

Capteurs RF pour la caractérisation diélectrique de solutions et de particules à l'échelle micrométrique : Application aux biopuces à cellules

Alaeddine Landoulsi

► To cite this version:

Alaeddine Landoulsi. Capteurs RF pour la caractérisation diélectrique de solutions et de particules à l'échelle micrométrique : Application aux biopuces à cellules. Electronique. Université de Limoges, 2016. Français. NNT : 2016LIMO0058 . tel-04081096

HAL Id: tel-04081096 https://theses.hal.science/tel-04081096

Submitted on 25 Apr 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 de Limoges École Doctorale Sciences et Ingénierie pour l'Information, Mathématiques (ED 521) Laboratoire XLIM / Axe RF-ELITE

Thèse pour obtenir le grade de Docteur de l'Université de Limoges Discipline : Electronique des Hautes Fréquences, Photonique et Systèmes

> Présentée et soutenue par Alaeddine LANDOULSI

> > Le 12 juillet 2016

Capteurs RF pour la caractérisation diélectrique de solutions et de particules à l'échelle micrométrique : Application aux biopuces à cellules

Thèse dirigée par Annie BESSAUDOU, Claire DALMAY et Arnaud POTHIER

JURY :

Rapporteurs M. Olivier FRANÇAIS, HDR, Maître de Conférences à l'ENS Cachan M. Cédric QUENDO, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale

Examinateurs

M. Cédric AYELA, Chargé de Recherche CNRS à l'IMS Bordeaux M. Thomas DARGENT, Maître de Conférences à l'Université de Lilles 1 Mme Valérie MADRANGEAS, Professeur à l'Université de Limoges Mme Claire DALMAY, Maître de Conférences à l'Université de Limoges Mme Annie BESSAUDOU, Professeur à l'Université de Limoges M. Pierre BLONDY, Professeur à l'Université de Limoges

Invité

M. Arnaud POTHIER, Chargé de Recherche CNRS à XLIM Université de Limoges



À mon père, à ma mère,

A mon frère et ma sœur,

A ma femme.



Table des matières

Introduction générale	12
Chapitre I : Microfluidique et spectroscopie diélectrique	17
1. La microfluidique : une science pour la manipulation de petits volumes de liquides	18
1.1 Qu'est–ce que la microfluidique ?	18
1.1.1 Les fondements théoriques	18
1.1.2 Contrôle des écoulements dans le canal microfluidique	21
1.2. Les systèmes microfluidiques	22
1.2.1 Les techniques de fabrication	22
1.2.1.1 Réalisation de canaux microfluidiques en verre	23
1.2.1.2 Réalisation de canaux microfluidiques à partir de polymères	25
1.2.2 Quelques exemples de systèmes/fonctions microfluidiques de base	28
1.2.2.1 Les micro-vannes	28
1.2.2.2 Les micro-pompes	29
1.3 Quelques grands domaines d'applications des systèmes microfluidiques	31
2. Caractérisation microondes de liquides – Applications à l'analyse cellulaire	34
2.1 Interaction onde/liquide	35
2.2 Applications à la caractérisation d'échantillons biologiques	37
3. Méthodes hyperfréquences pour la caractérisation de liquides polaires	41
3.1 Les techniques de caractérisation en réflexion	42
3.1.1 Mesures en guide coaxial	42
3.1.2 Guides d'ondes volumiques	43
3.2 Les techniques de caractérisation en transmission	44
3.3 Les techniques de caractérisation basées sur des structures résonantes volumion	ques
2 4 Technologico microfluidiques pour la coroctóriaction dióloctrique de liquides en	45
3.4 Technologies micronulaiques pour la caracterisation dielectrique de liquides en	17
3.5 Exemples de canteurs CMOS pour la caractérisation de liquide	47
4 La caractérisation diélectrique de cellules biologiques	50
4.1 Capteurs hyperfréquences appliqués à la biodétection	59
4.2 Les biocapteurs RE microfluidiques	62
Conclusion	70
Chapitre II : Développement d'un capteur microfluidique hyperfréquence pour la	
caractérisation large bande de milieux liquides	77
1. Introduction	78
2. Conception du capteur	79
2.1 Présentation du capteur microfluidique développé pour l'analyse hyperfréquence	e de
liquides	81
2.2 Etalonnage du capteur microfluidique	89
3. Fabrication des capteurs	92
3.1. Elaboration du circuit HF	93
3.2 Preparation du PDMS	98
4. Experimentations	100

4.1 Banc et méthode de mesures1	00
4.2 Caractérisation de différents milieux liquides1	01
5. Robustesse de la méthode d'étalonnage et fiabilité des capteurs microfluidiques1	05
5.1 Caractérisation de l'IsoPropAnol Anhydre (IPA)1	06
5.2 Etude de la reproductibilité des résultats1	09
Conclusion1	12
Chapitre III : Caractérisation diélectrique de particules à l'échelle micrométrique1	14
1. Introduction1	15
2. Etude théorique de la sensibilité du capteur - Simulations Electromagnétiques1	16
3. Expérimentations1	27
3.1 Application à la spectroscopie diélectrique de particules en suspension1	27
3.2 Application à la spectroscopie diélectrique de cellules biologiques en suspension 1	29
3.2.1. La diélectrophorèse (DEP)1	30
3.2.2. Mise en œuvre expérimentale de la spectroscopie d'une cellule biologique en	1
suspension à partir des capteurs développés1	32
Conclusion1	38
Conclusion Générale1	40
Publications Scientifiques1	43



Table des illustrations

Figure I.1. Les deux différents régimes d'écoulements, (a) écoulement laminaire (Re<1) et (b) écoulement turbulent (Re≈2000)20
Figure I.2. Exemple de pousse seringue de la société New Era [6]21
Figure I.3. Exemple de contrôleur de flux microfluidique de la société FLUIGENT [8]22
Figure I.4. Représentation schématique du procédé de microfabrication des canaux microfluidiques sur des substrats de verre [10]24
Figure I.5. Les étapes nécessaires à la réalisation d'un canal en PDMS [12]26
Figure I.6. Des canaux rectilignes en SU-8 fabriqués sur un substrat de silicium et scellés en utilisant un morceau de PDMS activé avec un plasma d'azote [16]27
Figure I.7. (a) La micro-vanne de Quake (b) Un schéma 3D d'une pompe [19]29
Figure I.8. (a) Micro-pompe à commande pneumatique (b) Structure de l'actionneur pneumatique pour la micro-pompe pneumatique [20]
Figure I.9. Principe de fonctionnement d'une micro-pompe avec actionneur piézoélectrique en configuration de contraintes latérales [21]
Figure I.10. Exemple de microréacteur sur puce de verre [24]32
Figure I.11. Représentation schématique d'un cymomètre en flux [28]
Figure I.12 (a) Variation de la permittivité de l'eau en fonction de la fréquence (b) Zoom sur les fréquences radio et microondes (courbes tracées pour l'eau à 30°C)
Figure I.13. Diagramme de Cole-Cole pour l'eau déionisée à 30°C37
Figure I.14. (a) Modélisation biologique d'une cellule (b) Modélisation diélectrique équivalent d'une cellule eucaryote avec un modèle double couche (c) Le modèle de sphère homogène [33]
Figure I.15. Evolution de la permittivité complexe des tissus biologiques en fonction de la fréquence : zones de dispersion
Figure I.16. Comparaison entre les propriétés diélectriques de tissus mammaires non tumorales (NT) et tumoral (TT) [38]40
Figure I.17. Circuit électrique équivalent modélisant le comportement diélectrique d'une cellule [41]41
Figure I.18. Une sonde coplanaire en réflexion pour la caractérisation diélectrique de liquides [31]42
Figure I.19. Exemple de caractérisation de tissus biologique à l'aide d'une sonde coaxiale [36]43
Figure I.20. Montage expérimental du guide d'onde rectangulaire utilisé en réflexion pour la caractérisation de liquides [45]
Figure I.21. Câble coaxial pour la caractérisation de liquides en transmission [31]44
Figure I.22. Dispositif mis au point par Toropaine <i>et al.</i> [46] pour la caractérisation diélectrique hyperfréquence de liquides par sonde coaxiale en transmission

Figure I.23. Cavité résonante pour l'analyse hyperfréquence de liquides [31]46
Figure I.24. Dispositif proposé par G.R. Facer basé sur un guide d'onde coplanaire pour la caractérisation diélectrique de liquides [47]47
Figure I.25. (a) Ligne coplanaire à microréservoir développé par Sanghyun Seo <i>et al.</i> (b) Exemple de mesure sur un échantillon de méthanol [48]48
Figure I.26. Capteur développé par J.C. Booth <i>et al.</i> pour la caractérisation diélectrique de liquides dans la bande de fréquences 45MHz -40GHz [49]
Figure I.27. Exemple de dispositif coplanaire couplé à un canal microfluidique pour l'analyse hyperfréquence de liquides biologiques [29]49
Figure I.28. Variation de la capacité en fonction de la fréquence lorsque le capteur est en contact avec de l'eau DI [50]
Figure I.29. Variation de la capacité en fonction de la fréquence pour différents mélanges eau-éthanol [50]
Figure I.30. (a) Le résonateur WGM [52] (b) La cellule de mesure constitué par le résonateur WGM [51]51
Figure I.31. (a) Décalage de la fréquence de résonance f _{liq-air} en fonction de la partie réelle de la permittivité de différents liquides de référence (b) inverse du facteur de qualité du résonateur en fonction de la partie imaginaire de liquides de référence [52]52
Figure I.32. Les parties réelles (bleu) et imaginaires (rouge) de la permittivité de solutions aqueuses présentant différentes concentrations en cytochrome C [52]52
Figure I.33. (a) Schéma du capteur DSSR (b) Photographie du capteur DSSR réalisé avec une structure de microruban [53]53
Figure I.34. (a) Vue en coupe du capteur microfluidique basé sur une structure capacitive 3D avec électrode flottante – (b) Vue de dessus (c) Prototype d'un capteur fabriqué [54]
Figure I.35 (a). Courbes d'étalonnage (b) parties réelles et imaginaires de la permittivité en fonction de la fréquence de 14 MHz à 6,5 GHz mesurées pour l'éthanol et l'éthylène glycol [54]
Figure I.36. (a) Photographie de la puce CMOS et implémentation au fond d'un réservoir plastique (b) Géométrie de la zone de détection du capteur formée par une capacité inter- digitée [55]
Figure I.37. Mesures des parties réelle et imaginaire de V _A /V _B en fonction respectivement de ϵ' et ϵ'' , à 8 GHz [55]
Figure I.38. Comparaison de la partie réelle et imaginaire de la permittivité mesurée pour l'éthanol en fonction de la fréquence avec les valeurs théoriques [55]57
Figure I.39. Photographie du capteur BiCMOS à 120 GHz [56]57
Figure I.40. Photographie du dispositif (a) à vide (canal microfluidique remplie d'air)(b) chargé avec de l'eau [57]
Figure I.41. (a) Les résultats de mesure de la tension détectée à la sortie du capteur pour les

Figure I.42. Principe de détection de biomolécules en utilisant un circuit planaire RF résonant [58]60
Figure I.43. Comparaison du coefficient de réflexion du résonateur à vide, après l'immobilisation de biotines et après fixation de biomolécules d'avidines [58]60
Figure I.44. (a) Exemple de biocapteurs résonants (b) La partie réelle de la permittivité relative extraite comme une signature représentative du type cellulaire
Figure I.45. (a) Contraste capacitif ΔC (b) et contraste de conductance (ΔG) pour différentes concentrations de cellules lymphomes B dans du RPMI+10%SVF pris comme milieu de référence [60]62
Figure I.46. Distribution des cellules de Lymphomes B dans la zone de détection du capteur pour différentes concentrations [60]63
Figure I.47. Schéma de principe du biocapteur RF développé au LAAS– CNRS pour la caractérisation microonde d'une cellule unique [61]64
Figure I.48. Modèle électrique du capteur64
Figure I.49. Contrastes capacitifs du capteur en présence de cellules vivantes individuelles de lymphome B dans leur milieu de culture [61]65
Figure I.50.Comparaison entre les contrastes capacitifs et contrastes de la conductivité obtenus sur une bille de polystyrène et une cellule biologique suspendues dans un milieu de culture cellulaire [59]
Figure I.51. Schéma de principe du capteur interféromètre microondes proposé par Y. Yang [62]66
Figure I.52. (a) Mesures du S ₂₁ du capteur interféromètre pour des particules de latex de diamètres différents (b) Variation de la permittivité mesurée des microbilles de latex caractérisées (courbe verte) [63]67
Figure I.53. Photographie du capteur annulaire muni d'un capillaire de quartz [64]67
Figure I.54. La réponse en transmission sur une large bande du capteur annulaire [64]68
Figure I.55. Paramètres S ₂₁ mesurés et simulés du capteur annulaire en présence de 2 types de microbilles en suspension dans de l'eau DI [64]68
Figure II.1. Comportement d'une onde électromagnétique interagissant avec un matériau diélectrique [1]79
Figure II.2. Admittance d'une capacité : (a) formée par deux armatures et l'air comme diélectrique, (b) formée par deux armatures et un diélectrique
Figure II.3. Représentation schématique de l'architecture du capteur microfluidique (a) vue de dessus – zoom sur la zone capacitive, (b) vue en coupe (échelle arbitraire)
Figure II.4. La structure du canal microfluidique
Figure II.5. Variation du paramètre de transmission S ₂₁ du capteur (canal rempli d'air) sur un substrat de silice fondue de 500µm d'épaisseur84
Figure II.6. Distribution du champ électrique (vue de dessus)85
Figure II.7. Variation du paramètre de transmission S_{21} (courbe rouge) et de réflexion S_{11} (courbe bleue) lorsque le canal microfluidique est rempli d'air (à vide)85
LANDOULSI Alaeddine Thèse de doctorat Université de Limoges 7

Figure II.8. Variation de la capacité globale du capteur à vide
Figure II.9. (a) Evolution de la partie réelle de la permittivité (b) de la partie imaginaire de la permittivité en fonction de la fréquence pour différents milieux aqueux [2-3]
Figure II.10. Variation de la capacité globale du capteur à la présence de différents liquides dans le canal microfluidique
Figure II.11. Evolution de l'écart capacitif ΔC en fonction de la variation de la partie réelle de la permittivité ($\Delta \varepsilon'$) (référence prise par rapport à l'air)
Figure II.12. Variation de la capacité globale du capteur en fonction de la partie réelle de la permittivité des liquides étalons à 2 GHz(a), à 6 GHz(b)90
Figure II.13. Méthode de calcul de la partie réelle de la permittivité par projection sur la courbe d'étalonnage91
Figure II.14. Principe de dépôt par évaporation par faisceau d'électrons [4]93
Figure II.15. Procédé technologique utilisé pour la fabrication du circuit HF
Figure II.16. Banc d'électrolyse de cuivre95
Figure II.17. Photographie du canal microfluidique formé en SU-8 sur les électrodes RF fabriqué dans la salle blanche d'XLIM
Figure II.18. Prototype d'un capteur microfluidique RF fabriqué dans la salle blanche d'XLIM.
Figure II.19. (a) Vue de dessus du support de maintien mécanique (b) Exemple d'un capteur placé dans le support
Figure 20. Architecture du banc de mesures
Figure II.21. Comparaison entre les résultats de simulation (courbe rouge) et mesure (courbe bleu) de S ₂₁ 102
Figure II.22. (a) Sonde coaxiale (Keysight/Agilent, 85070 probe Kit), (b) banc de mesure à sonde coaxiale [5]
Figure II.23. Evolution de la partie réelle de la permittivité des liquides étalons : Comparaison des mesures expérimentales avec la sonde coaxiale (symboles pleins) avec les données reportées dans la littérature (symboles creux)
Figure II.24. Paramètres S de transmission normalisés (S ₂₁) du capteur pour les différents étalons104
Figure II.25. Variation de la capacité en fonction de la permittivité à 1 GHz (courbe rouge) et à 2 GHz (courbe bleue) mesurée avec différents mélanges éthanol/eau104
Figure 26. Comparaison de la partie réelle de la permittivité relative mesurée avec la sonde coaxiale (symboles vides) et avec le capteur développé (symboles pleins)105
Figure II.27. Protocole de mesure suivi pour la détermination de la partie réelle de la permittivité de l'IPA106
Figure II.28. Variation de la capacité globale du capteur en fonction de la partie réelle de la permittivité du liquide (a) à 2 GHz (courbe rouge), (b) à 4 GHz (courbe bleue)107

Figure II.29. Comparaison de la partie réelle de la permittivité relative de l'IPA mesurée avec la sonde coaxiale (carrés verts), avec le capteur microfluidique (carrés bleus) et les données de Debye issues de la littérature (triangles rouges)108
Figure II.30. Comparaison de la partie réelle de la permittivité relative de l'IPA mesurée avec la sonde coaxiale et les données de Debye issues de la littérature (symboles vides) avec un des capteurs microfluidiques dont la capacité de détection présente un gap de 17 µm et 22 µm (symboles pleins)
Figure II.31. Comparaison de la partie réelle de la permittivité relative de l'IPA mesurée avec les capteurs microfluidique (symboles vides) avec les données de Debye issues de la littérature (courbe rouge)
Figure III.1. Schéma 3D de principe du capteur microfluidique116
Figure III.2. Distribution du champ électromagnétique en présence d'eau DI dans le canal microfluidique (a) vue de dessus et (b) vue en coupe118
Figure III.3. Comparaison des paramètres S ₂₁ du capteur avec le canal rempli uniquement d'eau DI et lorsqu'une bille est positionnée au centre du gap (position optimale)
Figure III.4. Variation de capacité mesurée par le capteur lors de la présence d'une bille centrée dans le gap119
Figure III.5. Distribution du champ électrique dans la zone d'analyse lors de la présence d'une bille de polystyrène dans le canal rempli d'eau DI avec : (a) des électrodes épaisses (10 µm), (b) des électrodes fines (0,5 µm)120
Figure III.6. Comparaison du contraste capacitif en fonction de la taille d'une particule placée au centre du gap
Figure III.7. Représentation des différentes positions simulées pour la bille
Figure III.8. (a) Paramètres S21 du capteur chargé par une bille présentant différentes positions, (b) zoom entre 3 et 5 GHz
Figure III.9. Variation de la capacité globale du capteur (fF) en fonction de la fréquence pour les différentes positions d'une bille suspendue dans l'eau DI
Figure III.10. Contraste capacitifs ΔC pour les différentes positions de la bille le long du canal
Figure III.11. Représentation des différentes positions latérales de la bille simulées124
Figure III.12. Contraste capacitifs ΔC pour les différentes positions latérales d'une particule.
Figure III.13. Représentation de différentes altitudes simulées pour la bille125
Figure III.14. Contrastes capacitifs ΔC simulés en fonction de la fréquence pour les différentes altitudes de la bille dans le canal126
Figure III.15. Photographie d'une bille de polystyrène piégée dans la zone de détection128
Figure III.16. Variation de la capacité mesurée lorsqu'une bille de polystyrène est positionnée au niveau de la zone de détection
Figure III.17. Distribution asymétrique des charges électriques sur la surface d'une particule soumise à un champ électrique [3]130

Figure III.18. Electrodes interdigitées : en vert, des particules soumises à la diélectrophorèse négative, en rouge, des particules soumises à la diélectrophorèse positive [6]
Figure III.19. Banc de mesure utilisé pour la spectroscopie diélectrique de cellules biologiques en suspension
Figure III.20. Photographie d'une cellule SW620 vivanteetpiégée dans la zone de détection. 133
Figure III.21. Contraste Capacitif mesuré lors de la présence d'une cellule SW620 dans le gap134
Figure III.22. Evolution du contraste capacitif mesuré en fonction du nombre de cellules présentes dans le gap134
Figure III.23. Contraste capacitif en fonction de la permittivité de la cellule présente dans le gap135
Figure III.24. Comparaison du contraste capacitif pour différentes valeurs de permittivitéde la cellule présente dans le gap136
Figure III.25. Comparaison du contraste capacitif pour différentes valeurs de permittivité de la cellule présente dans le gap137
Figure III.26. Variation de la partie réelle de la permittivité relative d'une cellule SW620 en fonction de la fréquence







Introduction générale







Introduction générale

Ces dernières années, le développement des capteurs permettant l'analyse d'échantillons biologiques, que ce soit un milieu biologique liquide (sang, urines...) ou des particules biologiques (cellules, molécules, ADN...) a connu un intérêt croissant. Dans ce contexte, différentes méthodes de bio-analyse peuvent être utilisées. Ces méthodes se basent sur des techniques de détection pouvant être optiques, mécaniques, chimiques ou encore électriques. Les méthodes optiques ont connu un développement très rapide et montré des performances intéressantes notamment avec la cytométrie en flux qui est aujourd'hui une des techniques de caractérisation les plus utilisées en routine dans les laboratoires de biologie. Néanmoins, ces techniques présentent des inconvénients comme leur complexité de mise en œuvre ainsi que le recours nécessaire à des marqueurs spécifiques. L'utilisation des marqueurs présentent en effet plusieurs inconvénients : (i) temps et coût de préparation des échantillons, (ii) modification potentielle de l'entité à analyser, (iii) remise en cause ou manque de marqueurs spécifiques pour certaines familles de cellules comme les cellules souches. Dans ce contexte, les méthodes basées sur une détection électrique présente une alternative intéressante et complémentaire aux méthodes optiques puisqu'elles ne nécessitent pas le recours à des marqueurs spécifiques. En particulier, la spectroscopie diélectrique microondes apparaît comme une approche très prometteuse, puisque les fréquences de travail permettent de courtcircuiter la membrane cellulaire pour interroger et analyser le contenu intracellulaire.

Le développement croissant des techniques électriques va de pair avec l'évolution des microtechnologies qui offre aujourd'hui des perspectives intéressantes pour le développement de biocapteurs RF miniaturisés permettant d'atteindre des sensibilités capables d'effectuer une analyse à l'échelle de la cellule unique. En parallèle, le développement de la technologie microfluidique a permis d'apporter de nouvelles possibilités et perspectives dans domaine biomédical.

En particulier, l'intégration de fonctionnalités microfluidiques sur des circuits électroniques RF permet de travailler avec des petits volumes d'échantillons circulant dans des canaux de taille micrométrique voir nanométrique. Aussi, l'intégration de réseaux microfluidiques sur des capteurs RF permet d'effectuer des analyses non invasives sur des cellules biologiques en milieu liquide tout en minimisant la perturbation introduite par le liquide sur la réponse RF du dispositif.



Dans ce contexte, les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit concernent le développement et l'optimisation d'un biocapteur microfluidique, basé sur une méthode de détection électrique, capable de fonctionner dans la gamme de fréquences microondes pour l'analyse de liquides ainsi que de solutions cellulaires. Le capteur développé en technologie microruban est basé sur une détection capacitive qui présente l'intérêt majeur d'être large bande (typiquement 400 MHz à 8 GHz dans ces travaux). Le capteur est formé d'une ligne microruban réalisée sur un substrat de silice fondue. Cette ligne présente une discontinuité en son centre formant une capacité en série. Les électrodes métalliques épaisses en or ont été optimisées pour garantir un champ électrique homogène dans la zone de détection et ainsi effectuer des analyses avec une grande sensibilité qui permette de déterminer la partie réelle de la permittivité diélectrique en fonction de la fréquence. Un canal microfluidique en résine SU-8 a été implémenté à la surface du capteur. Son intérêt est double, il permet de travailler avec de très faibles volumes de liquide (de l'ordre de quelques nanolitres) et permet également de guider le liquide et les particules en suspension à analyser, jusqu'à la zone d'analyse du dispositif en limitant au maximum son impact sur les pertes globales du dispositif. Le principe de mesure consiste à suivre en temps réel la variation de la capacité du capteur en fonction des caractéristiques diélectriques du milieu liquide ou de la suspension cellulaire présent dans la zone d'analyse.

Ce manuscrit se décomposera en trois parties. Dans un premier chapitre nous présenterons la technologie microfluidique dans un contexte général à travers ses enjeux et objectifs. Nous décrirons ensuite les différentes techniques utilisées pour la réalisation d'un réseau microfluidique ainsi que les différents domaines d'application. Puis nous présenteront un état de l'art des techniques usuelles de spectroscopie diélectriques sur milieux liquides et particules diélectriques (comme des cellules biologiques). Cela nous permettra de mettre en avant le potentiel de la spectroscopie diélectrique aux fréquences microondes proposée dans le cadre de cette thèse et de fixer les objectifs des performances à atteindre pour le capteur développé.

Dans le chapitre II, nous détaillerons la conception du capteur RF microfluidique optimisé pour l'analyse de très faibles volumes de liquide (de l'ordre de quelques nanolitres) sur une large bande de fréquence de 400 MHz jusqu'à 8 GHz. Dans un premier temps, nous présenterons la structure globale du capteur microfluidique ainsi que les procédés de fabrication utilisés. Nous verrons par la suite les protocoles expérimentaux développés pour mesurer et



caractériser les différents liquides, incluant la phase de calibration du capteur, et les résultats obtenus seront décrits et discutés à la fin de ce deuxième chapitre.

Au cours du dernier chapitre, nous allons étudier la faisabilité d'utiliser de tels capteurs large bande pour l'analyse individuelle de particules diélectriques micrométriques (comme des cellules biologiques) circulant dans les canaux microfluidiques. Pour démontrer l'approche proposée, nous étudierons dans un premier temps la sensibilité du capteur à la présence d'une bille de polystyrène en suspension dans la zone de détection. Nous étudierons aussi l'influence de sa position et de sa taille sur la réponse du capteur par simulations électromagnétiques. Pour finir, nous analyserons les premiers tests de sensibilité réalisés sur des cellules biologiques issues de la lignée cellulaire SW620 (cellules cancéreuses du colon). Les résultats obtenus au niveau des contrastes capacitifs montrent une sensibilité intéressante qui ouvre des perspectives intéressantes en termes de spectroscopie microonde pour la caractérisation non-invasive et en temps réel de cellules biologiques.



Chapitre I : Microfluidique et spectroscopie diélectrique

LANDOULSI Alaeddine| Thèse de doctorat | Université de Limoges|



1. La microfluidique : une science pour la manipulation de petits volumes de liquides

1.1 Qu'est-ce que la microfluidique ?

La microfluidique est une science qui permet la manipulation et l'étude de petites quantités de fluides (de l'ordre de 10⁻⁹ à 10⁻¹⁸ litres) circulant dans des canaux micrométriques. Sa mise en œuvre s'appuie sur le développement mené ces dernières années dans le domaine des microtechnologies qui permettent la réalisation de dispositifs avec des dimensions de l'ordre de quelques dizaines à quelques centaines de micromètres.

Les systèmes microfluidiques sont apparus dans la nature bien avant que l'être humain commence à étudier ce domaine. Par exemple, les arbres utilisent un réseau de millions de capillaires avec des diamètres micrométriques dans lesquels circule la sève qui alimente des milliers de feuilles et ce, de manière homogène. Aussi, nous pouvons citer l'exemple de l'araignée qui contrôle des écoulements micrométriques de protéines pour produire une fibre fine en flux continu afin de tisser sa toile [1].

Les premières applications de la technologie microfluidique ont naturellement concerné l'analyse des fluides, vu qu'elle permet la manipulation de très petits volumes d'échantillons. De plus cette technologie est compatible avec l'intégration de capteurs haute résolution et permet ainsi de développer de véritables laboratoires sur puce [2].

Avant de présenter plus en détail la technologie microfluidique, donnons quelques notions théoriques sur la manipulation de fluides dans des canaux micrométriques.

1.1.1 Les fondements théoriques

Une grande variété de phénomènes physiques peut se produire dans les dispositifs microfluidiques. Ces phénomènes physiques décrivent le comportement avec lequel un fluide se déplace dans un canal microfluidique, que l'on caractérise par le type d'écoulement.

Pour un fluide newtonien, c'est-à-dire dont la viscosité est indépendante de la pression qu'on lui applique, comme par exemple l'eau, le champ de vitesse obéit :

- aux équations de Navier-Stokes, qui sont basées sur la loi fondamentale de la dynamique : $\vec{F} = m \cdot \vec{a}$ [3].

$$\rho(\frac{\partial V}{\partial t} + V \,\vec{\nabla} V) = \vec{\nabla} \, p + \eta \Delta V + f \tag{1.1}$$

18

Où V est la vitesse caractéristique du fluide (m.s⁻¹), p est le champ de pression, f est une force extérieure exercée par unité de volume, ρ la masse volumique du fluide et η sa viscosité dynamique.

à l'équation de conservation de la masse :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \vec{\nabla} \rho V = \vec{0}$$
(1.2)

Qui se simplifie pour un fluide incompressible et donne :

$$\vec{\nabla}V = \vec{0} \tag{1.3}$$

A ce stade, il est nécessaire de quantifier le rapport entre les forces d'inerties et les forces de viscosité. Ceci est fait par l'introduction du nombre de Reynols, défini par l'équation (1.4) pour un canal de diamètre *d*.

$$\operatorname{Re} = \frac{\rho V d}{\eta} \tag{1.4}$$

En général, dans le cas d'écoulements, à l'échelle micrométrique, puisque le diamètre du canal est petit, les écoulements sont gouvernés majoritairement par les contraintes de pression et les contraintes visqueuses. Les forces inertielles sont alors négligeables. D'après l'équation (1.4), le nombre de Reynolds devient donc petit devant 1. Par exemple, dans le cas de l'eau qui s'écoule dans un canal microfluidique circulaire de rayon 100 μ m avec une vitesse de 1 mm/s, le nombre de Reynolds est égal à 0,1.

Dans ces conditions, le terme représentant les forces inertielles $V \overrightarrow{\nabla} V$ devient négligeable devant le terme représentant les forces visqueuses $\eta \Delta V$. Ainsi, en régime stationnaire $\left(\frac{\partial \rho}{\partial t} = 0\right)$, le champ de vitesse stationnaire obéit à l'équation de Stockes :

$$-\Delta p + \eta \Delta V + f = 0 \tag{1.5}$$

Cette équation (1.5) appliquée à un fluide incompressible permet de démontrer que le régime d'écoulement du fluide dans le canal microfluidique correspond à un écoulement laminaire, c'est-à-dire que son profil de vitesse est parabolique avec une vitesse maximale au centre du canal et nulle sur les parois (Figure I.1 (a)). Ce type d'écoulement sera donc caractérisé par un nombre de Reynolds petit devant 1.

Par contre si le nombre de Reynolds est très grand devant 1 (typiquement Re≈2000), l'écoulement devient turbulent. Dans ce cas, le profil de vitesse n'est plus parabolique et présente une brusque variation au voisinage des parois (Figure I.1 (b)). Dans le cadre de ces travaux de thèse, nous travaillerons toujours dans le régime d'écoulement laminaire étant donné les dimensions des canaux microfluidiques ainsi que la nature des fluides utilisés. Ainsi, le profil de vitesse généré permettra aux particules en flux dans le canal microfluidique de suivre principalement une trajectoire rectiligne et d'être localisées majoritairement au centre du canal.



Figure I.1. Les deux différents régimes d'écoulements, (a) écoulement laminaire (Re<1) et (b) écoulement turbulent (Re≈2000).

Outre, le type d'écoulement considéré, un autre paramètre important à définir est la résistance microfluidique R. Elle définit la résistance à l'écoulement dans un canal microfluidique par analogie avec la résistance électrique qui s'oppose au passage du courant électrique. La résistance microfluidique, notée R, est définit comme le rapport entre la perte de charge ΔP et le débit du fluide Q [4].

$$R = \frac{\Delta P}{Q} \tag{1.6}$$

Sachant que R pour un canal de section circulaire de diamètre d et de longueur L est généralement considéré égale à [5] :

$$R_{circulaire} = \frac{128\eta L}{\pi d^4} \tag{1.7}$$

Et pour un canal de section rectangulaire de largeur w, de hauteur h et de longueur L, R est alors égale à :

$$R_{rectangulaire} = \frac{12\eta L}{h^3 w} \tag{1.8}$$

Si on prend l'exemple de l'eau circulant dans un canal rectangulaire de largeur 200 μ m et de hauteur 25 μ m (dimensions de canal typiques sur lesquelles nous allons travailler), la résistance microfluidique est alors de l'ordre de 38.10¹² Pa.s.m⁻³ pour une longueur de canal de 1 cm. Cette valeur de résistance microfluidique permet d'avoir un bon compromis entre la pression à appliquer pour l'injection du fluide dans le canal et la vitesse du liquide dans le canal.



1.1.2 Contrôle des écoulements dans le canal microfluidique

Le fonctionnement d'un dispositif microfluidique nécessite l'injection de fluides et le contrôle de leur écoulement au sein des micro-canaux. Ceci peut se faire de différentes façons. Les pousse-seringues sont depuis très longtemps largement utilisés dans le domaine médical pour l'injection contrôlée de médicaments. Assez naturellement, cet appareil a donc été utilisé pour l'injection de solutions dans des canaux microfluidiques et reste aujourd'hui le plus utilisé. Le pousse-seringue (Figure I.2) permet de contrôler la vitesse d'écoulement du fluide dans un canal microfluidique grâce à un moteur pas à pas qui fait progresser régulièrement le piston d'une seringue connectée au canal par des tubes flexibles. L'écoulement qui en résulte présente un profil de vitesse parabolique comme présenté sur la Figure I.1 (a). Ce type de système est particulièrement bien adapté dans le cas de micro-canaux de section proche du mm². Cependant, comme la progression du piston n'est pas continue, dès lors que les débits deviennent faibles (typiquement inférieurs à quelques μ L/min), il est difficile d'assurer une bonne stabilité du flux. Ce problème peut être minimisé mais au détriment du temps de réponse du système.





Dans le cas des applications que nous visons, il est nécessaire d'assurer un flux stable et continu pour des débits pouvant être très faibles et avec des temps de réponse du système très courts. Dans ce contexte, et pour parer aux inconvénients des pousse-seringues, des systèmes, appelés contrôleur de flux (Figure I.3), ont été développés, commercialisés et sont de plus en plus utilisés dans les laboratoires de recherche. Ils permettent l'application d'une différence de pression bien contrôlée entre l'entrée et la sortie du canal microfluidique. Ce type de système permet donc un équilibrage d'écoulement avec une constante de temps inférieure à une seconde et assure également le maintien d'un flux stable et continu avec une large gamme de débits (du nL/min au mL/min) [7].





Figure I.3. Exemple de contrôleur de flux microfluidique de la société FLUIGENT [8].

Comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, des solutions technologiques peuvent être utilisées pour réduire la quantité de matériel externe nécessaire pour faire fonctionner un dispositif microfluidique et intégrer un certain nombre de fonctions de contrôle d'écoulement directement sur puce.

1.2. Les systèmes microfluidiques

Les avancées en terme de microfabrication et de développement de nouveaux matériaux ont permis l'émergence de différents systèmes microfluidiques qui permettent des fonctions de base comme l'écoulement de liquides ou leur mélange.

Parmi les matériaux les plus couramment utilisés, nous pouvons citer le silicium, le verre mais aussi les matériaux de type polymères comme la résine SU-8 ou le polydiméthylsiloxane (PDMS). Notons que le choix du matériau pour la fabrication des microsystèmes dépend essentiellement de la géométrie, des dimensions des structures et de l'application envisagée pour le système.

Dans cette partie, nous allons présenter les méthodes de fabrication principales utilisées pour la réalisation de systèmes microfluidiques, puis nous verrons quelques exemples particulièrement pertinents des possibilités offertes par cette technologie.

1.2.1 Les techniques de fabrication

Les méthodes standards pour la fabrication des dispositifs microfluidiques sont héritées de l'industrie microélectronique. Historiquement, la technologie microfluidique est dérivée des technologies MEMS (Micro-Electro-Mechanical Systems). Apparues dans les années 90, les méthodes de gravure profonde, sur des substrats de silicium ou du verre, associées aux techniques de collage, ont permis d'envisager la réalisation de micro-canaux fermés par un



capot. Rapidement, des techniques de moulage et d'impression à base de polymères sont apparues et sont aujourd'hui largement utilisées dans les laboratoires de recherche.

Dans la partie suivante, nous allons présenter ces techniques de fabrication, en commençant par la technologie de fabrication sur des substrats en verre.

1.2.1.1 Réalisation de canaux microfluidiques en verre

Le verre est un matériau présentant de nombreux avantages pour la microfluidique. Parmi ces avantages on trouve :

- ✤ La transparence optique
- ✤ La biocompatibilité
- ✤ La stabilité chimique pour la manipulation de produits chimiques agressifs
- ✤ La bonne résistance à la chaleur pour des applications à des températures élevées
- C'est un bon isolant électrique.

Le procédé de fabrication des canaux microfluidiques en verre se base sur la technique de photolithographie et la gravure humide et se fait en différentes étapes [9-10].

Une fois le substrat de verre nettoyé et revêtu avec une résine sensible marquant la zone à graver sur le substrat de verre, il est immergé dans la solution de gravure. Différentes solutions à base de fluorure d'hydrogène (HF), différents temps de gravure ainsi que plusieurs types d'agitation peuvent être utilisés. Après gravure, les substrats sont rincés à l'eau déionisée et la résine est généralement éliminée avec de l'acétone (Figure I.4).

Après la fabrication des micro-canaux, le système doit être assemblé, enfermant les réseaux de canaux ou microstructures pour permettre la circulation des fluides à travers le dispositif. La technique la plus utilisée pour fermer les micro-canaux, est de sceller un autre substrat de verre, qui a le même coefficient d'expansion thermique, avec le substrat gravé en utilisant la méthode de diffusion thermique [11]. Pour cela les deux substrats de verres doivent être maintenus en contact avec une forte pression pendant que la température est amenée jusqu'à la température de transition vitreuse du verre (de l'ordre de 675°C). Avec cette technique on peut obtenir une liaison parfaitement étanche entre les deux substrats et un bon maintien lorsque de fortes pressions seront appliquées dans le canal microfluidique.







Néanmoins les techniques pour la fabrication de microcanaux en verre restent couteuses et complexes du point de vue de la fabrication. Une bonne alternative réside dans les méthodes de fabrication à base de polymères.



1.2.1.2 Réalisation de canaux microfluidiques à partir de polymères

Les polymères organiques sont particulièrement intéressants pour la fabrication de systèmes microfluidiques. Ces matériaux présentent en effet l'avantage d'être transparents, biocompatibles, perméables aux gaz et sont donc tout à fait appropriés pour des applications biologiques. Le moulage et l'impression sont les technologies les plus couramment utilisées pour fabriquer des microstructures en polymères. Le groupe de Georges Whiteside a été à l'origine du développement d'un ensemble de méthodes pour le prototypage rapide de dispositifs microfluidiques [12]. Ils ont été parmi les 1^{ers} à fabriquer des dispositifs microfluidiques à partir d'élastomères silicones comme le PDMS.

La réalisation d'un canal microfluidique en PDMS se fait en deux étapes : la préparation du moule puis l'impression sur le PDMS. La Figure I.5 illustre les étapes de cette réalisation. En premier lieu, une empreinte représentant la forme du canal microfluidique est préparée. Cette empreinte est réalisée avec une résine photosensible, de type SU-8 avec une épaisseur qui peut atteindre plusieurs centaines de µm [13]. L'empreinte est ensuite mise en présence de vapeur d'hexamethyl-dichloro-silane (HDMS) pour la recouvrir d'une couche moléculaire qui va faciliter par la suite le démoulage du PDMS. Ensuite le mélange du PDMS, formé par le polymère et une solution de réticulant, est versé pour recouvrir l'empreinte, avant d'être placé dans une étuve. Une fois que le mélange de PDMS est polymérisé, il sera décollé et le moule laisse son empreinte sur la pièce de PDMS. Cette pièce est ensuite percée pour former les réservoirs qui permettent la connexion entre les canaux et un dispositif de contrôle de flux via des tuyaux souples de petit diamètre. Enfin, cette pièce de PDMS et une lamelle de verre sont exposées à un plasma d'oxygène qui va fonctionnaliser la surface en formant des groupements de SiO₂ ainsi que des fonctions silanols Si-OH sur les surfaces des deux pièces. Les surfaces exposées sont rapidement mises en contact pour créer des liaisons covalentes qui réalisent les conditions d'un collage permanent [14-15].







Cette méthode de fabrication microfluidique est souvent utilisée pour des prototypages rapides puisqu'elle offre une possibilité de fabrication facile et à faibles coûts.

Une seconde approche consiste à utiliser la résine époxy SU-8 pour la fabrication des canaux microfluidiques. Le polymère SU-8 est biocompatible, inerte une fois polymérisé et transparent. Il présente donc de nombreux avantages pour l'élaboration des canaux microfluidiques directement sur la surface du substrat, définis par photolithographie. Ce procédé se fait en plusieurs étapes. La première étape consiste à déposer la résine au centre du substrat et à l'étaler à l'aide d'une tournette. L'épaisseur de la résine sur le substrat est contrôlée par la vitesse de rotation du substrat. Ensuite la couche de résine est précuite sur une plaque chauffante pour évaporer les solvants piégés dans la résine. Une fois que la résine est revenue à la température ambiante, le substrat est exposé avec une source lumineuse UV à travers un masque qui définit la structure désirée. La durée d'exposition dépend de l'épaisseur de la résine, de la puissance et de la longueur d'onde de la lampe utilisée. Après l'insolation, le substrat est à nouveau recuit. En fin une étape de développement permet d'enlever la partie de résine qui n'a pas été exposée à la lumière UV [16-17].



Conventionnellement, le PDMS est utilisé pour fermer le canal en SU-8. Le scellement des deux parties ne peut passe faire, à notre connaissance, avec un simple plasma d'oxygène comme dans le cas du collage PDMS/Verre. Il est nécessaire de faire subir un traitement chimique à l'une ou l'autre des surfaces de PDMS et de SU-8 pour leur scellement. Une méthode relativement simple et efficace consiste à silaniser la SU-8 ou le PDMS. Il existe deux méthodes principales qui utilisent soit un plasma d'azote [16] ou un plasma d'oxygène [18]. L'objectif de ces deux méthodes est d'activer les surfaces de SU-8 et de PDMS pour favoriser des liaisons moléculaires fortes entre ces deux matériaux. Dans le cadre de ces travaux de thèse, la méthode de collage utilisant un plasma d'oxygène sera utilisée. Cette méthode consiste dans un premier temps à ouvrir les ponts époxy présents à la surface de la SU-8 à l'aide d'un traitement de plasma O₂. Puis, la SU-8 est plongée dans un mélange d'APTMS/méthanol pour former des groupements de Si-O-CH₃ libres sur la surface de la SU-8. Ensuite, un plasma O₂ est réalisé à la fois sur la SU-8 silanisée et le PDMS pour ouvrir les groupements Si-OH sur les deux surfaces. Les deux pièces sont ensuite mises en contact pour créer des liaisons covalentes qui provoquent un collage irréversible entre les deux matériaux.

La Figure I.6 montre un prototype de collage d'un capot de PDMS sur une couche de SU-8 pour former des canaux microfluidiques. La liaison entre PDMS et SU-8 est restée intacte même après que les dispositifs scellés aient été trempés dans l'eau pendant de nombreux mois [16].



Figure I.6. Des canaux rectilignes en SU-8 fabriqués sur un substrat de silicium et scellés en utilisant un morceau de PDMS activé avec un plasma d'azote [16].

Outre les avantages que nous avons déjà cités (essentiellement biocompatibilité et transparence), on peut ajouter la bonne tenue mécanique et la bonne résistance chimique du PDMS et de la SU-8. Par contre, la méthode de fabrication avec le PDMS est beaucoup plus simple que la méthode de fabrication avec la SU-8, puisqu'elle ne nécessite pas une étape de traitement chimique de surface pour coller le PDMS sur le verre. Cependant, l'utilisation de la SU-8 présente un réel avantage lorsqu'une précision d'alignement du canal microfluidique avec



d'autres éléments (comme des électrodes), est nécessaire. Cette précision sera assurée par l'étape de photolithographie de la SU-8 sur la puce. Dans notre cas, cette méthode sera la plus adaptée.

De plus, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, le développement de ces techniques à base de polymères souples et déformables va de pair avec l'intégration d'un grand nombre de fonctions au sein des systèmes microfluidiques.

1.2.2 Quelques exemples de systèmes/fonctions microfluidiques de base

Un exemple typique des potentialités des technologies microfluidiques a été montré, dès les années 2000, avec la réalisation de micro-vannes et micro-pompes qui permettent l'intégration sur puces de fonctions de contrôle d'écoulement [19]. En effet, une micro-vanne permet de contrôler l'acheminement et la séparation des fluides dans un dispositif microfluidique. L'association de plusieurs micro-vannes permet le développement de micro-pompes par création d'effets péristaltiques au sein des canaux. Ces micro-pompes permettent de générer des déplacements de fluides au sein des canaux et donc de réduire l'encombrement externe des expériences microfluidiques.

1.2.2.1 Les micro-vannes

Les micro-vannes permettent à l'utilisateur de contrôler l'écoulement de fluide dans un canal microfluidique en faisant varier la forme d'une partie de la structure microfluidique. Les micro-vannes peuvent être actionnées d'une manière pneumatique, mécanique, électrocinétique, ou par introduction d'une force externe.

Les micro-vannes pneumatiques, introduites par le groupe de Stephen Quake en 2000 [19] sont devenues l'une des architectures de vannes les plus courantes. Elles utilisent généralement la déviation d'une membrane en PDMS pour interrompre la circulation du fluide. Une pression pneumatique est appliquée à la membrane de PDMS via un canal dédié appelé «ligne de commande» ou «canal de contrôle». La raison de leur popularité est liée au fait qu'elles peuvent être facilement intégrées aux procédés de lithographie standards utilisés dans la plupart des laboratoires de recherche.

Les micro-vannes de Quake sont constituées d'un canal de commande qui chevauche le trajet d'un canal d'écoulement, séparés par une membrane qui a typiquement une épaisseur variant de 5 à 15 μ m (Figure I.7 (a)). La conception d'origine était une micro-vanne de poussée vers le bas où une section transversale rectangulaire est située au-dessus d'un canal

d'écoulement semi-circulaire en coupe transversale et qui pénètre dans le canal d'écoulement pour couper l'écoulement. Une deuxième génération de la vanne de Quake utilise une conception de poussée vers le haut, où un canal de commande rectangulaire est placé en dessous d'un canal d'écoulement semi-circulaire. Dans la conception de poussée vers le haut, le canal de commande gonfle une membrane plane pour former une bosse hémisphérique qui ferme le canal d'écoulement semi-circulaire au-dessus [19]. L'inconvénient potentiel de la conception de Quake est qu'elle engendre des difficultés en matière d'imagerie. Le canal semi-circulaire produit une interface arrondie qui agit comme une lentille et rend l'observation un peu compliquée. Pour éviter ce problème, le canal microfluidique semi-circulaire peut être remplacé par un canal rectangulaire.



Figure I.7. (a) La micro-vanne de Quake (b) Un schéma 3D d'une pompe [19].

1.2.2.2 Les micro-pompes

Comme les micro-vannes, les micro-pompes sont des éléments essentiels pour contrôler et moduler l'écoulement du fluide dans les réseaux microfluidiques. Les micro-pompes peuvent généralement être classées en deux catégories : active et passive. Le pompage de fluide dans des canaux d'écoulement semi-circulaires (en utilisant les vannes de Quake mentionnés cidessus) a été décrit pour la première fois en 2000 par Unger *et al.* La pompe se compose de trois vannes pneumatiques en ligne avec des lignes de commande individuelles comme le montre la Figure I.7 (b) [19]. L'inconvénient de ce type de micro-pompes, est qu'elles présentent des risques de fuites puisque les canaux de contrôle des vannes n'arrivent pas à bien fermer le canal semi circulaire d'écoulement des fluides.

Pour éviter les problèmes de fuites et l'écoulement de liquide non désiré vers l'arrière, Jeong *et al.* [20] ont développé une micro-pompe à commande pneumatique en PDMS qui est constituée de trois actionneurs circulaires en série et un canal microfluidique reliant les deux réservoirs d'entrée et de sortie comme le montre la Figure I.8 (a). Une nouvelle structure



d'actionneur a été conçue et fabriquée à partir de trois couches de PDMS (Figure I.8 (b)). Deux couches épaisses et rigides sont utilisées pour former les chambres d'actionnement ainsi que la structure du canal microfluidique et une couche mince et souple de PDMS pour former la membrane de l'actionneur. Si la force pneumatique de l'actionneur est suffisante, la membrane de l'actionneur est complètement gonflée dans la chambre d'actionnement et donc le fluide est bien confiné.



Figure I.8. (a) Micro-pompe à commande pneumatique (b) Structure de l'actionneur pneumatique pour la micro-pompe pneumatique [20]

Les micro-pompes à base de matériaux piézo-électriques sont aussi largement utilisées car elles présentent de bonnes performances en termes de temps de réponse. Elles tirent profit de la faculté de certains matériaux piézo-électriques à se déformer de façon importante sous l'action d'un champ électrique. Ainsi, une force générée par les matériaux piézo-électriques, couplée à une membrane mince, peut être utilisée pour pomper des liquides. Par exemple, nous pouvons citer la micro-pompe piézoélectrique développée par Tracey *et al.* [21], où une céramique piézoélectrique en PZT (Titano-Zirconate de Plomb) a été utilisée en tant qu'actionneur. La Figure I.9 montre le principe de fonctionnement d'une micro-pompe avec actionneur piézoélectrique en configuration de contraintes latérales. Un disque de PZT est fixé sur la surface extérieure de la membrane. Lorsqu'une tension $\pm V$ est appliquée, le disque piézoélectrique force la membrane à se déformer (vers l'intérieur ou l'extérieur de la chambre microfluidique) et change ainsi le volume de la chambre. Ces types de pompes sont également utilisés dans les têtes d'impression jet d'encre [22].



Chapitre I : Microfluidique et spectroscopie diélectrique



Figure I.9. Principe de fonctionnement d'une micro-pompe avec actionneur piézoélectrique en configuration de contraintes latérales [21].

Nous allons à présent introduire la grande variété d'applications qu'offrent les systèmes microfluidiques.

1.3 Quelques grands domaines d'applications des systèmes microfluidiques

Ces dernières années, le développement des techniques de micro-fabrication a permis de faire émerger la microfluidique comme une solution pertinente pour répondre aux défis actuels dans de nombreux domaines. La microfluidique apporte de nombreux avantages essentiellement parce qu'elle permet de réduire drastiquement les volumes d'analyse (typiquement quelques nanolitres de solution sont suffisants). Cette réduction d'échelle est fondamentale car elle permet d'amplifier les sensibilités de détection et d'augmenter les cinétiques de réactions et donc de gagner du temps pour réaliser une analyse [2]. Sans compter que certaines solutions peuvent être coûteuses ou difficiles à produire en grande quantité. D'autre part, les systèmes microfluidiques permettent d'intégrer sur une même puce différentes fonctions (purification, quantification, tri...) et ont donc grandement contribués au développement du concept de laboratoires sur puce ou Lab-on-Chip.

Les premiers systèmes microfluidiques sont donc apparus dans le domaine de la chimie pour l'analyse. Dès les années 1990, Manz *et al.* [23] proposent un concept de micro Total Analysis System (microTAS) pour la chromatographie où les mesures d'absorption sont réalisées sur des volumes de l'ordre de la dizaine de nL. S'en suit le développement sur puce de microréacteurs [24] permettant, à l'échelle micrométrique, la réalisation et le contrôle de réactions de synthèse organique, pour des études de réactivité. Le principe est de pomper deux réactifs à un certain débit dans des micro-canaux qui se rejoignent dans une zone appelée zone de mélange ou zone de réaction chimique au sein de laquelle les fluides entrent en contact (Figure I.10). Dans cette zone de mélange, les réactifs réagissent ensemble puis les mélanges sont analysés en sortie. L'intérêt majeur de la microfluidique pour les microréacteurs réside sur le rapport surface/volume qui est élevé et qui conduit à une plus large surface d'échanges entre les fluides. Un autre exemple dans le domaine de la chimie est d'ordre analytique pour des applications environnementales, avec l'analyse sur site d'échantillons environnementaux en vue de la détermination de teneurs en polluants ou en produits toxiques. Egalement le potentiel des systèmes microfluidiques intéresse fortement le secteur militaire pour le développement de capteurs capables de détecter les menaces des armes chimiques et biologiques.



Figure I.10. Exemple de microréacteur sur puce de verre [24].

Un autre domaine qui a grandement motivé le développement des systèmes microfluidiques est celui des sciences du vivant et plus particulièrement les problématiques liées à la protéomique et la génomique. Les avancées faites sur les microTAS pour l'analyse chimique ont naturellement conduit vers la biologie moléculaire qui requiert elle aussi des méthodes analytiques avec toujours plus de débit et de résolution. Dans ce contexte, la microfluidique a permis le développement d'outils par exemple pour le séquençage de l'ADN haut débit [25]. Par la suite, les applications biologiques se sont étendues à l'étude des cellules biologiques. En effet, les développements technologiques associés à l'utilisation de matériaux polymères souples comme le PDMS qui sont totalement biocompatibles et bien adaptés à une observation microscopique, ont conduit au développement d'outils d'analyse cellulaire. Les systèmes microfluidiques apportent dans ce domaine les mêmes intérêts que ceux cités précédemment à savoir une réduction des volumes d'analyse combinée à une miniaturisation des capteurs à l'échelle des espèces cibles pour obtenir une sensibilité plus élevée, et une analyse rapide des échantillons. Cette étape est fondamentale car elle permet d'accéder à l'analyse à l'échelle de la cellule unique [26].

Parmi les méthodes de détection les plus matures et les plus utilisées pour l'analyse cellulaire, on trouve le cytométrie en flux [27-28]. Cette technique est largement utilisée dans les laboratoires de biologie pour l'analyse et le tri cellulaire. Les cytomètres sont basés sur



l'analyse de signaux optiques émis par une cellule située au milieu du faisceau lumineux d'un laser par exemple. À partir des signaux optiques mesurés, les propriétés optiques intrinsèques des cellules peuvent être extraites. Comme le montre la Figure I.11, le cytomètre de flux se compose essentiellement de trois parties :

- Une partie qui se compose d'un réseau microfluidique formé par une gaine liquide d'entraînement dans laquelle un liquide s'écoulant à vitesse constante, entraîne et focalise un deuxième flux liquide contenant les suspensions cellulaires.
- La deuxième partie est constituée d'un banc optique avec une ou plusieurs sources lumineuses et ses détecteurs de type photodiode (pour la diffusion de la lumière) et des photomultiplicateurs et filtres optiques qui permettent de quantifier les diverses fluorescences émises par chaque objet.
- La troisième partie est formée par un microprocesseur pour convertir les signaux électriques en signaux numériques et les analyser.



Figure I.11. Représentation schématique d'un cymomètre en flux [28].

Cependant, la cytométrie nécessite le marquage des entités à analyser à l'aide de fluorochromes, qui peuvent modifier les cellules et donc conduire à des analyses erronées ou modifiées. Ainsi, le développement de nouveaux outils d'analyse cellulaire qui ne nécessitent pas de marquage des cellules constitue de nouveaux challenges pour les chercheurs. Parmi ces nouvelles voies de recherches, les méthodes de détection électrique et notamment la spectroscopie diélectrique hyperfréquence est un bon candidat [29]. Cette technique se base sur l'étude des interactions entre l'objet à analyser et les ondes électromagnétiques. En particulier, les ondes hyperfréquences sont particulièrement pertinentes car les longueurs d'onde misent en jeux permettent de miniaturiser les capteurs pour travailler à l'échelle de l'échantillon à



analyser. De plus, comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants, à ces fréquences, interviennent majoritairement des phénomènes de relaxation des molécules d'eau, ce qui rend ces fréquences intéressantes pour étudier les propriétés des liquides polaires mais aussi celles des cellules biologiques dont la teneur en eau peut renseigner sur leur état pathologique [30-31].

2. Caractérisation microondes de liquides – Applications à l'analyse cellulaire

Un matériau est considéré comme «diélectrique» lorsqu'il est capable de stocker de l'énergie électromagnétique quand il est exposé à un champ électrique externe. Ces matériaux diélectriques, comme l'air, la matière inorganique, les solutions aqueuses ou encore la matière organique/biologique, sont caractérisés par leurs propriétés diélectriques. Ces propriétés sont représentatives des interactions entre la matière et le champ électromagnétique. L'étude des propriétés diélectriques d'un matériau en fonction de la fréquence est couramment appelée spectroscopie diélectrique et se fait principalement par la mesure de la permittivité relative complexe du matériau, définie par l'équation (1.9).

$$\varepsilon_r^* = \varepsilon' - j\varepsilon'' \tag{1.9}$$

Où ε' est la partie réelle de la permittivité relative. Elle représente la capacité d'un matériau à se polariser sous l'effet d'un champ électrique. ε'' est la partie imaginaire de la permittivité, liée aux pertes diélectriques autrement dit à l'atténuation générée par le matériau sur l'onde qui le traverse. On représente également l'effet de ces pertes par la tangente de pertes (tan δ) du matériau. Elle se définie comme le rapport de la partie imaginaire de sa permittivité sur sa partie réelle (1.10).

$$tan\delta = \frac{\varepsilon''}{\varepsilon'} \tag{1.10}$$

Ainsi la permittivité complexe d'un matériau évolue en fonction de la fréquence du champ électromagnétique qui lui est appliqué. En effet, la courbe représentant l'évolution de la permittivité en fonction de la fréquence représente en quelque sorte la signature électromagnétique du matériau. C'est donc l'obtention de cette signature aux fréquences microondes qui va nous intéresser comme nous allons le voir par la suite.


2.1 Interaction onde/liquide

Comme nous venons de le voir, l'étude de l'interaction entre les ondes électromagnétiques et les molécules constituant un liquide permet de déduire les propriétés diélectriques de ce liquide. Pour les liquides dits «polaires», les molécules ont des moments dipolaires permanents, et leur permittivité diélectrique, dans le spectre radiofréquence et microonde, varie fortement, typiquement jusqu'à 100. Les pertes diélectriques associées sont généralement élevées, avec une tanô pouvant varier de 0,1 à 1. En revanche, les liquides apolaires ont une permittivité diélectrique bien plus faible (typiquement 2-3) qui varie très peu en fonction de la fréquence. Ils ont aussi de faibles pertes diélectriques, avec une tanô généralement inférieure à 0,001 [32]. Les grandes différences de permittivité et de tangente de perte entre les liquides polaires et non polaires nécessitent l'utilisation de techniques de mesure différentes pour les deux types de liquides. Dans notre travail nous allons nous focaliser sur les liquides polaires. Ces liquides sont intéressants à étudier car (i) ils présentent une forte variation de la permittivité en fonction de la fréquence et (ii) sont représentatifs des solutions biologiques qui sont des solutions polaires.

Comme nous l'avons dit précédemment les propriétés diélectriques des liquides polaires évoluent fortement en fonction de la fréquence. En effet, l'application d'un champ électrique local au liquide polaire entraîne la création d'un moment qui tend à aligner les dipôles avec le champ électrique. L'orientation des molécules polaires dans un champ électrique ne se produit pas instantanément, et la constante de temps associée est appelée temps de relaxation τ_R . Le temps de relaxation τ_R est défini comme le temps nécessaire pour que le liquide retrouve un nouvel équilibre. Il en résulte dans le domaine fréquentiel le phénomène de dispersion diélectrique, i.e.une forte variation des propriétés diélectriques du liquide en fonction de la fréquence (Figure I.12 (a)). Le temps de relaxation transposé dans le domaine fréquentiel donne accès à la fréquence caractéristique notée f_c , fréquence à laquelle la permittivité atteint sa valeur moyenne lors de la transition entre deux paliers sur la courbe de dispersion (Figure I.12 (b)). La fréquence caractéristique est inversement proportionnelle au temps de relaxation (1.11).

$$f_c = \frac{1}{2\pi\tau_R} \tag{1.11}$$

Cette dépendance en fréquence des propriétés diélectriques des liquides polaires a été largement étudiée et modélisée. En particulier, dans le cas le plus simple d'un milieu avec un



mécanisme de relaxation unique, le modèle de Debye permet d'exprimer la permittivité complexe du liquide en fonction de la fréquence (1.12).

$$\varepsilon^{*}(\omega) = \varepsilon'_{\infty} + \frac{\varepsilon'_{s} - \varepsilon'_{\infty}}{1 + j\omega\tau_{R}} \qquad \text{et } \omega = 2\pi f \qquad (1.12)$$

Où ε'_{s} correspond à la permittivité statique (aux très basses fréquences) et ε'_{∞} est la permittivité aux très hautes fréquences.

Prenons un exemple avec de l'eau déionisée (DI) à 30°C, liquide pour lequel ce modèle est particulièrement bien approprié. Les valeurs du modèle de Debye sont présentées dans le tableau 1.1 et ont permis à partir de l'équation (1.12) de tracer la courbe de relaxation de la Figure I.12 (b). Sur cette figure, on voit que la partie réelle de la permittivité ε' varie brusquement entre deux paliers (à 76,47 pour les basses fréquences et à 4,9 pour les hautes fréquences) et passe par une transition autour de la fréquence caractéristique de 20 GHz. En parallèle, on peut voir que la partie imaginaire de la permittivité ε'' présente logiquement un maximum à la fréquence caractéristique c'est-à-dire au moment où se produit la relaxation.





Il est très courant de représenter l'équation de Debye dans le plan complexe en traçant la partie imaginaire de la permittivité en fonction de sa partie réelle comme le montre la Figure I.13.





Figure I.13. Diagramme de Cole-Cole pour l'eau déionisée à 30°C.

Dans le cas d'un matériau qui a une seule fréquence de relaxation (type Debye), cette représentation apparaîtra comme un demi-cercle de rayon égal à $\frac{\varepsilon'_S + \varepsilon'_{\infty}}{2}$ centré en $\frac{1}{\tau_R}$.

Ce modèle s'applique à un grand nombre de liquides polaires, mais reste valable que pour des milieux à un temps de relaxation unique. Toutefois, dans les milieux inhomogènes, il n'est pas rare de trouver non pas un temps de relaxation mais une distribution des constantes de temps. C'est pour cela que le modèle Cole-Cole a été introduit (1.13).

$$\varepsilon^{*}(\omega) = \varepsilon'_{\infty} + \frac{\varepsilon'_{s} - \varepsilon'_{\infty}}{\left(1 + j\omega\tau_{R}\right)^{(1-\alpha)}}$$
(1.13)

Où α est un paramètre qui permet d'ajuster la largeur de la dispersion. Lorsque $\alpha = 0$, on retrouve l'équation de Debye.

2.2 Applications à la caractérisation d'échantillons biologiques

Une cellule biologique, peut être modélisée en première approximation par une sphère homogène, définie par sa permittivité ε et sa conductivité σ (comme le montre la Figure I.14). Elle se polarise donc en réponse à un champ électrique.





Figure I.14. (a) Modélisation biologique d'une cellule (b) Modélisation diélectrique équivalent d'une cellule eucaryote avec un modèle double couche (c) Le modèle de sphère homogène [33].

Lorsque l'on considère des échantillons biologiques, de par l'existence de la membrane cellulaire, d'autres phénomènes de relaxation interviennent. Comme le montre la Figure I.15, la partie réelle de la permittivité ε ' diminue en plusieurs étapes distinctes lorsque la fréquence augmente ce qui correspond aux différentes zones de dispersion dont l'origine s'explique par divers mécanismes qui dépendent des fréquences d'excitation.



Figure I.15. Evolution de la permittivité complexe des tissus biologiques en fonction de la fréquence : zones de dispersion

Le premier domaine de dispersion, appelé α , apparait entre 10Hz et 0,1KHz. Ce domaine de dispersion est en fait associé à un processus de diffusion ionique au niveau de la membrane cellulaire. Pour décrire ce phénomène de dispersion, Schwartz [34] a considéré le cas où des contre-ions sont libres et se déplacent sur la surface d'une particule diélectrique. Lorsqu'un champ électromagnétique est appliqué, les contrions vont se déplacer relativement vite par rapport à la particule diélectrique entraînant la polarisation du système.

Le second domaine de dispersion est le domaine β (de 0,1 MHz à 10 MHz) lié à des effets de polarisation de la membrane cellulaire. Ce phénomène de polarisation interfaciale est

connu sous le nom d'effet Maxwell-Wagner [35] lorsque le courant électrique doit passer une interface entre deux diélectriques différents. Aux basses fréquences les charges ont le temps de s'accumuler aux frontières des régions conductrices. À des fréquences plus élevées, les charges n'ont pas le temps de s'accumuler et la polarisation ne se produit pas puisque le déplacement de la charge est faible par rapport aux dimensions de la région conductrice.

Dans le domaine des fréquences microondes se trouve la dispersion γ liée aux effets de polarisation dipolaire d'orientation basés sur le phénomène de relaxation des molécules polaires (molécules d'eau et de nombreuses protéines par exemple) dont nous avons déjà discuté dans le paragraphe précédent.

Au-delà, dans le domaine Terahertz, d'autres mécanismes apparaissent. Ils sont essentiellement basés sur des mécanismes vibrationnels avec une polarisation électronique qui résulte du déplacement des orbites électroniques externes par rapport au noyau de l'atome. Le dernier domaine de dispersion qui apparaît pour les fréquences optiques est quant à lui lié à une polarisation atomique résultant du déplacement des atomes liés par des liaisons ioniques.

En termes de détection et d'analyse de liquides ou d'échantillons biologiques, il est plus intéressant de développer des capteurs opérant à des fréquences situées dans les zones de dispersion, là où les propriétés diélectriques varient fortement en fonction de la fréquence, assurant la mesure de paramètres plus pertinents.

En particulier, les cellules biologiques étant à 80 % constituées d'eau, les fréquences microondes, pour lesquelles nous venons de voir qu'il existait un phénomène de dispersion dû à la relaxation des molécules d'eau, semblent particulièrement appropriées. En effet, dans les années 1990, les travaux de Schwan et Gabriel [34-36], qui consistaient à étudier les propriétés diélectriques de différents tissus jusqu'au domaine des fréquences microondes à l'aide d'une sonde coaxiale, ont montré que la permittivité et la conductivité varient fortement d'un tissu à un autre. Aussi les travaux de Gabriel ont amené à montrer que la permittivité et la conductivité de cellules cancéreuses sont supérieures à celles de cellules saines. Dans les travaux de Ann P O'Rourke *et al.* [37], une comparaison entre les propriétés diélectriques de tissus de foie humain a été présentée à deux fréquences discrètes (915 MHz et 2,45 GHz). Aussi, les travaux de Usman Khan *et al.* [38], ont montré la variation des propriétés diélectriques entre un tissu mammaire sain et pathogène confirmant les grandes potentialités de l'utilisation des ondes électromagnétiques pour la discrimination cellulaire et les applications diagnostiques (Figure I.16).





Figure I.16. Comparaison entre les propriétés diélectriques de tissus mammaires non tumorales (NT) et tumoral (TT) [38].

Dans le même temps, et pour comprendre la dépendance fréquentielle des propriétés diélectriques, plusieurs chercheurs ont proposé des modèles électriques équivalents pour décrire les propriétés physiques des cellules biologiques [39]. La Figure I.17 présente un circuit électrique équivalent qui décrit les caractéristiques diélectriques des deux principaux compartiments de la cellule : la membrane et le milieu intracellulaire ou cytoplasme.

Dans ce modèle, la membrane cellulaire est assimilable à une capacité C_{mem} combinée en parallèle avec une résistance R_{mem} . Aux fréquences radio et microondes, la résistance R_{mem} est court-circuitée puis que la capacité C_{mem} présente une impédance $\frac{1}{jC_{mem}\omega}$ très faible. En revanche, Höber [40] a montré qu'en basses fréquences (typiquement en-dessous de la centaine de MHz), la membrane cellulaire ne laisse pas pénétrer le signal à l'intérieur de la cellule puisque la capacité C_{mem} se comporte alors comme un circuit ouvert. D'autre part, l'association série de R_{int} et C_{int} reflète l'influence du milieu intracellulaire aux hautes fréquences, tandis qu'aux basses fréquences le milieu est dominé par la conductivité ionique du cytoplasme modélisée par R_{io} . Pour le milieu extérieur, il est ici représenté par une résistance R_{ext} associée en parallèle avec une capacité C_{ext} en série avec une résistance R_{die} . Cette dernière représente les pertes diélectriques du milieu [41].





Figure I.17. Circuit électrique équivalent modélisant le comportement diélectrique d'une cellule [41].

Comme nous l'avons vu dans ce paragraphe, dans la gamme des fréquences microondes, le phénomène de dispersion est dû principalement au mécanisme de relaxation des molécules d'eau. Ainsi, les propriétés diélectriques mesurées sur une solution seront fortement liées à leur teneur en eau. Dans ce contexte, l'utilisation des fréquences radio et microondes pour la caractérisation de solutions polaires et d'échantillons biologiques paraît très prometteuse et fait l'objet, comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant, de développements d'outils hyperfréquences adaptés.

3. Méthodes hyperfréquences pour la caractérisation de liquides polaires

De manière générale, la caractérisation diélectrique de matériaux dans la gamme radio et hyperfréquences s'appuie sur différents types de techniques. Dans cette partie, nous allons nous focaliser sur quelques-unes de ces techniques qui ont été spécifiquement mises en œuvre pour la caractérisation de liquides.

Ces techniques de mesure peuvent se classer en trois catégories principales.

- Les techniques de caractérisation en réflexion
- Les techniques de caractérisation en transmission
- Les techniques de caractérisation basées sur des structures résonantes



3.1 Les techniques de caractérisation en réflexion

3.1.1 Mesures en guide coaxial

Parmi les techniques de mesure en réflexion, la méthode la plus répandue pour l'analyse de liquides consiste à utiliser une sonde coaxiale. Cette popularité est due à la simplicité de mise en œuvre de tels dispositifs commerciaux comme la sonde coaxiale «85070 probe Kit» de Keysight (Agilent) ou la sonde coaxiale DAK de SPEAG.

Pour la caractérisation diélectrique de fluides, la géométrie de l'extrémité du câble coaxial est importante et influe sur la reproductibilité des mesures, ainsi plusieurs géométries ont été développées [31]. La Figure I.18 donne un exemple d'une sonde coaxiale où le conducteur intérieur est tronqué et protégé par un conducteur de masse extérieur plus long. Une rondelle diélectrique est située à l'extrémité de la sonde pour délimiter le liquide à analyser. Ces rondelles sont généralement fabriquées à partir d'un polymère qui a une faible permittivité, une bonne résistance chimique et une bonne stabilité thermique.



Figure I.18. Une sonde coplanaire en réflexion pour la caractérisation diélectrique de liquides [31].

Pour calibrer cette sonde, la procédure la plus répandue est d'utiliser trois mesures pour lesquelles la sonde est respectivement en court-circuit, en circuit ouvert (c'est-à-dire qu'elle rayonne dans l'air) et immergée dans un liquide de référence dont les propriétés diélectriques sont bien connues. Une fois la sonde calibrée, le liquide à caractériser est positionné au niveau du plan de calibrage.

Le principe de cette méthode de caractérisation est basé sur la détermination du coefficient de réflexion Γ d'une onde TEM réfléchie à l'extrémité de la sonde coaxiale, là où les lignes de champ électrique pénètrent dans le liquide. Le coefficient de réflexion est mesuré à l'aide d'un analyseur de réseaux vectoriel sur une large bande de fréquences. Ce coefficient



de réflexion est lié à la permittivité complexe ε^* du matériau qui est placé à l'extrémité de la sonde [31].

Ces outils de caractérisation en réflexion à base de sondes coaxiales, ont été utilisés également pour la caractérisation de tissus biologiques dès la fin des années 80 [42-44]. Ils présentent l'avantage d'être large bande avec une mise en œuvre relativement simple. Aussi ces techniques de mesures sont connues pour leur bonne précision sur les mesures avec une incertitude d'erreur sur la mesure de la permittivité complexe inférieure à 10%. Un exemple de caractérisation utilisant le principe de sonde coaxiale pour des mesures de permittivité sur des tissus issus du foie est donné Figure I.19.



Figure I.19. Exemple de caractérisation de tissus biologique à l'aide d'une sonde coaxiale [36].

3.1.2 Guides d'ondes volumiques

Une autre technique pour la caractérisation de liquides consiste à utiliser un guide d'onde volumique. Parmi ces techniques on trouve les travaux de R. Jazicek [45], où un guide d'onde rectangulaire en réflexion est utilisé comme sonde microonde. La Figure I.20 montre le banc de mesure qui est formé d'un analyseur de réseau vectoriel, un câble coaxial, le guide d'onde rectangulaire et le matériau sous test placé à l'extrémité ouverte du guide d'onde. Ce guide d'onde a été utilisé pour la caractérisation diélectrique de liquides et de tissus humains.

Le principe de fonctionnement de ce banc de caractérisation est simple, la réactance et la conductance équivalentes du dispositif sous test perturbent la réflexion au niveau de la sortie en circuit ouvert du guide d'onde.





Figure I.20. Montage expérimental du guide d'onde rectangulaire utilisé en réflexion pour la caractérisation de liquides [45]

Ces guides d'ondes volumiques ne sont pas très utilisés vue leur limitation en largeur de bande fréquentielle (par exemple ce guide d'onde couvre seulement la bande de 434 MHz à 2,4 GHz) et également leur encombrement qui requière des volumes de fluides importants.

3.2 Les techniques de caractérisation en transmission

Parmi les techniques de caractérisation en transmission, l'utilisation du câble coaxial est à nouveau la méthode la plus répandue pour les mêmes raisons que précédemment. Le principe de caractérisation en transmission est de remplacer le diélectrique séparant les conducteurs intérieur et extérieur de la sonde, sur une section de longueur précise, par le liquide à caractériser comme le montre la Figure I.21 [31].





La Figure I.22 illustre un dispositif expérimental développé par Toropaine [46] qui est formé d'une ligne centrale constituée d'un conducteur circulaire, et de deux conducteurs formant la masse et espacés de la ligne centrale d'une distance «d» et d'une sonde de température. La longueur de la ligne est réglée pour une certaine gamme de fréquences de sorte que l'effet des réflexions multiples à l'intérieur du capteur soit faible, et l'atténuation totale du capteur ne dépasse pas la plage dynamique de l'analyseur vectoriel utilisé. Les dimensions de la ligne centrale et les plans de masse sont choisis de telle sorte que l'impédance du capteur à vide soit de 50 Ω .



Figure I.22. Dispositif mis au point par Toropaine *et al.* [46] pour la caractérisation diélectrique hyperfréquence de liquides par sonde coaxiale en transmission.

La méthode est basée sur la mesure du coefficient de transmission complexe de la structure remplie avec un liquide. La permittivité complexe du liquide est calculée à partir de l'amplitude et de la phase du coefficient de transmission.

Les propriétés principales du capteur sont les suivantes: (i) la structure est ouverte de telle sorte que le liquide inséré dans le capteur est complètement visible, et les bulles peut être totalement éliminées; (ii) la structure est simple et facile à fabriquer; (iii) les conducteurs sont rigides, de sorte que le capteur peut être nettoyé fréquemment sans affecter les propriétés électriques; (iv) la fréquence de coupure des modes de guide d'onde est élevée (par rapport à celle d'un capteur coaxial), et (v) la température du liquide peut être contrôlée en continu pendant la mesure. Du point de vue de la reproductibilité, l'écart-type des valeurs moyennes de la partie réelle de la permittivité mesurées est estimé à $\pm 0.7\%$.

3.3 Les techniques de caractérisation basées sur des structures résonantes volumiques

La permittivité complexe de liquides polaires peut également être mesurée en utilisant des résonateurs planaires ou volumiques. En effet, les structures hyperfréquences résonantes sont connues pour être plus sensibles que les dispositifs de caractérisation de liquides large bande. Par contre, à la différence des dispositifs large bande, les structures résonantes ne permettent de caractériser un matériau qu'autour de leur fréquence de résonance.



Par exemple, Robert et Wang [31] ont décrit une technique de caractérisation résonante basée sur une cavité cylindrique en métal. Le champ électromagnétique est confiné à l'intérieur de la cavité et les échantillons à caractériser sont placés dans un tube de pyrex le long de l'axe central de la cavité comme le montre la Figure I.23.

Cette cavité est excitée par un champ électromagnétique sur le mode TM₀₁₀. La cavité est caractérisée par sa fréquence de résonance f_r et son facteur de qualité à la résonance Q. La présence d'un diélectrique dans le tube de pyrex, perturbe f_r et Q. La perturbation sur la fréquence de résonance, Δf_r , est liée à la partie réelle du diélectrique ε' , et la perturbation introduite sur le facteur de qualité, ΔQ , est liée à la partie imaginaire du diélectrique ε'' . À partir de ces deux modifications, les propriétés diélectriques d'un liquide à la fréquence de résonance peuvent être extraites assez facilement.



Figure I.23. Cavité résonante pour l'analyse hyperfréquence de liquides [31].

La précision obtenue sur la caractérisation de liquides avec de tels dispositifs hyperfréquences reste satisfaisante (inférieure à 10%). Par contre ces types de dispositifs restent encombrants et nécessitent un grand volume de liquide (de l'ordre du mL).

Pour résumer, le principal inconvénient de l'ensemble de ces techniques est qu'elles nécessitent un volume important de liquide. Or, il n'est pas toujours facile, lorsqu'on travaille sur les échantillons biologiques d'avoir accès à de grandes quantités de liquides. De plus, comme nous l'avons vu précédemment, il y a un fort intérêt à réduire les volumes d'analyse pour accroitre la sensibilité de détection. En particulier, aux fréquences microondes, les liquides polaires sont fortement dispersifs et introduisent des fortes pertes qui impactent de façon importante les performances de détection. Pour pallier à cet inconvénient, les technologies microfluidiques apportent une solution intéressante puisqu'elles permettent de limiter et maîtriser les zones d'interaction entre le liquide et le capteur hyperfréquence.



Chapitre I : Microfluidique et spectroscopie diélectrique

Nous allons donc voir dans le paragraphe suivant quelques solutions qui ont été développées pour coupler les dispositifs hyperfréquences avec les technologies microfluidiques.

3.4 Technologies microfluidiques pour la caractérisation diélectrique de liquides en technologie planaire

Le couplage de la microfluidique avec des capteurs hyperfréquences permet le développement d'outils plus précis, plus intégrés et plus économes en volume d'échantillon.

Les premiers développements ont été réalisés sur des lignes de transmission coplanaires car leur configuration planaire rend l'implémentation d'un réseau microfluidique relativement simple. Par exemple, G.R. Facer *et al.* [47] ont développé un dispositif basé sur une ligne coplanaire pour la caractérisation diélectrique de liquides. La Figure I.24 nous montre l'architecture du dispositif utilisé. Ce dispositif est formé d'un guide d'onde coplanaire (CPW) sur lequel un microréservoir en PDMS a été implémenté pour contenir les échantillons liquides à analyser.



Figure I.24. Dispositif proposé par G.R. Facer basé sur un guide d'onde coplanaire pour la caractérisation diélectrique de liquides [47].

Des analyses d'échantillons biologiques comme l'hémoglobine, dans une bande de fréquence allant de 40 Hz jusqu'à 26,5 GHz, ont été menées et démontrent le potentiel des structures hyperfréquences coplanaires pour la caractérisation d'échantillons biologiques.

Sur le même principe, Sanghyun Seo *et al.* [48] ont développé un dispositif formé d'une ligne coplanaire (CPW) sur un substrat de Pyrex de 550 μ m d'épaisseur. Sur cette ligne coplanaire, un microréservoir en SU-8 de 300 μ m de profondeur a été implémenté (Figure I.25 (a)). Des analyses sur différents liquides ont été menées dans la bande de fréquence allant de 1 à 32 GHz. La Figure I.25 (b) montre un exemple de mesure sur un échantillon de méthanol. Les mesures effectuées avec ce dispositif sont en bon accord avec le modèle de Cole-Cole.





Figure I.25. (a) Ligne coplanaire à microréservoir développé par Sanghyun Seo *et al.* (b) Exemple de mesure sur un échantillon de méthanol [48].

On peut également citer les travaux de James C. Booth qui a utilisé des lignes de transmission coplanaires en or, d'épaisseur 0,4µm, déposées sur un substrat en quartz de 1mm d'épaisseur, pour la caractérisation diélectrique de liquides dans la bande de fréquences allant de 45 MHz jusqu'à 40 GHz [49]. Pour définir le canal microfluidique sur les lignes, un morceau de PDMS moulé est utilisé comme le montre la Figure I.26. La liaison permanente du PDMS sur le substrat de quartz a été réalisée par un traitement par plasma d'oxygène. Des structures d'étalonnage avec des géométries transversales identiques à la géométrie du capteur ont été fabriquées pour permettre d'effectuer un étalonnage de type multi-lignes TRL (through-reflect-line).

Ce capteur permet d'extraire la permittivité complexe de l'échantillon liquide polaire (Méthanol) sous test à partir de la mesure de la variation de la capacité et de la variation de la conductance de la ligne de transmission. La particularité de la méthode d'extraction utilisée repose sur le fait que tous les paramètres nécessaires du modèle ont été directement déterminés expérimentalement à partir d'un seul ensemble de mesures sans avoir besoin d'un liquide de référence de permittivité connue. Cette méthode consiste dans un premier temps à déterminer avec précision les paramètres caractéristiques (impédance caractéristique Z_c et constante de propagation γ) de chaque région de la ligne (Air/Quartz, PDMS/Quartz et PDMS/Canal microfluidique/Quartz). À partir de ces paramètres, la permittivité du liquide placé dans le canal microfluidique, est calculée.



Chapitre I : Microfluidique et spectroscopie diélectrique



Figure I.26. Capteur développé par J.C. Booth *et al.* pour la caractérisation diélectrique de liquides dans la bande de fréquences 45MHz -40GHz [49].

De façon à améliorer la sensibilité de tels capteurs, T.Chen *et al.* [29][50] ont développé un dispositif formé d'un guide d'onde coplanaire en série avec une capacité inter-digitée qui concentre le champ électromagnétique et forme la zone d'analyse. Un canal microfluidique en PDMS a été reporté sur le dispositif de façon à guider le fluide sous test sur la capacité interdigitée. La Figure I.27 présente le dispositif fabriqué.



Figure I.27. Exemple de dispositif coplanaire couplé à un canal microfluidique pour l'analyse hyperfréquence de liquides biologiques [29].

La caractérisation diélectrique est effectuée sur la bande de fréquence 40 MHz-40 GHz. Le principe consiste à mesurer la valeur de la capacité inter-digitée lorsque celle-ci est recouverte par différents liquides. Une procédure de «de-embedding» est appliquée pour soustraire l'effet des lignes d'accès coplanaires. La Figure I.28 présente la variation de capacité en fonction de la fréquence lorsque le canal microfluidique est rempli d'eau déionisée (DI). Etant donné que la capacité globale du capteur est proportionnelle à la permittivité relative du liquide avec laquelle elle est en contact, son évolution en fonction de la fréquence suit la même allure que la variation de la permittivité de l'eau en fonction de la fréquence.



Figure I.28. Variation de la capacité en fonction de la fréquence lorsque le capteur est en contact avec de l'eau DI [50].



Figure I.29. Variation de la capacité en fonction de la fréquence pour différents mélanges eau-éthanol [50].

Avec ce capteur microfluidique, différents mélanges éthanol/eau ont été analysés et identifiés à partir du contraste capacitif généré par le mélange par rapport à l'eau (Figure I.29).

Les capteurs résonants qui offrent des performances intéressantes en terme de détection, ont également été intégrés au sein de dispositifs microfluidiques. Notamment, A.I. Gubin *et al.* [51-52] ont proposé un capteur hyperfréquences pour la caractérisation de petits volumes de liquides dans la bande Ka (de 27 à 40 GHz). Ce capteur est basé sur l'utilisation d'un résonateur diélectrique excité par des modes de galeries (Whispering Gallery Mode). Le résonateur se compose de deux guides d'ondes diélectriques placés à l'entrée et la sortie d'un résonateur

diélectrique. Ce résonateur est formé par un disque de saphir (de diamètre de 14,4 mm et de hauteur égale à 2,5 mm) et un disque de plastique de 0,69 mm d'épaisseur. Un canal microfluidique, constitué d'un tube en matière plastique (Zeonex 480) et de diamètre 0,2 mm, est placé sur la partie supérieure du résonateur comme le montre la Figure I.30 (a). Un système de contrôle en température a été installé pour stabiliser la température du résonateur et le liquide en cours de test avec une précision supérieure à $\pm 0,01$ °C (Figure I.30(b)).



Figure I.30. (a) Le résonateur WGM [52] (b) La cellule de mesure constitué par le résonateur WGM [51].

Le principe de détection repose sur la mesure de l'évolution de la fréquence de résonance du résonateur et du facteur de qualité liés respectivement à ε' et ε'' du liquide sous test.

Pour obtenir la valeur absolue de la permittivité complexe du liquide sous test à partir des données mesurées, des courbes d'étalonnages ont été réalisées à partir des mesures effectuées avec des liquides de référence (de permittivité bien connue à la fréquence de résonance du résonateur). Deux types de courbes d'étalonnages ont été mises en œuvre. Une courbe d'étalonnage qui présente le décalage de la fréquence de résonateur à la présence du liquide sous test (f_{liq}) , par rapport à la fréquence du résonateur à l'air (f_{air}) en fonction de la permittivité comme le montre la Figure I.31 (a). Cette courbe d'étalonnage permet de calculer la partie réelle de la permittivité complexe du liquide sous test. Une seconde courbe qui présente la différence de l'inverse de facteur de qualité du résonateur $\frac{1}{Q_{liq}} - \frac{1}{Q_{air}}$ en fonction de ε'' (Figure I.31 (b)) et permet d'estimer la partie imaginaire de la permittivité du liquide sous test.





Figure I.31. (a) Décalage de la fréquence de résonance f_{liq-air} en fonction de la partie réelle de la permittivité de différents liquides de référence (b) inverse du facteur de qualité du résonateur en fonction de la partie imaginaire de liquides de référence [52].

À partir de ces deux courbes d'étalonnage, la permittivité complexe de différentes concentrations de solutions aqueuses de cytochrome C a été mesurée à la fréquence de 35,5 GHz comme le montre la Figure I.32. En effet, le cytochrome C est une protéine qui est généralement utilisée en tant que système modèle pour étudier le transfert d'électrons dans les protéines.



Figure I.32. Les parties réelles (bleu) et imaginaires (rouge) de la permittivité de solutions aqueuses présentant différentes concentrations en cytochrome C [52].

Les résultats obtenus montrent une bonne concordance des données calculées et mesurées sur la permittivité complexe de différentes concentrations en Cytochrome C. Aussi cette technique fait preuve d'une bonne précision ainsi qu'une sensibilité très élevée. Par contre ce type de dispositifs reste relativement encombrant et complexe à mettre en œuvre.

Nous pouvons également citer les travaux de Ali Abduljabar *et al.* [53], qui se basent aussi sur l'étude des perturbations de la fréquence de résonance et du facteur de qualité d'un résonateur chargé par différents liquides. Le capteur est constitué d'un circuit résonnant formé par un anneau microruban à double gap (DSSR) comme le montre la Figure I.33. Un capillaire est fixé au substrat et passe à l'intérieur des gaps du résonateur; par conséquent, la capacité



formée par les gaps change, ce qui entraîne une modification des conditions de résonance du capteur.



Figure I.33. (a) Schéma du capteur DSSR (b) Photographie du capteur DSSR réalisé avec une structure de microruban [53].

Les caractérisations des liquides ont été effectuées avec deux types de capillaires, un capillaire en quartz et un capillaire en Perfluoralkoxy (PFA). La permittivité complexe à 3 GHz, pour différents liquides, est extraite à partir des mesures en utilisant des équations optimisées en simulation et basées sur le décalage de la fréquence de résonance du DSSR à la présence du liquide. Un bon accord entre les valeurs mesurées de la permittivité complexe et celles calculées à partir du modèle de Debye est ainsi observé, avec des erreurs de mesures faibles. Par exemple, pour l'eau, l'erreur de mesure est estimée à 0,33%. Ce type de structure montre donc des résultats intéressants avec une bonne sensibilité et nous verrons dans le paragraphe suivant comment ce type de capteurs peut être adapté pour la mesure de particules en suspension.

Une autre topologie intéressante a été développée dans les travaux de Michael A. Suster *et al.* [54]. Le capteur RF est formé par deux électrodes en or séparées par un gap de 400 μ m, qui forme une zone de détection capacitive, sur un substrat de Rogers 4350 PCB. Pour former le canal microfluidique, un film adhésif double face de 250 μ m d'épaisseur a été utilisé. Le capot du canal microfluidique est fabriqué en polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Une électrode flottante d'or est déposée sur la face supérieure interne du capot et permet d'obtenir un champ électromagnétique constant dans la zone de détection. Tous ces éléments sont assemblés en fixant le capot de PMMA à la surface du substrat. L'électrode flottante supérieure est alignée sur les électrodes de détection à l'aide de trous de positionnement prévus dans le film adhésif double face (Figure I.34). Le canal microfluidique a un volume total de 9 μ L et un volume de 0,8 μ L dans la zone de détection.





Figure I.34. (a) Vue en coupe du capteur microfluidique basé sur une structure capacitive 3D avec électrode flottante – (b) Vue de dessus (c) Prototype d'un capteur fabriqué [54].

Le capteur a été calibré à l'aide de six liquides de référence: l'air, l'isopropanol (IPA), le méthanol et 3 mélanges isopropanol-méthanol. Chaque milieu liquide d'étalonnage a été caractérisé d'abord avec un kit de sonde diélectrique commercial (Agilent 85070E) pour obtenir une permittivité de référence. Les liquides d'étalonnage ont ensuite été chargés dans le capteur. À partir des paramètres de réflexion S₁₁, il est possible d'extraire des courbes d'étalonnage linéaires, qui représentent la variation de la partie réelle et imaginaire de l'admittance globale du capteur en fonction de la permittivité sur chaque fréquence (Figure I.35 (a)).



Figure I.35 (a). Courbes d'étalonnage (b) parties réelles et imaginaires de la permittivité en fonction de la fréquence de 14 MHz à 6,5 GHz mesurées pour l'éthanol et l'éthylène glycol [54].

L'éthanol et l'éthylène glycol ont été caractérisés avec ce capteur. À partir du paramètre S₁₁, l'admittance du capteur a été calculée. Les courbes d'étalonnage sont ensuite utilisées pour calculer la partie réelle et imaginaire de la permittivité des échantillons. Les résultats de mesure du capteur sont représentés sur la Figure I.35 (b) et comparés avec les mesures de référence

effectuées avec la sonde diélectrique d'Agilent 85070E (traits pleins). Les résultats montrent un très bon accord. Les erreurs sur la partie réelle et imaginaire de l'éthanol dans la gamme de fréquence 14 MHz à 6,5 GHz ont été estimées respectivement à 3,5% et 5,6%, alors que les erreurs correspondantes pour l'éthylène glycol ont été respectivement de 5,4% et 4,5%. Ce capteur présente donc une bonne précision de mesure. En revanche, il présente une structure complexe qui nécessite de nombreuses étapes de fabrication avec notamment la nécessité de réaliser des vias au travers du substrat et une électrode supérieure.

En résumé, les capteurs résonants sont intéressants car ils permettent d'atteindre de très bonnes précisions de mesure et de fortes sensibilités. En revanche, à la différence des dispositifs large bande, les dispositifs résonants ne permettent pas de mesurer les propriétés diélectriques des liquides sous test, de façon continue, sur une large bande de fréquence. Il est donc nécessaire de faire des compromis et choisir le type de capteur à utiliser en fonction des applications visées et des performances qu'elles requièrent.

Cet état de l'art démontre le fort potentiel de ces techniques de détection pour la caractérisation de liquides. Cela ouvre de nouvelles perspectives et depuis peu, un certain nombre de travaux sont initiés pour tendre vers une miniaturisation poussée et une intégration complète de ce type de systèmes dans des dispositifs plus complexes grâce aux technologies CMOS. Elles permettent en particulier le développement de systèmes intégrant les sources RF ainsi que la partie capteur et traitement des données. Nous allons à présent introduire quelques avancées dans ce domaine.

3.5 Exemples de capteurs CMOS pour la caractérisation de liquide

De récents travaux ont montré les potentialités de la technologie CMOS pour l'intégration de dispositifs RF pour la spectroscopie diélectrique. Notamment, les travaux de M. Bajestan *et al.* [55] démontrent la faisabilité de concevoir un système de spectroscopie diélectrique CMOS complètement intégré qui permet de mesurer à la fois les parties réelles et imaginaires de la permittivité d'un liquide sur une large gamme de fréquences. L'élément de détection est basé sur une capacité inter-digitée dont l'admittance change par rapport à la permittivité complexe de l'échantillon (Figure I.36 (b)). Afin de détecter la permittivité sur une large bande de fréquence (de 0,62 à 10 GHz), la capacité est insérée dans une topologie de diviseur de tension avec une capacité fixe. Les nœuds A et B (cf Figure I.36 (b)) sont d'abord appliquées à des mélangeurs I/Q. Les sorties des mélangeurs sont ensuite filtrées passe-bas pour générer des signaux en courant continu VI_A, VQ_A, VI_B et VQ_B. Ces signaux DC portent des

informations sur l'amplitude et la phase des tensions V_A et V_B . Tout changement de la permittivité complexe dans la zone de détection se traduit par une variation de l'amplitude et de la phase des tensions V_A et V_B respectivement aux nœuds A et B et ces tensions peuvent donc être utilisées pour détecter avec précision la permittivité complexe du matériau sous test en utilisant une simple équation analytique. La Figure I.36 (a) montre l'ensemble du dispositif fabriqué en technologie CMOS. Pour positionner le liquide à caractériser dans la zone de détection, le capteur est implémenté au fond d'un réservoir en plastique. De façon à mesurer le même volume de liquide (de l'ordre de 20μ L) à chaque mesure, une micropipette a été utilisée pour l'injection du liquide.



Figure I.36. (a) Photographie de la puce CMOS et implémentation au fond d'un réservoir plastique (b) Géométrie de la zone de détection du capteur formée par une capacité interdigitée [55].

Pour mesurer la permittivité d'un milieu liquide, le capteur doit être d'abord calibré en utilisant des matériaux de référence : l'air, le méthanol, l'éthanediol, le butane-1-ol et le diméthylsulfoxyde (DMSO). À partir de l'air et des différents liquides d'étalonnage, des équations d'étalonnage sont établies (Figure I.37). Ces équations sont ensuite utilisées pour déterminer la permittivité d'un liquide sous test en fonction des tensions V_A et V_B mesurées. Ainsi la Figure I.38 présente un exemple de permittivité complexe mesurée pour l'éthanol. Ce capteur est relativement précis avec une erreur sur la permittivité de moins de 1% sur toute la gamme de fréquence de 0,62-10 GHz.





Figure I.37. Mesures des parties réelle et imaginaire de V_A/V_B en fonction respectivement de ϵ' et ϵ'' , à 8 GHz [55].



Figure I.38. Comparaison de la partie réelle et imaginaire de la permittivité mesurée pour l'éthanol en fonction de la fréquence avec les valeurs théoriques [55].

D'autres travaux, dans la gamme de fréquences submillimétriques ont été initiés. Comme ceux du laboratoire IHP, dans lesquels une plate-forme microfluidique intégrée BiCMOS a été développée [56-57]. Le capteur utilisé fonctionne à 120 GHz et est basé sur un filtre passe bande réalisé au moyen d'un résonateur planaire, d'un oscillateur commandé en tension (placé à l'entrée du résonateur) et d'un détecteur de puissance implémenté à la sortie du capteur (Figure I.39).



Figure I.39. Photographie du capteur BiCMOS à 120 GHz [56].



Lorsque le résonateur est chargé par un échantillon diélectrique biologique, les paramètres caractéristiques du résonateur, tels que la fréquence de résonance et le facteur de qualité, changent en fonction des propriétés diélectriques de l'échantillon. Ainsi, le niveau de tension à la sortie du détecteur subira un changement en fonction de l'atténuation présentée par l'échantillon diélectrique. En monitorant ces changements, les caractéristiques diélectriques de l'échantillon peuvent être estimées.

Ce capteur est muni d'un canal microfluidique intégré dans le volume du substrat de silicium, grâce à une étape de gravure RIE (Figure I.40).



(a)



Figure I.40. Photographie du dispositif (a) à vide (canal microfluidique remplie d'air)(b) chargé avec de l'eau [57].

Le niveau de sensibilité du capteur, peut s'évaluer en comparant la variation de la tension au niveau du détecteur à la présence de différents liquides par rapport à la tension mesurée à vide. La Figure I.41 (a) montre les tensions de sortie du détecteur mesurées en présence d'air, d'eau et d'éthanol dans le canal microfluidique. À la fréquence de 115 GHz, la variation de la sortie du détecteur est de 60 mV pour l'eau et de 160 mV pour l'éthanol par rapport à la mesure de référence avec l'air. Ces résultats sont en bon accord avec les simulations de la réponse en transmission (Figure I.41 (b)).







L'ensemble de ces travaux montre que les dispositifs hyperfréquences présentent un fort potentiel pour l'investigation des liquides polaires. Les chercheurs ont donc naturellement cherché à étendre ce type de capteurs à la caractérisation de cellules biologiques pour lesquelles les systèmes microfluidiques présentent de nombreux avantages.

4. La caractérisation diélectrique de cellules biologiques

Ces vingt dernières années, les recherches dans le domaine des capteurs pour l'analyse de cellules biologiques ont connu une forte croissance. L'analyse de cellules biologiques peut se faire par différentes méthodes. Les méthodes les plus couramment utilisées dans les laboratoires de biologie reposent sur des méthodes optiques basées sur des techniques de microscopie qui permettent l'analyse de cellules par traitement d'images en utilisant des marqueurs fluorescents, ou encore sur la cytométrie en flux et sur l'analyse de signaux optiques émis par une cellule soumise à un faisceau lumineux (un laser par exemple). Par contre la plupart des techniques optiques reposent sur une étape de marquage des cellules. Cette étape de marquage peut être parfois coûteuse, longue et peut altérer voir perturber les cellules et les rendre non réutilisables après analyse. Pour surmonter ces inconvénients, de nouvelles méthodes d'analyse cellulaire non invasives et sans marquage se sont développées.

Dans les paragraphes suivants, nous allons détailler quelques exemples de biocapteurs basés sur des méthodes de détection électrique pour l'analyse de cellules biologiques.

4.1 Capteurs hyperfréquences appliqués à la biodétection

Les premières générations de biocapteurs hyperfréquences exploitaient le fait que l'énergie du signal RF est essentiellement concentrée sur la surface des lignes impliquant des pertes d'insertion et des pertes par réflexion. L'introduction d'une particule diélectrique (cellule, biomolécule...) sur la ligne RF engendre des modifications sur la propagation du signal. Les premiers capteurs développés dérivés des biopuces à ADN utilisaient des cibles d'immobilisation greffées à la surface des lignes RF. Un exemple typique est donné Figure I.42. Young-Il Kim *et al.* [58] ont développé un dispositif résonant LC pour la détection de biomolécules. Le principe de détection repose sur la variation du signal RF provoquée par la résistance, la perméabilité et la permittivité d'une biomolécule à la surface du résonateur RF. En effet, le résonateur est formé par une inductance en spirale implémentée en série avec une capacité inter-digitée comme le montre la Figure I.42.



Chapitre I : Microfluidique et spectroscopie diélectrique



Figure I.42. Principe de détection de biomolécules en utilisant un circuit planaire RF résonant [58].

Pour immobiliser les éléments biologiques sur la surface du résonateur, un matériau à faible constante diélectrique, le BCB, a été utilisé pour déterminer la sensibilité du résonateur à la présence des biomolécules. Les paramètres S du dispositif sont tout d'abord mesurés puis comparés à la réponse à vide du résonateur. Comme le montre la Figure I.43, la variation des pertes d'insertion entre le résonateur à vide et après l'immobilisation de biotines n'est pas très significative. Par contre après la fixation des biomolécules d'avidines, les pertes d'insertion sur le point de résonance subissent une grande variation. En revanche, la fréquence de résonance ne semble pas affectée par la liaison biotine-avidine et cela signifie que la biomolécule agit comme une résistance et induit une variation d'impédance purement résistive du dispositif RF.

Dans cet exemple, l'association toute simple d'une inductance avec une capacité a montré une approche prometteuse pour la détection de biomolécules dans la gamme radio fréquences. Par contre, il faut noter que cette méthode nécessite une étape de fonctionnalisation de surface consistant à greffer sélectivement des sondes d'immobilisations sur les éléments sensibles du capteur.



Figure I.43. Comparaison du coefficient de réflexion du résonateur à vide, après l'immobilisation de biotines et après fixation de biomolécules d'avidines [58].



Sur le même principe, d'autres types de dispositifs RF résonants, pour la détection de cellules biologiques ont été également mis en œuvre. L'objectif étant de tirer profit des interactions d'une onde électromagnétique haute fréquence avec une ou plusieurs cellules biologiques pour réaliser une analyse physique globale du continu cellulaire. Notamment, nous pouvons citer les biocapteurs RF développés au sein du laboratoire XLIM par L.Y. Zhang et al. pour la caractérisation de cellules biologiques cancéreuses [59]. Ces capteurs, comme le montre la Figure I.44 (a), sont basés sur des résonateurs stop bande formés d'une inductance disposée en parallèle avec deux capacités inter-digitées. Leur fréquence de résonance est réglée en ajustant la taille de l'élément inductif. Les capacités inter-digitées, qui concentrent fortement le champ électromagnétique à la fréquence de résonance, constituent les zones d'interaction privilégiées avec les cellules biologiques. Si une particule diélectrique, caractérisée par sa propre permittivité et conductivité, est déposée entre les électrodes de la capacité inter-digitée, des changements de paramètres S du résonateur sont enregistrés. La variation de permittivité aura un effet sur la fréquence de résonance du résonateur RF, alors qu'une variation de conductivité aura un effet sur le facteur de qualité à la fréquence de résonance du résonateur RF. Les mesures ont été faites en deux étapes. Dans un premier temps, les paramètres S du capteur à vide ont été enregistrés. Ensuite, une goutte de cellules en suspension dans de l'eau est déposée dans une micro-chambre qui définit la zone d'interaction cellules/capteur. Une fois que tout le volume d'eau est évaporé et que les cellules ont sédimenté entre les électrodes de la capacité inter-digitée, les paramètres S sont enregistrés de nouveau.





À partir du décalage de la fréquence de résonance de chaque capteur, la variation de la permittivité en fonction de la fréquence de plusieurs types cellulaire a été mesurée comme le montre la Figure I.44 (b). Cette technique présente l'avantage de pouvoir concevoir des dispositifs d'analyse miniaturisés qui permettent de travailler à l'échelle cellulaire et sans avoir



recours à un marquage des cellules. Par contre, les mesures avec les cellules sont réalisées à l'air ambiant, ce qui impose de fixer au préalable les cellules pour assurer une reproductibilité et une stabilité des mesures au cours du temps.

Il est donc nécessaire pour aller plus loin de pouvoir caractériser les cellules biologiques sans les dénaturer en les conservant dans un milieu biologique. Dans cet objectif, nous avons vu que les technologies microfluidiques ouvraient des perspectives intéressantes car elles permettent de réduire les volumes d'analyse tout en maîtrisant parfaitement les zones d'interaction du capteur avec le liquide biologique. Dans le paragraphe suivant, nous allons présenter les solutions mises en œuvre jusqu'à présent pour le couplage des technologies microfluidiques avec les dispositifs hyperfréquences.

4.2 Les biocapteurs RF microfluidiques

Nous avons vu que la technologie microfluidique présente l'intérêt de s'adapter à des structures miniatures. Un exemple de couplage entre un système microfluidique et un dispositif hyperfréquence est reporté dans les travaux de T Chen *et al.*[60]. Ce même capteur qui était présenté dans la partie 3.4 de ce chapitre a été utilisé pour la caractérisation de cellules biologiques. Afin d'étudier les capacités du dispositif pour la détection et l'analyse de cellules vivantes en suspension dans leur milieu de culture, des mesures sur de différentes concentrations de suspensions de cellules de Lymphomes B ont été effectuées. Notons que le milieu de culture utilisé pour les suspensions cellulaires est du RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) mélangé avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF). Ce milieu a été utilisé aussi comme milieu de référence pour calibrer les mesures. Différentes concentrations de cellules vivantes ont été mesurées et les résultats sont présentés sur la Figure I.45. Le comptage des cellules dans la zone de détection (la capacité inter-digitée) se fait à l'aide d'un microscope (Figure I.46).



Figure I.45. (a) Contraste capacitif ΔC (b) et contraste de conductance (ΔG) pour différentes concentrations de cellules lymphomes B dans du RPMI+10%SVF pris comme milieu de référence [60].





Figure I.46. Distribution des cellules de Lymphomes B dans la zone de détection du capteur pour différentes concentrations [60].

Comme le montre la Figure 45, les contrastes capacitifs et de conductances semblent bien proportionnels au nombre de cellules dans la zone de détection. À partir de ces mesures, un contraste capacitif moyen par cellule de 0,2 fF a été évalué. Compte tenu d'un niveau de 0,1 fF de sensibilité, la détection d'une seule cellule avec la technique de détection microondes peut être envisagée mais semble insuffisante pour réaliser une analyse. Cet exemple montre également l'importance de travailler et d'optimiser la sensibilité de ces dispositifs compte tenu des très faibles variations capacitives introduites par les cellules lorsqu'elles sont dans un milieu liquide.

T. Chen *et al.*, ont par la suite développé un biocapteur RF pour la spectroscopie diélectrique d'une cellule biologique unique et vivante dans son milieu de culture dans le spectre fréquentiel microondes [61]. Ce capteur comporte une zone d'analyse électromagnétique constituée par une ligne coplanaire discontinue formant une capacité série utilisable pour l'analyse. Cette zone de détection est adaptée à la taille de l'objet à analyser, soit une cellule sphérique de l'ordre de $10 \text{ à } 20 \text{ }\mu\text{m}$ de diamètre, afin d'accroitre la sensibilité du dispositif. Ces lignes coplanaires de faibles épaisseurs (0,3 μm) sont implémentées sur un substrat faible pertes en quartz. Un canal microfluidique incluant un bloqueur mécanique, permettant de localiser précisément la cellule biologique par rapport à la zone de détection, est placé sur les lignes coplanaires. Une pièce de SU-8 permet de définir le canal microfluidique et le bloqueur (indiqués en bleu sur la Figure I.47). Le bloqueur est très légèrement décalé par rapport à la coupure capacitive de la ligne coplanaire afin de permettre la localisation de la cellule à analyser juste au centre de la capacité, là où le champ électromagnétique est focalisé.



Chapitre I : Microfluidique et spectroscopie diélectrique



Figure I.47. Schéma de principe du biocapteur RF développé au LAAS– CNRS pour la caractérisation microonde d'une cellule unique [61].

Pour extraire le modèle électrique du capteur et supprimer l'impact des accès coplanaires ainsi que des «murs microfluidiques», différents milieux liquides ont été utilisés. L'admittance correspond alors à une capacité en parallèle avec une résistance comme le montre la Figure I.48. Toutes les deux sont modifiées dès qu'une particule diélectrique est stoppée au niveau du bloqueur, en raison de sa différence de permittivité relative complexe par rapport au milieu liquide.



Figure I.48. Modèle électrique du capteur

Ce capteur permet la détection d'une cellule biologique unique de lymphome B. Le principe de mesure est assez simple. Dans un premier temps, une mesure des paramètres S du biocapteur est réalisée avec uniquement le milieu de culture dans le canal microfluidique. Cette mesure permet d'extraire l'effet capacitif du milieu. Des cellules en suspension sont ensuite injectées dans le canal microfluidique du capteur. Une fois qu'une cellule se trouve bloquée dans le piège, le canal fluidique est rincé avec le milieu de culture pour évacuer toute autre cellule au voisinage de la zone d'analyse du composant RF. La sensibilité du capteur s'évalue en calculant le contraste capacitif visible sur les mesures en présence ou pas de cellule sur le capteur.



Ce contraste est indiqué sur la Figure I.49 en fonction de la fréquence pour 3 cellules individuelles provenant de la même lignée cellulaire. Le contraste capacitif est de l'ordre de 600 aF \pm 60 aF à 5 GHz. Il faut noter que le contraste capacitif n'est pas très élevé. En effet, il n'existe qu'une petite différence entre la permittivité du milieu de culture et la permittivité de la cellule biologique et donc son impact sur le comportement électromagnétique du capteur est limité.



Figure I.49. Contrastes capacitifs du capteur en présence de cellules vivantes individuelles de lymphome B dans leur milieu de culture [61].

D'autres cellules (TPH1, une lignée de cellules monocytes humains), ont été caractérisées. Également, les contrastes capacitifs ainsi que les contrastes de conductivités obtenus sont présentés dans la Figure I.50 et comparés aux contrastes obtenus sur des billes de polystyrène (de diamètre $10 \mu m$) dans le même milieu de culture que les cellules.





Comme on peut s'y attendre, le contraste capacitif de la cellule est inférieur à celui de la bille. La permittivité d'une cellule est bien plus proche de celle du milieu de culture que pour des billes de polystyrène (permittivité proche de 2,4 à 2,7).



Les travaux d'Y.Yang *et al.* [62-63], ont permis de développer une méthode de mesure de la permittivité de particules diélectriques individuelles aux fréquences microondes, basée sur une technique d'interférométrie. La Figure I.51 montre le schéma de l'architecture du capteur RF : deux diviseurs de puissance de Wilkinson sont utilisés pour réaliser la combinaison en différence de phase de deux signaux: le premier interrogeant un milieu de référence, le second interagissant avec la particule sous test. La différence de phase de 180° est atteinte en ajustant la longueur électrique l₂.



Figure I.51. Schéma de principe du capteur interféromètre microondes proposé par Y. Yang [62].

Ce capteur est basé sur une architecture de guide d'onde coplanaire (CPW) réalisé sur un substrat de quartz de 500 μ m d'épaisseur. Le capteur est constitué de 2 cellules de détection, dont une servira de référence. La zone de détection est formée par une section conique, adaptée à la taille des particules à analyser, de façon à accroitre sa sensibilité en concentrant le champ électromagnétique dans un volume restreint de détection. Un canal microfluidique est réalisé sur ces lignes CPW à partir d'un polymère SU-8 de 25 μ m de hauteur et de 50 μ m de largueur. Deux morceaux rectangulaires de PDMS, de 2 mm d'épaisseur, sont utilisés pour fermer le canal. Pour réaliser la mesure, le canal de la cellule de référence est rempli d'eau tandis que le canal de l'autre cellule est rempli avec une suspension de particules suspendues dans l'eau.

La mesure consiste à évaluer le paramètre S_{21} du dispositif autour de la fréquence où il est le plus faible (interférence destructive) et où la recombinaison des 2 signaux issus de chaque voie de détection est en opposition de phase comme le montre la Figure I.52 (a). La permittivité effective des particules de latex en suspension peut être ainsi évaluée avec une grande précision comme le montre la Figure I.52 (b). La permittivité des billes de latex reste relativement constante, quel que soit le diamètre de la particule considérée (courbe verte).





Figure I.52. (a) Mesures du S₂₁ du capteur interféromètre pour des particules de latex de diamètres différents (b) Variation de la permittivité mesurée des microbilles de latex caractérisées (courbe verte) [63].

Sur un autre principe, le dispositif RF développé par Ali Abduljabar *et al.* [64] utilise la perturbation d'un mode de résonance pour caractériser des cellules biologiques en suspension dans un capillaire. Ce même capteur décrit dans le paragraphe 3.4, a été adapté afin de caractériser des particules en suspension. En effet, ce capteur est formé par un anneau microruban présentant un gap de 35 μ m à une extrémité où un capillaire de quartz (de diamètre interne de 30 μ m et externe de 34 μ m) a été positionné. Les rayons interne et externe de l'anneau ont été choisis respectivement à 6,7 et 8,0 mm, pour obtenir une fréquence de résonance de 2,5 GHz (Figure I.53).



Figure I.53. Photographie du capteur annulaire muni d'un capillaire de quartz [64].

La réponse en transmission sur une large bande de ce capteur est formée de deux résonances (Figure I.54). La première résonance définit le mode impair et la seconde le mode pair du capteur. Le mode impair est perturbé par les propriétés diélectriques du matériau à l'intérieur du gap où il existe un fort champ électrique. Inversement, le mode pair est presque

imperturbable puisque le champ magnétique est concentré entre l'anneau et le plan de masse. Par conséquent, le mode pair du capteur est utilisé pour monitorer les changements éventuels de température qui influent sur la valeur de la permittivité complexe du liquide.



Figure I.54. La réponse en transmission sur une large bande du capteur annulaire [64].

Pour évaluer la sensibilité du capteur à la présence d'une particule dans le gap, deux tailles de microbilles de polystyrène (15 et 25 μ m) ont été utilisées. Tout d'abord une mesure avec le capillaire rempli uniquement d'eau a été faite comme mesure de référence. Ensuite, des microbilles en suspension dans l'eau sont injectées dans le capillaire. Lorsqu'une microbille arrive dans le gap, la fréquence de résonance du mode impair diminue car la permittivité de la bille, plus faible, diminue la capacité de bout du résonateur. Ainsi, pour une bille de 15 μ m, la fréquence de résonance du mode impair se décale de 150 KHz contre 350 KHz pour une bille de 25 μ m comme le montre la Figure I.55.



Figure I.55. Paramètres S₂₁ mesurés et simulés du capteur annulaire en présence de 2 types de microbilles en suspension dans de l'eau DI [64].



Chapitre I : Microfluidique et spectroscopie diélectrique

Au final comme nous l'avons présenté, les méthodes de spectroscopie diélectrique hautes fréquences développées dans la littérature semblent bien adaptées pour la caractérisation de liquides et d'échantillons biologiques. Cette approche d'analyse non invasive et sans marquage présente en effet un grand potentiel pour devenir un outil d'analyse performant pour de nombreux domaines d'applications.



Conclusion

Ce premier chapitre nous a permis d'introduire les différents avantages de la technologie microfluidique ainsi que l'ensemble des domaines d'application qu'elle couvre. Nous avons vu que si les premières applications ont été naturellement dédiées aux analyses chimiques et à la biologie moléculaire, très rapidement, l'intérêt des technologies microfluidiques a été mis à profit dans le domaine de la caractérisation cellulaire. La possibilité de manipuler, maintenir en vie et caractériser des cellules dans des microsystèmes hautement intégrés représente en effet un enjeu majeur et le développement des laboratoires sur puce ouvrent d'importantes perspectives aussi bien du point de vue du diagnostic que du traitement. En outre, cette étude bibliographique nous a permis en particulier de fixer le choix de la méthode de fabrication que nous allons utiliser pour réaliser nos canaux microfluidiques. Ensuite, nous avons décrit les différentes méthodes d'analyse diélectrique de liquides et d'échantillons biologiques en se focalisant sur la spectroscopie diélectrique haute fréquence qui fait l'objet de ces travaux de thèse. Dans cette partie nous avons montré l'intérêt d'intégrer les technologies microfluidiques aux dispositifs hyperfréquences pour l'analyse diélectrique. L'utilisation de petits volumes de liquides dont l'interaction est bien contrôlée permet d'assurer une bonne sensibilité de détection des dispositifs hyperfréquences tout en restant compatible avec la miniaturisation des capteurs.

Dans ce contexte, le but de ces travaux de thèse a été de développer un capteur hyperfréquence, qui combine un système microfluidique avec le dispositif hyperfréquence, tout d'abord pour la caractérisation diélectrique de liquides mais également pour la détection et la caractérisation d'une particule diélectrique unitaire mise en suspension et cela sur une large bande de fréquences (400 MHz-8 GHz).


[1] <u>http://www.institut-pgg.fr/Comprendre-la-Microfluidique 65.html</u>, Mars 2016.

[2] George M. Whitesides, "The origins and the future of microfluidics", Nature, 2006, Vol.442, pp. 368-373.

[3] Todd M. Squires and Stephen R. Quake, "Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale", Modern Physics, 2005, Vol. 77, No. 3, pp. 977-1026.

[4] Armand Ajdari, "Steady flows in networks of microfluidic channels: building on the analogy with electrical circuits", C. R. Physique 5, 2004, pp. 539–546.

[5] <u>http://www.fluigent.com/page/2?s=micro+fluidic</u>, Mars 2016.

[6] http://www.medicalexpo.fr/prod/new-era-pump-systems/product-79748-537029.html, Mars 2016.

[7] C. Fütterer, N. Minc, V. Bormuth, J.-H. Codarbox, P. Laval, J. Rossierb and J.-L.Viovya, "Injection and flow control system for microchannels", LabChip, 2004, Vol. 4, pp. 351–356.

[8]<u>http://www.cmc.ca/en/WhatWeOffer/Prototyping/OtherPlatforms/CarrierPlatform</u> /<u>FluigentMicrofluidicControl.aspx</u>, Mars 2016.

[9]Marten Stjernstrom and Johan Roeraade, "Method for fabrication of microfluidic systems in glass", J. Micromech. Microeng., 1998, Vol. 8, pp. 33–38.

[10] Mario Castano-Alvarez *et al.*, "Critical points in the fabrication of microfluidic devices on glass substrates", Sensors and Actuators B, 2008, Vol. 130, pp. 436–448.

[11] Klaassen E.H, Petersen K, Noworolski J.M, Logan J, Maluf N.I, Brown J, Storment C, McCulley W. and Kovacs G.T.A, "Silicon fusion bonding and deep reactive ion etching: a new technology for microstructures", Sensors and Actuators A, 1996, Vol. 52, pp. 132-139.

[12] George M. Whitesides and Abraham D. Stroock, "Flexible methods for microfluidics", Physics today, 2001, Vol. 54, No. 6, pp. 42-48.

[13]H. Lorenz, M. Despontxk, N. Fahrniy, N. LaBianca, P. Renaudy and P. Vettigerx, "SU-8: a low-cost negative resist for MEMS", J. Micromech. Microeng., 1997, Vol. 7, pp. 121–124.

[14] J.M. Ng, I. Gitlin, A.D. Stroock, G. M. Whitesides, "Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems", Electrophoresis, 2002, Vol. 23, No. 20, pp. 3461–3473.



[15] Z. Zhang, P.Zhao, G.Xiao, B.R. Watts, and C. Xu, "Sealing SU-8 microfluidic channels using PDMS", Biomicrofluidics, 2011, Vol.5, 046503.

[16] J.N. Patel, B.L. Gray, B.Kaminska, N.C. Wu and B.D. Gates, "SU-8- and PDMS-based hybrid fabrication technology for combination of permanently bonded flexible and rigid features on a single device", J. Micromech. Microeng., 2013, Vol. 23, 065029.

 [17] S. Lopera and R. D. Mansano, "Plasma-Based SurfaceModification of Polydimethylsiloxane for PDMS-PDMSMolding", ISRN Polymer Science, 2012, Vol. 2012, 767151.

[18] Stephen R. Quake and Axel Scherer, "From Micro- to Nanofabrication with Soft Materials", Science, 2000, Vol. 290, No. 5496, pp. 1536-1540.

[19] A.K. Au, H.Lai, B.R. Utela and A.Folch, "Microvalves and Micropumps for BioMEMS", Micromachines, 2011, Vol. 2, pp. 179-220.

[20] O.C. Jeong, S. Konishi, "Fabrication of a peristaltic micro pump with novel cascaded actuators", J. Micromech. Microeng., 2008, Vol. 18, 025022.

[21] M.C. TraceyI.D. Johnston, J.B. DavisC.K.L. Tan, "Dual independent displacementamplified micropumps with a single actuator", J. Micromech. Microeng., 2006, Vol. 16, pp. 1444-1452.

[22] D.J. Laser and J.G. Santiago, "A review of micropumps", J. Micromech. Microeng., 2004, Vol. 14 R35–R64.

[23] A. Manz, A. *et al.*, "Planar chips technology for miniaturization and integration of separation techniques into monitoring systems — capillary electrophoresis on a chip", J. Chromatog. 1992, Vol. 593, pp. 253–258.

[24] https://sites.google.com/site/maelpenhoathomepage/introduction-a-la-technologie-microreacteur, Mars 2016.

[25] B.M. Paegel, R.G. Blazej eandR.A. Mathies, "Microfluidic devices for DNA sequencing: sample preparation and electrophoretic analysis", Current Opinion in Biotechnology, 2003, Vol. 14, No. 1, pp. 42-50.

[26] D. Di Carlo, L. P. Lee, "Dynamic single-cell analysis for quantitative biology", Anal. Chem., 2006, pp.7918-7925.



[27] M. Díaz, "Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses", Biochemical Engineering Journal, 2010, Vol.48, No.3, pp 385–407.

[28] http://acces.ens-lyon.fr/acces/logiciels/externes/winmdi/didacticiel-de-winmdi/ cytometr.htm, Mars 2016

[29]R. Bashir, "BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects", Advanced Drug Delivery Reviews, 2004, Vol. 56, pp. 1565–1586.

[30] T.Chen, D. Dubuc, M. Poupot, J-J. Fournié, K.Grenier, "Accurate nanoliter liquid characterization up to 40 GHz for biomedical applications: toward non-invasive living cells monitoring", IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques, 2012, Vol. 60, No. 12, pp. 4171-4177.

[31] C. Dalmay, A. Pohier, M. Cheray, F. Lalloue, M-O. Jauberteau, P. Blondy : « Label Free RF Biosensors for Human Cell Dielectric Spectroscopy», Int. J. Microwave and. Wireless Technologies., 2009, Vol. 1, pp. 497-504..

[32] A.P. Gregory and R.N. Clarke, "A Review of RF and Microwave Techniques for Dielectric Measurements on Polar Liquids", IEEE Transactions on Dielectrics and Electrical Insulation, 2006, Vol. 13, No. 4, pp. 727-743.

[33] N. Demierre, "Continuous-Flow Separation of Cells in aLab-on-a-Chip using Liquid Electrodes and Multiple-Frequency Dielectrophoresis", Thèse de l'Ecole Polytechnique Fédéral de Lausanne, Suisse, 2008, pp. 35-43.

[34] G. Martinsen, S. Grimmes, H. P. Schwan, "Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue", Encyclopedia of Surface and Colloid Science", 2002, pp. 2643-2652.

[35] C. Gabriel, S. Gabriel et E. Corthout, "The dielectric properties of biological tissues : I. Literature survey", Phys.Med.Biol, 1996, Vol.41, pp.2231-2249.

[36] S. Gabriel, S. W. Lau and C. Gabriel, "The dielectric properties of biological tissues : II. Measurements in the frequency range 10 Hz to 20 GHz", Phys.Med.Biol, 1996, Vol.41, pp.2251-2269.

[37] Ann P O'Rourke, Mariya Lazebnik, John M Bertram, Mark C Converse, Susan C Hagness, John G Webster andDavid M Mahvi, "Dielectric properties of human normal,



malignant and cirrhotic liver tissue: in vivo and ex vivo measurements from 0.5 to 20 GHz using a precision open-ended coaxial probe", Phys. Med. Biol, 2007, Vol.52,pp.4707-4719.

[38] U. Khan, N.Al-Moayed, N. Nguyen, M. Obol, K. Korolev, M. Afsar and S. Naber, "High Frequency Dielectric Characteristics of Tumorous and Nontumorous Breast Tissues", IEEE/MTT-S International Microwave Symposium, 3-8 June 2007, pp. 1341-1344.

[39] H. Fricke, "The theory of electrolytic polarization", Phil. Mag 1932, pp.310-318.

[40] H.P. Schwan, "Electrical Properties of Blood and its Constituents: Alternating Current Spectroscopy", Blut, 1983, Vol. 46, pp.185-197.

[41]R. Pethig, "Delectrophoresis: An assessment of its potential to aid the research and practice of drug discovery and delivery", Advanced Drug Delivery Reviews, 2013, Vol. 65, pp. 1589-1599.

[42] K.R. Poster, J.L. Schepps, R.D.Stoy, et H.P. Schwan, "Dielectric properties of brain tissue between 0.01 and 10 GHz", Phys. Med. Biol., 1979, Vol.24, pp. 1177-1187.

[43] A.P. O'Rourke, M.Lazebnik, J.M.Bertram, M.C. Converse, S.C.Hagness, J.G. Webster and D.M. Mahvi, "Dielectric properties of human normal, malignant and cirrhotic liver tissue: in vivo and ex vivo measurements from 0.5 to 20 GHz using a precision open-ended coaxial probe", Phys. Med. Biol., 2007, Vol. 52, pp. 4707–4719.

[44] T.P. Marsland et S. Evans, "Dielectric measurements with an open-ended coaxial probe", IEE Proceedings H Microwaves, Antennas and Propagation, 1987, Vol. 134, No. 4, pp.341-349,.

[45] R. Zalicek, T. Smejkal, L. Oppl and J. Vrba, "Waveguide Probes for Complex Permittivity Measurement", IEEE 14h Conference on Microwave Techniques, 23-24 April 2008.

[46] A. Toropainen, P. Vainikainen and A. Drossos, "Method for accurate measurement of complex permittivity of tissue equivalent liquids", Electronic lettrers 2000, Vol.36, No.1.

[47] G.R. Facer, D.A. Notterman and L.L. Sohn, "Dielectric spectroscopy for bioanalysis: From 40 Hz to 26.5 GHz in a microfabricated wave guide", Applied Physics Letters, 2001, Vol. 78, No. 996.

[48]S. Seo, T. Stintzing, I. Block, D. Pavlidis, M. Rieke, P.G. Layer, "High frequency wideband permittivity measurements of biological substances using coplanar waveguides and



application to cell suspensions", IEEE/MTT-S International Microwave Symposium, 15-20 June 2008, pp. 915-918.

[49] J.C. Booth, N.D. Orloff, J.Mateu, M. Janezic, M. Rinehart, and J.A. Beall, "Quantitative Permittivity Measurements of Nanoliter Liquid Volumes in Microfluidic Channels to 40 GHz", IEEE Transactions on Instrumentation and Measurement, 2010, Vol.59, No12, pp. 3279-3288.

[50] T. Chen, D. Dubuc, andK. Grenier, "Accurate Nanoliter Liquid Complex Admittance Characterization up to 40 GHz for Biomedical Applications", IEEE/MTT-S International Microwave Symposium,17-22 June 2012, pp. 1-3.

[51]A.I.Gubin, A.A.Barannik, N.T.Cherpak, S.Vitusevich, A. Offenhaeusser and N.Klein, "Whispering-Gallery Mode Resonator Technique for Characterization of Small Volumes of Biochemical Liquids in Microfluidic Channel", Microwave Conference (EuMC), 10-13 october 2011, pp. 615-618.

[52] A.I.Gubin, A.A.Barannik, I.A.Protsenko, N.T.Cherpak, A. Offenhaeusser and S.Vitusevich, "Biochemical Liquids Permittivity Characterization Technique Based on Whispering-Gallery Mode Resonator With Microfluidic Channel", Microwave Conference (EuMC), 6-10 october 2013, pp. 314-317.

[53] A.A. Abduljabar, D.J. Rowe, A.Porch, and D.A. Barrow, "Novel Microwave Microfluidic Sensor Using a Microstrip Split-Ring Resonator", IEEE Transaction on Microwave Theory and Techniques, 2014, Vol. 62, No. 3, pp. 679-688.

[54] M.A. Suster, B.Blackburn, U. Gurkan, P. Mohseni, "An RF/Microwave Microfluidic Sensor Based on a 3D Capacitive Structure with a Floating Electrode for Miniaturized Dielectric Spectroscopy", IEEE Sensors 2014 Proceedings, 2-5 November 2014, pp. 1784-1787.

[55]M.M. Bajestan, A.A. Helm, H. Hedayati, K. Entesari, "A 0.62-1 OGHz CMOS Dielectric Spectroscopy System for Chemical/Biological Material Characterization", IEEE/MTT-S International Microwave Symposium,1-6 June 2014.

[56]K. Schmalz, J. Borngräber, M. Kaynak, W. Winkler, J. Wessel, M. Neshat, and S. Safavi-Naeini, "A 120 GHz Dielectric Sensor in SiGe BiCMOS", IEEE Microwave and wireless components letters, 2013, Vol23, No. 1, pp. 46-48.



[57] M. Kaynak, M. Wietstruck, C. Baristiran Kaynak, S. Marschmeyer, P. Kulse, K. Schuz, H. Silz, A. Krüger, R. Barth, K. Schmalz, G. Gastrock and B. Tillack, "BiCMOS Integrated Microfluidic Platform for Bio-MEMS Applications", IEEE/MTT-S International Microwave Symposium, 1-6 June 2014.

[58] Y.I. Kim, Y.Park, H.K Baik, "Development of LC resonator for label-free biomolecule detection", Sensors and Actuators A, 2008, Vol. 143, pp. 279–285.

[59] L.Y.Zhang, C. Bounaix Morand du Puch, C. Dalmay, A. Lacroix, A. Landoulsi, J. Leroy,
C. Mélin, F. Lalloué, S. Battu, C. Lautrette, S. Giraud, A. Bessaudou, P. Blondy, M.O.
Jauberteau, A. Pothier, "Discrimination of colorectal cancer cell lines using microwave biosensors", Sensors and Actuators A, 2014, Vol. 216, pp. 405–416.

[60] T.Chen, D. Dubuc, M. Poupot, J-J. Fournié, K.Grenier, "Accurate nanoliter liquid characterization up to 40 GHz for biomedical applications: toward non-invasive living cells monitoring", IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques, 2012, Vol. 60, No. 12, pp. 4171-4177.

[61] T. Chen, F. Artis, D. Dubuc, J.J. Fournié, M. Poupot, K. Grenier, "Microwave biosensor dedicated to the dielectric spectroscopy of a single alive biological cell in its culture medium", IEEE/MTT-S International Microwave Symposium, 2-7 June 2013, pp. 1-4.

[62] Y. Yang, H.Zhang, J.Zhu, G.Wang, T.R. Tzeng, X. Xuan, K.Huangb and P. Wang, "Distinguishing the viability of a single yeast cell with an ultra-sensitive radio frequency sensor", Lab Chip, 2010, Vol. 10, pp. 553–555.

[63] Y.Yang, Y.He, H.Zhang, K.Huang, G.Yu, and P. Wang, "Measuring the Microwave Permittivity of Single Particles", BioWireleSS 2013 Proceedings, 20-23 January 2013, pp. 28-30.

[64] A.Abduljabar, X.Yang, D. Barrow, and A.Porch, "Microstrip Split Ring Resonator for Microsphere Detection and Characterization", IEEE/MTT-S International Microwave Symposium, 17-22 May 2015.





1. Introduction

Au cours de ce second chapitre, nous allons nous intéresser à la mise au point et la fabrication d'un capteur électromagnétique pour l'analyse diélectrique de liquides. Comme nous l'avons montré dans le premier chapitre, l'utilisation des fréquences micro-ondes présente plusieurs avantages pour la caractérisation de liquides ainsi que pour celle de cellules biologiques. En effet, la spectroscopie diélectrique HF, contrairement aux méthodes conventionnelles, permet en passant outre la membrane cellulaire d'interroger directement le contenu intracellulaire dans sa globalité. De plus, ces fréquences permettent de travailler avec des dispositifs miniaturisés mieux adaptés à la taille de petits échantillons. Couplé aux technologies microfluidiques, il est alors possible de réduire drastiquement les volumes d'analyse. Cela présente également l'avantage de limiter la perturbation introduite par le liquide à analyser sur les dispositifs RF et de maintenir à un bon niveau leur sensibilité. De plus, les méthodes de spectroscopie HF sont des techniques d'analyse non-invasives, qui ne nécessitent pas le recours à d'immuno-marqueurs. De ce fait, les échantillons analysés peuvent, si besoin, être réutilisés après leur caractérisation pour des tests complémentaires.

Dans ce contexte, nous nous sommes concentrés en premier lieu sur le développement d'un capteur RF miniature pour l'analyse de liquide de très faible volume, (gamme du nanolitre), sur une large bande de fréquence de 400 MHz jusqu'à 8 GHz. Nous verrons le design et l'optimisation du capteur capacitif qui présente en particulier des électrodes métalliques épaisses en or optimisées pour garantir un champ électrique homogène dans la zone de détection et ainsi effectuer des analyses avec une grande sensibilité. En premier lieu, une procédure de calibration du capteur a été développée et utilise différents mélanges d'eau et d'éthanol de permittivité connue. Ensuite, les performances de détection et d'analyse du capteur microfluidique proposé seront démontrées au travers de la caractérisation de différentes solutions. La partie réelle de leur permittivité relative a été extraite et comparée à la fois à la littérature et à des mesures réalisées avec une sonde coaxiale commerciale.



2. Conception du capteur

Comme nous l'avons vu lors de l'étude bibliographique du premier chapitre, les méthodes de détection électriques HF pour la caractérisation de matériaux se catégorisent principalement en deux grandes familles : les méthodes large bande et les méthodes résonantes. Les méthodes résonantes ne permettent de déterminer les propriétés diélectriques du matériau que pour une fréquence unique ou un spectre très étroit. En revanche, ces méthodes sont connues pour avoir une très bonne sensibilité. De façon alternative, les méthodes non résonantes sont également intéressantes car elles sont basées sur des techniques large bande qui permettent d'accéder aux propriétés diélectriques des matériaux sous test sur une large gamme de fréquences.

C'est pourquoi, dans nos travaux, nous allons plus particulièrement nous intéresser aux méthodes de caractérisation de matériaux large bande. Dans ce cas, les propriétés des matériaux peuvent être extraites à partir de la réflexion des ondes sur le matériau diélectrique, ou de leur transmission au travers du matériau à analyser comme l'illustre la Figure II.1. En effet, les caractéristiques des ondes mesurées, que ce soit en réflexion ou en transmission, permettent de déterminer les caractéristiques de propagation dans le matériau et d'en déduire des informations sur les propriétés diélectriques du matériau [1].



Figure II.1. Comportement d'une onde électromagnétique interagissant avec un matériau diélectrique [1].

Généralement le mécanisme de mesure en transmission ou en réflexion des propriétés diélectriques hautes fréquences d'un matériau utilise une source qui émet un champ électromagnétique, et d'après les lois physiques décrivant la théorie des champs



électromagnétiques, une partie de ce champ est réfléchi et l'autre partie traverse le matériau à analyser, il s'en suit une interaction champ-matière qui impacte le champ électromagnétique. Un récepteur est requis pour capter ce changement de champ et par conséquent, il s'agit d'une séquence : source-interaction-récepteur.

L'objectif de ces travaux de thèse, va être d'extraire les propriétés diélectriques, dans la gamme des hyperfréquences, de certains matériaux liquides ou de solutions de particules en suspension). Ces propriétés diélectriques sont représentées par la permittivité qui est un paramètre essentiel pour étudier les mécanismes de couplage matériau/champ électromagnétique. Comme nous l'avons indiqué dans le premier chapitre, la permittivité complexe relative d'un milieu est définie par l'équation (2.1).

$$\varepsilon^* = \varepsilon' - j\varepsilon'' \tag{2.1}$$

En général la partie réelle ε ' et imaginaire ε '' ne sont pas constantes et dépendent de la fréquence et de la température. Comme nous l'avons vu au cours du premier chapitre, les méthodes basées sur une détection capacitive sont parmi les solutions les plus utilisées pour l'analyse de liquides. Cette méthode de détection paraît en effet très prometteuse pour les applications de détection de matériaux diélectriques en raison de nombreux avantages comme la simplicité des circuits et l'existence d'équations fondamentales pour extraire les propriétés diélectriques du matériau à analyser. Cette méthode consiste à placer le matériau à analyser entre deux électrodes se faisant face de façon à former un condensateur d'admittance Y, comme l'illustre la Figure II.2. L'introduction d'un matériau entre les armatures engendre une variation de capacité qui peut être directement reliée à la permittivité relative du matériau sous test. La plupart du temps, les électrodes sont formées avec une couche fine de conducteur (comme le cuivre ou l'or) de moins de 1µm d'épaisseur. L'objectif de ces travaux va consister à développer une méthode de détection capacitive basée sur l'utilisation d'électrodes épaisses (de l'ordre de 10 µm) de façon à augmenter la sensibilité de détection.





Figure II.2. Admittance d'une capacité : (a) formée par deux armatures et l'air comme diélectrique, (b) formée par deux armatures et un diélectrique.

2.1 Présentation du capteur microfluidique développé pour l'analyse hyperfréquence de liquides

Le capteur développé est formé de deux éléments principaux : un circuit hyperfréquence couplé à un canal microfluidique. La première partie consiste à mettre en œuvre une structure RF capacitive qui permet d'effectuer des mesures large bande, donc qui ne présente pas de résonance dans la gamme de fréquences où nous souhaitons travailler. La deuxième contrainte à prendre en compte lors de la conception du dispositif RF est que sa topologie et ses dimensions doivent rester compatibles avec l'implémentation d'un réseau microfluidique pour des applications de type « Laboratoire sur Puce ». C'est pourquoi, nous avons opté pour les structures planaires qui répondent bien aux objectifs fixés, malgré les bonnes performances offertes par les structures 3D comme les guides d'onde volumique en terme notamment de facteur de qualité.

La Figure II.3 présente le circuit RF basé sur une ligne micro-ruban présentant une discontinuité en son centre qui forme une capacité série. Afin d'obtenir un circuit large bande il est nécessaire que la ligne micro-ruban reste le plus longtemps possible adaptée sur 50 ohms. Pour cela, la largeur de la ligne micro-ruban au niveau de la SU-8 et du capot de PDMS (W2) est réduite de 30 µm par rapport à la largeur initiale W1. Au niveau de la zone de détection, la largeur de la ligne micro-ruban est progressivement rétrécie de façon à concentrer fortement le champ électromagnétique dans une zone restreinte pouvant contenir une particule de taille



micrométrique (Figure II.3). La distance inter-électrodes au niveau du gap capacitif sera de 17 μ m ou 22 μ m. Ces dimensions ont été choisies pour être par la suite compatibles avec la tailles des particules que nous aurons à analyser. Nous y reviendrons au cours du chapitre 3. La ligne micro-ruban est réalisée en cuivre puis recouverte d'or pour (i) des besoins de biocompatibilité, (ii) sa conductivité de l'ordre de 2,7.10⁷ S/m et (iii) sa bonne stabilité dans le temps (pas d'oxydation à l'air). La ligne RF est implémentée sur un substrat de silice fondue qui est un matériau biocompatible et qui présente une faible permittivité (de l'ordre de 3.83) et de faibles pertes.

Concernant le réseau microfluidique, l'objectif est de réaliser un canal qui permet de contrôler précisément la position et le volume du fluide en interaction avec le champ électromagnétique d'une manière reproductible pour éviter toutes variations de résultats de mesures. Un autre avantage de l'utilisation de la microfluidique est de pouvoir minimiser les zones d'interaction entre le champ électromagnétique et les liquides polaires qui présentent de fortes pertes aux fréquences micro-ondes et peuvent ainsi dégrader fortement les performances des capteurs.



Figure II.3. Représentation schématique de l'architecture du capteur microfluidique (a) vue de dessus – zoom sur la zone capacitive, (b) vue en coupe (échelle arbitraire).

Nous avons choisi pour sa fabrication d'utiliser la résine photosensible SU-8 puisque nous avons besoin d'une bonne précision d'alignement pour la superposition du canal sur la ligne micro-ruban. La structure microfluidique est donc constituée d'un canal en polymère SU-8, déposé sur la surface supérieure du dispositif. Les accès microfluidiques sont positionnés



perpendiculairement à la ligne RF pour limiter les problèmes d'encombrement lors des expérimentations. Le canal en SU-8 est fermé par un capot en PDMS.

La géométrie du canal microfluidique a été optimisée pour présenter une résistance fluidique suffisamment grande pour limiter la vitesse du liquide dans le canal. Ainsi l'introduction de méandres à l'entrée et à la sortie du canal permet également dans le cas d'injection de particules de les ralentir assez simplement et par conséquent de pouvoir les manipuler plus facilement. La Figure II.4 présente la structure du canal ainsi que ses dimensions. Les réservoirs d'entrée et de sortie dédiés à l'injection des fluides ont un diamètre de 2 mm et seront connectés au contrôleur de flux grâce à des micro-tubes en téflon. La largeur du canal microfluidique est majoritairement de 50 μ m. La largeur du canal a été augmentée au niveau de la zone de détection à 200 μ m. Cette augmentation de canal à deux objectifs : (i) réduire la vitesse du liquide et des particules au niveau de la zone d'analyse, (ii) résoudre des problèmes de fabrication que nous allons détailler parla suite.



Figure II.4. La structure du canal microfluidique.

Dans un premier temps, nous avons commencé les simulations pour le capteur réalisé sur un substrat de silice fondue de 500 μ m d'épaisseur (substrat classiquement utilisé au laboratoire). La largeur des lignes RF est choisie de façon à ce que la ligne présente une impédance caractéristique de 50 ohms. Cela fixe la largeur de la ligne à 1,05 mm. Comme on peut le voir sur la Figure II.5, les simulations électromagnétiques (EM) ont montré que des effets de résonance commençaient à apparaître aux alentours de 12 GHz ce qui ne permet pas l'utilisation de ce capteur sur une bande au-delà de 10 GHz. Ce phénomène de résonance s'explique principalement par le fait qu'une partie non négligeable du champ électromagnétique pénètre dans le substrat de silice fondue et une autre partie du champ rayonne. Le risque ici est de voir cette résonance changer de fréquence en fonction du type de liquide analysé et de ses propriétés propres, ce qui réduirait fortement la bande d'analyse effective utilisable. Pour éviter



ce problème et minimiser la quantité du champ électromagnétique qui rayonne, nous avons choisi d'avoir recours à des substrats de silice fondue de plus faible épaisseur.



Figure II.5. Variation du paramètre de transmission S_{21} du capteur (canal rempli d'air) sur un substrat de silice fondue de 500µm d'épaisseur.

Nous avons donc réduit l'épaisseur du substrat à 200 μ m. Les dimensions de la ligne ont donc été recalculées (Tableau 2.1). Le capteur est donc formé d'une ligne d'impédance caractéristique de 50 ohms et de largeur W1 (410 μ m). Au niveau du réseau microfluidique la largeur W2 de la ligne RF passe à 380 μ m pour maintenir son impédance à 50 ohms (Figure II.3). La largeur totale de la structure RF est de 11 mm. Cette largeur a été fixée pour des raisons de contrainte de fabrication. Nous avons choisi une largeur pour le capot de PDMS de 5 mm, taille minimale pour pouvoir l'aligner à la main simplement sur la puce et le connecter aux tubes téflon sans risquer de déchirures.

Dimension	Valeur		
W1	410µm		
W2	380µm		
LPDMS	5mm		
L _{SU8}	5mm		
LSILICE FONDUE	11mm		

Tableau 2.1.Dimensions du capteur.

Grâce au logiciel de simulation électromagnétique 3D HFSS d'ANSYS, la distribution du champ électromagnétique ainsi que les paramètres S de la structure RF ont été simulés.



La Figure II.6 présente la distribution du champ électrique sur le capteur dans le cas où le canal de 200 μ m de largeur est rempli d'air (capteur à vide). L'espacement entre les électrodes est de 17 μ m. Ces résultats montrent que la structure concentre le champ électrique au niveau de la rupture capacitive. Cette zone qui présente une intensité de champ électrique élevée (de l'ordre de 5.10⁵ V/m), représente donc la zone sensible dans laquelle l'interaction liquide-champ est maximale. Elle constituera donc la zone de détection privilégiée du capteur.



Figure II.6. Distribution du champ électrique (vue de dessus).

Les paramètres S simulés de la structure sont présentés sur la Figure II.7. La courbe rouge décrit la réponse en transmission du capteur lorsque le canal microfluidique est rempli d'air (c'est-à-dire à vide). La courbe bleue présente la réponse en réflexion à l'entrée du capteur dans les mêmes conditions.



Figure II.7. Variation du paramètre de transmission S₂₁ (courbe rouge) et de réflexion S₁₁ (courbe bleue) lorsque le canal microfluidique est rempli d'air (à vide).



Le capteur développé présente donc une réponse purement capacitive sur la bande de fréquence visée (400 MHz – 8 GHz) ce qui va nous permettre d'effectuer des caractérisations large bande et de les coupler à une modélisation simple : capacité série entre deux lignes 50 ohms. En effet, à partir de l'évolution du paramètre de transmission S₂₁ du capteur en fonction de la fréquence, il est possible d'extraire l'évolution de la capacité globale du capteur, grâce à l'équation (2.2) où Z_0 représente l'impédance caractéristique à l'entrée soit 50 ohms.

$$C_{vide} = \sqrt{\frac{|S_{21}|^2}{4\omega^2 Z_0^2}}$$
(2.2)

Comme le montre la Figure II.8 la capacité globale du capteur à vide est constante et vaut 4,4 fF, ce qui est logique ici puisque la permittivité de l'air est constante et égale à 1 sur toute la gamme de fréquences.



Figure II.8. Variation de la capacité globale du capteur à vide.

Afin d'étudier et d'optimiser la sensibilité du capteur, l'impact de l'introduction d'un liquide sur la variation de la capacité globale du capteur a été évalué. Pour ce faire, nous avons utilisé des liquides dont les permittivités sont bien connues et tabulées comme par exemple l'eau pure [2] ou des mélanges à différentes concentrations d'eau/éthanol [3].

Dans le cas de l'eau pure ou de mélanges eau/éthanol, la permittivité relative varie en fonction de la fréquence en suivant des lois de type Debye (équation 2.3) comme discuté dans le chapitre 1.

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'_{\infty} + \frac{\varepsilon'_S - \varepsilon'_{\infty}}{1 - j\omega\tau_R}$$
 et $\omega = 2\pi f$ (2.3)

86

Où ε'_{s} correspond à la permittivité statique (à basse fréquence), ε'_{∞} la permittivité à haute fréquence et τ_{R} le temps de relaxation. Pour les différents mélanges, les paramètres qui permettent de tracer la variation de permittivité en fonction de la fréquence sont présentés dans le tableau 2.2.

% massique	ε	$\dot{\mathcal{E}_{\infty}}$	$\tau_{\rm R}$ (ps)
Ethanol 100%	24,47	2,6	164,9
88,3% d'éthanol et 11,7 % d'eau	30,42	3,61	97,90
58% d'éthanol et 42 % d'eau	47,21	4,06	41,79
41,5% d'éthanol et 58,5 d'eau	56,9	4,52	28,62
22% d'éthanol et 78 % d'eau	67,89	4,11	17,8
Eau pure	78.32	4.57	8.38

Tableau 2.2. Paramètres de relaxation diélectrique pour différents liquides à 25°C [2-3].

La Figure II.9 représente l'évolution de la partie réelle et imaginaire de la permittivité en fonction de la fréquence de chaque milieu liquide choisi (pris à une température de 25°C). Ces variations de valeurs de permittivité pour les différents mélanges ont été introduits dans le logiciel HFSS afin d'étudier en simulation la variation de la réponse en transmission du capteur pour chaque mélange.







Figure II.9. (a) Evolution de la partie réelle de la permittivité (b) de la partie imaginaire de la permittivité en fonction de la fréquence pour différents milieux aqueux [2-3].

L'introduction de ces différents liquides dans le canal microfluidique modifie la permittivité complexe du volume intérieur du canal. Ces variations de caractéristiques diélectriques du milieu de propagation de l'onde électromagnétique perturbent donc la réponse en transmission du capteur. Cette perturbation au niveau du S₂₁, se traduit par une variation de la capacité globale du capteur. Comme le montre la Figure II.10, la variation de la capacité globale du capteur suit la même allure que la variation de la partie réelle de la permittivité du liquide. Lorsque la fraction d'éthanol augmente dans le mélange, la capacité globale du capteur diminue puisque la partie réelle de la permittivité du mélange eau/éthanol diminue.



Figure II.10. Variation de la capacité globale du capteur à la présence de différents liquides dans le canal microfluidique.



Pour évaluer la variation de la valeur de la capacité en fonction de la permittivité, nous avons tracé l'écart capacitif ΔC obtenu en simulation en fonction de $\Delta \varepsilon'$ définit par l'équation (2.4).



Figure II.11. Evolution de l'écart capacitif ΔC en fonction de la variation de la partie réelle de la permittivité ($\Delta \varepsilon'$) (référence prise par rapport à l'air).

La Figure II.11 montre que l'évolution de l'écart de la capacité globale du capteur (ΔC) varie linéairement par rapport à la variation de la partie réelle de la permittivité ($\Delta \varepsilon'$) des fluides présents dans le canal microfluidique. Par exemple une variation de 13,14 de la partie réelle de la permittivité par rapport à la permittivité de l'air à 1 GHz, génère un décalage capacitif de 8,57 fF.

2.2 Etalonnage du capteur microfluidique

Dans l'objectif de caractériser un liquide de permittivité inconnue, il est nécessaire d'étalonner le capteur pour avoir des références de mesure. Pour ce faire, nous avons choisi l'eau pure (Eau pour la biologie moléculaire dont la résistivité est à minima supérieure à 10 M Ω .cm à 25°C) et les différents mélanges eau/éthanol qui nous ont servis dans la section 2.1 pour la simulation et l'optimisation de la sensibilité du capteur. Ainsi, les différents liquides étalons que nous allons utiliser sont l'eau pure, l'éthanol pur, 22% d'éthanol dans l'eau, 41,5% d'éthanol dans l'eau et 58% d'éthanol dans l'eau.

Donc la réponse du capteur a été calculée à l'aide du simulateur HFSS avec la présence de ces différents liquides de références dans le canal microfluidique. Etant donné que la permittivité des liquides est différente, le maillage dans la zone de détection généré par le

89

logiciel HFSS n'est forcément pas le même en fonction du liquide considéré. Ce changement au niveau du maillage influence les résultats de simulation et peut introduire des erreurs dans leur interprétation. Pour s'affranchir de ce problème et s'assurer d'un maillage identique quel que soit le cas étudié, nous avons utilisé la méthodologie suivante, valable sur une structure à géométrie constante. Une première simulation, pour laquelle une forte permittivité (150) est imposée dans le canal microfluidique est réalisée. Cette simulation permet de générer un maillage dense du canal notamment au niveau de la zone de détection. Le maillage généré est ensuite exporté et réutilisé pour une seconde simulation pour laquelle la permittivité imposée dans le canal et égale à celle du mélange étudié. Les valeurs de permittivité considérées pour les différents liquides étalons sont calculées à partir du modèle de Debye (Figure II.9).

Le Tableau 2.3 résume la partie réelle de la permittivité de chaque liquide étalon à 6 GHz.

	Ethanol	Ethanol 58%	Ethanol 41%	Ethanol 22%	Eau pure
ε'	4,92	20,69	32,06	50,47	71,69



À partir de ces simulations, nous avons tracé la variation de la capacité globale du capteur, sur chaque fréquence, en fonction de la permittivité du liquide présent dans le canal microfluidique.

Comme le montre la Figure II.12, la variation de la capacité globale du capteur en fonction de la partie réelle de la permittivité des différents liquides étalons prend la forme d'une équation du second degré (2.5).

$$C_{capteur}(fF) = a \cdot {\varepsilon'}^2 + b \cdot {\varepsilon'} + c$$
(2.5)



Figure II.12. Variation de la capacité globale du capteur en fonction de la partie réelle de la permittivité des liquides étalons à 2 GHz(a), à 6 GHz(b).



Ces équations représentent les courbes d'étalonnage du capteur pour chaque fréquence. Donc, pour chaque fréquence, nous avons à résoudre ces équations afin de déterminer la permittivité du liquide présent dans le canal microfluidique. Pour résoudre ces équations du second degré, nous commençons par le calcul du déterminant Δ (équation 2.6).

$$\Delta = b^2 - \left(4 \cdot a \cdot \left(c - C_{capteur}\right)\right)$$
(2.6)

Dans tous les cas pratiques rencontrés, la valeur de Δ était toujours supérieure à 0. Donc, les solutions de l'équation du second degré nous donnent deux possibilités :

$$\varepsilon'_1 = \frac{\left(\sqrt{\Delta} - b\right)}{2a}$$
 ou $\varepsilon'_2 = \frac{\left(-\sqrt{\Delta} - b\right)}{2a}$ (2.7)

La deuxième solution ε'_2 étant négative, elle est éliminée puisque la partie réelle de la permittivité ne peut pas être négative. ε'_1 est donc la seule solution valable.

Pour vérifier la méthodologie proposée, nous avons effectué une simulation avec un liquide de permittivité différente des liquides étalons. Nous avons pour cela considéré un mélange de 88,3% d'éthanol dans l'eau. Dans cette simulation, nous avons introduit les valeurs de la permittivité complexe obtenue par le modèle de Debye (cf. Tableau 2.2 et la Figure II.9). En utilisant l'équation (2.1), à partir des paramètres S obtenus, nous avons extrait la variation de capacité en fonction de la fréquence. Les valeurs de capacité trouvées sont utilisées pour résoudre les équations du second degré déterminées pour chaque fréquence.



Figure II.13. Méthode de calcul de la partie réelle de la permittivité par projection sur la courbe d'étalonnage.

Par exemple, à la fréquence 6 GHz, la capacité du capteur en présence du mélange de 88,3% d'éthanol est égale à 9,81 fF. Si on place cette valeur de capacité sur la courbe



d'étalonnage, nous obtenons directement la valeur de la permittivité du liquide à 6 GHz (Figure II.13). Ainsi à partir de cette capacité et à l'aide de l'équation d'étalonnage présentée sur la Figure 12.(a), nous avons trouvé que la valeur de permittivité du liquide doit valoir 7,75 à 6 GHz ; cette valeur est très proche de la valeur introduite dans le logiciel HFSS à 6 GHz qui est de 7,8 et valide par conséquent la méthodologie. Les différents paramètres pour résoudre l'équation du second ordre à 6GHz sont résumés dans le Tableau 2.4.

$C_{capteur}(fF)$	а	b	С	Δ	$oldsymbol{arepsilon_1}'$	$m{arepsilon}_{Lit ext{{\it e}rature}}^{\prime}$
10.905	-0,0022	0,7632	4,0237	0,531	7,755	7,8

Tableau 2.4. Résolution de l'équation du second ordre à 6GHz.

3. Fabrication des capteurs

Nos capteurs dédiés à la spectroscopie diélectrique HF de liquides ont été fabriqués grâce à des procédés de microfabrication standards (dépôt de couche mince, photolithographie, gravure, électrolyse...). La fabrication de ces capteurs comporte plusieurs étapes:

- ✤ La première étape consiste à définir le circuit HF sur le substrat de silice fondue,
- ◆ La deuxième étape consiste à définir le canal microfluidique sur le circuit HF,
- La troisième étape consiste à fabriquer le capot en PDMS qui permettra de fermer le micro-canal,
- ◆ La dernière étape consiste à reporter et sceller le capot de PDMS sur le capteur.

Avant de commencer les étapes de fabrication du capteur, le substrat de silice fondue est nettoyé avec de l'acétone pendant 5 minutes dans un bain à ultrasons et ensuite avec de l'isopropanol (également pendant 5 minutes). Cette étape de nettoyage a pour objectif d'éliminer des résidus organiques qui pourraient polluer la surface du substrat de silice fondue. Afin de désorber le substrat, nous le passons ensuite sur une plaque chauffante à 150°C pendant 5 minutes.

Après cette étape de nettoyage, les différentes étapes décrites ci-après peuvent être mises en œuvre.



3.1. Elaboration du circuit HF

Une fois le nettoyage et la déshydratation des substrats effectués, l'étape suivante consiste à définir les lignes métalliques hautes fréquences (HF). Ces lignes de métallisation, réalisées en cuivre, n'ont pas de très bonnes propriétés d'adhérence naturelle sur la silice fondue. Pour assurer l'adhérence du cuivre sur le substrat, nous avons donc déposé une couche de titane entre la métallisation et le substrat. Afin d'éviter l'oxydation du film de cuivre qui permettra l'amorce durant la phase d'électrolyse utilisée pour atteindre des épaisseurs de plusieurs micromètres, nous l'avons recouverte d'une fine couche de titane au-dessus des métallisations de cuivre évaporé.

Ces 3 couches Ti/Cu/Ti, sont déposées par évaporation par faisceau d'électrons. Cette technique de dépôt se fait, dans un bâti sous vide, avec une pression inférieure à 10⁻⁶mbar. Le principe de cette méthode de dépôt est d'exposer une pastille métallique, composée du métal que l'on souhaite déposer, à un faisceau d'électrons afin de le vaporiser localement par effet Joule [4]. L'épaisseur de dépôt est contrôlée par une balance à quartz comme le montre la Figure II.14. Dans notre cas, l'épaisseur des couches de titane est de l'ordre de 10 nm, et celle de cuivre est de 130 nm.



Figure II.14. Principe de dépôt par évaporation par faisceau d'électrons [4].

Après le dépôt des 3 matériaux (titane/cuivre/titane) sur toute la surface du substrat, il est nécessaire d'épaissir localement la métallisation de cuivre au niveau des lignes HF. Pour réaliser cette phase, une électrolyse partielle des lignes de cuivre jusqu'à des épaisseurs de l'ordre de 10 µm est réalisée. Au début de cette étape, un moule de masquage est fabriqué à la surface du substrat par photolithographie à l'aide de la résine négative AZ 15nXT, qui permet



de réaliser des épaisseurs importantes avec un fort facteur de forme. Cette étape est nécessaire afin de protéger les zones où l'on ne souhaite pas déposer de cuivre.

Après le dépôt à la tournette de la résine et son recuit, elle est ensuite insolée au travers d'un masque définissant les motifs du circuit HF (étape A de la Figure II.15). Les parties non insolées de la résine sont sensibles et seront développées au moyen d'une solution de développement appropriée (étape B de la Figure 15). Une fois la résine bien développée, la couche protectrice de titane qui permet d'éviter l'oxydation du cuivre, est enlevée juste avant de réaliser l'électrolyse des motifs de métal non protégés par le moule (étape C de la Figure II.15).



Figure II.15. Procédé technologique utilisé pour la fabrication du circuit HF.



Avant de commencer l'électrolyse de cuivre, le substrat est plongé dans de l'acide sulfurique à 10% pendant 30 secondes afin d'en nettoyer la surface de tout oxyde de cuivre. La présence de cet oxyde dégraderait fortement l'interface entre le cuivre évaporé et le cuivre électrolytique et provoquerait des décollements et arrachements de métallisation par la suite.

Le dépôt électrolytique se fait grâce au montage présenté sur la Figure II.16. Il est constitué d'une source d'alimentation connectée en série avec deux armatures qui sont plongées dans une solution électrolytique de sulfate de cuivre placé sous une légère agitation à température ambiante. L'armature connectée à la borne positive de la source de courant, appelée anode, est formée par une électrode de titane platinée qui ne réagit pas avec la solution. La cathode est l'armature où le substrat doit être fixée et liée à la borne négative du générateur du courant (Figure II.16). Lorsqu'un courant est appliqué entre les deux armatures, les ions positifs de cuivre migrent jusqu'à la cathode afin de se déposer sur les métallisations existantes sur le substrat de façon à les épaissir. Le courant à appliquer entre les deux armatures est calculé à partir de la surface effective de cuivre exposée à la solution d'électrolyse. Une fois l'épaisseur de cuivre désirée obtenue, le substrat est rincé à l'eau déionisée puis séché à l'air sec (étape D de la Figure II.15).



Figure II.16. Banc d'électrolyse de cuivre.

L'étape suivante consiste à dorer la surface du cuivre. Pour ce faire, il est nécessaire d'enlever la couche de résine AZ 15nXT de sorte que les flans des lignes RF soient également recouverts d'or. Pour cela, initialement nous enlevons la résine par voie humide en utilisant un



solvant puissant (du type N-méthyle pyrrolidinone, NMP) chauffé à 65°C. L'inconvénient de cette méthode d'attaque chimique est qu'elle peut provoquer le décollement des métallisations épaisses de cuivre. Nous avons donc finalement opté pour une méthode de gravure sèche, qui consiste à enlever la résine par gravure ionique réactive aussi appelée RIE (pour Reactive IonEtching) sous atmosphère d'oxygène. Cette technique de gravure sèche, se déroule au sein d'une enceinte sous vide. Le principe repose sur la collision ionique et les réactions chimiques provoquées entre le gaz ionisé et les surfaces de l'échantillon. Dans notre cas, le but est d'enlever la couche de résine AZ 15nXT.Nous avons donc utilisé, pour la création du plasma, deux types de gaz : de l'oxygène (O₂) et de l'hexafluorure de soufre (SF₆). La présence du SF₆ accélère la gravure de la résine. En revanche, elle peut rapidement réagir avec la couche de titane qui subsiste sur le substrat et dont nous avons besoin pour réaliser la dorure. Par conséquent, la couche de résine est gravée en deux étapes. La première étape consiste à créer le plasma dans un mélange SF₆/oxygène pendant 9 minutes. Pendant cette étape, l'épaisseur de la résine est très significativement réduite. Ensuite, un plasma d'oxygène pur est appliqué pendant 20 minutes pour terminer la gravure de la résine tout en préservant la couche de titane recouvrant la couche d'amorce de cuivre évaporée au canon à électron.

Une fois toute la résine enlevée, le substrat est plongé, pour quelques minutes, dans un bain électrolytique, constitué d'aurocyanure de potassium, et porté à 55°C sous agitation. De même que pour l'électrolyse de cuivre, un courant est appliqué entre l'anode et la cathode pour provoquer un déplacement des particules d'or présentes dans le mélange. Les particules d'or se déposent alors sur les métallisations qui ne sont pas protégées parla couche de titane qui a été oxydé en surface par le plasma d'oxygène. En effet, l'accroche des particules d'or sur le cuivre est plus rapide que sur le titane ce qui permet de faire un dépôt sélectif sur le cuivre. En revanche, si le courant appliqué est trop élevé, l'accroche des particules d'or sur la couche de titane peut être trop rapide. De plus, pour obtenir une électrolyse homogène et une couche peu contrainte, le courant à appliquer ne doit pas être trop élevé. Le temps d'électrolyse est également un paramètre important. Il ne doit pas être trop élevé pour garantir la tenue de l'oxyde de titane dans le bain pendant l'électrolyse. Il est donc nécessaire de trouver des compromis entre les temps d'électrolyse qui n'excéderont pas 3 minutes et la valeur des courants à appliquer.

Après la dorure des lignes de cuivre, le substrat est à nouveau soumis à une étape de gravure plasma (RIE) pour éliminer la couche de titane restante. Pour finir, la couche de cuivre puis la couche de titane qui se trouvent au-dessous sont gravées par voie chimique (une solution



diluée à 10% d'acide fluorhydrique HF est utilisée pour le Titane) pour obtenir les motifs souhaités des lignes HF.

Une fois les lignes RF réalisées, il est nécessaire de fabriquer le réseau microfluidique en résine SU-8. Pour ce faire, la résine SU-8 est déposée à la surface du circuit après son nettoyage par un plasma d'oxygène à 150 W pendant 2 minutes. La résine est déposée avec une épaisseur de 25 µm qui correspond à l'épaisseur visée du canal microfluidique.

D'un point de vue technologique, nous avons choisi d'utiliser la résine SU-8 2025 (MicroChem), car elle permet d'atteindre des épaisseurs allant de 20 à 70 μ m. Après dépôt et recuit de cette résine, le canal microfluidique est ensuite formé par photolithographie UV. Comme le montre la Figure II.17, le canal microfluidique formé par la SU-8 est plus large au niveau du croisement du canal avec les électrodes RF (de l'ordre de 200 μ m au niveau des électrodes et de 50 μ m ailleurs). Ce choix de dimension a été fixé pour favoriser une meilleure pénétration de la solution de développeur entre les électrodes. Lorsque la largeur du canal est de 50 μ m, le développeur de la SU-8 n'arrive pas à bien pénétrer entre les électrodes et le développement de la résine s'est souvent avéré incomplet : problématiques de tension de surface liées à la forte épaisseur des électrodes.



Figure II.17. Photographie du canal microfluidique formé en SU-8 sur les électrodes RF fabriqué dans la salle blanche d'XLIM.

Une fois que le canal microfluidique est bien défini, il est nécessaire de fabriquer le plan de masse en face arrière du substrat.

Avant de commencer cette étape, la face avant du substrat est protégée à l'aide d'une résine positive (S1828). En premier lieu, une couche de titane épaisse (de 40 nm d'épaisseur) a été déposée sur la surface arrière pour diminuer les effets d'inhomogénéité de réflexion de la lumière lors de l'observation au microscope des capteurs. Cette couche de titane est déposée



par évaporation par faisceau d'électrons. Ensuite, une feuille d'aluminium de 50 µm d'épaisseur est collée avec de la colle d'argent époxy. Le substrat est ensuite mis dans le four à 75°C pendant 2 heures. L'utilisation de cette feuille d'aluminium permet ici de limiter les étapes chimiques, nécessaires à l'obtention d'un plan de masse suffisamment épais, qui pourraient dégrader la bonne tenue mécanique et les propriétés de surface de la SU-8.

L'étape finale consiste à fabriquer le capot de PDMS qui fermera le canal microfluidique.

3.2 Préparation du PDMS

Le canal microfluidique étant défini par la résine SU-8, le PDMS est préparé pour former un bloc lisse et uniforme. Il sera donc coulé sur un substrat de silicium vierge et préalablement nettoyé dans un bain d'acétone et ensuite dans un bain d'IPA.

Afin de faciliter le démoulage du PDMS, nous avons réalisé en premier lieu un traitement de surface du substrat en silicium qui est exposé à des vapeurs d'hexaméthyldisiloxane (HMDS) pendant toute la durée de préparation du PDMS.

Le PDMS est ensuite préparé à l'aide du kit Sylgard[®]184 (Dow Corning) qui est composé de deux composés : l'élastomère visqueux et un agent réticulant. L'élastomère et l'agent réticulant sont mélangés en proportion de 10 pour 1. Une fois que la solution est bien mélangée, elle est dégazée sous une cloche à vide pendant environ 30 minutes. Ensuite, le mélange est versé sur le substrat de silicium, placé dans un contenant en plastique. L'ensemble est placé à l'étuve à 75°C pendant 2h. À la fin de cette étape, le PDMS réticulé peut alors être décollé du substrat. L'épaisseur du PDMS fabriqué est d'environ 0,5 cm. Ensuite le PDMS est découpé en petits morceaux afin qu'il s'adapte sur les capteurs. Des trous sont percés à chaque extrémité du morceau de PDMS pour permettre le passage des tubes qui permettront d'amener le liquide jusqu'aux réservoirs.

Les capots sont enfin prêts à être assemblés avec les capteurs. Pour ce faire, nous avons dans un premier temps opté pour une méthode de packaging qui consiste à sceller de façon irréversible la SU-8 et le PDMS par traitement chimique de la SU-8. Le protocole de silanisation utilisé a été développé dans le cadre des travaux de thèse de F. Hamdi [5]. Pour le traitement de surface de la SU-8, le circuit RF a été plongé dans une solution à 10% d'APTMS (Aminopropyltrimethoxysilane) pendant 5 minutes et placé dans un four à 110°C pendant 30 minutes. Ensuite, et après le nettoyage de la pièce de PDMS avec du méthanol, les deux pièces



sont exposées à un plasma d'oxygène pendant 45 secondes. La surface du PDMS exposée au plasma est ensuite alignée et collée sur le circuit RF et placée dans un four à 70°C en exerçant une pression uniforme sur le circuit. L'alignement du PDMS sur le circuit RF a été fait de façon manuelle sous un microscope. Pour faciliter l'alignement, des marques ont été prévues sur le circuit RF. Ces marques d'alignement se présentent sous la forme d'un cercle au centre de chaque réservoir. Donc, un bon alignement est assuré par la superposition des centres des trous des réservoirs percés dans le PDMS aux cercles d'alignement du circuit.



Figure II.18. Prototype d'un capteur microfluidique RF fabriqué dans la salle blanche d'XLIM.

La Figure II.18 montre un exemple de capteur après assemblage avec cette méthode. Cependant, il est possible parfois de rencontrer des problèmes de fuites en raison des étapes qui suivent le dépôt de la SU-8 et qui peuvent modifier son état de surface en défaveur du procédé de silanisation. De plus, cette méthode de packaging ne permet pas un nettoyage efficace du canal microfluidique. Donc lorsque le canal est bouché, par exemple par un amas de particules, le capteur n'est plus utilisable.

Pour éviter ces deux principaux problèmes, nous avons développé une autre solution de packaging, qui permet de fixer de façon réversible la pièce de PDMS sur la SU-8. Cette méthode consiste à maintenir la pièce de PDMS sur le circuit RF par une pression mécanique qui est exercée à l'aide de deux plaques métalliques. Le niveau de pression mécanique est réglé manuellement par un système de vis montées sur ressort comme le montre la Figure II.19.

Cette technique présente l'avantage de permettre le nettoyage de la surface des électrodes de façon efficace ce qui prolonge la durée de vie des capteurs et améliore la reproductibilité des mesures par un nettoyage et une mise à sec des capteurs irréprochables.

99





(a) (b) Figure II.19. (a) Vue de dessus du support de maintien mécanique (b) Exemple d'un capteur placé dans le support.

4. Expérimentations

4.1 Banc et méthode de mesures

Pour la mise en œuvre des mesures RF, une cellule Wiltron (Figure II.20) est utilisée puisque nous avons vu que pour optimiser les performances du capteur il était nécessaire de travailler avec un substrat de 200 µm d'épaisseur. En effet, de tels substrats sont fragiles et ne sont donc pas vraiment compatibles avec l'utilisation de connecteurs SMA. Cette cellule est connectée à un analyseur de réseaux vectoriel (Agilent Technologies E5071B). L'injection des échantillons liquides se fait grâce à un contrôleur de flux (MFCS de Fluigent) commandé par un ordinateur (cette méthode d'injection a été décrite dans la première partie du chapitre 1). De plus, l'observation des liquides au sein du capteur est effectuée à l'aide d'une caméra CCD connectée à un ordinateur comme le schématise la Figure II.20.

Avec ce banc, les paramètres S du capteur sont mesurés sur la bande 400 MHz à 8,5 GHz. Une calibration TRL (Thru-Reflect-Line) est utilisée de façon à ramener les plans de mesure au niveau de l'entrée et de la sortie du capteur et de s'affranchir ainsi de toutes les erreurs introduites par chaque élément de la chaine de mesure. Cette méthode de calibration consiste à utiliser trois étalons : une connexion directe de longueur L_{thru}, une ligne de transmission (Line) de longueur connue L et d'impédance caractéristique Z_c, et un troisième étalon qui présente une charge fortement réflective (un court-circuit ou un circuit ouvert).





Figure 20. Architecture du banc de mesures.

Une fois l'analyseur de réseau vectoriel calibré, nous pouvons mesurer la réponse en transmission du capteur. Le capteur utilisé pour ces caractérisations présente une distance interélectrodes de 17 μ m au niveau de la zone capacitive. Dans la partie suivante, nous allons détailler les procédures mises en œuvre de l'introduction du liquide dans le canal microfluidique jusqu'à l'extraction de la partie réelle de la permittivité complexe du liquide en fonction de la fréquence.

4.2 Caractérisation de différents milieux liquides

Après la calibration de l'analyseur de réseau vectoriel, et avant de commencer l'étape d'étalonnage du capteur avec les liquides étalons, nous avons tout d'abord comparé la réponse en transmission du capteur à vide à celle de la simulation. Dans les simulations, nous avons adapté les dimensions du circuit RF à celle du circuit fabriqué. Par contre, le canal microfluidique est défini avec une profondeur de 25 μ m (c'est-à-dire que l'épaisseur de la couche SU-8 est de 25 μ m). Or, pendant les mesures le PDMS est serré avec le support de maintien mécanique. Cette pression appliquée avec le support rétrécit la profondeur du canal. Ce changement de profondeur du canal explique le petit décalage obtenu par rapport à la simulation au niveau de la réponse en transmission du capteur comme nous montre la Figure II.21.





Figure II.21. Comparaison entre les résultats de simulation (courbe rouge) et mesure (courbe bleu) de S_{21} .

Une fois la réponse du capteur à vide vérifiée, nous passons à l'étape d'étalonnage de notre capteur hyperfréquence. La procédure d'étalonnage consiste à mesurer les paramètres S du capteur lorsque le canal microfluidique est rempli d'air (correspondant à la configuration dite de capteur à vide) puis par les différents liquides étalons : l'éthanol pur, 88,3% d'éthanol dans l'eau, 41% d'éthanol dans l'eau, et l'eau pure. Les liquides étalons sont préparés avec des micropipettes qui sont des systèmes de pipetage de précision. Afin de vérifier le bon dosage des liquides étalons préparés, nous avons effectué des mesures de leur permittivité, en parallèle avec les mesures de notre capteur, à l'aide d'une méthode de mesure utilisant une sonde commerciale. Ces mesures de permittivités complexes ont été effectuées avec une sonde coaxiale (Keysight/Agilent, 85070 probe Kit), présentée sur la Figure II.22 [6] et dont les résultats sont comparés aux modèles de Debye donnés par la littérature [2-3].



(a) (b) Figure II.22. (a) Sonde coaxiale (Keysight/Agilent, 85070 probe Kit), (b) banc de mesure à sonde coaxiale [5].



Cette méthode de caractérisation de liquides est classée parmi les méthodes de caractérisation de liquide en réflexion les plus utilisées. Elle est connue pour avoir une bonne précision de mesure avec un pourcentage d'erreur inférieur à 1% mais nécessite une dizaine de ml de liquide. Comme tout appareil de mesure hyperfréquence, la sonde nécessite une étape d'étalonnage avant de commencer la caractérisation des liquides. Pour l'étalonnage, nous avons utilisé un court-circuit, un circuit ouvert (air) et de l'eau déionisée. Une fois la sonde calibrée, nous avons pu caractériser les liquides étalons.

Ensuite, nous avons comparé les résultats, mesurés à l'aide de la sonde, avec les valeurs de permittivité trouvées dans la littérature [2-3]. Comme le montre la Figure II.23, nous obtenons une bonne concordance entre la permittivité mesurée avec la sonde et celle annoncée dans la littérature pour les différents liquides. Ceci nous permet de valider que les solutions étalons préparées ont bien la permittivité attendue. De plus, pour garantir une bonne précision, ces résultats de mesures, seront utilisés dans la suite pour extraire les courbes d'étalonnage.



Figure II.23. Evolution de la partie réelle de la permittivité des liquides étalons : Comparaison des mesures expérimentales avec la sonde coaxiale (symboles pleins) avec les données reportées dans la littérature (symboles creux).

La calibration du capteur est réalisée en utilisant l'éthanol pur et les mélanges à 88,3%et 41% d'éthanol dans l'eau. Nous avons chronologiquement mesuré notre capteur à l'air, puis à la présence des différentes concentrations d'éthanol de la plus grande concentration à la plus petite pour finir par l'eau pure. En effet, au cours de ces mesures, le niveau de transmission du signal (S₂₁) entre l'entrée et la sortie du capteur augmente lorsque la concentration en éthanol diminue. La permittivité de l'éthanol étant plus petite que celle de l'eau, quelle que soit la fréquence, plus la proportion d'eau est importante plus le niveau de S₂₁est élevé comme le



montre la Figure II.24. Donc, cet ordre d'injection permet d'éviter une contamination du mélange à mesurer par de l'eau qui augmenterait sa permittivité et assure que le liquide présent dans la zone de détection est bien celui que nous voulons mesurer.

A partir de ces mesures, la variation globale de la capacité du capteur en fonction de la fréquence est extraite à partir de la méthodologie détaillée dans la partie 2.2 de ce chapitre.



Figure II.24. Paramètres S de transmission normalisés (S₂₁) du capteur pour les différents étalons.

À partir de ces mesures, nous avons tracé la variation de la capacité globale du capteur, en fonction de la permittivité des différents milieux étalons, pour chaque fréquence de la bande de mesure. Cette variation nous a permis, comme prévu en simulation, de trouver une équation du 2^{ème} ordre sur chaque fréquence qui servira à extraire la permittivité de n'importe quel liquide de permittivité inconnue comme le montre la Figure II.25.



Figure II.25. Variation de la capacité en fonction de la permittivité à 1 GHz (courbe rouge) et à 2 GHz (courbe bleue) mesurée avec différents mélanges éthanol/eau.



Pour vérifier le bon étalonnage du capteur, nous avons souhaité caractériser dans un premier temps, deux mélanges de concentration en éthanol, différentes de celles utilisées pour calibrer le capteur. Ainsi, deux autres mélanges à 58% d'éthanol dans l'eau et 21% d'éthanol dans l'eau ont été caractérisés en mesurant leur permittivité diélectrique sur la bande de fréquences 400 MHz – 8 GHz. Ces données sont comparées à des mesures expérimentales réalisées avec la sonde coaxiale sur les mêmes mélanges. Comme le montre la Figure II.26, les résultats sont en bon accord et valident bien l'étape de calibration.



Figure 26. Comparaison de la partie réelle de la permittivité relative mesurée avec la sonde coaxiale (symboles vides) et avec le capteur développé (symboles pleins).

Cette première étude montre que la méthodologie proposée lors des simulations pour extraire la variation de la permittivité en fonction de la fréquence est efficace. Après cette étape de validation, nous avons cherché à caractériser d'autres liquides. Ainsi, dans le paragraphe suivant, nous allons détailler les résultats de mesures de caractérisation d'IsoPropAnol anhydre (IPA). Ces caractérisations ont également permis de réaliser une étude sur la reproductibilité des mesures qui sera aussi présentée.

5. Robustesse de la méthode d'étalonnage et fiabilité des capteurs microfluidiques

Pour réaliser cette étude de reproductibilité, nous avons souhaité utiliser une solution commerciale prête à l'emploi pour garantir que la même solution est caractérisée d'une mesure à l'autre à la différence d'un mélange de solutions préparé au jour le jour, et dont les caractéristiques pourraientévoluer dans le temps. C'est pourquoi pour cette étude, nous avons utilisé de l'IsoPropAnol Anhydre de la société SIGMA-ALDRICH.



Cela permettra de (i) démontrer la capacité du capteur à caractériser un liquide inconnu et non dérivé des liquides étalons et (ii) évaluer le niveau de reproductibilité des caractérisations.

5.1 Caractérisation de l'IsoPropAnol Anhydre (IPA)

Pour la caractérisation de l'IPA anhydre nous avons suivi la procédure décrite précédemment et résumée sur la Figure II.27. L'étape d'étalonnage du capteur se fait avec différents liquides éthanol/eau : l'éthanol 100%, 88,3% d'éthanol dans l'eau, 58% d'éthanol dans l'eau, 0,3% d'éthanol dans l'eau et l'eau pure.



Figure II.27. Protocole de mesure suivi pour la détermination de la partie réelle de la permittivité de l'IPA.


Le protocole de mesure est donc le suivant :

- Mesure des paramètres S du capteur à vide (c'est-à-dire en présence d'air dans le canal microfluidique).
- Injection des différents liquides étalons un par un en commençant par l'éthanol pur, les différents mélanges éthanol/eau du plus concentré en éthanol au moins concentré (pour les raisons expliquées précédemment), jusqu'à l'eau pure pour finir.
- Enregistrement des paramètres S du capteur à la présence des différents liquides étalons (le canal est bien nettoyé et séché entre chaque mesure mais le capteur n'est pas démonté et le PDMS reste en place).
- Injection de l'échantillon à caractériser (dans notre cas l'IPA) et enregistrement des paramètres S du capteur.

Une fois que toutes les mesures sont effectuées, les différentes données sont traitées. La première étape consiste à exprimer la variation de capacité du capteur à la présence des différents liquides étalons en fonction de leur permittivité réelle. Cela permet d'extraire pour chaque fréquence l'équation de calibration du second degré (Figure II.28).



Figure II.28. Variation de la capacité globale du capteur en fonction de la partie réelle de la permittivité du liquide (a) à 2 GHz (courbe rouge), (b) à 4 GHz (courbe bleue).

Après l'extraction des équations de calibration du capteur pour chaque fréquence, la variation de la capacité globale du capteur à la présence de l'IPA sur la bande de fréquence 400 MHz-8 GHz est tracée d'après le fichier de mesure. A partir de ces valeurs de capacités et des



équations du second ordre, il est possible de déduire la variation de la partie réelle de la permittivité de l'IPA sur la bande de fréquence 400 MHz-8 GHz. Comme le montre la Figure II.29, la partie réelle de la permittivité de l'IPA mesurée avec le capteur (carrés bleus) est très proche des données de la littérature extraites à partir du modèle de Debye (triangles rouges).



Figure II.29. Comparaison de la partie réelle de la permittivité relative de l'IPA mesurée avec la sonde coaxiale (carrés verts), avec le capteur microfluidique (carrés bleus) et les données de Debye issues de la littérature (triangles rouges).

L'ensemble des mesures présentées ont été réalisées, comme nous l'avons déjà précisé, avec un capteur qui présente une distance inter-électrode de 17 μ m. Néanmoins, la taille du gap au niveau de la rupture capacitive ne doit pas influencer les résultats. Pour valider ce dernier point et vérifier l'influence de la taille du gap sur la mesure de la partie réelle de la permittivité du liquide sous test, nous avons réalisé des caractérisations avec un second capteur qui présente une capacité de détection avec une distance inter-électrodes de 22 μ m. La même méthodologie résumée Figure II.27 a été suivie pour mesurer la permittivité de l'IPA avec ce nouveau capteur. La Figure II.30 compare les résultats obtenus avec les deux capteurs présentant des gaps différents (17 et 22 μ m). Ces deux campagnes de caractérisation réalisées avec l'IPA montrent qu'en effet la taille du gap d'un capteur à un autre n'influe pas sur les résultats.





Figure II.30. Comparaison de la partie réelle de la permittivité relative de l'IPA mesurée avec la sonde coaxiale et les données de Debye issues de la littérature (symboles vides) avec un des capteurs microfluidiques dont la capacité de détection présente un gap de 17 µm et 22 µm (symboles pleins).

5.2 Etude de la reproductibilité des résultats

Dans ce paragraphe, nous présentons une étude de reproductibilité des mesures de la partie réelle de la permittivité relative de l'IPA effectuées avec les capteurs développés. L'étude de reproductibilité a été faite en utilisant le calcul de l'écart type. Ce dernier sert à mesurer la dispersion d'un ensemble de données par rapport à la moyenne, et permet de définir un intervalle de confiance attribuable à un échantillon. Plus l'écart type est faible, plus les valeurs sont regroupées autour de la moyenne. Souvent, la répartition des valeurs est présentée selon une courbe Gaussienne. Dans notre cas, par exemple, la moyenne de l'écart type permet de déterminer un intervalle dans lequel on trouve 70% des mesures. En effet, si la moyenne est «m» et l'écart type est « σ » on trouve 70% des mesures dans l'intervalle [m- σ ; m+ σ].

Dans ce contexte, nous avons réalisé plusieurs mesures avec différents capteurs pouvant présenter également des gaps différents (17 et 22 μ m). La Figure II.31 montre les résultats obtenus, à différentes fréquences, sur une quinzaine de mesures de caractérisation de l'IPA.





Figure II.31. Comparaison de la partie réelle de la permittivité relative de l'IPA mesurée avec les capteurs microfluidique (symboles vides) avec les données de Debye issues de la littérature (courbe rouge).

Ces mesures nous ont permis d'estimer l'erreur faite sur l'extraction de la partie réelle de la permittivité en fonction de la fréquence. Pour ce faire, nous avons calculé la moyenne des résultats de mesures pour chaque fréquence ainsi que l'écart type. Le pourcentage d'erreur représente alors le rapport entre l'écart type et la moyenne pour chaque fréquence. Le tableau 2.5 qui présente les pourcentages d'erreurs obtenus, montre que la méthode de caractérisation proposée permet la caractérisation de solutions liquides avec un pourcentage d'erreur d'environ 5% en incluant toutes les étapes de calibrations préliminaires du capteur.

Fréquence (GHz)	Moyenne de la permittivité	Ecart type (σ)	Erreur sur 70% des mesures
1	6,70	0,35	5,20%
2	4,21	0,19	4,53%
3	3,57	0,20	5,72%
4	3,43	0,16	4,7%

Tableau 2.5. Calcul de l'erreur sur les mesures de la partie réelle de la permittivité de l'IPA

Cette étude montre que le raisonnement proposé permet de déterminer les propriétés caractéristiques de la permittivité d'un échantillon liquide de très petit volume dans la gamme des hyperfréquences avec une précision tout à fait honorable par rapport à l'existant. De plus, les performances du capteur développé en termes de sensibilité et de précision de mesure sont tout à fait comparables à l'état de l'art. Ainsi par exemple, les capteurs développés présentent



des erreurs de mesures sur la partie réelle de la permittivité du même ordre (de l'ordre de 5%) que celui développé par M. Suster *et al.*[7], bien que beaucoup plus simple à fabriquer.





Conclusion

Après avoir discuté des différentes contraintes imposées par le développement d'un dispositif de caractérisation large bande de milieux liquides, nous avons présenté dans ce chapitre les choix de conception que nous avons fait pour mettre au point un capteur de permittivité performant. Après avoir présenté comment nous avons dimensionné et optimisé ce capteur, nous avons décrit les différentes étapes de fabrication ainsi que les problèmes rencontrés pendant les phases de fabrication. Les résultats de mesures présentés dans ce chapitre, démontrent la capacité du capteur développé à extraire la partie réelle de la permittivité relative de milieux liquides dans la gamme fréquentielles 400 MHz – 8 GHz. L'étude de reproductibilité des résultats de mesure nous a permis de mettre en avant la bonne robustesse de la méthode développée.

Ainsi, nous avons démontré la faisabilité de l'approche proposée pour la caractérisation d'échantillons liquides présentant des volumes de quelques nanolitres. Dans le chapitre suivant, nous allons étudier la capacité d'un tel dispositif à détecter et analyser des cellules biologiques vivantes en suspension, dans un objectif à terme de développer d'autres approches d'analyse et de discrimination du contenu cellulaire par voie spectroscopique hautes fréquences.





[1] L.F. Chen, C.K. Ong, C.P.Neo, V.V. Varadan, V.K. Varadan, "Microwave Electronics Measurement and Materials Characterization", John Wiley&Sons.Ltd, 2004, Chapter 2.

[2] R. Buchner, J. Barthel, J. Stauber, "The dielectric relaxation of water between 0°C and 35°C", Chemical Physics Letters, 1999, Vol. 306, No 1-2, pp. 57–63.

[3] T. Sato, R. Buchner, "Dielectric Relaxation Processes in Ethanol/Water Mixtures", Journal of Chemical Physics, 2003, Vol. 108, pp 4606-4613.

[4] https://microelectronique.univ-rennes1.fr/fr/chap8c.htm, Mars 2016.

[5] F. Hamdi, "Interaction champ électrique cellule : conception de puces microfluidiques pour l'appariement cellulaire et la fusion par champ électrique pulsé", Thèse de l'Université Paris-Sud, France, 2013, pp. 92-94.

[6] <u>http://www.keysight.com/en/pd-304506-pn-85070E/dielectric-probe-kit?cc=FR&lc=fre</u>, Mars 2016.

[7] M.A. Suster, B. Blackburn, U. Gurkan, P. Mohseni, "An RF/Microwave Microfluidic Sensor Based on a 3D Capacitive Structure with a Floating Electrode for Miniaturized Dielectric Spectroscopy", IEEE SENSORS 2014 Proceedings, 2014, pp. 1784-1787.



Chapitre III : Caractérisation diélectrique de particules à l'échelle micrométrique



1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté le développement d'un capteur microfluidique hyperfréquence optimisé pour la caractérisation de solutions liquides (mélanges binaires eau/éthanol ainsi que l'Isopropanol). Nous avons démontré la robustesse de l'approche suivie et la bonne reproductibilité de l'évaluation de la partie réelle de la permittivité diélectrique extraite à partir des résultats de mesures.

Dans ce dernier chapitre, nous allons à présent évaluer la capacité de ce capteur microfluidique à pouvoir détecter et caractériser des particules diélectriques en suspension : que ce soit des billes de polystyrène jusqu'à des cellules biologiques. En fait, dans une population de cellules donnée, même si l'ensemble de ces cellules sont du même type, chaque cellule a une caractéristique diélectrique qui lui est propre et qui de par l'hétérogénéité cellulaire naturelle peut être différente qualitativement des autres cellules [1]. En conséquence, on voit bien quelle importance pourrait avoir l'analyse et l'étude des propriétés diélectriques d'une cellule en flux dans ce type de système d'analyse si ce dernier peut atteindre un niveau de sensibilité suffisant.

Nous étudierons dans un premier temps la sensibilité du capteur grâce à des billes de polystyrène en suspension. Nous étudierons l'influence de la position de la particule par rapport à la zone de détection et celle de sa taille sur la réponse du capteur au moyen de simulations électromagnétiques. Nous verrons que les tests de sensibilité réalisés avec les billes de polystyrène ont montré des performances intéressantes en accord avec ce que nous attendions, ce qui ouvre des perspectives très prometteuses pour la caractérisation des propriétés diélectriques individuelles de particules colloïdales ou de cellules biologiques en suspension.

Puis, nous présenterons les tous premiers tests de sensibilité que nous avons réalisés sur des cellules biologiques issues de la lignée cellulaire SW620 (cellules cancéreuses du colon). Les résultats obtenus au niveau des contrastes capacitifs montrent la possibilité de la détection avec un niveau de sensibilité qui sera discuté. Ces résultats ouvrent des perspectives intéressantes en termes de spectroscopie diélectrique haute fréquence pour la caractérisation cellulaire non-invasive et en temps réel.





2. Etude théorique de la sensibilité du capteur - Simulations Electromagnétiques

L'objectif était ici d'étudier les performances du capteur capacitif pour la détection de microparticules en flux dans un milieu aqueux. La sensibilité du capteur a été évaluée en mesurant l'impact du passage d'une particule au niveau de la zone de détection capacitive du capteur sur les paramètres S de la structure.



Figure III.1. Schéma 3D de principe du capteur microfluidique.

Partant de la même structure HF présentée dans le chapitre précédent, nous avons commencé l'étude de sensibilité en étudiant la distribution du champ électromagnétique lorsque le canal microfluidique est rempli d'eau DI. La Figure III.1 présente une vue schématique de la structure étudiée à partir de laquelle des simulations électromagnétiques ont été effectuées avec le logiciel HFSS.

L'eau DI est modélisée dans les simulations EM à l'aide des paramètres du modèle de Debye défini à partir des données de la littérature présentées précédemment dans la deuxième partie du chapitre 2. Pour comparer les résultats de simulation de façon fiable, il est nécessaire d'assurer un maillage constant quel que soit la nature de la particule qui occupe la zone de détection. En effet, par défaut, HFSS génère un maillage adaptatif qui peut varier en fonction de l'intensité du champ que le logiciel anticipe dans le canal. Cette variation du nombre de mailles et de leur taille peut induire des artefacts dans les calculs que nous effectuons ou nous cherchons à évaluer l'influence d'un changement de permittivité localement et dans un volume très restreint. Une approche pour imposer à HFSS un maillage identique est de simuler la structure dans un premier temps avec une permittivité très forte dans le canal microfluidique



(par exemple 150); ce qui assure un maillage plus dense qu'une permittivité faible au sein du canal.

Ainsi pour chaque géométrie de capteur (dimensions des lignes RF et dimension du gap capacitif), nous commençons toujours par une simulation avec une permittivité de 150 dans le canal microfluidique et dans le volume représentant la particule diélectrique. Le maillage généré avec cette permittivité est ensuite importé pour toutes les simulations qui vont suivre, en considérant différentes caractéristiques pour le canal et/ou le volume représentant la particule (air, eau DI, milieu modélisé par une caractéristique constante en fonction de la fréquence pour une bille de polystyrène ou une caractéristique basée sur un modèle de Cole-Cole pour une cellule biologique), avec un balayage discret de la fréquence de 400 MHz à 8 GHz.

En visualisant la distribution du champ électromagnétique, nous pouvons ainsi mieux quantifier la région d'interaction onde/fluide la plus intense et ainsi optimiser la zone qui favorise la meilleure sensibilité à détecter la présence d'une particule diélectrique. Dans notre cas, la zone de détection du capteur est formée par un gap de 17μ m et la largeur du canal microfluidique est de 200 µm et son épaisseur de 25μ m. Le choix des dimensions du gap a été fait pour s'adapter à la dimension des billes de polystyrène que nous possédons au laboratoire (bille de polystyrène de 15 µm de diamètre dont le diamètre est comparable à celui des cellules biologiques que nous analyserons par la suite). La Figure III.2 présente la distribution du champ électrique au niveau de la zone de détection capacitive lorsque le canal microfluidique est rempli d'eau DI. Comme attendu, la discontinuité de la ligne concentre fortement le champ électrique avec un rayonnement du champ EM au-dessus du substrat jusqu'à une hauteur d'environ 20 µm ; ce qui permet bien d'interroger tout le volume d'une particule diélectrique présente dans le gap. Ces simulations démontrent que l'interaction entre une particule diélectrique est bien optimale dans cette zone.







Chapitre III : Caractérisation diélectrique de particules à l'échelle micrométrique



Figure III.2. Distribution du champ électromagnétique en présence d'eau DI dans le canal microfluidique (a) vue de dessus et (b) vue en coupe.

Pour étudier la perturbation introduite par des microparticules de polystyrène, nous les avons modélisées par des microsphères de 15 μ m de diamètre et de permittivité égale à 2,7. Elles sont placées dans le canal microfluidique rempli d'eau DI. Tout d'abord, nous avons étudié la perturbation introduite par une particule diélectrique idéalement positionnée dans le centre du gap du capteur. La ligne RF est ici formée de cuivre d'épaisseur 10 μ m et recouvert d'une couche mince d'or. Le gap est de 17 μ m et la largeur des électrodes au niveau du gap est de 20 μ m. La bille de polystyrène de 15 μ m de diamètre est positionnée au centre du gap à une altitude nulle par rapport au substrat.



Figure III.3. Comparaison des paramètres S₂₁ du capteur avec le canal rempli uniquement d'eau DI et lorsqu'une bille est positionnée au centre du gap (position optimale).



Le niveau des paramètres de transmission du capteur lorsque le canal est considéré entièrement rempli d'eau et rempli d'eau avec une bille placée idéalement dans la zone de détection varie de 0,67 dB à 400 MHz à 0,75 dB à 8 GHz (Figure III.3).

À partir des paramètres S calculés par le simulateur HFSS, le contraste capacitif entre les deux milieux (capteur chargé uniquement avec de l'eau DI et chargé avec une bille de polystyrène) peut être facilement extrait. Ce contraste capacitif est représenté sur la Figure III.4. La variation de capacité ou contraste capacitif ΔC est ici significatif et varie de 4 fF à 400 MHz jusqu'à 3,23 fF à 8 GHz. Cette diminution du contraste en fonction de la fréquence s'explique par le fait que la permittivité de l'eau diminue lorsque la fréquence augmente et se rapproche progressivement de la permittivité de la bille de polystyrène.



Figure III.4. Variation de capacité mesurée par le capteur lors de la présence d'une bille centrée dans le gap.

Jusqu'à présent dans l'état de l'art, le contraste capacitif maximal obtenu avec des structures similaires pour des billes de polystyrène était voisin de 1,2 fF [2], 3 fois inférieur à celui que nous sommes susceptibles d'obtenir avec cette structure. Cette différence est principalement due à l'utilisation de métallisations épaisses plus proches de la taille des particules situées dans le gap. Pour confirmer cette hypothèse, nous avons étudié la sensibilité de notre capteur dans le cas où les électrodes sont fines (0,5 μ m d'épaisseur). Comme le montre la Figure III.4 (courbe bleue), le contraste capacitif est de l'ordre de 1,45 fF pour les basses fréquences.

Pour mieux comprendre cette différence de sensibilité, nous avons effectué des simulations électromagnétiques afin d'identifier clairement le volume de la bille interrogé par le champ électrique. Ces simulations ont été faites en considérant des billes de polystyrène de



diamètre 15 μ m suspendues dans de l'eau DI, avec une métallisation de 10 μ m d'épaisseur pour les électrodes guidant le champ jusqu'aux billes et un gap de 17 μ m.

La Figure III.5 présente l'intensité du champ électrique dans la zone d'analyse lors de la présence d'une bille. La Figure III.5 (a) indique que comme on pouvait s'y attendre le champ électrique est maximum autour de la bille piégée au centre de la zone d'analyse. A la vue de ces résultats, il apparaît évident que l'ensemble du volume de la bille est en interaction avec le champ électrique, ce qui n'est pas le cas lorsque les métallisations présentent une faible épaisseur (0,5 μ m) comme le montre la Figure III.5 (b).





Nous avons également évalué l'influence de la taille de la particule sur la sensibilité du capteur. Pour ce faire, des simulations avec une bille de polystyrène placée au centre de la zone capacitive et dont le diamètre varie entre 5 et 15 μ m ont été effectuées. L'évolution des contrastes capacitifs Δ C (fF) en fonction de la fréquence est présentée sur la Figure III.6.

Logiquement, les contrastes capacitifs augmentent lorsque le volume de la bille augmente : ils sont maximaux lorsque le diamètre de la bille se rapproche de la taille du gap capacitif. Par exemple à 2 GHz, nous pouvons observer que le contraste ΔC détectable pour une bille de 15 µm vaut 4 fF tandis qu'il n'est de 1,4 fF pour une bille de 5 µm. Cette étude nous



confirme l'intérêt de travailler avec un gap adapté à la taille des particules à analyser. Dans la partie suivante, nous allons étudier l'impact sur la sensibilité de notre capteur de la position de la particule, vis-à-vis du centre de la zone capacitive formée par les deux électrodes.



Figure III.6. Comparaison du contraste capacitif en fonction de la taille d'une particule placée au centre du gap.

L'effet de différentes positions dans le plan du substrat pour une bille de 15 μ m de diamètre placée à une altitude médiane vis-à-vis de l'épaisseur des électrodes (de A à D conformément à la Figure III.7) ont été simulées. Dans cette étude, nous avons utilisé les mêmes électrodes utilisées dans les simulations précédentes (gap de 17 μ m) et nous avons placé la particule à différentes positions vis-à-vis de la zone d'interaction optimale avec le champ électrique. La position (A) correspond au cas où la bille est bien centrée et représente le cas idéal car il y a un maximum d'interaction bille/champ électromagnétique. Les positions (B) à (D) sont obtenues en décalant selon l'axe Y la bille de la rupture capacitive par pas de 16 μ m. Les résultats de simulation des paramètres de transmission pour ces différentes positions sont présentés sur la Figure III.7.



Figure III.7. Représentation des différentes positions simulées pour la bille.





Figure III.8. (a) Paramètres S21 du capteur chargé par une bille présentant différentes positions, (b) zoom entre 3 et 5 GHz.

La Figure III.8 montre que lorsque la bille s'éloigne du centre de la zone capacitive, il existe une limite à partir de laquelle la perturbation sur la réponse en transmission du capteur devient négligeable et plus détectable. Cela correspond à la limite à partir de laquelle la bille n'interagit plus suffisamment avec la zone de fort champ électromagnétique. A partir de la position D de la bille, qui correspond à un éloignement de 48 µm du centre du gap, la perturbation induite devient non détectable par la simple mesure de paramètres [S].

On voit aussi, qu'au-delà d'une simple détection de la présence ou pas d'une particule dans la zone de détection du capteur, si l'analyse des propriétés diélectriques de la particule est souhaitée, positionner la particule au plus près du centre du gap sera une condition indispensable.

Ainsi à partir de la perturbation introduite sur les paramètres de transmission du capteur, nous avons évalué l'évolution de la capacité globale du capteur chargé avec de l'eau DI et avec les différentes positions de la bille dans l'eau DI. Cela permet d'entrevoir quelle pourrait être la marge d'erreur sur la détermination des propriétés diélectriques d'une particule en fonction de sa position au moment de la mesure des paramètres [S] du capteur. La Figure III.9 montre la variation de capacité pour les différents cas de simulation.







Figure III.9. Variation de la capacité globale du capteur (fF) en fonction de la fréquence pour les différentes positions d'une bille suspendue dans l'eau DI.

Ainsi les valeurs de la capacité du capteur sur la bande étudiée se rapprochent des valeurs de capacité présentées par le capteur dont le canal est uniquement rempli d'eau lorsque la bille s'éloigne du centre de la zone capacitive. À partir de la position D, la capacité globale du capteur est quasi confondue avec celle du capteur sans particule. Et dès la position C, il semble difficile de pouvoir assurer la détection de la présence de la particule vis-à-vis de potentielles perturbations autres. La sensibilité du capteur par rapport à la position de la bille, peut s'évaluer en traçant le contraste capacitif entre le capteur chargé uniquement avec de l'eau DI et chaque position de la bille dans un canal rempli d'eau DI (Figure III.10).



Figure III.10. Contraste capacitifs ΔC pour les différentes positions de la bille le long du canal.

Donc le contraste ΔC diminue très rapidement lorsque la bille s'éloigne du centre et tend vers zéro lorsqu'il quitte la zone de fort champ électrique. Par exemple, un décalage de 16 μ m



Chapitre III : Caractérisation diélectrique de particules à l'échelle micrométrique

de la bille (position B), par rapport au centre, conduit à une diminution de moitié de ΔC par rapport à une bille parfaitement centrée (position A). À partir de la position C, le contraste capacitif est faible voir très faible à la position D pour être détecté (de l'ordre de 0,08 fF). Alors que pour la position A, le contraste capacitif varie de 4 fF jusqu'à 3,23 fF entre 400 MHz et 8 GHz.

Ces simulations nous ont permis d'estimer l'influence de la position le long du canal d'une bille de polystyrène par rapport à la zone optimale privilégiée du capteur. Donc dans la perspective d'une analyse d'une particule diélectrique unique, il faudra éviter que cette dernière se situe trop loin du centre du gap ou qu'une autre particule se situe à une distance inférieure à $48 \,\mu\text{m}$ de la zone d'analyse.

De la même façon, il est nécessaire d'étudier l'influence de la position latérale de la bille (selon l'axe X). Pour cette étude, nous avons décalé latéralement et successivement la bille de 20 µm en 20 µm par rapport au centre de la zone de détection comme le montre la Figure III.11.





La même méthodologie de simulation et de traitement des données que pour le cas précédent a été effectuée. Les résultats, présentés Figure III.12, montrent que le contraste ΔC diminuent drastiquement si la microbille à analyser n'est pas positionnée au plus près de la zone de détection. Par exemple, pour la position A', le contraste capacitif ΔC à 2 GHz est égal à 1,3 fF ce qui présente 1/3 du contraste capacitif présenté lorsqu'une bille est dans la position optimale pour être détectée. En effet, lorsque la bille s'éloigne du centre du gap, le contraste ΔC devient rapidement faible (0,07 fF pour la position D').







On voit également ici, l'importance de la mesure de référence pour la détermination d'un ΔC représentatif des propriétés de la particule à analyser, soit fait juste avant de piéger la particule au centre du gap ou idéalement juste après l'avoir libérée, de façon à pouvoir prendre en compte l'influence d'autres particules qui pourrait être amenées à se coller sur les électrodes de détection et à rester bloquées malgré le flux imposé dans le canal.

Pour compléter cette étude, nous avons également étudié les contrastes capacitifs en fonction de l'altitude de la bille dans le canal microfluidique. Pour ce faire, nous avons considéré le cas où la bille est positionnée de façon idéale au centre du gap, à l'altitude zéro par rapport au substrat (position A''- Figure III.13) et nous l'avons décalé successivement de 3µm en 3µm au-dessus du substrat (position B'' à D'' – Figure III.13).



Figure III.13. Représentation de différentes altitudes simulées pour la bille.





Figure III.14. Contrastes capacitifs ΔC simulés en fonction de la fréquence pour les différentes altitudes de la bille dans le canal.

Les contrastes capacitifs pour chaque cas ont été extraits et les résultats sont présentés sur la Figure III.14. Ces simulations montrent que bien entendu les contrastes capacitifs diminuent lorsque la bille s'éloigne de la surface du substrat, mais pas dans des proportions catastrophiques puisque le contraste capacitif détecté dans un canal de 25 μ m reste tout de même significatif. Par exemple pour la position D'' (cas le plus défavorable), pour laquelle la distance entre le centre de la bille et le substrat vaut 16,5 μ m, le contraste capacitif Δ C n'est que divisé par 2 par rapport à la situation idéale A''.

L'ensemble de cette étude a permis de mettre en lumière que la position de la particule au niveau de la zone de détection va avoir une influence importante sur le contraste capacitif obtenu. Cela démontre la nécessité de pouvoir maitriser et imposer de façon reproductible cette position, de la maintenir stable durant la mesure, pour pouvoir exploiter de façon fiable les résultats de caractérisation. De plus, comme l'on pouvait s'y attendre, la configuration qui présente le plus de contraste capacitif est celle pour laquelle la particule interagit au maximum avec le champ électrique c'est-à-dire quand elle est centrée dans la rupture capacitive et au plus près du substrat. Cette position assure de plus que l'ensemble de la particule est bien interrogée par le champ électrique, condition indispensable pour pouvoir extraire ses propriétés diélectriques avec une erreur de mesure faible.





3. Expérimentations

3.1 Application à la spectroscopie diélectrique de particules en suspension

Pour valider le potentiel de détection du capteur microfluidique à la présence d'une particule diélectrique dans la zone de détection, des mesures ont été réalisées avec des microbilles de polystyrène de 15µm de diamètre mises en suspension dans de l'eau DI. Nous avons utilisé le même banc de mesure que celui présenté dans le chapitre précédent pour la caractérisation de liquides. Pour optimiser la sensibilité d'analyse du capteur, nous avons privilégié un capteur présentant une distance inter-électrodes de 17µm bien adaptée à la taille des particules utilisées.

Tout d'abord le canal microfluidique du capteur est rempli avec de l'eau DI sous un débit contrôlé et continu. Ensuite, la suspension de microbilles est injectée dans le canal microfluidique grâce à un système de contrôle de flux (MFCS Fluigent).

Pour piéger la bille en position optimale dans la zone de détection, plusieurs méthodes peuvent être utilisées. Par exemple dans les travaux de T. Chen *et al.* [2], la particule a été piégée avec une méthode mécanique. Le piège est formé par un plot solide en SU-8 positionné au centre du micro canal et décalé de quelques µm des électrodes. La forme du piège comporte une face concave transversale au sens de l'écoulement du fluide. La forme de cette face a été conçue pour s'adapter à la forme sphérique des microparticules et ainsi mieux les piéger. Cette méthode rajoute une étape de fabrication supplémentaire qui peut être complexe vu la dimension du gap, l'utilisation des métallisations épaisses et le matériau utilisé (polymère SU-8) présente des difficultés de définition lithographique dans des zones aux reliefs vallonnés. De plus, cette méthode peut diminuer la sensibilité du capteur vu que le bloqueur est situé dans la zone de concentration du champ électromagnétique (la SU-8 étant de faible permittivité).

Il est également possible de maitriser la position de la particule en contrôlant précisément la différence de pression entre l'entrée et la sortie du microsystème. C'est la méthode que nous avons choisie, dans un premier temps, de par sa simplicité de mise en œuvre. Grâce au système d'injection, il est possible de maîtriser la vitesse de la particule injectée dans le canal. Ainsi, une fois dans le canal, la particule peut être ralentie aux alentours de la zone de détection puis stoppée pour être piégée en son centre. Pour cela, les microbilles en suspension de 15µm de diamètre sont injectées à partir du réservoir d'entrée. Le réservoir de sortie est aussi connecté au système de contrôle de flux et mis sous pression. Lorsque la bille se rapproche du gap, une pression dans le réservoir de sortie (proche de la pression d'entrée) est appliquée pour ralentir le déplacement de la bille puis la piéger dans le gap (Figure III.15).



Chapitre III : Caractérisation diélectrique de particules à l'échelle micrométrique



Figure III.15. Photographie d'une bille de polystyrène piégée dans la zone de détection.

Les paramètres [S] du capteur sont mesurés et enregistrés tout au long des expériences, avec un délai d'acquisition d'une seconde et répété toutes les secondes. Ce délai d'acquisition nous permet d'acquérir toujours une mesure de référence juste avant l'arrivée de la bille dans la zone de détection. En effet, pendant les mesures il est difficile d'éviter que des billes viennent se coller sur les bords des électrodes. Donc pour ne pas tenir compte de l'effet de ces billes, nous avons choisi ce délai d'acquisition pour pouvoir enregistrer les mesures juste avant que la bille arrive dans la zone de détection optimale déterminée par les simulations et ainsi prendre en considération l'influence des billes parasites.

La figure 16 illustre la mesure effectuée pour la configuration de la Figure III.15. On peut y observer la variation de la capacité du capteur mesurée en présence d'une seule bille dans la zone de détection et de 5 billes à l'extérieur. Donc la mesure de référence a été prise juste avant que la bille se rapproche de la zone de détection (c'est-à-dire que les 5 autres billes collées sur les métallisations ont été déjà prise en compte dans la mesure de référence). Même si dans ce cas l'emplacement de la bille analysée n'est pas tout à fait optimal, la variation de capacité permet clairement de détecter la présence de la particule dans l'eau lors de son passage au travers du gap capacitif avec un contraste capacitif moyen de 1,4 fF à 400 MHz. Néanmoins, on remarque que la valeur de la capacité de référence (avant le piégeage de la bille) est plus faible qu'en simulation (Figure III.9). Cette différence peut s'expliquer principalement par le positionnement manuel du morceau de PDMS qui ferme le canal. De plus, le support mécanique qui permet de maintenir le PDMS impose un niveau de pression qui peut modifier légèrement l'épaisseur réelle du canal microfluidique.





Figure III.16. Variation de la capacité mesurée lorsqu'une bille de polystyrène est positionnée au niveau de la zone de détection.

Dans cette partie du manuscrit, nous avons étudié la sensibilité du capteur développé à la présence d'une microbille de polystyrène dans la zone de détection. À partir des mesures effectuées, nous avons vérifié qu'il est possible d'atteindre un contraste capacitif significatif bien que la bille ne soit pas parfaitement bien positionnée dans le gap et que cela pouvait être pris en compte par un modèle électromagnétique approprié.

Pour améliorer la reproductibilité de la position de la particule, nous allons mettre en œuvre une autre méthode de piégeage par diélectrophorèse (DEP) comme nous allons le voir dans la partie suivante. Celle-ci est plus particulièrement bien appropriée pour des particules présentant des propriétés diélectriques non constantes en fonction de la fréquence.

C'est pourquoi, dans le paragraphe suivant, nous la mettrons en œuvre lors d'expériences en présence de cellules biologiques dans la zone de détection.

3.2 Application à la spectroscopie diélectrique de cellules biologiques en suspension

Nous avons souhaité ici voir si ce capteur pouvait être utilisé pour détecter le passage, au travers de la capacité de détection, de cellules biologiques vivantes en suspension dans le canal. Nous avons utilisé pour ces tests des cellules cancéreuses colorectales (lignée cellulaire SW620). Les cellules ont été mises en suspension dans un milieu osmotique non ionique pour garantir leur intégrité pendant les mesures. Le milieu osmotique est composé essentiellement d'eau DI et de sucrose.

Afin d'immobiliser les cellules entre les électrodes et de facilement les libérer une fois mesurées, nous avons mis en place un piège électrique. Ce dernier permet de plus d'identifier



rapidement les cellules mortes car seules les cellules vivantes y sont sensibles ; les cellules mortes en effet ne sont pas piégées. Ce piège électrique est basé sur la technique de diélectrophorèse (DEP).

3.2.1. La diélectrophorèse (DEP)

La diélectrophorèse utilise les propriétés de polarisabilité des particules et permet de mettre en mouvement des particules sous l'effet d'un champ électrique non uniforme en amplitude [3-4]. En général, une particule diélectrique possède une charge neutre, mais au niveau microscopique elle présente une distribution de charges positives et négatives [5]. Lorsque cette particule est placée dans un champ électrique, les charges s'accumulent sur ses différentes surfaces, sur sa membrane externe ou autour de ses constituants internes, selon une distribution asymétrique conduisant à sa polarisation (Figure III.17).



Figure III.17. Distribution asymétrique des charges électriques sur la surface d'une particule soumise à un champ électrique [3].

Donc, lorsqu'une cellule est placée dans un champ électrique, elle présente un moment dipolaire dont l'expression est :

$$\vec{m} = 4\pi\varepsilon_0\varepsilon_m r^3 Re[K(\omega)]\vec{E}$$
(3.1)

où la cellule est modélisée par une sphère de rayon r, exposée à un champ électrique E Avec

- ε_0 la permittivité du vide de valeur 8,854 × 10⁻¹² F/m.
- ε_m la permittivité du milieu de suspension.
- $Re[K(\omega)]$ la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti.
- ω la fréquence angulaire du champ électrique appliqué [3].

L'expression du facteur de Clausius-Mossottis'écrit:



Chapitre III : Caractérisation diélectrique de particules à l'échelle micrométrique

$$K(\omega) = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}$$
(3.2)

 ε_p^* et ε_m^* sont respectivement les permittivités complexes de la particule et du milieu liquide dans lequel elle évolue. (N.B. : $\varepsilon_x^* = \varepsilon_x - j \frac{\sigma_x}{\omega}$ avec $\varepsilon_x^* = \varepsilon_0 \varepsilon_{x,r}$ où $\varepsilon_{x,r}$ est la permittivité relative et σ_x la conductivité ionique du milieu).

Lorsqu'un gradient de champ électrique est appliqué, la particule dans son milieu liquide subira une force de translation appelée force de diélectrophorèse notée $\overrightarrow{F_{DEP}}$ et cette force se traduit par l'équation suivante :

$$\overrightarrow{F_{DEP}} = 2\pi\varepsilon_0\varepsilon_m r^3 Re[K(\omega)]\vec{\nabla}E^2$$
(3.3)

À partir de cette équation, nous pouvons conclure que la force diélectrophorèse dépend principalement des différences de propriétés entre la particule et son milieu $Re[K(\omega)]$, de l'intensité du gradient de champ électrique et aussi du volume de la cellule.

L'équation (3.3) montre qu'il est possible de générer une force de diélectrophorèse à partir d'une tension faible pour une petite distance puisque $\vec{V}(E^2) = \frac{|V^2|}{[distance^3]}$. Donc, il est nécessaire de diminuerla distance inter-électrodes pour obtenir une force de diélectrophorèse importante pour permettre le déplacement de la cellule.

En outre, selon le signe du facteur $Re[K(\omega)]$, on obtient deux types de forcesde diélectrophorèse. Dans le cas où $Re[K(\omega)]$ est positive, on travaille avec une force de DEP dite positive et les cellules seront piégées dans les zones où le champ est maximal. Dans le cas d'une diélectrophorèse négative ($Re[K(\omega)] < 0$), les cellules sont amenées vers les minima de champ (Figure III.18).



Figure III.18. Electrodes interdigitées : en vert, des particules soumises à la diélectrophorèse négative, en rouge, des particules soumises à la diélectrophorèse positive [6].



Chapitre III : Caractérisation diélectrique de particules à l'échelle micrométrique

Donc, dans notre cas, nous visons à piéger les cellules entre les électrodes où le champ électrique est maximum comme nous l'avons montré avec les simulations dans la première partie de ce chapitre. Alors, il faudra pour cela générer une force de diélectrophorèse positive.

3.2.2. Mise en œuvre expérimentale de la spectroscopie d'une cellule biologique en suspension à partir des capteurs développés

Dans la partie précédente nous avons montré la plus-value de la mise en place d'un piège électrique (DEP). Donc pour générer une force de DEP au niveau de nos zones d'analyse, nous avons utilisé un générateur de tension sinusoïdale connecté à l'entrée et à la sortie des lignes RF du capteur au moyen d'un Té de polarisation afin d'isoler les signaux RF et BF (Figure III.19).



Figure III.19. Banc de mesure utilisé pour la spectroscopie diélectrique de cellules biologiques en suspension.

Pour ces expérimentations, nous avons injecté tout d'abord le milieu osmotique dans le canal microfluidique. Une fois que le milieu osmotique occupe tout le volume du canal, nous avons injecté les cellules SW620 en suspension dans ce même milieu, dans le capteur. La concentration des cellules dans le volume du milieu osmotique a été optimisée afin d'assurer la présence de quelques dizaines de cellules dans le canal microfluidique. Lorsqu'une cellule se rapproche de la zone de détection, une pression inverse est appliquée pour ralentir en premier



lieu le déplacement de la cellule. Une fois que la cellule est proche du gap, une tension sinusoïdale de fréquence 2 MHz est appliquée entre les électrodes afin de piéger la cellule au centre du gap. La Figure III.20 présente la photographie d'une cellule ainsi piégée à l'extrémité de l'une des électrodes ce qui n'est pas encore tout à fait la position idéale pour avoir le maximum de sensibilité, néanmoins cette position est stable et plus facile à reproduire qu'avec le réglage de la bonne différence de pression à appliquer à l'entrée et à la sortie du canal.



Figure III.20. Photographie d'une cellule SW620 vivanteetpiégée dans la zone de détection.

Une fois que la cellule est immobilisée, les paramètres [S] du capteur sont enregistrés. La capacité présentée par la discontinuité de la ligne est extraite à partir de ces mesures de paramètres [S], avant que la cellule ne soit piégée (C_{milieu}), et en présence de la cellule ($C_{cellule}$). La variation de capacité ou contraste capacitif en résultant a été calculée en utilisant l'équation 3.4 :

$$\Delta C = C_{milieu} - C_{cellule} \tag{3.4}$$

La Figure III.21 illustre le contraste capacitif qu'il nous est possible de détecter avec ce capteur lorsqu'une seule cellule est piégée dans le gap. Le contraste maximal est obtenu à 2 GHz avec une valeur proche de 0,46 fF lorsqu'une seule cellule SW620 est piégée autour de la zone de détection. Par rapport aux travaux de W. Chen*et al.* [2], les contrastes capacitifs présentés avec une cellule biologique sont du même ordre de grandeur. On peut noter que pendant nos mesures, la cellule n'a pas été piégée dans la zone où la sensibilité est maximale. Il ya par conséquent une probable marge de progression en terme d'optimisation de sensibilité.





Figure III.21. Contraste Capacitif mesuré lors de la présence d'une cellule SW620 dans le gap.

Comme on pouvait s'y attendre, nous avons également pu observer que ce contraste capacitif, dépend bien du nombre de cellules présentes dans la zone de détection et du volume de matériel biologique associé. Lorsque le nombre des cellules piégées dans le gap augmente, le contraste augmente proportionnellement jusqu'à une certaine limite (Figure III.22). En effet, au-delà de 5 cellules, le contraste mesuré reste constant, car l'excédent de cellules se trouve alors dans une zone où le champ électromagnétique devient trop faible et les cellules périphériques qui se retrouvent trop éloignées du centre du gap n'influent plus suffisamment sur la réponse du capteur.



Figure III.22. Evolution du contraste capacitif mesuré en fonction du nombre de cellules présentes dans le gap.

Nous avons voulu chercher à estimer l'ordre de grandeur de permittivité que pourrait présenter la cellule piégée dans le gap. Pour cela, nous avons effectué des simulations en



modélisant la cellule par une sphère homogène placée à la même position que celle où nous l'avons piégée pendant les mesures. Dans un premier temps, nous avons réalisé différentes simulations avec une permittivité constante pour la cellule SW620 sur la plage de fréquences, allant de 0,1 GHz jusqu'à 6 GHz. Nous avons ainsi trouvé que le contraste capacitif obtenu en mesures pourrait correspondre au contraste capacitif d'une cellule dont la permittivité pourrait se situer entre 63et 70 comme le montre la Figure III.23.



Figure III.23. Contraste capacitif en fonction de la permittivité de la cellule présente dans le gap.

Dans un second temps, nous avons essayé de modéliser la partie réelle de la permittivité de la cellule par une permittivité variable en fonction de la fréquence. Pour cela, nous avons utilisé un modèle de Debye (équation (3.5)).

$$\varepsilon^*(\omega) = \varepsilon'_{\infty} + \frac{\varepsilon'_S - \varepsilon'_{\infty}}{1 - j\omega\tau_R}$$
(3.5)

Nous avons fait varier au départ uniquement la permittivité ε'_{s} (permittivité basse fréquence). Le tableau 3.1 résume les paramètres utilisés pour les différentes simulations.

	ε'_{S}	$arepsilon'_{\infty}$	$ au_R$ (ps)
Simulation A	60	4,57	8,38
Simulation B	65	4,57	8,38
Simulation C	70	4,57	8,38

Tableau 3.1. Paramètres de Debye utilisés pour une cellule SW620.

Pour ces simulations, nous avons logiquement trouvé que l'allure des contrastes capacitifs obtenus entre les deux milieux (milieu de référence (eau DI) et milieu avec une cellule en suspendue dans l'eau) sont beaucoup plus proches des mesures que les contrastes trouvés



avec une permittivité constante en fonction de la fréquence. Comme le montre la Figure III.24, le contraste capacitif trouvé en mesure est encadré par les deux courbes de contraste capacitif trouvées avec le modèle de Debye des simulations B et C. Donc nous avons pu encadrer dans un premier temps la plage de permittivité de départ par variation unique de ε'_{S} .



Figure III.24. Comparaison du contraste capacitif pour différentes valeurs de permittivitéde la cellule présente dans le gap.

Par la suite, et dans le but de se rapprocher du contraste capacitif trouvé en mesure, nous avons fait varier en plus de la permittivité ε'_S , le temps de relaxation τ_R . Le tableau 3.2 résume les paramètres de Debye pour les simulations effectuées.

	ε'_{S}	$arepsilon_{\infty}'$	$ au_R$ (ps)
Simulation D	67	4,57	11
Simulation E	68	4,57	10

Tableau 3.2. Paramètres de Debye utilisés pour une cellule SW620.

Donc, d'après ces dernières simulations, nous avons obtenu des résultats très proches des mesures permettant d'encadrer assez finement la valeur de la partie réelle de la permittivité de la cellule analysée (Figure III.25).





Figure III.25. Comparaison du contraste capacitif pour différentes valeurs de permittivité de la cellule présente dans le gap.

Ainsi, à partir du modèle de Debye dont les paramètres ont été ajustés par simulation, il est possible de tracer l'évolution de la partie réelle de la permittivité d'une cellule SW620 en fonction de la fréquence. En prenant en compte les simulations D et E, nous pouvons estimer que la variation de la permittivité de la cellule SW620 se situe entre les deux courbes de permittivité extraites sur la Figure III.26.



Figure III.26. Variation de la partie réelle de la permittivité relative d'une cellule SW620 en fonction de la fréquence.

Les résultats trouvés à l'aide de ce capteur large bande sont en bon accord avec les caractérisations déjà menées par l'équipe au sein du laboratoire XLIM avec un autre type d'architecture : capteurs résonants présentés dans le premier chapitre [7].



Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons étudié la possibilité d'utiliser le capteur microfluidique que nous avons mis au point pour détecter la présence d'une particule diélectrique et voir quel pourrait être son niveau de sensibilité pour en extraire des informations sur ses propriétés diélectriques intrinsèques. Nous avons ainsi étudié le niveau de perturbation introduit par une particule diélectrique par rapport à sa position dans le canal microfluidique. Cette étude nous a permis de déterminer la zone de détection optimale et de quantifier l'influence des particules présentes accidentellement à proximité du gap capacitif. Nous avons de plus pointé les potentielles difficultés de mise en œuvre au niveau de la reproductibilité des mesures en utilisant une méthode de piégeage par différence de pression entre l'entrée et la sortie du capteur. Pour éviter ces inconvénients de reproductibilité de positionnement, nous avons complété cette méthode par la mise en place de pièges électriques (par DEP) qui se sont avérés compatibles avec notre structure HF.

Dans la dernière partie de ce chapitre, des premiers tests de sensibilité réalisés sur des cellules biologiques issues de la lignée cellulaire SW620 (cellules cancéreuses du colon) ont été présentés. Les résultats obtenus au niveau des contrastes capacitifs montrent une sensibilité intéressante qui ouvre des perspectives en terme d'analyse cellulaire par spectroscopie diélectrique haute fréquence pour la caractérisation non-invasive d'une cellule unique en temps réel.



[1] J.Zhao, "Cell individuality: A basic multicellular phenomenon and its role in the pathogenesis of disease", Medical Hypothese, 1995, Vol. 44, pp. 400-402.

[2] W. Chen, D.Dubuc, K.Grenier, "Microwave Dielectric Spectroscopy of a Single Biological Cell withImproved Sensitivity up to 40 GHz", IEEE MTT-S International Microwave Symposium , 17-22 May 2015, 978-1-4799-8275.

[3] R.Pethig, "Dielectrophoresis: An assessment of its potential to aid the research and practice of drug discovery and delivery", Elsevier, 2013, Vol.65, pp. 1589-1599.

[4] R.Pethig *et al.*, "Dielectrophoresis: A Review of Applications for Stem Cell Research", Journal of Biomedicine and Biotechnology, 2010, Vol. 2010, Article ID 182581.

[5] M.Lagouge, "Conception de microsystèmes à base d'actionneurs en SU8 pour la manipulation de micro-objets en milieu liquide et transfert vers un milieu quasi-sec", Thèse de l'Université des Sciences et Technologies de Lille, soutenue le 30 janvier 2006.

[6] M. Frenea-Robin, J. Laforet, G. Robin, B. Le Pioufle, and L. Nicolas, "Selecting an electrode structure for cell sorting by differential dielectric affinity," Engineering in Medicine and Biology Society, 2007, pp. 6310 – 6313.

[7] L.Y.Zhang, C. Bounaix Morand du Puch, C. Dalmay, A. Lacroix, A. Landoulsi, J. Leroy, C. Mélin, F. Lalloué, S. Battu, C. Lautrette, S. Giraud, A. Bessaudou, P. Blondy, M.O. Jauberteau, A. Pothier, "Discrimination of colorectal cancer cell lines using microwave biosensors", Sensors and Actuators A, 2014, Vol. 216, pp. 405–416.



Conclusion Générale





Conclusion générale

Ces travaux de thèse se placent dans le contexte du développement d'une technique de caractérisation basée sur le couplage de capteurs hyperfréquences avec la technologie microfluidique. L'objectif était d'aboutir à la spectroscopie diélectrique de liquides et de particules à l'échelle micrométrique.

Dans la première partie de ce manuscrit, nous avons montré l'intérêt de travailler dans la gamme des fréquences microondes pour caractériser différents types de milieux qu'ils soient homogènes (liquides) ou inhomogènes (i.e. constitués de particules en suspension). L'utilisation de capteurs hyperfréquences, permet de travailler avec des dispositifs de caractérisation miniaturés et non-invasifs qui: (i) permettent d'éviter une étape de marquage des particules (notamment des cellules biologiques) (ii) permettent l'intégration d'un réseau microfluidique (iii) sont compatibles avec l'intégration au sein de « laboratoires sur puce » (iv) permettent l'utilisation de petits volumes de liquides ainsi que de travailler avec des particules à l'échelle micrométrique. De plus, concernant l'étude des cellules biologiques, nous avons montré grâce à l'étude bibliographique, que les fréquences microondes présentent l'intérêt de pouvoir sonder le contenu intracellulaire sans le dénaturer.

Ces travaux de thèse se sont organisés en deux grandes parties : la première partie est consacrée à la caractérisation diélectrique de petits volumes de liquides et la deuxième partie à la détection et l'analyse diélectrique de particules diélectriques micrométriques.

Ainsi, un capteur RF microfluidique permettant de déterminer la partie réelle de la permittivité diélectrique de liquides en fonction de la fréquence a tout d'abord été développé et optimisé. Le capteur formé d'une ligne microruban de 10 µm d'épaisseur est réalisé sur un substrat de silice fondue. La ligne RF est implémentée au milieu d'un canal microfluidique qui permet de travailler avec des volumes de liquide de l'ordre de quelques nanolitres. Les simulations électromagnétique 3D (réalisées sous HFSS/Ansys) ont permis d'établir des relations entre la partie réelle de la permittivité complexe des liquides à caractériser et les variations des paramètres [S] du capteur. Le principe de mesure a consisté à suivre en temps réel la variation de la discontinuité. Après une étape d'étalonnage utilisant différents liquides de référence, le principe de mesure a été validé par simulation puis expérimentalement en caractérisant différentes solutions liquides basées sur des mélanges éthanol/eau et sur



l'isopropanol. Les mesures des propriétés diélectriques effectuées avec les capteurs développés ont montré un très bon accord avec des mesures réalisées avec une sonde coaxiale commerciale (Keysight/Agilent, 85070 probe Kit) validant ainsi la démarche proposée. Une étude de reproductibilité a également permis de montrer la robustesse de la méthode de caractérisation développée et a permis d'estimer la précision obtenue sur la mesure de la partie réelle de la permittivité qui est inférieure à 5 % et tout à fait compétitive par rapport aux techniques courantes.

La deuxième partie de ces travaux de thèse a permis d'évaluer la capacité de tels capteurs RF à détecter et analyser des particules diélectriques micrométriques en suspension dans le canal microfluidique. Une étude par simulation électromagnétique sur des billes de polystyrène a permis d'évaluer les performances attendues d'un tel capteur en terme notamment de sensibilité de détection. Nous avons notamment mis en avant l'importance majeure de travailler avec des électrodes épaisses qui permettent d'interroger tout le volume de la particule ce qui est une condition indispensable pour pouvoir extraire ses propriétés diélectriques. Cette étude EM a également permis de mettre en lumière l'influence du positionnement de la particule par rapport aux électrodes sur la reproductibilité des résultats. Cela nous a conduit à considérer différentes techniques pour pouvoir immobiliser de façon efficace et reproductible les particules d'intérêt dans la zone d'analyse du capteur. Des mesures expérimentales ont été menées sur des billes de polystyrène puis sur des cellules biologiques vivantes (lignée cellulaire SW-620). Les résultats obtenus montrent de bonnes sensibilités de détection qui permettent d'envisager des perspectives intéressantes pour la spectroscopie diélectrique microondes appliquée à des particules micrométriques individuelles en suspension.

Ces travaux démontrent en effet la possibilité de mesurer les propriétés diélectriques d'une cellule unique. De nombreux travaux restent néanmoins à mener pour fiabiliser la technique de mesure. Cela passe par l'augmentation de la sensibilité du capteur grâce à des montages interférométriques par exemple ou encore la mesure sur puce de la taille exacte de la cellule étant donné qu'il existe une hétérogénéité naturelle dans les lignées cellulaires et qui augmentent au sein de cultures primaires. De plus, des améliorations peuvent être apportées sur le traitement des données et l'exploitation des résultats en intégrant des fonctions de traitement des signaux hyperfréquences. Dans cette perspective, la technologie CMOS est particulièrement intéressante car elle permettra une telle intégration. Cette étape est indispensable à terme pour le développement d'outils diagnostiques performants et utilisables par les biologistes et les médecins.


Publications Scientifiques



Publications dans des revues internationales

Jonathan Leroy, Fatima Hjeij, Alaeddine Landoulsi, Carole Mélin, Claire Dalmay *et al.* :« **Microfluidic Biosensors for Microwave Dielectric Spectroscopy**», *Sensors and Actuators A: Physical, Elsevier, 2015, Volume 229, pp 172-181.*

Ling Yan Zhang, Christophe BounaixMorand Du Puch, Claire Dalmay, Aurélie Lacroix, Alaeddine Landoulsi *et al.* :« **Discrimination of Colorectal Cancer Cell Lines using Microwave Biosensors**», *Sensors & Actuators: A. Physical, 2014, pp.405-416.*

Communications à des congrès internationaux

Alaeddine Landoulsi, Claire Dalmay, Annie Bessaudou, Pierre Blondy, Arnaud Pothier : « A Microwave Sensor Dedicated to Dielectric Spectroscopy of nanoliter volumes of Liquids Medium and Flowing Particles», *IEEE Radio and Wireless Week (RWW 2015), Biosensor Conference, Jan 2015, San Diego, United States.*

Alaeddine Landoulsi, Jonathan Leroy, Claire Dalmay, Arnaud Pothier, Annie Bessaudou *et al.* :« A Microfluidic Sensor Dedicated to Microwave Dielectric Spectroscopy of Liquids Medium and Flowing Colloidal Suspension», *Eurosensor 2014, Sep 2014, Bresca, Italy.*

Alaeddine Landoulsi, Jonathan Leroy, Claire Dalmay, Arnaud Pothier, Annie Bessaudou *et al.* :« Microwave Biosensor Dedicated to Dielectric Spectroscopy of Liquids and Colloidal Suspensions», *MEMSWAVE 2014, Jul 2014, La Rochelle, France.*

Alaeddine Landoulsi, Arnaud Pothier, Claire Dalmay, Ling Yan Zhang, Aurélie Lacroix *et al.* : **« Tunable frequency resonant biosensors dedicated to dielectric permittivity analysis of biological cell cytoplasm»**, *IEEE International Microwave Symposium: IMS 2013, Jun 2013, Seatle, United States.*

Ling Yan Zhang, Arnaud Pothier, Alaeddine Landoulsi, Christophe Bounaix Morand Du Puch, Aurélie Lacroix *et al.* : « Label-Free Colorectal Cancer Cell Line Bio-Sensing Using RF Resonator » Transducers, International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Jun 2013, Barcelone, Spain.

Alaeddine Landoulsi, Claire Dalmay, Arnaud Pothier, Ling Yan Zhang, Aurélie Lacroix *et al.* : **« Capteurs Électromagnétiques Accordables En Fréquence Appliqués À L'analyse Cellulaire»**, *Colloque francophone PLUridisciplinaire sur les Matériaux*, *l'Environnement et l'Electronique : PLUMEE*, May 2013, Bacau, Roumanie.

Ling Yan Zhang, Aurélie Lacroix, Alaeddine Landoulsi, Arnaud Pothier, Claire Dalmay *et al.* : **«Resonant RF Biosensors for immature cells identification»,** *Progress In Electromagnetics Research Symposium : PIERS, Mar 2013, Tapei, Taiwan.*

Communications à des congrès nationaux

Alaeddine Landoulsi, Fatima Hjeij, Claire Dalmay, Annie Bessaudou, Pierre Blondy *et al.* : « Microcapteurs RF dédiés à la spectroscopie diélectrique de liquides et de particules



micrométriques en suspension», XIXèmes Journées Nationales Microondes, Jun 2015, bordeaux, France.

Alaeddine Landoulsi, Claire Dalmay, Arnaud Pothier, Ling Yan Zhang, Aurélie Lacroix *et al.* :« **Biocapteurs résonants et accordables en fréquence dédiés à l'analyse cellulaire aux fréquences radio et micro-ondes**», *Journées Nationales des Microondes, May 2013, Paris, France.*

Ling Yan Zhang, Alaeddine Landoulsi, Aurélie Lacroix, Claire Dalmay, Arnaud Pothier *et al.* : **« Discrimination de lignées cellulaires cancéreuses colorectales à l'aide de biocapteurs RF résonnants»**, *Journées Nationales des Microondes, May 2013, Paris, France.*

Workshop

Arnaud Pothier, Alaeddine Landoulsi, Annie Bessaudou, Christophe Bounaix Morand Du Puch, Christophe Lautrette *et al.* : « **Microwave biosensors dedicated for label-free discrimination of cancer cells**», *International Microwave Symposium (IMS) 2015 workshop : Emerging and Silicon Technologies for Bio-sensing from RF to Millimeter-wave Frequencies workshop , May 2015, Phoenix, United States.*

Arnaud Pothier, Alaeddine Landoulsi, Annie Bessaudou, Christophe Bounaix Morand Du Puch, Christophe Lautrette *et al.* : « Label Free Cell Discrimination Using Microwave Biosensors», European Microwave Week (EUMW) 2014 Workshop: MEMS Technology and Application: From RF to THz, Convergence with Microfluidics and Biosensing, Oct 2014, Rome, Italy.

Arnaud Pothier, Claire Dalmay, Ling Yan Zhang, Annie Bessaudou, Alaeddine Landoulsi *et al.* : « Microwave resonant biosensors for Cancer cell maturity and aggressiveness discrimination», Conference IMS 2013 : Microwave sensors and biochips for biomolecules and cells characterization workshop, Jun 2013, Seatle, United States.







Capteurs RF pour la caractérisation diélectrique de solutions et de particules à l'échelle micrométrique : Application aux biopuces à cellules

Les travaux de thèse proposés concernent le développement et la caractérisation de biocapteurs microfluidiques dédiés à la spectroscopie diélectrique microondes sur de petits volumes de liquides (quelques nL) et des particules micrométriques (typiquement la dizaine de μm). La spectroscopie diélectrique microonde offre des capacités uniques pour étudier les propriétés intracellulaires de cellules biologiques qui sont connues pour être représentatives de nombreux processus biologiques. Le capteur est basé sur une détection capacitive qui présente l'intérêt majeur d'être large bande (typiquement 400 MHz à 8 GHz dans ces travaux). Des électrodes métalliques épaisses en or ont été optimisées pour garantir un champ électrique homogène dans la zone de détection. Un système microfluidique a été implémenté sur le circuit RF pour que le liquide à analyser ait un impact minimal sur les pertes global du dispositif de façon à conserver une bonne sensibilité de détection. Après une étape de calibration, les performances de détection et d'analyse des capteurs microfluidiques proposés ont été démontrées sur différentes solutions. La partie réelle de leur permittivité relative a été extraite et comparée à la fois à la littérature et à des mesures réalisées avec une sonde coaxiale commerciale. Puis la faisabilité d'utiliser de tels capteurs large bande pour analyser des particules micrométriques circulant dans les canaux microfluidiques a été étudiée. Après une étude par simulations électromagnétiques, des expérimentations ont permis de mesurer des contrastes capacitifs autour de 1 fF à 5 GHz ce qui est très compétitif par rapport à l'état de l'art actuel. Finalement, des tests préliminaires ont été réalisés sur des cellules cancéreuses. Les résultats présentés démontrent le fort potentiel de l'approche proposée pour développer de nouveaux outils d'analyse sans marquage avec une large gamme d'applications, que ce soit dans les domaines du diagnostic ou du traitement.

Mots-clés : capteur capacitif, spectroscopie diélectrique, microondes, microfluidique

RF sensors for microscopic dielectric analysis of solutions and particles: Application to cell biochips.

The proposed work deals with the development and characterization of label-free microfluidic biosensors dedicated to the microwave dielectric spectroscopy of small volumes (few nL) and flowing micro-scale particles (about tens of μm). Microwave dielectric spectroscopy offers unique capabilities to investigate intracellular properties of biological cells, which are informative on many biological processes. The sensing principle is based on a capacitive detection which present the main advantage to able achieving broadband analysis (typically 400 MHz to 8 GHz in this work). Thick gold metal electrodes have been investigated to perform high sensitive analysis ensuring a homogeneous electric field in the detection area. A microfluidic system has been implemented over the RF circuit so that flowing liquid minimally impacts global losses of the system and has hence a limited effect on sensor sensitivity. After a calibration step, the detection and analysis capabilities of the proposed microfluidic sensors have been demonstrated on different solutions. The real part of their relative permittivity has been extracted and compared both to literature and measurements achieved with a commercial coaxial probe. Then, the feasibility of using such broadband sensors to analyze flowing micro-particles in the microfluidic channels has been studied. After electromagnetic simulations, experiments have allowed measuring capacitance contrasts around 1 fF at 5 GHz which is highly competitive with the current state-of-the-art. Finally, preliminary experimentations have been achieved on cancerous cells. The presented results demonstrate the high potential of the proposed approach to develop new label-free analysis tools with a large application range, either in the diagnosis or treatment fields.

Keywords : capacitive sensor, dielectric spectroscopy, microwave, microfluidic

