse est mesurée au niveau de la contre électrode (CE). L'impédance mesurée prend alors seulement compte de l'effet à l'interface entre l'électrode de travail (ET) et l'échantillon. Enfin, pour s'affranchir totalement des effets d'interface, une 4^{ème} électrode peut être ajoutée. L'excitation est appliquée entre l'électrode de travail (ET) et la contre électrode (CE), tandis que la réponse est mesurée entre l'électrode de travail sonde ajoutée (ETS) et l'électrode de référence (REF). Dans ce cas-là, le courant ne traversant pas les électrodes sondes, les effets d'interface sont abolis. Cette dernière configuration permet d'améliorer la précision de la mesure d'impédance. Pour la caractérisation électrique de nos réalisations technologiques nous travaillerons selon un mode à 2 électrodes (voir 4.1).

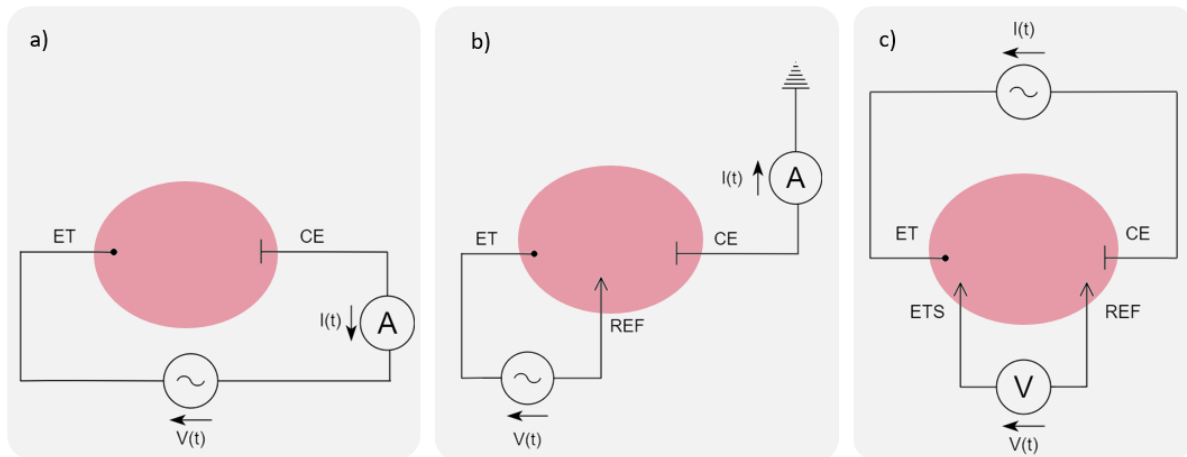


Figure 6 Schéma des différentes configurations d'électrodes pour les mesures de spectroscopie d'impédance. a) Système de mesure à 2 électrodes. b) Système de mesure à 3 électrodes. c) Système de mesure à 4 électrodes. Schéma reproduit de la revue par M. Grossi et B. Riccò ³⁰.

De nos jours, la plupart des explorations menées par spectroscopie d'impédance s'effectuent avec un analyseur d'impédance permettant la stimulation électrique et l'analyse de la réponse en fréquence. Ces équipements fournissent une précision de mesure, de larges gammes de fréquence d'étude et la possibilité de travailler avec les différentes configurations d'électrodes décrites plus haut. Ils sont souvent associés à des logiciels effectuant le traitement des données. De nombreux travaux d'exploration de propriétés électriques de cellules biologiques utilisent des analyseurs d'impédance et l'étude se fait généralement dans le domaine fréquentiel de façon à étudier le comportement électrique sur une large gamme de fréquences ^{13,31-35}. Cependant ce sont des équipements coûteux et relativement volumineux qui en font principalement des outils de laboratoire. Depuis la démocratisation des microcontrôleurs bas coût dans les années 1980, des systèmes portables ont été conçus pour effectuer des mesures de spectroscopie d'impédance. Dans ces systèmes, l'excitation est généralement générée au moyen de convertisseurs numériques-analogiques (en anglais *digital-to-analog converter*, DAC) et la réponse est acquise au moyen de convertisseurs analogiques-numériques (en anglais *analog-to-digital converter*, ADC) ³⁶⁻³⁸. L'instrumentation peut aussi être composée de LCR mètres permettant une mesure de l'inductance, la capacité et la résistance d'un composant soumis à une excitation électrique alternative sur une gamme de fréquence donnée ³⁹. L'utilisation d'amplificateurs à détection synchrone (en anglais *lock-in amplifier*) est aussi courante car elle permet d'extraire des signaux de faibles amplitudes mais présents sur une gamme fréquentielle étroite noyés dans un bruit important sur une large gamme fréquentielle, ce qui peut être le cas pour des mesures effectuées à l'échelle de la cellule biologique ⁴⁰.

Pour la caractérisation électrique de nos systèmes, nous utilisons un analyseur d'impédance et une excitation en tension d'amplitude entre 10 et 500 mV. Nous travaillons à relativement faible amplitude pour éviter d'altérer les cellules biologiques. Selon une approche exploratoire de notre système sur cette gamme de fréquence, nous travaillons dans le domaine fréquentiel avec un balayage logarithmique sur des gammes de fréquences comprises entre 1 kHz et 2 Mhz. Ces fréquences sont choisies afin d'exploiter les propriétés diélectriques particulières des membranes plasmiques de cellules tumorales sur cette gamme de fréquence (voir 1.2.2). Nous privilégions la durée la plus élevée proposée par l'appareil pour la conversion analogique numérique du signal qui résulte en un meilleur rapport signal sur bruit. Avec ces paramètres la durée d'acquisition est d'environ 110 ms par point de mesure. L'instrumentation utilisée pour la caractérisation électrique de nos systèmes est décrite de façon plus détaillée plus tard dans ce chapitre (voir 4.1).

1.4. Les biocapteurs à spectroscopie d'impédance

1.4.1. Les différents types de biocapteurs

Un biocapteur est un dispositif conçu pour la détection d'éléments organiques à partir d'échantillons d'eau, d'air, de sol ou de matériel biologique. Il est constitué d'un **détecteur**, sensible à des variations physiques ou chimiques induites par la présence (ou l'absence) de l'élément à étudier. Un **transducteur** transforme l'information détectée en un signal conventionnellement mesurable. Un dernier élément électronique est nécessaire pour **numériser le signal** et permettre l'accès à une base de données des résultats de mesures, afin de pouvoir les traiter ultérieurement. Avec le développement de la microfabrication et de la microfluidique, un effort est apporté sur la **réduction en taille des biocapteurs** de façon à pouvoir détecter, analyser ou quantifier des échantillons de faible volume. Ceci permet d'effectuer l'analyse en un temps réduit et sur une faible quantité d'analyte, améliorant ainsi la précision, la sensibilité et la sélectivité de la mesure. Les autres avantages de la miniaturisation sont la portabilité des dispositifs et la détection en temps réel. A partir de ces évolutions, ont émergé au début des années 1990 des dispositifs qualifiés de laboratoire sur puce (en anglais *Lab-On-a-Chip*, LOC) intégrant un ou plusieurs biocapteurs et des composants de microfluidique permettant de reproduire des opérations effectuées en laboratoire à faible échelle, réduisant ainsi le temps d'analyse, le coût des réactifs et les déchets.

Les biocapteurs peuvent être classés selon la nature du transducteur qui peut être mécanique, optique ou électrique par exemple. Parmi les méthodes de détection électriques, nous pouvons distinguer l'amperométrie, la potentiométrie, la conductimétrie, et l'impédancemétrie. L'impédancemétrie, aussi qualifiée de spectroscopie d'impédance, spectroscopie d'impédance électrochimique (en anglais *electrochemical impedance spectroscopy*, EIS), ou encore spectroscopie de bio-impédance, est une technique dont le principe de **détection repose sur la variation d'impédance induite par la présence d'échantillons biologiques entre deux électrodes métalliques**. Les champs d'applications de biocapteurs basés sur des mesures d'impédance sont divers et comprennent la qualité dans le secteur de l'industrie alimentaire ⁴¹, l'environnement ⁴², le secteur médical ⁴³ et la biologie ⁴⁴ par exemple. Dans le domaine de la biologie, la détection d'éléments biologiques tels que des acides nucléiques ⁴⁵, des protéines ⁴⁶⁻⁴⁹, des bactéries ⁵⁰ ou des cellules eukaryotes ⁵¹ a été couplée au développement parallèle de la microfluidique, de la microélectronique et des biocapteurs.

Concernant les cellules biologiques plus particulièrement, des résultats d'impédancemétrie ont déjà été utilisés afin d'obtenir des informations sur la taille des cellules ³⁶, la capacité de leur membrane plasmique et la résistivité de leur cytoplasme ^{40,52}. Ces mesures sont effectuées à des fréquences inférieures à 100 MHz. Les mesures en hyper fréquences, c'est-à-dire dans le domaine des micro-ondes de 3 à 300 GHz, sont effectuées sans contact et en mesurant les coefficients de transmission et réflexion de la cellule en utilisant des systèmes de guide d'ondes. Les mesures à haute fréquence permettent de sonder le milieu intracellulaire qui peut être caractérisé à partir des paramètres « S » caractérisant la réflexion de tous les modes guidés étudiés en hyperfréquences ⁵³.

1.4.2. Etat de l'art des biocapteurs à impédancemétrie pour la détection de cellules biologiques

Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéressons aux dispositifs relatifs à la **détection de cellules biologiques et à leur discrimination en exploitant les propriétés diélectriques de la membrane plasmique à basse fréquence**. Les dispositifs développés à cet effet peuvent être distingués selon qu'ils étudient des cellules biologiques circulant dans un fluide, il s'agit de la

cytométrie de flux basée sur la mesure d'impédance, ou l'étude de cellules biologiques de façon statique en positionnant celles-ci entre des microélectrodes.

- Cytométrie de flux basée sur la mesure d'impédance

Le premier dispositif de cytométrie en flux basé sur des mesures d'impédance est le compteur Coulter qui est commercialisé depuis les années 1950 dans les domaines de l'hématologie⁵⁴. Il est constitué d'un canal comportant une constriction micrométrique. Deux électrodes, disposées à l'entrée et à la sortie du canal, sont alimentées en courant continu. La mesure de variation de résistance détecte le passage de particules « isolantes » qui traversent la constriction. Ainsi, l'énumération et la discrimination en taille de particules est possible. Cela a été utilisé pour le comptage de cellules biologiques, bactéries et virus. Plus tard, des excitations électriques alternatives multifréquentielles ont été utilisées afin d'accéder aux propriétés diélectriques des cellules. Les premiers travaux à avoir utilisé des microélectrodes insérées directement au sein du canal fluide pour la détermination de propriétés diélectriques de cellules ovariennes de hamster chinois ont été menés en 1978⁵⁵. Depuis la cytométrie de flux a permis de déterminer la position latérale de cellules circulant dans un canal^{56,57}, de discriminer différentes tailles de cellules circulantes³⁸, de discriminer des cellules tumorales de cellules sanguines^{58,59}, ou encore la discrimination entre cellules tumorales et saines⁶⁰.

Les dispositifs mis en œuvre pour la discrimination de cellules tumorales et cellules sanguines nous intéressent particulièrement dans le cadre des recherches et développements entrepris pour cette thèse. Parmi ceux cités précédemment, un dispositif met en œuvre des électrodes formées à base d'un gel de polyélectrolytes de part et d'autre d'un canal fluide de section $25 \times 25 \mu\text{m}^2$ sur une longueur de $70 \mu\text{m}$. Le débit au sein du canal est de $13 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. Une tension continue de 400 mV est appliquée entre les électrodes. En utilisant une excitation continue, l'amplitude de la variation d'impédance mesurée lors du passage de cellules entre les électrodes est liée à leur taille. Ainsi le dispositif est capable de discriminer des cellules OVCAR-3, issues de lignée cellulaire tumorale ovarienne, de globules blancs en suspension dans du sang dont le plasma a été remplacé par du PBS. Les cellules OVCAR-3 présentant une taille plus importante que les cellules sanguines, leur passage entre les électrodes se traduit par des variations de plus grande amplitude⁵⁹. Un autre dispositif utilise deux paires d'électrodes parallèles placées de part et d'autre d'un canal de section $30 \times 40 \mu\text{m}^2$. Les paires d'électrodes se font face sur une distance de $30 \mu\text{m}$ du canal et sont séparées d'une distance de $50 \mu\text{m}$. Deux fréquences simultanées sont utilisées (0,5 MHz et 2 ou 4 MHz) avec une amplitude de 2,5 V pour exciter une paire d'électrodes disposées sur la même face du canal. Le débit au sein du canal est de $40 \mu\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$. La variation d'impédance en basse fréquence permet de déterminer la taille des cellules circulant entre les microélectrodes et le ratio de variation d'impédance à haute fréquence sur la variation d'impédance à basse fréquence est inversement proportionnel à la capacité de membrane plasmique des cellules. Ainsi ce dispositif a été utilisé pour discriminer des cellules MCF-7, issues de lignée de cancer du sein, au sein d'échantillon sanguin après lyse des globules rouges. Le seuil de détection rapporté est de 1 cellule MCF-7 pour 1000 leucocytes. Différents types de leucocytes (lymphocytes, monocytes et neutrophiles) ont aussi été identifiés avec succès⁵⁸. La combinaison de deux fréquences permettant d'obtenir simultanément une information sur la taille et la capacité de membrane plasmique des cellules paraît prometteuse pour détecter et discriminer différents types cellulaires.

- Mesures sur cellules statiques

Les dispositifs statiques étudient les propriétés de cellules biologiques positionnées entre des microélectrodes. La mesure peut être effectuée dans le domaine temporel, notamment s'il s'agit de

suivre l'évolution du système au cours du temps, ou dans le domaine fréquentiel de façon à explorer les propriétés électriques sur une large gamme fréquentielle. Ces types de dispositifs ont recours à des méthodes comme la DEP^{37,39}, l'hydrodynamique^{36,40,61} ou la fonctionnalisation immunologique de surface^{28,31,32} afin de manipuler les cellules à analyser et de les positionner sur le site de détection entre les électrodes. Ainsi des mesures de spectroscopie d'impédance permettent par exemple le suivi de l'adhésion cellulaire sur une surface³³, le suivi du cycle de division de cellules⁶¹, la détermination de l'intégrité de cellules³⁹, l'extraction des propriétés diélectriques de cellules⁴⁰, la discrimination de cellules de différentes tailles³⁶, l'énumération de cellules sur une surface^{28,31,32,34,37}.

Un dispositif utilisé pour la discrimination de cellules mortes et vivantes a été développé au sein d'une puce microfluidique. La puce microfluidique comporte un canal dont la surface inférieure est constituée d'une couche de polymère SU-8 présentant un réseau de cavités circulaires de 16 μm de diamètre et 10 μm de profondeur. Des paires d'électrodes coplanaires sont disposées au fond des cavités (voir **Figure 7a** et **Figure 7b**). Un système de diélectrophorèse permet de disposer les cellules au sein des cavités. La spectroscopie d'impédance est ensuite réalisée sur une paire d'électrodes entre lesquelles est disposée une cellule. La spectroscopie s'effectue entre 1 kHz et 300 MHz avec une excitation de 200 mV. A partir des mesures d'impédance, le dispositif a ainsi discriminé avec succès des cellules vivantes et mortes mais aussi deux types de cellules, les cellules HL60 et NB4 issues de deux lignées cellulaires de leucémie humaine (voir **Figure 7c** et **Figure 7d**). La différence en module d'impédance mesurée en présence des deux types de cellules est de 190 k Ω à 10 kHz³⁹. L'ensemble des mesures avec cellules est effectué au sein d'une solution de saccharose. Ces travaux sont intéressants dans le cadre de notre application pour la configuration employée qui rappelle la géométrie de la membrane filtrante des S-MDCs.

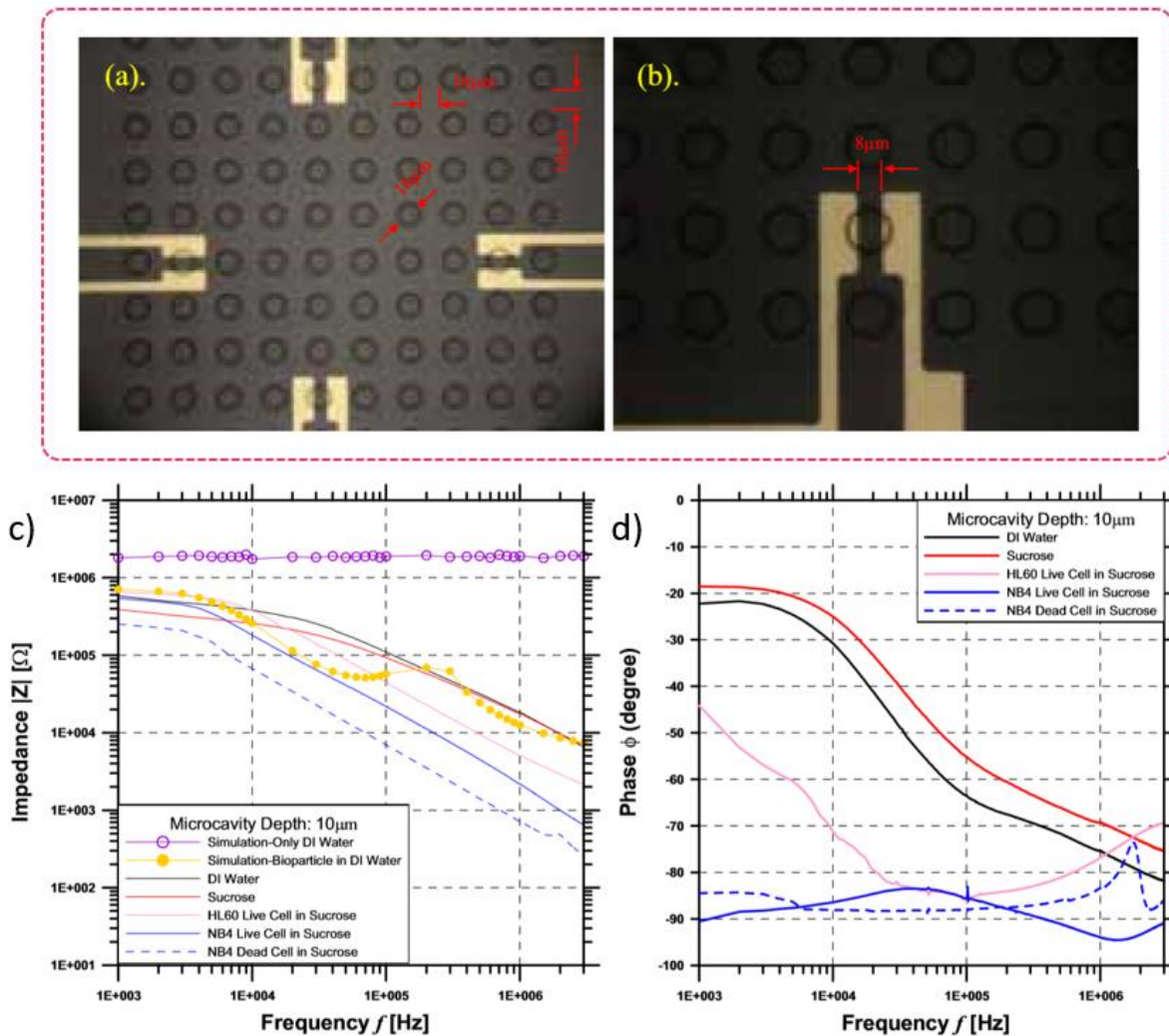


Figure 7 Résultats présentés dans les travaux de C.H. Chuang et al. ⁶² a) Image du réseau de microcavités et de quatre paires d'électrodes pour la spectroscopie d'impédance. b) Grandissement sur une paire d'électrodes, le gap inter-électrode est de 8 μm. c) Résultats de module d'impédance en présence de cellules HL60, NB4 et de cellules NB4 mortes dans une solution de saccharose notamment. d) Résultats de phase de l'impédance en présence de cellules HL60, NB4 et de cellules NB4 mortes dans une solution de saccharose notamment.

- Milieu hôte contenant les cellules pour les mesures

Il est à noter que l'ensemble des dispositifs cités effectuent les mesures sur suspension de cellules biologiques au sein d'un milieu simple, majoritairement en présence de sérum physiologique tampon phosphate salin (en anglais *Phosphate Buffer Saline*, PBS). Les dispositifs discriminant cellules tumorales des cellules sanguines à partir d'échantillon sanguin, procèdent auparavant à une étape de centrifugation afin de retirer le plasma et le remplacer par du PBS ⁵⁹. Le plasma étant un milieu complexe composé de protéines, sucres, hormones et ions dissous notamment, il constitue un électrolyte très concentré. L'adsorption des protéines à la surface des électrodes et la forte concentration de l'électrolyte réduit l'épaisseur de la double couche électrique. A titre d'exemple, pour des électrolytes aqueux de concentrations ioniques de 0,1 et 0,001 M, les épaisseurs de doubles couches électriques sont 0,1 et 10 nm respectivement ²⁸.

Etant donné que la formation de cette double couche est inévitable à la surface des électrodes il serait éventuellement préférable de ne pas trop réduire son épaisseur afin d'éviter de se trouver en présence de valeurs de capacités trop importantes (voir *relation 24*). Des valeurs de capacités trop importantes auraient potentiellement pour effet d'écranter les effets induits par l'élément à détecter.

De plus dans la perspective de détection de cellules biologiques et dans l'éventualité où la double couche électrique puisse être perturbée par la présence d'une cellule biologique en contact avec les électrodes, une épaisseur plus importante semble être à privilégier afin d'augmenter le volume d'interaction avec la cellule. En revanche étant donné que la double couche domine à basse fréquence et interfère généralement au niveau de la gamme de fréquence sur laquelle s'expriment les propriétés diélectriques de la cellule, réduire son épaisseur et ainsi augmenter la capacité de double couche résulterait en une diminution de la fréquence de coupure (voir *relation 26*) et donc permettrait de rendre accessible la région où pourra être effectuée la détection dans la gamme de fréquence d'intérêt (< 1 MHz). Cependant les régions fréquentielles de dominance de capacité de double couche électrique, de résistance du milieu et de capacité générée entre les microélectrodes sont aussi déterminées par la géométrie des électrodes. Le système doit donc être évalué dans sa globalité afin d'estimer les composantes dominantes sur la gamme fréquentielle d'intérêt.

Il n'existe pas à notre connaissance de dispositifs de discrimination ou détection de cellules tumorales dans du sang complet à base de spectroscopie d'impédance. Toutefois il peut être souligné à nouveau ici que le dispositif précédemment décrit, un système de cytométrie en flux basé sur des mesures d'impédance pour la discrimination de cellules, utilise des échantillons sanguins de donneurs auxquels sont ajoutées des cellules issues de lignées tumorales, en effectuant seulement une lyse préalable des érythrocytes⁵⁸.

1.4.3. Biocapteurs à électrodes coplanaires

Les biocapteurs à électrodes coplanaires se réfèrent à des systèmes comportant au moins deux électrodes disposées sur une même surface et dont les dimensions sont caractérisées par une épaisseur faible devant les largeurs et longueurs d'électrode. Selon cette configuration particulière, des variations de propriétés électriques peuvent être détectées dans un certain volume en contact avec le champ électrique généré entre les microélectrodes. La détection peut être effectuée par spectroscopie d'impédance comme évoqué précédemment.

Ce type de capteur est avantageux sur différents aspects. Ce sont généralement des dispositifs bas coût car leur fabrication ne requiert pas d'étapes complexes étant donné qu'il s'agit d'intégrer des électrodes sur une seule et même surface. Cette configuration peut être implémentée pour des applications dites non invasives, en approchant un échantillon pour effectuer des mesures de proximité par exemple. La structure planaire permet d'interroger un échantillon sous test à partir d'un côté seulement, ce qui est pratique lorsque l'accès à l'échantillon est limité. Enfin cette configuration permet une flexibilité dans la géométrie des électrodes afin d'optimiser la détection pour une application particulière.

Différents dispositifs basés sur des capteurs planaires ont été mis au point pour la détection de cellules biologiques, notamment la discrimination de cellules tumorales et l'étude de leurs propriétés diélectriques. C'est en effet la configuration principale utilisée par les dispositifs cités pour l'étude de cellules statiques dans la section précédente. Dans le cadre de cette thèse, avec l'objectif de détecter la présence de cellules biologiques, et idéalement discriminer les cellules tumorales de cellules sanguines saines, capturées à la surface de la membrane filtrante des S-MDCs, la configuration d'électrodes planaires intégrées à la membrane filtrante est la voie que nous avons privilégiée pour notre application.

1.4.4. Facteurs de performance

Afin d'évaluer la performance d'un capteur à électrodes coplanaires pour l'application envisagée, *i.e.* la détection de cellules à la surface de la membrane filtrante des S-MDCs, les premiers

paramètres importants à considérer peuvent être le volume de détection, la sensibilité, la gamme dynamique de mesure, et la reproductibilité.

- Volume de détection

Le volume de détection du capteur peut être défini par la surface occupée par les électrodes et la distance maximum dans la direction z perpendiculaire au plan des électrodes à laquelle un changement est détectable sur le signal de sortie. C'est un paramètre important pour identifier quel est le volume autour des microélectrodes qui est sondé par le capteur et à partir de quelle distance de la surface la présence d'un élément à détecter pourrait impacter significativement l'impédance mesurée aux bornes des électrodes. Pour une paire d'électrode soumises à une excitation en tension ou en courant, le volume de détection peut être associé au volume dans lequel circule un courant non négligeable. Dans ce cas-là, le paramètre à considérer est la densité de courant générée dans le volume au-dessus des électrodes. La sensibilité du système est considérée proportionnelle à la densité de courant au carré¹², et donc le volume sensible ou la détection est possible peut être déterminé à partir d'une cartographie de la densité de courant.

Lorsque les dimensions d'une paire d'électrodes coplanaires sont inférieures aux dimensions du volume de milieu biologique avec lequel elles sont en contact, le courant ionique généré entre elles s'étend dans le volume, et la densité de courant diminue lorsque la distance par rapport aux électrodes augmente. La tension et le courant aux bornes des électrodes peuvent être mesurés et définissent l'impédance du système. Cependant, le volume de détection n'est pas facilement mesurable en pratique. Des simulations peuvent être effectuées afin de déterminer numériquement la répartition spatiale du champ électrique générée entre les deux électrodes ainsi que la répartition du champ de vecteur représentant la densité de courant.

Pour des électrodes coplanaires, il est considéré que le champ du vecteur densité de courant décroît en fonction de z^{-3} au sein d'un milieu homogène, z étant la distance sur un axe perpendiculaire au plan comportant les électrodes¹². Le champ de densité de courant, et donc le volume de détection peut être affecté par la géométrie des électrodes coplanaires. La **Figure 8** représente schématiquement l'impact de la distance entre les électrodes et de la largeur des électrodes sur la répartition des vecteurs densité de courant. La distance entre deux électrodes influence la profondeur de détection (voir **Figure 8a**). Plus la distance augmente, plus le volume de détection augmente. La contribution à la mesure d'éléments plus éloignés des électrodes augmente, en revanche la densité de courant diminue avec la distance ce qui mène à une diminution de la sensibilité du système. Le volume de détection est en revanche peu affecté par la surface des électrodes. Ceci est représenté sur la **Figure 8b** avec différentes surfaces de paires électrodes dont la distance entre le centre des deux est constante. Dans le cas où la surface des électrodes est importante et le gap inter électrode réduit, la densité de courant et la sensibilité sont élevées proche des électrodes puis diminuent rapidement. Ainsi la géométrie des électrodes doit être réalisée en fonction des dimensions de l'élément à détecter, de son positionnement vis-à-vis des électrodes et de la sensibilité nécessaire pour la détection.

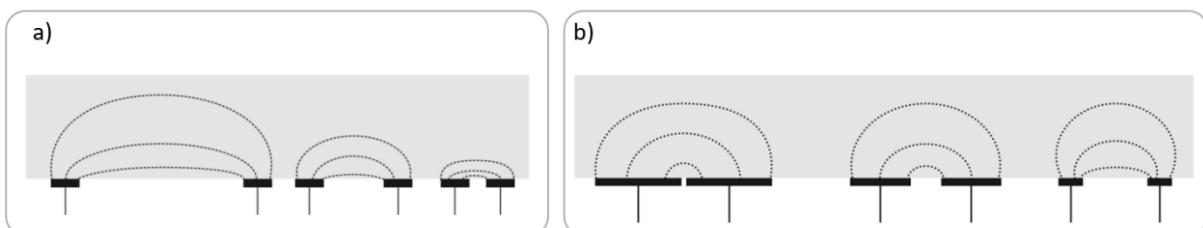


Figure 8 Représentation schématique de profondeurs de détection d'électrodes planaires en fonction de paramètres géométriques. Les lignes symbolisent des lignes de courant et la proximité entre deux lignes code le

module de la densité de courant. a) Profondeur de détection en fonction de la distance entre des électrodes de largeur égale. b) Profondeur de détection en fonction de la largeur d'électrode pour une distance constante entre les centres des électrodes. Schémas extraits de de G. Martisen et S. Grimnes¹².

- Sensibilité

De façon générale, la sensibilité est définie comme le ratio de changement entre le signal de sortie du capteur aux changements d'une variable du système. Dans la perspective de détecter des variations de propriétés diélectriques du milieu entre deux électrodes induites par les propriétés spécifiques de la membrane plasmique d'une cellule à détecter, la sensibilité pour une mesure d'impédance peut s'écrire:

$$s_{\varepsilon} = \frac{dZ}{d\varepsilon} \quad (28)$$

Avec dZ la variation d'impédance mesurée pour une variation de permittivité $d\varepsilon$ et s_{ε} la sensibilité du transducteur.

Les capteurs destinés à détecter des éléments spécifiques au sein d'un milieu biologique à base de mesures d'impédance sont soumis à des variations multiples qui incluent les propriétés électriques du milieu, la distance de l'élément par rapport aux électrodes et le volume d'un échantillon à analyser par exemple. Pour des systèmes de détection de cellules qui nous intéressent et en tenant compte de l'ensemble de ces facteurs, la sensibilité peut être définie de façon plus spécifique à partir de la mesure d'impédance en présence d'une cellule individuelle $Z_{Cellule}$ et la mesure de référence du milieu sans cellule $Z_{Solution}$. Dans ce cas la sensibilité à une fréquence donnée pourrait s'exprimer de la façon suivante:

$$S = \frac{Z_{Solution} - Z_{Cellule}}{Z_{Solution}} \quad (29)$$

- Gamme dynamique de mesure

Le signal de sortie d'un capteur correspond à la combinaison d'une valeur dite « à vide » sans élément spécifique à détecter et d'un changement dynamique induit par la présence d'un élément à détecter. La gamme dynamique est le rapport de la valeur la plus élevée à la valeur la plus faible d'une grandeur détectable par le capteur. La limite basse de la gamme dynamique définit la limite de détection (en anglais *limit of detection*, LOD) du système. Pour des capteurs à électrodes planaires mesurant des variations de capacité, la valeur à vide est généralement beaucoup plus importante que la gamme dynamique⁶³. En pratique, l'objectif du design d'un tel capteur est de minimiser la valeur à vide et maximiser la gamme dynamique de façon à atteindre un rapport signal sur bruit maximal. En effet, plus la valeur d'impédance mesurée à vide est élevée, plus la mesure sera bruitée. Une gamme dynamique la plus large possible contribuera aussi à réduire le bruit sur la mesure.

- Reproductibilité et stabilité

Comme pour tout type de capteur, la reproductibilité et la stabilité sont des facteurs de performance très importants afin de pouvoir valider la capacité d'un système à détecter un élément spécifique. Il est important de caractériser correctement ces paramètres, d'autant plus lorsqu'il s'agit d'analyser du matériel biologique, source intrinsèque de variabilité.

2. Concept et design du S-MDC à électrodes intégrées

2.1. Concept d'intégration d'électrodes pour la détection de cellules tumorales

La stratégie suivie se base sur le procédé de fabrication des S-MDCs en nickel précédemment développés (voir Chapitre 1) et l'intégration de **microélectrodes planaires** contournant les pores de la membrane filtrante (voir **Figure 9a**). Il a été choisi de conserver le nickel comme matériau pour la fabrication, compte tenu des propriétés de tenue mécanique qu'il confère aux dispositifs. Cependant la nature conductrice de la membrane filtrante en nickel complique ce type de réalisation qui aurait nécessité l'adjonction d'une couche supplémentaire afin d'isoler les microélectrodes et la membrane filtrante. Cette étape aurait conduit à un épaissement de la membrane qui n'est pas souhaitable afin de préserver la qualité de la capture. Une solution technique nouvelle a donc été développée afin de former des S-MDCs, possédant une membrane filtrante isolante et mince en oxyde et nitrure de Silicium compatible avec l'intégration de microélectrodes à sa surface tout en conservant une partie périphérique métallique et épaisse en Nickel.

De nombreuses études ont montré que la géométrie et l'arrangement des électrodes influe sur la performance du capteur capacitif^{63,64}, et qu'ils doivent être adaptés à la nature de l'élément à détecter. Dans notre cas d'autres contraintes sont à prendre en considération car l'intégration des microélectrodes de détection sur la membrane ne doit pas se traduire par une détérioration de ses propriétés de rétention des cellules cancéreuses. En particulier, comme nous l'avons montré dans le Chapitre 1 de ce manuscrit, les cellules capturées par la membrane filtrante se trouvent immobilisées au voisinage des pores, leur détection électrique est donc possible à condition d'intégrer un couple de microélectrodes autour de ces pores et de les dimensionner afin de sonder diélectriquement un volume au-dessus du plan de la membrane filtrante de dimension cellulaire. La taille des pores ne peut pas être réduite. Il est en effet primordial de conserver une ouverture suffisante pour effectuer la capture des cellules ciblées sans encombrer le dispositif avec des cellules sanguines saines. Ce raisonnement simple montre que le gap entre les électrodes est contraint par le diamètre des pores de capture. Il est également nécessaire de maintenir une épaisseur de membrane en dessous de 5 μm . En effet, l'ouverture et l'épaisseur de la membrane filtrante sont des paramètres qui définissent sa résistance hydraulique⁶⁵. La résistance hydraulique des S-MDCs a été optimisée de façon à conserver une faible différence de pression au travers de la membrane filtrante pour un débit fixé (voir Chapitre 1). De cette façon, la capture des CTCs s'effectue dans des conditions débit et pression qui sont proches des conditions physiologiques, préservant ainsi l'intégrité des cellules capturées. De façon à détecter la présence de cellules cancéreuses à la surface de la membrane filtrante tout en limitant l'encombrement de celle-ci et inspiré par les multiples exemples de la littérature (voir 1.4.2), le choix s'est rapidement orienté vers la fabrication de **microélectrodes coplanaires** de faible épaisseur (< 1 μm) intégrées de part et d'autre des pores de la membrane filtrante.

La méthode de détection sera basée sur la spectroscopie d'impédance. La réponse électrique du milieu proche des pores de la membrane filtrante pourra être explorée sur une large gamme fréquentielle de 100 Hz à 1 MHz. L'objectif premier est d'être capable de détecter un changement d'impédance permettant l'énumération des cellules capturées et donc d'avoir une mesure du taux d'encombrement de la membrane filtrante et sa progressive saturation. Un autre objectif plus ambitieux est d'effectuer en même temps que l'énumération des cellules une identification de celles-ci. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment dans ce chapitre, il sera possible à basse fréquence de sonder la capacité membranaire des cellules piégées et de pouvoir ainsi éventuellement distinguer les cellules tumorales des cellules sanguines saines mais également à plus haute fréquence de révéler d'autres types de différences phénotypiques liées aux organites internes. Le but est

d'étudier spectralement quelles sont les fréquences préférentielles ou les bandes de fréquence les mieux adaptées à l'énumération et à la discrimination cellulaire. Il est probable que ces bandes soient différentes. La spectroscopie pourrait nous permettre de mener ce type d'études puis de définir les fréquences préférentielles d'utilisation. Afin de permettre la mesure, des pistes de connexion relient les microélectrodes disposées sur la membrane filtrante à des plots de contact électrique situés en périphérie de la face arrière des S-MDCs, (voir **Figure 9b**). Ces éléments d'adressage constituent l'environnement électrique autour de la zone sensible du capteur, ils doivent être minutieusement conçus et dimensionnés afin de ne pas masquer les variations d'impédance liées à la présence des cellules au voisinage du gap entre les microélectrodes.

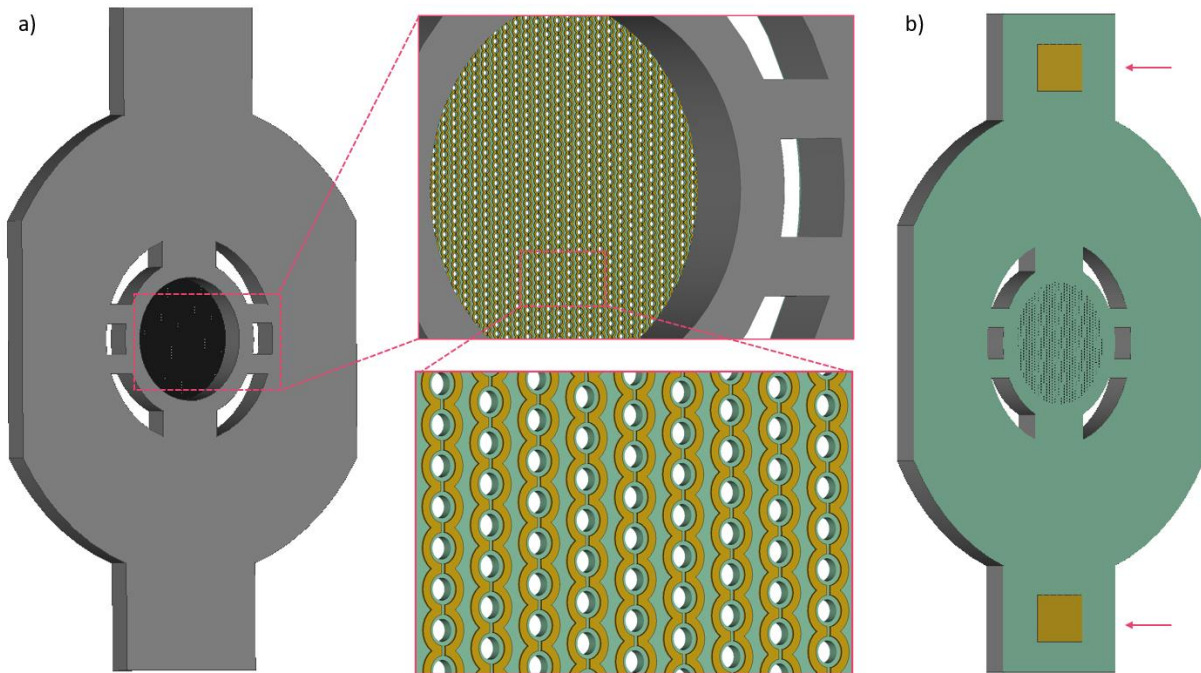


Figure 9 Représentation 3D du concept d'intégration d'électrodes aux S-MDCs. a) Face avant du dispositif. Les encarts représentent un agrandissement de l'image pour la visualisation de la membrane filtrante et des microélectrodes contournant les pores. b) Face arrière du dispositif. Les flèches représentent l'accès aux plots de contact électrique.

2.2. Proposition de design de S-MDC à électrodes intégrées

2.2.1. Structure générale du S-MDC à électrodes intégrées

Tel qu'évoqué précédemment, la partie supportrice des S-MDCs constituée d'une couche de nickel d'épaisseur $150\ \mu\text{m}$ a été conservée pour l'intégration des microélectrodes. Cependant sa surface est augmentée par rapport aux S-MDCs précédemment développés. En effet les plots de contact électrique se trouvant en face arrière de cette partie supportrice, ils doivent être isolés afin de ne pas être en contact avec le fluide traversant la membrane filtrante et les ouvertures latérales. Pour cela, ils sont positionnés en périphérie de la partie supportrice de façon à obtenir un espace suffisant pour le positionnement d'un joint assurant l'étanchéité entre la zone en contact avec le fluide et celle comportant les plots de contact électrique (voir **Figure 10c**). Les joints toriques standards industrialisés compatibles avec les dimensions de la zone filtrante de nos dispositifs présentent un diamètre de 2 mm et une section de 1 mm de diamètre minimum. Ainsi, cette nouvelle génération de S-MDCs présente un diamètre total d'environ 4 mm (voir **Figure 10b**) contre 2 mm pour les S-MDCs précédemment développés.

Le diamètre des pores est maintenu à 10 μm afin de maximiser la capture de cellules tumorales tout en minimisant la contamination (voir Chapitre 1). Afin de permettre des comparaisons en termes de performance de capture et de faciliter l'intégration au système fluide précédemment développé, le diamètre du lumen est identique à celui des S-MDCs précédemment développés, soit un diamètre de 1,8 mm (voir **Figure 10b**).

Afin de permettre l'intégration des microélectrodes, la surface de la membrane filtrante a été augmentée. Pour le design de S-MDC précédent, cette surface correspondait à 31% de la surface du lumen, elle correspond à présent à 39% de la surface du lumen. Avec l'intégration de microélectrodes, les pores initialement disposés en nid d'abeille de façon à optimiser la surface d'ouverture de la membrane filtrante (voir Chapitre 1), se trouvent désormais disposés en quinconce pour cette nouvelle génération de dispositifs (voir **Figure 10b**). Avec l'intégration d'électrodes, le nombre de pores est réduit à 2018 contre 2717 pores pour les S-MDCs précédemment développés. Ceci engendre une réduction de l'ouverture de la membrane filtrante de 8% de la surface du lumen pour le design précédent à 6% pour ce nouveau design. La surface des ouvertures latérales a été augmentée de façon à compenser la réduction d'ouverture de la membrane filtrante afin d'éviter une augmentation de la pression transmembranaire. Cette nouvelle génération de S-MDCs à électrodes intégrées possède ainsi une ouverture totale de 27%, proche de l'ouverture des S-MDCs précédemment développés qui était de 25%. Avec une ouverture totale légèrement supérieure à celle du design précédent et une aire de la membrane filtrante augmentée et son épaisseur réduite, la pression transmembranaire de cette nouvelle génération de S-MDCs doit être globalement inférieure que celle obtenue avec les S-MDCs initiaux. Cependant, il est possible que les performances de capture soient affectées compte tenu d'une augmentation de 8% (31 à 39% de la surface du lumen) de la surface de la membrane filtrante accompagnée d'une réduction de 2% de son ouverture (8 à 6% de la surface du lumen). Les évolutions de pressions transmembranaires pour un débit donné et de performances de captures pour des conditions expérimentales données devront être étudiées par des simulations fluidiques et par des expériences.

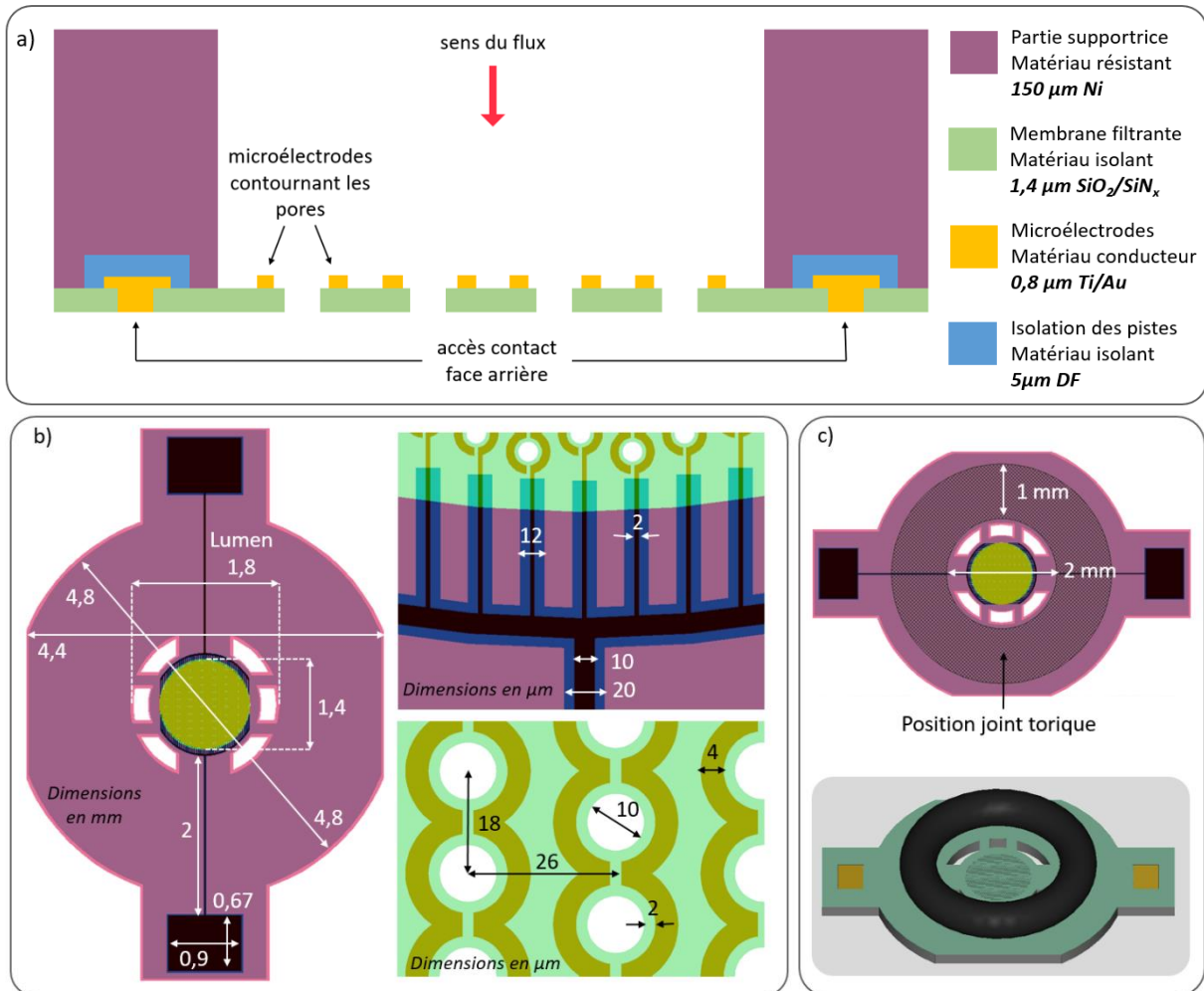


Figure 10 Représentations schématiques de la structure et des dimensions du S-MDC à électrodes intégrées. a) Vue de coupe représentant les différentes couches constitutives du S-MDC à électrodes intégrées et les matériaux correspondants. Le schéma n'est pas à l'échelle. b) Design 2D du S-MDC à électrodes intégrées et dimensions de la partie supportrice, des microélectrodes, pistes de connexions, plots de contacts et couche d'isolation. c) Représentations 2D et 3D du positionnement du joint torique permettant d'isoler les plots de contact pour les mesures électriques.

2.2.2. Stratégie d'intégration des microélectrodes

La vue de coupe schématisée en **Figure 10a** présente le principe de conception pour l'intégration des électrodes à la surface de la membrane filtrante des S-MDCs. La membrane filtrante est constituée d'un matériau isolant, nous avons choisi une bicouche de 1,4 µm d'épaisseur totale d'oxyde de silicium et de nitrure de silicium. Les microélectrodes coplanaires sont disposées de part et d'autre des pores de la membrane filtrante. Les microélectrodes, les pistes de connexion et les plots de contact électriques sont fabriqués lors d'une même étape de la microfabrication et sont constitués d'une bicouche de 100 nm de titane et de 700 nm d'or. Un matériau isolant est utilisé afin d'isoler les pistes reliant les électrodes de détection aux plots de contact électriques de la partie supportrice en nickel, nous avons choisi d'utiliser un polymère photosensible, sous la forme d'un film sec, d'une épaisseur de 5 µm à cet effet. Le choix des matériaux est discuté dans la section 3.1.

De façon à simplifier la conception, le choix a été fait d'intégrer des paires d'électrodes autour de pores disposés sur une même ligne (voir **Figure 10b**). Ainsi, plusieurs paires peuvent être intégrées contournant chacune une ligne de pores distincte, avec des longueurs de lignes variables pouvant éventuellement être réduites afin de n'entourer qu'un seul pore. Une seule paire d'électrode

interdigitée peut aussi être intégrée, contournant un réseau de lignes et enserrant ainsi l'ensemble des pores de la membrane filtrante. C'est le cas du design présenté en **Figure 10b** par exemple, présentant une seule paire d'électrodes circulaires interdigitées et donc seulement deux plots de contacts accessibles à la périphérie de la face arrière du dispositif. Dans ce cas, la détection de capture sur l'ensemble des pores du réseau est effectuée simultanément avec de possibles effets de moyenne mais au bénéfice d'une conception et d'une mesure simplifiés, la mesure s'effectuant par le biais d'une paire de microélectrodes uniquement. En revanche, dans le cas où la mesure sonde un pore individuel, elle serait beaucoup plus précise mais nécessiterait l'intégration d'un plus grand nombre d'électrodes, dès lors qu'il s'agirait de sonder tous les pores du réseau de manière individuelle. Une telle configuration complexifie alors le design et l'intégration du système au S-MDCs, ainsi que la mesure et le traitement de données ultérieurs.

2.2.3. Géométrie des microélectrodes

Des travaux précédents ont étudié par la simulation l'influence de différentes géométries d'électrodes pour la détection d'une cellule issue de la lignée HeLa, qui est une lignée de cellules tumorales humaines de cancer du sein ⁶⁶. Dans cette étude, la cellule est positionnée sur un substrat à la surface duquel sont disposées des électrodes coplanaires de différentes formes qui contournent la surface en contact avec la cellule. Les électrodes de forme parallèle ou circulaire apparaissent comme les plus performantes. Sur la base de ces résultats, deux configurations géométriques d'électrodes parallèles et circulaires ont été conçues pour intégration à la surface de la membrane filtrante des S-MDCs. Compte tenu de la répartition et configuration des microélectrodes présentées précédemment, le dimensionnement de ces microélectrodes a été réalisé de façon à réduire autant que possible l'encombrement de la membrane filtrante afin d'éviter d'altérer trop fortement les performances de capture du dispositif. La **Figure 10b** présente l'ensemble des dimensions décrites en suivant. La largeur des électrodes parallèles et circulaires a été fixée à 4 μm de façon à réduire au maximum l'encombrement tout en produisant un champ électrique suffisant pour interagir avec la cellule. Contraints par les alignements des niveaux de microfabrication, un écart de 2 μm est maintenu entre les extrémités des électrodes et le pore ce qui résulte en un **gap inter électrodes** de 14 μm . La largeur des pistes de connexion définie à 2 μm est portée à la limite de la résolution de la technique de photolithographie de proximité employée pour la microfabrication. Cette réduction des dimensions est anticipée dans la projection de l'intégration de plusieurs paires de microélectrodes aux S-MDCs, de façon à pouvoir insérer le nombre de pistes de connexion correspondant sur le pourtour de la membrane filtrante des S-MDCs. Les plots de contacts rectangulaires présentent des surfaces variables en fonction de l'espace disponible sur le pourtour du S-MDC, lié au nombre de paires de microélectrodes intégrées au S-MDC. Les plots de plus petites dimensions sont des carrés de 100 μm^2 , une surface suffisante pour permettre l'accès aux pointes pour la mesure électrique. La couche d'isolation est superposée sur les pistes de connexion et plots de contacts pour les séparer de la partie supportrice du S-MDC composée de nickel. La couche d'isolation suit la géométrie des pistes de connexion et plot de contacts avec une marge de 5 μm sur les bords afin de permettre l'adhésion entre les différents matériaux et ainsi d'assurer une bonne isolation des pistes en Ti/Au.

3. Procédé de microfabrication des S-MDCs à électrodes intégrées

3.1. Choix des matériaux

Afin de permettre l'intégration de microélectrodes à la membrane filtrante des S-MDCs, des modifications doivent être apportées sur le choix des matériaux pour la microfabrication. En se basant sur un principe similaire de microfabrication couche par couche des S-MDCs comme présenté dans le

Chapitre 1 de ce manuscrit, un nouveau processus de fabrication a dû être établi en tenant compte des matériaux choisis et du design défini pour l'intégration des électrodes.

- Partie supportrice

Forts de l'expérience gagnée avec l'utilisation des S-MDCs précédemment développés, nous avons choisi de conserver la partie supportrice de la membrane en nickel électrolytique. Il nous est apparu qu'elle confère aux S-MDCs une résistance mécanique permettant à l'utilisateur de les manipuler aisément à la pince sans les endommager. Cette partie supportrice épaisse de 150 μm permet en effet de protéger la membrane filtrante qui ne se trouve jamais en contact avec les outils du manipulateur. Le nickel étant un métal conducteur ($\sigma=1,47 \times 10^7 \text{ S/m}$), il devra être isolé des pistes de connexion et plots de contacts électriques afin d'éviter des courts circuits et de parasiter la mesure.

- Membrane filtrante

La première nécessité est de choisir un matériau isolant afin de former la membrane filtrante. Il s'agit de choisir un matériau diélectrique présentant une faible permittivité afin de ne pas générer de capacité importante interférant avec les capacités formées entre les microélectrodes à sa surface. Il doit aussi présenter un faible facteur pertes afin de minimiser au maximum les fuites de courant. La surface du matériau choisi doit être plane (uniforme et sans rugosité) afin d'obtenir une résolution suffisante pour l'étape de photolithographie définissant les microélectrodes et les pistes de connexions qui présentent les dimensions critiques de notre design. Enfin le matériau choisi doit être résistant pour assurer sa fonction filtrante sous flux hydrodynamique. Le matériau doit être le moins contraint possible afin de supporter la couche de métal à sa surface formant les microélectrodes. Basé sur ces prérequis, nous avons identifié une bicouche de 800 nm d'oxyde de silicium (SiO_2) et de 600 nm de nitrure de silicium (SiN_x) comme potentielle candidate pour répondre à nos contraintes. Cette bicouche $\text{SiO}_2/\text{SiN}_x$ a été précédemment développée au sein du LAAS-CNRS pour la fabrication de capteurs de gaz⁶⁷. Elle a été mise au point afin de présenter une faible contrainte résiduelle, ce qui lui confère des propriétés mécaniques accrues de stabilité et résistance à la contrainte. La bicouche développée a par ailleurs l'avantage de présenter une importante uniformité à sa surface. L'épaisseur totale de la couche est de 1,4 μm , plus fine que l'épaisseur de la membrane filtrante en nickel de 5 μm des S-MDCs précédemment développés. Cette réduction de l'épaisseur entraîne une réduction de la résistance hydraulique de nos dispositifs, ce qui a du sens pour l'application finale de capture de cellules tumorales. De plus, cela laisse une marge de liberté pour la structuration des microélectrodes à sa surface. Ces matériaux très répandus pour une fonction d'isolation dans la microélectronique, présentent les propriétés diélectriques compatibles pour la fonction de substrat à l'intégration d'électrodes (voir **Tableau 3**). En effet avec de faibles valeurs de permittivité et de facteur de pertes, ils contribueront à minimiser la capacité induite dans le substrat des microélectrodes intégrées, que constitue la membrane filtrante, et préviendront les fuites de courant. De plus il a été montré que ces matériaux utilisés dans la réalisation de Bio-MEMS (Micro Electro Mechanical Systems pour des applications biologiques), ne présentent pas d'encrassement biologique et ne déclenchent pas de réponse inflammatoire lorsqu'implantés jusqu'à 21 jours au sein d'un modèle murin⁶⁸. Des implants ont aussi été étudiés sur xénogreffe tumorale sur modèle murin, ne présentant pas d'impact significatif sur le tissu tumoral sur une période de 7 jours⁶⁹.

- Microélectrodes

Concernant le métal utilisé pour la fabrication des microélectrodes, notre choix s'est porté sur l'or pour ses propriétés élevées de stabilité vis-à-vis de la réaction avec d'autres matériaux, résultant par exemple en une faible oxydation à l'air libre ou en présence milieu de liquide, et sa résistance à la corrosion⁷⁰. De plus c'est un métal présentant de bonnes propriétés conductrices ($\sigma=$

$4,25 \times 10^7$ S/m). Ce métal est déjà utilisé pour le développement d'une variété de biocapteurs implantables et est largement reconnu comme l'un des métaux les plus compatibles avec l'environnement biologique (non cytotoxique)^{68,71}. Un choix de 800 nm d'épaisseur a été défini afin de compenser les largeurs relativement faibles des microélectrodes en comparaison de celles rapportées dans la littérature^{36,52,72}. Cette épaisseur permet d'augmenter le volume d'interaction entre le champ électrique généré par les électrodes coplanaires et la cellule tumorale capturée. Cependant, un compromis est à effectuer car en augmentant l'épaisseur des microélectrodes, la valeur de capacité est augmentée, ce qui aura pour effet une réduction de la sensibilité de détection. En revanche une épaisseur d'électrode trop faible aboutira à un faible volume d'interaction entre cellule et champ électrique et à des impédances élevées difficiles à mesurer avec précision. L'épaisseur de 800 nm étant importante en comparaison des épaisseurs des couches minces métalliques utilisées pour des applications standards de biocapteurs capacitifs, elle nous permettra de tester la résistance de la membrane filtrante bicouche à l'intégration de matière métallique à sa surface.

- Couche isolante

Enfin le matériau isolant choisi pour isoler les pistes de connexion et les plots de contacts de la membrane en nickel est polymère photosensible, présenté sous forme de film sec, le DF. Les films secs sont généralement utilisés en photolithographie pour la mise en forme de structures de dimensions plus importantes que celles de structures réalisées à partir des résines photosensibles liquides. Le dépôt de film sec peut se faire par laminage ou pressage et résulte ainsi à une épaisseur plus uniforme sur le wafer que dans le cas de résine liquides déposées à la tournette. Des études *in vitro* menées selon la norme ISO 10993-5 ont montré que le film sec DF est non cytotoxique⁷³. Ses propriétés diélectriques (voir **Tableau 3**) permettent son utilisation pour l'isolation des pistes de connexion et plots de contacts électriques de la partie supportrice en nickel. La plasticité de ce matériau polymère permet un dépôt conforme par moulage sur une surface préalablement structurée avec les éléments conducteurs à isoler.

	SiO ₂ ⁷⁴	SiN _x ⁷⁵	DF ^{76*}
Permittivité ϵ_R	3,8	7 - 12,5	3
Facteur de pertes $\tan\delta$ à 10 kHz	0,1	~ 0,01	0,0003

Tableau 3 Propriétés diélectriques des matériaux isolants utilisés pour l'intégration des électrodes aux S-MDCs.

3.2. Description des techniques de microfabrication employées

Les dispositifs sont structurés *via* un procédé de microfabrication comprenant dix étapes dont six étapes de photolithographie. La photolithographie consiste en l'ensemble des opérations permettant le transfert d'un motif à la surface d'un substrat. Une résine photosensible est déposée à la surface d'un substrat sous la forme d'un film d'épaisseur bien contrôlée. La résine est ensuite exposée à une radiation lumineuse au travers d'un masque formé de zones opaques et transparentes permettant de définir le motif à reproduire sur le substrat. En fonction de la nature de la résine, les zones exposées ou non sont révélées dans un bain adapté, formant ainsi un moule à la surface du wafer. La photolithographie est une technique de base servant par la suite à son tour de masque pour différentes techniques de mise en forme. Pour la fabrication des S-MDCs à électrodes intégrées, les techniques utilisées pour la structuration à partir d'un substrat de silicium 4 pouces sont : une étape de dépôt chimique en phase vapeur, une étape de lift off, trois étapes de gravure sèche, un dépôt de

* Le DF étant une résine composée principalement d'époxy, les propriétés diélectriques rapportées dans le tableau sont celles de l'époxy

film sec photosensible, deux étapes d'électrochimie ainsi qu'une étape de gravure chimique humide. Nous allons dans la suite de cette section décrire le principe de fonctionnement des principales techniques utilisées. La **Figure 11** présente des schémas de ces différentes techniques.

3.2.1. Dépôt CVD pour la formation de la membrane filtrante

La formation de la bicouche $\text{SiO}_2/\text{SiN}_x$ s'opère sur les deux faces du substrat de silicium. Pour le dépôt de la couche de nitrure de silicium la technique additive utilisée est le dépôt chimique en phase vapeur (en anglais *Chemical Vapor Deposition* CVD). Cette technique s'effectue à haute température en présence d'une phase gazeuse dont les constituants réagissent avec le substrat pour faire croître un film solide. Dans un premier temps, une couche de $0,8 \mu\text{m}$ de SiO_2 est formée par oxydation thermique du substrat de silicium dans un four à une température de 1070°C . Ensuite, une couche de $0,6 \mu\text{m}$ de SiN_x est déposée à faible pression par LPCVD (*Low Pressure Chemical Vapor Deposition*), cette technique permet d'augmenter l'uniformité des films déposés sur les substrats. Le film de SiN_x est formé à 750°C par la réaction des gaz SiH_4 et NH_3 sur le substrat. Le substrat de silicium présente donc une bicouche $\text{SiO}_2/\text{SiN}_x$ formée préalablement aux étapes de structurations effectuées par les techniques décrites en suivant. Le dépôt SiN_x n'est pas du nitrure stœchiométrique (Si_3N_4). Notons que c'est l'ajustement des paramètres du bâti de LPCVD qui permet de régler la teneur en nitrure. Avec les conditions de dépôt utilisées, le paramètre x est de 1,15. Le dépôt est en revanche bien reproductible et la même teneur en nitrure sera obtenue d'une manipulation à l'autre. Ce dépôt a été développé car le Si_3N_4 stœchiométrique présente une contrainte trop élevée et le dépôt est donc limité en épaisseur (120 nm). Nous avons donc choisi des paramètres déjà établis au sein de la centrale technologique du LAAS pour les procédés MEMS, minimisant la contrainte résiduelle au sein de la bicouche $\text{SiO}_2/\text{SiN}_x$ qui sera libérée de son support au cours du procédé technologique.

3.2.2. Lift off pour la formation des microélectrodes et pistes de connexion

Une résine photosensible est préalablement structurée par une étape de photolithographie afin de former des ouvertures aux endroits où le métal doit être déposé. La technique du *lift-off* est une technique additive consistant en la métallisation à travers la résine structurée, suivi du retrait de la couche de résine. La métallisation par évaporation sous vide est un processus physique (en anglais *Physical Vapor Deposition* PVD) de dépôt de couches minces. Dans notre cas, il s'agit d'une évaporation thermique effectuée par chauffage d'une source de métal *via* un faisceau d'électrons. Le métal évaporé se condense ensuite à l'état solide à la surface du substrat (voir **Figure 11**). Le retrait successif de la résine permet d'obtenir les motifs de métallisation sur le substrat. Les résines dédiées à la technique du *lift-off* sont développées de façon à présenter un profil inversé après révélation (voir **Figure 11**). La métallisation par évaporation étant directive, le profil inversé permet d'éviter le dépôt de métal sur les flancs de la résine. Dans notre cas, nous avons préféré la technique du *lift-off* à une gravure humide (chimique) du métal, car elle présente une meilleure résolution pour les motifs de notre design aux dimensions critiques, qui sont les lignes de connexion de largeur $2 \mu\text{m}$. Nous avons donc choisi une résine d'épaisseur $2,5 \mu\text{m}$ permettant d'atteindre la résolution souhaitée pour *lifter* une épaisseur de 800 nm d'or.

3.2.3. Gravure RIE pour l'ouverture des pores

Les étapes de gravure sèche effectuées sont de type ionique réactive (en anglais *Reactive Ion Etching* RIE), technique soustractive mise en œuvre par le biais d'un plasma réagissant physiquement et chimiquement avec le matériau à graver. Une étape de photolithographie préalable permet le dépôt d'une résine photosensible structurée d'ouvertures aux endroits à graver. Ce type de gravure est anisotrope, c'est-à-dire que la gravure du matériau a lieu selon une direction préférentielle. Le type et la quantité de gaz utilisés pour générer le plasma dépend de la matière à graver. Dans notre cas nous

utilisons un réacteur de type ICP de l'anglais *Inductive Coupled Plasma*. Dans ce système, le plasma est généré par un puissant champ magnétique en radio fréquences. Ce type de réacteur permet d'obtenir une forte densité d'ions dans le plasma, et de contrôler l'énergie des ions réagissant avec le substrat grâce à une seconde source radio fréquence polarisée. La résine photosensible protectrice des zones qui ne doivent pas être structurées, est aussi gravée par le plasma. La sélectivité de gravure du substrat par rapport à la résine est définie par la vitesse de gravure de l'espèce à graver sur la vitesse de gravure de la résine photosensible utilisée. Ce paramètre permet d'anticiper l'épaisseur de résine à déposer. Dans notre cas, nous utilisons la résine ECI dont les sélectivités sont les suivantes : $V_{SiNx}/V_{ECI} = 0,6$ et $V_{SiO2}/V_{ECI} = 0,7$. Il est aussi important de connaître la sélectivité de gravure par rapport à un matériau se trouvant en dessous de celui à graver, de façon à ne pas l'attaquer s'il doit être conservé pour la suite du procédé de microfabrication. Bien que les vitesses de gravure de chaque matériau soient définies grâce à des expériences de calibration, lors de la réalisation de designs pour un dispositif complexe tel que le nôtre, le temps de gravure demande généralement une étape d'optimisation en raison d'effets plus fins intervenant pendant la gravure. En effet la surface à graver et la disposition des motifs par exemple influent aussi sur la vitesse de gravure. Nous utilisons le tétrafluorure de carbone (CF_4) afin de graver l'oxyde de nitrure de $0,6 \mu m$ et l'oxyde de silicium de $0,8 \mu m$ successivement. Nous utilisons la résine photosensible ECI avec une épaisseur de $2,4 \mu m$, suffisante pour permettre la gravure de la profondeur prévue sans être totalement gravée. La pression du gaz et la puissance RF utilisées pour générer le plasma sont $40 \text{ cm}^3/\text{min}$ et 40 W respectivement.

3.2.4. Dépôt électrolytique pour la formation de la partie supportrice et des vias de connexion

La croissance électrolytique est une technique additive consistant en la croissance d'un métal à la surface d'un substrat conducteur immergé dans bain ionique conducteur appelé électrolyte. Une étape de métallisation préalablement effectuée sur l'ensemble du wafer permet d'obtenir une couche métallique appelée *seed layer* ou base de croissance nécessaire à la croissance électrolytique lorsque la surface à métalliser est isolante. La croissance métallique s'effectue sur les régions du wafer définies par une résine structurée. En comparaison du lift-off, l'avantage de la croissance électrolytique est qu'elle permet d'obtenir des couches plus épaisses et dans le cas où le substrat présente des reliefs topographiques la métallisation s'opère sur toutes les faces au contact de l'électrolyte. Ce dernier avantage est capital pour former des connections électriques de part en part d'un substrat, appelés « vias ». Une anode est immergée dans l'électrolyte, tandis que le substrat conducteur sert de cathode, attirant ainsi les cations métalliques sur les régions conductrices non protégées de résine. La vitesse de croissance (épaisseur en fonction du temps) dépend de la densité de courant (exprimée en A/m^2). Elle dépend aussi de la chimie du bain électrolytique utilisé et en moindre mesure des équipements. La densité de courant génère la qualité du dépôt en termes de rugosité, contraintes au sein du dépôt et résistivité du matériau déposé. Dans notre cas, cette technique est utilisée pour former la partie supportrice des S-MDCs à électrodes intégrées constituée d'une épaisseur de $150 \mu m$ de Nickel. Pour la partie supportrice de la des S-MDCs à microélectrodes intégrées, la couche de Nickel est déposée à partir d'un électrolyte à base de sulfamate de Nickel avec une densité de courant de $4 A/dm^2$ pendant 215 min. Cette technique est aussi utilisée pour la formation des vias de connexion reliant les pistes de connexion face avant des S-MDCs à électrodes intégrées aux plots de contact face arrière. Dans ce cas-là, $1 \mu m$ d'or est déposé à partir d'un bain d'or sulfite avec une densité de courant de $0,2 A/dm^2$ pendant 8 min.

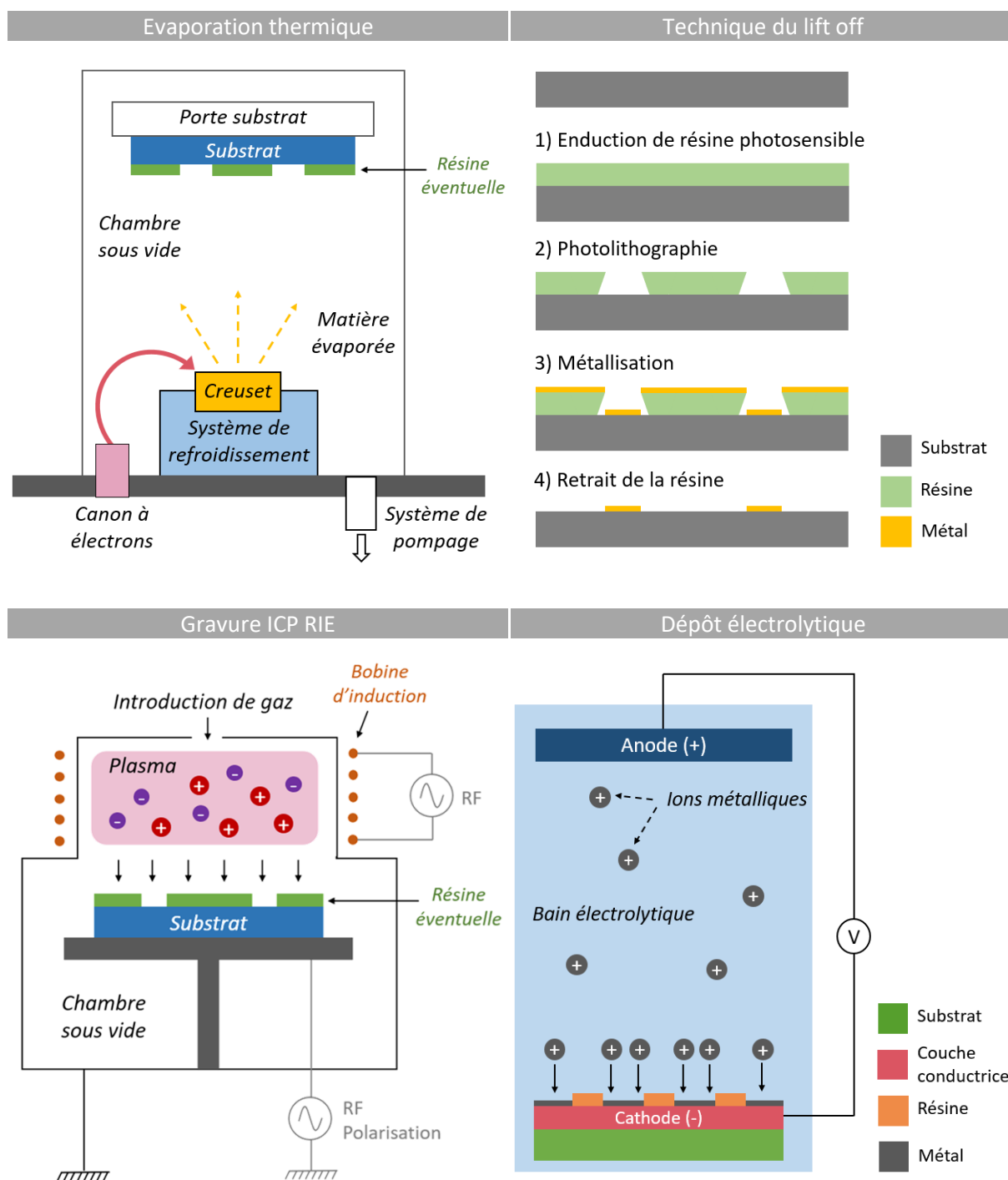


Figure 11 Représentations schématiques des différentes techniques de microfabrication employées.

3.3. Procédé de microfabrication

Le design est optimisé de façon à maximiser le nombre de dispositifs réalisés à partir d'un wafer. Le design comporte actuellement 320 dispositifs pour un wafer 4 pouces.

Six niveaux de masques ont été conçus en utilisant le logiciel CleWin. Un premier niveau (N1) correspond à l'ouverture des plots de connexion en face arrière des dispositifs. Les microélectrodes, pistes de connexion et plots de contact électrique sont définis sur un même second niveau (N2). Un troisième niveau (N3) correspond aux pores de la membrane filtrante centrées entre les paires de microélectrodes précédemment définies et aux ouvertures latérales. Le quatrième niveau (N4)

constitue les vias entre les plots de contact électrique face arrière des dispositifs et les pistes de connexion et microélectrodes face avant. L'isolation des pistes de connexion et plots de contact est définie sur le cinquième niveau (N5). Enfin un sixième et dernier niveau forme la partie supportrice en nickel (N6). Il est à noter que l'alignement entre les niveaux N2 et N3 est particulièrement critique, les ouvertures de la membrane filtrante devant être structurées au centre des microélectrodes, avec une distance de 2 μm entre les extrémités des ouvertures et des microélectrodes.

Le procédé de fabrication a été développé en collaboration avec David Bourrier, ingénieur d'étude spécialiste des dépôts électrolytiques, dans l'environnement de la salle blanche du LAAS-CNRS. Chaque niveau de structuration correspondant aux six niveaux de masque présentés précédemment nécessite une étape de photolithographie. Les différentes techniques de microfabrication présentées dans la section précédente (voir 3.2) sont employées pour la réalisation de ce procédé. La **Figure 12** résume les étapes successives du procédé de fabrication dont les détails sont présentés en Annexe.

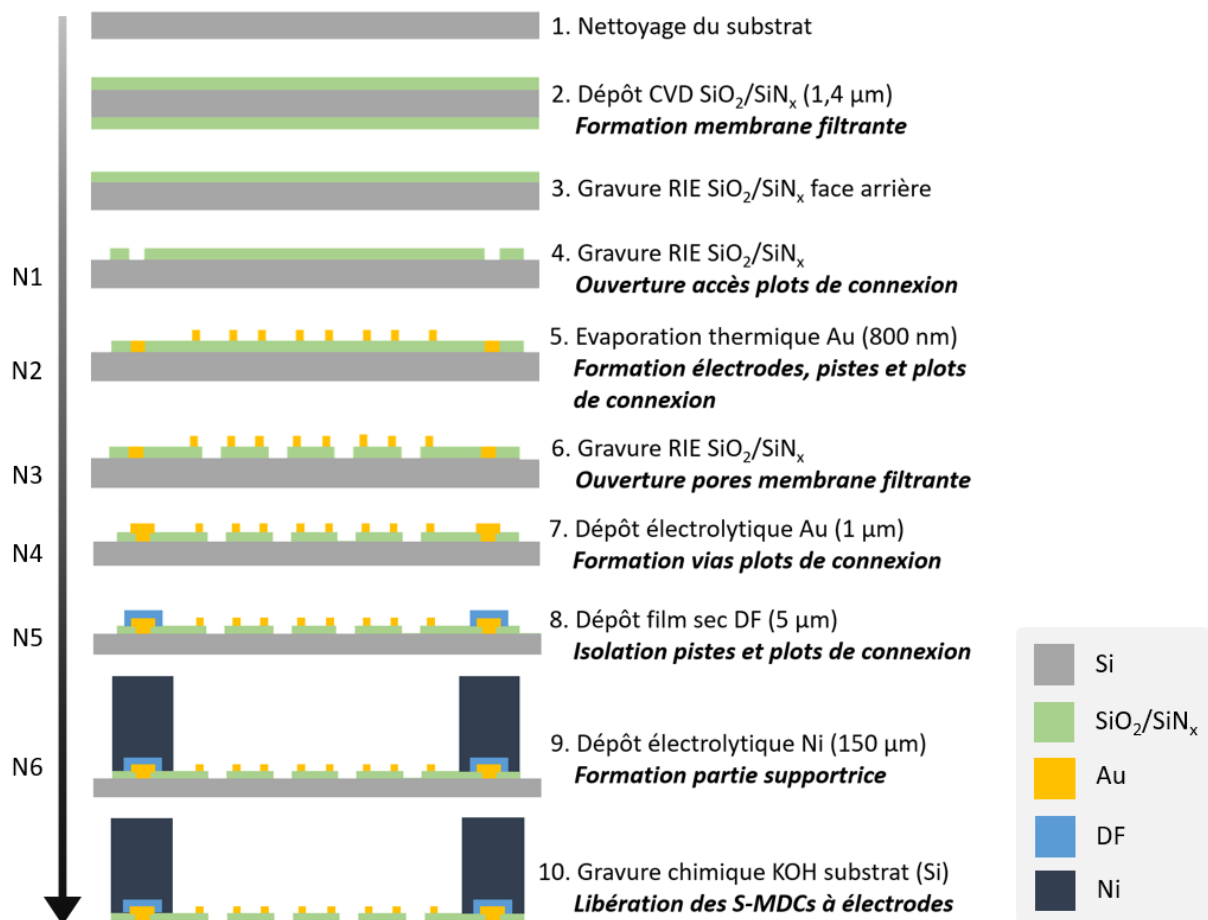


Figure 12 Représentation schématique des étapes du procédé de microfabrication des S-MDCs à électrodes intégrées. Les schémas ne sont pas à l'échelle. Le dépôt électrolytique de nickel est conforme, c'est-à-dire qu'il suit la topographie du substrat sur lequel il est déposé, cette caractéristique n'est pas représentée sur le schéma.

3.4. Caractérisation du procédé de microfabrication

Le procédé de microfabrication est caractérisé à chaque étape soit par profilométrie mécanique, microscopie optique et ou microscopie électronique à balayage (MEB). La caractérisation a pour but de vérifier que les dimensions des structures soient conformes au design ainsi que de vérifier l'état des surfaces et la bonne adhésion entre les différentes couches constitutives du S-MDC à électrodes intégrées.

Le diamètre des pores obtenus est de $10,0 \pm 0,1 \mu\text{m}$. La résine utilisée permet donc la définition de pores de la membrane filtrante de façon très précise. Par ailleurs, la maîtrise du procédé de gravure plasma RIE permet de conserver la définition de la résine pour la structuration ainsi que d'obtenir des flancs de gravure droits. Les **Figures 13a** et **13b** illustrent cette étape. La largeur et l'épaisseur des électrodes obtenues est de $3,6 \mu\text{m}$ et $0,8 \mu\text{m}$ respectivement. La largeur des pistes de connexion est de $1,6 \mu\text{m}$. Les largeurs des électrodes et pistes de connexion sont inférieures au design initial de 10% et 20% respectivement. Ceci est dû aux dimensions choisies qui se trouvent à la limite d'une structure pouvant être réalisée par la technique de photolithographie de contact avec les équipements disponibles au sein de la plateforme de micro et nanotechnologies du LAAS-CNRS.

Les **Figures 13c** et **13d** représentent les vias de connexion formés par la superposition entre les deux couches d'or. L'une de ces couches d'or est formée par évaporation thermique et constitue les microélectrodes et pistes de connexion à la surface de la membrane filtrante et la seconde est un dépôt électrolytique formant plot de contact électrique traversant la membrane filtrante et accessible en face arrière du S-MDC.

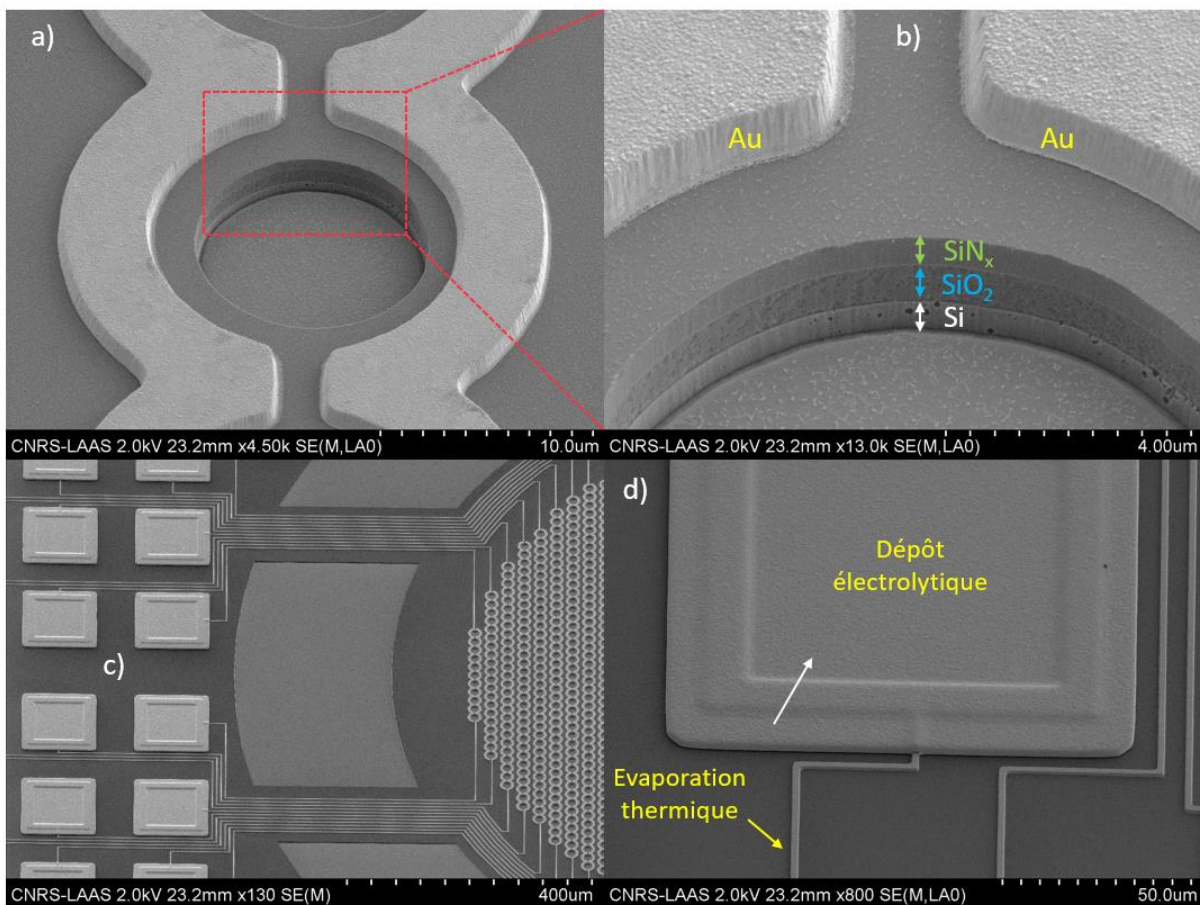


Figure 13 Images MEB du procédé de microfabrication avant libération de la membrane. a) Image d'une paire de microélectrodes circulaires de largeur $4 \mu\text{m}$ contournant un pore de diamètre $10 \mu\text{m}$. b) Grandissement permettant l'observation de la gravure du pore dans la bicouche $\text{SiO}_2/\text{SiN}_x$ d'épaisseur $1,4 \mu\text{m}$ constituant la membrane filtrante. A cette étape du procédé le substrat de silicium est toujours présent, les dispositifs n'ont pas été libérés (étape 6 de la Figure 12). La surgravure dans le substrat de silicium est visible. c) Image de la membrane filtrante comportant les microélectrodes, pistes de connexion et plots de contacts électriques disposés sur le pourtour. d) Grandissement pour observation du via de connexion constitué de la couche d'or formé par dépôt électrolytique pour la connexion entre le plot de connexion face arrière et les pistes de connexion face avant du S-MDC à électrodes intégrées. La flèche blanche désigne la zone formant le via et qui débouche en face arrière du dispositif après libération du wafer de silicium. Le dépôt électrolytique est conforme et laisse apparaître le relief de la première couche d'or déposée par évaporation thermique.

La **Figure 14a** est une image illustrant la couche de polymère DF isolant les pistes de connexion de la partie supportrice en nickel. Cette couche isolante dépasse sur une longueur de 15 μm sur la membrane filtrante, ainsi que de 5 μm de part et d'autre de la piste de connexion pour s'assurer d'une correcte isolation et prévenir des défauts de fabrication ou alignement entre les couches. Il est important de vérifier qu'il y a une bonne adhésion entre les matériaux aux zones d'interface. En effet, en fonction de la solution utilisée lors de la dernière étape de gravure chimique du silicium pour la libération des dispositifs, le DF peut avoir tendance à gonfler, ce qui engendre une fragilisation de la membrane filtrante et parfois un décollement des plots de contact électrique en face arrière des S-MDCs. Nous avons d'avantage observé ces problèmes pour des surfaces importantes de DF, pour l'isolation de plots de contacts électriques de dimensions 0,92 x 2,17 mm, que pour des surfaces réduites, dans le cas de l'isolation de plots de dimensions 0,92 x 0,7 mm. Le niveau de réticulation du polymère peut aussi influencer sur l'adhésion correcte avec la surface d'oxyde de nitrure de la membrane filtrante. Ainsi, l'exposition UV et le design doivent aussi être optimisés afin d'assurer une structuration conforme de la couche isolante de DF.

Les **Figures 14b, 14c et 14d** présentent des S-MDCs libérés du substrat, suite à la dernière étape du procédé qui consiste en la gravure chimique du silicium. Cette dernière étape est critique, car c'est seulement à la fin du procédé qu'il est possible de vérifier que la fine bicouche $\text{SiO}_2/\text{SiN}_x$ perforées des pores filtrants supporte l'intégration des microélectrodes à sa surface. La contrainte semble être supportée par la bicouche qui apparaît plane sur les images MEB avec un angle d'inclinaison approprié pour l'observation. Cette étape de gravure est longue, environ 5h30 au KOH, car la totalité du substrat de silicium est gravée, l'épaisseur d'un wafer étant typiquement de 525 μm . La **Figure 14d** présente un S-MDC à électrodes intégrées face avant. Nous observons que le dépôt électrolytique de nickel est conforme et devinons ainsi à la surface le relief des structures des plots de contacts et pistes de connexion qui présentent une épaisseur d'environ 6 μm avec la superposition de la couche isolante de DF sur l'or. Sur l'ensemble du wafer, l'épaisseur de Nickel présente une épaisseur de $150 \pm 18 \mu\text{m}$. En fonction de leur positionnement sur le wafer, les S-MDCs peuvent ainsi présenter des variations d'épaisseur significatives. Ceci présente un potentiel problème de compatibilité avec le holder pour intégration au système fluide et risque de compromettre l'étanchéité si l'épaisseur du dispositif diffère démesurément des 150 μm prévus. Le dépôt électrolytique est donc à optimiser. C'est principalement l'équipement qui influe, mais certains additifs ajoutés au bain électrolytique peuvent aussi améliorer l'homogénéité du dépôt. L'optimisation de l'homogénéité peut aussi et surtout être réalisée en amont *via* le design, en répartissant les motifs de façon homogène sur le wafer, le design le plus favorable étant celui comportant uniquement des motifs identiques. Dans ces conditions, avec l'équipement utilisé il est possible d'atteindre des inhomogénéités d'épaisseur inférieures à 7% pour la croissance de nickel. Etant donné que les masques réalisés pour cette première génération de S-MDCs à électrodes intégrés comporte de nombreux designs exploratoires, le design n'est pas adapté pour atteindre ce type d'homogénéité.

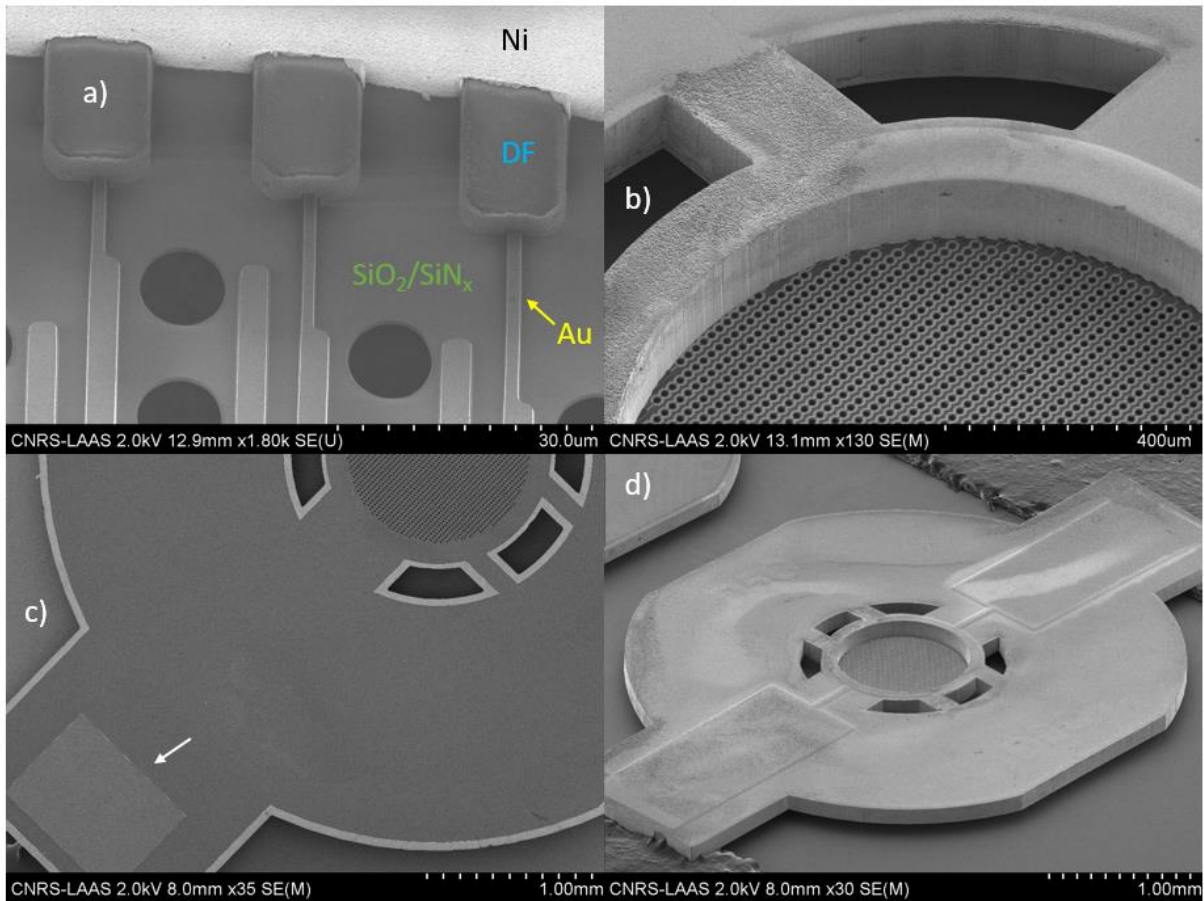


Figure 14 Images MEB du procédé de microfabrication après libération de la membrane. a) Image de la couche de polymère DF isolant les pistes de connexion en or de la partie supportrice en Nickel. b) Image face avant d'un S-MDC à microélectrodes intégrées où les ouvertures latérales sont visibles ainsi que les microélectrodes circulaires à la surface de la membrane filtrante. c) Image face arrière d'un S-MDC à microélectrode intégrées, la flèche désigne un plot de connexion. Le métal apparent face arrière est le titane qui correspond à la couche d'accroche pour l'évaporation thermique de l'or. d) Image d'un S-MDC à microélectrodes intégrées face avant à un grandissement permettant d'observer la totalité du dispositif.

A l'issue du procédé de microfabrication, les dispositifs sont rincés à l'eau DI avec précaution. En effet, une fois libérés du substrat, les S-MDCs à électrodes intégrées doivent être manipulés avec minutie car la membrane filtrante reste très fragile. Ils doivent être manipulés à la pince au niveau de la partie supportrice en nickel est des bords aplatis prévus à cet effet. Des aimants peuvent éventuellement être utilisés pour la manipulation.

4. Principe de la mesure

4.1. Instrumentation

Afin de caractériser électriquement les dispositifs, nous effectuons une spectroscopie d'impédance avec un analyseur d'impédance (Agilent 4294A). Un programme LabView communique avec l'instrument de mesure et permet d'enregistrer les données. Une station sous pointe et une binoculaire permettent de contrôler le positionnement des pointes sur les plots de contact électrique à l'aide de micropositionneurs (voir **Figure 15**). L'utilisateur définit l'amplitude de l'excitation électrique alternative ainsi que la gamme fréquentielle à balayer. En pratique, une excitation en tension est préférentiellement utilisée pour la mesure de capacités. Etant contraints par l'encombrement et le procédé de fabrication pour les dispositifs avec les microélectrodes, nous avons prévu dans le design

des paires de microélectrodes contournant des réseaux de trous de la membrane filtrante. Nous sommes donc dans la configuration de mesure à 2 électrodes. L'excitation électrique et la mesure sont adressées *via* les contacts électriques par deux pointes de mesures connectées aux bornes de tension et courant de l'analyseur d'impédance. A partir des mesures en amplitude et en phase de la tension et du courant, et selon la loi d'Ohm généralisée, l'unité de traitement de données de l'analyseur d'impédance fournit le module $|Z|$ et la phase θ de l'impédance en fonction de la fréquence. Nous nous intéressons aux basses fréquences ($< 2\text{MHz}$) afin d'exploiter les propriétés capacitives de la membrane cellulaire. Nous utilisons une excitation en tension dont l'amplitude varie entre 10 et 500 mV afin d'éviter la détérioration des microélectrodes en contact avec l'électrolyte et de préserver la viabilité des cellules biologiques. Pour nos mesures, nous effectuons un balayage logarithmique en fréquence sur 101 points et le temps d'acquisition des spectres d'impédance est d'environ 11 secondes.

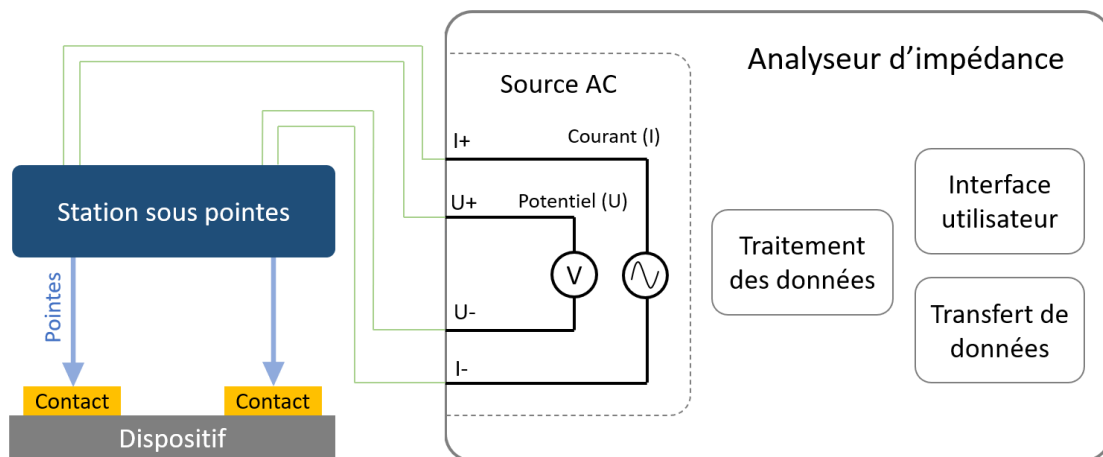


Figure 15 Représentation schématique de l'analyseur d'impédance utilisant la loi d'Ohm pour la mesure de l'impédance. L'analyseur d'impédance utilisé est doté d'une interface utilisateur et d'un module de transfert des données. L'instrument est connecté à des pointes manipulées par le biais d'une station sous pointes pour effectuer la mesure sur le dispositif étudié.

4.2. Calibrations

Généralement, la mesure peut être effectuée simplement à 2 pointes sur la paire de contact. Lorsque la mesure est effectuée à 4 pointes, elle s'affranchit de la résistance de contact à l'interface entre la pointe et le plot de connexion électrique. Dans notre cas l'impédance mesurée aux bornes de la paire de microélectrodes est comprise entre 10 M Ω et 1 k Ω sur la gamme de fréquence étudiée. La résistance théorique d'une piste de connexion (largeur 2 μm , épaisseur 800 nm voir 2.2) de longueur 2 mm est déterminée par la relation suivante :

$$R = \frac{L}{S\sigma} = 35\Omega \quad (30)$$

Avec L la longueur de la piste (exprimée en m) et S la surface de la section de la piste (exprimée en m²). La mesure de cette piste de connexion est de 34,3 $\Omega \pm 2,9 \Omega$ (n= 12). La mesure comprend la résistance de la piste de connexion en série avec la résistance à l'interface. En comparaison aux valeurs d'impédances mesurées pour le système total, cette résistance aura une influence négligeable sur la mesure totale de l'impédance. Avant la mesure, nous effectuons des calibrations sur circuit fermé et circuit ouvert représentatifs de nos systèmes en termes de dimension. Ces calibrations permettent de s'affranchir de la résistance de contact parasite ainsi que d'éventuels effets électriques induits par le substrat, c'est-à-dire les couches d'oxyde de silicium et de nitrure, de nickel et de polymère isolant

dans le cas de nos dispositifs. Ces circuits sont formés par des plots de contacts électriques intégrés à un substrat identique à celui de la partie supportrice en nickel de S-MDCs à électrodes intégrées. Ces plots de contact électrique sont espacés de 2 mm, ce qui correspond au diamètre de la membrane filtrante. Des paires de plots reliés par des pistes de connexion et non reliés forment les circuits fermés et ouverts respectivement.

L'erreur sur la mesure dépend de la fréquence et de l'amplitude de l'excitation, ainsi que de l'impédance mesurée (voir 6.3.2). Le signal de type capacitif mesuré présente une décroissance du module de l'impédance en fréquence. Nous avons mesuré de fortes impédances, de l'ordre du $G\Omega$, sur nos systèmes à basses fréquences (< 1 kHz) qui sont à la limite de la capacité de mesure de l'équipement. En pratique nous effectuons donc les mesures à des fréquences > 1 kHz.

4.3. Montage expérimental

Afin d'effectuer la mesure électrique simultanément avec l'expérience de capture, un réceptacle adapté a été conçu en collaboration avec A. Kayum Jiménez, ingénieur Développement Produits SmartCatch, Xavier Dollat, ingénieur d'études et Julie Foncy, ingénieure de recherche au sein du service I2C du LAAS-CNRS et la plateforme MultiFab du LAAS-CNRS. De la même façon que le type réceptacle utilisé pour les expériences de capture présentées dans le Chapitre 1, le réceptacle est fabriqué par impression 3D en résine DWS. Le réceptacle est composé de deux parties. La partie inférieure contient l'empreinte du S-MDC à électrodes intégrées. La partie supérieure contient l'empreinte du joint torique, celui-ci permettant d'isoler les plots de contacts électriques de la partie en contact avec le fluide au niveau de la zone de filtration (voir **Figure 16a**). Un système de verrouillage permet de sceller les deux parties du réceptacle pour connexion au système fluidique. Une ouverture sur les côtés de la partie supérieure du réceptacle permet l'accès aux plots de contact électrique pour la caractérisation électrique *via* la station sous pointes. Le réceptacle est ensuite connecté au système fluidique (tel que décrit dans le Chapitre 1), ainsi qu'au système de caractérisation électrique (voir **Figure 16b**). La caractérisation électrique peut être effectuée simultanément à l'expérimentation de capture au moyen de l'analyseur de l'impédance et de la station sous pointes (voir 4.1). Pour la caractérisation électrique, il est possible d'effectuer une spectroscopie d'impédance au début et à la fin de l'expérimentation de capture. La variation entre les spectres d'impédance pourra alors être corrélée au nombre de cellules présentes à la surface de la membrane filtrante, déterminé ultérieurement par caractérisation optique. Dans ce cas la mesure s'effectue dans le domaine fréquentiel. La mesure peut aussi s'effectuer dans le domaine temporel à partir d'une fréquence ou combinaison de fréquences d'excitation définies. Cette option permettrait de suivre les événements de capture en relevant des pics de variation d'impédance au cours du temps et en corrélant leur nombre au nombre de cellules présentes à la surface de la membrane filtrante. La caractérisation optique de la capture peut éventuellement s'effectuer *a posteriori*.

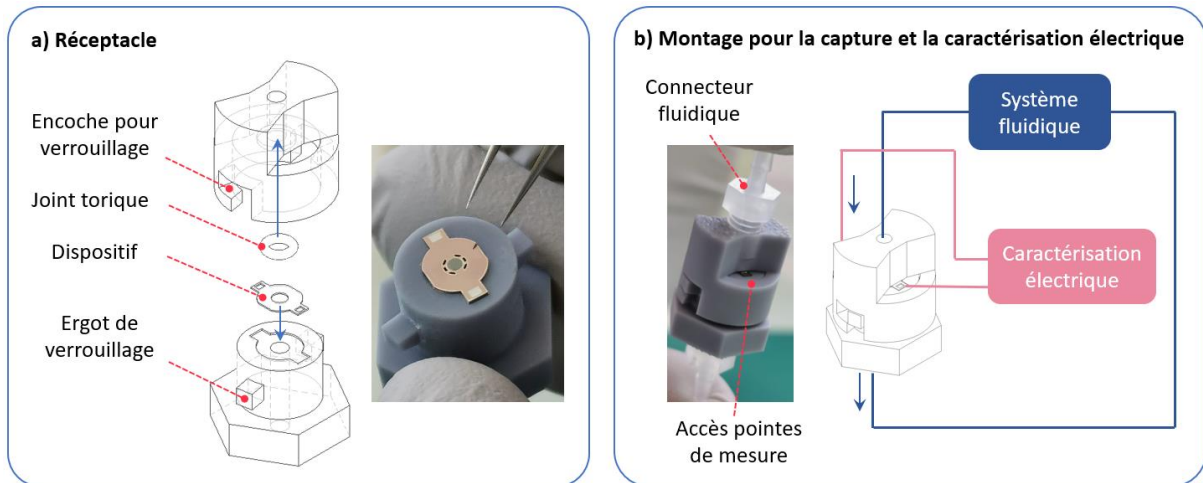


Figure 16 Montage expérimental permettant l'expérimentation de capture cellulaire couplée à la caractérisation électrique. a) Représentation schématique de l'assemblage et des deux parties constituant le réceptacle. b) Représentation schématique des connexions entre le réceptacle et le système fluidique et l'accès du système de caractérisation électrique aux plots de connexion électriques du S-MDC à électrodes intégrées.

5. Modélisation et circuit électrique équivalent

Cette section a pour objectif l'identification des différents composants électriques entrant en jeu au niveau du site de détection à la surface de la membrane filtrante des S-MDCs à microélectrodes intégrées. Nous proposons ici les éléments de base pour une description électrique analytique de notre système. Pour les descriptions qui suivent nous nous concentrons uniquement sur le site de détection des cellules tumorales c'est-à-dire dans le volume d'espace entre les microélectrodes à la surface de la membrane filtrante. Les effets électriques liés aux pistes de connexion et plots de contact électrique ne sont pas pris en compte.

5.1. Circuit électrique équivalent

5.1.1. Perturbation induite par la cellule

Le concept se base sur l'exploitation des propriétés diélectriques spécifiques des cellules tumorales à basses fréquences. Dans la gamme de fréquences que nous ciblons ($< 1\text{MHz}$), la membrane plasmique des cellules présente des propriétés électriques de type capacitives. Ainsi, il est important d'estimer la valeur de capacité générée par les microélectrodes en présence du milieu hôte, afin de comparer ces valeurs avec celles des capacités de membranes plasmiques de cellules tumorales rapportées dans la littérature (voir 1.2.3). La **Figure 17** présente un schéma de la capacité et de l'impédance générée entre les microélectrodes en absence et avec une cellule biologique retenue sur le pore filtrant. Afin de permettre la détection des cellules, la valeur de la capacité sans cellule doit être la plus faible possible, éventuellement de l'ordre de grandeur de celles des cellules qui est le pF. Si la capacité générée par les microélectrodes est trop élevée ou si des capacités parasites trop importantes sont présentes, la capacité générée par la présence de la cellule biologique entre les électrodes ne sera pas détectable. D'autres composants électriques entrent en jeu dans le système. Il est ainsi nécessaire de décrire finement le système complet au niveau du site de détection entre les microélectrodes afin d'estimer l'impédance pour les différentes configurations. Ceci permettra d'évaluer la compatibilité de notre système pour la détection de cellules tumorales à partir des données de la littérature.

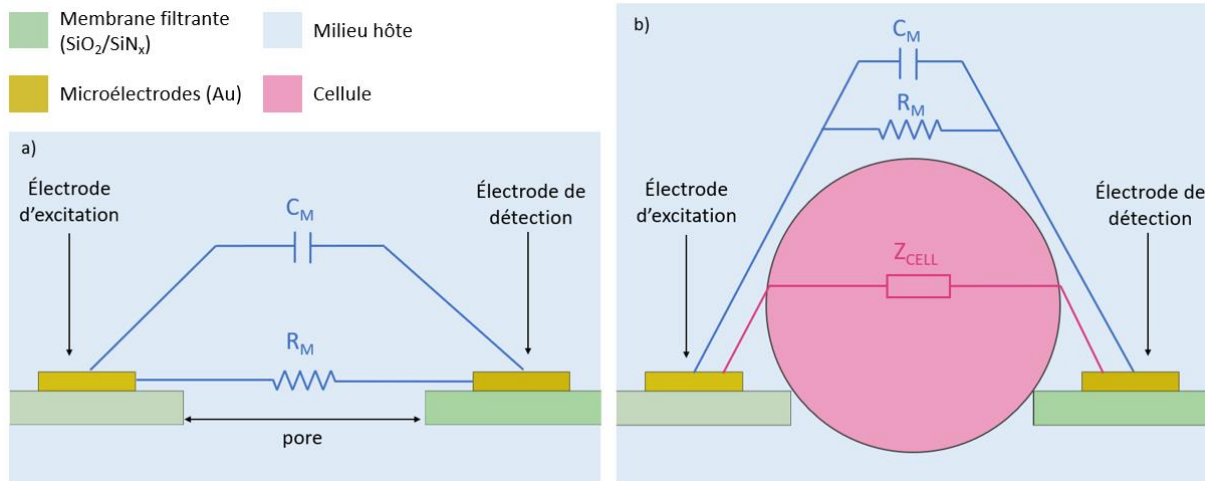


Figure 17 Représentation schématique d'électrodes coplanaires à la surface de la membrane filtrante des S-MDCs. Le schéma représente les composantes de l'impédance au niveau du volume de détection, ainsi les composantes de capacité de double couche électrique et de résistance de l'électrodes n'apparaissent pas. a) Impédance entre les microélectrodes à vide. b) Impédance entre les microélectrodes en présence d'une cellule biologique. Les schémas sont à l'échelle. La cellule est ici représentée par une sphère de 12 μm de diamètre.

5.1.2. Circuit équivalent global

Un circuit équivalent simplifié est établi de façon à tenir compte des principales composantes entrant en jeu au niveau du système de détection. La **Figure 18** présente ce circuit équivalent. Il est composé de la **résistance des électrodes R_E** , en série avec la **capacité de double couche électrique C_{DL}** se formant à l'interface entre l'électrode et l'électrolyte (voir **section**). Les éléments précédents sont en série avec l'**impédance sur le site de détection Z_{DE}** entre les microélectrodes. L'impédance Z_{DE} est constituée de la **capacité du milieu C_M** en parallèle avec la **résistance du milieu R_M** . La capacité du milieu est déclinée en deux capacités parallèles, la **capacité de gap C_G** entre les électrodes et la **capacité C_c induite par les effets de couplage**, non négligeables pour la configuration d'électrodes coplanaires. Ceci constitue un modèle simplifié du système de détection « à vide », *i.e.* sans élément à détecter entre les microélectrodes. L'**impédance Z_{CELL} d'une cellule biologique** présente sur le site de détection est ajoutée en parallèle à la capacité et résistance du milieu, C_M et R_M . Il s'agit là d'une description très approximative. Nous pourrions également songer que si la cellule contacte les électrodes et occupe tout le volume sondé par les électrodes planaires, il conviendrait tout simplement de remplacer C_M et R_M par Z_{CELL} et non pas d'ajouter Z_{CELL} en parallèle. De même, nous faisons l'hypothèse que les capacités de double couche ne sont pas affectées par la présence de la cellule, ce qui est loin de faire évidence. En l'absence d'expériences dédiées à étudier la conformation précise des cellules capturées dans les pores et au contact des électrodes, nous avons donc fait un choix de schéma équivalent en présence de la cellule qui est tout à fait arbitraire et méritera d'être revu en fonction des résultats expérimentaux obtenus. Le présent schéma équivalent a pour simple objectif de déterminer des ordres de grandeurs pour se placer dans des conditions propices à la détection mais n'a pas vertu à servir d'interprétation fiable des futurs résultats expérimentaux. Notons que à notre grande surprise, la littérature dans le domaine utilise généralement la même hypothèse de travail sans discuter de sa possible invalidité. Il s'agit, à notre avis, d'un point très important que ce travail de thèse en l'état actuel d'avancement du projet n'a pas permis d'élucider mais qui nous semble très important de garder à l'esprit pour interpréter les résultats futurs. La cellule biologique ayant une structure complexe, des modèles plus ou moins simplifiés sont déterminés afin de représenter l'impédance Z_{CELL} (voir 1.2.4). Au système total décrit précédemment s'ajoutent en parallèle la **capacité de substrat sur lequel sont intégrées les électrodes C_S** et la **capacité parasite C_P** .

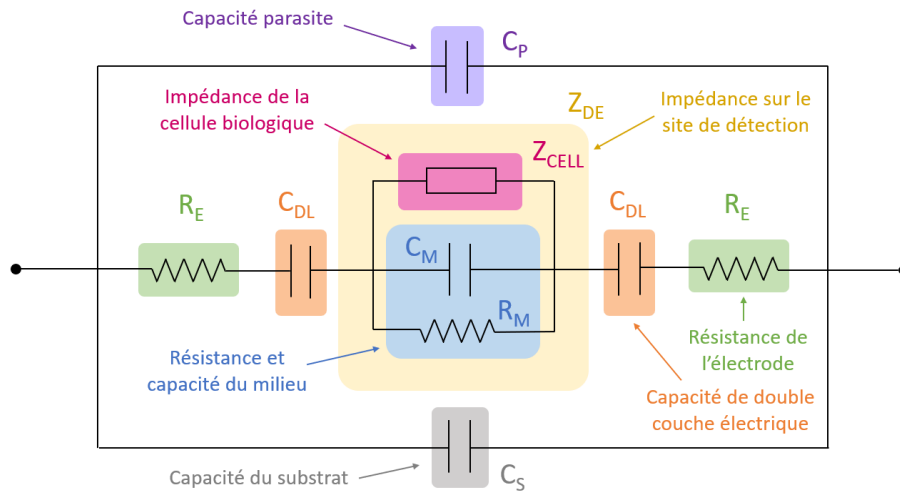


Figure 18 Schéma du circuit équivalent

Le design du système doit être optimisé afin de répondre aux facteurs de performance (voir 1.4.4) et permettre la détection de l'élément d'intérêt. En pratique, l'enjeu est de concevoir un système dont la capacité effective à vide ne soit pas trop importante de façon à ne pas masquer la capacité de la cellule biologique à détecter. Afin de permettre la détection, la composante dominante de l'impédance du système total doit correspondre à celle du site de détection Z_{DE} entre les microélectrodes. Les composantes annexes doivent être négligeables afin de ne pas prévaloir sur l'impédance totale du système et parasiter la détection entre les microélectrodes. De façon à exploiter les propriétés capacitives de la membrane plasmique aux basses fréquences, l'impédance du système doit être gouvernée par les capacités en présence sur le site de détection.

5.2. Éléments analytiques

Nous allons décrire analytiquement les composantes entrant dans le modèle électrique équivalent décrit dans le paragraphe précédent et donner des ordres de grandeur de ces éléments. Les calculs d'estimation des valeurs des différents composants sont effectués en présence d'un milieu tampon phosphate salin (PBS) possédant une permittivité relative et conductivité $\epsilon_R=80$ et $\sigma=1,6$ S/m respectivement⁵⁸. Dans la description analytique du système qui suit, nous négligeons les capacités de substrat et parasite C_S et C_P .

5.2.1. Capacité électrodes coplanaires

Une paire de microélectrodes coplanaires génère un champ électrique non uniforme et ne peut donc pas être assimilée au modèle du condensateur plan idéal. La capacité résultante du champ électrique non uniforme, dépend de la géométrie des électrodes coplanaires et a été développée par la théorie des transformations conformes⁷⁷. La Figure 19 présente les paramètres géométriques des microélectrodes pris en compte pour la description analytique de la capacité générée entre les microélectrodes coplanaires.

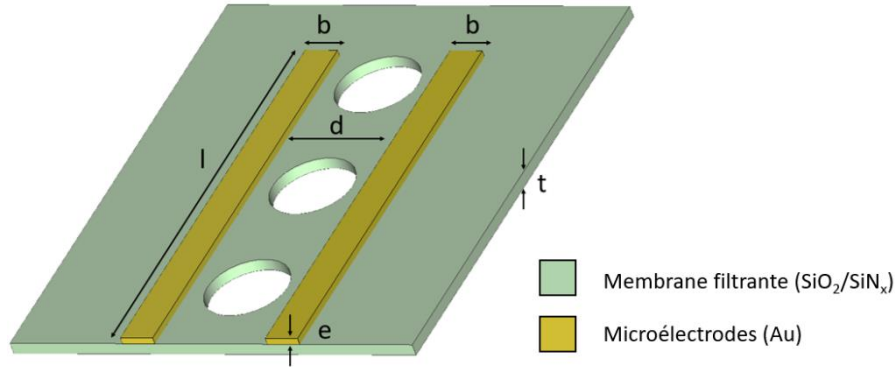


Figure 19 Spécification des dimensions d'un exemple de paire de microélectrodes parallèle contournant trois pores.

La capacité générée entre les microélectrodes peut être calculée comme suit :

$$C_M = \frac{\pi \epsilon_0 \epsilon_{eff} l}{\ln\left(\frac{\pi d}{b+e} + 1\right)} \quad (31)$$

Avec e l'épaisseur, l la longueur, b la largeur des électrodes et d l'espacement entre elles. Sur la Figure 19, le paramètre t représente l'épaisseur verticale séparant les électrodes du plan de masse. Typiquement $b=4 \mu\text{m}$, $d=14 \mu\text{m}$ et $t=1,6 \mu\text{m}$ et l est variable en fonction du nombre de pores contournés et est égal à $15 \mu\text{m} \times (\text{nombre de pores})$, dans le cas de trois pores comme représenté Figure 19, $l=45 \mu\text{m}$. Dans le cas où $t \approx (d+b)$, alors $\epsilon_{eff} = (\epsilon_{r1} + \epsilon_{r2})/2$ avec ϵ_{r1} la permittivité relative du milieu entre les microélectrodes et ϵ_{r2} la permittivité relative du substrat. Dans notre cas $t/(d+b) \approx 0,07 \ll 1$. Dans ce cas, $\epsilon_{eff} \approx \epsilon_{r1}$.

Pour le cas de la paire d'électrode parallèle contournant un pore unique, la valeur de capacité est ainsi estimée à $C_M=14,3 \text{ fF}$. La capacité C_M étant proportionnelle à la longueur des microélectrodes, la valeur estimée est à multiplier par le nombre de pores pour des microélectrodes de tailles différentes qui contournent un certain nombre de pores disposés sur un même axe. Cette valeur paraît adaptée au regard des valeurs de capacités de la membrane plasmique des cellules tumorales rapportées dans la littérature qui présentent des valeurs de l'ordre du pF.

5.2.2. Capacité double couche électrique

Tel qu'évoqué dans la section 1.3.3, la capacité de double couche électrique est modélisée par un élément à phase constante. Nous rappelons ici la réactance correspondante qui est la suivante :

$$Z_{CPE} = \frac{1}{(j\omega C_{DL})^n} \quad (32)$$

A noter que C_{DL} exprimé de cette façon n'est pas homogène à une capacité. Pour estimer une valeur de C_{DL} , nous pouvons considérer que pour $n=1$,

$$Z_{CPE} = \frac{1}{j\omega C_{DL,0}} \quad (33)$$

Avec la capacité $C_{DL,0}$ la capacité de double couche estimée à partir de l'hypothèse d'une faible concentration de l'électrolyte ³⁴:

$$C_{DL,0} = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A}{L_D} \quad (34)$$

Où ε_r est la permittivité de l'électrolyte, A la surface active de l'électrode (exprimée en m^2) et L_D la longueur de Debye (exprimée en m) de l'électrolyte à une concentration donnée. Pour la surface active A de la microélectrode dans notre cas, nous considérons toutes les surfaces en contact avec l'électrolyte, c'est-à-dire $A = 2be + lb + 2le$.

Et donc,

$$C_{DL} = C_{DL,0}^{\frac{1}{n}} \quad (35)$$

Le modèle d'élément à phase constante prend en compte la rugosité de la surface de l'électrode en contact avec l'électrolyte pour estimer la valeur de la capacité de double couche. Les valeurs de n et L_D sont fournies dans une étude présentant des conditions similaires à celles de notre cas, ainsi la valeur typique de n pour des microélectrodes en or est 0,9 et celle de L_D pour le tampon phosphate salin (PBS) de concentration identique à celle utilisée dans nos expériences (1X) de spectroscopie d'impédance est 1 nm ³⁴.

Dans notre cas, pour la paire d'électrode parallèle contournant un pore, la valeur de capacité de double couche est estimée à $C_{DL}=4,7 \text{ pF}$. La capacité de double couche présente un facteur 10^3 avec la capacité générée entre les microélectrodes. Ici aussi, la valeur de C_{DL} étant proportionnelle à la longueur de la microélectrode, elle peut être déterminée pour les différentes tailles de microélectrodes en multipliant par le nombre de pores.

5.2.3. Modèle de la cellule

Nous avons choisi le modèle le plus simple à deux éléments constitué de la résistance du milieu intracellulaire (cytoplasme) R_i et de la capacité de membrane C_{Mem} associées en série tel que décrit par le modèle de Fricke valable aux basses fréquences (voir 1.2.4). Nous ne décrivons donc pas la membrane cellulaire par un élément à phase constante mais par une capacité idéale. L'impédance Z_C de la cellule est alors définie comme suit :

$$Z_{Cellule} = R_i + \frac{1}{j\omega C_{Mem}} \quad (36)$$

A basse fréquence, la capacité de membrane étant dominante, nous négligeons la résistance du cytoplasme pour la description de notre système. Ainsi nous obtenons simplement :

$$Z_{Cellule} = \frac{1}{j\omega C_{Mem}} \quad (37)$$

La valeur de la capacité de membrane d'une cellule PC-3, issue d'une lignée de cellules tumorales de cancer de la prostate, rapportée dans la littérature est $C_{Mem}=37 \text{ pF}$. Il est nécessaire de noter que cette capacité correspond à la capacité totale de la membrane plasmique de la cellule, qui n'est pas forcément entièrement sondée par le champ électrique généré entre les microélectrodes.

5.2.4. Expression de l'impédance entre les microélectrodes

Nous négligeons la capacité de substrat C_s , c'est à dire induite par la bicouche d'oxyde de silicium et nitrure de la membrane filtrante, et la capacité parasite C_p pour l'estimation de l'impédance. Ces deux capacités s'ajoutent en parallèle de l'impédance entre les microélectrodes. L'impédance entre les microélectrodes s'exprime alors de la manière suivante :

$$Z = 2R_E + \frac{2}{j\omega C_{DL}} + Z_{DE} \quad (38)$$

Avec R_E la résistance d'une électrode qui est estimée à $R_E=0,103 \Omega$ pour une électrode de géométrie parallèle. Cette valeur peut être multipliée par le nombre de pores que contourne la paire de microélectrodes pour déterminer la résistance d'électrodes de différentes tailles. Cependant, cette valeur de résistance de l'électrode reste négligeable au regard des autres termes en jeu. La valeur du terme correspondant à la prise en compte des **capacités de double couche générées sur chaque électrode est estimée à 189 kΩ** pour une fréquence de 100 kHz.

Le terme Z_{DE} correspond à l'impédance sur le site de détection et s'exprime de la manière suivante en absence de cellule entre les microélectrodes :

$$Z_{DE} = \frac{R_M}{R_M j\omega C_M + 1} \quad (39)$$

Pour notre géométrie de microélectrodes parallèles, la résistance du milieu entre les microélectrodes R_M s'exprime comme suit :

$$R_M = \frac{d}{A\sigma} \quad (40)$$

Avec A la surface active de l'électrode et σ la conductivité du milieu. La valeur de R_M pour la paire d'électrodes parallèle contournant un pore est $R_M=96 \text{ k}\Omega$. Cette valeur peut être divisée par le nombre de pores que contourne la paire de microélectrodes pour déterminer la résistance du milieu entre des électrodes de différentes tailles. L'expression de R_M peut être affinée en considérant le temps de relaxation qui est une constante caractéristique du matériau étudié ($RC = \epsilon/\sigma$). Ainsi nous obtenons :

$$R_M = \frac{\ln\left(\frac{\pi d}{b+e} + 1\right)}{\pi l \sigma} \quad (41)$$

Nous obtenons alors une valeur de $R_M=31 \text{ k}\Omega$. La valeur de C_M étant négligeable en comparaison de R_M , l'impédance Z_{DE} pour une fréquence de 100 kHz est estimée à $Z_{DE} \approx R_M = 31 \text{ k}\Omega$.

En présence de cellule logée entre les microélectrodes, l'impédance est la suivante :

$$Z_{DE} = \frac{R_M}{R_M j\omega(C_M + C_{Mem}) + 1} \quad (42)$$

La valeur de Z_{DE} pour une fréquence de 100 kHz est estimée à $Z_{DE}=18 \text{ k}\Omega$. Nous observons une **réduction d'environ 13 kΩ sur le module de l'impédance au niveau du site de détection** en présence d'une cellule entre les microélectrodes. Ceci reste un modèle très simplifié du système et la totalité de la cellule est prise en compte ce qui n'est très probablement pas le cas avec cette configuration de microélectrodes. Des simulations électriques peuvent permettre d'estimer la cartographie du champ électrique et de visualiser la proportion de cellule en interaction avec ce champ. Toutefois, les ordres de grandeur mis en avant dans les descriptions analytiques et calculs d'estimation précédents montrent qu'il paraît être possible de détecter une variation d'impédance significative en présence d'une cellule entre les microélectrodes contournant un pore de la membrane filtrante.

6. Caractérisation électrique dans un milieu simple

Dans un premier temps, dans l'objectif de simplifier les expérimentations et d'obtenir des premières caractérisations électriques expérimentales du design d'électrode établi, des dispositifs 2D ont été conçus. Pour ces dispositifs 2D, les microélectrodes conçues selon des géométries et

configurations identiques à celles présentés précédemment sont disposées sur un substrat. Des puits sont gravés dans le substrat entre les microélectrodes afin de modéliser les pores de la membrane filtrante des S-MDCs. De cette façon, la caractérisation électrique est simplifiée car nous nous affranchissons de l'étape de capture des cellules tumorales par le biais des S-MDCs. En effet, la mesure est effectuée sur des cellules adsorbées au niveau des puits gravés entre les microélectrodes dans le but de vérifier si la détection électrique de cellules entre les électrodes coplanaires est possible. Ainsi pour ces mesures nous ne travaillons pas en présence d'un flux traversant une membrane filtrante mais avec une incubation statique du milieu contenant les cellules au niveau des microélectrodes. Notons que cette configuration expérimentale est très limitante. En effet, les cellules simplement sédimentées à la surface des dispositifs n'adoptent pas du tout la même configuration que des cellules capturées par des pores débouchants. Ainsi il est probable que cette configuration de validation soit moins favorable à la détection cellulaire qu'une configuration sous flux, pour laquelle les cellules se centrent sur les pores et forment donc avec les électrodes entourantes un contact plus intime et plus reproductible.

6.1. Dispositifs exploratoires 2D

6.1.1. Concept et description générale

Les dispositifs 2D sont fabriqués sur un substrat de silicium, préalablement passivé d'une couche de 1 μm de SiO_2 afin de prévenir les fuites de courant dans le substrat. Les dispositifs 2D se composent de puits de 10 μm de diamètre et 1 μm de profondeur qui « miment » les pores de nos S-MDC. Des microélectrodes coplanaires de formes parallèles et circulaires entourent les puits selon différentes configurations. Les dimensions des microélectrodes, pistes de connexion et plots de contact électrique sont identiques à celles présentées pour les S-MDCs à électrodes intégrées (voir 2.2.3). Elles sont formées à la surface du substrat lors d'une étape technologique identique d'évaporation et de lift off d'une bicouche de 100 nm de Titane et de 700 nm d'Or. Une cuve circulaire de diamètre 800 μm en résine permet de contenir le milieu et les éventuelles cellules à détecter. Les pistes de connexion relient les électrodes disposées à l'intérieur de la cuve avec les plots de contact électriques situés à l'extérieur de la cuve. La **Figure 20** présente une vue de coupe d'un dispositif 2D. Le diamètre de la cuve est identique au diamètre de la surface occupée par la membrane filtrante des S-MDCs. Ainsi il est envisageable d'étudier de nouveaux designs et configurations d'électrodes qui seront transposables à la géométrie des S-MDCs, s'ils s'avèrent exploitables.

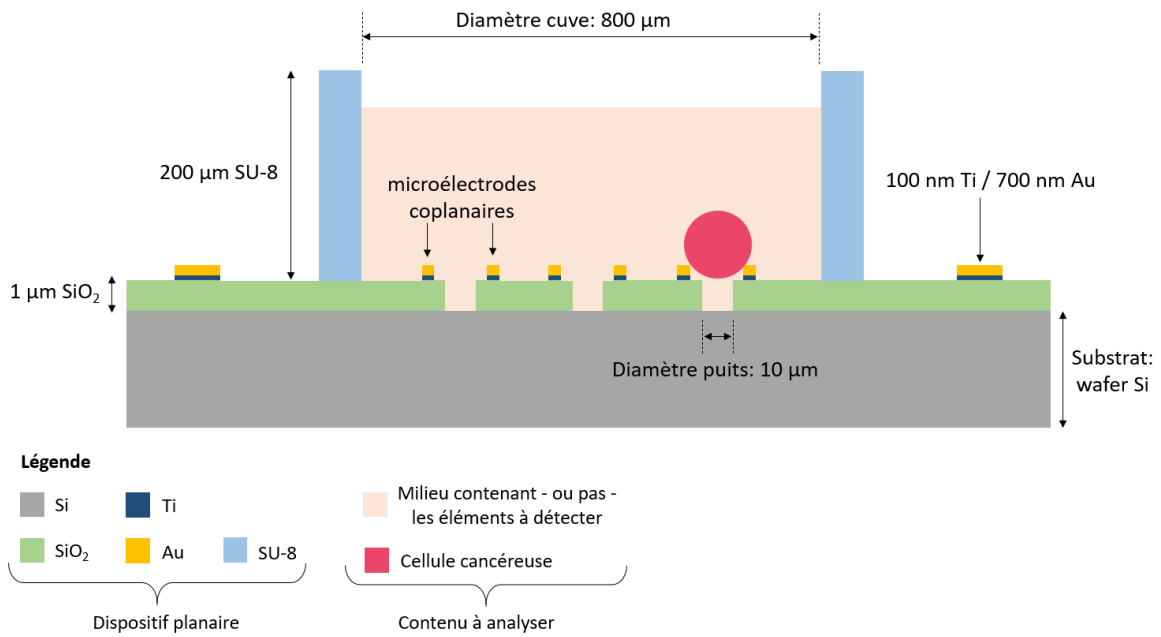


Figure 20 Schéma représentant une vue en coupe d'un dispositif planaire exploratoire avec la cuve d'incubation en résine contenant la suspension à analyser. Le schéma n'est pas à l'échelle.

6.1.2. Description des différents designs

Différents designs ont été conçus selon les arrangements, les longueurs et formes d'électrodes dont un ensemble de designs comprenant une surface d'électrodes proche de celle de la membrane filtrante des S-MDCs et donc transposables à leur géométrie. Ces designs transposables aux S-MDCs comprennent des versions avec un réseau de paires d'électrodes rapprochées et de même longueur contournant 39 puits disposés sur un même axe linéaire (voir Figure 21c), ce design est appelé D_{LIGNE} dans la suite du manuscrit. Une autre version de ce type de design comporte une seule paire d'électrode couvrant la totalité de l'équivalent de la surface filtrante (voir Figure 21a), ce design sera appelé D_{TOTAL} dans la suite du manuscrit. Pour ce design, les deux électrodes interdigitées contournent l'ensemble de réseaux linéaires de puits, avec un total de 340 puits. Un autre ensemble de design constitue des dispositifs d'investigation, et vise à comparer les électrodes en fonction du nombre de puits sondés et donc de la longueur de microélectrodes. Ce design permet d'étudier la réponse électrique de 18 puits sondés jusqu'à seulement 1 puit sondé, ce qui correspond à la détection d'une cellule unique, ce design est appelé D_{N_PUITS} . Pour ce design, les électrodes sont espacées sur la surface de la cuve et elles contournent de 1, 4, 7, 10, 13 ou 18 puits. La Figure 21b présente les dimensions d'une paire d'électrodes à 1 puits.

Pour tous les designs D_{LIGNE} , D_{TOTAL} et D_{N_PUITS} , des versions identiques existent avec des électrodes parallèles ou circulaires. L'ensemble des dispositifs 2D correspondant aux différents designs présentés sont disposés sur un wafer de silicium.

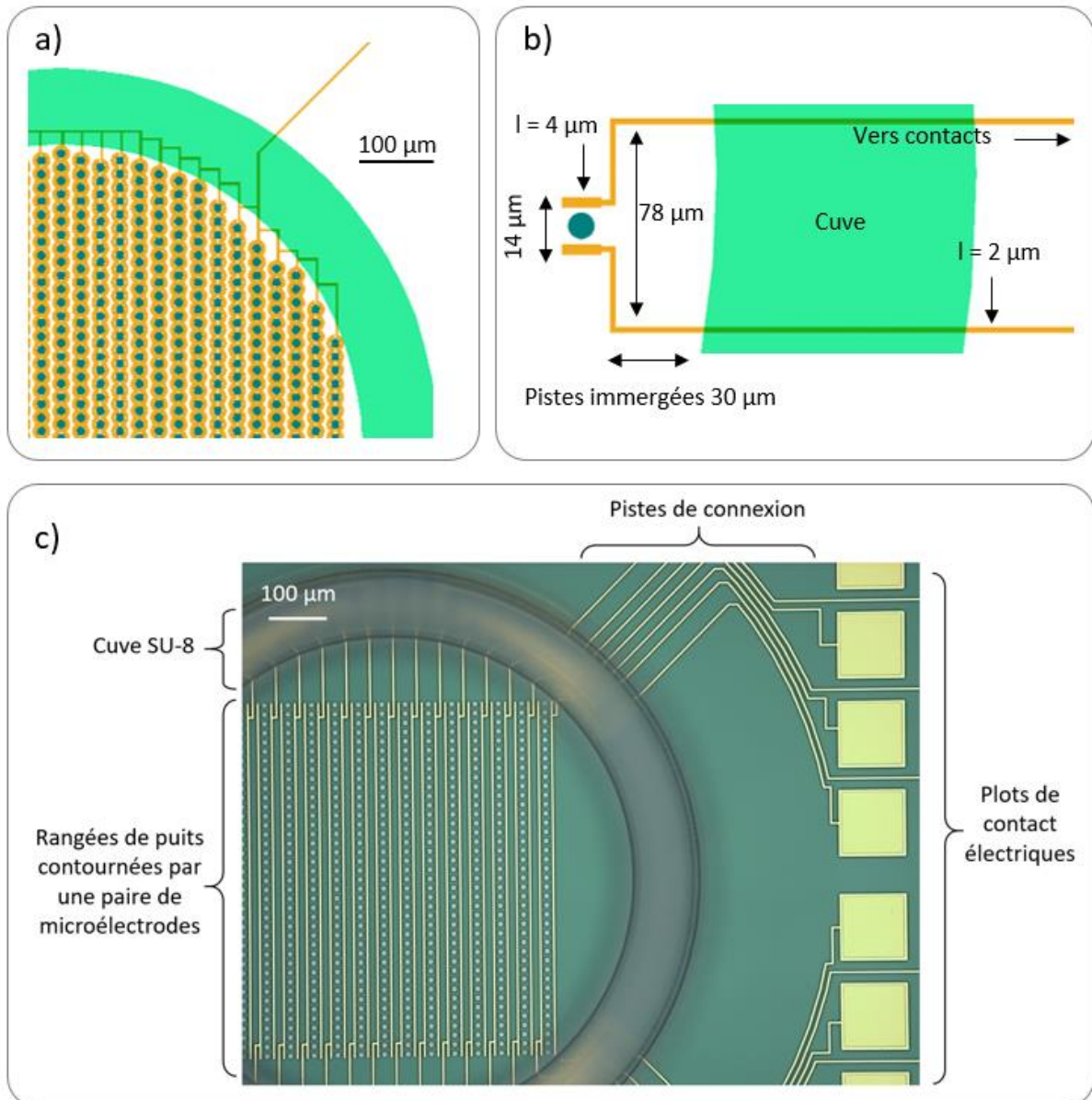


Figure 21 Illustrations des différents designs des dispositifs exploratoires 2D. a) Schéma du design D_{TOTAL} : 1 paire de microélectrodes circulaires interdigitées contournent les puits sur l'équivalent de la surface filtrante des S-MDCs. b) Schéma et dimensions d'une paire de microélectrode parallèles du design D_{N_PUITS} contournant un puit unique. c) Image d'un dispositif de design D_{LIGNE} : 14 paires de microélectrodes parallèles contournant 39 puits.

L'objectif principal de cette étape intermédiaire de caractérisation électrique de dispositifs planaires est l'investigation du signal électrique obtenu sur les différentes configurations d'électrodes et l'obtention d'une preuve de concept de l'impact diélectrique de cellules de lignée cancéreuse sur l'impédance mesurée entre les microélectrodes.

6.2. Caractérisation électrique par spectroscopie d'impédance

Les caractérisations électriques présentées dans cette partie sont préliminaires, elles sont le fruit d'un nombre limité de campagnes expérimentales. Des études systématiques sur un plus grand nombre de séries d'expériences seraient nécessaires pour consolider ces premiers résultats et établir des conclusions. Néanmoins, les résultats présentés permettent d'obtenir l'allure générale du signal

et des ordres de grandeurs des valeurs d'intérêt telles que le module et la phase de l'impédance, ainsi que la capacité expérimentale du système.

6.2.1. Précisions sur les mesures et protocole expérimental

Les designs des dispositifs ayant été conçus pour être compatibles dimensionnellement avec les S-MDCs, le diamètre de la cuve est de 800 μm et sa hauteur de 200 μm , afin de permettre aux cellules une sédimentation en un temps limité. Cette configuration résulte en un faible volume, ~ 100 nL, soumis à une évaporation en un temps d'environ 20 minutes à l'air libre. Afin de prévenir l'évaporation pour pouvoir mener la caractérisation électrique, un capot en polydiméthylsiloxane (PDMS) d'épaisseur de 1 à 2 mm et de diamètre 2 mm est positionné au-dessus de la cuve après remplissage de la solution à analyser. Le PDMS est préparé à un ratio de 1:5 d'agent réticulant et de polymère permettant de limiter la diffusion d'oxygène⁷⁸ et prévenir ainsi de l'évaporation, ainsi la solution peut être maintenue jusqu'à 4 heures au sein de la cuve.

Dans un premier temps les dispositifs sont caractérisés « à vide » sans cellules cancéreuses à détecter, en présence de milieu seulement. Des mesures sont menées sur milieu de culture RPMI et du sérum physiologique tampon phosphate salin PBS (en anglais *Phosphate Buffered Saline*). Dans le cas du milieu de culture, afin de simplifier la solution à analyser et prévenir des interactions de protéines avec le champ électrique, le milieu RPMI est choisi sans les protéines nécessaires à la culture cellulaire (sans ajout de sérum veau fœtal et des antibiotiques pénicilline et streptomycine) et sans rouge de phénol.

Des mesures ont été effectuées dans le domaine fréquentiel sur la gamme 1 kHz - 1 MHz afin d'étudier la réponse électrique des dispositifs. La spectroscopie d'impédance effectuée pour la caractérisation de ces dispositifs planaires est menée avec un analyseur d'impédance Agilent 3942 (voir 4.1). Les résultats des mesures sont des graphiques présentant l'évolution du module et de la phase de l'impédance en fonction de la fréquence de l'excitation en tension appliquée. Les différents designs de dispositifs ont été explorés. Les résultats mettent en avant l'influence du nombre de puits sondés avec des paires de microélectrodes qui sont nommées 1p à 39p pour des électrodes contournant 1 puits à 39 puits respectivement, la reproductibilité de la mesure pour une géométrie de microélectrode donnée, et l'influence d'une couche d'oxyde au-dessus des microélectrodes sur l'impédance mesurée.

La durée de vie des électrodes n'a pas été caractérisée rigoureusement, cependant certains dispositifs ont été soumis à des excitations électriques répétées au cours des différentes expérimentations effectuées (> 20) et à des cycles de nettoyages et remplissage du milieu à caractériser (PBS, RPMI) et nous n'avons pas observé visuellement de détérioration des électrodes. Le procédé de fabrication des microélectrodes pour intégration aux S-MDCs permet d'obtenir des microélectrodes conformes au design spécifié de façon reproductible et assez robustes pour l'application souhaitée.

6.2.2. Influence du nombre de puits sondés

La **Figure 22** présente l'évolution du module et de la phase de l'impédance en fonction du nombre de puits sondés pour des paires de microélectrodes parallèles contournant 1 à 39 puits disposés selon un même axe.

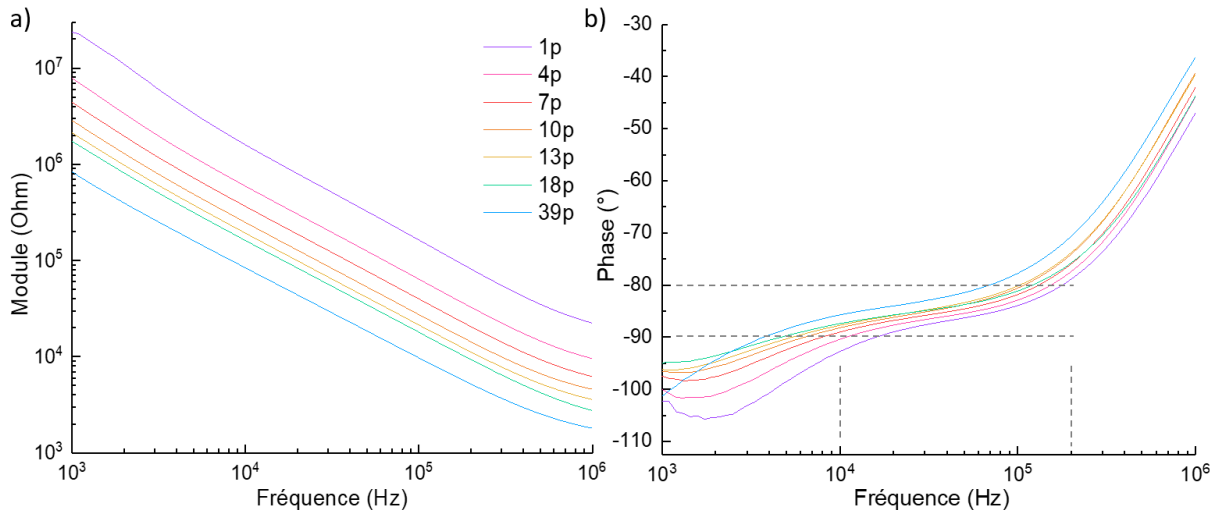


Figure 22 Influence du nombre de puits sondés entre des microélectrodes parallèles en présence de milieu RPMI. Pour les paires de microélectrodes 1p à 18p, un dispositif D_{N_PUITS} est utilisé avec une excitation de 50 mV. Pour la paire 39p, un dispositif D_{LIGNE} est utilisé avec une excitation de 10 mV. a) Module de l'impédance. b) Phase de l'impédance.

Nous observons tout d'abord une évolution linéaire du module de l'impédance en échelle logarithmique. Ceci traduit le comportement typique d'un comportement capacitif, ou d'un comportement capacitif non idéal (voir 1.2.4) dont le module de l'impédance (exprimé en Ω) s'exprime comme suit :

$$|Z| = \frac{1}{(C2\pi f)^n} \quad (43)$$

Avec n compris entre 0 et 1, C une constante homogène à une capacité dans le cas où $n=1$ (alors exprimée en F) et f la fréquence en (Hz). En représentation log-log, le paramètre n est égal à la pente du signal. La pente du module de l'impédance est relativement constante pour l'ensemble des paires de microélectrodes mesurées sur les différents dispositifs. Cette pente varie de -1 à -0,9 $\log(\Omega)$ /décade pour les différentes paires d'électrodes sur la gamme de fréquences 1 kHz - 100 kHz. La pente de -1 $\log(\Omega)$ /décade correspondant au cas $n=1$, est celle attendue pour l'impédance d'un condensateur. La seconde pente de -0,9 $\log(\Omega)$ /décade correspondrait à une impédance de condensateur non idéal représenté par un élément d'impédance à phase constante utilisé pour décrire une double couche électrique. Expérimentalement, nous obtenons donc $0,9 < n < 1$ pour l'ensemble de mesures présentées en **Figure 22**. Le paramètre n mesuré expérimentalement se rapproche de celui rapporté dans la littérature, $n=0,9$, pour la caractérisation d'une double couche électrique formée à la surface de microélectrode en or ³⁴. Etant donné que nous observons une dépendance de l'impédance en puissance de la fréquence pour une partie des mesures, l'impédance de notre système sur cette gamme de fréquence est probablement dominée par la capacité de double couche électrique générée à la surface des microélectrodes.

La pente du module de l'impédance diminue légèrement à des fréquences > 300 kHz, probablement sous l'effet de la résistance du milieu qui domine dans une gamme de fréquences supérieure (voir 1.3.3). Ceci s'observe plus facilement sur le graphique présenté en **Figure 24** présentant le module de l'impédance jusqu'à 2 MHz. Une fréquence de coupure d'environ 300 kHz délimitant la gamme de fréquence dominée par la capacité de double couche de celle dominée par la résistance du milieu entre les électrodes est cohérent avec l'analyse analytique de notre système (voir section 6.2.4).

La phase présente une allure plus exotique que celle d'un simple condensateur ou élément à phase constante. En effet elle n'est pas constante sur la gamme de fréquence caractérisée. Elle est d'environ -100° aux basses fréquences, puis présente une allure de plateau entre 10 kHz et 200 kHz environ avec des valeurs comprises entre -90° et -80° pour finalement remonter à une valeur d'environ -45° . Les valeurs aux basses fréquences sont davantage bruitées. Expérimentalement à 1kHz, l'impédance est très forte et proche de la limite de capacité de mesure de l'équipement ($|Z| \sim 10^7 \Omega$), le bruit l'emporte et génère des signaux « aberrants » difficilement interprétables du point de vue de la phase de l'impédance. Pour $n=0,9$ dans le modèle de l'élément d'impédance à phase constante, la valeur de phase théorique est $\theta = -90^\circ * 0,9 = -81^\circ$. Il est donc possible que le plateau observé entre 10 kHz et 200 kHz soit caractéristique de la capacité de double couche électrique. La remontée en phase à des fréquences > 200 kHz correspond probablement à l'effet de la résistance du milieu.

Le module de l'impédance décroît avec la longueur de la microélectrode. Cela a du sens car la capacité, que ce soit celle générée entre les microélectrodes ou celle de double couche électrique, est proportionnelle à la longueur de l'électrode (voir 5.2.1 et 5.2.2), et le module de l'impédance inversement proportionnel à la capacité. Les capacités expérimentales ont été extraites à partir des mesures d'impédance de paires d'électrodes de longueurs différentes d'un dispositif de design D_{N_PUITS} à électrodes parallèles. Le **Tableau 4** présente ces valeurs expérimentales ainsi que les valeurs de capacité de double couche électrique et de capacité générée entre les microélectrodes estimées analytiquement pour comparaison. Ces valeurs de capacité expérimentales sont déterminées à partir de la relation 32 en considérant $n=1$ avec les mesures de module de l'impédance relevées à 100 kHz. Nous observons l'évolution linéaire de ces valeurs expérimentales avec la taille de l'électrode (voir **Figure 23**). De plus les valeurs de capacité expérimentales sont très proches des valeurs de capacités de double couche électriques estimées analytiquement. La valeur de capacité pour une longueur d'électrode nulle (valeur de l'ordonnée à l'origine) est proche de 10 pF. Cette valeur résiduelle peut correspondre à un artefact de calibration ou aux composantes des capacités additionnelles au système, les capacités parasites et de couplage avec le substrat, auquel cas cette valeur relativement faible n'aura probablement pas de fort impact sur les capacités expérimentales mesurées en vue de la détection de cellule. La valeur de capacité du milieu telle qu'exprimée en relation 31 est proportionnelle avec la longueur de l'électrode, cependant en présence de l'offset évoqué précédemment nous utilisons une fonction affine pour ajuster les points d'évolution de la capacité expérimentale en fonction de la longueur de la microélectrode.

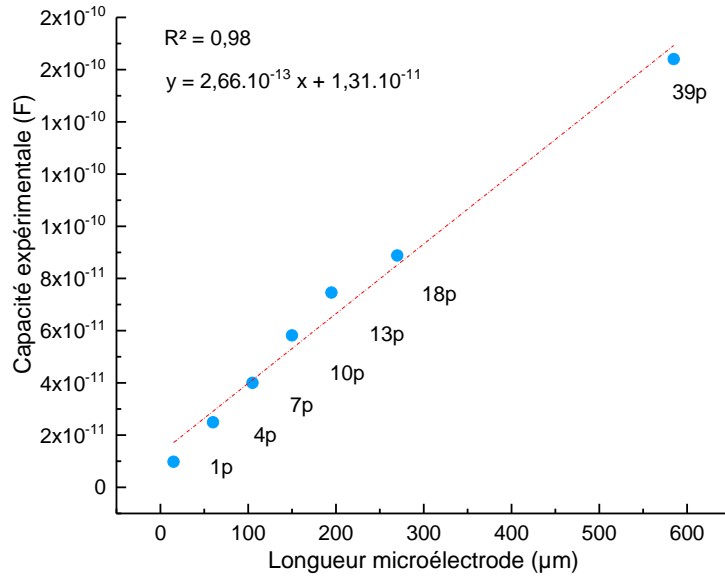


Figure 23 Evolution de la valeur de capacité expérimentale en fonction de la longueur de la microélectrode.

Nb puits	Longueur (μm)	Module (Ω)	Capa exp. (F)	C _{DL} th. (F)	C _M th. (F)
1	15	162919	9,77 x 10 ⁻¹²	4,34 x 10 ⁻¹²	1,43 x 10 ⁻¹⁴
4	60	63886	2,49 x 10 ⁻¹¹	1,73 x 10 ⁻¹¹	5,75 x 10 ⁻¹⁴
7	105	39818	3,99 x 10 ⁻¹¹	3,04 x 10 ⁻¹¹	1,00 x 10 ⁻¹³
10	150	27366	5,81 x 10 ⁻¹¹	4,34 x 10 ⁻¹¹	1,43 x 10 ⁻¹³
13	195	21354	7,45 x 10 ⁻¹¹	5,65 x 10 ⁻¹¹	1,86 x 10 ⁻¹³
18	270	17933	8,87 x 10 ⁻¹¹	7,82 x 10 ⁻¹¹	2,58 x 10 ⁻¹³
39	585	9706	1,64 x 10 ⁻¹⁰	1,69 x 10 ⁻¹⁰	5,60 x 10 ⁻¹³

Tableau 4 Valeurs de capacité expérimentales extraites à 100 kHz, de capacité de double couche électrique C_{DL} et de capacité générée entre les microélectrodes C_M théoriques calculées à partir des formules analytiques.

L'ordre de grandeur de la dizaine de pF obtenu correspond aux valeurs de capacité totale de cellules tumorales reportées dans la littérature (voir 1.2.3). En revanche, l'ensemble de nos études, analytiques et premières mesures expérimentales présentées ici, montrent qu'avec la géométrie actuelle de nos électrodes, le **module de l'impédance semble gouverné par la double couche électrique** formée à la surface des microélectrodes. Il paraît peu probable que cette configuration permette la détection d'une cellule biologique au niveau de la paire de microélectrodes, pour ces dispositifs exploratoire 2D où le contact entre cellules et électrodes n'est pas bien contrôlé. En effet, en considérant les ordres de grandeur en jeu et notamment la dimension caractéristique de la double couche de l'ordre de 0,1 à 10 nm pour des concentrations en électrolyte d'environ 0,1 et 0,001 M respectivement²⁸, et le diamètre de la cellule de l'ordre d'une dizaine de μm, il paraît peu envisageable que la présence d'une cellule perturbe la capacité générée à la surface des microélectrodes.

6.2.3. Microélectrodes contournant la totalité de la surface de la membrane filtrante

La **Figure 24** présente l'impédance pour un dispositif de design D_{TOTAL} à deux électrodes interdigitées contournant les puits sur une surface équivalente à celle de la membrane filtrante des S-MDCs. La gamme de fréquence pour la spectroscopie d'impédance ici est 2 kHz - 2 MHz.

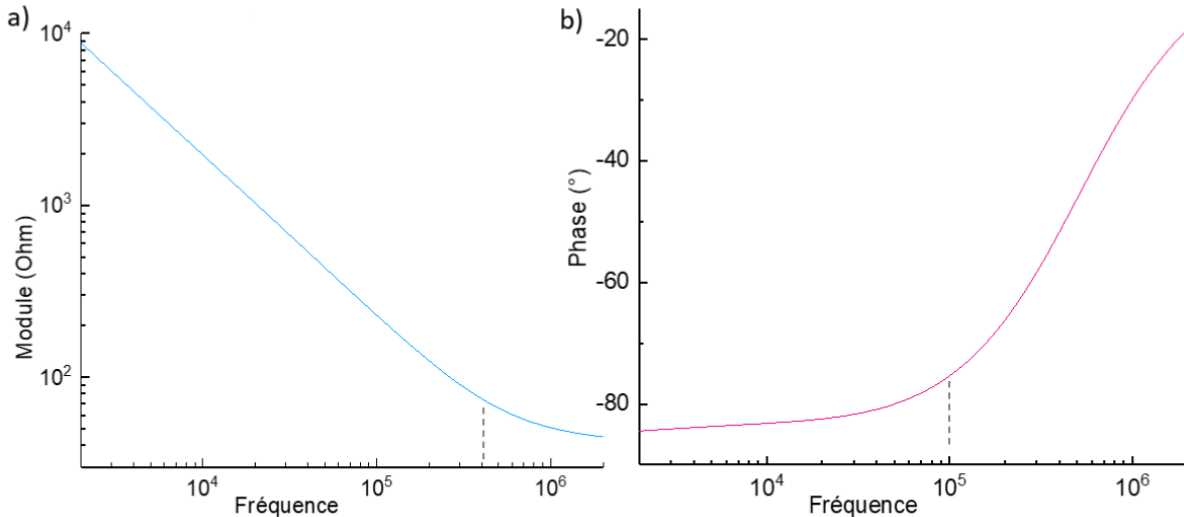


Figure 24 Dispositif de design D_{TOTAL} avec microélectrodes circulaires en présence de PBS, l'excitation est de 50 mV. a) Module de l'impédance. b) Phase de l'impédance.

Nous observons ici plus clairement une fréquence de coupure aux environs de 400 kHz à partir de laquelle la pente présentée par le signal du module de l'impédance diminue pour tendre vers une allure de plateau. La phase quant à elle présente une allure de plateau avec une valeur d'environ -85° pour augmenter à partir d'environ 100 kHz progressivement jusqu'à des valeurs d'environ -20° . Comme expliqué pour les mesures précédentes, il apparaît que la double couche électrique C_{DL} domine sur la gamme de fréquence étudiée. En mesurant ici l'impédance jusqu'à 2 MHz, nous observons plus clairement le début de la région fréquentielle dominée par la résistance de la solution. Nous mesurons une impédance comprise entre 10 k Ω et 100 Ω sur la gamme de fréquence 1 kHz - 1 MHz. **La capacité expérimentale extraite à 100 kHz est d'environ 7 nF.** Pour ce design, le nombre de puits contourné par les microélectrodes est très supérieur à celui des mesures précédentes. Pour 340 puits, la valeur de **capacité de double couche électrique estimée analytiquement est 1,6 nF.** Les estimations analytiques sont basées sur la géométrie d'électrode parallèle, nous pouvons nous attendre à une valeur plus élevée pour la géométrie d'électrode circulaire qui présente une surface augmentée en contact avec l'électrolyte. Ainsi la valeur expérimentale extraite paraît en accord avec l'estimation analytique.

Des valeurs de capacité de l'ordre du nF sont très supérieures à l'ordre de grandeur rapporté pour les capacités de membrane plasmique de cellules tumorales de l'ordre du pF. De telles valeurs de capacités seraient éventuellement significativement impactées par un grand nombre de cellules à la surface de la paire de microélectrode. Ainsi dans cette configuration et en supposant que la présence de cellules à la surface de microélectrodes puisse affecter la capacité de double couche électrique, le design d'électrodes à une paire interdigitée semblerait davantage approprié à la détection d'un taux d'obstruction des pores filtrants qu'au dénombrement de cellules piégées. Pour ce design, la capacité générée entre les microélectrodes est estimée analytiquement à 4,8 pF, ce qui correspond à l'ordre de grandeur rapporté pour la cellule tumorale unique. Cependant, dans la configuration actuelle, il ne semble pas que cette composante domine le signal sur la gamme de fréquences caractérisée.

6.2.4. Confrontation au modèle analytique

Basé sur l'expression analytique simplifiée présentée en section 5.2.4, les mesures expérimentales ont été corrélées au modèle analytique. Les paramètres géométriques utilisés sont ceux de trois paires d'électrodes parallèles contournant différents nombres de pores, à savoir les électrodes 1p, 4p et 18p. Les paramètres de conductivité σ et permittivité relative ϵ du milieu, ainsi que le paramètre n de l'élément d'impédance à phase constante modélisant la double couche électrique et la longueur de Debye L_D ont été ajustés afin de rapprocher le modèle des mesures expérimentales. La **Figure 25** présente la corrélation des mesures expérimentales au modèle analytique pour le module et la phase de l'impédance. Cette confrontation des mesures au modèle est préliminaire mais permet d'interpréter nos premiers résultats de mesures électriques et de comprendre le comportement électrique de notre système.

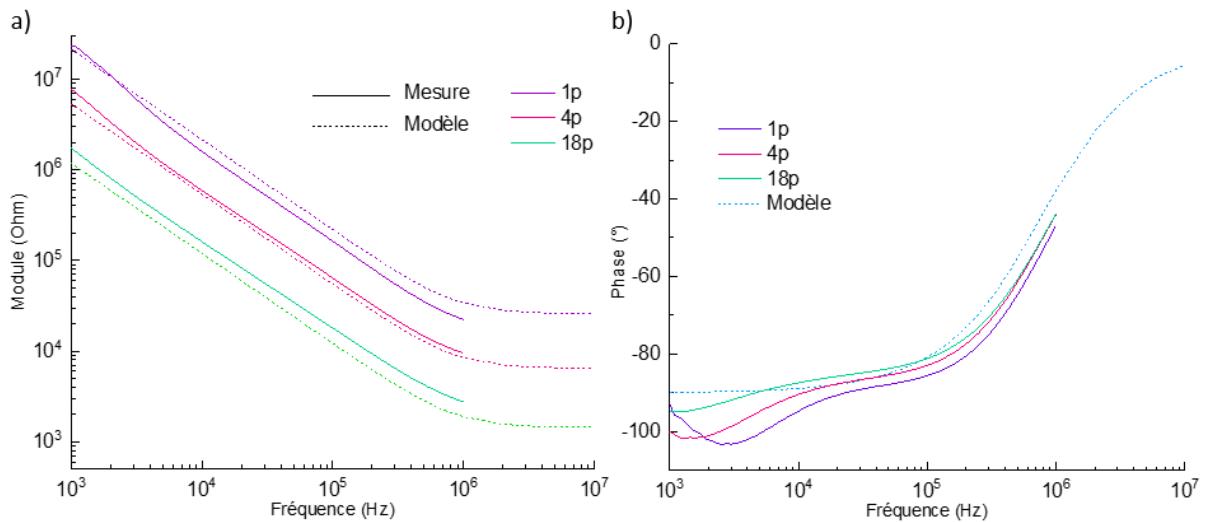


Figure 25 Confrontation des mesures expérimentales au modèle analytique pour trois paires d'électrodes parallèles 1p, 4p et 18p. a) Module de l'impédance. b) Phase de l'impédance. Le modèle est identique pour les paires d'électrodes de différentes tailles.

Les paramètres ajustés sont $\sigma=1,9$ S/m, $\epsilon_r=43$, $n=0,995$ et $L_D=2,2$ nm. Avec ces paramètres les valeurs de capacité de double couche électrique, de capacité générée entre les microélectrodes et de résistance du milieu sont respectivement $C_{DL}=15,6$ pF, $R_M=26$ k Ω et $C_M=7,7$ fF. Le modèle semble adapté pour décrire notre système électrique. En se basant sur la description des domaines fréquentiels d'influence de ces différentes composantes sur le système (voir 1.3.3), nous pouvons identifier les fréquences de coupure caractéristiques et associer une gamme de fréquence où chacune de ces composantes C_{DL} , R_M ou C_M domine sur l'expression du module de l'impédance. La **Figure 26** présente le spectre obtenu avec le modèle analytique sur une gamme de fréquence plus étendue. Ainsi nous pouvons identifier les fréquences de coupure suivantes : $f_B \approx 1$ MHz et $f_H \approx 200$ MHz pour notre géométrie d'électrodes (voir **Figure 26a**). Nous observons que sur notre plage de fréquence (1 kHz- 1 MHz), la capacité de double couche électrique domine sur la mesure. Nous imaginons donc que les diverses composantes électriques influent sur nos fréquences de coupure de manière assez simple, les valeurs de capacité de double couche électrique C_{DL} et de résistance de la solution R_M régissent f_B tandis que les valeurs de capacité générée entre les microélectrodes C_M et de résistance du milieu R_M régissent f_H . Ainsi, les fréquences de coupure sont valables pour les différentes dimensions d'électrodes car elles prennent en compte les capacités de double couche électrique et du milieu qui sont toutes deux proportionnelles à la longueur d'électrode et la résistance du milieu qui est inversement proportionnelle à la longueur d'électrode.

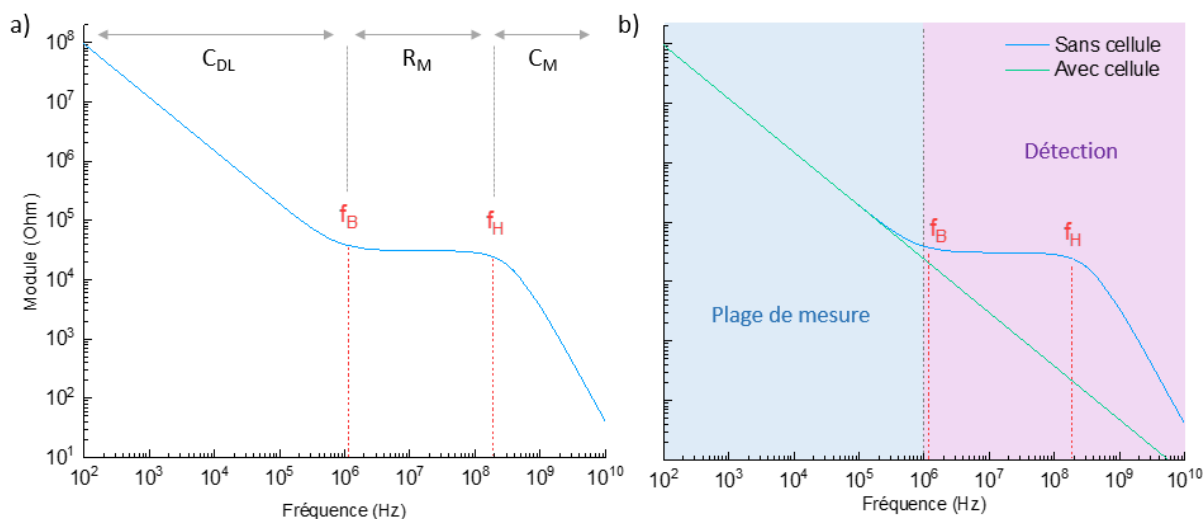


Figure 26 Spectres du module de l'impédance obtenus analytiquement pour une paire d'électrode parallèle 1p. a) Spectre obtenu « à vide » sans cellule. Les fréquences f_B et f_H correspondent aux fréquences de coupure basse fréquence et haute fréquence respectivement. b) Comparaison des spectres obtenus sans et avec cellule entre la paire de microélectrode. Les spectres sont confondus sur la gamme fréquentielle inférieure à f_B correspondant à la plage de mesures.

Ainsi avec le dimensionnement d'électrodes actuel et le modèle équivalent utilisé, la gamme de fréquence associée à la capacité C_M générée entre les microélectrodes se trouve au-delà de 200 MHz, à des fréquences où la membrane plasmique des cellules devient transparente au champ électrique et où un courant peut circuler à l'intérieur de la cellule. Les propriétés diélectriques de la membrane plasmique de la cellule ne peuvent alors pas être exploitées à des fréquences aussi élevées. La **Figure 26b** présente un graphique comportant des spectres avec et sans cellule entre les microélectrodes pour une paire 1p obtenus analytiquement à partir de nos schémas équivalents. L'ajout de la cellule correspond à l'expression analytique présentée dans la section 5.2.4 en utilisant une capacité de membrane plasmique $C_{Mem}=37$ pF. Nous observons effectivement que sur notre plage de mesure, il n'y a pas de variation significative du signal car il est seulement gouverné par la capacité de double couche électrique C_{DL} et l'ajout d'une capacité C_{Mem} en parallèle de celle générée entre les microélectrodes C_M est visible pour des fréquences supérieures à f_B . Idéalement, les propriétés diélectriques de la membrane plasmique des cellules se manifestent pour des fréquences <1 MHz, ce paramètre définit la limite haute de notre gamme fréquentielle de mesure. Il n'est pas possible de modifier la géométrie des microélectrodes de façon à obtenir $f_H < 1$ MHz. En effet, diminuer la valeur de f_H correspond à augmenter la résistance du milieu R_M . Or la valeur de R_M est inversement la longueur microélectrodes et il est impossible de diminuer cette longueur pour l'application que nous souhaitons réaliser. Ainsi à partir de ce modèle théorique, nous concluons qu'il serait éventuellement possible de détecter la présence de cellule biologique avec notre système de microélectrodes à condition que celle-ci modifie la valeur de la capacité de double couche, mais ceci reste à élucider. Il faut cependant noter que pour notre modèle équivalent nous avons fait des hypothèses fortes de résistance du milieu R_M et capacité du milieu C_M inchangées en présence de cellules. Nous avons émis ces hypothèses par manque de données pour la modélisation fine des phénomènes se produisant entre les microélectrodes en présence de cellules. Le modèle utilisé à vide nous a permis d'obtenir les ordres de grandeurs d'impédance sur la gamme fréquentielle qui nous intéresse et d'identifier les composantes électriques qui entrent sans cellule. Cependant les hypothèses simplificatrices utilisées pour modéliser le cas de la présence d'une cellule entre les microélectrodes ne sont fort probablement pas représentatives de la réalité du signal obtenu expérimentalement.

6.3. Premières mesures en présence de cellules

Des expériences préliminaires de mesures électriques en présence de cellules ont été effectuées, nous présentons dans cette section le protocole expérimental et un résultat de mesure. La caractérisation électrique est toujours effectuée par spectroscopie d'impédance sur la gamme fréquentielle 1 kHz - 1 MHz.

6.3.1. Protocole expérimental

Le principe de mesure est d'effectuer une première série de mesures « à vide » c'est-à-dire seulement en présence du milieu contenant les cellules biologiques. Ces mesures servent de signal de référence. Des cellules sont ensuite introduites dans la cuve des dispositifs 2D. Suite à l'introduction des cellules, des images sont effectuées par microscopie à fluorescence en utilisant un microscope droit pour imager la surface des dispositifs à travers le capot en PDMS. Il est ainsi possible de repérer visuellement les cellules à la surface du dispositif. Les mesures électriques en présence de cellules sont ensuite effectuées. Une seconde séance d'image est effectuée suite aux mesures électriques afin de vérifier que le positionnement des cellules n'ait pas évolué au cours du temps. Ainsi, à l'issue de cette démarche, il est possible de corréler la présence éventuelle de cellules entre les microélectrodes avec les variations de mesure électriques sur milieu de référence et en présence de cellule pour chaque paire de microélectrode testée.

De la même façon que pour les caractérisations à vide, la surface est préparée par plasma O_2 ou mouillage à l'éthanol. La solution hôte, PBS ou milieu de culture, est manuellement introduite à la pipette dans la cuve, et le capot en PDMS est ensuite placé au-dessus de la cuve. Le principe de la caractérisation électrique repose sur trois mesures successives sur une même paire d'électrode afin de vérifier la stabilité du signal, ces mesures constituent le signal de référence sans cellules cancéreuses à détecter entre les microélectrodes. Plusieurs paires d'électrodes appartenant à un même dispositif sont caractérisées, au maximum une douzaine. Le temps nécessaire pour effectuer la mesure 3 fois sur la douzaine de paires peut être arrondi à 1 heure, incluant l'enregistrement des données et le positionnement manuel des pointes sur chaque paire. Ainsi, en fonction du nombre de paires analysées, les mesures successives constituant le signal de référence sont espacées d'environ 5 à 20 minutes. L'étape suivante est le retrait du capot en PDMS et l'ajout instantané d'une suspension de cellules cancéreuses dans le milieu hôte correspondant à celui des mesures prises pour références. Le volume introduit est d'environ 200 nL, concentré à environ 400000 cellules cancéreuses par mL. Il s'agit de cellules issues d'une lignée cellulaire humaine de tumeur de la prostate, modifiées génétiquement pour émettre une fluorescence dans le vert, les cellules PC3-GFP. L'ADN des noyaux de ces cellules est préalablement marqué au colorant Hoechst afin d'affiner la caractérisation optique. Une fois la suspension de cellules introduites dans la cuve et le capot en PDMS positionné, une caractérisation optique est effectuée en microscopie à fluorescence. Pour chaque dispositif contenant des cellules cancéreuses à caractériser électriquement, des images sont prises en champ clair, et aux filtres d'excitation et d'émission correspondant à la protéine GFP et au marqueur Hoechst, $\lambda_{ex}=488$ nm, $\lambda_{em}=510$ nm et $\lambda_{ex}=350$ nm, $\lambda_{em}=461$ nm respectivement. La spectroscopie d'impédance est ensuite effectuée sur l'ensemble des paires pour lesquelles les mesures de référence ont été réalisées. Environ 30 minutes se sont écoulées entre la caractérisation optique et la spectroscopie d'impédance. Les dispositifs sont ensuite placés pour 2 heures dans environnement à 80% d'humidité. Une spectroscopie d'impédance est à nouveau effectuée sur chaque paire étudiée. Pour finir, des images en microscopie en fluorescence sont réalisées afin de vérifier le positionnement des cellules cancéreuses avant et après mesures. Après l'expérience, les dispositifs sont nettoyés dans des bains d'eau DI suivi d'un plasma O_2 (temps : 2 minutes, puissance : 200 W, débit : 400 cm³/min). Ils peuvent ensuite être utilisés pour de nouvelles mesures.

6.3.2. Exemple de résultat de mesure

Une expérimentation de détection de cellule a été effectuée sur des paires de microélectrodes parallèles du design D_{N_PUITS} (voir **Figure 27**). La **Figure 28** présente les résultats de mesure d'impédance sur ces dispositifs avant et après ajout de cellules. L'observation en fluorescence a permis de corréler les variations observées sur la mesure électrique à la présence de cellules entre les microélectrodes.

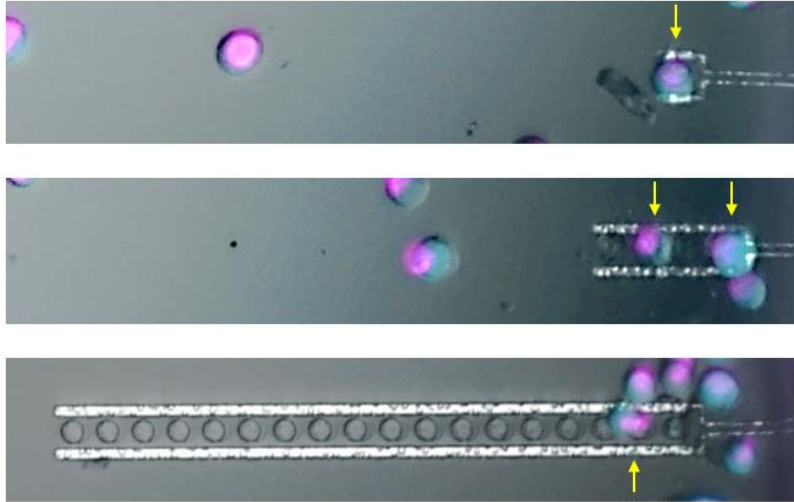


Figure 27 Superposition d'images en champ clair et en fluorescence de 3 paires de microélectrodes parallèles du design D_{N_PUITS} , à 1 puits, 4 puits et 18 puits. La fluorescence représentée en bleu correspond à l'expression de la GFP et celle en fuchsia aux noyaux marqués (Hoechst) des cellules PC3-GFP. Les flèches jaunes pointent les cellules positionnées dans les puits entre les microélectrodes.

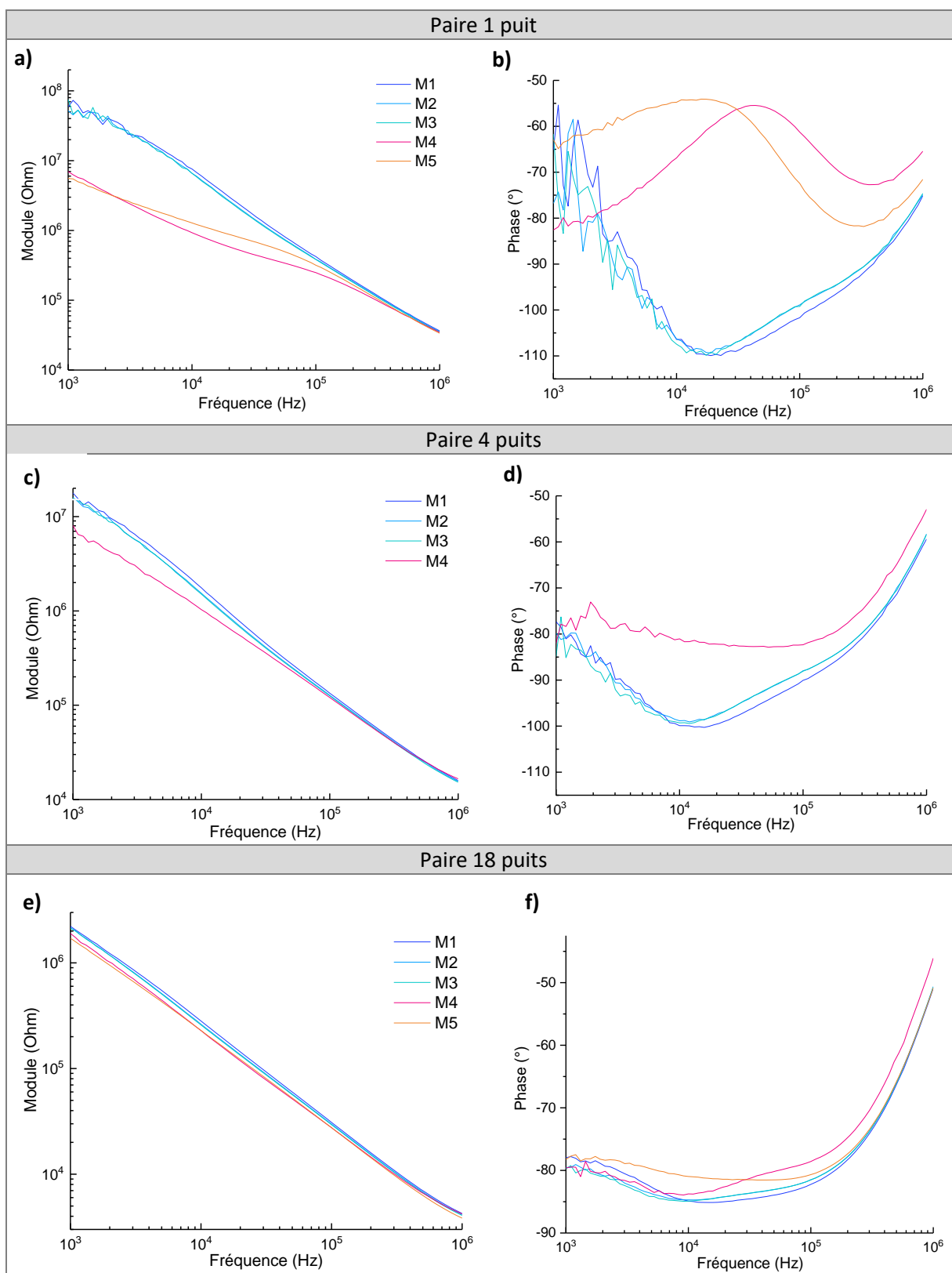


Figure 28 Spectres d'impédance des 3 paires de microélectrodes parallèles de design D_N _PUITS. Les mesures M1 à M3 (nuances de bleu) sont des mesures de référence menées sur milieu RPMI, environ 10 min entre les mesures, excitation 50 mV. La mesure M4 (rouge) est effectuée environ 30 min après ajout des cellules. La mesure M5 (orange, manquantes pour la paire 4 puits) est effectuée environ 2h30 après ajout de cellules. L'excitation est maintenue à 50 mV pour les mesures M4 et M5 en présence de cellule. a) et b) Module et phase de l'impédance

paire 1 puit. c) et d) Module et phase de l'impédance paire 4 puits. e) et f) Module et phase de l'impédance paire 18 puits.

Les trois mesures de référence (courbes M1 à M3 représentées en nuances de bleu sur les graphiques de la **Figure 28** présentent une légère variation du signal entre M1 et M2 suivie d'une stabilisation du signal entre M2 et M3 pour les trois paires de microélectrodes étudiées. Nous remarquons que le module de l'impédance des paires 1p et 4p (voir graphiques a et c **Figure 28**) est plus élevé que celui mesuré pour des paires d'électrodes de même géométrie caractérisées à vide dont les résultats sont présentés dans la section précédente (voir graphique a **Figure 28**). La différence est d'environ 40 MΩ et 10 MΩ à kHz pour les modules des paires 1 puit et 4 puits respectivement. Ceci provient des mesures davantage bruitées en basse fréquence car nous sommes dans les limites de la capacité de mesure de l'analyseur d'impédance.

Lors de l'ajout de cellules (courbes M4 et M5 représentées en rouge et orange), nous observons une baisse du module de l'impédance et une augmentation de la phase. Nous remarquons par ailleurs que cette variation est globalement plus prononcée en basse fréquence (<100 kHz). Nous observons aussi que les écarts de variations sur le module et la phase de l'impédance diminuent avec la taille de l'électrode. En effet plus la taille de l'électrode est importante, plus sa sensibilité à la détection d'une cellule unique est réduite ⁷⁹. Le **Tableau 5** présente les écarts absolus et relatifs du module et de la phase de l'impédance entre les mesures M1 et M4 pour les trois paires de microélectrodes aux fréquences 1 kHz, 10 kHz, 100 kHz et 1 MHz.

		Ecart module M1 - M4		Déphasage M1 - M4	
		Absolu Ω	Relatif %	Absolu °	Relatif %
Paire 1 puit	1 kHz	5,22 x10 ⁷	88	17	-26
	10 kHz	6,67 x10 ⁶	87	-39	37
	100 kHz	1,74 x10 ⁵	41	-40	39
	1 MHz	1,81 x10 ³	4,9	-9,7	12
Paire 4 puits	1 kHz	9,75 x10 ⁶	54	4,6	-6
	10 kHz	7,28 x10 ⁵	41	-18	18
	100 kHz	1,34 x10 ⁴	10	-7,7	8,5
	1 MHz	-6,82 x10 ²	-4,36	-6,4	10
Paire 18 puits	1 kHz	3,23 x10 ⁵	14	1,6	-2,2
	10 kHz	5,31 x10 ⁴	18	-1,1	1,3
	100 kHz	3,32 x10 ³	10	-3,6	4,4
	1 MHz	4,00 x10 ¹	0,9	-4,7	9,4

Tableau 5 Ecarts absolus et relatifs du module et de la phase de l'impédance mesurés avant (M1) et après (M4) ajout de cellules PC3-GFP aux fréquences 1 kHz, 10 kHz, 100 kHz, et 1 MHz pour les trois paires de microélectrodes analysées (1 puit, 4 puits et 18 puits).

Les résultats sont à analyser en prenant en compte les erreurs sur la mesure de l'impédance. Nous nous intéressons en particulier au module de l'impédance à partir duquel nous pouvons extraire des valeurs de capacité expérimentales. L'erreur sur la mesure dépend de la gamme de fréquence balayée, de l'amplitude de l'excitation en tension, de la période d'échantillonnage et de l'impédance mesurée, elle peut être calculée en tenant compte de ces paramètres à partir des expressions fournies dans le guide utilisateur de l'analyseur d'impédance Agilent 4963 p.332. Les erreurs absolues et relatives ont été calculées pour les écarts de module d'impédance entre la mesure M1 et M4 pour les trois paires de microélectrodes (1p, 4p, 18p) aux fréquences 1 kHz, 10 kHz, 100 kHz et 1 MHz (voir **Tableau 6**). En observant les erreurs relatives représentées sur le diagramme à barres (voir **Figure 29**), nous observons des erreurs très importantes à 1 kHz (entre 67 et 170%) liées à la mesure de fortes

impédances et à une imprécision accrue sur la mesure en basse fréquence. Les erreurs diminuent pour les mesures à 10 kHz, 100 kHz et 1 MHz. C'est pour la fréquence 100 kHz qu'elles sont les plus faibles avec $\pm 3,9\%$, $\pm 8,1\%$ et $\pm 3,1\%$ pour les paires de microélectrodes 1 puits, 4 puits, et 18 puits respectivement. Il y a donc un compromis à trouver entre gamme de fréquence présentant une erreur acceptable sur la mesure permettant une interprétation correcte des résultats et gamme de fréquence à laquelle l'impact diélectrique de la membrane plasmique des cellules est le plus accentué pour favoriser la détection. Au vu des erreurs calculées et des résultats de la littérature sur la détection de cellules tumorales, 100 kHz semble être une option cohérente pour l'interprétation de nos résultats.

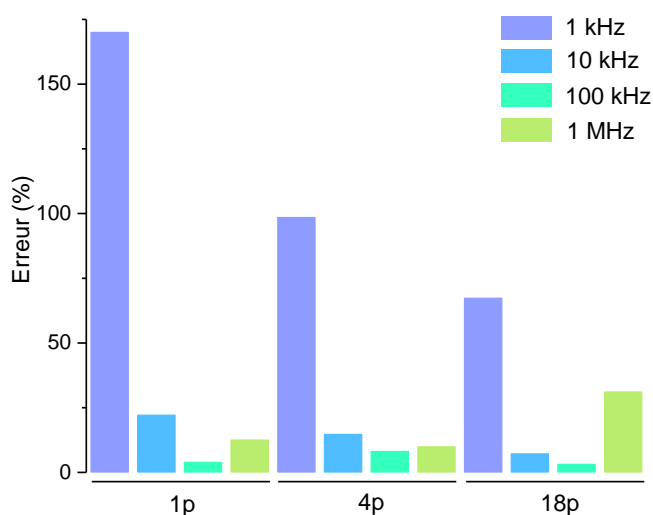


Figure 2.29 Diagramme à barres représentant l'erreur relative sur les écarts de modules de l'impédance entre les mesures M1 et M4 aux fréquences 1 kHz, 10 kHz, 100 kHz et 1 MHz pour les paires 1p, 4p et 18p.

		Ecart Ω	$\pm E \Omega$	$\pm E \%$
1p	1 kHz	$5,22 \times 10^7$	$8,88 \times 10^8$	170
	10 kHz	$6,67 \times 10^6$	$1,48 \times 10^6$	22,1
	100 kHz	$1,74 \times 10^5$	6840	3,9
	1 Mhz	1810	226	12,5
4p	1 kHz	$9,75 \times 10^6$	$9,6 \times 10^6$	98,5
	10 kHz	$7,28 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$	14,7
	100 kHz	$1,34 \times 10^4$	1100	8,1
	1 Mhz	-682	69	9,9
18p	1 kHz	$3,23 \times 10^5$	$2,18 \times 10^5$	67,3
	10 kHz	$5,31 \times 10^4$	$3,83 \times 10^3$	7,2
	100 kHz	3320	105	3,1
	1 Mhz	40	12	31

Tableau 6 Erreurs absolues et relatives sur les écarts de modules d'impédance entre les mesures M1 et M4 aux fréquences 1 kHz, 10 kHz, 100 kHz et 1 MHz pour les paires 1p, 4p et 18p.

Les écarts de module d'impédance mesurés en présence de cellules par rapport au signal de référence sont donc **$3,3 \pm 0,1 \text{ k}\Omega$ pour la paire 18p** en présence d'une cellule, **$13,4 \pm 1,1 \text{ k}\Omega$ pour la paire 4p** en présence de deux cellules et **$174 \pm 6,8 \text{ k}\Omega$ pour la paire 1p** en présence d'une cellule à 100 kHz. La valeur de capacité correspondante à l'écart mesuré déterminée à partir de la relation 42 en prenant $n=1$ serait de **$428 \pm 13 \text{ pF}$ pour une cellule sur la paire 18p, $106 \pm 8 \text{ pF}$ pour 2 cellules sur la paire 4p et $87 \text{ pF} \pm 3 \text{ pF}$ pour une cellule sur la paire 1p**. Pour cette expérience particulière, une condition importante est manquante qui est celle de la mesure contrôle. Une paire de microélectrode caractérisée avant et après ajout de cellules sur laquelle aucune cellule n'est identifiée entre les microélectrodes aurait permis de confirmer et conforter les résultats présentés ci-dessus. En pratique, l'ajout de cellule dans la cuve et leur positionnement aléatoire régit seulement par les forces de sédimentation complique la tâche pour mener correctement l'expérience de détection électrique.

En lien avec les caractérisations électriques menées à vide et la confrontation au modèle analytique, il n'apparaît pas possible de détecter la présence de cellule avec notre géométrie d'électrode sauf si celle-ci perturbe la double couche électrique. La capacité de double couche électrique a déjà été utilisée au sein de biocapteur pour la détection de molécules biologiques, mais pour des entités de dimensions de l'ordre de la centaine de nm maximum²⁹. Cependant une explication pour la variation d'impédance mesurée pourrait effectivement être que la double couche électrique soit localement affectée. On pourrait éventuellement imaginer que l'épaisseur, caractérisée par la longueur de Debye L_D , soit comprimée ou réduite sous l'effet de la présence de la cellule. Les variations de capacités extraites des mesures expérimentales correspondraient à une réduction de la longueur de Debye L_D d'environ 3,3 nm, 3,0 nm, et 0,9 nm pour les paires 18p, 4p et 1p respectivement.

La *relation 24* de la section 1.3.3 est utilisée pour ces calculs et la longueur de Debye est ici moyennée sur l'ensemble de la surface de l'électrode où est présente la double couche électrique bien que nous imaginons que la perturbation a lieu localement au niveau de la surface interagissant avec la cellule. De plus le paramètre n caractérisant la capacité de double couche électrique a été considéré égal à 1. Nous observons sur les mesures une diminution de la pente, ce qui correspond à un paramètre n réduit. La présence de la cellule influe potentiellement sur ce paramètre. La prise en compte du paramètre inférieur à 1 aurait pour effet de diminuer les valeurs de L_D estimées précédemment. Les valeurs obtenues paraissent plausibles avec ce type d'interprétation, au regard de l'estimation de l'épaisseur de double couche électrique $L_D=5$ nm estimée analytiquement. Ce processus paraît néanmoins très aléatoire pour ces dispositifs 2D en présence de cellules en suspension au-dessus des microélectrodes. Cependant, dans la perspective des S-MDCs à microélectrodes intégrées, les cellules sont mécaniquement contraintes sur le pore filtrant contre les microélectrodes par la pression transmembranaire générée sous flux. A notre connaissance, cet effet n'a pas été rapporté dans la littérature et l'on pourrait éventuellement s'attendre à une perturbation de C_{DL} avec ce contact rapproché. Cette piste sera à explorer en parallèle d'une réduction de l'épaisseur de microélectrode pour obtenir $f_H < 1$ MHz et être théoriquement dans de meilleures conditions pour la détection de cellules logées entre les microélectrodes.

6.3.3. Discussion sur les résultats de détection de cellules via les dispositifs 2D

Les résultats présentés précédemment ne sont pas reproductibles. Plusieurs campagnes de mesures non concluantes ont été effectuées dans les mêmes conditions que précédemment décrites, ainsi qu'en jouant sur les paramètres d'amplitude de l'excitation, de gamme fréquentielle, d'éléments à analyser (microbilles en polystyrène, différents types cellulaires). Nous avons aussi observé des variations d'impédance non spécifiques, c'est-à-dire des variations significatives de l'impédance mesurées en l'absence de cellules entre les microélectrodes. Cela est probablement lié aux faibles volumes en présence, qui font que le système est facilement perturbé lors de l'ajout de cellules consécutivement aux mesures de référence. Les dispositifs s'avèrent ne pas être adaptés pour la fonction de détection souhaitée. En effet, ils reposent sur un positionnement des cellules aléatoire à la surface des microélectrodes par simple sédimentation. Les cellules sont statiques sur la surface plane et paraissent relativement proches de la surface des électrodes par inspection en microscopie optique mais nous n'avons en revanche aucun contrôle sur le positionnement vertical de la cellule vis-à-vis des microélectrodes. Il est possible qu'à cause d'effets statiques ou électrostatiques, la cellule soit en suspension au-dessus des microélectrodes et que le volume d'interaction entre le champ électrique formé par les microélectrodes coplanaires et la cellule soit trop faible. Ceci est une explication très probable du manque de reproductibilité des résultats obtenus avec nos dispositifs.

Néanmoins, les dispositifs exploratoires 2D auront permis de valider le processus de microfabrication de micro électrodes robustes aux dimensions critiques (largeur des électrodes et des pistes notamment) pour l'intégration à la surface de la membrane filtrante des S-MDCs. Des caractérisations électriques à vide dans des conditions expérimentales identiques certifient la reproductibilité de la mesure et donc de la fabrication. Les mesures à vide ont aussi permis de valider le modèle analytique sans cellule et de mettre en avant des domaines fréquentiels où dominent les différentes composantes de capacité de double couche électrique, résistance du milieu et capacité générée entre les microélectrodes. Concernant les mesures en présence de cellules, l'hypothèse de perturbation de la double couche électrique a été amenée pour interpréter ces premiers résultats, toutefois il est possible que notre modèle analytique ne soit pas adapté pour rendre compte de cet exemple de détection de cellule avec nos dispositifs exploratoires 2D. Toutefois, cet exemple d'expérimentation de détection est une ébauche de preuve de concept de la détection de cellules

biologiques avec les microélectrodes et un résultat encourageant pour la mesure avec les S-MDCs à microélectrodes intégrées. Nous pourrions nous attendre dans le cas de mesure électrique couplée à l'expérimentation de capture avec les MDCs à électrodes intégrées à de meilleurs résultats car le contact entre cellule et microélectrode sera assuré par la force hydrodynamique.

7. Perspectives pour le développement du S-MDC à électrodes intégrées

Les premiers développements pour l'intégration de microélectrodes aux S-MDCs présentés dans ce chapitre mettent au jour les prémices d'un système pour la détection de la capture de cellules tumorales en temps réel. De nombreuses perspectives sont envisageables pour faire évoluer cette première génération de dispositifs vers un système plus abouti.

7.1. Mesures expérimentales avec les S-MDCs à électrodes intégrées

Une perspective immédiate sur la base de ces travaux est le test des S-MDCs à électrodes intégrées pour effectuer des mesures d'impédance en dynamique, c'est-à-dire lorsqu'un flux circule au travers de la membrane filtrante. Les systèmes de mesure électrique et fluide devront ainsi être installés avec précaution sur une même paillasse expérimentale. Dans un premier temps, une vérification de la résistance mécanique de la membrane filtrante à électrodes intégrées devra être effectuée pour différents débits de circulation du fluide et notamment ceux utilisés pour le processus de capture. La démarche à suivre pourrait être d'effectuer des mesures de spectroscopie d'impédance dans le domaine fréquentiel avec un milieu simple en circulation, une solution de tampon phosphate salin par exemple. Les spectres d'impédance pourraient être comparés à ceux obtenus avec les dispositifs exploratoires 2D, les dimensions et configurations d'électrodes étant très semblables. Il sera tout de même important avec ces nouveaux dispositifs d'investiguer les différents designs et configurations comportant différentes géométries et longueurs de microélectrodes. Une éventuelle dérive du signal pourra être évaluée. Si le signal est relativement stable, des mesures pourront être envisagées dans le domaine temporel à une ou plusieurs fréquences d'excitation fixes. Le passage dans le domaine temporel est nécessaire pour le suivi d'un processus évoluant au cours du temps tel que le processus d'isolement de cellules tumorales sur la membrane filtrante des S-MDCs. Idéalement une variation de signal significative, de l'impédance mesurée entre les microélectrodes, pourrait être associée à un événement de capture. La ou les fréquences optimales pour exploiter au mieux les propriétés diélectriques des cellules tumorales devront être déterminées compte tenu du dimensionnement des microélectrodes. Des expériences de capture de cellules tumorales en milieu simple avec mesures d'impédance simultanée pourront ainsi être effectuées. Le nombre de variations enregistrées sur la mesure de l'impédance au cours du temps pourront alors être corrélées au nombre de cellules présentes sur la membrane filtrante, qui sera caractérisée par microscopie à fluorescence à l'issue de l'expérience. Il serait intéressant de faire évoluer le système, notamment le réceptacle du S-MDC à électrodes intégrées, afin de permettre une caractérisation en microscopie optique simultanée à la mesure électrique et circulation fluide. Ceci permettrait un suivi optique des événements de capture à la surface de la membrane filtrante en temps réel pour une meilleure corrélation à la mesure d'impédance.

7.2. Optimisation du système de détection

Des études analytiques et de simulations électriques fines devront être effectuées avec une corrélation à des mesures expérimentales en milieu simple afin d'extraire un modèle équivalent du système électrique utilisé. Il est important de décrire correctement la nature du signal afin de comprendre quelle composante du système prévaut sur l'impédance mesurée dans la gamme de fréquence ciblée (1 kHz - 1 MHz). Sur la base des premières études menées dans le cadre de cette

thèse, il a été montré que trois composantes principales peuvent jouer un rôle. Il s'agit de la capacité de double couche formée à l'interface entre le métal de l'électrode et de l'électrolyte, de la résistance de la solution et de la capacité générée dans le milieu par le champ électrique entre les microélectrodes. Le dimensionnement des microélectrodes peut être ajusté, en prenant en compte la nature de l'électrolyte, afin de faire prévaloir l'une ou l'autre de ces composantes sur l'impédance à la fréquence (ou gamme de fréquence) souhaitée. La composante du système qui sera la plus à même à être impactée par la présence de la cellule entre les microélectrodes devra être déterminée de façon à obtenir une variation de signal significative permettant la détection. Ceci nécessitera d'approfondir la compréhension du comportement électrique de la cellule biologique ainsi que l'interaction entre la cellule et le champ électrique généré entre les microélectrodes. Il nous semble à ce titre crucial de revoir le schéma équivalent en présence de cellules capturées à la lueur de nouvelles données expérimentales de capture sous flux et de mesures électriques sous flux. La « superposition » de l'impédance liée à la cellule à celle liée au milieu ne nous paraît pas adaptée de prime abord à la description fine du système en présence de cellule. La rupture avec ce schéma de superposition, probablement hérité d'une tradition en génie électrique, nous paraît essentielle pour aller de l'avant au niveau de l'interprétation des mesures électriques *via* notre système. Dans l'hypothèse d'un schéma de remplacement d'impédance au lieu de superposition, de nouvelles données issues d'expériences et de simulations seront nécessaires. Dans notre système particulier, il sera aussi important de prendre en compte la nature de l'interaction entre la membrane filtrante à électrodes intégrées et la cellule mécaniquement contrainte sur la surface par une différence de pression. Les paramètres du système fluide doivent ainsi être pris en compte pour étudier la détection électrique de cellules tumorales isolées par les S-MDCs à électrodes intégrées.

7.3. Interrogation à distance du S-MDC à électrodes intégrées

Une perspective à plus long terme consiste à implémenter un système permettant d'interroger à distance et sans fil le S-MDC à électrodes intégrées embarqué au sein de la plateforme fluide. Un système pourrait être conçu sur le principe des puces RFID (Radio Frequency Identification) qui permettent l'interrogation sans contact de puces électroniques *via* une antenne et un lecteur dédiés. Le S-MDC à électrodes intégrées serait alors connecté à une puce électronique interrogeable à distance et qui permettrait de délivrer sans contact le nombre de cellules détectés ou une valeur seuil correspondant à un taux d'obstruction de la membrane filtrante. La lecture sans contact et courte portée de la puce pourra être réalisée en utilisant un couplage inductif. Dans ce cas, l'intégration d'une bobine L au sein de la puce permettrait de réaliser un circuit résonant de type LC dont la fréquence de résonance serait dépendante de la valeur de capacité C du S-MDC à électrodes intégrées. La fréquence de résonance de ce circuit serait alors dépendante, du moins en principe, du nombre de cellules logées entre les microélectrodes ou du taux d'obstruction de la membrane filtrante. L'intégration d'un tel système de lecture sans contact nécessite la calibration de la variation de la fréquence de résonance en fonction de l'obstruction progressive de la membrane filtrante. Ce développement requiert au préalable la détermination des grandeurs clés du système sans fil (telles que tension d'alimentation, la fréquence de fonctionnement, etc.) pour la détection de cellules ou d'un taux d'obstruction de la membrane filtrante.

Conclusions

Une recherche bibliographique a orienté la solution technologique permettant la détection en temps réel des événements de capture de cellules à la surface de la membrane filtrante des S-MDC vers l'intégration de microélectrodes pour exploiter les propriétés diélectriques particulières ces cellules tumorales. En effet, la structure particulière que présente la membrane plasmique des cellules tumorales leur confèrent des propriétés capacitives à basse fréquence qui peuvent être utilisées pour impacter un champ électrique et ainsi permettre une détection électrique de la présence de ces cellules sur une surface.

Les travaux présentés dans ce chapitre mettent en avant la mise au point d'un procédé de fabrication pour l'intégration de microélectrodes à la surface de la membrane filtrante des S-MDCs. Ce procédé implique l'utilisation de nouveaux matériaux et une adaptation des designs pour la fabrication des S-MDCs qui semblent compatibles pour la réalisation d'un dispositif de microfiltration pour l'isolement de cellules tumorales et pour effectuer des mesures électriques simultanées.

Des dispositifs exploratoires 2D ont montré que le dimensionnement des microélectrodes est adapté pour générer, en présence de milieu simple, une valeur de capacité compatible avec l'ordre de grandeur des valeurs de capacités de la membrane plasmique de cellules tumorales rapportées dans la littérature.

Ces travaux présentent donc une première étape pour l'approche de détection en temps réel d'évènements de capture de cellules tumorales au sein des S-MDCs. Ces premiers développements ouvrent la voie à des travaux plus approfondis pour faire de ces nouveaux dispositifs de réels outils de capture et détection en temps réel de cellules tumorales.

Bibliographie

1. Mason, K. A., Losos, J. B., Singer, S. R., Raven, P. H. & Johnson, G. B. *Biology*. (Glencoe Mcgraw-Hill Post, 2010).
2. Shepherd, V. A. The Cytomatrix as a Cooperative System of Macromolecular and Water Networks. in *Current Topics in Developmental Biology* vol. 75 171–223 (Elsevier, 2006).
3. Markx, G. H. & Davey, C. L. The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology. *Enzyme and Microbial Technology* **25**, 161–171 (1999).
4. Pethig, R. & Kell, D. B. The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology. *Phys. Med. Biol.* **32**, 933–970 (1987).
5. Fricke, H. The Electric Capacity of Suspensions of Red Corpuscles of a Dog. *Phys. Rev.* **26**, 682–687 (1925).
6. Morgan, H., Sun, T., Holmes, D., Gawad, S. & Green, N. G. Single cell dielectric spectroscopy. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **40**, 61–70 (2007).
7. Mansoorifar, A., Ghosh, A., Sabuncu, A. C. & Beskok, A. Accuracy of the Maxwell–Wagner and the Bruggeman–Hanai mixture models for single cell dielectric spectroscopy. *IET Nanobiotechnology* **11**, 874–882 (2017).
8. Sieskind, R., Trainito, C., Français, O. & Le Pioufle, B. Microsystème dédié à l'étude de la polarisation diélectrique de microparticules dans le cadre de formation master recherche : application au micropositionnement 3D de cellules par force de diélectrophorèse. *J3eA* **14**, 1007 (2015).
9. Cole, K. S. PERMEABILITY AND IMPERMEABILITY OF CELL MEMBRANES FOR IONS. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **8**, 110–122 (1940).
10. Curtis, H. J. & Cole, K. S. TRANSVERSE ELECTRIC IMPEDANCE OF NITELLA. *The Journal of General Physiology* **21**, 189–201 (1937).
11. Schwan, H. P. Electrical Properties of Tissue and Cell Suspensions. in *Advances in Biological and Medical Physics* vol. 5 147–209 (Elsevier, 1957).
12. Grimnes, S. & Martinsen, Ø. G. *Bioimpedance and bioelectricity basics*. (Academic Press, 2008).
13. Gabriel, S., Lau, R. W. & Gabriel, C. The dielectric properties of biological tissues: II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz. 20.
14. Hölzel, R. & Lamprecht, I. Dielectric properties of yeast cells as determined by electrorotation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **1104**, 195–200 (1992).
15. Pethig, R. & Markx, G. Applications of dielectrophoresis in biotechnology. *Trends in Biotechnology* **15**, 426–432 (1997).
16. Becker, F. F. *et al.* Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **92**, 860–864 (1995).
17. Gascoyne, P. R. C., Shim, S., Noshari, J., Becker, F. F. & Stemke-Hale, K. Correlations between the dielectric properties and exterior morphology of cells revealed by dielectrophoretic field-flow fractionation: General. *ELECTROPHORESIS* **34**, 1042–1050 (2013).
18. Liang, X., Graham, K. A., Johannessen, A. C., Costea, D. E. & Labeed, F. H. Human oral cancer cells with increasing tumorigenic abilities exhibit higher effective membrane capacitance. *Integr. Biol.* **6**, 545–554 (2014).
19. Eddy, R. J., Weidmann, M. D., Sharma, V. P. & Condeelis, J. S. Tumor Cell Invadopodia: Invasive Protrusions that Orchestrate Metastasis. *Trends in Cell Biology* **27**, 595–607 (2017).
20. Østevold, K. *et al.* Septin remodeling is essential for the formation of cell membrane protrusions (microtentacles) in detached tumor cells. *Oncotarget* **8**, 76686–76698 (2017).
21. Shibue, T., Brooks, M. W., Inan, M. F., Reinhardt, F. & Weinberg, R. A. The Outgrowth of Micrometastases Is Enabled by the Formation of Filopodium-like Protrusions. *Cancer Discovery* **2**, 706–721 (2012).

22. Ravikumar, K., Basu, B. & Dubey, A. K. Analysis of Electrical Analogue of a Biological Cell and Its Response to External Electric Field. *Regenerative Engineering and Translational Medicine* **5**, 10–21 (2019).
23. Fricke, H. & Morse, S. THE ELECTRIC RESISTANCE AND CAPACITY OF BLOOD FOR FREQUENCIES BETWEEN 800 AND 4½ MILLION CYCLES. *The Journal of General Physiology* **9**, 153–167 (1925).
24. Lei, U., Sun, P.-H. & Pethig, R. Refinement of the theory for extracting cell dielectric properties from dielectrophoresis and electrorotation experiments. *Biomicrofluidics* **5**, 044109 (2011).
25. Gascoyne, P. & Shim, S. Isolation of Circulating Tumor Cells by Dielectrophoresis. *Cancers* **6**, 545–579 (2014).
26. S. Iliescu, F. *et al.* Highlighting the uniqueness in dielectrophoretic enrichment of circulating tumor cells. *ELECTROPHORESIS* **40**, 1457–1477 (2019).
27. Kojtych, S. *Introduction au traitement du signal et à l'analyse fréquentielle par transformées de Fourier*. 47 (2019).
28. Venkatanarayanan, A., Keyes, T. E. & Forster, R. J. Label-Free Impedance Detection of Cancer Cells. *Anal. Chem.* **85**, 2216–2222 (2013).
29. Hong, J. *et al.* AC frequency characteristics of coplanar impedance sensors as design parameters. *Lab Chip* **5**, 270 (2005).
30. Grossi, M. & Riccò, B. Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: a review. *J. Sens. Sens. Syst.* **6**, 303–325 (2017).
31. Arya, S. K., Lee, K. C., Dah'alan, D. B., Daniel & Rahman, A. R. A. Breast tumor cell detection at single cell resolution using an electrochemical impedance technique. *Lab Chip* **12**, 2362 (2012).
32. An, L. *et al.* Electrochemical biosensor for cancer cell detection based on a surface 3D micro-array. *Lab Chip* **18**, 335–342 (2018).
33. Cho, S. & Thielecke, H. Micro hole-based cell chip with impedance spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* **22**, 1764–1768 (2007).
34. Ferrario, A. *et al.* Electrochemical impedance spectroscopy study of the cells adhesion over microelectrodes array. in *2011 7th Conference on Ph.D. Research in Microelectronics and Electronics* 57–60 (IEEE, 2011). doi:10.1109/PRIME.2011.5966216.
35. Mansor, M., Takeuchi, M., Nakajima, M., Hasegawa, Y. & Ahmad, M. Electrical Impedance Spectroscopy for Detection of Cells in Suspensions Using Microfluidic Device with Integrated Microneedles. *Applied Sciences* **7**, 170 (2017).
36. Tang, W., Tang, D., Ni, Z., Xiang, N. & Yi, H. A portable single-cell analysis system integrating hydrodynamic trapping with broadband impedance spectroscopy. *Sci. China Technol. Sci.* **60**, 1707–1715 (2017).
37. Do, L. Q. *et al.* Dielectrophoresis Microfluidic Enrichment Platform with Built-In Capacitive Sensor for Rare Tumor Cell Detection. *BioChip J* **12**, 114–122 (2018).
38. Gawad, S., Schild, L. & Renaud, P. Micromachined impedance spectroscopy flow cytometer for cell analysis and particle sizing. *Lab Chip* **1**, 76 (2001).
39. Cheng-Hsin Chuang, Ching-Hua Wei, You-Ming Hsu, Hsiang-Ching Chen & Chin-Hung Wang. Depth effects of DEP chip with microcavities array on impedance measurement for live and dead cells. in *2008 3rd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems* 858–863 (IEEE, 2008). doi:10.1109/NEMS.2008.4484459.
40. Zhao, Y. *et al.* A microfluidic system enabling continuous characterization of specific membrane capacitance and cytoplasm conductivity of single cells in suspension. *Biosensors and Bioelectronics* **43**, 304–307 (2013).
41. Potyrailo, R. A. *et al.* Battery-free Radio Frequency Identification (RFID) Sensors for Food Quality and Safety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**, 8535–8543 (2012).
42. Tsekenis, G. *et al.* Heavy metal ion detection using a capacitive micromechanical biosensor array for environmental monitoring. *Sensors and Actuators B: Chemical* **208**, 628–635 (2015).
43. Hartono, A., Sanjaya, E. & Ramli, R. Glucose Sensing Using Capacitive Biosensor Based on Polyvinylidene Fluoride Thin Film. *Biosensors* **8**, 12 (2018).

44. Bergdahl, G. E., Hedström, M. & Mattiasson, B. Capacitive Sensor to Monitor Enzyme Activity by Following Degradation of Macromolecules in Real Time. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **189**, 374–383 (2019).
45. Wang, L. *et al.* A sensitive DNA capacitive biosensor using interdigitated electrodes. *Biosensors and Bioelectronics* **87**, 646–653 (2017).
46. Javanmard, M. *et al.* Electrical detection of protein biomarkers using bioactivated microfluidic channels. *Lab Chip* **9**, 1429 (2009).
47. Quoc, T. V., Wu, M.-S., Bui, T. T., Duc, T. C. & Jen, C.-P. A compact microfluidic chip with integrated impedance biosensor for protein preconcentration and detection. *Biomicrofluidics* **11**, 054113 (2017).
48. Selvam, A. P. *et al.* Development and validation of an impedance biosensor for point-of-care detection of vascular cell adhesion molecule-1 toward lupus diagnostics. *Future Science OA* **3**, FSO224 (2017).
49. Wang, S. X. *et al.* Detection of the tau protein in human serum by a sensitive four-electrode electrochemical biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* **92**, 482–488 (2017).
50. Rydosz, A. *et al.* A broadband capacitive sensing method for label-free bacterial LPS detection. *Biosensors and Bioelectronics* **75**, 328–336 (2016).
51. Chen, J. *et al.* Microfluidic Impedance Flow Cytometry Enabling High-Throughput Single-Cell Electrical Property Characterization. *IJMS* **16**, 9804–9830 (2015).
52. Wang, M.-H. & Jang, L.-S. A systematic investigation into the electrical properties of single HeLa cells via impedance measurements and COMSOL simulations. *Biosensors and Bioelectronics* **24**, 2830–2835 (2009).
53. Artis, F. *et al.* Microwaving Biological Cells: Intracellular Analysis with Microwave Dielectric Spectroscopy. *IEEE Microwave* **16**, 87–96 (2015).
54. Graham, M. The Coulter principle: foundation of an industry. *Journal of the Association for Laboratory Automation* **8**, 72–81 (2003).
55. Hoffman, R. A. & Britt, W. B. Flow-system measurement of cell impedance properties. *J Histochem Cytochem.* **27**, 234–240 (1979).
56. Wang, H., Sobahi, N. & Han, A. Impedance spectroscopy-based cell/particle position detection in microfluidic systems. *Lab Chip* **17**, 1264–1269 (2017).
57. Yang, D. & Ai, Y. Microfluidic impedance cytometry device with N-shaped electrodes for lateral position measurement of single cells/particles. *Lab on a Chip* **19**, 3609–3617 (2019).
58. Spencer, D., Hollis, V. & Morgan, H. Microfluidic impedance cytometry of tumour cells in blood. *Biomicrofluidics* **8**, 064124 (2014).
59. Choi, H. *et al.* A label-free DC impedance-based microcytometer for circulating rare cancer cell counting. *Lab Chip* **13**, 970 (2013).
60. Park, Y. *et al.* Microelectrical Impedance Spectroscopy for the Differentiation between Normal and Cancerous Human Urothelial Cell Lines: Real-Time Electrical Impedance Measurement at an Optimal Frequency. *BioMed Research International* **2016**, 1–10 (2016).
61. Zhu, Z. *et al.* Time-lapse electrical impedance spectroscopy for monitoring the cell cycle of single immobilized *S. pombe* cells. *Sci Rep* **5**, 17180 (2015).
62. Cheng-Hsin Chuang, Ching-Hua Wei, You-Ming Hsu, Hsiang-Ching Chen & Chin-Hung Wang. Depth effects of DEP chip with microcavities array on impedance measurement for live and dead cells. in *2008 3rd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems* 858–863 (IEEE, 2008). doi:10.1109/NEMS.2008.4484459.
63. Hu, X. & Yang, W. Planar capacitive sensors – designs and applications. *Sensor Review* **30**, 24–39 (2010).
64. Ibrahim, M., Claudel, J., Kourtiche, D. & Nadi, M. Geometric parameters optimization of planar interdigitated electrodes for bioimpedance spectroscopy. *10* (2013).
65. Belfort, G., Davis, R. H. & Zydny, A. L. The behavior of suspensions and macromolecular solutions in crossflow microfiltration. *Journal of Membrane Science* **96**, 1–58 (1994).

66. Wang, M.-H. & Chang, W.-H. Effect of Electrode Shape on Impedance of Single HeLa Cell: A COMSOL Simulation. *BioMed Research International* **2015**, 1–9 (2015).
67. Menini, P. Gas Microsensor Technology. in *Chemical Sensors and Biosensors* (ed. Lalauze, R.) 175–209 (John Wiley & Sons, Inc., 2013). doi:10.1002/9781118561799.ch8.
68. Voskerician, G. *et al.* Biocompatibility and biofouling of MEMS drug delivery devices. *Biomaterials* **24**, 1959–1967 (2003).
69. Gray, M. E. *et al.* Biocompatibility of common implantable sensor materials in a tumor xenograft model. *J. Biomed. Mater. Res.* **107**, 1620–1633 (2019).
70. Abdulbari, H. A. & Basheer, E. A. M. Electrochemical Biosensors: Electrode Development, Materials, Design, and Fabrication. *ChemBioEng Reviews* **4**, 92–105 (2017).
71. Selvakumaran, J., Hughes, M. P., Keddie, J. L. & Ewins, D. J. Assessing biocompatibility of materials for implantable microelectrodes using cytotoxicity and protein adsorption studies. in *2nd Annual International IEEE-EMBS Special Topic Conference on Microtechnologies in Medicine and Biology. Proceedings (Cat. No.02EX578)* 261–264 (IEEE, 2002). doi:10.1109/MMB.2002.1002326.
72. Iliescu, C., Poenar, D. P., Carp, M. & Loe, F. C. A microfluidic device for impedance spectroscopy analysis of biological samples. *Sensors and Actuators B: Chemical* **123**, 168–176 (2007).
73. Courson, R. *et al.* Low-cost multilevel microchannel lab on chip: DF-1000 series dry film photoresist as a promising enabler. *RSC Adv.* **4**, 54847–54853 (2014).
74. Esro, M., Kolosov, O., Jones, P. J., Milne, W. I. & Adamopoulos, G. Structural and Electrical Characterization of SiO₂ Gate Dielectrics Deposited from Solutions at Moderate Temperatures in Air. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **9**, 529–536 (2017).
75. Wiersch, A. Room-temperature deposition of SiNx using ECR-PECVD for III/V semiconductor microelectronics in lift-off technique. *J. Non-Cryst. Solids* **187**, 334–339 (1995).
76. Phan, T. T. M. *et al.* Enhancement of polarization property of silane-modified BaTiO₃ nanoparticles and its effect in increasing dielectric property of epoxy/BaTiO₃ nanocomposites. *Journal of Science: Advanced Materials and Devices* **1**, 90–97 (2016).
77. Walker, C. S. *Capacitance, Inductance and Crosstalk Analysis*. (Artech House Publishers, 1990).
78. Lamberti, A., Marasso, S. L. & Cocuzza, M. PDMS membranes with tunable gas permeability for microfluidic applications. *RSC Adv.* **4**, 61415–61419 (2014).
79. Arya, S. K., Lee, K. C., Dah'alan, D. B., Daniel & Rahman, A. R. A. Breast tumor cell detection at single cell resolution using an electrochemical impedance technique. *Lab on a Chip* **12**, 2362 (2012).

Annexe

Procédé de microfabrication S-MDCs à électrodes intégrées

Concernant les étapes de photolithographie, si l'information n'est pas précisée, l'insolation de la résine photosensible est effectuée avec l'aligneur de masque MA6-Gen4 et la révélation avec le développeur MFCD26, ce qui est le cas pour la majorité des étapes.

- 1. Préparation du substrat.** Un wafer de silicium 4 pouces haute résistivité est nettoyé dans une solution piranah (50% H₂SO₄ + 50% H₂O₂). Une désoxydation est ensuite effectuée dans une solution de HF 5%.
- 2. Dépôt chimique en phase vapeur.** Une oxydation thermique à 1070°C est réalisée sur le substrat de façon à obtenir une couche de SiO₂ d'une épaisseur de 800 nm. Un film de 600 nm de SiN_x est ensuite déposé à 750°C par LPCVD. Ces dépôts sont effectués sur les deux faces du wafer.
- 3. Gravure face arrière.** Une gravure RIE est effectuée avec un plasma CF₄ dans un bâti ICP en pleine plaque sur la face arrière du wafer afin de retirer la bicouche SiO₂/SiN_x. La pression du gaz est 40 cm³/min, la puissance RF est de 40W et la durée de gravure est 13 minutes.
- 4. Ouverture des plots de connexion (N1).** Un plasma O₂ (temps : 2 minutes, puissance : 200 W, débit : 400 cm³/min) est opéré sur le wafer afin d'éliminer d'éventuels résidus organiques. Un dépôt d'hexaméthylsilazane (HMDS) est effectué sur le wafer afin d'assurer l'adhésion de la résine sur la surface oxydée. Une résine positive, ECI, est enduite à la tournette en deux temps. Une première déposition (vitesse : 5000 rpm/min, accélération : 4000 rpm/min², temps : 30 secondes) avec un recuit à 90°C pendant 30 secondes suivi d'une seconde déposition (vitesse : 1000 rpm/min, accélération : 4000 rpm/min², temps : 30 secondes) et un recuit de 1 minute 15 secondes pour obtenir une épaisseur de couche de 2,4 µm. Un détournage de la résine est opéré à l'acétone. L'exposition UV est effectuée avec une dose de 250 mJ/cm² en *vacuum contact*, suivie d'une cuisson post-exposition de 1 min 15 sec à 110°C. Après révélation de la résine, une gravure RIE est effectuée dans un réacteur ICP avec un plasma CF₄ (pression : 40 cm³/min, puissance : 40W, temps : 10 min). Le retrait de la résine est effectué dans un bain d'acétone pendant 2h puis dans un bain de DMSO chauffé à 80°C pendant 1h. Un plasma O₂ (temps : 5 minutes, puissance : 800 W, débit : 1000 cm³/min) est effectué afin de retirer les résidus de résine et solvants.
- 5. Formation des microélectrodes, pistes de connexion et plots de contacts (N2).** Un plasma O₂ (temps : 2 minutes, puissance : 200 W, débit : 400 cm³/min) suivi d'un dépôt HMDS sont effectués sur le wafer. Une résine négative, NLOF, est enduite à la tournette (vitesse : 5000 rpm/min, accélération : 4000 rpm/min², temps : 30 secondes) afin d'obtenir, après recuit à 105°C pendant 1 minute, une épaisseur de couche de 2,5 µm. L'exposition UV est effectuée avec une dose de 250 mJ/cm² en *vacuum contact*, suivie d'une cuisson post-exposition de 1 min à 110°C. Après révélation de la résine, une couche métallique est déposée par évaporation thermique, elle est constituée d'une bicouche de 100 nm de chrome et 700 nm d'or, le chrome assurant l'adhérence au substrat. Un lift-off est effectué dans un bain de DMSO chauffé à 80°C pendant environ deux heures, le wafer a ensuite été rincé à l'acétone puis à l'eau déionisée.

6. **Ouverture des pores de la membrane filtrante (N3).** Cette étape de gravure est identique à celle décrite au point 4. correspondant au niveau N1. Seul le temps de gravure diffère, il est égal à 12 minutes pour cette étape.
7. **Formation des vias de connexion (N4).** Une *seed layer* constituée d'une bicouche de 100 nm de titane et 200 nm de cuivre est déposée par évaporation thermique sur le wafer. Un plasma O₂ (temps : 2 minutes, puissance : 200 W, débit : 400 cm³/min) suivi d'un dépôt HMDS sont effectués sur le wafer. Une résine négative, AZ15NXT est enduite à la tournette (vitesse : 5000 rpm/min, accélération : 4000 rpm/min², temps : 30 secondes). Le recuit est opéré à 105°C en positionnant le wafer 30 sec à 5 mm, 30 sec à 1 mm de la plaque, puis 30 sec en contact et enfin 1 min 30 en *vacuum contact*. L'épaisseur de résine obtenue est de 19 µm. L'exposition UV est effectuée avec une dose de 1600 mJ/cm² en *soft contact*. La cuisson post-exposition est opérée à 110°C en positionnant le wafer 30 sec à 5 mm, 30 sec à 1 mm de la plaque, puis 30 sec en contact et enfin 1 min 30 en *vacuum contact*. Après révélation de la résine, un plasma O₂ est effectué sur le wafer (paramètres). Un dépôt électrolytique d'or de 1 µm est effectué (temps : 8 min, densité de courant : 0,2A/Dm²). La résine est retirée à l'acétone, suivi d'un bain de NF52 à 80°C pendant 5 min et d'un plasma O₂/CF₄ (temps : 2 minutes, puissance : 200 W, débits : 200 cm³/min pour l'O₂ et 40 cm³/min pour le CF₄). Le cuivre de la *seed layer* est gravé avec une solution de piranah (1% H₂SO₄ + 1% H₂O₂+98% H₂O) pendant environ 30 secondes. Le titane est gravé avec un buffer HF 5% pendant 10 secondes jusqu'à l'apparition de bulles dans la solution, puis le wafer est rincé à l'eau DI et à nouveau gravé pendant 5 secondes puis rincé à nouveau.
8. **Isolation des contacts et pistes de connexion (N5).** Un plasma O₂ (temps : 2 minutes, puissance : 200 W, débit : 400 cm³/min) est effectué sur le wafer. Un film sec DF, d'épaisseur 5 µm est déposé avec une presse Nanonex, équipement conventionnellement utilisé pour la technique de *nano imprint* (temps de pompage: 2 min, *preprint* : 30 °C 15 psi, *print* 65 °C 30 psi, temps : 2 min, 55 °C). L'exposition UV a été effectuée avec une dose de 550 mJ/cm² en *hard contact*. La cuisson post-exposition est opérée à 100°C pendant 3minutes. La révélation du film est opérée dans un bain de cyclohexanone pendant 4 min. Le wafer est ensuite rincé à l'isopropanol. Un plasma O₂ (temps : 2 minutes, puissance : 200 W, débit : 400 cm³/min) est effectué afin d'éliminer les résidus de résine et solvants sur le substrat. Un recuit *hard bake* est effectué (60 °C pendant 4 min, 80 °C pendant 2 min, 100 °C pendant 2 min, 120°C pendant 13 min). Un plasma O₂ (temps : 2 minutes, puissance : 200 W, débit : 400 cm³/min) est à nouveau effectué afin d'éliminer d'éventuels résidus persistants.
9. **Formation de la partie supportrice (N6).** Une *seed layer* constituée d'une bicouche de 100 nm de titane et 200 nm de cuivre est déposée par pulvérisation sur le wafer, afin d'obtenir un dépôt conforme sur la surface structurée. Deux films secs WBR-2100, d'épaisseur 100 µm sont laminés à 50°C sur le wafer (pression : 2,5 bars, vitesse < 0,5 m/s). Le wafer est ensuite passé entre les rouleaux de la lamineuse à 100°C (pression : 2,5 bars, vitesse < 0,5 m/s) afin de renforcer l'adhésion entre les deux films de WBR. Un recuit est effectué à 65°C pendant 10 min. L'exposition UV est effectuée avec l'aligneur de masque MA150 avec une dose de 1100 mJ/cm² avec un filtre 365 nm et une ouverture *big circle* en *vacuum contact*. Une cuisson post-exposition est effectuée à 105°C pendant 2 min. La révélation est opérée dans une solution de carbonate de sodium NaCO₃ avec agitation pendant environ 15 min. Après révélation de la résine, un plasma CF₄/O₂ (temps : 2 minutes, puissance : 200 W, débit : 400 cm³/min) est

effectué sur le wafer. Un dépôt électrolytique de nickel est effectué (temps : 214 min, densité de courant : 4 A.dm^{-2}). La résine est retirée à l'acétone, suivi d'un bain de NF52 à 80°C pendant 45 min. La *seed layer* est gravée comme décrit à l'étape 7. Correspondant au niveau N4 et à l'étape d'électrochimie des vias de connexion.

10. Gravure du substrat de silicium et libération des dispositifs. Le silicium est gravé au KOH pendant environ 5,5 heures. Les microdispositifs libérés sont ensuite rincés dans un bain d'eau DI pendant 12h (sans agitation). La gravure de la *seed layer* est effectuée pièce par pièce. Le cuivre est gravé avec une solution de piranah (1% H₂SO₄ + 1% H₂O₂+98% H₂O) pendant environ 45 secondes. Le titane est gravé avec un buffer HF 5% pendant environ 30 secondes. Les microdispositifs sont rincés pendant 12h dans un bain d'eau DI sans agitation.

Intégration d'un dispositif de mesure d'écoulement de la vitesse par effet Doppler

Table des matières

Éléments de contexte	128
1. Le sang en tant que fluide et la mesure de son écoulement	129
1.1. Les propriétés hydrodynamiques de l'écoulement sanguin	129
1.1.1. Composition et fonction du sang	129
1.1.2. L'étude hydrodynamique de l'écoulement sanguin.....	129
1.1.3. Analyse adaptée à la géométrie du conduit étudié	131
1.2. Techniques de vélocimétrie d'écoulement de sang.....	132
1.2.1. Techniques utilisées en routine clinique	132
1.2.2. Techniques de cartographie de l'écoulement sanguin / microcirculation.....	133
1.3. Principe de la vélocimétrie laser à effet Doppler	137
1.3.1. Théorie en milieu simple	137
1.3.2. Détection hétérodyne	138
1.3.3. Configuration à deux sources lasers.....	139
1.3.4. Cas des milieux complexes	140
1.4. Instrumentation pour la mesure	143
1.4.1. Longueur d'onde du laser pour la vélocimétrie Doppler	143
1.4.2. Les lentilles optiques	144
1.4.3. L'analyseur de spectre.....	145
2. Choix techniques pour le système de vélocimétrie laser à effet Doppler	146
2.1. Compatibilité du système de vélocimétrie laser à effet Doppler.....	146
2.2. Configuration de la mesure <i>in situ</i>	147
2.3. Choix de la source laser	147
3. Montage du système et principe de la mesure	148
3.1. Montage de vélocimétrie laser à effet Doppler	149
3.2. Montage fluidique	151
4. Mesures sur modèle de suspension de microbille	152
4.1. Estimation de la vitesse d'écoulement au centre du canal en utilisant la loi Poiseuille	152
4.2. Vélocimétrie par suivi de particule.....	152
4.3. Vélocimétrie laser à effet Doppler	154
4.3.1. Mesure d'une distribution de vitesses	154
4.3.2. Extraction d'une vitesse maximale.....	156
4.3.3. Mesure de vitesses de microbilles individuelles	158
5. Mesures sur sang complet	158

5.1. Simulation de mécanique des fluides.....	159
5.2. Vélocimétrie laser à effet Doppler sur sang complet.....	161
6. Perspectives pour le développement du système.....	165
6.1. Perspectives liées au principe de fonctionnement	165
6.2. Perspectives liées à l'intégration du système de vélocimétrie au dispositif fluidique.....	166
Conclusions	168
Bibliographie.....	170
Annexe A.....	172
Annexe B	174

Chapitre 3

Intégration d'un dispositif de mesure de la vitesse d'écoulement par effet Doppler

Éléments de contexte

Contrairement aux dispositifs de microfiltration de cellules tumorales décrits dans la littérature, les S-MDCs que nous fabriquons ont la particularité de présenter des **ouvertures latérales permettant au sang de circuler** afin de ne pas augmenter la différence de pression à travers la membrane filtrante. Ceci permet d'effectuer la capture dans des conditions dites douces c'est à dire **proches des paramètres de vitesse et pression physiologiques**, assurant ainsi le maintien de l'intégrité et de la viabilité cellulaire. C'est un prérequis important afin de mettre en œuvre les analyses biologiques ou l'éventuelle mise en culture ultérieures à la capture. Cette configuration est aussi prévue pour éviter une obstruction de la circulation sanguine pouvant mener à des complications dans le cas de la capture *ex vivo*, c'est-à-dire connectée à la circulation sanguine du patient sur le principe de l'aphérèse.

En raison de cette différence majeure, il est difficile de déterminer des facteurs de performance de nos dispositifs qui permettent une comparaison directe avec les dispositifs déjà publiés dans la littérature. En effet, pour la majorité des dispositifs technologiques de microfiltration de CTCs existants, l'évaluation des performances est portée sur la filtration du volume total d'un échantillon sanguin. Dans notre cas, il est difficile d'estimer analytiquement ou numériquement le volume de sang ayant réellement traversé la membrane filtrante. Une telle estimation nécessiterait de prendre en compte finement les propriétés hydrodynamiques à l'échelle micrométrique au niveau de la membrane filtrante, les propriétés non newtoniennes du sang, ainsi qu'un effet dynamique non trivial lié à l'obstruction progressive de la membrane filtrante par les cellules capturées.

Toujours dans le fil conducteur de ces travaux de thèse dédiés au **suivi en temps réel de la capture** pour l'inscription du dispositif en routine clinique, nous avons imaginé qu'il serait intéressant d'implémenter un système permettant **une mesure locale d'écoulement sanguin au voisinage de la membrane filtrante**. Le volume sanguin filtré serait ainsi déterminé à partir de la vitesse d'écoulement sanguin en temps réel. La **corrélation du nombre de cellules tumorales capturées au volume filtré** constitue une information numérique fiable qui assurerait l'intégration des S-MDCs en routine clinique pour le suivi de pathologies cancéreuses. Le suivi de la vitesse d'écoulement permettrait aussi **d'optimiser le temps d'exposition** en détectant une obstruction de la membrane filtrante lorsque la vitesse mesurée en aval de cette dernière se réduit trop fortement. De la même façon, une anomalie du flux de circulation au travers du dispositif pourrait être détectée, permettant ainsi une invalidation instantanée de l'analyse médicale.

L'objectif est donc l'intégration d'un système de mesure de l'écoulement sanguin au voisinage de la membrane de filtration afin d'obtenir **des informations quantitatives sur la capture et d'instaurer un protocole précis d'utilisation des S-MDCs, concernant le temps d'exposition notamment**. Ces évolutions techniques sont nécessaires pour le respect des normes en vigueur dans le milieu clinique et l'introduction des dispositifs en routine médicale. Nous avons identifié la vélocimétrie laser à effet Doppler pour répondre à ce besoin technique.

1. Le sang en tant que fluide et la mesure de son écoulement

Cette section a pour but d'apporter les connaissances de base sur la composition du sang et ses propriétés hydrodynamiques, les techniques utilisées actuellement en routine clinique pour la mesure de vitesse de l'écoulement sanguin, et les techniques développées afin de caractériser plus précisément la circulation d'un fluide aux échelles micrométriques. La technique de vélocimétrie laser par effet Doppler fait ensuite l'objet d'une description spécifique, car c'est celle que nous avons choisi de mettre en œuvre.

1.1. Les propriétés hydrodynamiques de l'écoulement sanguin

Nous nous intéressons dans un premier temps à la composition du sang et aux propriétés hydrodynamiques de son écoulement, dont il est important de connaître les spécificités afin d'en effectuer une étude adéquate.

1.1.1. Composition et fonction du sang

Le sang est un fluide complexe constitué d'un liquide aqueux appelé plasma. Le plasma est composé d'eau à 91% et d'une grande variété de solutés comprenant des ions dissouts et différentes molécules telles que des protéines, des nutriments et des hormones notamment. Le plasma contient aussi différents types cellulaires en suspension, appelées hématocytes. Les hématocytes, aussi qualifiées d'éléments figurés du sang périphérique, comprennent les leucocytes ou plus communément globules blancs, les érythrocytes ou globules rouges et les thrombocytes ou plaquettes. Le sang périphérique est le sang situé hors des organes synthétisant le sang, c'est-à-dire hors de la moelle osseuse. Le volume de sang périphérique chez l'adulte humain est d'environ 5L¹. La fonction du sang est le transport du dioxygène et des éléments nutritifs nécessaires aux processus vitaux de l'ensemble des organes et tissus du corps, ainsi que l'évacuation des déchets tels que le dioxyde de carbone CO₂ ou les déchets azotés vers les sites d'élimination (reins, foie, poumons, intestins). Le sang permet également l'acheminement des cellules et molécules du système immunitaire vers les tissus et la diffusion des hormones au sein de l'organisme.

1.1.2. L'étude hydrodynamique de l'écoulement sanguin

- Propriétés rhéologiques

Le sang dans sa globalité est un fluide complexe réagissant mécaniquement et chimiquement avec son environnement. Du point de vue hydrodynamique, les globules rouges sont majoritairement responsables des propriétés de l'écoulement sanguin. La particularité de l'écoulement sanguin est en effet principalement liée à ses propriétés rhéologiques, qui lui sont conférées par les globules rouges largement majoritaires en nombre. De nombreuses études explorent les propriétés rhéologiques liées aux globules rouges²⁻⁴. Ces cellules anucléées sont de forme biconcave avec un diamètre et une épaisseur d'environ 7 µm et 2 µm respectivement⁵. Leur cytoplasme est riche en hémoglobine, protéine assurant le transport de l'oxygène. On appelle hématocrite, la fraction volumique de globules rouges dans le sang qui est d'environ 45% chez l'humain mais qui est variable en fonction de l'âge et du genre⁶.

La capacité des globules rouges à s'agréger et leur déformabilité confèrent à l'écoulement sanguin un caractère non newtonien. Un fluide est newtonien lorsque la contrainte de cisaillement est proportionnelle au taux de cisaillement ou vitesse de déformation du fluide. La constante de proportionnalité est appelée viscosité. Pour un fluide non newtonien, la viscosité dépend du taux de cisaillement du fluide, elle est alors qualifiée de viscosité apparente. Dans le cas de l'écoulement sanguin, l'effet Faraeus-Lindquist, dont le nom fait référence à l'hématologue et au physicien à l'origine

de ces observations en 1931, décrit l'évolution de la viscosité du sang en fonction du diamètre du conduit dans lequel il circule⁷. Cet effet s'observe pour des vaisseaux sanguins compris entre 10 et 300 μm de diamètre par une diminution de la viscosité du sang avec la diminution du diamètre du vaisseau. Ceci s'explique par une viscosité apparente qui diminue lorsque le taux de cisaillement augmente, ce comportement est qualifié de rhéofluidifiant. Cet effet est lié à la déformabilité des globules rouges qui réagissent à la contrainte de cisaillement (voir **Figure 1**). A l'inverse lorsque le taux de cisaillement du fluide diminue, la viscosité apparente du sang augmente en conséquence de la tendance des globules rouges à former des agglomérats⁸. Les globules rouges évoluent préférentiellement au centre du vaisseau sanguin résultant généralement à une région déplétée en globules rouges proche des parois, cette région étant alors essentiellement occupée par du plasma.

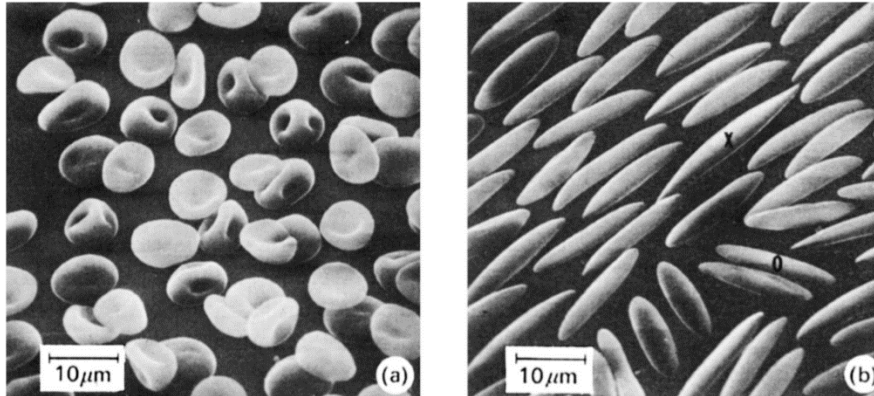


Figure 1 Globules rouges fixés au glutaraldéhyde lors de leur exposition à une contrainte de cisaillement dans un viscosimètre. a) La contrainte est de 10 Nm^{-2} . b) La contrainte est de 300 Nm^{-2} . Images extraites de l'ouvrage « *The mechanics of the circulation* » par C. G. Caro et al.⁹

- Profil de vitesses

L'analyse fluidique du sang en tant que fluide continu ou constitué de deux phases et la prise en compte de ses propriétés non newtoniennes dépend de la taille du vaisseau sanguin. A l'échelle macroscopique, lorsque la taille des cellules est petite devant la dimension du vaisseau, le sang peut être décrit comme un milieu homogène. Dans cette configuration, les cellules sanguines sont sujettes à de faibles taux de cisaillement au sein du vaisseau sanguin mais il existe un gradient radial de viscosité étendu. Cela se traduit par un profil de vitesses aplati par rapport au profil de vitesses parabolique décrit par la loi de Poiseuille pour les fluides visqueux newtoniens en écoulement laminaire au sein d'une conduite cylindrique. Pour les vaisseaux de plus petites dimensions tels que les artérioles et veinules, la région à faible taux de cisaillement est très réduite et comparable à la taille des agrégats de globules rouges. Le gradient de viscosité radial est moins prononcé et la viscosité peut même paradoxalement être considérée comme constante. Dans ce cas-là le profil de vitesse est décrit par la loi de Poiseuille si l'écoulement est laminaire au sein d'une conduite cylindrique. A petite échelle, lorsque la taille du vaisseau sanguin est comparable à celle des cellules sanguines, le sang doit être traité de manière plus complexe comme un fluide non homogène constitué de deux phases. Nous ne détaillerons pas ce régime qui ne correspond pas aux configurations que nous allons étudier.

- Paramètres caractéristiques

La géométrie du système vasculaire présente un caractère 3D important et se décline en plusieurs échelles avec des vaisseaux de diamètres compris entre la dizaine de millimètres pour l'aorte par exemple et le micromètre pour les capillaires (voir **Tableau 1**). La pulsation du système cardiaque est particulièrement ressentie au niveau des larges vaisseaux du réseau artériel où le flux sanguin est pulsatile alors que la circulation observée au niveau de certains vaisseaux sanguins du réseau veineux

est continue et quasiment stationnaire au sein des capillaires de plus petites dimensions. Le flux est principalement décrit par deux paramètres sans dimensions qui sont le nombre de Reynolds et le nombre de Womersley définis comme suit :

$$Re = \frac{d\bar{V}\rho}{\eta} \quad \text{et} \quad W = d\sqrt{\frac{2\pi f\rho}{\eta}} \quad (1) \text{ et } (2)$$

Avec d le diamètre du conduit (en m), \bar{V} la vitesse moyenne (en $\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$), ρ la densité du sang (en $\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$), η la viscosité dynamique (en $\text{kg}\cdot\text{m}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ ou Pa.s) et f la fréquence de l'oscillation du gradient de pression pour un flux pulsatile (en Hz). Le nombre de Reynolds représente le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses et est utilisé pour caractériser le régime laminaire, transitoire ou turbulent d'un écoulement. De façon générale pour l'écoulement sanguin, $Re < 2000$ ce qui traduit un flux laminaire dans la majorité des vaisseaux sanguins (voir **Tableau 1**). Le nombre de Womersley est un paramètre liant la fréquence de flux pulsé aux effets visqueux du fluide. Il porte le nom du mathématicien éponyme qui a dédié une partie de ses travaux à l'hémodynamique et en particulier au flux sanguin dans les artères (1955) ¹⁰. Dans la littérature, l'utilisation de ce paramètre se réfère généralement à la géométrie simple d'un conduit cylindrique. Lorsque $W < 1$, le flux suit les oscillations du gradient de pression et présente un profil parabolique classique. Le flux oscillant à la plus grande amplitude est situé sur l'axe le plus éloigné des parois, alors qu'il est quasiment stationnaire proche de ces dernières. Lorsque $W > 1$, le profil de vitesse n'est plus parabolique et le flux est en déphasage par rapport au gradient oscillant de pression ¹¹. Le tableau répertorie ces deux paramètres pour différents vaisseaux sanguins du système vasculaire ainsi que leur dimensions, taux de cisaillement et vitesses moyennes de l'écoulement sanguin.

Vaisseau	\bar{V} (m/s)	d (mm)	$\dot{\gamma}$ (s^{-1})	Re	W
Aorte	0,4	25	130	2500	260
Artères	0,45	4	900	450	40
Artérioles	0,05	0,05	8000	0,5	0,5
Capillaires	0,001	0,008	1000	0,002	0,1
Veinules	0,002	0,02	800	0,01	0,2
Veines	0,1	5	160	125	50
Veine cave	0,38	30	100	2800	310

Tableau 1 Valeurs de référence pour la vitesse moyenne \bar{V} , le diamètre d , le taux de cisaillement $\dot{\gamma}$, le nombre de Reynolds Re et le nombre de Womersley W dans le système circulatoire humain. Tableau extrait de la revue par P. Vennemann et al. ⁵.

1.1.3. Analyse adaptée à la géométrie du conduit étudié

Dans de nombreux cas, la détermination du débit volumique à partir de la mesure d'une vitesse moyenne ou de la vitesse au centre du vaisseau sanguin et l'hypothèse d'un profil de vitesse parabolique peut constituer une estimation suffisante. Cependant lorsque le profil de vitesse est inconnu et la géométrie du vaisseau plus complexe, une simulation complète de l'écoulement avec une résolution spatiale importante par rapport à la dimension du vaisseau est requise. De la même façon, si le flux est pulsatile la résolution temporelle devra être adaptée de façon à caractériser correctement la dynamique du fluide. De nombreuses techniques permettent la mesure d'une seule composante de la vitesse d'écoulement (voir 1.2.1) ce qui est suffisant pour les vaisseaux réguliers mais ne convient pas pour des vaisseaux à géométrie complexifiée qui peuvent nécessiter jusqu'à la détermination des trois composantes afin d'estimer correctement la vitesse du flux en un point ou sur une région donnée. Le mouvement et la déformation induite sur les vaisseaux sanguins affecte le flux. En tenant compte de l'ensemble des particularités évoquées propres à l'écoulement sanguin, l'estimation de la vitesse du flux sanguin n'est pas évidente et requiert une analyse des conditions et

caractéristiques au niveau du vaisseau sanguin et de la zone où cette vitesse est mesurée afin de choisir une technique de mesure appropriée.

Dans le cadre du projet de thèse, nous cherchons à estimer la vitesse au sein d'un conduit à géométrie régulière qui est le canal fluide dans lequel sont insérés les S-MDCs, que ce soit pour l'utilisation *in vitro* ou de la circulation déportée du patient. Nous considérons que les conditions au sein de ce canal sont proches de celles observées au niveau de vaisseaux sanguins du réseau veineux de géométrie régulière. Nous considérons donc un profil non parabolique dû aux propriétés non newtoniennes de l'écoulement sanguin, ainsi qu'une région déplétée en globules rouges proche des parois du canal. L'écoulement au sein de notre système est considéré laminaire avec un nombre de Reynolds estimé à $Re=14$ en prenant le diamètre du canal $d=2$ mm et la vitesse moyenne $\bar{V}=2$ cm.s⁻¹. Les paramètres de masse volumique¹² et viscosité dynamique¹³ du sang utilisés sont ceux rapportés dans la littérature pour la modélisation de l'écoulement sanguin au sein de la veine porte avec des valeurs de $\rho=1050$ kg.m⁻³ et $\eta=0,003$ kg.m⁻¹.s⁻¹ respectivement. Le flux est stationnaire pour les systèmes utilisés *in vitro*, et nous négligeons le caractère pulsatile du flux que nous assumons stationnaire pour les systèmes utilisés en circulation déportée au sein d'un dispositif fluide *ex vivo*. Cependant, la présence du ou des S-MDCS intégré(s) au canal perturbe le flux localement. Nous faisons l'hypothèse que la mesure d'une composante de la vitesse perpendiculaire à la membrane des S-MDCs permet le suivi de l'évolution de la vitesse en amont de celui-ci au fur et à mesure que les pores sont obstrués.

Pour les S-MDCs utilisés sur les plateformes *in vitro*, le système fluide reproduit les conditions *in vivo* de circulation sanguine au niveau des veines privilégiées pour les prélèvements sanguins (débit, vitesse). Ceci permet d'effectuer la capture dans les conditions proches de celles de l'environnement physiologique afin de ne pas altérer les cellules capturées. Pour les S-MDCs destinés à être utilisés en circulation déportée, le système sera connecté à un site de prélèvement sanguin conventionnel, tel que celui de la veine basilique de l'avant-bras par exemple. Nous nous intéressons donc à des techniques de mesure de vitesse aux ordres de grandeur de vitesse de circulation dans les veines de ce type. Pour nos applications, nous ciblons donc des vitesses moyennes maximales d'écoulement au sein du canal de l'ordre de 7 cm/s, ce qui correspond à la valeur rapportée dans la littérature pour l'écoulement sanguin au sein de la veine basilique par exemple¹⁴.

1.2. Techniques de vélocimétrie d'écoulement de sang

1.2.1. Techniques utilisées en routine clinique

La caractérisation quantitative du flux sanguin *in vivo* présente un intérêt important dans la communauté médicale pour le diagnostic, la thérapie et le suivi de maladies vasculaires dont des exemples courants sont la maladie de l'artère carotide, la maladie coronarienne, l'arythmie, l'infarctus, l'accident vasculaire cérébral ou la maladie artérielle périphérique qui peut entraîner l'insensibilité ou de sérieuses infections. Le flux sanguin se trouve altéré pour un nombre important de maladies, et son analyse permet donc de déceler de nombreuses conditions pathologiques. Elle permet aussi la détection de caillots sanguins (thrombus) dans le système artériel qui mènent généralement à de sévères complications s'ils ne sont pas rapidement neutralisés. Les paramètres pris en compte dans le champ médical sont le débit volumique sanguin (le volume sanguin par unité de temps dans le système vasculaire, exprimé en mL.min⁻¹) et la perfusion (volume de sang par volume de tissu et unité de temps, exprimée en mL.mm⁻³.min⁻¹). Ces deux paramètres sont liés à la vitesse du flux sanguin à travers les vaisseaux sanguins.

Les débitmètres conventionnels utilisés en microfluidique ou dans le domaine médical basés sur des techniques ultrasoniques ou électromagnétiques aboutissent à une mesure moyenne de la

vitesse au sein du conduit étudié. De même, les techniques employées dans le domaine médical telles que la convection thermique ou l'imagerie par résonance magnétique permettent la caractérisation du flux sanguin à partir d'une mesure de vitesse moyennée dans le temps et l'espace. Ces techniques s'appliquent principalement à la caractérisation de vaisseaux sanguins de taille importante et ne permettent pas d'obtenir une mesure précise et localisée de la vitesse d'écoulement sanguin. La technique de vélocimétrie laser à effet Doppler fait exception à cela. Cette technique est déjà intégrée à certains outils utilisés en routine clinique et elle est parallèlement toujours développée dans le milieu de la recherche. Cette technique est décrite dans les paragraphes suivants en soulignant l'intérêt de son application pour des mesures de vitesses d'écoulement localisées. Nous avons en effet sélectionné cette méthode particulière dans le cadre de notre projet en raison de son potentiel d'adaptation à la mesure de la vitesse d'écoulement sanguin au voisinage des S-MDCs, qui nécessite d'être localisée et précise. L'intégration d'une telle mesure au sein du système fluide de capture permettrait ainsi de suivre en temps réel l'occlusion de la membrane filtrante.

1.2.2. Techniques de cartographie de l'écoulement sanguin / microcirculation

Là où les techniques utilisées en routine clinique donnent accès à des valeurs de vitesses d'écoulement sanguin moyennées sur l'ensemble du vaisseau ou sans pouvoir déterminer précisément la localisation de la mesure, de nombreuses techniques sont à l'étude pour une caractérisation plus fine de l'écoulement sanguin. Les informations de profils de distribution de vitesses et cartographies de vitesses d'écoulement représentent des avancées pour la recherche fondamentale dans le domaine de l'hydrodynamique sanguine. Elle permettrait aussi une avancée dans la recherche sur les maladies vasculaires telles que l'athérosclérose qui requiert des images spatialement résolues de la distribution en vitesse de l'écoulement sanguin afin de déterminer l'influence de la force de cisaillement endothéliale sur le développement de la maladie. La mesure de forces de cisaillement permet aussi l'investigation des mécanismes de stimulation pour la cardiogénèse et l'angiogénèse.

- Comparatif des techniques

Un article de revue paru en 2006 présente les avancées permettant la caractérisation *in vivo* de l'écoulement sanguin à l'échelle micrométrique⁵. Les techniques qui y sont rapportées sont basées sur l'usage de lasers ou d'ultrasons et la résonance magnétique nucléaire. Le **Tableau 2** extrait de la revue présente les différentes techniques et certaines de leurs caractéristiques dont les résolutions spatiales et temporelles ainsi que le nombre de composantes du vecteur vitesse mesurées.

	Spatial resolution	Measurement duration	Velocity components	Remarks
Nuclear magnetic resonance imaging	100 µm	10 ms	Standard 1 Up to 3	Used in human research
Ultrasound particle image velocimetry	100 µm	10 ms	2	Used in animal research
Particle image velocimetry	0,1 µm	1 ms	Standard 2 Up to 3	Used in animal research
Laser speckle contrast imaging	100 µm	1 ms	1	Standard research tool for animal model
Scanning laser Doppler	10 µm	1 s	1	Standard diagnostics tool
Multiprobe laser Doppler	100 µm	100 s	1	Under development
Profile laser Doppler	0,1 µm	1 ms	Standard 1 Up to 3	Under development

Tableau 2 Résolution spatiale et temporelle des techniques de mesure de microcirculation *in vivo*. Tableau extrait de la revue par P. Vennemann et al.⁵.

Les techniques optiques présentent de meilleures résolutions spatiales et temporelles. Dans le cadre de notre projet la résolution spatiale et temporelle sont des facteurs importants afin de suivre l'évolution de la variation de vitesse au niveau de la membrane filtrante des S-MDCs. Nous nous intéressons donc préférentiellement à ces techniques que nous allons décrire brièvement.

- Laser speckle contrast imaging

Le phénomène de laser speckle se produit lorsque la lumière cohérente émise à partir d'une source laser est diffusée sur une cible en mouvement présentant des irrégularités de l'ordre de grandeur de la longueur d'onde utilisée, ou dans un milieu présentant plusieurs particules diffusantes. Les ondes réfléchies suivant différents chemins optiques forment des interférences selon un motif aléatoire stationnaire (*speckle* en anglais). Lorsque les particules sont en mouvement uniforme, le motif d'interférence fluctue à une fréquence liée à la vitesse des particules.

La technique du *laser speckle contrast imaging* emploie le phénomène de laser speckle en illuminant le milieu à caractériser au moyen d'une source laser et en imageant le motif d'interférence. Un milieu stationnaire résulte en un motif de fort contraste pour un temps d'acquisition de l'image donné. Le mouvement des particules se traduit par une réduction du contraste causé par le moyennage du motif fluctuant au cours du temps. Une relation liant une variation du contraste du motif d'interférence à une distribution de vitesses a été proposée par A. F. Fercher et J. D. Briers (1981)¹⁵. La technique est sensible au mouvement de particules à la fois parallèle et perpendiculaire au plan de mesure. Cependant, comme les sensibilités de l'imagerie par contraste du motif d'interférence dépendent de la direction du mouvement, la distribution de vitesse doit être connue a priori¹⁶. Cette technique est étudiée depuis le début des années 2000 pour imager la perfusion sanguine. Récemment, une investigation a été menée sur la relation entre la taille des particules diffusantes et la vitesse du flux sanguin pour l'imagerie par contraste laser et cette technique a été utilisée pour imager la microcirculation sublinguale humaine¹⁷. Cette technique présente l'avantage d'être non invasive et de permettre une mesure de la perfusion en temps réel. Cependant, la profondeur de pénétration de la fenêtre spectrale de l'infrarouge étant limitée à quelques millimètres, elle ne s'applique qu'à des vaisseaux superficiels. Sa résolution spatiale élevée en fait une technique privilégiée pour la caractérisation de la microcirculation. De nombreux travaux qui mettent à l'œuvre cette technique sont publiés dans la littérature mais il n'existe actuellement pas, à notre connaissance, d'équipement commercial ou d'utilisation en clinique.

- Vélométrie laser à effet Doppler

Dans sa forme classique, la vélocimétrie laser Doppler permet une mesure localisée de la vitesse d'un écoulement. Elle est généralement mise en œuvre avec un faisceau laser dont la mise au point est effectuée au niveau du site de mesure. Cette technique emploie l'effet Doppler décrivant le décalage fréquentiel subi par une onde lumineuse réfléchi par une particule en mouvement. Ce décalage fréquentiel est lié à la vitesse de la particule réfléchissante (voir 1.3.1). Concernant l'écoulement sanguin, la vélocimétrie laser par effet Doppler a été utilisée pour la première fois en 1972 par C. Riva *et al.* pour la mesure de l'écoulement sanguin au sein d'une artériole de la rétine d'un modèle de l'œil de lapin (voir **Figure 2**)¹⁸. Depuis, de nombreux travaux sont disponibles dans la littérature pour la mesure d'écoulement sanguins *in vivo*¹⁹⁻²¹. De la même façon que pour la technique de *laser speckle contrast imaging*, la distance de pénétration limitée de la lumière (voir 1.4.1) dans les tissus biologiques associée à des résolutions spatiales et temporelles élevées en font une technique privilégiée pour la caractérisation de la microcirculation superficielle.

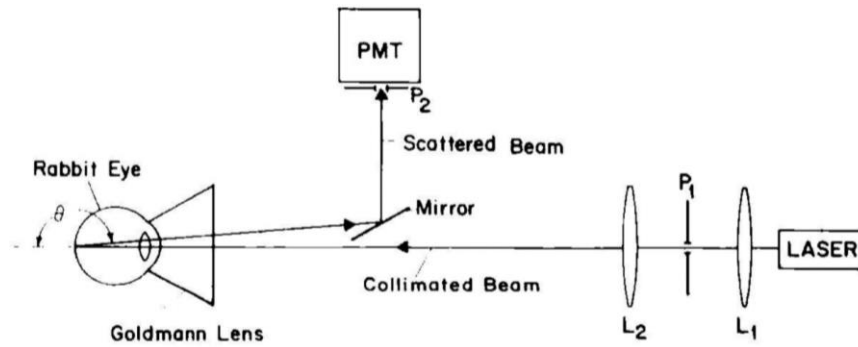


Figure 2 Eléments optiques du montage expérimental pour les mesures de vélocimétrie laser par effet Doppler sur un modèle d'œil de lapin. Schéma extrait de la publication de C. Riva et al. ¹⁸ rapportant la mise en œuvre de cette technique pour les premières mesures réalisées *in vivo*.

A la différence de la technique de *laser speckle contrast imaging* permettant de caractériser une surface 2D, la vélocimétrie laser par effet Doppler donne lieu à une mesure localisée. Des systèmes ont été développés afin d'accéder à un champ de mesure plus important. Pour ce faire, certains systèmes emploient plusieurs fibres optiques d'émission laser et de réception du signal Doppler de façon à multiplier les zones sondées. C'est le cas d'un dispositif constitué de 32 fibres optiques pour la mesure de distributions de vitesses 2D et 3D de vaisseaux méésentériques d'un modèle murin ¹⁹. Une autre façon de caractériser des surfaces 2D est de balayer la surface avec des faisceaux lasers en mouvement continu. Le balayage d'une surface augmente le temps de mesure. Le résultat des mesures pour une surface donnée n'est alors pas obtenu en temps réel, contrairement à la technique de *laser speckle*. Les données sont généralement visualisées sur des images avec un code couleur correspondant à l'information de vitesse (voir **Figure 3**). Le balayage peut être effectué en déplaçant physiquement la source laser ²² mais dans le cas de la caractérisation *in vivo*, le mouvement relatif entre le laser et le tissu peut mener à des artefacts. Une solution à ce problème est l'utilisation de miroirs motorisés pour déplacer le faisceau laser sur la surface à caractériser ²³. Aujourd'hui, de nombreux systèmes commerciaux basés sur ce principe existent, des exemples en sont cités dans les revues par P. Vennemann *et al.* ⁵ et V. Rajan *et al.* ²⁴. La technique de *scanning laser Doppler velocimetry* est devenue un outil standard dans le diagnostic, notamment répandue pour le diagnostic de brûlure, elle permet de discriminer des brûlures superficielles de brûlures plus profondes qui nécessiteraient une intervention chirurgicale. Cette technique de proximité est appréciée pour son caractère non invasif.

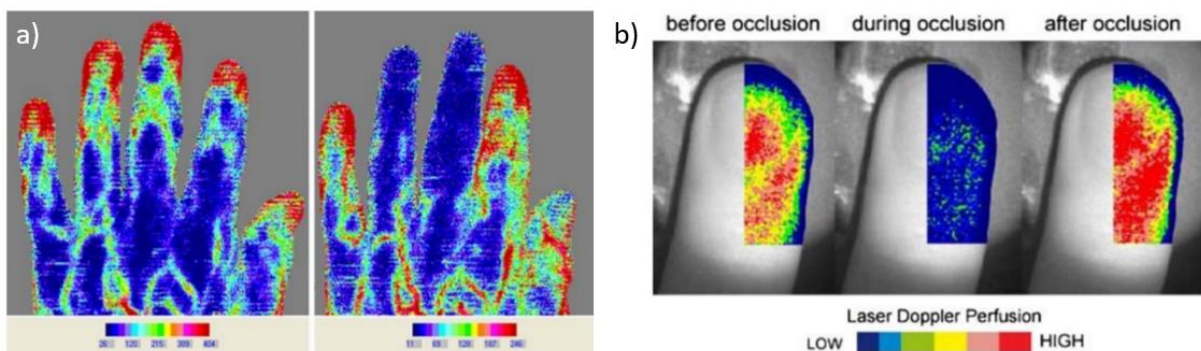


Figure 3 Exemples de cartes 2D de distributions de vitesses obtenues par vélocimétrie laser à effet Doppler. a) Balayage laser Doppler d'une main pour la visualisation de la maladie du syndrome de Raynaud, un problème de circulation lié aux changements de température. Le balayage de gauche est une mesure de référence. Le balayage de droite est une mesure de la main après immersion dans de l'eau froide. b) Image de perfusion d'un bout de doigt par vélocimétrie laser à effet Doppler multi sondes. Les images ont été prises avant, pendant et après ligature du haut du bras. Images extraites de la revue par P. Vennemann *et al.* ⁵.

- Vélocimétrie par suivi de particule

La vélocimétrie par images de particules (en anglais *Particle Image Velocimetry*, PIV) consiste en la visualisation d'un écoulement au moyen de traceurs, prenant la forme de particules introduites à cet effet dans le fluide à étudier ou présentes initialement. En général, le mouvement des particules est enregistré sur deux images digitales successivement acquises avec un délai temporel contrôlé. Le déplacement des particules sur la seconde image relativement à leur position sur la première divisée par le temps de décalage donne une mesure de la vitesse du fluide à l'endroit où se situait les particules étudiées. Il est généralement supposé que le mouvement des particules ainsi enregistré est directement représentatif de la vitesse du fluide en écoulement. Le déplacement de la population de particules entre les deux prises de vue est obtenu par traitement mathématique, souvent de type corrélation²⁵. Une autre technique découlant de la PIV classique est la vélocimétrie par suivi de particules (en anglais *Particle Tracking Velocimetry*, PTV) pour laquelle le déplacement des particules est suivi individuellement entre deux images²⁶. Cela permet d'obtenir une meilleure résolution spatiale mais nécessite une concentration de traceurs beaucoup plus faible. Contrairement à la technique PIV, la distance entre deux traceurs doit être plus importante que leur déplacement de façon à pouvoir identifier des paires de traceurs correspondantes sur les deux prises de vue sans ambiguïté. La représentation des vecteurs vitesses sur une population de particules permet alors une cartographie vectorielle du champ de vitesses. Pour ces deux techniques, des systèmes comportant une caméra permettent d'imager les deux composantes de la vitesse parallèle au plan de l'image et des systèmes à deux caméras permettent d'accéder à la troisième composante de la vitesse.

De nombreux groupes de recherche ont employé les techniques de PIV et PTV pour l'étude de l'écoulement sanguin. La première mesure optique *in vivo* a été rapportée par A. Basler (1918), en utilisant un microscope pour projeter sur un film le mouvement des globules rouges d'un vaisseau sanguin du muscle sartorius d'un modèle de grenouille⁵. Depuis avec l'évolution des techniques d'acquisition d'images et l'évolution de l'analogique au numérique, de nombreux travaux d'analyse d'écoulement sanguin *in vivo* sur modèles animaux ont été rapportés^{27,28} avec des améliorations des résolutions spatiales et temporelles. Une alternative pour augmenter la résolution spatiale est le marquage en fluorescence des éléments sanguins, comme par exemple le marquage des plaquettes effectué pour la mesure de vitesses d'écoulement au sein des artérioles du mésentère d'un modèle de lapin²⁹. Ces techniques s'appuient sur le déplacement des éléments figurés du sang qui peuvent différer de la vitesse réelle du plasma. Le profil de contrainte de cisaillement au niveau des parois des vaisseaux sanguins notamment est difficile à déduire. L'introduction de particules de petite taille, des microsphères fluorescentes de 470 nm de diamètre, a été proposée pour pallier ce problème pour l'étude de la distribution de vitesse au sein de veinules du muscle crémaster d'un modèle murin³⁰.

Cette technique aboutit à une mesure indirecte de la vitesse car un traitement d'image est requis. Elle présente une résolution spatiale et temporelle élevées de l'ordre de 0,1 μm et 1 ms respectivement⁵. Cependant, compte tenu de l'utilisation de lumière dans le spectre du visible pour l'imagerie, la profondeur de pénétration dans les tissus se trouve d'autant plus limitée que pour les techniques employant de la lumière infrarouge (voir 1.4.1). Ainsi, cette technique reste principalement dédiée à des applications de recherche car elle nécessite d'avoir recours à la dissection pour exposer les vaisseaux sanguins analysés.

Nous avons fait le choix de la vélocimétrie laser Doppler pour la mesure de vitesse du flux au voisinage de la membrane filtrante des S-MDCs. Les avantages identifiés de cette technique sont la précision de mesure qu'elle offre, ainsi que la possibilité de mesure locale et directe de l'écoulement sanguin, et enfin le potentiel d'intégration à notre système avec un coût relativement peu élevé. L'originalité de nos travaux tient au fait que nous souhaitons localiser une mesure de vitesse

d'écoulement au voisinage d'un filtre microfabriqué, afin de suivre la dynamique d'obstruction des pores de ce microfiltre. Ainsi, nous souhaitons développer une instrumentation permettant une mesure *in situ*, c'est-à-dire implémentée au sein du canal fluide dans lequel sont positionnés les S-MDCs.

1.3. Principe de la vélocimétrie laser à effet Doppler

L'effet Doppler, dont le nom fait référence au physicien éponyme qui a décrit ce phénomène en 1842, est le décalage fréquentiel d'une onde mécanique, acoustique, électromagnétique ou d'une autre nature, observé entre les mesures à l'émission et à la réception lorsque la distance entre l'émetteur et le récepteur varie au cours du temps. Cet effet est de façon générale très répandu dans les techniques de vélocimétrie pour des applications dans différents domaines tels que l'astronomie pour l'étude du mouvement des astres. Il est aussi à l'œuvre dans les systèmes radars et lidars ainsi que dans les antennes de repérages d'urgence utilisés dans le secteur maritime et dans certains dispositifs utilisés en médecine.

En ce qui concerne la vélocimétrie appliquée au flux sanguin, l'effet Doppler est utilisé dans des systèmes de mesure à partir d'ultrasons, c'est la vélocimétrie Doppler par ultrasons ³¹. Il est aussi largement mis à l'œuvre pour des mesures à partir de faisceaux lasers, telle que la vélocimétrie laser à effet Doppler, qui est la technique à laquelle nous nous intéressons ici. Dans leur implémentation la plus simple, c'est-à-dire sans recours à plusieurs lasers pour des mesures simultanées ou d'un système de balayage, les systèmes basés sur la vélocimétrie Doppler permettent généralement la mesure d'une des trois composantes de la vitesse seulement.

1.3.1. Théorie en milieu simple

L'effet Doppler se produit lorsque l'onde électromagnétique est diffusée par un objet en mouvement par rapport au détecteur. La fréquence de l'onde réfléchi est décalée, la diffusion est dite inélastique car l'énergie du rayonnement diffusé est différente de celle du rayonnement incident. Le décalage fréquentiel permet de déterminer l'une des composantes de la vitesse de l'objet. Considérons un globule rouge (érythrocyte) évoluant dans la direction représentée par le vecteur \vec{V} dont la norme V correspond à la vitesse du globule rouge dans cette direction. Un faisceau laser de longueur d'onde λ_i et de vecteur d'onde \vec{k}_i est incident sur le globule rouge. L'angle α_i est formé entre les vecteurs \vec{k}_i et \vec{V} . Le globule rouge diffuse le faisceau laser dans différentes directions. Dans la direction définie par l'angle α_d avec la direction \vec{V} du globule rouge, la fréquence du faisceau est décalée d'une quantité Δf (voir **Figure 4**). La relation liant le vecteur vitesse \vec{V} du globule rouge au décalage de fréquence Δf est la suivante :

$$\Delta f = \frac{n|\vec{V}|(\cos\alpha_d - \cos\alpha_i)}{\lambda_i} \quad (3)$$

Le décalage fréquentiel peut être positif ou négatif en fonction des angles d'incidence et de diffusion du faisceau laser α_i et α_d et de la direction du mouvement du globule rouge. Cette relation suppose que la direction du globule rouge soit connue *a priori* afin d'en estimer sa vitesse selon cette direction. La relation entre la longueur d'onde λ_i du laser et sa fréquence f_i est la suivante :

$$\lambda_i = \frac{c}{nf_i} \quad (4)$$

Avec c la vitesse de propagation d'une onde électromagnétique dans le vide ou célérité égale à environ 3.10^8 m/s et n l'indice de réfraction du milieu supposé homogène et isotrope.

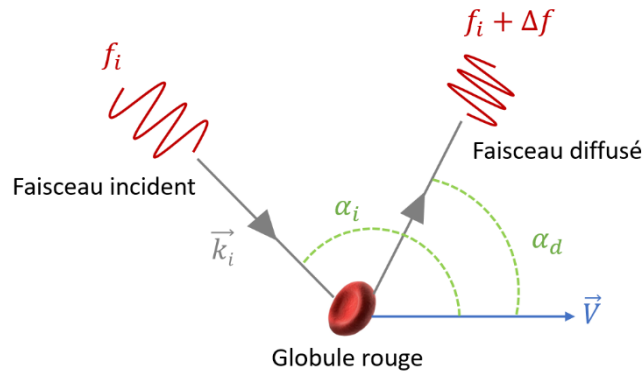


Figure 4 Schéma représentatif d'un globule rouge en mouvement diffusant une onde incidente de fréquence f_i . L'onde diffusée, dont la direction par rapport au vecteur vitesse du globule rouge est repérée par l'angle α_d , présente un décalage fréquentiel Doppler Δf .

1.3.2. Détection hétérodyne

En pratique, le décalage en fréquence de l'onde électromagnétique diffusée est faible, de 100 à 110 kHz, en comparaison de la gamme fréquentielle des ondes lumineuses de l'infrarouge de l'ordre de 100 THz. Ce faible décalage est difficilement détectable de façon directe⁵. La combinaison de l'onde diffusée décalée en fréquence avec l'onde incidente résulte en une fréquence de battement appelée fréquence Doppler f_D égale à la valeur absolue du décalage en fréquence $|\Delta f|$:

$$f_D = |\Delta f| = \frac{nV(\cos\alpha_d - \cos\alpha_i)}{\lambda_i} \quad (5)$$

Lorsque la vélocimétrie laser Doppler est appliquée sur des vaisseaux sanguins superficiels *via* un faisceau laser traversant les tissus et illuminant l'écoulement sanguin, une faible fraction de la lumière détectée, seulement 1 à 5 %³², a été diffusée par les globules rouges en mouvement et présente un décalage fréquentiel dû à l'effet Doppler. La majeure partie de la lumière diffusée détectée a été diffusée par les constituants statiques du tissu biologique et ne présente donc pas de décalage fréquentiel. Cette diffusion élastique, c'est-à-dire sans modification énergétique et décalage de fréquence, sert de signal de référence pour obtenir la fréquence de battement Doppler et déterminer la vitesse des globules rouges diffusants.

Les ondes non décalées en fréquence servent de signal de référence de fréquence f_i égale à celle du faisceau incident et sont optiquement mélangées à la surface du photodétecteur, généralement une photodiode, avec la lumière rétrodiffusée par le globule rouge évoluant à la vitesse V de fréquence $f_i + \Delta f$. Un mélangeur est un composant non linéaire permettant de créer deux nouveaux signaux de fréquences $f_A + f_B$ et $f_A - f_B$ à partir de la combinaison de deux ondes de fréquences distinctes f_A et f_B . En raison du temps de réponse limité du photodétecteur, le mélange de fréquences produit en sortie du capteur un photocourant correspondant à la différence des ondes combinées $(f_i + \Delta f) - f_i = \Delta f$. Le courant du photodétecteur contient donc précisément le décalage fréquentiel Doppler que l'on cherche à détecter. Cette méthode de détection par multiplication de plusieurs fréquences est appelé hétérodyne. Pour ce type de détection, l'amplitude du signal de référence, appelé oscillateur local, doit être plus élevée que celle du signal de la fréquence à combiner de façon améliorer le rapport signal sur bruit. Cette condition est respectée dans le cas de la vélocimétrie par laser Doppler décrit ci-dessus. En effet, le signal de référence est plus puissant que la lumière rétrodiffusée par les globules rouges.

La **Figure 5** présente la technique hétérodyne afin de déterminer le décalage fréquentiel induit par effet Doppler. L'amplitude E_1 est celle de l'onde diffusée par les tissus statiques et présente donc

une fréquence égale à celle de l'onde incidente f_i . L'amplitude E_2 correspond à l'onde diffusée par le globule rouge en mouvement dont la fréquence est décalée d'une valeur Δf . La fonction enveloppe de l'intensité résultante oscille à la fréquence Doppler f_D égale à la valeur absolue de la différence Δf entre la fréquence du faisceau de référence f_i et de la lumière diffusée par le globule rouge en mouvement $f_i + \Delta f$. Le signal du photodétecteur suit la même oscillation. Le décalage Doppler Δf peut alors être déterminé par analyse Fourier du photocourant mesuré en sortie. La lumière réfléchiée par le globule rouge contient des décalages Doppler qui peuvent être positifs ou négatifs en fonction de la direction du mouvement du globule rouge par rapport au faisceau incident et rétrodiffusé. Cependant, seulement la valeur absolue des décalages en fréquence est extraite par la détection hétérodyne et l'information de direction du globule rouge est perdue en utilisant cette technique.

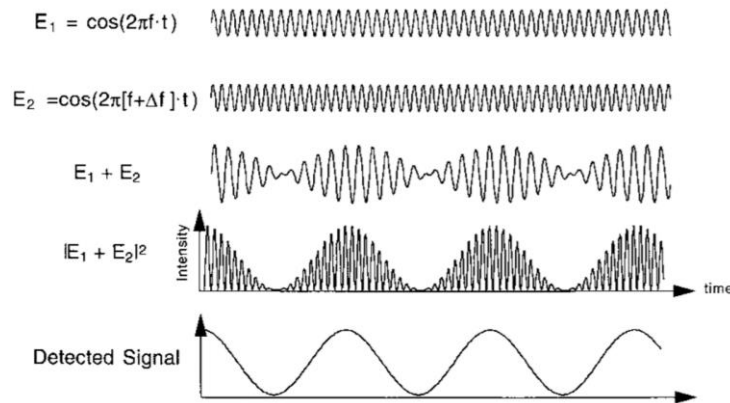


Figure 5 Représentation schématique du principe de détection hétérodyne. Une onde d'amplitude E_1 est combinée avec une onde d'amplitude E_2 décalée en fréquence d'une valeur Δf . Les deux ondes sont combinées à la surface du détecteur pour obtenir une onde d'amplitude $E_1 + E_2$. La sortie du photodétecteur $|E_1 + E_2|^2$ est proportionnelle au flux d'énergie transmis à sa surface. Son temps de réponse limité transmet seulement l'enveloppe des fluctuations. Le signal fluctue alors à la fréquence Δf égale au décalage fréquentiel entre les deux ondes. Figure extraite de la revue par C. Riva ³².

1.3.3. Configuration à deux sources lasers

La combinaison de l'onde incidente et réfléchiée par l'objet en mouvement n'étant pas toujours évidente à mettre en œuvre, certains systèmes emploient deux faisceaux lasers de longueur d'onde λ_i qui se croisent en formant un angle 2θ entre les deux faisceaux et forment des franges d'interférences ⁵ (voir **Figure 6**). Le volume d'intersection définit le volume de mesure. Lorsqu'une particule traverse le volume de mesure, elle réfléchit la lumière du réseau d'interférences à une fréquence liée à la composante de sa vitesse perpendiculaire aux franges d'interférences. Cette fréquence correspond à la fréquence Doppler f_D et s'exprime :

$$f_D = \frac{V \sin(\theta)}{\lambda_i} \quad (6)$$

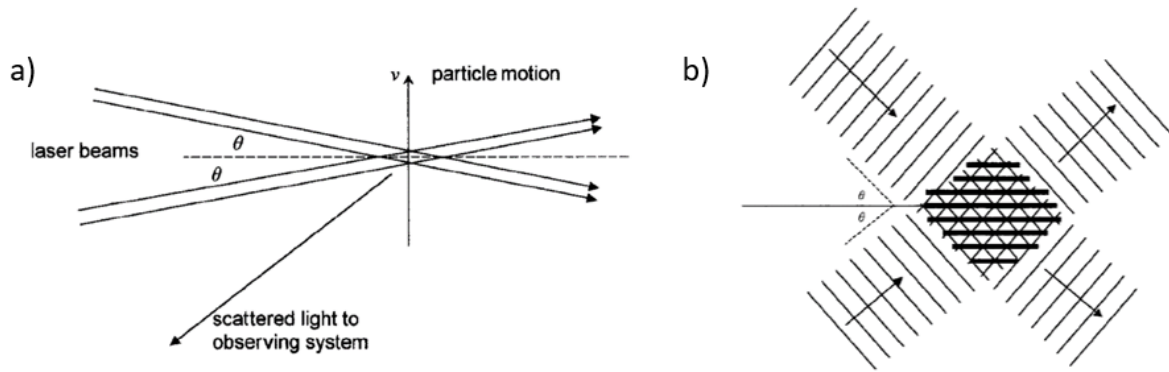


Figure 6 Schématisation du système de vélocimétrie laser à effet Doppler à deux faisceaux. a) Configuration des faisceaux laser vis-à-vis de la particule en mouvement. b) Schématisation des franges d'interférences au niveau du croisement des faisceaux laser. Schémas extraits de la revue par D. Briers³³.

Dans ce cas-là, la détection hétérodyne n'est pas nécessaire, la fréquence de l'onde réfléchi par la particule en mouvement est égale à la fréquence de battement Doppler.

1.3.4. Cas des milieux complexes

En théorie, lorsque l'onde est réfléchi par une particule unique, le décalage Doppler se caractérise par un pic fréquentiel à la fréquence Doppler définie par les relations présentées précédemment. Ces relations sont valables dans le cas idéal d'une onde réfléchi par une particule unique et sont valables pour des milieux présentant des particules toutes identiques présentant un même mouvement dans la même direction. En théorie, il serait possible d'extraire la valeur absolue de la vitesse de la particule diffusante *via* la mesure Doppler. Cependant, au sein des milieux biologiques comme le sang contenant une concentration très élevée de particules diffusantes, les cellules sanguines et autres constituants du sang, des diffusions multiples de la lumière sont possibles. De plus dans le volume correspondant au point de focalisation du laser tous ces centres diffuseurs ne se déplacent pas forcément avec la même vitesse et la même direction. Cet effet complique le phénomène et transforme le pic fréquentiel en une large bande de décalage spectral.

- Le spectre de puissance de densité spectrale

Lorsqu'un faisceau laser illumine un vaisseau sanguin, plusieurs globules rouges - et autres constituants sanguins - se déplaçant à des vitesses et directions variées diffusent la lumière vers le détecteur. La lumière diffusée par l'ensemble des globules rouges illuminés consiste en une somme d'ondes présentant différents décalages fréquentiels Doppler. Le signal obtenu est alors un spectre de puissance de densité spectrale en fonction de la fréquence Doppler (en anglais *Doppler Shift Power Spectrum*, DSPTS). Pour simplifier le texte, nous nous référerons à « puissance optique » pour désigner la puissance de densité spectrale dans la suite de cette partie. Ce spectre est porteur d'informations sur le profil des vitesses et la concentration en particules diffusantes. En effet, la distribution en vitesse et la concentration en particules diffusantes au sein du volume sondé affectent la morphologie du signal de puissance optique. Lorsque la vélocimétrie laser par effet Doppler est effectuée sur un vaisseau sanguin ou conduit artificiel dont le diamètre est de l'ordre de quelques centaines de micromètres, il est fréquent que le faisceau laser illumine l'ensemble de sa section transversale. Le spectre est alors le reflet du profil de vitesse au sein du conduit. Deux allures de signal sont couramment observées dans la littérature.

Le signal de puissance optique peut se présenter sous forme de plateau avec fréquence de coupure nette ou d'un signal de puissance décroissant avec la fréquence. Cette distinction a été

observée dès les premiers travaux rapportés pour la mesure d'écoulement sanguin *in vivo* par C. Riva *et al.*¹⁸, dont deux graphiques sont extraits et présentés **Figure 7**.

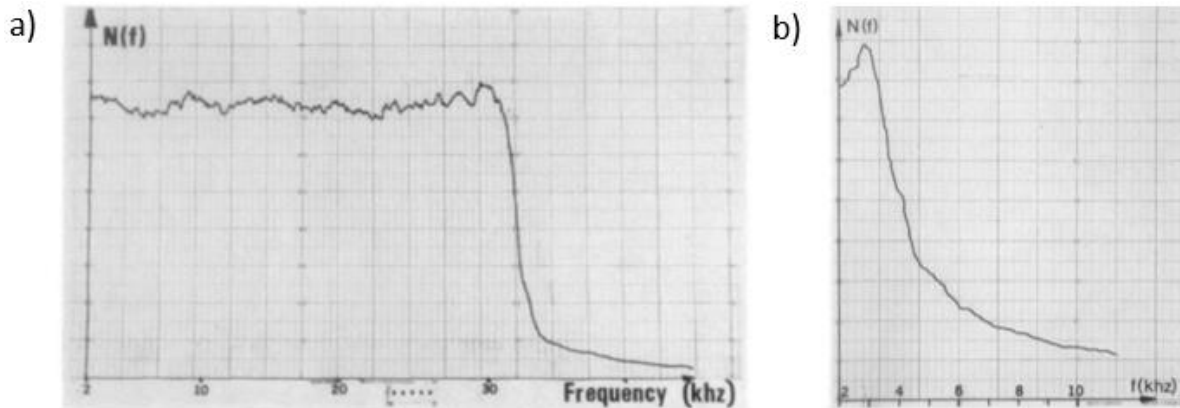


Figure 7 Spectres de puissance de densité spectrales extraits de la publication de Riva *et al.* rapportant pour la première fois l'utilisation de la vélocimétrie laser par effet Doppler *in vivo*¹⁸. a) Mesure effectuée sur une suspension de billes en polystyrène circulant au sein d'un capillaire en verre. Le spectre présente l'allure d'un plateau avec une décroissance nette à une fréquence associée à la fréquence Doppler de la vitesse maximale sondée. b) Mesure effectuée sur une artériole de la rétine d'un modèle oculaire de lapin. Le spectre présente une décroissance de la puissance de densité spectrale lorsque la fréquence de décalage augmente.

Le premier cas de spectre formant un plateau a été observé lors de l'étude préliminaire de l'écoulement d'une suspension de microbilles en polystyrène de 560 nm de diamètre au sein d'un capillaire en verre de 200 μm de diamètre (voir **Figure 7a**). Ce spectre a été associé au profil parabolique décrit par la loi de Poiseuille pour l'écoulement d'un fluide newtonien au sein d'un conduit circulaire. En effet, selon ce type d'écoulement, le profil de vitesse est parabolique avec un nombre égal de particules diffusantes qui circulent à chaque incrément de la gamme de vitesse jusqu'à la vitesse maximale. La fréquence de coupure correspond à cette vitesse maximale. Ainsi, lorsque le signal de puissance optique présente une distribution fréquentielle sous forme de plateau, l'approximation de fréquence de coupure permet d'extraire la fréquence Doppler correspondant à la vitesse maximale au sein du volume sondé. Pour cette méthode, la fréquence à partir de laquelle le plateau de puissance optique décroît en dessous d'une valeur seuil est choisie et permet de calculer la vitesse maximale correspondante. Il n'existe pas de critère ou d'algorithme bien défini pour l'extraction de cette fréquence de coupure particulière. Une valeur seuil de 3dB en dessous de la valeur de puissance optique du plateau est généralement utilisée dans la littérature^{18,34}. Une étude montre néanmoins que le niveau de coupure dépend fortement de la concentration des particules diffusantes³⁵.

La seconde allure de signal généralement observée est une décroissance du signal de puissance optique des faibles fréquences aux fréquences plus élevées. Cette allure est généralement observée lorsque la vélocimétrie est effectuée sur sang complet. Elle a été observée lors de la première utilisation de la vélocimétrie laser par effet Doppler *in vivo*, sur une artériole de la rétine d'un modèle d'œil de lapin (voir **Figure 7b**). Dans ces cas-là, la vitesse moyenne des particules diffusantes dans le milieu sondé peut être déterminé à partir du moment pondéré du spectre de puissance optique. Le moment d'ordre i du spectre de puissance optique est défini comme suit :

$$M_i = \int_0^{\infty} f^i P(f) df \quad (7)$$

Avec f une fréquence et $P(f)$ la puissance optique mesurée à cette fréquence. R. Bonner et R. Nossal sont à l'origine de cette expression qui constitue la base pour l'extraction du signal *via* la vélocimétrie laser par effet Doppler²⁴. Leur modèle est utilisé pour le traitement de données de nombreux systèmes de mesures. Le premier moment, $i=1$ suit une évolution linéaire avec la vitesse moyenne quadratique (rms) des globules rouges et leur concentration. Il a été défini comme le signal de perfusion qui correspond à la concentration moyenne en globules rouges multipliée par la vitesse moyenne des globules rouges. Le premier moment pondéré (M_1/M_0) correspond au shift Doppler moyen permettant d'extraire la vitesse moyenne des globules rouges. Cependant, les relations linéaires décrites par ces modèles sont valides sous certaines conditions, notamment dans les cas en présence de faibles fractions de globules rouges, c'est-à-dire en négligeant la diffusion multiple. Ceci est la principale limitation pour l'application de ce modèle à des vaisseaux dont la dimension est très supérieure à celle des globules rouges.

- La diffusion multiple

Dans des milieux plus complexes, tel que le milieu sanguin auquel nous nous intéressons, des effets de diffusion multiple interviennent. En effet le sang est composé d'éléments de différentes tailles évoluant de façon non uniforme dans le flux sanguin et une onde incidente présente une probabilité importante d'être diffusée plusieurs fois. Cet effet de diffusion multiple est tenu comme responsable de l'élargissement du spectre de puissance optique décrit dans le paragraphe précédent. La figure présente les résultats issus des travaux pionniers de C. Riva *et al.* La **Figure 8a** est le spectre présenté précédemment obtenu avec une suspension de microbilles circulant dans un capillaire en verre de 200 μm de diamètre. La **Figure 8b** présente les résultats obtenus en faisant circuler du sang complet à un débit équivalent dans un capillaire identique. Dès lors, l'absence de fréquence de coupure nette et la décroissance du signal vers les hautes fréquences est associé aux effets de diffusion multiples. Cependant, il n'existe aujourd'hui pas de base théorique solide pour interpréter et discriminer cet effet des spectres de puissance optique mesurées par vélocimétrie laser à effet Doppler. Des approches tentent de modéliser les effets de diffusion multiple en utilisant des modélisations analytiques³⁶ et des algorithmes adaptés³⁷.

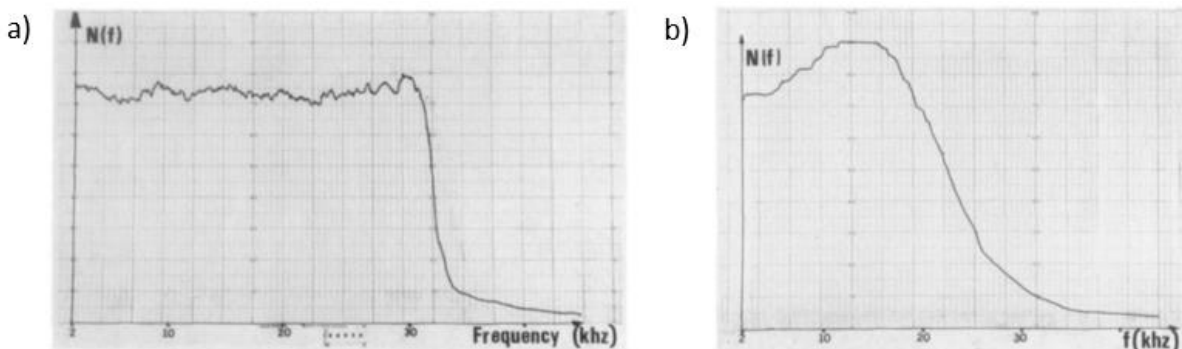


Figure 8 Spectres de puissance de densité spectrales extraits de la publication de Riva *et al.* rapportant pour la première fois l'utilisation de la vélocimétrie laser par effet Doppler *in vivo*¹⁸. a) Mesure effectuée sur une suspension de billes en polystyrène circulant au sein d'un capillaire en verre. Le spectre présente l'allure d'un plateau avec une décroissance nette à une fréquence associée à la fréquence Doppler de la vitesse maximale sondée. b) Mesure effectuée sur du sang complet circulant au sein d'un capillaire en verre identique à celui de la mesure présentée en figure a. Deux différences majeures sont observées. La première est que la puissance de densité spectrale augmente avec la fréquence dans un premier temps. Ceci peut être associé au profil de vitesse non newtonien du sang aplati par rapport au profil parabolique décrit par la loi de Poiseuille. La seconde différence est une décroissance plus progressive du signal lorsque la fréquence augmente. Les effets de diffusions multiples se produisant dans le milieu sanguin peuvent être responsables de l'élargissement du spectre, étant donné que des combinaisons de plusieurs vitesses peuvent être sondées par la lumière diffusée par plusieurs particules.

1.4. Instrumentation pour la mesure

Dans cette section nous allons décrire les composants requis pour la mise en place d'un système de vélocimétrie laser par effet Doppler.

1.4.1. Longueur d'onde du laser pour la vélocimétrie Doppler

Pour les tissus biologiques, les effets de diffusion diminuent avec la longueur d'onde résultant en une profondeur de pénétration augmentée des photons³⁸. Parmi les longueurs d'onde utilisées en imagerie biomédicale, le proche infrarouge présente la profondeur de pénétration maximale dans les tissus biologiques (plusieurs mm), le rouge présente une pénétration de 1 à 2 mm et la lumière verte et bleue ne pénètre quasiment pas les tissus biologiques (0,15 mm)³³. Outre les effets de diffusion, la profondeur de pénétration de la lumière est limitée par l'absorption de certains composants biologiques. Il s'agit notamment de l'absorption dans le sang, plus précisément causée par l'hémoglobine présente dans les globules rouges. Cette protéine présente des pics d'absorption à différentes longueurs d'ondes et est relativement élevée pour des longueurs d'ondes < 600 nm. La lumière est aussi absorbée par l'eau présente dans les tissus et le sang mais de façon relativement plus faible sur un spectre de 250 à 1000 nm. Le coefficient d'atténuation combine les effets d'absorption et de diffusion. La **Figure 9** présente le coefficient d'atténuation de la lumière sur la gamme spectrale 200 nm - 1800 nm pour le sang oxygéné et désoxygéné ainsi que pour les tissus de la peau et adipeux³⁹. La figure présente la pénétration relative de la lumière *in vivo* pour différentes longueurs d'ondes, en prenant comme référence la pénétration dans les tissus de 8 mm pour une longueur d'onde de 800 nm⁴⁰. La fenêtre spectrale du proche infrarouge NIR-I (750 à 950 nm), relativement peu impactée par l'absorption des éléments biologiques et présentant moins de diffusion que la lumière visible est ainsi privilégiée dans le domaine de l'imagerie biomédicale.

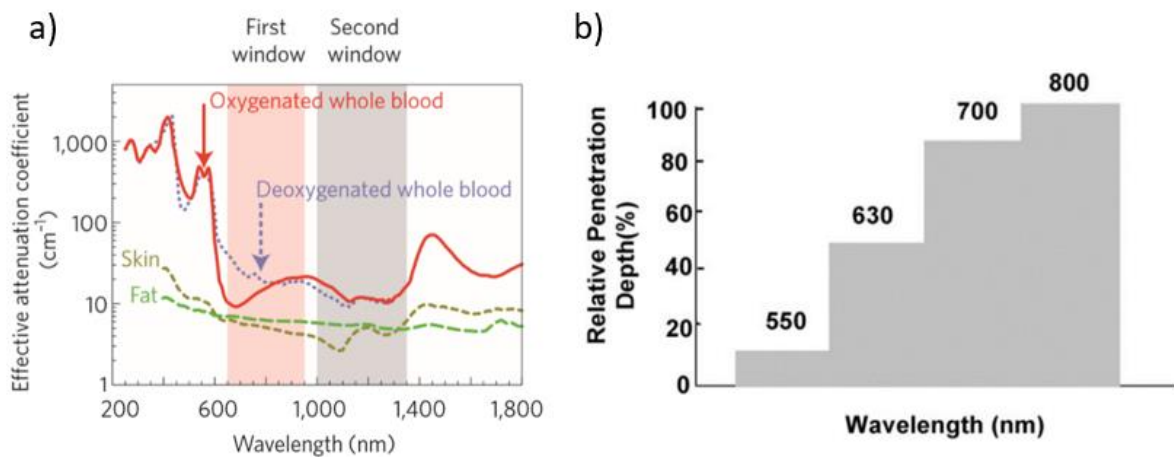


Figure 9 a) Graphique représentant le coefficient d'atténuation (sur une échelle log) en fonction de la longueur d'onde. L'absorption et la diffusion du sang oxygéné et désoxygéné, de la peau et du tissu adipeux sont plus faibles dans la première et la seconde fenêtre des proches infrarouges (NIR-I et NIR-II). Graphique extrait de l'article par A. M. Smith et al.³⁹. b) Diagramme représentant la profondeur de pénétration relative dans les tissus biologiques liée aux effets de diffusion en fonction de la longueur d'onde. La profondeur de pénétration relative à 800 nm est fixée à 100%. La profondeur de pénétration à 800 nm est de 8 mm. Graphique extrait de l'article par M. Ethirajan et al.⁴⁰.

Aux débuts de la vélocimétrie Doppler pour la mesure de vitesse d'écoulement sanguin, les lasers émettant dans le spectre visible rouge ont été utilisés. Le premier laser à gaz, avec un mélange d'hélium et de néon, présentant une longueur d'onde dans le rouge visible $\lambda = 632,8$ nm, est utilisé dans de nombreux travaux^{18,20,41}. Suite à l'apparition du laser à semi-conducteur, ou diode laser, de nombreux systèmes emploient ce type de lasers pour les avantages qu'ils présentent en termes de

coût et de compacité. La majorité des diodes lasers reportées dans les travaux plus récents émettent dans l'infrarouge à des longueurs d'onde entre 667 et 825 nm^{19,21,34,42}. Ces longueurs d'onde font partie de la bande spectrale des proches infrarouges de la fenêtre NIR I (750 - 950 nm) utilisées pour des applications d'imagerie biomédicales.

Dans le cadre de notre projet, nous ne sommes pas confrontés à la problématique de pénétration de la lumière au travers des tissus. En effet, la détection devant être effectuée au voisinage du S-MDC, la source lumineuse sera intégrée *in situ*, c'est-à-dire embarquée sur le dispositif fluïdique dans lequel est établi l'écoulement sanguin.

1.4.2. Les lentilles optiques

En général, les faisceaux lasers sont divergents à la sortie de la cavité optique. Des lentilles optiques sont utilisées pour faire converger le faisceau au niveau de la zone de mesure. Cela permet de concentrer l'énergie de l'illumination et ainsi de réduire le volume de mesure tout en maximisant la puissance du signal diffusé vers le détecteur. Lorsque le faisceau laser traverse une lentille convexe, la largeur du faisceau est minimale à une distance axiale de la lentille appelée distance focale f (voir **Figure 10**). Le faisceau Gaussien décrit les rayonnements cohérents tels que les faisceaux lasers. Selon ce modèle, $w(z)$ représente le rayon de la tâche que forme le faisceau laser dans un plan perpendiculaire à sa propagation, à une distance z de l'origine. Le paramètre $w(z)$ est aussi qualifié de demi largeur du faisceau à un point donné. Pour un point z très éloigné de l'origine, $z \gg z=0$, le paramètre $w(z)$ s'approche d'une ligne droite. L'angle entre cette ligne et l'axe central du faisceau est appelé divergence, égale à $\theta/2$ sur le schéma de la **Figure 10**. La demi largeur du faisceau présente une valeur minimale w_0 à l'origine $z=0$. On appelle portée de Rayleigh z_R , la distance à l'origine à partir de laquelle la surface de la tâche du faisceau est multipliée par deux. La portée de Rayleigh est définie comme suit :

$$z_R = \frac{\pi w_0^2 n}{\lambda} \quad (8)$$

Avec n l'indice de réfraction du milieu dans lequel se propage le faisceau et λ la longueur d'onde du laser dans le vide. La distance entre $+z_R$ et $-z_R$ est appelée paramètre confocal et est égale à :

$$b = 2z_R = \frac{2\pi w_0^2 n}{\lambda} \quad (9)$$

Certains travaux utilisent ces paramètres pour définir le volume de mesure dans le cas d'une mesure de la vitesse d'écoulement localisée⁴¹. En effet, le volume de mesure Doppler situé à l'endroit où le faisceau converge peut être approximé à partir de ces paramètres, en multipliant la surface du faisceau à $z=0$ qui présente la demi largeur minimale w_0 par le paramètre confocal b . La distance focale de la lentille convexe correspond alors à la distance de travail du système, et définit la localisation du site de mesure. Cependant les effets de diffusions multiples augmentent potentiellement le volume sondé.

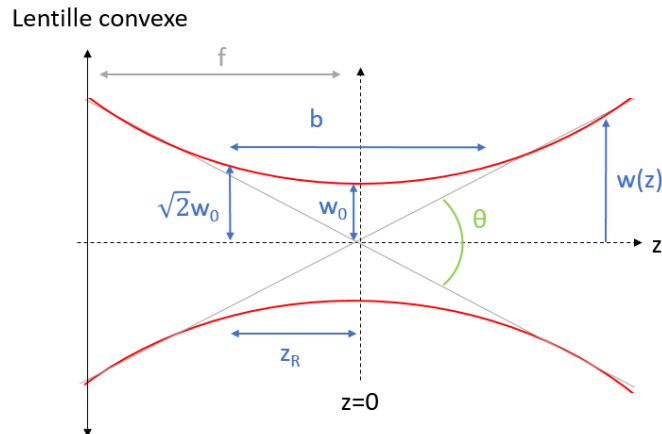


Figure 10 Schéma représentatif d'un faisceau Gaussien à la sortie d'une lentille convergente et de sa demi largeur $w(z)$ en fonction de la distance z .

Des systèmes de vélocimétrie laser exploitant l'effet Doppler pour la mesure d'écoulement sanguin rapportent généralement l'utilisation de lentilles convexes afin de faire converger le faisceau au niveau du site de mesure souhaité ou au niveau de la photodiode de détection^{18,19,34}. Cela implique un réglage du système au préalable et que celui-ci soit statique, ce qui n'est pas évident à mettre en œuvre pour la mesure d'écoulement sanguin *in vivo*. Pour contourner ce problème, des travaux utilisant une fibre optique comme émetteur du faisceau laser et récepteur du signal Doppler décrivent la fabrication d'une lentille convexe en bout de fibre par attaque chimique⁴¹, permettant le déplacement de façon solidaire de la source laser et de la lentille.

1.4.3. L'analyseur de spectre

L'analyseur de spectre est un instrument qui mesure l'amplitude d'un signal en fonction de la fréquence sur une gamme fréquentielle donnée. La nature du signal analysé est généralement électrique, mais peut aussi être optique, sonore ou radioélectrique lorsque le transducteur est adapté. En analysant le spectre des signaux électriques, des paramètres tels que la fréquence dominante, les harmoniques, la puissance et la bande passante peuvent être détectés qui ne seraient pas forcément identifiables en observant la forme de l'onde dans le domaine temporel. Deux types d'analyseurs de spectres sont distingués selon leur mode de fonctionnement qui sont l'analyseur à balayage et l'analyseur en temps réel.

L'analyseur à balayage (en anglais *sweep-tuned spectrum analyzer*) mesure la composition fréquentielle d'un signal en analysant chacune de ses fréquences séparément. L'analyseur temps réel (en anglais *real time spectrum analyzer*) réalise la conversion simultanée d'un signal dans une gamme de fréquence. Il existe alors deux types d'instrumentation, les analyseurs à filtres parallèles qui utilisent plusieurs filtres passe-bande et les analyseurs qui utilisent la transformation de Fourier rapide (en anglais *Fast Fourier Transform*, FFT), une transformation mathématique permettant de convertir le signal numérisé dans le domaine fréquentiel.

Dans le cas des mesures par vélocimétrie laser Doppler, l'analyseur de spectre est généralement couplé à une photodiode. Il peut aussi être couplé directement à la diode laser. Dans ce cas-là, la source laser sert à la fois, d'émetteur et de récepteur de l'onde optique, et d'interféromètre. Il s'agit en anglais de la technique de *self mixing* ou *laser intra cavity feedback interferometry*, aussi rapportée dans la littérature pour des mesures de la perfusion superficielle de la peau^{42,43}. Des analyseurs de spectres utilisés en laboratoire permettent d'effectuer des mesures de quelques dixièmes de Hz à la centaine de GHz. Ces instruments sont relativement conséquents et peuvent être

branchés sur le secteur. Depuis récemment, il existe des instruments portables très légers et alimentés par batterie dont le coût est très abordable mais dont la gamme spectrale analysée est réduite.

2. Choix techniques pour le système de vélocimétrie laser à effet Doppler

Nous nous sommes tournés vers la technique de vélocimétrie laser à effet Doppler qui semble la plus appropriée à la caractérisation du flux sanguin tel que nous l'envisageons, et la plus compatible pour l'intégration au système fluide dans lequel nous souhaitons positionner les Micro-Dispositifs de Capture (S-MDCs). En effet, des travaux antérieurs ont été reportés pour des mesure intra-artérielle d'écoulement sanguin en utilisant une diode laser et la technique de *self-mixing*⁴². Cependant, à notre connaissance, aucune étude de vélocimétrie laser par effet Doppler n'a été rapportée pour l'étude de l'écoulement *in situ*, c'est-à-dire en insérant une sonde au sein du conduit fluide ou vaisseau sanguin où le flux doit être analysé. Un système commercial (ADInstruments) de sonde Doppler intravasculaire existe pour un usage à destination de la recherche animale. Le système emploie une diode laser émettant dans le proche infrarouge et mesure un décalage fréquentiel Doppler sur une gamme fréquentielle de 16 kHz. Cette gamme correspond à une variation de vitesse d'environ 0,5 cm/s. Ceci ne permet pas de mesurer l'amplitude des variations de vitesses auquel est sujet notre système lors de l'obstruction de la membrane filtrante du S-MDC. En effet, la vitesse d'écoulement en amont de la membrane filtrante du S-MDC peut varier d'une dizaine de cm/s, variable selon le débit établi pour le processus de capture, à une vitesse d'écoulement quasi-nulle lorsque cette dernière est totalement obstruée par la présence de cellules. Nous sommes donc intéressés par le développement d'un tel système de vélocimétrie pour intégration à la plateforme fluide dans laquelle est effectuée la capture cellulaire avec les S-MDC.

2.1. Compatibilité du système de vélocimétrie laser à effet Doppler

Dans la littérature, une solution pour contourner la limite de pénétration laser est la **mesure *in situ***, en amenant le faisceau laser au sein du conduit fluide dans lequel le sang circule. Sur ce principe, nous envisageons l'implémentation de la vélocimétrie laser à effet Doppler par le biais d'un faisceau laser unique guidée par une fibre optique débouchant au sein du canal ou du vaisseau, résultant donc en une **mesure locale**. L'implémentation d'un scan, techniquement plus complexe, et non adaptée pour le suivi du processus dynamique de capture susceptible d'évoluer relativement rapidement dans le temps, n'a pas été envisagée. L'insertion de plusieurs fibres pour la caractérisation d'un volume fluide élargi ne paraît pas judicieuse vis-à-vis de la très forte perturbation du flux engendré en multipliant les fibres. Nous supposons que sur la surface de 800 μm de diamètre de la membrane filtrante, l'obstruction progressive du filtre aura une répercussion sur l'écoulement en aval et que la diminution de la vitesse au niveau central sera représentative de l'obstruction progressive de l'ensemble de la surface de la membrane filtrante. Nous pouvons aussi imaginer sonder une augmentation de la vitesse au niveau des ouvertures latérales liée à l'obstruction de la membrane filtrante. Ces hypothèses doivent être explorées méticuleusement par le biais de simulations fluidiques fines, mais ces investigations ne font pas partie des travaux présentés dans le cadre de ce projet de thèse. Un **positionnement central de la fibre optique par rapport à la membrane filtrante** ou au niveau d'une ouverture latérale permettrait donc d'obtenir un signal de variation de la vitesse d'écoulement porteur d'informations sur l'occupation des pores de la membrane par des cellules capturées. Le système ainsi envisagé pourrait permettre le suivi de la variation d'une seule composante de la vitesse (selon l'axe du canal ou du vaisseau), et nous estimons son évolution représentative de l'obstruction progressive de la membrane filtrante.

2.2. Configuration de la mesure *in situ*

Nous avons été inspirés par les travaux menés par Tajikawa *et al.*⁴¹ qui présentent l'insertion d'une fibre optique directement dans le conduit où le fluide circule pour des mesures de vélocimétrie laser par effet Doppler. Nous avons choisi de mettre en œuvre un système où la fibre optique serait insérée directement dans le canal fluide dans lequel est placé le S-MDC, afin d'effectuer la mesure *in situ* au **voisinage de la membrane filtrante**. De la même façon que dans les travaux évoqués, cette fibre servirait à la fois d'émetteur du faisceau laser et de récepteur du signal rétrodiffusé. Nous privilégierons une **disposition de la fibre optique parallèle au flux** afin d'en minimiser la perturbation au voisinage du S-MDC. Elle serait disposée de préférence en amont du S-MDC afin de sonder les variations de vitesses à son entrée car le flux est davantage en aval du S-MDC, ce qui empêcherait de mesurer correctement des variations de vitesse liées à l'obstruction progressive de la membrane filtrante.

Les travaux sur lesquels nous nous sommes basés décrivent l'intégration d'une lentille convexe en bout de fibre afin de focaliser le faisceau laser à 220 μm du bout de la fibre par attaque chimique. L'angle d'insertion de la fibre dans le conduit fluide a été étudié pour la mesure de la vitesse d'écoulement d'une suspension de globules rouges. Les résultats montrent que la mesure n'est pas concluante avec un angle de 0°, ce qui signifie en insérant la fibre dans le sens du flux. Une justification de cette observation est que le site de mesure est probablement situé dans le sillage de la fibre, à un endroit où le flux est fortement perturbé. Cette configuration étant celle que nous souhaitons implémenter, nous devons augmenter la distance de travail afin d'effectuer la mesure dans une zone non perturbée en aval de la fibre et en amont du S-MDC. Sur le même principe, nous avons fabriqué manuellement des lentilles boules afin de focaliser le faisceau au niveau du site de mesure et d'obtenir suffisamment de lumière rétrodiffusée réentrant dans la fibre optique pour mesurer un effet Doppler. Nous avons utilisé **différents rayons de courbure** afin de déterminer **l'impact sur la mesure en termes de perturbation** éventuelle du flux et de **distance de travail**.

Un compromis doit être effectué concernant la distance entre le bout de la fibre optique et la membrane filtrante du S-MDC. Il faut minimiser la perturbation du flux pour ne pas impacter la capture tout en étant capable de pouvoir sonder les variations de vitesse au niveau du volume fluide affecté par l'obstruction du filtre, c'est-à-dire au voisinage de la membrane. La recherche de ce compromis peut être effectuée par des simulations fluidiques et optiques couplées à des expérimentations. La puissance du laser doit être limitée afin d'éviter un échauffement du milieu au niveau du site de mesure, de façon à affecter le moins possible le processus de capture cellulaire. Les fibres optiques en verre sont cassantes et doivent être manipulées avec précaution. Elles peuvent être courbées avec un rayon de courbure de 30 cm minimum. L'intégration au système fluide comportant les S-MDCs devra être pensée pour une insertion guidée de la fibre au sein du canal fluide ainsi qu'un contrôle de son centrage par rapport à la membrane filtrante. Un contrôle précis de la distance entre le bout de la fibre optique et la membrane filtrante sera aussi nécessaire.

2.3. Choix de la source laser

Le choix de la source laser a été porté sur une diode laser DFB (en anglais *distributed feedback*) émettant dans l'infrarouge lointain ($\lambda=1537$ nm). Ce type de laser est le premier à **fréquence unique** et a été largement répandu dans le domaine des télécommunications entre la fin des années 1990 et début des années 2000. L'utilisation d'un laser de ce type permet de mettre en place un **montage compact** comprenant un chemin optique totalement fibré grâce à la variété de **composants fibrés** développés pour le marché des télécommunications. Ces composants présentent aussi l'avantage d'être accessibles à faible coût. Le montage ainsi simplifié, n'emploie aucune lentille et autres

composants optiques (miroirs chromatiques) généralement utilisés dans les systèmes reportés dans la littérature pour la vélocimétrie Doppler laser d'écoulements sanguins^{19,20,41,43,44}. Le montage ne nécessitera pas de réglages minutieux de la part de l'utilisateur et pourra ainsi être intégré facilement au système fluïdique auquel sont couplés les S-MDCs pour la capture cellulaire. De plus, ces lasers présentent une **grande finesse spectrale** permettant d'effectuer des mesures de façon très précise.

A notre connaissance, l'utilisation de laser dont la longueur d'onde appartient à gamme spectrale de la fenêtre des infrarouges lointain (NIR II 1000 - 1700 nm) est originale pour l'application de vélocimétrie Doppler d'écoulement sanguin, pour laquelle les systèmes emploient des lasers émettant préférentiellement dans le rouge et proche infrarouge (voir 1.4.1). L'emploi de laser à ces longueurs d'onde a été principalement dédié à des mesures haute vitesse. Des travaux ont été menés avec un laser fibré de longueur d'onde $\lambda = 1550$ nm pour la mesure de la vitesse d'une cible en mouvement à une vitesse de 1000 m/s. D'autres travaux ont proposé un modèle théorique pour la mesure vélocimétrie Doppler employant des lasers à blocage de mode (en anglais *mode locked*). Leur approche a ensuite été appliquée à des mesures de vitesse autour de 20 m/s avec un laser de longueur d'onde $\lambda = 1064$ nm. Cependant, les vitesses que nous souhaitons caractériser, de l'ordre de grandeur de celles reportées pour la circulation sanguine dans le système veineux autour de 10 cm/s, sont inférieures de deux ordres de grandeur, (voir 1.1.2). La compatibilité de la longueur d'onde choisie avec la mesure de vitesse de l'écoulement sanguin fait partie de l'étude menée dans les travaux de cette thèse et en constitue sa spécificité principale.

3. Montage du système et principe de la mesure

Pour la mise en place du système de vélocimétrie laser par effet Doppler et les mesures expérimentales effectuées avec ce système, nous avons collaboré avec Olivier Llopis, directeur de recherche au sein de l'équipe MOST (Microondes et Opto-microondes pour Systèmes de Télécommunications) du LAAS-CNRS et Aliou Ly, post-doctorant de la même équipe. Un montage de vélocimétrie Doppler comprenant un laser émettant dans **l'infrarouge lointain de longueur d'onde $\lambda=1537$ nm** a été mis en place afin de déterminer la vitesse d'écoulement de sang complet au sein d'un canal de microfluidique, nous appellerons ce type de mesure une mesure *in situ*. Dans la configuration *in situ*, une **fibre optique est insérée au sein d'un canal fluïdique** modélisant le système fluïdique dans lequel est effectuée la capture de cellules tumorales en utilisant les S-MDCs. L'intégration du système de vélocimétrie au système fluïdique contenant les S-MDCs et l'étude de l'évolution de l'obstruction de la membrane filtrante par mesure des évolutions de la vitesse d'écoulement au voisinage de la membrane filtrante n'entre pas dans le cadre des travaux de cette thèse.

Des mesures ont été menées avec des fibres lentillées présentant différents rayons de courbure de la lentille sur **suspension de microbilles** dans un premier temps, puis sur **sang complet** circulant dans le canal. Les mesures ont été effectuées avec la fibre positionnée dans le sens de l'écoulement et dans le sens opposé de l'écoulement afin d'observer l'impact de ces configurations sur la mesure. Dans la suite du manuscrit, nous appelons les deux options précédentes configuration en amont et configuration en aval respectivement. Cependant dans l'anticipation de l'intégration pour la mesure d'obstruction de la membrane filtrante des S-MDCs, le positionnement de la **fibre optique dans la configuration en amont, c'est-à-dire avec le faisceau se propageant dans le sens de l'écoulement** est privilégié.

3.1. Montage de vélocimétrie laser à effet Doppler

Des lentilles de type boule sont formées en bout des fibres optiques. Elles ont été manuellement fabriquées en utilisant un dispositif d'épissage par fusion de fibres optiques, dont le principe de fonctionnement est comparable à celui d'une soudeuse, sur des fibres optiques commerciales (Corning® SMF28® Ultra Optical Fiber). Le réglage des paramètres a permis d'obtenir des lentilles hémisphériques présentant différents rayons de courbure. Nous appelons la Fibre A, la fibre de rayon de courbure le plus important (voir **Figure 11a**) qui a été mesurée optiquement à $123\ \mu\text{m}$ et Fibre B la fibre de rayon de courbure mesurée optiquement à $72\ \mu\text{m}$ (voir **Figure 11b**). Les diamètres de fibre sont de $125\ \mu\text{m}$. La troisième fibre utilisée est une fibre commerciale à embout conique lentillé (CXFIBER®) que nous appelons Fibre C (voir **Figure 11c**). Le rayon de courbure est de $10\ \mu\text{m}$ et le diamètre est toujours de $125\ \mu\text{m}$.

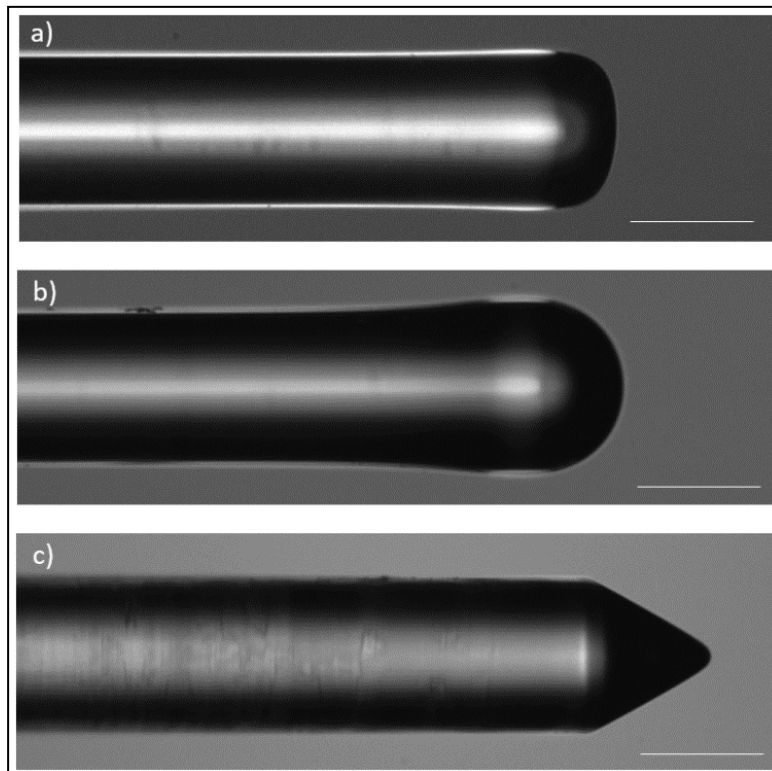


Figure 11 Images des trois embouts de fibres optiques utilisées pour les mesures de vélocimétrie laser à effet Doppler. Les barres d'échelle correspondent à $100\ \mu\text{m}$. a) Fibre A présentant le rayon de courbure le plus important. b) Fibre B présentant un rayon de courbure intermédiaire. c) Fibre C avec embout conique lentillé.

Les fibres optiques servent à la fois d'émetteur du signal optique au niveau du site à caractériser et de récepteur du signal rétrodiffusé. Le montage du système de vélocimétrie Doppler consiste en la combinaison du faisceau laser de référence avec la lumière rétrodiffusée par les particules en mouvement dans le fluide. Un faisceau monochromatique émis par un laser DFB monomode (FU-68PDF, Mitsubishi), de puissance $20\ \text{mW}$ et de longueur d'onde $\lambda = 1537\ \text{nm}$, est utilisé comme faisceau de référence. L'alimentation du laser est de $120\ \text{mA}$, ce qui correspond à une puissance de sortie de $16,5\ \text{mW}$. Le source laser est connectée à un circulateur optique permettant de séparer la puissance réfléchiée de celle transmise. Le port de sortie du circulateur est connecté à une photodiode (FGA04, Thorlabs) chargée à une résistance de $1\ \text{k}\Omega$. Le signal en tension collecté aux bornes de la résistance est ensuite amplifié en utilisant un amplificateur faible bruit (AD797, Analog Devices). Le signal amplifié est mesuré *via* un analyseur de spectre (RSA306, Tektronix) (voir **Figure 12**). Le spectre est mesuré sur la gamme de fréquence $5 \cdot 10^3 - 2 \cdot 10^6\ \text{Hz}$.

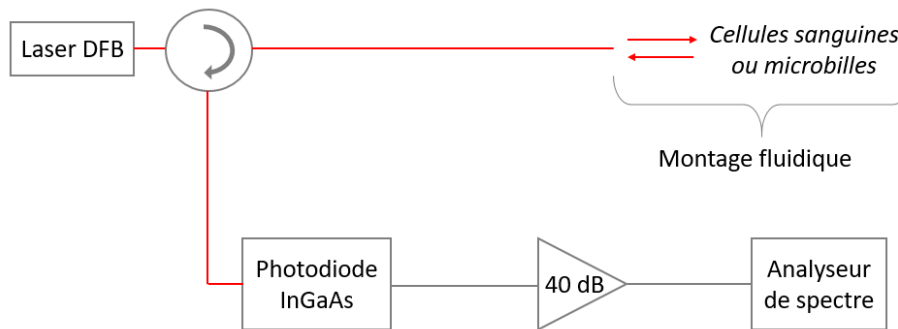


Figure 12 Représentation schématique du montage expérimental compact pour les mesures de vélocimétrie laser par effet Doppler. La partie optique et instrumentation du montage est présentée sur cette figure.

Une partie du faisceau laser est réfléchi en bout de fibre par la différence d'indice de réfraction entre la silice et le milieu liquide et constitue le signal de référence. Une autre partie est transmise dans le fluide contenant les particules en mouvement. La puissance optique collectée par la photodiode consiste en la combinaison du signal de référence et du signal réentrant la fibre optique qui résulte de la rétrodiffusion du faisceau optique par les particules en mouvement. Ces deux signaux sont combinés au niveau de la photodiode et la fréquence de battement résultante peut être observée sur le spectre enregistré. Cette **fréquence de battement est égale au décalage Doppler** induite par les particules diffusantes et est donc liée à leur vitesse.

L'avantage d'un tel montage est d'abord sa simplicité de mise en œuvre. Un autre avantage repose sur le délai très court entre la réflexion du signal de référence et la transmission du signal rétrodiffusé. Ceci élimine toute détection possible du bruit fréquentiel induit par la source laser. Le niveau de bruit de celle-ci est faible, de l'ordre de -160 dB/Hz aux fréquences d'intérêt de notre expérience. La mesure de bruit plancher est principalement déterminée par les caractéristiques de la détection optique, qui sont le bruit quantique de la photodiode ainsi que le bruit thermique de la résistance.

La sortie de l'analyseur de spectre est une puissance de densité spectrale en fonction de la fréquence. Selon notre configuration expérimentale, l'effet Doppler idéal d'une population monocinétique de particules diffusantes résulte en un pic de fréquence qui est lié à la vitesse de ces particules V par la relation :

$$f_D = \left| \frac{2ncos(\theta)V}{\lambda} \right| \quad (10)$$

Avec V la vitesse des particules (en m.s⁻¹), λ la longueur d'onde du faisceau incident (en m), θ l'angle entre le faisceau incident et la direction du mouvement des particules, et f_D la fréquence Doppler (en Hz). Cette relation correspond à la *relation 3.5* présentée dans la section 1.3.2 sur le principe de la vélocimétrie laser à effet Doppler. La relation est adaptée à la géométrie de notre système expérimental pour lequel il y a un angle nul entre le faisceau laser incident sortant de la fibre et le faisceau rétrodiffusé réentrant dans la fibre, les deux faisceaux présentent des directions opposées. Dans notre cas l'angle est considéré égal à 0°, étant donné que la fibre est centrée dans le canal fluïdique où l'écoulement est laminaire. Cette relation simplifiée est valable dans le cas de particules identiques circulant de façon uniforme dans le fluide à la même vitesse et sans diffusions multiples.

3.2. Montage fluidique

Le montage fluidique comprend une puce fluidique fabriquée en polydiméthylsiloxane (PDMS). Un canal de section carrée $3 \times 3 \text{ mm}^2$ fabriqué par moulage du PDMS est conçu pour l'insertion de la fibre optique du système de vélocimétrie Doppler pour les mesures d'écoulement *in situ*. La puce en PDMS est collée, via traitement plasma O_2 suivi d'une activation thermique, sur une lamelle de verre. Une ouverture latérale de diamètre 1,3 mm connectée au canal permet l'insertion de la fibre comme elle pourrait être effectuée dans la lumière d'un cathéter. En pratique, la fibre a été scellée par collage dans une aiguille pour une insertion facilitée dans la puce fluidique. Une fois fixée, la fibre sort de l'aiguille sur une longueur d'environ 1 cm afin d'éviter les perturbations induites par l'aiguille sur l'écoulement. L'ouverture latérale sur la puce fluidique permet de positionner la fibre optique de façon centrée dans le canal (voir **Figure 13**), où la vitesse de fluide est maximale en se plaçant dans l'approximation de la loi de Poiseuille pour un écoulement laminaire dans un canal cylindrique.

Des tubes et connecteurs appropriés permettent de relier la puce fluidique en PDMS à une pompe péristaltique, pour établir la circulation d'un fluide dans le canal en boucle fermée. Le flux est établi dans la direction de la propagation du faisceau laser, la fibre est alors positionnée en amont de l'écoulement, ou dans la direction opposée à la propagation du faisceau laser, la fibre est alors positionnée en aval de l'écoulement. Toutes les mesures présentées en suivant ont été effectuées à 4 vitesses de rotation de la pompe qui sont 23, 35, 50 et 60 tours par minute respectivement. La façon dont les tubes et connecteurs sont connectés à la pompe est susceptible de causer des variations de flux d'une expérience à l'autre, cela ne représente pas un système de mesure précis permettant d'atteindre une haute reproductibilité entre les expériences. La pompe elle-même ne présente pas une stabilité et précision de qualité en terme de débit, cependant, ce système a été choisi en considérant la gamme de vitesses d'écoulement que nous souhaitons caractériser dans le but d'établir une première preuve de concept du système de vélocimétrie Doppler que l'on propose.

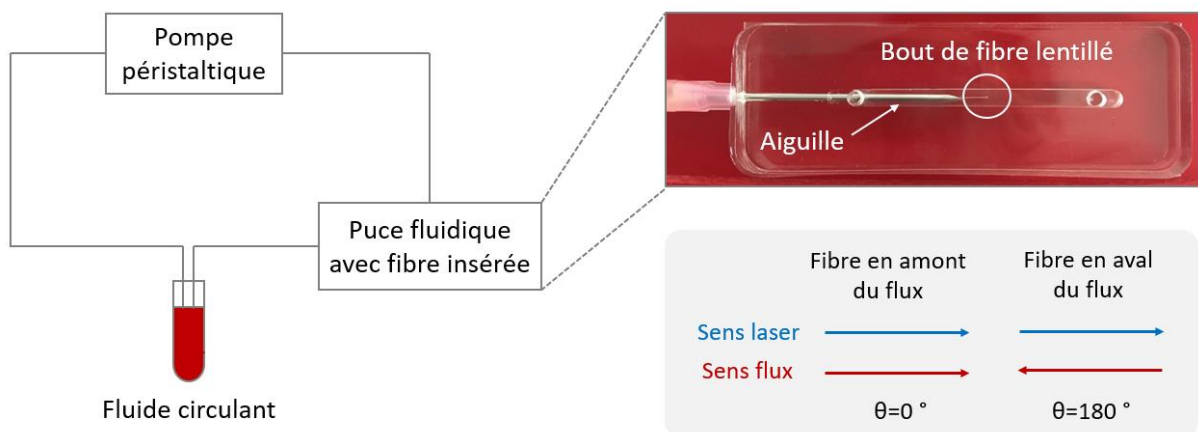


Figure 13 Représentation schématique du montage fluidique pour les mesures de vélocimétrie laser par effet Doppler. L'encart présente une image de la puce fluidique au centre de laquelle est introduite la fibre optique par le biais d'une aiguille avec une orientation parallèle à la direction du flux. Les configurations de disposition de la fibre optique en amont et en aval de l'écoulement sont représentées avec les sens de propagation du faisceau laser et d'écoulement, ainsi que les angles entre direction du faisceau laser et du flux correspondants.

4. Mesures sur modèle de suspension de microbille

Afin d'évaluer la performance du système de mesure, des premières expériences de vélocimétrie laser à effet Doppler sont menées sur une suspension de microbilles. Pour validation, ces mesures ont été confrontées à des estimations de vitesse au sein du canal à partir de la loi Poiseuille et à des mesures expérimentales réalisées en vélocimétrie par suivi de particule (en anglais *Particle Tracking Velocimetry*, PTV).

Les expériences ont été menées sur une suspension homogène de microbilles en résine de 6 μm de diamètre. Les microbilles ont été introduites à une concentration de 10^7 par mL de solution, correspondant à une fraction massique de 0,18 % dans une solution de triton X-100 dilué à 0,1 % dans un tampon phosphate salin Dulbecco (DPBS). Une incubation de 12h d'albumine de sérum bovin (BSA) diluée dans du DPBS a été effectuée au sein de la puce fluide de façon à éviter l'adhésion électrostatique des microbilles sur les parois du canal.

4.1. Estimation de la vitesse d'écoulement au centre du canal en utilisant la loi Poiseuille

Le PBS étant un fluide newtonien et l'écoulement dans le canal étant laminaire, nous faisons l'approximation que la suspension de microbilles s'écoule en suivant une loi de Poiseuille. Ceci nous permet d'obtenir une estimation de la vitesse d'écoulement maximale au centre du canal. La vitesse moyenne dans le canal V_{moy} peut être estimée à partir de la relation suivante :

$$D = V_{\text{moy}}S \quad (11)$$

Avec D le débit volumique (exprimé en mL/s) et S section du canal (exprimée en mm^2), qui est de 9 mm^2 dans notre cas. Nous considérons donc le profil de vitesse au sein du canal comme étant parabolique. Dans ce cas, la vitesse maximale V_{max} au centre du canal est égale au double de la vitesse moyenne, résultant en la relation suivante :

$$D = \frac{1}{2}V_{\text{max}}S \quad (12)$$

A partir de cette relation, la mesure du volume de DPBS circulant dans la puce fluide pendant 1 minute permet d'estimer une valeur de la vitesse maximale au centre du canal. Cette estimation a été effectuée pour les 4 vitesses de rotation de pompe que nous utilisons dans les expériences suivantes (23, 35, 50, 60 rpm). Nous considérons ainsi que le mouvement des microbilles est déterminé par la dynamique fluide uniquement. Les fréquences Doppler théoriques correspondantes ont été calculées à partir de la *relation 3.10* de la section 3.1 en utilisant un indice de réfraction du PBS de $n=1,35$ pour la longueur d'onde $\lambda_i=1550 \text{ nm}$ ⁴⁵, et en utilisant la longueur d'onde du laser de notre système de mesure $\lambda=1537 \text{ nm}$. Les fréquences Doppler dites « théoriques » correspondant aux valeurs estimées pour la vitesse maximale au centre du canal pour chaque vitesse de rotation de pompe sont présentées dans le **Tableau 3**. Les erreurs prennent en compte l'incertitude sur les mesures effectuées pour obtenir l'estimation de vitesse, c'est-à-dire sur le débit D et la section du canal S.

4.2. Vélocimétrie par suivi de particule

Afin d'obtenir une valeur de référence de la vitesse du flux au centre du canal, la technique de vélocimétrie par suivi de particule (en anglais *Particle Tracking Velocimetry*, PTV) a été effectuée avec une puce fluide identique à celle utilisée pour la vélocimétrie laser par effet Doppler. Ces mesures ont été effectuées avec l'aide de Julien Roul, ingénieur de recherche au sein du service I2C (Instrumentation Conception caractérisation) du LAAS-CNRS. Le principe de cette méthode est le suivi

du mouvement d'une particule sur deux images successives d'une séquence d'images et de déduire la vitesse de la particule à partir de la taille du pixel et de la durée entre les acquisitions (voir 1.2.2). La composition de la suspension de microbilles est identique à celle décrite en début de section avec une concentration réduite à $2 \cdot 10^6$ microbilles par mL de solution, correspondant à une concentration massique de 0,03%. La pompe péristaltique a été utilisée en boucle fermée aux mêmes vitesses de rotation que celles utilisées pour les expériences de vélocimétrie Doppler. Les microbilles utilisées sont fonctionnalisées avec un fluorophore (FITC) qui présente des pics d'excitation et d'émission à des longueurs d'onde de 495 et 519 nm respectivement. Un microscope à fluorescence inversé (LEICA) équipé de la technologie à disque rotatif (Yokogawa) a été utilisé afin d'imager les microbilles au centre du canal. Un objectif de grossissement X5 a été utilisé pour imager un champ assez large. Le taux d'acquisition était de 1000 images par seconde.

Les séquences d'images ont permis de suivre le mouvement de microbilles individuelles sur plusieurs images successives et de calculer la vitesse du flux pour les différentes vitesses de rotation de pompe étudiées (voir **Figure 14**). L'objectif du microscope inversé a été positionné sous le canal en PDMS et les images ont été prises à travers la lamelle de verre. Un dispositif de micro-positionnement a été utilisé pour ajuster l'objectif selon l'axe vertical et effectuer la mise au point au niveau du centre du canal. Cette technique permet la mesure des composantes de vitesse appartenant au plan image uniquement. Nous considérons que l'écoulement est laminaire avec des vecteurs vitesse parallèles au plan image. La vitesse mesurée est donc considérée comme le module du vecteur vitesse des microbilles au centre du canal, c'est-à-dire une grandeur directement comparable à V_{\max} .

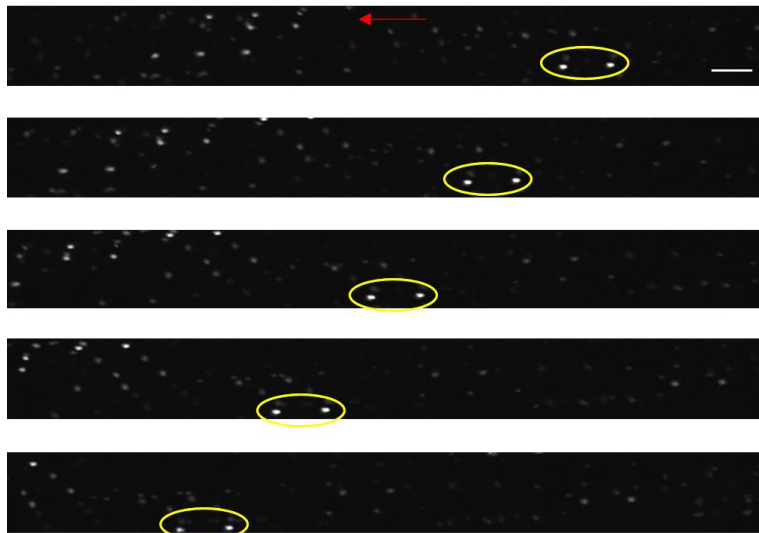


Figure 14 Exemple de suivi de microbille sur cinq images consécutives. La flèche rouge indique la direction du flux et la barre d'échelle est $100 \mu\text{m}$. Chaque microbille apparaît comme un point lumineux dédoublé en raison d'un artefact d'imagerie, comme indiqué sur les images par les zones jaunes. L'enregistrement de la trajectoire de ces deux points lumineux sur les clichés successifs permet toutefois l'accès à la vitesse de la microbille.

Nous appelons les vitesses au centre du canal extraites par cette méthode V_{PTV} . Les résultats pour chaque vitesse de rotation de pompe sont présentés dans le **Tableau 3**. En prenant en compte la dispersion des mesures effectuées par vélocimétrie par suivi des microbilles et la précision de l'estimation analytique, les résultats obtenus par la technique décrite dans ce paragraphe sont cohérents avec l'estimation de V_{\max} extraite à partir de la loi Poiseuille (voir **Tableau 3**). Cela signifie que les approximations effectuées pour l'application de la loi Poiseuille à la géométrie de notre canal fluide sont acceptables pour les conditions de débits étudiées.

Vitesse de rotation pompe (rpm)	Débit D (mL/min)	V_{max} (cm/s) (Poiseuille)	V_{PTV} par suivi de microbilles (cm/s)	Fréquence Doppler f_D (kHz) (basé sur V_{max})
23	36 ± 1	13 ± 3	16 ± 1	234 ± 47
35	56 ± 1	21 ± 4	20 ± 2	364 ± 69
50	82 ± 1	30 ± 5	29 ± 2	533 ± 99
60	100 ± 1	37 ± 7	31 ± 3	650 ± 126

Tableau 3 Débit mesuré, vitesse maximale au centre du canal estimée en utilisant la loi de Poiseuille, vitesse moyenne extraite au centre du canal par suivi de microbille et fréquence Doppler correspondante pour les quatre vitesses de rotation de pompe utilisées.

Ayant été effectuées sans présence de fibre optique dans le canal, ces deux méthodes d'estimation de la vitesse au centre du canal seront utilisées pour comparaison aux mesures de vélocimétrie laser à effet Doppler dans les deux configurations de positionnement de la fibre lentillée, en amont de l'écoulement et en aval de l'écoulement.

4.3. Vélocimétrie laser à effet Doppler

Les expériences ont été menées pour chaque vitesse de rotation de pompe avec les trois fibres lentillées présentées en section 3.1. Les mesures ont été effectuées avec chaque fibre positionnée en amont et en aval de l'écoulement, c'est-à-dire avec le faisceau laser se propageant dans le sens du flux et dans le sens opposé au flux respectivement. Un signal de référence a été enregistré en allumant le laser et en éteignant la pompe péristaltique, résultant en l'illumination du fluide qui est statique au sein du canal.

4.3.1. Mesure d'une distribution de vitesses

Dans un premier temps, les mesures ont été effectuées en utilisant l'analyseur de spectre avec une accumulation de 50 spectres afin de collecter suffisamment d'évènements de rétrodiffusion du faisceau laser et d'obtenir une mesure représentative de la gamme de vitesses au niveau du volume de mesure. Le signal obtenu en utilisant la fibre B de rayon de courbure intermédiaire est présenté en **Figure 15**.

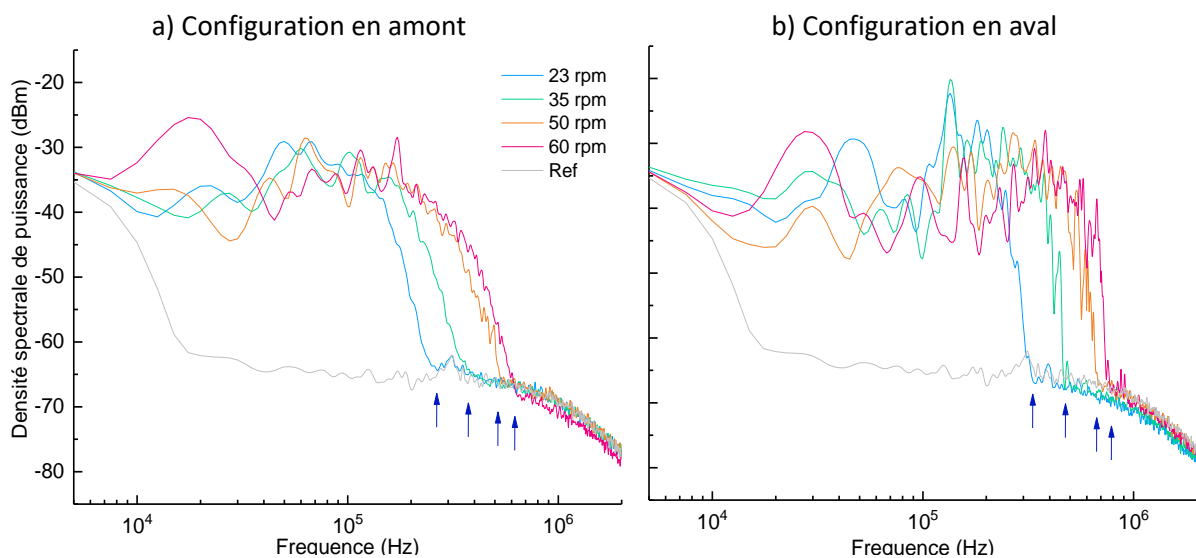


Figure 15 Spectre de puissance de densité spectrale mesuré en utilisant la Fibre B sur une suspension de microbilles. a) La propagation du faisceau et le flux sont dans le même sens, i.e. la fibre est positionnée en amont de l'écoulement. b) La propagation du faisceau et le flux sont dans des sens opposés, i.e. la fibre est positionnée en aval de l'écoulement.

La puissance de densité spectrale mesurée pour le signal de référence sur fluide statique est élevée aux basses fréquences, avec une valeur de -35 dBm qui diminue pour atteindre une valeur plancher d'environ -65 dBm à 20 kHz. Une seconde décroissance de 10 dBm est observée à plus haute fréquence entre 500 kHz et 2 MHz. Tous les autres spectres enregistrés avec des vitesses d'écoulement différentes présentent un comportement similaire en dessous de 10kHz et au-delà de 1 MHz. Nous en concluons que c'est la région du spectre comprise entre 10 kHz et 1 MHz qui, dans nos conditions expérimentales, est affectée par la vitesse de déplacement des particules diffusantes au sein du fluide en circulation. Pour chaque vitesse de rotation de pompe, nous observons un plateau élevé de la puissance de densité spectrale entre environ 10 kHz et 500 kHz avant une décroissance du signal pour rejoindre les valeurs du signal de référence. La représentation en échelle linéaire de la fréquence aboutit à un signal de puissance optique qui décroît progressivement avec la fréquence qui augmente.

L'observation des spectres sous écoulement nous permet de définir ce que nous appelons une « **fréquence de coupure** », au-delà de laquelle le spectre de densité spectrale ne peut plus être discriminé du signal de référence. La représentation des mesures en échelle fréquentielle logarithmique aide à la visualisation et à l'identification de ces fréquences particulières. Ces fréquences de coupures pour chaque vitesse de rotation de pompe sont indiquées par les flèches bleues sur les graphiques de la **Figure 15**. Les fréquences de coupure relevées augmentent de façon linéaire avec la vitesse de rotation de pompe, évoquant bien une origine liée à l'effet Doppler (voir **Figure 16**).

Dans notre configuration nous supposons que la partie aplatie du spectre (en échelle fréquentielle logarithmique) correspond aux effets Doppler d'une **distribution de vitesses et de directions du mouvement des microbilles** au sein du volume sondé par la fibre. La distribution de vitesses et trajectoires est causée par la fibre elle-même qui **perturbe localement l'écoulement**. Dans cette hypothèse, la fréquence de coupure correspond donc à la **vitesse maximale** des microbilles au niveau du volume sondé. Nous observons que la décroissance du signal au niveau de la fréquence de coupure est plus progressive dans le cas où le faisceau laser illumine dans le sens de l'écoulement (fibre positionnée en amont) que dans le cas où il illumine dans le sens opposé (fibre positionnée en aval). Lorsque le faisceau illumine dans le sens opposé à l'écoulement, la partie aplatie du spectre présente davantage de fluctuations et les mesures paraissent davantage bruitées. Cette observation conforte l'ensemble de notre interprétation, en effet la perturbation de l'écoulement est accrue au niveau du volume sondé lorsque la fibre est positionnée en amont de l'écoulement.

Quel que soit le positionnement de la fibre et la vitesse de rotation de pompe, le signal aux fréquences inférieures à environ 10 kHz est proche du signal de référence. Ceci correspond probablement à la vitesse minimale sondée. Cette vitesse serait théoriquement égale à environ 5 mm/s en utilisant la *relation 10* avec un angle $\theta=0^\circ$ ou $\theta=180^\circ$ dans le cas où la fibre lentillée est positionnée en amont ou en aval respectivement. L'utilisation de l'un ou l'autre des angles revient au même sur la fréquence Doppler correspondante, en effet celle-ci correspond à la valeur absolue du décalage fréquentiel Doppler. Pour l'extraction de cette vitesse, nous considérons donc les microbilles dont le sens d'évolution correspond à celui de propagation du faisceau laser. Cette vitesse minimale sondée peut aussi correspondre à la composante axiale de la vitesse (dans la direction de propagation du faisceau laser) de microbilles dont la direction du mouvement par rapport à la direction de propagation du faisceau laser forme un angle différent de 0° ou 180° selon la configuration de disposition de la fibre en amont ou aval de l'écoulement, en excluant l'angle de 90° pour lequel la fréquence Doppler sondée est nulle.

4.3.2. Extraction d'une vitesse maximale

Nous nous intéressons maintenant à l'extraction d'une vitesse maximale du mouvement des microbilles sondés pour chaque condition à partir des mesures expérimentales. Une confrontation des mesures de puissance de densité spectrale à un modèle complet de l'écoulement présenterait une méthode rigoureuse pour l'extraction des fréquences Doppler correspondant à la vitesse maximale des microbilles au sein du volume sondé. Ceci est hors du cadre de ces travaux de thèse. Comme expliqué précédemment, nous faisons l'hypothèse que la vitesse maximale de l'écoulement se déduit de la fréquence de coupure mesurée par l'application simple de la *relation 10* avec $\cos(\theta)=1$. Ces fréquences de coupure ont été relevées de façon empirique comme la fréquence à laquelle le signal de puissance de densité spectrale à haute fréquence suit la tendance du signal de référence. Le bruit de mesure des signaux entache la mesure de cette fréquence de coupure d'une incertitude d'environ 50 kHz. Les fréquences de coupure f_c relevées avec la Fibre B placée en amont et en aval de l'écoulement sont répertoriées dans le **Tableau 4**.

A partir des fréquences de coupure f_c , les vitesses maximales correspondantes V_c sont extraites en utilisant la *relation 10* introduite en section 3.1 et sont répertoriées dans le **Tableau 4**. La *relation 10* est utilisée avec l'angle $\theta=0^\circ$, ce qui signifie que les vitesses extraites correspondent à la composante de la vitesse des microbilles parallèle à la direction du faisceau laser uniquement, et correspondent donc à la vitesse totale des microbilles dont la direction est parallèle au faisceau laser.

Dans le cas où la fibre est positionnée en amont, les valeurs expérimentales sont pertinentes au regard des estimations effectuées analytiquement en utilisant la loi Poiseuille (voir **Tableau 4**) et par vélocimétrie par suivi de microbilles (voir **Tableau 3**). Dans le cas où la fibre est positionnée en aval, les valeurs de vitesses maximales extraites expérimentalement V_c excèdent entre 18 et 41% les estimations V_{max} déduites de la loi Poiseuille selon la vitesse de rotation de la pompe. Ces variations par rapport aux estimations sont probablement majoritairement liées à la présence de la fibre et la perturbation qu'elle induit sur le flux qui doit être plus prononcée au niveau du site de mesure dans cette configuration particulière. Des spectres similaires ont été obtenus en utilisant les Fibres A et C (voir Annexe A).

Vitesse de rotation pompe (rpm)	Vitesse V_{max} (Poiseuille) (cm/s)	Configuration en amont		Configuration en aval	
		Fréquence de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)	Fréquence de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)
23	13 ± 3	266 ± 50	15,1 ± 2,8	324 ± 50	18,4 ± 2,8
35	21 ± 4	389 ± 50	22,1 ± 2,8	471 ± 50	26,8 ± 2,8
50	30 ± 5	539 ± 50	30,6 ± 2,8	675 ± 50	38,4 ± 2,8
60	37 ± 7	656 ± 50	37,3 ± 2,8	768 ± 50	43,7 ± 2,8

Tableau 4 Fréquences de coupure des mesures expérimentales Doppler et vitesses maximales de microbilles correspondantes pour chaque vitesse de rotation de pompe pour le faisceau laser dans la direction de l'écoulement et dans la direction opposée. La vitesse maximale au centre du canal déduite de la loi Poiseuille est indiquée pour chaque vitesse de rotation de pompe pour comparaison avec les vitesses extraites des fréquences de coupure.

Pour les trois fibres différentes, les fréquences de coupure pour les différentes vitesses de rotation de pompe augmentent linéairement avec l'estimation de V_{max} comme présenté **Figure 16**. Dans le cas où le faisceau laser se propage dans le sens du flux (fibre en amont), les pentes des régressions linéaires sont comprises entre 14 et 16. Cette valeur est proche de la valeur théorique de la pente calculée à partir de la *relation 10* introduite en section 3.1 pour un angle $\theta=0^\circ$:

$$pente\ théorique = \frac{2n}{\lambda} = 17,56 \quad (13)$$

Avec $n = 1,35$ pour le PBS et $\lambda = 1537$ nm, la longueur d'onde du laser. Ainsi dans ces cas-là, et comme mentionné plus haut dans le cas de la Fibre B, l'extraction des vitesses V_C correspondant aux fréquences de coupures relevées f_C aboutissent à des valeurs cohérentes avec les estimations analytiques V_{max} et les estimations par la mesure en suivi de particules V_{PTV} .

Ces coefficients sont plus importants dans le cas où le faisceau laser se propage dans le sens opposé à l'écoulement (fibre optique en configuration aval). Nous observons aussi davantage de disparités au niveau des pentes entre les différentes fibres, notamment pour la Fibre B pour laquelle la pente se distingue clairement de celle des Fibres A et C (19, 33 et 34 respectivement). Une hypothèse pour expliquer ces différences est que le flux est plus fortement perturbé au niveau du site sondé lorsque la fibre est positionnée en aval et que la forme de l'embout lentillé influe davantage sur la perturbation.

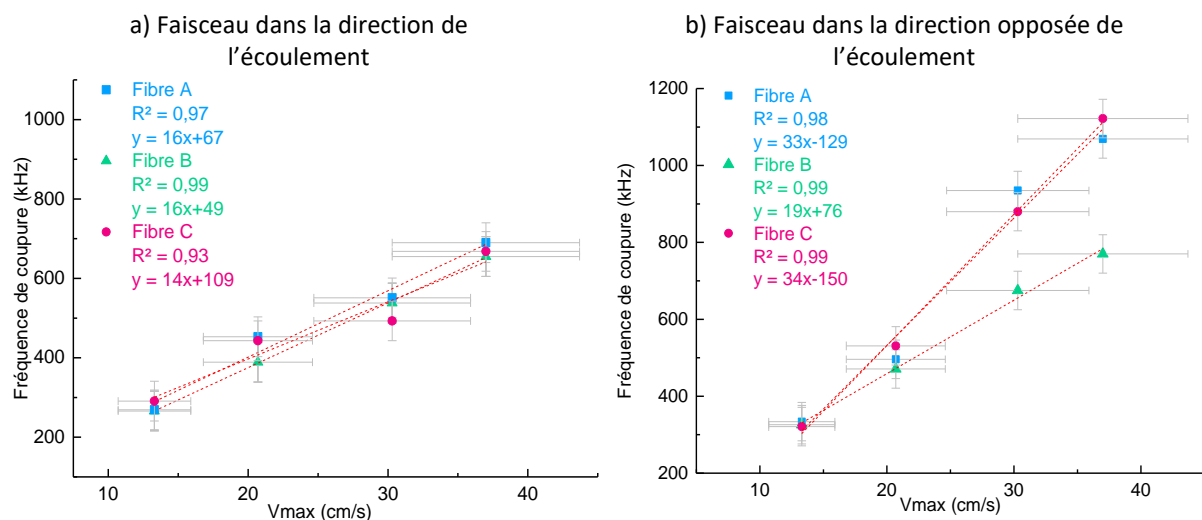


Figure 16 Evolution des fréquences de coupures en fonction de la vitesse théorique V_{max} maximale au centre du canal V_{max} pour chaque vitesse de rotation de pompe et chaque fibre lentillée. Les points de mesures correspondent aux mesures expérimentales et la droite est un fit linéaire. Les coefficients de corrélation et les pentes sont indiqués sur les graphiques. a) Cas pour lequel le faisceau laser se propage dans la direction de l'écoulement, i.e. la fibre est disposée en amont. b) Cas pour lequel le faisceau laser se propage dans la direction opposée à l'écoulement, i.e. la fibre est disposée en aval.

Dans le cadre du projet de thèse et de la projection d'intégration de la vélocimétrie à la plateforme de capture de cellules circulantes tumorales, nous privilégions la configuration pour laquelle la fibre est insérée en amont de l'écoulement. Pour cette configuration, les **vitesse V_C extraites à partir des mesures Doppler sont cohérentes avec les estimations analytiques de vitesse maximale au centre du canal et les résultats de vélocimétrie par suivi de microbilles**. Nous n'observons pas de différence notable sur les mesures expérimentales qui serait due à la forme de la lentille en bout de fibre. Les observations précédentes nous encouragent aussi à considérer que dans cette configuration particulière (fibre en amont), la microbille dont la vitesse maximale V_C est sondée par vélocimétrie laser à effet Doppler se trouve au-delà de la région perturbée par la présence de la fibre. En effet les vitesses maximales des microbilles extraites V_C correspondent aux estimations de vitesses maximales au centre du canal V_{max} et V_{PTV} pour chaque vitesse de rotation de pompe, pour lesquelles il n'y avait pas de fibre optique insérée au centre du canal. A ce stade, nous ne sommes pas en capacité de déterminer la distance de travail de notre système. Cependant, affirmer qu'il est **possible de sonder la vitesse maximale du flux au-delà de la région perturbée par la présence de la**

fibre est un point important dans la perspective de l'application de ce système de vélocimétrie laser à effet Doppler dans le cadre du projet de cette thèse.

4.3.3. Mesure de vitesses de microbilles individuelles

Des expériences ont aussi été effectuées sans accumulation sur un ensemble de points de mesures. En observant en direct l'affichage de l'analyseur de spectre, le signal présente des pics de puissance de densité spectrale. La **Figure 17a** présente ces pics de puissance de densité spectrale observés pour chaque vitesse de rotation de pompe. Ces pics correspondent aux pics fréquentiels attendus par effet Doppler pour une cible unique en mouvement à une vitesse constante. Une hypothèse pour l'observation de ces pics fréquentiels est que nous sommes en présence d'une concentration en particule diffusantes suffisamment basse pour obtenir une interaction du faisceau laser avec des microbilles individuelles.

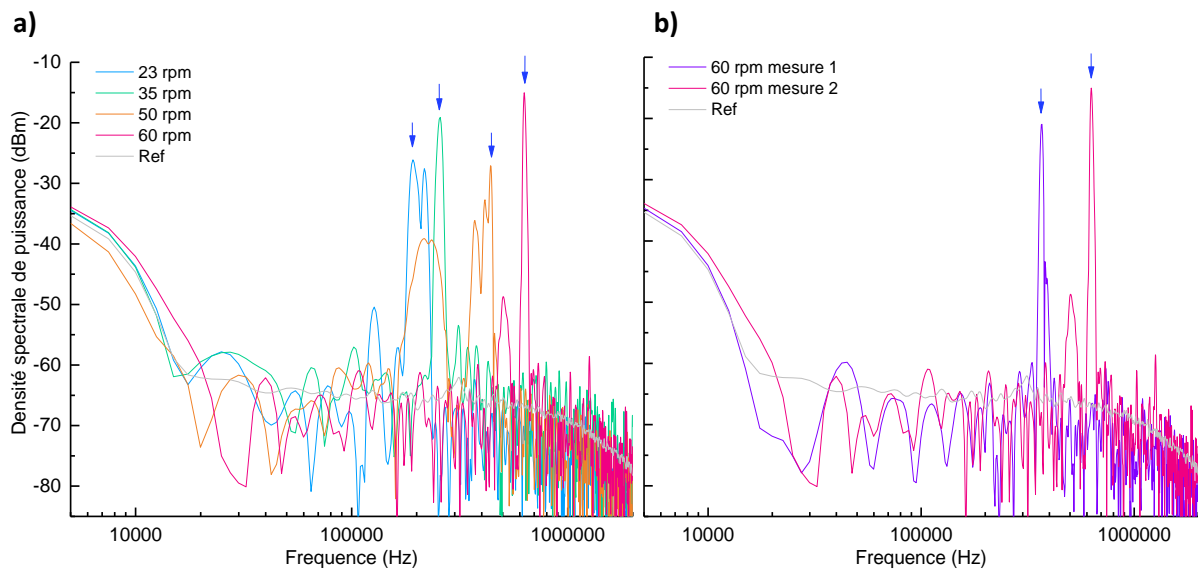


Figure 17 Signal obtenu en utilisant la Fibre B sans accumulation de spectres. Le faisceau se propage dans le sens opposé à l'écoulement, i.e. la fibre est positionnée en aval. Les flèches bleues désignent les pics d'amplitude la plus élevée pour chaque vitesse de rotation de pompe. Ces pics fréquentiels sont attribués aux effets Doppler instantanés produit par une seule microbille. a) Comparaison des pics fréquentiels pour plusieurs rotations de pompe. b) Comparaison des pics fréquentiels pour deux mesures successives à une vitesse de rotation de pompe de 60 rpm.

Nous attribuons ces pics fréquentiels de puissance de densité spectrale à la mesure de vitesse instantanée de microbille unique en mouvement au niveau du volume de mesure sondé par le faisceau laser. Pour des acquisitions de données successives effectuées dans les mêmes conditions, la fréquence des pics observée varie (voir **Figure 17b**). Ceci traduit la distribution en vitesses et trajectoires de la population de microbilles réfléchissant le faisceau laser au sein du volume sondé. En accumulant plusieurs points de mesure, la superposition de l'ensemble des pics obtenus résulte en la présence du plateau sur les spectres mesurés par accumulation précédemment présentés à la **Figure 15**.

5. Mesures sur sang complet

Nous avons ensuite testé notre système compact de vélocimétrie laser à effet Doppler pour la mesure de l'écoulement de sang complet au sein du canal de la puce fluïdique. Pour validation, les

mesures ont été confrontées à des estimations de vitesses au centre du canal effectué par simulation numérique de l'écoulement de ce fluide complexe.

5.1. Simulation de mécanique des fluides

Le sang est un fluide complexe composé de plusieurs constituants en suspension dans le plasma (voir 1.1.1). En conséquence, le sang est un fluide non newtonien présentant une viscosité non constante qui dépend du taux de cisaillement du fluide (voir 1.1.2). Dans ce cas, la loi de Poiseuille, utilisée pour la description de l'écoulement laminaire d'un fluide newtonien dans un conduit cylindrique, n'est pas appropriée pour déterminer la dynamique d'un tel fluide. Nous avons eu recours à des simulations en dynamique des fluides (*Computational Fluid Dynamics*, CFD) via le logiciel ANSYS Fluent afin d'estimer la vitesse maximale de l'écoulement sanguin au centre du canal fluidique. Les simulations ont été effectuées en modélisant la fibre optique au centre du canal de façon à prendre en compte la perturbation qu'elle induit sur le flux. Les géométries du canal de section carrée de 3X3 mm² et des différentes fibres lentillées ont été conçues à partir de l'unité de conception assistée par ordinateur (CAO) du logiciel. La fibre de 125 µm de diamètre est centrée dans le canal fluidique. Les trois types de lentilles ont été réalisés pour représenter les différentes morphologies de l'embout des fibres. Des lentilles boules de diamètres de 133 et 139 µm correspondent aux Fibres A et B respectivement et un cône de 125 µm de diamètre de base et une hauteur de 100 µm avec une lentille boule de 10 µm de rayon modélise la Fibre C. La longueur du corps de fibre est de 5 mm de façon à établir le développement du flux en aval des lentilles. De la même façon, le canal en amont de la lentille présente une longueur de 5 mm pour permettre la stabilisation du flux.

Le sang circulant dans le canal a été modélisé par un fluide non newtonien avec une masse volumique $\rho=1050 \text{ kg.m}^{-3}$ ¹³. La masse volumique du matériau solide utilisé pour modéliser les parois du canal est égale à celle du PDMS $\rho=965 \text{ kg.m}^{-3}$. Le modèle utilisé pour les simulations est laminaire visqueux. La viscosité est décrite par une loi de puissance non-newtonienne afin de modéliser les propriétés hydrodynamiques du sang. Les paramètres d'indice de loi de puissance, d'indice de cohérence, de viscosité minimale et maximale ont été définis à partir de valeurs disponibles dans la littérature¹². Un maillage non uniforme est généré par le logiciel (ANSYS Meshing). Les conditions limites à l'entrée et à la sortie du canal ont été définies à partir du débit massique déterminé à partir de la densité du sang et du débit volumique mesuré pour chaque vitesse de rotation de pompe. Les simulations pour chaque débit ciblé permettent l'extraction des valeurs du module de vitesse maximale correspondante au centre du canal (voir **Tableau 5**) où le flux est entièrement développé lorsque la fibre est placée en amont. Les fréquences Doppler théoriques correspondantes ont été calculées à partir de la *relation 10* introduite en section 3.1 en utilisant un indice de réfraction pour le sang de $n=1,3456$ à la longueur d'onde $\lambda = 1550 \text{ nm}$ ⁴⁶.

Vitesse de rotation de pompe (rpm)	Débit (mL/min)	Vitesse simulation V_s (cm/s)	Fréquence Doppler correspondante f_s (kHz)
23	40	12,9	226
35	60	17,7	310
50	88	25,2	441
60	114	31,9	559

Tableau 5 Débit mesuré pour chaque vitesse de rotation de pompe utilisé comme paramètre d'entrée pour les simulations fluidiques avec les vitesses maximales extraites au centre du canal suffisamment loin de la fibre pour éviter toute perturbation et les fréquences Doppler théoriques correspondantes.

Les simulations fluidiques ont été utilisées pour étudier la perturbation du flux induite par les différentes fibres lentillées positionnées en aval ou en amont dans le canal. La distance de stabilisation du flux à partir du bout de la lentille a été étudié pour chaque débit. Les simulations font apparaître

que les différentes géométries de fibre lentillées n'ont pas d'impact significatif sur la perturbation du flux. La **Figure 18** présente des carte 2D du module de vitesse dans un plan horizontal centré dans le canal fluide pour les débit d'entrée correspondant aux quatre vitesses de rotation de pompe dans le cas où la Fibre B est positionnée en amont de l'écoulement. Indépendamment de la vitesse de rotation de pompe, la région où la vitesse est réduite par la présence de la fibre s'étend sur une dimension typique de 3 mm. Au-delà de cette distance, l'écoulement est stabilisé comme cela peut être observé sur la **Figures 18a** à **18d**. Ces 3 mm de distance de stabilisation se retrouvent pour les trois fibres lentillées et pour les différents débits étudiés lorsqu'elles sont positionnées en amont de l'écoulement. Ceci peut être visualisé sur les graphiques de profil de vitesse présentés sur la **Figure 19**.

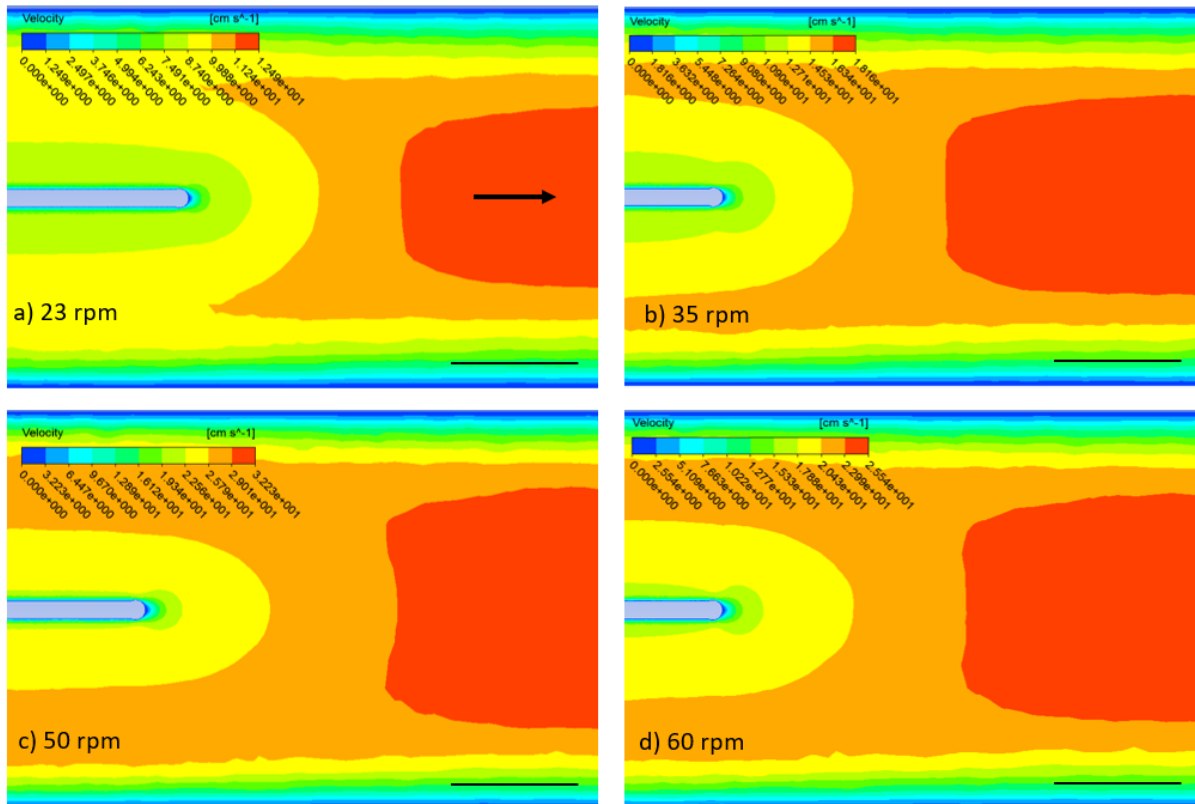


Figure 18 Carte du module de vitesse sur un plan horizontal au centre du canal fluide dans le cas où la Fibre B est positionnée en amont pour chaque vitesse de rotation de pompe. La barre d'échelle représente 1 mm et la flèche pointe la direction de l'écoulement, qui est le même sur les quatre images. a) Carte du module de vitesse à 23 rpm. b) Carte du module de vitesse à 35 rpm. c) Carte du module de vitesse à 50 rpm. d) Carte du module de vitesse à 60 rpm.

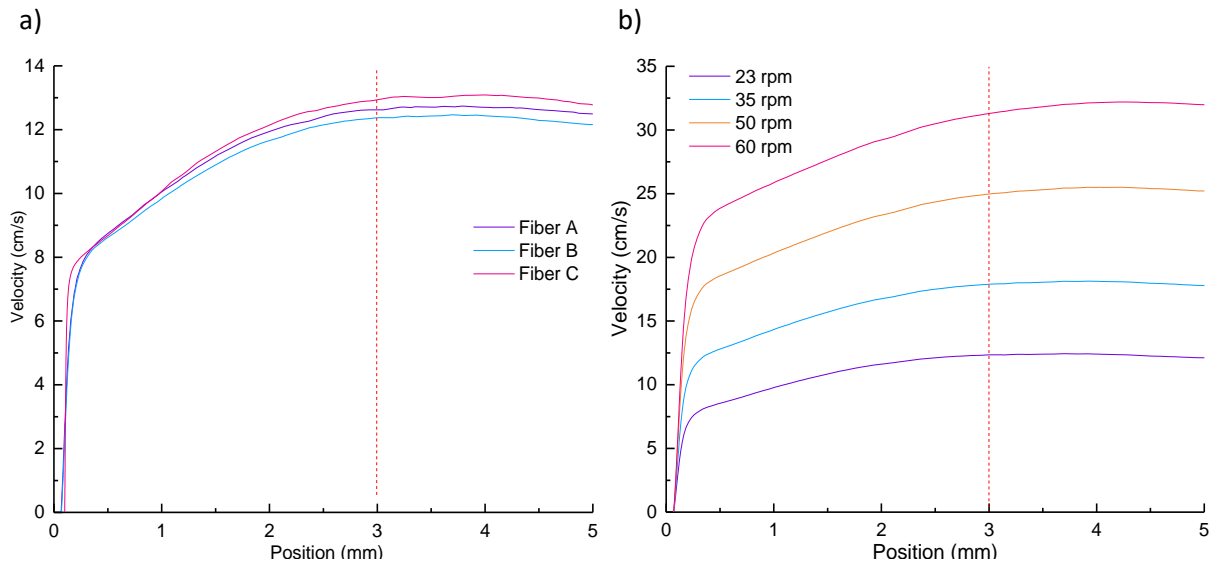


Figure 19 Profils de vitesse à partir de l'embout de fibre le long de l'axe du canal fluïdique. a) comparaison du profil de vitesse pour les trois fibres. L'évolution de la vitesse suit une tendance proche pour les trois fibres utilisées. La distance de l'embout de fibre à partir de laquelle l'écoulement se stabilise à la vitesse maximale est 3 mm pour les trois cas. b) Comparaison du profil de vitesse pour la Fibre B pour les 4 vitesses de rotation de pompe. La distance de l'embout de fibre à partir de laquelle le flux se stabilise à la vitesse maximale est 3 mm pour chaque condition d'écoulement.

Les études ont aussi été menées sur la circulation du flux en sens inverse, correspondant à la configuration pour laquelle la fibre est disposée en aval de l'écoulement. Nous retrouvons des vitesses maximales comparables à celles extraites dans la configuration précédente (fibre en amont de l'écoulement). Les distances de stabilisation du flux sur lesquelles les vitesses d'écoulement sont réduites par la présence de la fibre sont d'environ 2 mm. Cette distance est plus faible que celle observée pour la fibre placée en amont. Nous nous intéressons de façon privilégiée à la configuration de fibre en amont car c'est celle que nous considérons la plus compatible pour l'intégration de la mesure de vitesse d'écoulement à nos systèmes de capture. Pour la comparaison aux mesures expérimentales de vélocimétrie laser à effet Doppler nous utilisons les valeurs de vitesses maximales V_s simulées au centre du canal, dans la zone non perturbée, répertoriées dans le **Tableau 6** pour les deux configurations de fibres, en amont et en aval de l'écoulement.

5.2. Vélocimétrie laser à effet Doppler sur sang complet

Des échantillons sanguins de donneurs conditionnés dans des tubes fonctionnalisés à l'acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) ont été fournis par l'Etablissement Français du Sang de Toulouse (EFS-Toulouse). Les échantillons sanguins provenant de trois donneurs ont été mélangés afin d'atteindre le volume nécessaire (3 fois 8 mL) pour effectuer les expériences. De la même façon que décrit en section 4.3 dans le cas de la suspension de microbilles, les expériences ont été conduites à chaque vitesse de rotation de pompe avec les trois fibres lentillées présentées en section 3.1. Chaque fibre a été utilisée pour faire des mesures en étant disposée en amont et en aval de l'écoulement. Le signal de référence a été enregistré en allumant le laser et en éteignant la pompe. Les mesures ont été effectuées *via* l'analyseur de spectre avec une accumulation de 50 spectres afin de collecter suffisamment d'événements de rétrodiffusion du faisceau laser et d'obtenir une mesure représentative de la gamme de vitesses au niveau du volume de mesure. La **Figure 20** présente les spectres de puissance de densité spectrale mesurés avec la Fibre A.

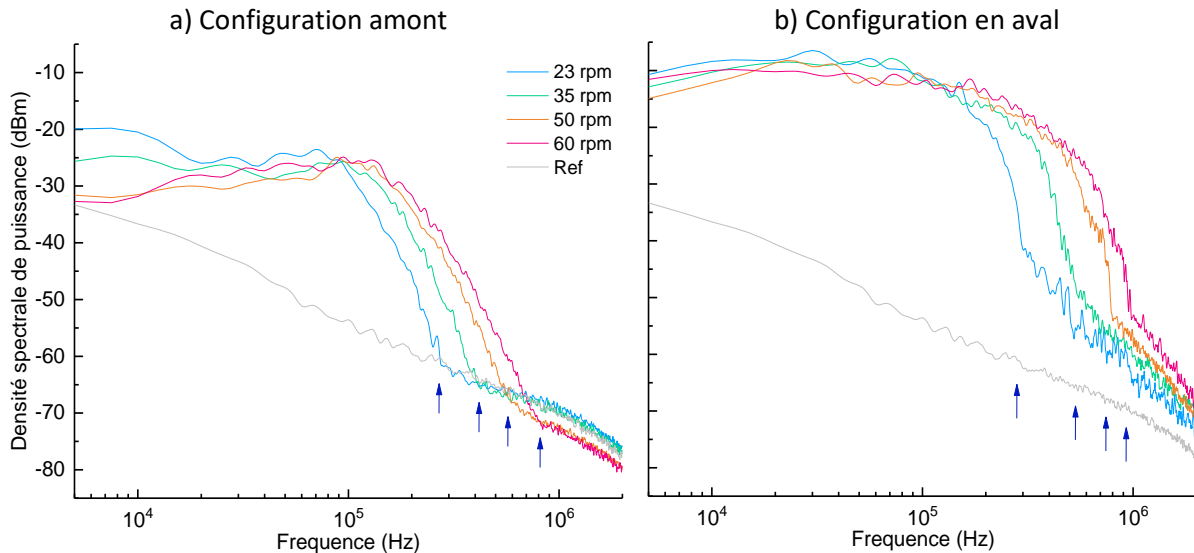


Figure 20 Spectre de puissance de densité spectrale mesuré en utilisant la Fibre A sur sang complet. a) La propagation du faisceau et l'écoulement sont dans le même sens, i.e. la fibre est positionnée en aval. b) La propagation du faisceau et l'écoulement sont dans des sens opposés, i.e. la fibre est positionnée en amont.

Les Fibres B et C ont abouti à des résultats de mesures similaires. L'allure des spectres de vélocimétrie est comparable à celle des mesures effectuées sur suspension de microbilles. L'allure est comparable à celle de mesures rapportées pour des mesures d'écoulement sanguin *in vivo*⁴⁴. Le signal de référence présente une allure différente de celui mesuré lors des expériences sur suspension de microbilles. Il est plus élevé que celui précédemment mesuré jusqu'à environ 200 kHz. Le signal présente une décroissance linéaire avec la fréquence en échelle logarithmique. Ce signal correspond probablement au « zéro biologique » reporté dans la littérature décrivant un signal de puissance optique mesuré en absence de flux. Il s'agirait de la détection du mouvement brownien des constituants sanguins au repos²⁴. Dans le cas où la fibre est disposée en aval de l'écoulement, la décroissance du signal est davantage progressive que celle observée dans la même configuration sur suspension de microbilles. Ceci peut être lié aux effets de diffusion multiple dans le sang pour lesquels plusieurs valeurs de vitesses de différentes particules diffusantes s'accumulent dans l'information de fréquence Doppler.

Les données sur sang complet ont été analysées sur le même principe que celui décrit en section 4.3.2 dans le cas des mesures sur suspension de microbilles. Les flèches bleues sur les graphiques de la **Figure 20** indiquent la fréquence à laquelle le signal mesuré rejoint le signal de référence pour chaque vitesse de rotation de pompe. Dans le cas où la fibre est positionnée en aval de l'écoulement, nous observons que le signal présente un écart avec le signal de référence aux basses et hautes fréquences. Dans ce cas, nous avons choisi de relever les fréquences de coupure à l'endroit où l'évolution du spectre présente une rupture. En effet, au-delà des fréquences où le signal se présente sous forme de plateau, le signal décroît et présente un point d'inflexion à partir duquel la décroissance devient linéaire.

Comme expliqué en section 4.3.1, nous considérons que les fréquences de coupure relevées correspondent aux fréquences Doppler induites par les particules diffusantes présentant une vitesse maximale au sein du volume sondé. Ces fréquences particulières et la vitesse maximale correspondante calculée par le biais de la *relation 10* sont répertoriées dans le **Tableau 6**. La *relation 10* est toujours utilisée avec un angle $\theta=0^\circ$ ou 180° pour la configuration où la fibre est positionnée en amont de l'écoulement, mais cela revient au même comme le sens du vecteur vitesse est une information perdue avec la détection hétérodyne. Cela signifie que nous estimons des vitesses

maximales pour les particules diffusantes se déplaçant dans la direction du faisceau laser. Ces vitesses peuvent aussi correspondre à la composante axiale de la vitesse de particules diffusantes se déplaçant dans des directions différentes. Les valeurs de vitesses estimées par simulation fluide avec les fréquences Doppler théoriques correspondantes sont aussi inscrites dans le tableau pour comparaison. Comme mentionné précédemment, la relation 10 pour le calcul de la fréquence Doppler est valable dans le cas idéal d'une particule diffusante unique sans effets de diffusions multiple. Elles ne sont pas adéquates dans le cas de mesures de vélocimétrie laser à effet Doppler au sein du milieu sanguin mais nous les indiquons néanmoins à titre comparatif.

Vitesse de rotation pompe (rpm)	Vitesse simulation V_s (cm/s)	Fréq. Doppler f_s (kHz) (basé sur V_s)	Configuration en amont		Configuration en aval	
			Fréq. de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)	Fréq. de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)
23	12,9	226	314 ± 50	17,9	304 ± 50	17,3
35	17,7	310	426 ± 50	24,3	553 ± 50	31,5
50	25,2	441	681 ± 50	38,8	800 ± 50	45,6
60	31,9	559	835 ± 50	47,7	987 ± 50	56,3

Tableau 6 Fréquences de coupure des mesures expérimentales Doppler dans du sang complet avec la fibre A dans les deux configurations amont et aval, pour différentes vitesses de rotation de pompe. V_c est la vitesse maximale déduite de la fréquence de coupure f_c par application de la relation 10 correspondant à un effet Doppler simple et idéal. Les vitesses maximales V_s déduites de la simulation fluide et les fréquences Doppler correspondantes f_s calculées à partir de la relation 10 sont rappelées pour comparaison.

Dans le cas de la fibre A, et pour les deux positionnements de fibre, les fréquences de coupure sont entre 34 et 81% plus élevées que les valeurs théoriques calculées à partir des estimations de vitesses par simulation fluide. Ceci est attribuable aux effets de diffusion multiple dans le sang qui augmentent les valeurs de fréquence Doppler par l'accumulation des vitesses de plusieurs particules diffusant le faisceau laser. Un résultat majeur obtenu à partir de ces mesures en utilisant les trois fibres différentes est **l'évolution linéaire des fréquences de coupure f_c avec les vitesses maximales estimées au centre du canal V_s** pour chaque vitesse de rotation de pompe comme cela peut être observé sur la **Figure 21**. Des résultats similaires ont été obtenus avec les fibres B et C (voir Annexe B).

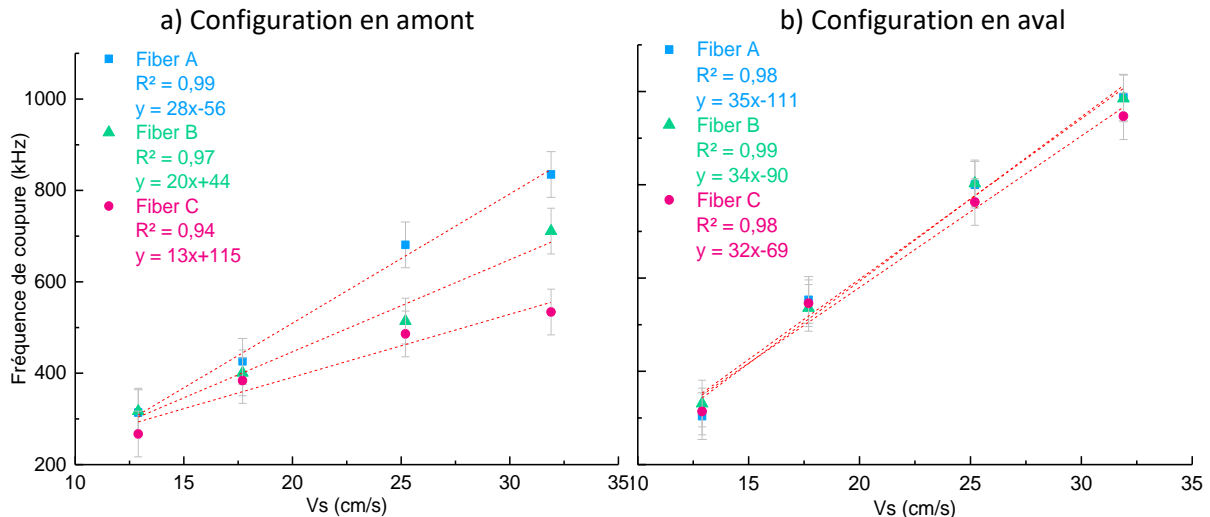


Figure 21 Evolution linéaire des fréquences de coupures en fonction de la vitesse maximale au centre du canal estimée par simulation fluidique V_s pour chaque vitesse de rotation de pompe et chaque fibre lentillée. Les points de mesures correspondent aux mesures expérimentales et la droite est un fit linéaire. Les coefficients de corrélation et les pentes sont indiqués sur les graphiques. a) Cas pour lequel le faisceau laser se propage dans la direction de l'écoulement, i.e. la fibre est disposée en amont. b) Cas pour lequel le faisceau laser se propage dans la direction opposée de l'écoulement, i.e. la fibre est disposée en aval.

Dans le cas du sang comme dans celui de la suspension de microbilles, les valeurs de pentes sont plus élevées lorsque la fibre est disposée en aval de l'écoulement. Cependant contrairement au cas de la suspension de microbille, les pentes sont différentes en fonction de la nature de la fibre utilisée dans le cas où elles sont disposées en amont de l'écoulement. Les différences observées sur l'influence de la géométrie des différentes fibres lentillées en fonction de sa position amont ou en aval sont à rapprocher de ce que nous avons observé par simulation. Dans la configuration où la fibre est positionnée en amont, la perturbation de l'écoulement s'étend sur une distance plus importante que dans la configuration où celle-ci est positionnée en aval. Ainsi, il est possible qu'en configuration aval, le volume sondé qui dépend de la géométrie de l'apex des différentes fibres, soit toujours situé dans la zone où l'écoulement est stabilisé. En revanche, il est possible qu'en configuration en amont, les fibres focalisantes sondent une région perturbée où la vitesse maximale de l'écoulement dans le volume sondé soit plus faible. Cette interprétation mériterait de nouvelles expériences, notamment pour déterminer avec précision la position du volume sondé par le faisceau laser en fonction de la géométrie de la lentille en bout de fibre.

Nous concluons que dans le cas du sang complet, les effets dus aux événements de diffusion multiple ne permettent pas de déduire une valeur absolue de la vitesse maximale d'écoulement par la simple application de la relation 10 décrivant la fréquence Doppler obtenue dans un cas idéal. Néanmoins, nous avons montré que la mesure permet de comparer de manière relative deux situations d'écoulement et différentes vitesses d'écoulement. En effet nous avons constaté que les fréquences de coupure enregistrées dans toutes les situations répondent linéairement à la variation de la vitesse de rotation de la pompe.

Lorsque les fibres sont positionnées en aval, configuration qui nous intéresse dans le cadre de l'intégration d'un système de vélocimétrie à nos systèmes de capture de cellules circulantes, la géométrie de la lentille a une influence sur la mesure. Cependant fort de notre étude, le résultat est que malgré la complexité du phénomène qui se produit dans le sang complet en présence de la fibre, les fréquences de coupures expérimentales évoluent linéairement avec les valeurs de la vitesse maximale telles qu'elles peuvent être estimées par simulation de mécanique des fluides. Ainsi,

moyennant une calibration de la fibre utilisée pour l'expérience, ce système pourrait permettre un suivi de l'évolution de la vitesse au niveau du site d'intérêt en amont de la membrane filtrante des S-MDCs.

6. Perspectives pour le développement du système

Les travaux présentés dans le cadre de ce projet de thèse présentent le point de départ de l'étude d'un système qui semble prometteur pour la mesure en temps réel de l'écoulement sanguin au voisinage de la membrane filtrante des S-MDCs. De nombreux développements prospectifs seront nécessaires pour permettre la mise en œuvre applicative et concrète de cet outil embarqué sur le système fluide avec lequel sont utilisés les S-MDCs.

6.1. Perspectives liées au principe de fonctionnement

- Distance de travail et résolution spatiale

Du point de vue de la recherche, il paraît nécessaire de caractériser plus en profondeur l'interaction entre le laser et l'environnement sanguin. Les paramètres importants à déterminer, qui sont nécessaires pour la mise en œuvre applicative du système, sont la **distance de travail** et le **volume sondé** par le faisceau incident et sa rétrodiffusion vers la fibre optique. Ces paramètres restent relativement flous dans les travaux de la littérature, notamment lorsqu'il s'agit de mesures *in situ*, lorsque le système d'émission/détection est inséré dans le conduit artificiel ou naturel où circule le sang. Dans le cas de nos fibres lentillées cela demanderait une étude approfondie de la géométrie de la lentille fabriquée à la soudeuse pour laquelle nous ne savons pas estimer à quelle distance le cœur se trouve de l'embout de la lentille boule. L'optique géométrique permettrait éventuellement de visualiser l'allure du faisceau laser en sortie de fibre lentillée pour les différentes géométries de lentilles. Une solution alternative pour la **visualisation du faisceau en sortie de fibre** serait d'utiliser un laser dont l'illumination puisse être imagée en fluorescence avec l'ensemencement de marqueurs dans le fluide. La difficulté repose sur la visualisation en fluorescence de marqueurs dans le sang très opaque. Cela peut être effectué dans un fluide plus transparent, tel que de l'eau, il faudra alors trouver la correspondance analytique pour transposer les résultats obtenus dans le cas du sang ainsi que la correspondance analytique permettant de transposer les résultats de la longueur d'onde utilisée à notre longueur d'onde d'intérêt $\lambda=1537$ nm.

- Les effets de diffusion multiple

Davantage de simulations fluidiques ou autres techniques pour déterminer précisément la vitesse de l'écoulement sanguin au centre du canal fluide corrélée aux mesures expérimentales permettraient éventuellement d'extraire une tendance correspondant à **l'effet de diffusion multiple sur les mesures**. Une autre méthode serait de comparer des mesures sur écoulement sanguin avec une lyse des globules rouges ou en présence d'un taux réduit de globules rouges pour comparaison aux mesures sur sang complet, cependant l'élément de comparaison est biaisé par le fait que les globules rouges jouent un rôle majeur sur les propriétés hydrodynamiques du sang. Il serait aussi intéressant de mener cette comparaison sur fluide statique, en considérant que l'effet de diffusion multiple induit par les globules rouges puisse être discriminé sur le signal du « zéro biologique » mesuré en vélocimétrie laser à effet Doppler, induit par le mouvement brownien des constituants sanguins en suspension. Ces dernières propositions reposent sur l'hypothèse que les effets de diffusions multiples sont provoqués par les globules rouges uniquement. Une étude approfondie des références sur l'analyse analytique de la diffusion multiple dans l'environnement sanguin permettrait éventuellement le traitement du signal pour une prise en compte de cet effet sur nos mesures

expérimentales. Il est important de comprendre l'impact de ces événements sur la mesure afin de pouvoir extraire des **vitesse quantitatives représentatives de l'écoulement sanguin**. Ces effets peuvent aussi avoir un impact sur le volume de détection.

- Résolution temporelle

Une fois que le système sera correctement caractérisé et calibré et la gamme de vitesses d'intérêt définie, il sera possible de mettre en place un système de détection avec un traitement du signal adapté pour le suivi en temps réel qualitatif et dans l'idéal quantitatif de l'évolution de la vitesse. Il serait par exemple possible de détecter la fréquence à laquelle la valeur du signal de puissance de densité spectrale est en dessous d'un certain seuil, à définir expérimentalement. Cette fréquence particulière permettra d'extraire la vitesse maximale des particules sanguine diffusantes au sein du volume sondé. Il sera alors important d'étudier la fréquence d'échantillonnage de l'analyseur de spectre, le nombre de signaux accumulés sur une gamme de fréquence pour une mesure et le temps de traitement de signal pour estimer la **résolution temporelle du système**. Ce paramètre n'est pas critique pour la mesure de référence de la vitesse d'écoulement au centre du canal avant capture. Cependant il est important d'avoir une bonne résolution temporelle dans le cas où le dispositif est utilisé pour la mesure de la vitesse en amont de la membrane filtrante du S-MDC et le suivi de son obstruction par les événements de capture cellulaires.

- Sensibilité de la mesure

Un autre paramètre important à déterminer dans la perspective de l'intégration de ce système de mesure est la **sensibilité de la mesure**. Pour cela il faut déterminer quelle variation minimale de vitesse de l'écoulement sanguin ΔV se traduit par une variation détectable de la fréquence Doppler mesurée Δf_D . Ceci peut être évalué expérimentalement en faisant varier par incrément le débit à l'entrée du canal fluide jusqu'à détecter une variation de la fréquence de coupure sur le signal de puissance de densité spectrale mesurée. Les valeurs de vitesses au centre du canal correspondant aux débits étudiés pourront être déterminées par simulation fluide de la même façon que la méthode présentée dans les travaux de cette thèse. Par ailleurs, cette sensibilité étant liée au bruit de la mesure, une étude spécifique du bruit et de ses origines devra être menée afin de le limiter au maximum.

6.2. Perspectives liées à l'intégration du système de vélocimétrie au dispositif fluide

- Intégration et compatibilité avec le système de capture

La configuration du système présenté dans ce chapitre, et notamment la partie fluide, constitue une étape d'approche vers l'intégration à la plateforme fluide dans laquelle est utilisée le S-MDC (*in vitro* ou *ex vivo*). Un point de développement important va être de concevoir un holder permettant l'intégration de la fibre optique au sein du canal fluide dans lequel est disposé le S-MDC. Un système devra être imaginé pour le **positionnement précis de la fibre optique** de façon centrée dans le canal et en amont du S-MDC à la distance de travail du système de vélocimétrie laser à effet Doppler, lorsqu'elle aura été déterminée. Nous pouvons imaginer insérer la fibre avec un angle par rapport au canal fluide, mais dans ce cas-là il est très important de connaître *a priori* la distance de travail et le volume sondé par le système car il y a un risque de sonder de la lumière diffusée sur la totalité du chemin optique et donc en dehors de la zone d'intérêt. Des simulations fluides devront être menées afin d'étudier l'impact de la fibre optique et de son système de maintien sur l'hydrodynamique et les répercussions éventuelles que ces modifications au sein du canal fluide pourraient avoir sur la capture.

- Relation entre vitesse d'écoulement et taux d'obstruction de la membrane filtrante

Une démarche expérimentale permettant d'évaluer **l'évolution de la vitesse d'écoulement mesurée en amont du S-MDC en fonction du taux d'obstruction de sa membrane filtrante** consisterait en la fabrication de S-MDCs au design modifiés comprenant différents taux d'ouvertures de la membrane filtrante. La mesure de la vitesse d'écoulement sanguin en amont de ces différents dispositifs dans des conditions fluidiques identiques permettrait d'identifier la relation entre ces deux paramètres et de valider la mesure localisée comme représentative du taux d'obstruction de la membrane filtrante. Des simulations fluidiques peuvent accompagner la caractérisation expérimentale pour l'investigation de l'évolution de la vitesse en amont de la membrane filtrante pour différents taux d'obstructions.

- Vers l'outil médical

Dans la perspective de l'intégration de cet outil au système complet de capture de cellules tumorales circulantes, un module d'interface devra être conçu pour permettre à l'utilisateur d'avoir un **accès simple à la mesure** de vitesse au centre du canal fluidique en temps réel. Deux modalités de mesures pourront être envisagées. Une mesure comme paramètre de référence de l'écoulement sanguin au sein du canal pré-capture. Dans ce cas-là le site de mesure peut être déporté du voisinage du S-MDC si le canal présente une constriction constante entre les deux. Le second cas est celui évoqué plus tôt dans ce paragraphe, qui a pour ambition la mesure en temps réel de l'évolution de la vitesse d'écoulement en amont de la membrane filtrante du S-MDC. Ce suivi permettrait d'évaluer le taux d'obstruction en temps réel de la membrane filtrante, correspondant à la présence de cellules d'intérêt ou de contamination. Une vitesse plancher ou nulle sondée correspondrait à l'obstruction totale de la membrane filtrante et indiquerait que l'action de capture cellulaire doit être achevée. Ces deux informations sont nécessaires pour établir un protocole d'utilisation précis du système de capture de cellules tumorales circulantes qui accompagnerait le geste médical. L'ensemble de l'intégration de ce système de vélocimétrie laser à effet Doppler à la plateforme fluidique du système de capture devra être certifiée par les normes ISO en vigueur pour son utilisation effective dans le contexte de routine clinique.

Conclusions

Dans ce chapitre, nous avons introduit les principales techniques existantes pour déterminer la vitesse de l'écoulement sanguin. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés à celles permettant d'effectuer une mesure locale et précise de la vitesse d'écoulement dans la perspective d'intégrer un système de mesure au sein de nos systèmes de capture de cellules tumorales circulantes. L'analyse de l'état de l'art parmi les techniques déjà utilisées en routine clinique et en cours de recherche et développement a fait émerger la vélocimétrie laser à effet Doppler comme solution pour la mesure locale et précise de la vitesse d'écoulement sanguin présentant un potentiel d'intégration au système fluide dans lequel sont embarqués nos S-MDCs.

Dans le cadre des travaux présentés dans cette thèse, un montage compact entièrement fibré a été réalisé pour des mesures de vélocimétrie laser à effet Doppler *in situ*, c'est-à-dire en insérant la fibre optique émettrice et réceptrice du signal directement au sein du fluide. Cette configuration permet de se positionner au plus proche du site de mesure et de s'affranchir des artefacts liés à la profondeur de pénétration du faisceau laser et aux obstacles présents entre le fluide et le faisceau incident. Le montage fibré ne comportant pas de composants optiques libres dans l'espace permet d'assurer l'intégrité du système et assure une simplicité de sa mise en œuvre. La **compacité du système** et son faible coût proposé le rendent compatible pour l'intégration au système fluide sur lesquels sont embarqués les S-MDCs, que ce soit un système *in vitro* ou *ex vivo*.

Trois fibres avec un embout lentillé de géométrie différente ont été utilisées afin d'étudier leur impact sur les mesures. Les mesures ont été effectuées en positionnant les fibres en amont et en aval de l'écoulement afin de vérifier si une condition est privilégiée pour la mesure en terme de perturbation du flux. Cependant, dans la perspective de notre application nous privilégions le positionnement en amont. Le système proposé a été testé expérimentalement, dans un premier temps pour l'étude d'une suspension de microbilles circulant au sein d'un canal fluide simple. Le signal de puissance de densité spectrale mesuré est le reflet d'une **distribution de vitesses et directions du mouvement des microbilles** perturbées localement par la présence de la fibre optique. Une **fréquence Doppler correspondant à la vitesse maximale des microbilles** au centre du canal a été extraite pour différents débits. Lorsque la fibre est positionnée en amont, les vitesses extraites à partir des fréquences Doppler relevées sont en accord avec les estimations théoriques basées sur la loi Poiseuille et des mesures expérimentales de vélocimétrie par suivi de microbilles. Dans un deuxième temps, les mesures ont été menées en faisant circuler du sang complet au sein du même canal fluide. Une allure de signal proche de celle observée dans le cas de la suspension de microbilles a été relevée. De la même façon des vitesses ont été extraites à partir **de fréquence Doppler correspondant aux vitesses maximales des particules sanguines diffusantes** au sein du volume sondé. Ces **fréquences Doppler évoluent linéairement avec les estimations de vitesses maximales** au centre basées sur des résultats de simulations fluidiques. Les vitesses correspondantes aux fréquences Doppler mesurées ne représentent pas quantitativement la valeur de vitesse car des effets de diffusion multiples sont à prendre en compte dans la mesure. Cependant, ce système permettrait dans un premier temps un **suivi qualitatif de l'évolution de la vitesse** au centre du canal, en amont de la membrane filtrante des S-MDCs. Suite à une étude plus approfondie de l'effets des diffusions multiples sur la mesure, une **calibration adéquate** permettrait d'extraire une valeur représentative de la vitesse d'écoulement au centre du canal.

Les trois embouts lentillés ont été concluants pour la mesure de vélocimétrie laser à effet Doppler en positionnant en aval et en amont de l'écoulement. Le système proposé et testé paraît prometteur pour l'intégration à la plateforme fluide dans laquelle sont embarqués les S-MDCs. Il

permettrait d'effectuer une **mesure locale et précise** de la vitesse au centre du canal comme **paramètre de référence** avant chaque geste médical de capture de cellules tumorales circulantes. Il permettrait aussi de façon plus ambitieuse un suivi de **l'évolution de la vitesse d'écoulement** en amont de la membrane filtrante du S-MDC représentative de son taux d'obstruction. Une investigation approfondie du système permettra de définir la sensibilité, la distance de travail ainsi que les résolutions spatiales et temporelles du système. Un travail de développement permettra l'intégration de ce système à la plateforme fluïdique permettant l'utilisation des S-MDCs. Ce système présente une avancée importante pour la mise en place d'un **protocole précis** d'utilisation du S-MDC et du dispositif complet de capture de CTCs nécessaire à son introduction en routine clinique.

Bibliographie

1. Feldschuh, J. & Enson, Y. Prediction of the normal blood volume. Relation of blood volume to body habitus. *Circulation* **56**, 605–612 (1977).
2. Secomb, T. W. Red blood cell mechanics and capillary blood rheology. *Cell Biophys.* **18**, 231–251 (1991).
3. Stuart, J. Erythrocyte rheology. *J. Clin. Pathol.* **38**, 965–977 (1985).
4. Li, X., Peng, Z., Lei, H., Dao, M. & Karniadakis, G. E. Probing red blood cell mechanics, rheology and dynamics with a two-component multi-scale model. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **372**, 20130389 (2014).
5. Vennemann, P., Lindken, R. & Westerweel, J. In vivo whole-field blood velocity measurement techniques. *Exp. Fluids* **42**, 495–511 (2007).
6. Coglianese, E. E., Qureshi, M. M., Vasan, R. S., Wang, T. J. & Moore, L. L. Usefulness of the Blood Hematocrit Level to Predict Development of Heart Failure in a Community. *Am. J. Cardiol.* **109**, 241–245 (2012).
7. Fåhræus, R. & Lindqvist, T. THE VISCOSITY OF THE BLOOD IN NARROW CAPILLARY TUBES. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* **96**, 562–568 (1931).
8. Chien, S. Shear Dependence of Effective Cell Volume as a Determinant of Blood Viscosity. *Science* **168**, 977–979 (1970).
9. *The mechanics of the circulation.* (Cambridge University Press, 2012).
10. Womersley, J. R. Method for the calculation of velocity, rate of flow and viscous drag in arteries when the pressure gradient is known. *J. Physiol.* **127**, 553–563 (1955).
11. Loudon, C. & Tordesillas, A. The Use of the Dimensionless Womersley Number to Characterize the Unsteady Nature of Internal Flow. *J. Theor. Biol.* **191**, 63–78 (1998).
12. Siebert, M. W. & Fodor, P. S. Newtonian and Non-Newtonian Blood Flow over a Backward- Facing Step – A Case Study. 5.
13. Botar, C. C. *et al.* CFD Simulation of the Portal Vein Blood Flow. in *International Conference on Advancements of Medicine and Health Care through Technology* (eds. Vlad, S., Ciupa, R. V. & Nicu, A. I.) vol. 26 359–362 (Springer Berlin Heidelberg, 2009).
14. Ooue, A. *et al.* Changes in blood flow in a conduit artery and superficial vein of the upper arm during passive heating in humans. *Eur. J. Appl. Physiol.* **101**, 97–103 (2007).
15. Fercher, A. F. & Briers, J. D. Flow visualization by means of single-exposure speckle photography. *Opt. Commun.* **37**, 326–330 (1981).
16. Briers, J. D., Richards, G. & He, X. W. Capillary Blood Flow Monitoring Using Laser Speckle Contrast Analysis (LASCA). *J. Biomed. Opt.* **4**, 164 (1999).
17. Nadort, A., Kalkman, K., van Leeuwen, T. G. & Faber, D. J. Quantitative blood flow velocity imaging using laser speckle flowmetry. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
18. Riva, C., Ross, B. & Benedek, G. B. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. **11**, 9 (1972).
19. Akiguchi, S. *et al.* Measurement of blood flow velocity in a model of stenosis *in vitro* and in mesenteric vessels *in vivo* using non-invasive micro multipoint laser Doppler velocimetry. *Meas. Sci. Technol.* **23**, 045702 (2012).
20. Feke, G. T. & Riva, C. E. Laser Doppler measurements of blood velocity in human retinal vessels. *JOSA* **68**, 526–531 (1978).
21. Shepherd, A. P., Riedel, G. L., Kiel, J. W., Haumschild, D. J. & Maxwell, L. C. Evaluation of an infrared laser-Doppler blood flowmeter. *Am. J. Physiol.-Gastrointest. Liver Physiol.* **252**, G832–G839 (1987).
22. Essex, T. J. H. & Byrne, P. O. A laser Doppler scanner for imaging blood flow in skin. *J. Biomed. Eng.* **13**, 189–194 (1991).
23. Wardell, K., Jakobsson, A. & Nilsson, G. E. Laser Doppler perfusion imaging by dynamic light scattering. *IEEE Trans. Biomed. Eng.* **40**, 309–316 (1993).

24. Rajan, V., Varghese, B., van Leeuwen, T. G. & Steenbergen, W. Review of methodological developments in laser Doppler flowmetry. *Lasers Med. Sci.* **24**, 269–283 (2009).
25. Keane, R. D. & Adrian, R. J. Theory of cross-correlation analysis of PIV images. 25.
26. Keane, R. D., Adrian, R. J. & Zhang, Y. Super-resolution particle imaging velocimetry. *Meas. Sci. Technol.* **6**, 754–768 (1995).
27. Johnson, P. & Wayland, H. Regulation of blood flow in single capillaries. *Am. J. Physiol.-Leg. Content* **212**, 1405–1415 (1967).
28. Zweifach, B. W. & Schmid-Schoenbein, G. W. RBC Velocity Profiles in Arterioles and Venules of the Rabbit Omentum. *Microvasc. Res.* **10**, 153–164 (1975).
29. Tangelder, G. J., Teirlinck, H. C., Slaaf, D. W. & Reneman, R. S. Distribution of blood platelets flowing in arterioles. *Am. J. Physiol.-Heart Circ. Physiol.* **248**, H318–H323 (1985).
30. Smith, M. L., Long, D. S., Damiano, E. R. & Ley, K. Near-Wall m-PIV Reveals a Hydrodynamically Relevant Endothelial Surface Layer in Venules In Vivo. *Biophys. J.* **9**.
31. Masood, S. & Yang, G.-Z. BLOOD FLOW MEASUREMENT. 11.
32. Riva, C. E. Basic principles of laser Doppler flowmetry and application to the ocular circulation. in *Laser Scanning: Update 1* (ed. Sampaolesi, J. R.) 1–7 (Springer Netherlands, 2001). doi:10.1007/978-94-010-0322-3_1.
33. Briers, J. D. Laser Doppler, speckle and related techniques for blood perfusion mapping and imaging. *Physiol. Meas.* **22**, R35–R66 (2001).
34. Campagnolo, L., Roman, S., Perchoux, J. & Lorthois, S. A new optical feedback interferometer for measuring red blood cell velocity distributions in individual capillaries: a feasibility study in microchannels. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **15**, 104–105 (2012).
35. Atashkhouei, R. *et al.* Optical Feedback Flowmetry: Impact of Particle Concentration on the Signal Processing Method. *IEEE Sens. J.* **18**, 1457–1463 (2018).
36. Bonner, R. & Nossal, R. Model for laser Doppler measurements of blood flow in tissue. *Appl. Opt.* **20**, 2097 (1981).
37. Nilsson, G. E. Signal processor for laser Doppler tissue flowmeters. *Med. Biol. Eng. Comput.* **22**, 343–348 (1984).
38. Zhao, J., Zhong, D. & Zhou, S. NIR-I-to-NIR-II fluorescent nanomaterials for biomedical imaging and cancer therapy. *J. Mater. Chem. B* **6**, 349–365 (2018).
39. Smith, A. M., Mancini, M. C. & Nie, S. Second window for in vivo imaging. *Nat. Nanotechnol.* **4**, 710–711 (2009).
40. Ethirajan, M., Chen, Y., Joshi, P. & Pandey, R. K. The role of porphyrin chemistry in tumor imaging and photodynamic therapy. *Chem Soc Rev* **40**, 340–362 (2011).
41. Tajikawa, T., Ishihara, W., Kohri, S. & Ohba, K. Development of Miniaturized Fiber-Optic Laser Doppler Velocimetry Sensor for Measuring Local Blood Velocity: Measurement of Whole Blood Velocity in Model Blood Vessel Using a Fiber-Optic Sensor with a Convex Lens-Like Tip. *J. Sens.* **2012**, 1–11 (2012).
42. Scalise, L., Steenbergen, W. & De Mul, F. Self-mixing feedback in a laser diode for intra-arterial optical blood velocimetry. *Appl. Opt.* **40**, 4608–4615 (2001).
43. Perchoux, J. *et al.* Current Developments on Optical Feedback Interferometry as an All-Optical Sensor for Biomedical Applications. *Sensors* **16**, 694 (2016).
44. Riva, C., Ross, B. & Benedek, G. B. Laser Doppler measurements of blood flow in capillary tubes and retinal arteries. **11**, 9 (1972).
45. Song, W. Z. *et al.* OPTICAL DETECTION OF LIVING CELLS' REFRACTIVE INDEX VIA BUFFER MODULATION OF MICROFLUIDIC CHIP. **4** (2006).
46. Lazareva, E. & Tuchin, V. Blood refractive index modelling in the visible and near infrared spectral regions. *J. Biomed. Photonics Eng.* **4**, 010503 (2018).

Annexe A

Résultats complémentaires de mesures de vélocimétrie laser à effet Doppler sur suspension de microbilles

B.1. Résultats obtenus avec la fibre A

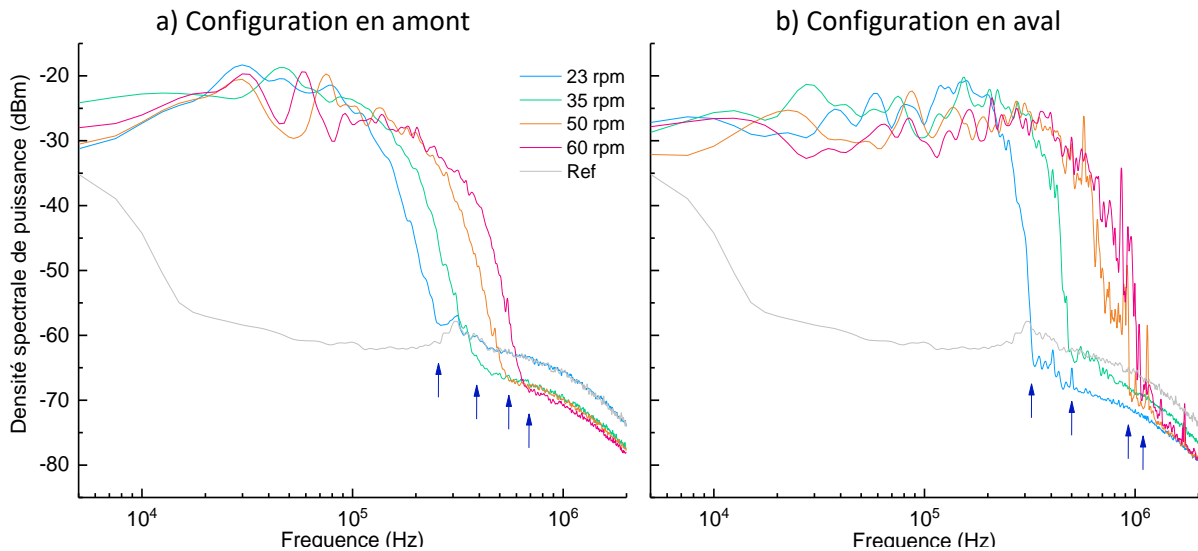


Figure B.1 Spectre de puissance de densité spectrale mesuré en utilisant la Fibre A sur une suspension de microbilles. a) La propagation du faisceau et le flux sont dans le même sens, i.e. la fibre est positionnée en amont de l'écoulement. b) La propagation du faisceau et le flux sont dans des sens opposés, i.e. la fibre est positionnée en aval de l'écoulement.

Vitesse de rotation pompe (rpm)	Vitesse V_{\max} (Poiseuille) (cm/s)	Configuration en amont		Configuration en aval	
		Fréquence de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)	Fréquence de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)
23	13 ± 3	269 ± 50	$15,3 \pm 2,8$	334 ± 50	$19,0 \pm 2,8$
35	21 ± 4	453 ± 50	$25,7 \pm 2,8$	496 ± 50	$28,2 \pm 2,8$
50	30 ± 5	551 ± 50	$31,3 \pm 2,8$	935 ± 50	$53,2 \pm 2,8$
60	37 ± 7	690 ± 50	$39,2 \pm 2,8$	1069 ± 50	$60,8 \pm 2,8$

Tableau B.1 Fréquences de coupure des mesures expérimentales Doppler et vitesses maximales de microbilles correspondantes pour chaque vitesse de rotation de pompe pour le faisceau laser dans la direction de l'écoulement et dans la direction opposée. La vitesse maximale au centre du canal déduite de la loi Poiseuille est indiquée pour chaque vitesse de rotation de pompe pour comparaison avec les vitesses extraites des fréquences de coupure.

B.2. Résultats obtenus avec la fibre C

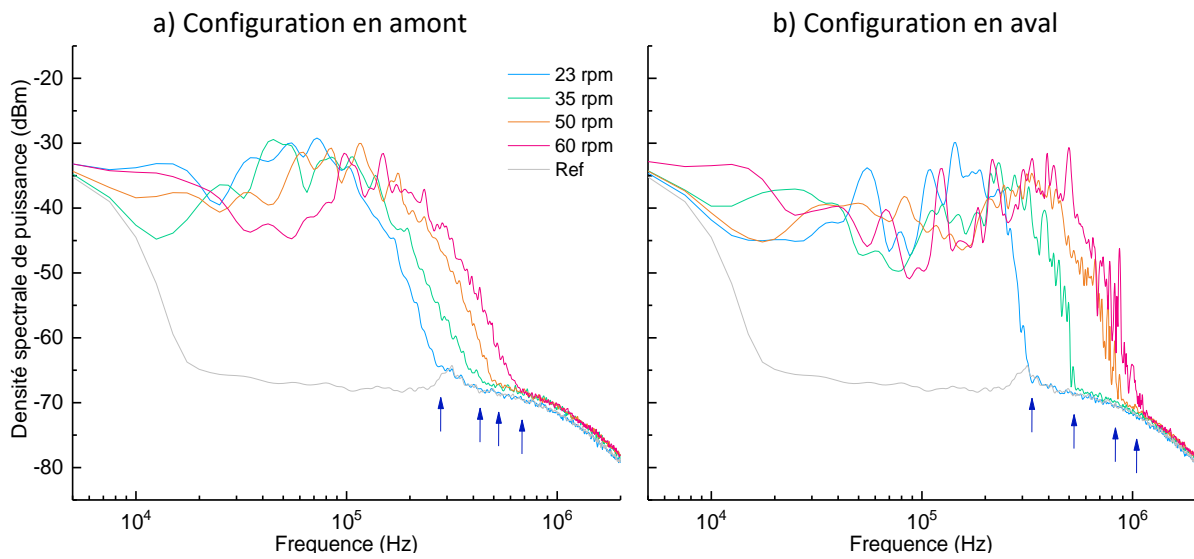


Figure B.2 Spectre de puissance de densité spectrale mesuré en utilisant la Fibre C sur une suspension de microbilles. a) La propagation du faisceau et le flux sont dans le même sens, i.e. la fibre est positionnée en amont de l'écoulement. b) La propagation du faisceau et le flux sont dans des sens opposés, i.e. la fibre est positionnée en aval de l'écoulement.

Vitesse de rotation pompe (rpm)	Vitesse V_{\max} (Poiseuille) (cm/s)	Configuration en amont		Configuration en aval	
		Fréquence de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)	Fréquence de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)
23	13 ± 3	291 ± 50	$16,5 \pm 2,8$	321 ± 50	$18,2 \pm 2,8$
35	21 ± 4	443 ± 50	$25,2 \pm 2,8$	531 ± 50	$30,2 \pm 2,8$
50	30 ± 5	493 ± 50	$28,0 \pm 2,8$	880 ± 50	$50,0 \pm 2,8$
60	37 ± 7	668 ± 50	$38,0 \pm 2,8$	1170 ± 50	$66,6 \pm 2,8$

Tableau B.2 Fréquences de coupure des mesures expérimentales Doppler et vitesses maximales de microbilles correspondantes pour chaque vitesse de rotation de pompe pour le faisceau laser dans la direction de l'écoulement et dans la direction opposée. La vitesse maximale au centre du canal déduite de la loi Poiseuille est indiquée pour chaque vitesse de rotation de pompe pour comparaison avec les vitesses extraites des fréquences de coupure.

Annexe B

Résultats complémentaires de mesures de vélocimétrie laser à effet Doppler sur suspension de microbilles

C.1. Résultats obtenus avec la fibre B

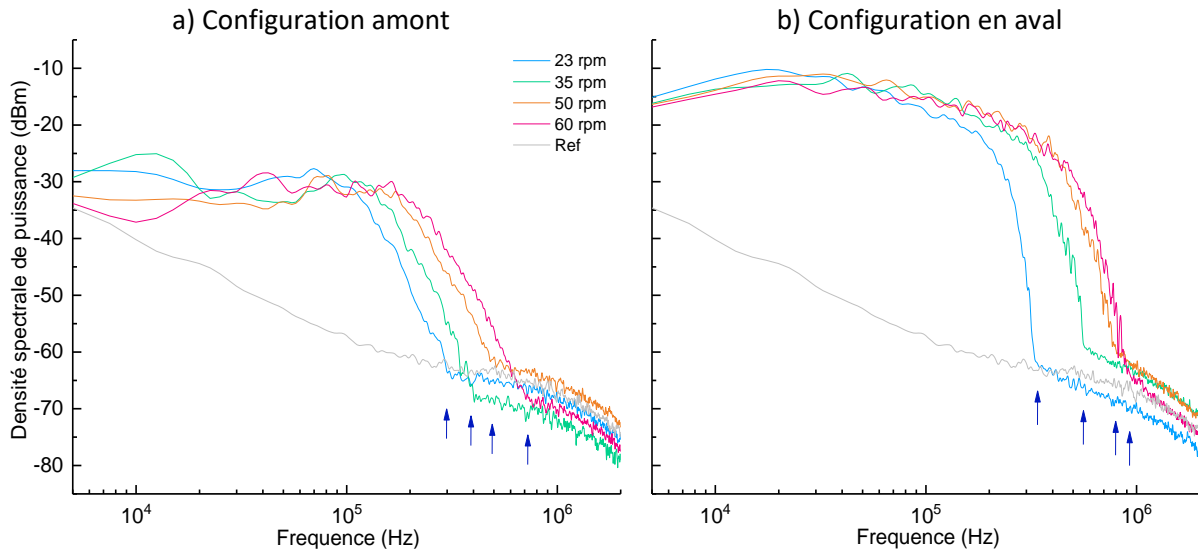


Figure C.1 Spectre de puissance de densité spectrale mesuré en utilisant la Fibre B sur sang complet. a) La propagation du faisceau et l'écoulement sont dans le même sens, i.e. la fibre est positionnée en aval. b) La propagation du faisceau et l'écoulement sont dans des sens opposés, i.e. la fibre est positionnée en amont.

Vitesse de rotation pompe (rpm)	Vitesse simulation V_s (cm/s)	Fréq. Doppler f_s (kHz) (basé sur V_s)	Configuration en amont		Configuration en aval	
			Fréq. de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)	Fréq. de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)
23	12,9	226	317 ± 50	18,1	331 ± 50	18,9
35	17,7	310	401 ± 50	22,9	536 ± 50	30,6
50	25,2	441	514 ± 50	29,3	803 ± 50	45,8
60	31,9	559	711 ± 50	40,6	985 ± 50	56,2

Tableau C.1 Fréquences de coupure des mesures expérimentales Doppler dans du sang complet avec la fibre B dans les deux configurations amont et aval, pour différentes vitesses de rotation de pompe. V_c est la vitesse maximale déduite de la fréquence de coupure f_c par application de la relation 3.10 correspondant à un effet Doppler simple et idéal. Les vitesses maximales V_s déduites de la simulation fluide et les fréquences Doppler correspondantes f_s calculées à partir de la relation 3.10 sont rappelées pour comparaison.

C.2. Résultats obtenus avec la fibre C

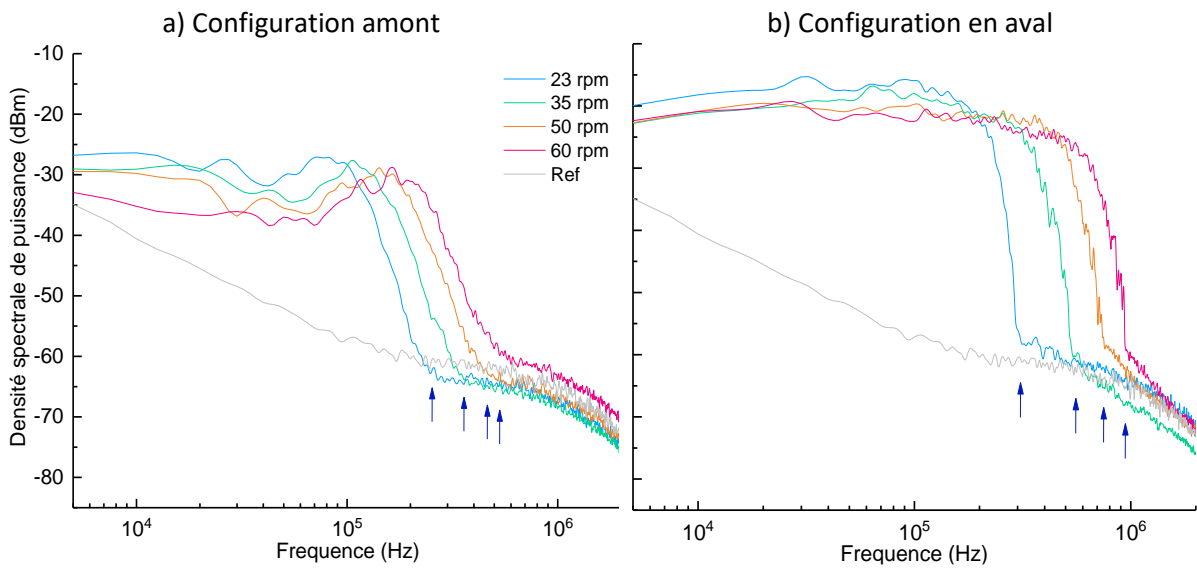


Figure C.2 Spectre de puissance de densité spectrale mesuré en utilisant la Fibre C sur sang complet. a) La propagation du faisceau et l'écoulement sont dans le même sens, i.e. la fibre est positionnée en aval. b) La propagation du faisceau et l'écoulement sont dans des sens opposés, i.e. la fibre est positionnée en amont.

Vitesse de rotation pompe (rpm)	Vitesse simulation V_s (cm/s)	Fréq. Doppler f_s (kHz) (basé sur V_s)	Configuration en amont		Configuration en aval	
			Fréq. de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)	Fréq. de coupure f_c (kHz)	Vitesse correspondante V_c (cm/s)
23	12,9	226	267 ± 50	15,2	314 ± 50	17,9
35	17,7	310	384 ± 50	21,9	546 ± 50	31,1
50	25,2	441	486 ± 50	27,7	763 ± 50	43,5
60	31,9	559	534 ± 50	30,4	947 ± 50	54,0

Tableau C.2 Fréquences de coupure des mesures expérimentales Doppler dans du sang complet avec la fibre C dans les deux configurations amont et aval, pour différentes vitesses de rotation de pompe. V_c est la vitesse maximale déduite de la fréquence de coupure f_c par application de la relation 3.10 correspondant à un effet Doppler simple et idéal. Les vitesses maximales V_s déduites de la simulation fluide et les fréquences Doppler correspondantes f_s calculées à partir de la relation 3.10 sont rappelées pour comparaison.

Conclusion générale

La biopsie liquide, et plus particulièrement la détection de cellules tumorales circulantes (CTCs) dans le sang, est prometteuse pour la recherche ainsi que pour la pratique clinique en oncologie. Cette technique trouverait un ensemble d'usages aussi bien pour l'étude médicale des mécanismes métastatiques et l'étude plus vaste de la biologie du cancer mais aussi pour la prise en charge clinique des patients. Du point de vue clinique, la détection des CTCs permettrait notamment la mise en place de diagnostics précoces, le suivi de la réponse thérapeutique à un traitement, l'émission de pronostics réguliers et donc l'adaptation du traitement tout au long de la maladie. L'isolement des CTCs et leur analyse biologique permettrait par ailleurs d'accéder à des informations sur la tumeur primaire, de tester de nouveaux traitements, et de comprendre la dynamique du processus à l'origine de la formation de métastases distantes.

Les avancées en biologie moléculaire et micro-nanotechnologies de ces dernières décennies ont permis de développer de multiples techniques et dispositifs pour isoler les CTCs dans le sang. Cependant la capture de ces cellules rares à partir d'un fluide complexe reste à ce jour un défi technologique de grande ampleur. Les verrous principaux pour l'utilisation de ces dispositifs en routine clinique sont l'isolement d'un nombre significatif de CTCs et l'analyse de volumes sanguins suffisant pour accéder à une population représentative des CTCs. C'est dans la perspective de fournir des dispositifs performants et fiables pour les milieux de la recherche et hospitalier que s'inscrit le cœur d'activité de l'entreprise SmartCatch. La technologie développée est basée sur les S-MDCs, des microdispositifs innovants de capture de CTCs à partir de sang complet. Les S-MDCs, comportant une membrane filtrante adaptée, isolent préférentiellement les CTCs des cellules sanguines saines à partir des critères physiques de taille et de rigidité mécanique.

Les travaux de la thèse présentée dans ce manuscrit sont basés sur le développement des S-MDCs et ont été effectués en collaboration entre le laboratoire LAAS-CNRS et la société SmartCatch. Le fil conducteur des présents travaux est l'intégration de nouvelles fonctions à ces micro-dispositifs, afin de les faire évoluer vers des systèmes communicants capable de transmettre des informations relatives au processus de capture en temps réel. Les développements entrepris concernent la détection en temps réel de la capture cellulaire et la mesure de la vitesse d'écoulement sanguin *in situ* au voisinage des S-MDCs. Ces informations permettraient notamment une optimisation du processus de capture ainsi que la mise en place d'un protocole précis d'utilisation clinique des dispositifs.

☞ Socle de départ des travaux de thèse

Le Chapitre 1 de ce manuscrit présente les performances de capture des S-MDCs développés par la société Smartcatch. Ces dispositifs ont vocation à être utilisés soit *in vitro*, où l'analyse échantillonne le volume de sang complet issu d'un prélèvement, soit *ex vivo*, où l'analyse échantillonne le sang du patient au sein d'une dérivation de la circulation extra-corporelle par un système d'aphérèse. L'optimisation du design des membranes filtrantes et leur montage au sein d'un système fluide adapté a permis d'obtenir des résultats de capture intéressants dans la configuration *in vitro* qui sont encore en cours d'étude et d'optimisation au sein de SmartCatch.

☞ Aboutissements des travaux de thèse

Le Chapitre 2 de ce manuscrit décrit l'axe recherche et développement relatif à la détection électrique de cellules tumorales. Une étude de la littérature a dans un premier temps mis en avant les propriétés diélectriques spécifiques des cellules tumorales à des fréquences inférieures à 1 MHz, ainsi que les techniques existantes pour la détection de cellules à partir d'une transduction électrique. A la

lumière de cette bibliographie, la solution technique choisie pour notre application a été l'intégration technologique de microélectrodes à la surface de la membrane filtrante des S-MDCs afin de détecter électriquement les cellules capturées au voisinage de ses pores de rétention. Des zones de contact électrique disposées en face arrière du dispositif permettront d'effectuer des mesures d'impédance à fréquences variables simultanément à la capture fluide. Afin d'étudier le comportement électrique d'électrodes dimensionnées pour être intégrées aux S-MDCs, des dispositifs exploratoires non filtrants, appelés dispositifs 2D, ont été fabriqués avec des dimensions et géométries d'électrodes compatibles pour intégration à la membrane filtrante. Ces dispositifs visent à effectuer des mesures de spectroscopie d'impédance en présence d'une suspension de cellules biologiques en incubation statique. L'évolution de l'impédance entre les microélectrodes sur la gamme de fréquences d'intérêt en présence de cellules sédimentées est analysée. Les premiers résultats de spectroscopie d'impédance ont été confrontés à un modèle analytique et ont permis une compréhension du système électrique. Les composantes du circuit influant sur le système ont été extraites en vue d'optimiser la conception des microélectrodes pour la détection de cellules tumorales sous flux. Ces développements constituent une preuve de concept pour la détection électrique embarquée sur les S-MDCs. Un procédé technologique complet intégrant ces microélectrodes sur des S-MDC de nouvelle génération a été mis au point et validé. Il a nécessité de nombreuses optimisations des différentes étapes de microfabrication mais aussi des matériaux utilisés. Des détails sur les matériaux choisis, les étapes du procédé de microfabrication, et la caractérisation des dispositifs par spectroscopie d'impédance sont présentés dans le manuscrit. Le guide principal de cette intégration a consisté à tirer les leçons des dispositifs exploratoires afin de concentrer le champ électrique au voisinage des pores de rétention et de minimiser les impédances parasites du circuit tout en concevant une membrane filtrante non dégradée, voire améliorée, vis-à-vis de son efficacité de capture. Les validations expérimentales de cette nouvelle génération de dispositifs s'effectueront après l'achèvement de ce travail de thèse, l'objectif sera de montrer le suivi électrique de la capture sous flux, d'abord au sein d'un fluide simple puis au sein du sang complet. La discrimination des cellules capturées, c'est-à-dire la possibilité par la mesure électrique de discerner les événements de capture liés à des cellules tumorales de ceux liés à des cellules sanguines, sera analysée, mais à ce stade reste encore hypothétique.

Le Chapitre 3 de ce manuscrit adresse la problématique de la mesure de la vitesse d'écoulement sanguin *in situ*. Une recherche des techniques employées à cet effet, et notamment pour la mesure de la vitesse précise et localisée, nous a permis de dégager une solution technique adaptée qui est la vélocimétrie laser à effet Doppler. Un système compact a été mis en place pour la mesure de vitesse de l'écoulement sanguin *in situ* au sein d'un canal fluide, modélisant l'environnement fluide du holder dans lequel sont positionnés les S-MDCs. Le montage emploie une fibre optique et un laser conventionnel du domaine des télécommunications émettant dans l'infrarouge lointain. La fibre optique est insérée directement au sein de l'écoulement et joue à la fois le rôle d'émetteur et de récepteur du signal. Des lentilles ont été réalisées en bout de fibre dans l'objectif de focaliser la lumière émise afin de définir un volume de mesure précis, mais aussi de collecter suffisamment de signal diffusé par les cellules sanguines en mouvement. La spécificité de ce montage repose sur la nature du laser permettant d'une part une mesure peu bruitée, et d'autre part un montage entièrement fibré à partir de composants développés pour le domaine des télécommunications. Ainsi, ce système a l'avantage d'être peu coûteux et simple à mettre en œuvre. L'originalité repose aussi sur l'insertion de la fibre parallèle à la direction de l'écoulement, permettant pour notre application de mesurer une vitesse localisée représentative de la dynamique d'écoulement au voisinage du S-MDC. Des mesures de spectres de densité spectrale de puissance ont permis d'extraire des fréquences spécifiques, qui évoluent linéairement avec le débit établi au sein du canal fluide. Ainsi, il a été montré qu'il est possible de mesurer des variations relatives de vitesse

d'écoulement au niveau du volume de détection. Il serait possible lors de futurs développements, en moyennant des calibrations adaptées, de mesurer quantitativement la vitesse d'écoulement au niveau du volume de détection. L'ensemble de ces caractéristiques font de ce système un outil adapté pour un suivi de l'évolution de vitesse d'écoulement proche de la membrane filtrante des S-MDCs, dans la perspective d'un suivi de la dynamique d'obstruction par les événements de capture cellulaire. Ce système peut aussi être envisagé pour une utilisation clinique sur le principe de l'endoscopie afin d'accéder à des vitesses d'écoulement au sein de vaisseaux sanguins non superficiels où les techniques de vélocimétrie actuelles ne sont pas implémentables.

L'exploration de ces deux pistes instrumentalisées validées expérimentalement ouvrent la voie pour une intégration aux plateformes fluidiques dans lesquelles sont embarqués les S-MDCs. L'implémentation de ces systèmes et la collecte des mesures en temps réel de détection électrique et de vitesse d'écoulement sanguin permettront d'établir un protocole calibré, standardisé, et adapté à chaque patient. Ces avancées présentent du potentiel pour la démocratisation de la biopsie liquide et afin de pouvoir l'inscrire véritablement comme le geste médical essentiel pour le diagnostic, le suivi et la personnalisation des soins en oncologie médicale.

✎ Considérations pour le développement d'outils médicaux de médecine de précision

En participant au développement de ces micro-dispositifs de capture de CTCs, ces travaux de thèse s'inscrivent dans les avancées actuelles relatives à la médecine dite de précision ou personnalisée, lorsque cette dernière est destinée à être appliquée à l'échelle individuelle. Ce concept repose sur l'identification d'approches thérapeutiques adaptées à l'échelle de chaque patient ou d'un groupe de patients à partir de profils génétiques notamment. Cette médecine de précision ambitionne la mise en place d'une thérapie sur mesure en adéquation avec l'état pathologique d'un patient donné à un moment précis. En permettant à chaque patient de recevoir un diagnostic précoce, une évaluation des risques précise et un traitement optimal, la médecine personnalisée promet d'améliorer la prise en charge des patients par les services de soins tout en réduisant le temps et les coûts. La démocratisation de cette approche favoriserait la transition d'une médecine réactive à une médecine préventive, plus accessible au quotidien.

Dès lors, une opportunité se présente aux industriels et fournisseurs de traitements et dispositifs médicaux pour le développement d'outils et de molécules ciblant des groupes de patients et pathologies spécifiques qui ne peuvent être traités correctement par le système de santé traditionnel. L'enjeu est de développer des outils de précision, spécifiques pour une utilisation à l'échelle individualisée tout en conservant une versatilité du dispositif afin de pouvoir le destiner à un sous-groupe d'individus présentant des caractéristiques pathologiques communes.

La médecine de précision couplée aux avancées en génomique tend à accumuler un nombre important d'informations sur le profil génomique des patients, nécessitant la mise en place de *biobanques*, des bases de données génétiques afin de gérer ces ressources et de soutenir la recherche médicale. Bien que nécessaire au développement de l'approche personnalisée à grande échelle, l'accumulation de ces données individuelles soulève des questions éthiques, sociales et légales. De rares études sur le sujet évoquent notamment le consentement éclairé sur le retour des résultats au patient et à ses proches, la confidentialité de ces données et la discrimination génétique, l'accès démocratisé à des tests génétiques ^{1,2}. Ces problématiques, actuellement peu adressées, nécessitent la mise en place en amont de cadres réglementaires sur les devoirs et responsabilités des praticiens de la médecine personnalisée. Les bases de données globalisées doivent permettre d'utiliser ces données dans l'intérêt du patient, et dans la perspective de faire avancer la recherche scientifique sur

certaines pathologies. Afin d'éviter les dérives, la manipulation de ces données doit être encadrée par des règles légales et éthiques claires.

La détection d'événements biologiques rares, caractéristiques de la médecine de précision questionne aussi la fiabilité et la qualité des technologies développées sur lesquelles vont reposer systématiquement des prises de décisions médicales, qui seront dans certains cas très engageantes voire vitales pour les patients. Concernant le développement technologique des futurs outils médicaux, la tendance tend à l'automatisation des systèmes dans le but notamment d'améliorer leurs performances ainsi que de réduire le temps et les coûts d'utilisation. Face au gain de temps opérationnel, il est crucial de veiller à ne pas négliger les temps d'échanges humains entre patients et professionnels de la santé nécessaire à une prise en charge de qualité ^{3,4}.

La médecine personnalisée sous-entend que le patient soit au cœur de cette nouvelle approche de la médecine. Dès lors il est important de veiller aux dérives d'utilisation des nouvelles technologies qui émergent dans ce domaine afin de ne pas compromettre l'intention première de suivi rapproché de l'état de santé du patient à l'échelle individuelle dans le but d'améliorer sa prise en charge. En tant qu'ingénieur ou chercheur dans le domaine médical, les développements technologiques doivent être entrepris selon le prisme du bien-être du patient et de façon avertie vis-à-vis des enjeux éthiques et sociétaux associés. Les développements technologiques présentés dans cette thèse sont encore éloignés de la pratique clinique, néanmoins nous voulons souligner qu'ils ont été entrepris et réalisés en conscience de ces problématiques, que nous jugeons très importantes à prendre en compte.

Références

1. Joly, Y., Saulnier, K. M., Osien, G. & Knoppers, B. M. The ethical framing of personalized medicine: *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **14**, 404–408 (2014).
2. McGowan, M. L., Settersten, R. A., Juengst, E. T. & Fishman, J. R. Integrating genomics into clinical oncology: Ethical and social challenges from proponents of personalized medicine. *Urol. Oncol. Semin. Orig. Investig.* **32**, 187–192 (2014).
3. Bylund, C. L., Gueguen, J. A., D'Agostino, T. A., Li, Y. & Sonet, E. Doctor–Patient Communication About Cancer-Related Internet Information. *J. Psychosoc. Oncol.* **28**, 127–142 (2010).
4. Ha, J. F. Doctor-Patient Communication: A Review. **10**, 6 (2010).

Annexe

Production scientifique

Brevet

- A. K. Jiménez Zenteno, **E. Bou**, D. Bourrier, B. Malavaud, C. Vieu, A. Cerf, Système de capture et de détection d'espèces présentes dans un fluide biologique, FR1912912, déposé le 19 Novembre **2019**

Publications

- **E. Bou**, A. Ly, J. Roul, O. Lopis, C. Vieu, A. Cerf, A compact solution for in situ laser Doppler velocimetry of blood flow, *Biomedical Optics Express* (**2019**), 10(11), 5862-5876
- K. Jiménez-Zenteno, A. Esteve, H. Cayron, **E. Bou**, D. Bourrier, S. Sanson, D. Calise, C. Blatché, C. Vieu, B. Malavaud, A. Cerf, A novel 3D microdevice for the in vivo capture of cancer-associated cells, *Medical Devices and Sensors* (**2019**), 2 (5-6), e10056
- **E. Bou**, A. K. Jiménez Zenteno, A. Estève, D. Bourrier, C. Vieu, A. Cerf, Fabrication of 3D microdevices from planar electroplating for the isolation of cancer associated cells in blood, *Microelec. Eng* (**2019**), 213, 69-76

Communications à des congrès internationaux

- Material Research Society (MRS) Fall Meeting and Exhibit, Boston (25-30 Novembre 2018)
Communication orale: A 3D microdevice for the isolation of cancer-associated circulating cells within the bloodstream
- 44th International conference on micro and nanoengineering (MNE 2018), Copenhagen (24- 27 Septembre 2018)
Communication poster: A 3D microdevice for the isolation of cancer-associated circulating cells within the bloodstream