



**HAL**  
open science

# Microsystème optofluidique pour la mesure des propriétés mécaniques de cellules uniques

Ali Kheir Aldine

► **To cite this version:**

Ali Kheir Aldine. Microsystème optofluidique pour la mesure des propriétés mécaniques de cellules uniques. Micro et nanotechnologies/Microélectronique. Université Claude Bernard - Lyon I, 2022. Français. NNT : 2022LYO10131 . tel-04148968

**HAL Id: tel-04148968**

**<https://theses.hal.science/tel-04148968v1>**

Submitted on 3 Jul 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.



# **THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1**

**Ecole Doctorale N° 160  
Électronique, Électrotechnique, et Automatique**

**Discipline :  
Electronique, micro et nanoélectronique, optique et laser**

Soutenue publiquement le 29/11/2022, par :  
**Ali Kheir Aldine**

---

## **Microsystème optofluidique pour la mesure des propriétés mécaniques de cellules uniques**

---

Devant le jury composé de :

Mme Dagens, Béatrice  
M. Broquin, Jean-Emmanuel  
M. Picot, Stéphane  
M. Coupier, Gwennou  
Mme Faivre, Magalie  
M. Benyattou, Taha  
M. Verdier, Claude  
M. Berguiga, Lotfi  
Mme Jamois, Cécile

Directrice de recherche CNRS  
Professeur Grenoble INP-UGA  
Professeur UCBL  
Chargé de recherche CNRS  
Chargée de recherche CNRS  
Directeur de recherche CNRS  
Directeur de recherche CNRS  
Ingénieur de recherche CNRS  
Chargée de recherche CNRS

Rapporteure  
Rapporteur et président  
Examinateur  
Examinateur  
Directrice de thèse  
Co-directeur de thèse  
Invité  
Invité  
Invitée



# Remerciements

Cette thèse constitue l'aboutissement de mes années d'études en commençant par l'Université Libanaise, puis l'Université de Lorraine, et enfin l'Université Claude Bernard Lyon 1. Elle m'a permis de développer de solides connaissances et compétences, scientifiques et humaines, au sein d'un projet qui m'a toujours motivé et tenu à cœur.

Je tiens à exprimer ma gratitude à tous ceux qui m'ont aidé à mener à bien ma thèse de doctorat.

Tout d'abord, ce travail ne serait pas aussi riche et n'aurait pas pu être accompli sans l'aide et l'encadrement de Madame Magalie FAIVRE (Directrice de thèse) et de Monsieur Taha BENYATTOU (Co-directeur de thèse). Je tiens à les remercier pour la qualité de leur encadrement exceptionnel, pour leur patience et pour leur rigueur. Je n'oublierai jamais leur merveilleux traitement humain à mon égard. Vous étiez et serez toujours ma deuxième famille.

Mes sincères remerciements s'adressent à M. Lotfi BERGUIGA et à Mme Cécile JAMOIS pour leur aide précieuse tout au long de ma thèse. Je suis ravie d'avoir travaillé avec vous, car en plus de vos soutien scientifique, vous étiez toujours là pour me soutenir et me conseiller lors de l'élaboration de cette thèse.

Je tiens à exprimer ma gratitude aux membres de mon jury de thèse d'avoir soigneusement évalué mon travail de thèse. Je vous remercie pour votre temps, votre expertise et vos conseils.

Un grand merci aux deux équipes avec lesquelles j'ai travaillé et partagé des connaissances et des idées, l'équipe i-Lum en particulier M. Christian SEASSAL, M. Xavier LETARTRE, M. Hai Son NGUYEN, M. Sébastien CUEFF... Et l'équipe DSE notamment M. Yann CHEVOLOT, Mme Marie-Charlotte AUDRY-DESCHAMPS, M. Laurent QUIQUEREZ... Ainsi que la plateforme NanoLyon en particulier M. Jean-Louis LECLERCQ, M. Patrick PITTET, Mme Céline CHEVALIER, M. Nicolas TERRIER, M. Radoslaw MAZURCZYK, M. Gerome DEGOUTTES, M. Benjamin FORNACCIARI...

Je désire également remercier l'école doctorale de EEA, dirigé par M. Gérard SCORLETTI (avant) et M. Philippe DELACHARTRE (actuellement), et le laboratoire INL, dirigé par Mme Catherine BRU-CHEVALLIER (avant) et M. Bruno MASENELLI (actuellement), Mme Virginie LAGARDE, M. Pascal DECEBAL, Bénédicte ANDRÉ, Mme Sylvie GONCALVES... pour m'avoir permis de mener à bien ma thèse.

Mes collègues doctorants, J. Dumoulin, C. Bhan, H. Ren, A. Wilson, T. Girerd, A. Ndiaye, G. Mendigaliyeva, B. Allais, V. Chalut, M. Zimmer, F. Thevenet, C. Cardozo. Je vous remercie chaleureusement et je vous souhaite une bonne continuation et le meilleur succès dans votre thèse. Vous le méritez bien mes amies.

Un immense merci à mes amis, M. Wazni, H. Darwich, M. Makki, H. Fakhouri, A. Mkahal, M. Mkahal, M. Hadi, A. Berro, H. Hayek, A. Lakkis, M. Yaghi... Pour m'avoir supporté dans tous les sens du terme et avoir été mon refuge de bonheur.

Je tiens à remercier mes parents "Habib kheir aldine" et "Abir Bourji", merci pour l'ADN, mes frères "Jad et Iyad", pour votre soutien indéfectible durant ma thèse. Vous êtes loin de mes yeux, mais proches de mon cœur.

Enfin, J'adresse mes remerciements à ma belle, ma chérie, ma femme "Aya Jomaa", merci d'être mon amour. L'histoire dira que je suis le premier homme au monde à avoir écrit votre nom avec des globules rouges. [Cliquer ici](#)

## Résumé

Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études se sont intéressées au phénotype mécanique des cellules biologiques en tant que nouveau biomarqueur physique pour le diagnostic. En effet, il est maintenant admis que les propriétés mécaniques des cellules sont influencées par l'apparition et la progression nombre de maladies telles que le paludisme, la drépanocytose ou encore le diabète. Dans ce contexte, nous proposons une approche originale pour évaluer les propriétés mécaniques de globules rouges uniques. Une innovation majeure de cette approche est la lecture tout optique de la déformabilité des cellules - sans imagerie - permettant d'envisager un débit d'analyse compatible avec les applications visées. Nous proposons d'utiliser le mode résonant de micro-cavités de cristaux photoniques. La présence d'un objet au-dessus d'une micro-cavité induit un décalage spectral de la résonance. Nous proposons d'étendre ce concept pour la mesure de la déformabilité de l'objet, ce que nous avons démontré ici sur des globules sains et artificiellement rigidifiés.



# Table des matières

<b>Introduction et contexte</b>	<b>10</b>
<b>1. Caractérisation mécanique des globules rouges. Etat de l'art et positionnement</b>	<b>15</b>
1.1 Etat de l'art sur le phénotypage mécanique des globules rouges .....	16
1.1.1 Structure et propriétés mécaniques des globules rouges .....	16
1.1.2 Techniques collectives.....	20
1.1.3 Techniques sur cellules individuelles.....	21
a. Aspiration par micropipette .....	21
b. Microscopie à force atomique (AFM) .....	21
c. Pincés optiques .....	22
d. Electro-déformation.....	27
e. Techniques microfluidiques .....	29
1.1.4 Synthèse.....	31
1.2 Composants nanophotoniques à base des cristaux photoniques.....	33
1.3 Notre approche.....	39
1.4 Conclusion .....	42
<b>2. Matériels et Méthodes</b>	<b>43</b>
2.1 Dispositif visé .....	44
2.2 Fabrication de la chambre optofluidique .....	45
2.2.1 Technologie des cristaux photoniques.....	45
2.2.2 Fabrication du réservoir fluidique.....	48
2.2.3 Traitement des surfaces et conservation des cristaux photoniques ....	49
2.3 Préparation des échantillons biologiques .....	52
2.3.1 Préparation des globules rouges sains et rigidifiés .....	52
2.3.2 Mesure de module d'Young .....	53

2.4 Montage expérimental .....	54
2.4.1 Module 1 : Mesure de micro-réflexivité.....	54
a. Source de lumière et caractéristique de faisceau.....	56
b. Visualisation infra-rouge et collecte de signal.....	58
2.4.2 Module 2 : Positionnement des cellules et déformation optique. ....	60
2.5 Conclusion. ....	61
<b>3. Etudes sur des microgouttes d'huile et des globules rouges</b>	<b>63</b>
3.1 Microgouttes d'huile dans l'eau .....	65
3.1.1 Fabrication des microgouttes d'huile.....	65
3.1.2 Mesure de la tension superficielle des microgouttes. ....	67
3.1.3 Déformation des microgouttes à l'aide de forces optiques .....	68
a. Conditions expérimentales.....	68
b. Piégeage et déformation des microgouttes par une pince optique classique .....	69
3.1.4 Etudes en fonction de la puissance du laser de déformation.....	71
3.2 Etude sur les globules rouges sains .....	76
3.3 Conclusion .....	78
<b>4. Adhésion non spécifique de globules</b>	<b>81</b>
4.1 Globules en suspension dans une solution de phosphate tamponnée (PBS) - Problème d'adhésion sur les surfaces .....	83
4.2 Approches initiales de la résolution du problème .....	84
4.2.1 Techniques de passivation de surface.....	84
a. Traitement avec l'albumine de sérum bovin.....	84
b. Silanisation de surface .....	85
4.2.2 Modification de la solution tampon.....	86
a. Globules rouges dans un milieu isotonique de sucrose .....	87
b. Variabilité intra-donneur .....	88
c. Variabilité inter-donneurs.....	89
4.2.3 Bilan.....	90
4.3 Nouvelle approche .....	91

4.4 Conclusion.....	93
<b>5. Démonstration de la mesure de déformabilité</b>	<b>95</b>
5.1 Etudes des décalages spectraux sur cellules individuelles.....	97
5.1.1 Globules rouges sains.....	98
5.1.2 Globules rouges artificiellement rigidifiés.....	100
5.2 Eude statistique.....	102
5.3 Discussion.....	104
5.4 Conclusion.....	106
<b>Conclusions et perspectives</b>	<b>108</b>
<b>A Pincés optiques classique</b>	<b>112</b>
A.1. Propriétés des faisceaux gaussiens	
A.2. Forces optiques	
A.3. Stabilité d'une pince classique	
A4. Piégeage dans un milieu aqueux	
<b>B Fabrication des canaux microfluidique</b>	<b>119</b>
B1 Fabrication du maitre-moule	
B2. Le moulage puis démoulage du PDMS	
B3. Fermeture du microsystème par collage plasma.	
<b>C Images microscopiques de test d'adhérence des globules rouges</b>	<b>122</b>
<b>Bibliographie</b>	<b>125</b>

# Introduction et contexte

La dernière décennie a vu une croissance substantielle des recherches sur la façon dont l'apparition et la progression de maladies impactent les propriétés physiques des cellules, en particulier leurs propriétés mécaniques.

Les fonctions cellulaires peuvent être significativement impactées par les changements de propriétés mécaniques de la cellule associés à des processus biochimiques ou des pathologies. Par exemple, l'évolution des cellules cancéreuses en cellules métastatiques est associée à une diminution de leur rigidité [1]. Chez une personne atteinte de drépanocytose, l'hémoglobine - molécule qui lie l'oxygène à son passage dans les poumons, pour ensuite le délivrer dans les tissus - contenue dans les globules rouges est présente sous une forme mutée qui a la propriété de polymériser en situation désoxygénée, entraînant ainsi un changement de forme et de propriétés mécaniques des cellules [2]. Le diabète est régulièrement associé à une augmentation de l'hémoglobine intracellulaire, et les études ont montré que les globules rouges diabétiques ont une déformabilité altérée par rapport aux globules rouges normaux [3]. Ces trois exemples illustrent comment les propriétés mécaniques peuvent être utilisées comme indicateur de l'état physio-pathologique des cellules [4].

Une maladie qui présente un intérêt particulier est le paludisme. Le paludisme est l'une des maladies à transmission vectorielle les plus graves. Elle constitue un problème de santé majeur dans le monde car elle touche environ 70 pour 1000 personnes/an répartis sur plus de 85 pays [5]. Le paludisme est une maladie potentiellement mortelle causée par l'infection des globules rouges par des parasites protozoaires du genre *Plasmodium* qui sont transmis à l'homme par la piqûre de moustiques anophèles femelles infectés [6].

On distingue 5 types de paludisme chez l'homme. Les deux plus courants sont *Plasmodium falciparum* et *Plasmodium vivax*. *Plasmodium malariae*, *Plasmodium ovale* et *Plasmodium knowlesi*, sont également présents. Chaque type de parasite a une répartition géographique et une dangerosité différente. Le plus redoutable est le *Plasmodium falciparum*, qui est très répandu en Afrique, car il peut provoquer une forme grave et compliquée de l'infection, pouvant entraîner la mort. *Plasmodium vivax* peut également provoquer une forme grave de paludisme, mais les cas sont rares.

Au cours de leur cycle érythrocytaire, les parasites pénètrent dans les globules rouges, s'y développent et s'y reproduisent, rendant ainsi moins déformables [7] les cellules hôtes, jusqu'à leur destruction. L'éclatement des globules rouges parasités aura pour conséquence la dissémination de nouveaux parasites qui infecteront à leur tour d'autres cellules. La mortalité associée au paludisme est particulièrement élevée dans les pays en voie de développement disposant d'installations de santé limitées. L'augmentation progressive du nombre de patients atteints de paludisme grave observée entre 2000 et

2020 continue de globalement s'accroître. Selon le rapport 2021 de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) [5] il y a eu 241 millions de cas de paludisme en 2020, dont la grande majorité a concerné la zone africaine (82.2%), puis en moindre mesure l'Asie du Sud-Est (10%) et la région Est de la méditerranée (4.9%).

Aujourd'hui, le test diagnostique de référence est le frottis sanguin, qui consiste en l'observation microscopique d'une goutte de sang colorée et étalée sur une lame de verre. Ce test, bien que précis et robuste, requiert des infrastructures particulières, l'intervention d'un personnel spécialisé, des équipements volumineux et parce que non automatisé, peut être relativement long dans le cas de très faibles parasitémies (nombre de cellules infectées sur nombre total de cellules). Toutes ces conditions sont difficilement remplies dans les zones les plus touchées par le palu, *i.e.* Afrique, Inde ou encore Amérique du Sud, et ce type de solution reste généralement privilégiée dans les infrastructures médicales et non pas au plus près des patients, ce qui peut rendre difficile de diagnostiquer à temps la maladie pour pouvoir la traiter. D'autres méthodes de détection existent, comme les tests basés sur la réaction en chaîne par polymérase (PCR) qui peuvent avoir une sensibilité 100 fois supérieure au frottis sanguin [8]–[10] en particulier dans le cas d'une faible parasitémie [11] ou quand les symptômes ne sont pas encore apparus [12], mais ces tests ne sont pas encore utilisés en routine sur le terrain.

Une solution alternative a donc été développée pour le diagnostic sur le terrain avec les tests de diagnostic rapides qui reposent sur une technique immuno-chromatographique [13]–[15]. La présence dans le sang du patient de protéines sécrétées par le parasite est détectée via une reconnaissance anticorps/antigène et visualisée par une réaction colorimétrique. Cette technique est globalement qualitative. La sensibilité et la spécificité de cette technique pour la détection de parasites est d'environ 96%. Malgré ces avantages, ces tests portables et rapides présentent néanmoins des inconvénients. En effet, l'utilisation de réactifs biochimiques peut entraîner un surcoût, nécessiter des conditions de conservation strictes et imposer au dispositif une date d'expiration. De plus, la rémanence des marqueurs biomoléculaires dans le sang, plusieurs jours après la disparition des parasites peut donner lieu à des faux-positifs qui participent au développement des phénomènes de résistance. Cependant, ces tests requièrent des infrastructures particulières et l'intervention de personnels spécialisés. Pour surmonter ces désavantages, il est nécessaire de développer de nouvelles approches exploitant les propriétés physiques des cellules.

Dans ce contexte, nous proposons d'allier les forces optiques et la microfluidique afin d'évaluer une nouvelle approche pour le diagnostic du paludisme, basé sur une mesure de la déformabilité des globules rouges de l'échantillon. En effet, au cours des 50 dernières années, il a été démontré qu'un globule rouge sain se déforme de manière importante en réponse à des contraintes, alors qu'un globule rouge infecté montre une très faible déformabilité pour le stade de développement le plus avancé (schizonte), lorsque le parasite occupe toute la cellule hôte [16]. Pour cela, nous proposons

d'explorer une approche originale " toute optique" développée à l'INL pour venir à la fois déformer et lire la réponse mécanique de la cellule.

Le présent manuscrit est divisé en cinq chapitres.

Dans le premier chapitre, après avoir introduit le globule rouge et ses propriétés de déformabilité, nous présentons une première revue bibliographique sur le phénotypage mécanique des globules rouges. Nous comparons les caractéristiques des différentes techniques décrites dans la littérature, afin de mettre en évidence leurs avantages et inconvénients. Nous présentons ensuite les composants nanophotoniques, en particulier les composants à base de cristaux photoniques, ainsi que leurs applications pour la détection optique de cellules et d'entités biologiques. La fin de ce premier chapitre sera consacrée à la description de notre l'approche, qui consiste en un dispositif à base de cristaux photoniques en silicium. Notre stratégie est basée sur la mesure du décalage spectral de la résonance de ces structures photoniques afin de détecter, sans imagerie, la présence et la déformation de globules rouges au-dessus de leur surface.

Dans le deuxième chapitre, nous présentons notre dispositif et les éléments qui le constituent. Puis, nous illustrons en détail les étapes de fabrication de chacun de ces éléments, la procédure de traitement des échantillons que nous avons développés dans cette thèse et enfin la préparation des suspensions biologiques. Ensuite, nous détaillons le banc optique que nous avons développé et utilisé dans les expériences de piégeage et de déformation optique des globules rouges et de la mesure de réflectivité des cavités photoniques.

Dans le troisième chapitre, nous présentons les premières démonstrations faites avec des microgouttes d'huile minérale dans l'eau. Après avoir explicité la fabrication des microgouttes en microfluidique, ainsi que leur caractérisation physique, nous montrons les décalages spectraux de la résonance d'une cavité photonique avec les microgouttelettes d'huile. À la fin de ce chapitre, nous présentons les études préliminaires que nous avons menées sur des globules rouges sains.

Le quatrième chapitre porte sur la résolution d'un verrou important auquel nous avons été confrontés dans cette thèse, à savoir l'adhésion non spécifique des globules rouges à la surface du cristal photonique. Nous présentons les différentes solutions techniques qui ont été proposées pour résoudre ce problème et finalement, nous détaillons l'approche que nous avons développée pour surmonter ce problème d'adhésion et poursuivre nos études sur les globules rouges.

Enfin, le cinquième chapitre, porte le point central de ce travail de thèse : la mesure optique des propriétés mécaniques de globules rouges humains. Nous illustrons tout d'abord la démarche expérimentale que nous avons développée et la cavité photonique que nous avons utilisée pour réaliser ces études expérimentales. Nous présentons ensuite les résultats de mesure des décalages spectraux expérimentaux de la résonance

de la cavité en fonction de la puissance laser appliquée sur des globules rouges sains et artificiellement rigidifiés. L'analyse des résultats expérimentaux et leur modélisation concluent ce chapitre.

La dernière partie sera consacré à la conclusion et aux perspectives de ce travail de thèse. Nous proposons notamment des voies d'amélioration possibles et nous discutons des étapes restant à franchir afin de faire de cette approche un candidat sérieux pour une application diagnostic.



# Chapitre



## Caractérisation mécanique des globules rouges. Etat de l'art et positionnement

### Sommaire

---

1.1	Etat de l'art sur le phénotypage mécanique des globules rouges .....	16
1.1.1	Structure et propriétés mécaniques des globules rouges .....	16
1.1.2	Techniques collectives.....	20
1.1.3	Techniques sur cellules individuelles.....	21
a.	Aspiration par micropipette .....	21
b.	Microscopie à force atomique (AFM) .....	21
c.	Pinces optiques .....	22
d.	Electro-déformation.....	27
e.	Techniques microfluidiques .....	29
1.1.4	Synthèse.....	31
1.2	Composants nanophotoniques à base des cristaux photoniques.....	33
1.3	Notre approche.....	39
1.4	Conclusion .....	42

---

Cette thèse pluridisciplinaire vise à étudier optiquement les propriétés mécaniques des globules rouges, à partir d'une approche originale utilisant la nanophotonique. Il est donc indispensable d'effectuer une revue bibliographique afin de positionner notre approche par rapport à celles existantes dans la littérature pour caractériser les propriétés mécaniques des globules rouges. Dans ce chapitre, nous rappelons d'abord l'architecture d'un globule rouge et nous relierons sa structure à ses propriétés de déformabilité. Puis, après avoir présenté les différentes techniques de caractérisation mécanique de cellules disponibles dans la littérature, nous discutons de leurs avantages et inconvénients dans le contexte du diagnostic automatisé du paludisme. Nous présentons ensuite les composants nanophotoniques à base de cristaux photoniques et leurs applications dans la détection optique d'entités biologiques. Enfin, nous détaillons l'approche que nous proposons d'évaluer dans cette thèse.

## 1.1 Etat de l'art sur le phénotypage mécanique des globules rouges

Comme nous l'avons mentionné dans l'introduction, le développement de nouvelles solutions de diagnostic est un enjeu de santé important pour certaines pathologies. Grâce au lien étroit existant entre la déformabilité des cellules et leurs états physiopathologiques, l'utilisation d'approches biophysiques peuvent apporter des solutions prometteuses. Dans ce contexte, l'objectif de cette thèse est de développer une nouvelle technique pour mesurer la déformabilité des cellules pour des applications de diagnostic. Ici, nous nous focalisons sur le paludisme, une maladie parasitaire qui impacte particulièrement les globules rouges et leur déformabilité. Nous allons donc présenter les cellules d'intérêt, à savoir les globules rouges et introduire les différentes techniques de caractérisation mécanique qui ont été développées.

### 1.1.1 Structure et propriétés mécaniques des globules rouges

Le sang est composé d'un fluide, le plasma, dans lequel circulent trois types de cellules : les globules rouges, les globules blancs et les plaquettes. Les globules rouges sont les cellules les plus nombreuses avec 4 à 6 millions de cellules/ $\mu\text{L}$  de sang, soit 1 globule blanc, pour environ 50 plaquettes et 1000 globules rouges. Ils se présentent sous la forme d'un disque biconcave de 7 à 8  $\mu\text{m}$  de diamètre et de 2  $\mu\text{m}$  d'épaisseur en moyenne comme illustré sur la figure *Figure 1-a*. Les globules rouges sont composés d'un cytoplasme contenant principalement de l'hémoglobine, encapsulé par une membrane d'une dizaine de nanomètre d'épaisseur. La membrane est elle-même composée d'une bicouche lipidique, tapissée d'un réseau bidimensionnel de spectrine qui joue le rôle de cytosquelette *Figure 1-b*. Des protéines trans-membranaires servent

de point d'encrage entre la bicouche et le cytosquelette. Les globules rouges ne possèdent ni noyau, ni organelle.

Le rôle des globules rouges est de transporter les gaz ( $O_2$  et  $CO_2$ ) entre les poumons et les tissus et organes [17]. Pour cela, ils doivent être capable de se déformer pour circuler dans les capillaires de la microcirculation dont certains peuvent être plus petits que leur propre diamètre. Ceci est rendu possible par leur capacité unique à se déformer.

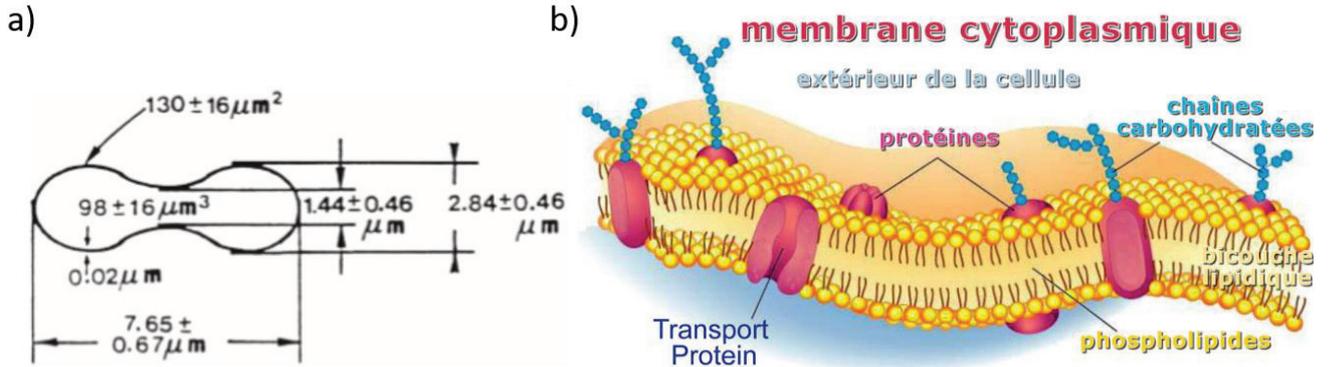


Figure 1 : a) Représentation schématique d'un globule rouge humain, rapportant toutes les dimensions. d'après [18]. b) Représentation schématique de la membrane du globule rouge [19].

La déformabilité exceptionnelle du globule rouge est attribuée à trois facteurs [20]: (i) aux propriétés viscoélastiques de sa membrane, (ii) la viscosité de son cytoplasme (10 mPa.s à  $25^\circ$  [21]) et (iii) son rapport surface/volume qui traduit la surface importante du globule ( $130 \mu m^2$ ), nettement supérieure à la surface d'une sphère de même volume ( $97 \mu m^2$ ).

En raison de sa faible épaisseur, la membrane peut être traitée comme un matériau continu 2D. En mécanique générale bidimensionnelle, toute déformation d'un matériau peut se décomposer en une combinaison des trois modes de déformation fondamentaux représentés dans la Figure 2 [22].

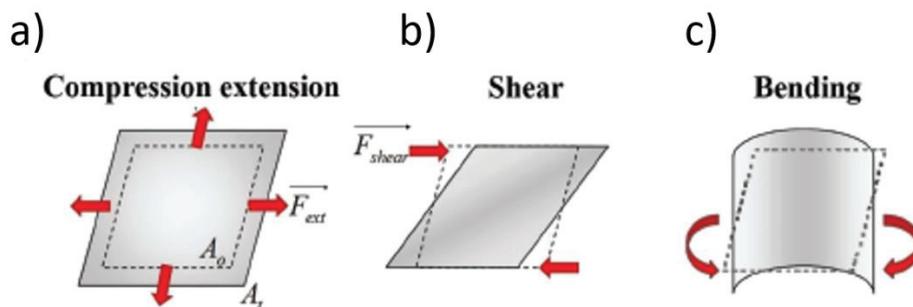


Figure 2 : Représentation schématique des trois types de déformation de base d'un matériau 2D : a) compression-extension, b) cisaillement et c) courbure [22].

La contrainte de **compression-extension pure** est caractérisée par l'énergie nécessaire pour augmenter en cas d'extension ou diminuer en cas de compression, la surface du

matériau sans changement de forme comme illustré dans la *Figure 2-a*. Cette énergie est caractérisée par le module d'extension-compression  $k$  défini par :

$$F_{ext} = k \frac{\Delta A}{A_0} \quad (1)$$

Où  $F_{ext}$  est la force externe appliquée pour induire la déformation,  $A_0$  est la surface initiale de la membrane et  $\Delta A = A_t - A_0$  correspond à la variation de surface à l'instant  $t$ .

La déformation par **cisaillement pure** correspond à une modification de la forme de la membrane à surface constante (voir *Figure 2-b*). Elle est caractérisée par le module de cisaillement  $\mu$  défini comme :

$$T_s = \frac{\mu}{2} (\lambda^2 - \lambda^{-2}) \quad (2)$$

Avec  $T_s$ , la force de cisaillement et  $\lambda$ , le rapport d'extension défini par  $\lambda = l_t / l_0$ , où  $l_t$  est la dimension étendue et  $l_0$  est la même dimension au repos.

Un autre paramètre permettant de définir l'élasticité du globule rouge beaucoup utilisé dans la littérature est le Module d'Young  $E$ . Il est relié aux autres modules par les relations suivantes :

$$k = \frac{E}{3(1-2\nu)} \text{ et } \mu = \frac{E}{1(1+\nu)} \quad (3)$$

Enfin, la déformation de **courbure pure**, correspond à un changement de courbure de la membrane à surface et forme constantes (voir *Figure 2-c*). Cette déformation est caractérisée par un module de courbure  $B$  défini comme :

$$M = B (C_1 + C_2 - C_3) \quad (4)$$

Où  $M$  est le moment de courbure,  $C_1$  et  $C_2$  les deux courbures dans les deux plans principaux et  $C_3$  la courbure à l'état initiale sans contrainte.

Des caractérisations mécaniques réalisées par aspiration par micropipettes sur des vésicules lipidiques géantes [23] – dont la membrane est comparable à la bicouche lipidique de la membrane des globules rouges - ont permis la mesure du module d'extension-compression  $k$  de la membrane lipidique. La valeur trouvée est de l'ordre de  $\sim 200\text{-}300$  mN/m. Le module de cisaillement  $\mu$  qui est principalement déterminé par le cytosquelette de spectrine, a été mesuré par étirement des cellules à l'aide d'une pince optique et est compris entre 2,5 et 9  $\mu\text{N}/\text{m}^2$  [24]. De plus, la valeur du module de Young du globule s'étend de  $100 \pm 30$  Pa [25] à  $4,4 \pm 0,6$  kPa [26]. La viscosité de sa membrane est de l'ordre de  $0,5 - 1.10^{-6}$  N.s/m [27].

De plus, le module de courbure  $B$  du globule rouge est principalement déterminé par la composition chimique de sa bicouche lipidique.  $B$  a été mesuré par l'aspiration avec de micropipette et est de l'ordre de  $10 k_b T$  à  $50 k_b T$  [28], avec  $k_b$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température en Kelvin.

Comme mentionné plus haut, le rapport surface/volume du globule rouge participe également à sa déformabilité exceptionnelle. Une façon simple d'influer sur ce rapport

est de modifier le volume de la cellule. Ceci peut se faire via la notion de pression osmotique.

On appelle osmose le passage d'un solvant (l'eau dans la plupart des cas) à travers une membrane semi-perméable sous l'action d'un gradient de concentration. Plus précisément, l'eau migre dans la direction qui tend à égaliser les concentrations de soluté des deux côtés de la membrane, c'est-à-dire de la solution diluée vers la plus concentrée. La pression osmotique est définie comme la pression minimale qui doit être exercée pour empêcher l'osmose. Plus le gradient de concentration entre deux milieux est fort, plus la pression osmotique est élevée. Dans le cas des globules rouges, la membrane qui sépare le cytoplasme du milieu extérieur à la cellule est très perméable à l'eau mais peu perméable aux macromolécules et aux ions ; elle agit donc comme une membrane semi-perméable.

Selon la concentration d'ions dans la solution, le globule rouge peut donc être soumis à différentes pressions osmotiques qui vont avoir pour conséquence des changements de volumes à surface constante, et donc de déformabilité. Un milieu hypotonique désigne une solution dont la concentration en ions est inférieure à celles du cytoplasme des globules rouges. Afin d'équilibrer les concentrations en ions de part et d'autre de la membrane, l'eau va entrer dans la cellule, lui donnant une forme typique de stomatocyte, *i.e.* un aspect plus gonflé et sphérique (voir *Figure 3-a*). Les milieux fortement hypotoniques sont généralement associés avec un risque important de lyse. Par opposition, dans une solution isotonique, la concentration en ions est supérieure à celle du cytoplasme, ce qui va induire un dégonflement de la cellule en équinocytes (*Figure 3-c*). Les cas où la concentration en ions est à l'équilibre de part et d'autre de la membrane sont appelés conditions isotoniques. Les milieux physiologiques dont l'osmolarité est comprise entre 285 et 300 mOsmols/L, par exemple le plasma, assurent des conditions isotoniques pour les globules rouges. Dans un tel milieu, les cellules ont une forme discocyte normale comme illustré sur la *Figure 3-b*.

La modification du volume des cellules à surface constante, via des modifications de pression osmotique peut modifier les propriétés biophysiques des globules rouges, notamment leur déformabilité [29], la concentration en hémoglobine[30], la viscosité du cytoplasme et également leur indice de réfraction [31].

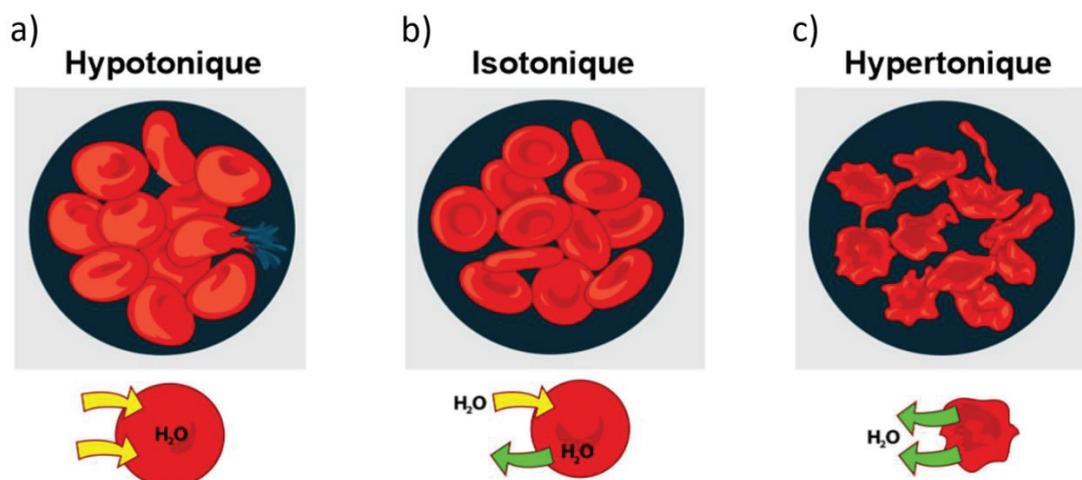


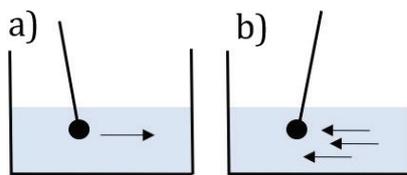
Figure 3 : Illustration de l'effet de l'osmolarité du milieu environnant sur la forme des globules rouges dans le cas d'un milieu extérieur a) hypotonique, b) isotonique et c) hypertonique [32].

Afin d'étudier et caractériser les propriétés mécaniques des globules rouges définies précédemment, différentes techniques ont été développées [33]; nous allons maintenant les présenter. Ces techniques peuvent être divisées en deux catégories : (i) les techniques collectives qui permettent l'obtention d'une mesure sur une population globale, et (ii) les techniques sur cellule individuelle qui, comme leur nom l'indique, permettent de réaliser une caractérisation mécanique à l'échelle de la "cellule unique".

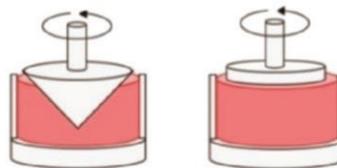
## 1.1.2 Techniques collectives

Parmi les méthodes collectives de caractérisation des cellules sanguines et qui sont effectuées directement sur l'ensemble des cellules de l'échantillon, on peut citer la viscosimétrie, la rhéométrie et l'éktacytométrie.

### 1. Viscosimètre



### 2. Rhéomètre



### 3. Ektacytomètre

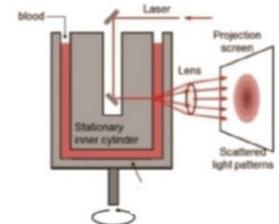


Figure 4 : Illustration des techniques collectives développées pour effectuer le phénotypage mécanique des cellules : 1) viscosimètre, 2) rhéomètre, 3) ektacytomètre. D'après [33].

Les mesures par viscosimétrie permettent de mesurer la viscosité globale d'une solution ou d'une suspension d'objets. Elles peuvent être effectuées soit en maintenant le liquide à l'arrêt et en y faisant bouger l'objet (*Figure 4-1,a*), soit en immobilisant l'objet et en faisant circuler le liquide autour de lui (*Figure 4-1,b*). L'observation du flux permet d'évaluer la force de traînée liée à la viscosité de la solution  $\eta_{out}$ .

L'utilisation d'un rhéomètre [34] permet d'appliquer une contrainte de cisaillement sur la suspension de globules rouges à l'aide de deux surfaces en rotation l'une par rapport à l'autre comme illustré sur la *Figure 4-2*. Parmi les configurations possibles on peut citer les rhéomètres plan/plan, cône/plan ou encore la géométrie de Couette, composée de 2 cylindres contrarotatifs. Cette technique a été utilisée pour estimer le temps de relaxation des globules rouges après l'arrêt des surfaces mobiles.

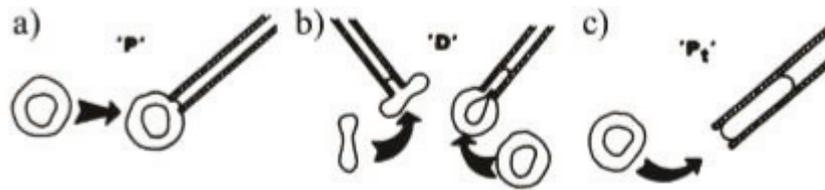
L'ektacytométrie, dont le principe est illustré sur la *Figure 4-3*, utilise une méthode de diffraction laser combinée à un rhéomètre de Couette, pour mesurer la déformabilité des globules rouges. La déformation des cellules est déduite de la figure de diffraction issue de l'interaction de tous les faisceaux diffractés. Celle-ci traduit l'ensemble des déformations adoptées par les cellules de l'échantillon de sang. Il est important de

signaler que l'ektacytométrie permet de détecter des anomalies génétiques de la membrane des globules rouges [35]

### 1.1.3 Techniques sur cellules individuelles

#### a. Aspiration par micropipette

L'aspiration par micropipette [36] est l'une des méthodes les plus répandues pour mesurer les propriétés mécaniques de la membrane du globule rouge. La technique utilise une micropipette en verre de diamètre interne  $\sim 1-3 \mu\text{m}$  pour aspirer une portion de la membrane du globule en appliquant une pression négative dans la pipette. Les modalités de mesure peuvent varier, soit en mesurant la pression nécessaire pour aspirer une membrane de longueur égale au diamètre de la micropipette (*Figure 5-a*) soit en mesurant le rapport entre la longueur aspirée et le diamètre de la micropipette à une pression donnée (*Figure 5-b*). Enfin, la mesure de la pression nécessaire pour aspirer toute la cellule à l'intérieur de la micropipette (*Figure 5-c*) peut également être utilisée pour extraire les propriétés des globules rouges.



*Figure 5 : Illustrations schématiques des trois variantes de la technique d'aspiration par micropipette. D'après [22]*

La technique d'aspiration par micropipette permet de mesurer le module d'extension  $k$  du globule rouge en utilisant l'équation (5) reliant  $k$  à la différence de pression appliquée à la pipette et en utilisant les dimensions de la cellule aspirée et celles de la pipette.

$$K = \frac{R_0^2}{1 - \frac{R_p}{R_0}} \frac{\Delta P}{\Delta L} \quad (5)$$

Où  $R_0$  est le rayon de la cellule avant aspiration,  $R_p$  le rayon de la micropipette,  $\Delta L$  la longueur de la langue de membrane aspirée et  $\Delta P$  la différence de pression appliquée dans la pipette pour déclencher l'aspiration. Les valeurs de  $k$  ont été rapportés dans la littérature de l'ordre de 300 à 500  $\text{mN.m}^{-1}$  [37], [38], tandis que les valeurs de  $k$  pour la bicouche lipidique seule est d'environ  $\sim 200-300 \text{ mN.m}^{-1}$  comme nous l'avons reporté précédemment [23].

#### b. Microscopie à force atomique

La microscopie à force atomique (AFM), technique développée en 1985 par Binnig et al [39], utilise un microscope à sonde locale qui permet de visualiser la topographie de la surface d'un échantillon. La technique repose sur le contact physique d'une pointe extrêmement fine, placée au bout d'un levier flexible avec la surface de la cellule (voir *Figure 6-a*). L'interaction de la pointe et du substrat induit de petites flexions du levier qui sont détectées par la déflexion d'un faisceau laser réfléchi sur le levier, captées par des photodiodes comme illustré sur *Figure 6-a*. Cette technique permet d'analyser des variations de hauteur aussi petites que quelques nanomètres et de mesurer des forces de l'ordre du nN [26]. La *Figure 6-b* présente l'image topographique en 3D d'un globule rouge obtenue par AFM.

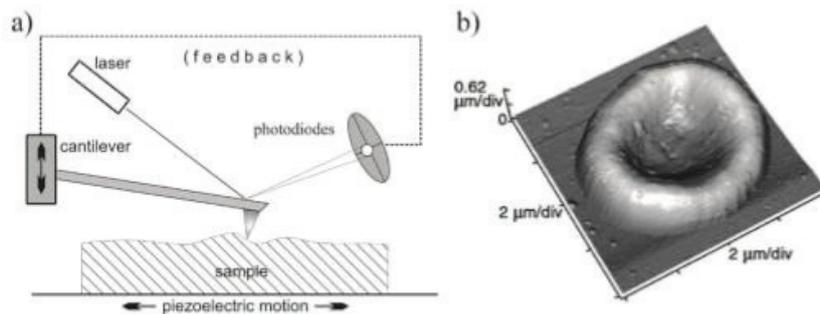


Figure 6 : a) Illustration schématique du principe de l'AFM, b) Image topographique en 3D d'un RBC réalisé par AFM. D'après [33].

En utilisant cette technique, on peut mesurer le module de Young d'un globule rouge. La force appliquée  $F$  est reliée au module d'Young  $E$  et à l'indentation  $\Delta z$  par :

$$F = \frac{4\sqrt{R_c}}{3} \cdot \frac{E}{(1-\nu^2)} \Delta z^{\frac{3}{2}} \quad (6)$$

Avec  $R_c$  est le rayon de courbure et  $\nu$  le coefficient de poisson qui est considéré égale à 0.5 pour les cellules biologiques. La valeur de  $E$  est de l'ordre de  $4,4 \pm 0,6$  kPa.

### c. Pinces optiques

Depuis l'époque de leur introduction, les pinces optiques sont devenues un outil puissant [40]. Le travail pionnier d'Arthur Ashkin, aux Bell Labs, dans les années 70 et 80 a ouvert la voie pour que le champ du piégeage optique émerge avec l'invention du tout premier système de pince optique à force de gradient. La technique de pince optique utilise un faisceau laser qui est focalisé sur un spot limité par la diffraction, généralement à travers un objectif de microscope à grande ouverture numérique. Les objets de taille micro/nanométriques ayant un indice de réfraction supérieur au milieu environnant sont alors piégés au maximum d'intensité du faisceau laser focalisé.

Les forces optiques peuvent être résumées en deux composantes principales [41], comme illustré dans la *Figure 7*. La première composante correspond à la pression

radiative des photons ( $F_{rad}$ ). Cette force est orientée dans la direction de propagation du laser. Elle provient du transfert de la quantité de mouvement des photons, aux objets qu'ils rencontrent. En effet, un photon possédant une quantité de mouvement ( $p = h \lambda$ ),  $h$  étant la constante de Planck et  $\lambda$  la longueur d'onde, peut en perdre une partie au contact d'un obstacle. D'après la loi de conservation de la quantité de mouvement, la quantité de mouvement perdue par le photon est en fait transmise à l'obstacle qu'il a rencontré (une paroi, une particule, etc...).

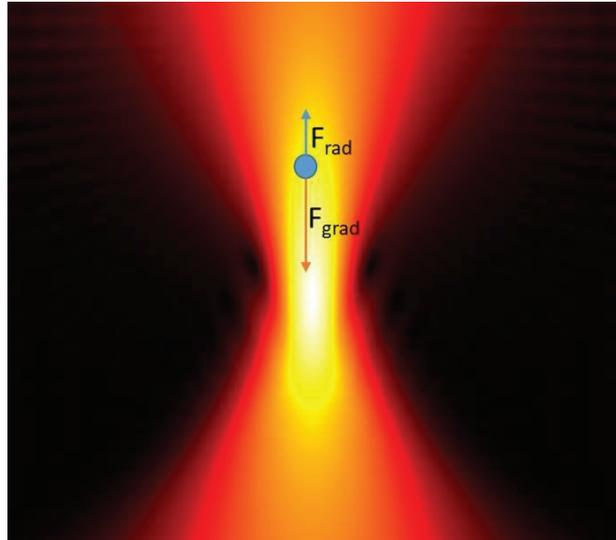


Figure 7 : Représentation des forces générées par une pince optique classique.

La deuxième composante des forces optiques est la force de gradient ( $F_{grad}$ ). Dans le cas d'un laser à profil gaussien, l'intensité du faisceau laser est très importante au centre de l'axe optique et elle diminue en suivant la forme d'une gaussienne lorsque l'on s'éloigne de cet axe perpendiculairement à la direction de propagation du laser. La force de gradient est la force qui va attirer la particule vers un extremum d'intensité du faisceau. Elle est dirigée selon le gradient d'intensité et donc selon un profil de champ sphérique qui la concentre vers le centre du faisceau, peu importe sa position initiale. C'est cette force qui est utile au piégeage par pinces optiques. Pour plus de détails sur les forces optiques, la stabilité de pinces optiques classiques ainsi que le piégeage dans un milieu aqueux, le lecteur peut se reporter vers l'annexe A.

Nous allons maintenant détailler les différentes mises en œuvre des pinces optiques présentes dans la littérature et qui sont utilisées pour caractériser mécaniquement les cellules biologiques.

### *Etirement par des pinces optiques*

Les forces optiques ont été utilisées pour sonder les propriétés mécaniques des cellules. Par exemple en manipulant des microsphères liées à leur membrane [24].

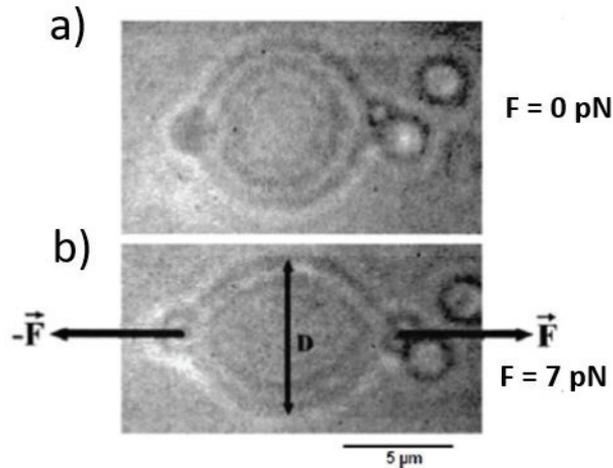


Figure 8 : Images microscopiques illustrant un globule rouge avec deux microparticules attachées à sa membrane de manière diamétralement opposée, (en haut) au repos, (en bas) pendant l'étirement induit par le déplacement relatif des microbilles avec une force de 7 pN. D'après [24]

Les billes métalliques sont fonctionnalisées pour coller à la surface des globules rouges. Ne sont sélectionnées que les cellules où 2 billes se retrouvent collées à des positions diamétralement opposées sur la membrane, comme illustré sur la *Figure 8-a*. Chaque bille est alors manipulée par une pince optique, et déplacée de manière opposée afin d'étirer la cellule (*Figure 8-b*). Une observation au microscope permet de quantifier la déformation de la cellule en réponse à l'application d'une force sur chaque bille. En mesurant la modification de diamètre pour une contrainte appliquée, on peut estimer le module d'élasticité  $\mu$  en utilisant la formule :

$$D = D_0 - \frac{F}{2\pi\mu} \quad (7)$$

Avec  $D_0$  et  $D$  les diamètres de la cellule avant et après étirement, respectivement.  $F$  est la force appliquée, et  $\mu$  est le module de cisaillement élastique de la membrane.

### *Elongation par un double piège*

Dans une étude sur la déformabilité des globules rouges chez les patients atteints de rétinopathie diabétique à l'aide de pinces optiques, les chercheurs ont piégé les globules rouges directement, sans avoir recours à des microbilles [42]. Dans cette configuration, une pince optique à double piège est utilisée pour étirer des globules rouges individuels *Figure 9-a*, permettant ainsi de ne pas impacter la mesure par la présence des billes liées à la membrane.

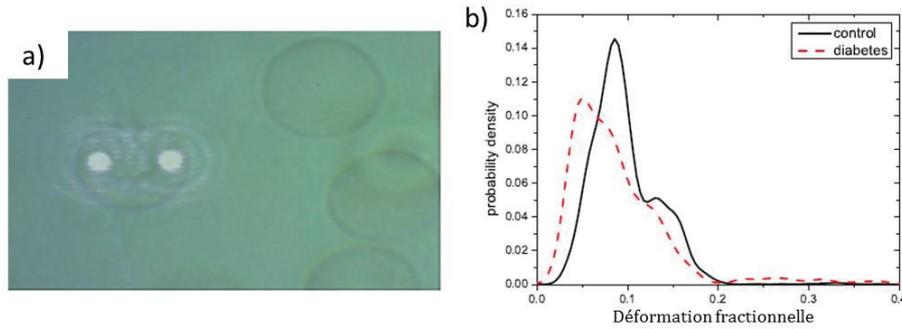


Figure 9 : a) Les foyers laser, visualisés par les 2 points blancs, sont positionnés sur un globule rouge initialement à plat sur la lamelle. b) Tracé des déformations normalisées des globules rouges de donneurs témoins (ligne continue) et de patients diabétiques (pointillés rouges) d'après [42].

Les globules rouges sont soumis à un étirement optique en augmentant lentement la distance entre les foyers laser. Afin de comparer des cellules de différentes tailles initiales soumises au même protocole d'étirement, on définit la déformation normalisée  $d$  (ou fractionnelle sur la Figure 9-b) :

$$d = \frac{L_1 - L_0}{L_0} \quad (8)$$

Où  $L_0$  et  $L_1$  sont les longueurs de la cellule avant et après étirement.

La distribution des déformations normalisées est mesurée comme rapporté dans la Figure 9-b. Une légère diminution de la déformabilité des cellules diabétiques est observée par rapport aux globules rouges sains.

Bien que dans cette technique dispense de l'utilisation de billes collées sur la membrane du globule rouge, le piégeage prolongé des cellules à puissance de laser élevée peut entraîner un échauffement qui provoque une modification irréversible des cellules.

### Mesure de fluctuation Browniennes

En utilisant les pinces optiques encore, Saraogi et al [43] ont étudié les propriétés mécaniques de globules rouges isolés. La technique repose cette fois, sur la mesure des fluctuations browniennes d'un seul globule rouge maintenu dans un piège optique, lesquelles dépendent des propriétés structurales du globule. Un changement dans le spectre des fluctuations browniennes entre les globules rouges sains et infectés par le parasite du paludisme, a été observé ; la fréquence de coupure  $f_c$ , qui dépend des caractéristiques physiques des objets dans le piège optique, augmente d'une cellule infectée par rapport à une cellule normale.

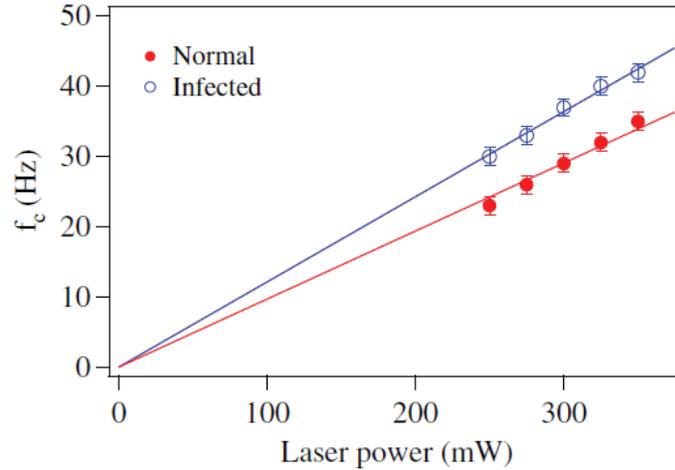


Figure 10 : La variation de  $f_c$  avec la puissance du laser de piégeage pour les cellules normales et infectées. Les lignes solides sont ajustements linéaires [43].

Les valeurs mesurées de  $f_c$  pour des puissances allant de 250 à 350 mW sont présentées sur Figure 10. Les valeurs de  $f_c$  augmentent linéairement avec la puissance du laser, à la fois pour les échantillons normaux et infectés. Cependant la pente est significativement plus élevée pour l'échantillon infecté que pour le sain. Cela signifie que la valeur de  $f_c$  à une puissance donnée est plus élevée pour les globules rouges infectés.

### Viscosimètre à pinces optiques pour cellule unique

Fontes et al [44] ont développé une autre méthode pour mesurer l'élasticité globale  $\mu_{global}$  de la membrane des globules rouges. Pour cela ils mesurent la déformation résultante des cellules lorsqu'elles sont entrainées par une pince optique, à travers un liquide physiologique (typiquement du plasma) confiné entre 2 parois (Figure 11). Afin d'évaluer l'élasticité et la viscosité de la membrane des globules rouges, la cellule est modélisée par un parallélépipède de longueur  $L$ , de largeur  $W$  et d'épaisseur négligeable  $d$ . La cellule, située à une distance  $Z_1$  du fond de la chambre et  $Z_2$  de l'autre paroi, est traînée par la pince optique, à des vitesses allant de 150 à 250  $\mu\text{m/s}$  à travers un fluide de viscosité  $\eta$ .

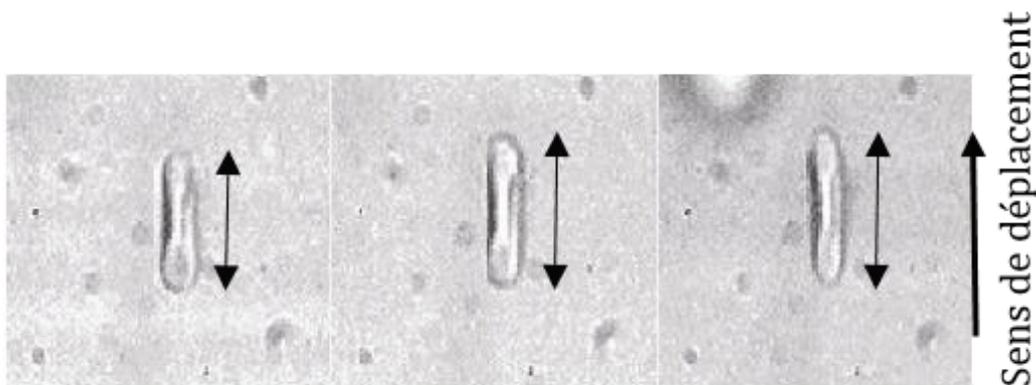


Figure 11 : Déformation d'un globule rouge traîné via une pince optique, à une vitesse de 150 à 210  $\mu\text{m/s}$ , dans un fluide au repos. D'après [44].

Sous l'effet de la force de trainée, la cellule s'étire comme illustré sur la *Figure 11*. La longueur de cellule  $L$  est donnée par la formule suivante :

$$L = L_0 + \left( \frac{\eta L_0^2}{\mu_{global} Z_{eq}} \right) V \quad (9)$$

Par conséquent, la mesure de la longueur  $L$  de la cellule en fonction de sa vitesse de trainée  $V$ , peut être utilisée pour extraire la valeur de  $\mu_{global}$ , pour une viscosité  $\eta$ , une longueur initiale  $L_0$  et  $Z_{eq}$  – les distances de la cellule aux parois données, avec  $\frac{1}{Z_{eq}} = \frac{1}{z_1} + \frac{1}{z_2}$ .

### Déformation optique en flux

Guck et al [45] ont développé une variante de pinces optiques couplée à de la microfluidique afin d'améliorer les débits de mesure. En utilisant un canal microfluidique et un piège à deux lasers, les auteurs ont prouvé que la déformabilité optique est suffisamment sensible pour mesurer les changements au cours de la progression tumorale de fibroblastes de souris et de cellules épithéliales du sein humain.

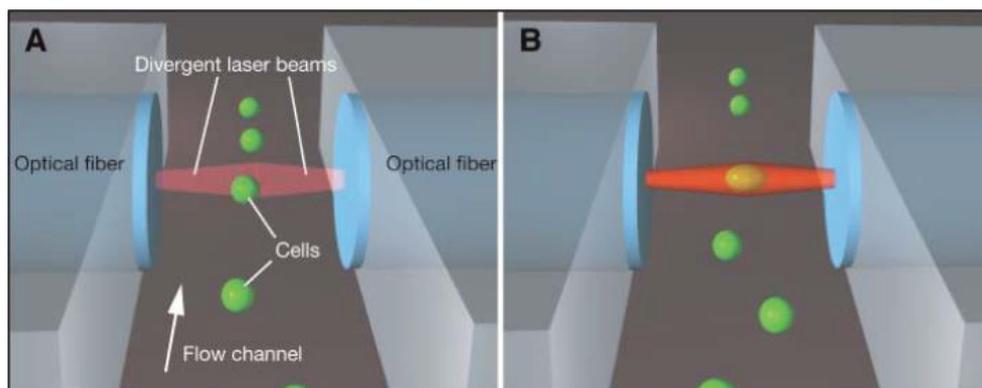


Figure 12 : : Les cellules s'écoulant dans un canal microfluidique sont déformées lorsqu'elles interceptent le champ entre deux faisceaux laser divergents à contre-propagation [45].

Les cellules s'écoulant dans un canal microfluidique sont déformées lorsqu'elles interceptent le faisceau de lumière entre 2 lasers divergents, placés de part et d'autre du canal (*Figure 12*). Cependant, la cellule entraînée par l'écoulement ne reste pas piégée et peut laisser la place à la cellule suivante. Le montage permet ainsi des mesures mécaniques par cytométrie d'élasticité sur cellules uniques. La mesure d'un grand nombre de cellules avec un débit de 1 cellule/minute, révèle que la déformabilité optique des fibroblastes transformés de manière maligne est significativement décalée vers des valeurs plus élevées par rapport aux fibroblastes normaux.

### d. Electro-déformation

D'autres types de champ de force peuvent être utilisés afin de sonder les propriétés de déformabilité des globules rouges, comme par exemple l'utilisation de champs

électriques. La déformation transitoire de cellules dans un champ électrique à haute fréquence [46], [47], aussi appelée électro-déformation, peut être utilisée pour évaluer le module de cisaillement et la viscosité de la membrane plasmique des globules rouges.

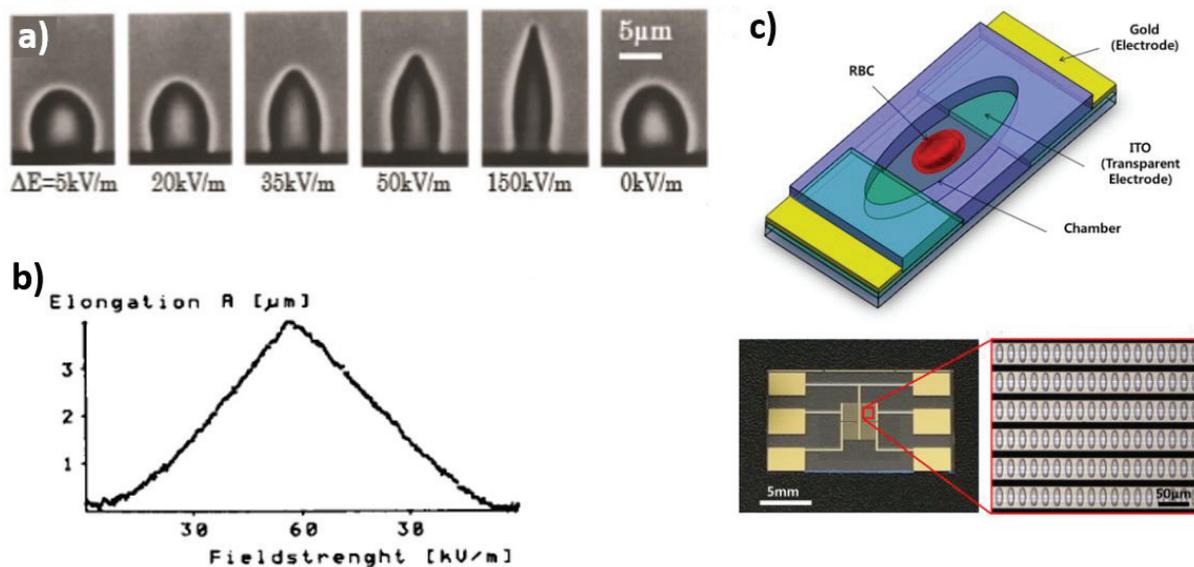


Figure 13 : a) Images microscopiques d'une expérience d'électro déformation de globules rouges allongés à différents champs électriques appliqués [47]. b) Dépendance typique de l'élongation d'un globule rouge en fonction de champs électriques [47].c) Vue schématique et images du dispositif à matrice de microchambres unicellulaires pour la caractérisation mécanique de globules rouges [47].

La Figure 13-a présente des images vidéo-microscopiques de globules rouges soumis à différentes valeurs de champ électrique. Plus le champ est important et plus l'élongation du globule rouge associée est importante. Il a également été montré que l'application d'un champ jusqu'à  $150\text{kV/m}$  n'induit pas de déformation irréversible, puisque quand le champ est stoppé, la cellule retourne à sa forme initiale (Figure 13-a). L'élongation des cellules peut donc être quantifiée, en fonction de l'intensité du champ électrique appliqué. Le graphique présenté Figure 13-b montre que l'élongation de la cellule augmente jusqu'à une valeur maximale  $\sim 4\mu\text{m}$ , atteinte pour  $60\text{kV/m}$  et que le comportement du globule rouge est le même pour l'augmentation et la réduction du champ jusqu'au retour à l'équilibre. L'étude montre que la relation entre l'élongation et l'intensité du champ électrique appliqué est parabolique pour les petites déformations, et linéaire pour les grandes. Le piégeage et la déformation des globules rouges peuvent se faire dans une matrice de microchambres cellulaires pour augmenter le débit de mesure, comme le montre la Figure 13-c.

Cependant, pour effectuer une expérience d'électro-déformation, les cellules doivent être suspendues dans un tampon de faible conductivité, ce qui n'est pas un environnement physiologique. Un tel tampon peut entraîner un vieillissement prématuré des cellules impactant ainsi leur déformabilité, et constitue une étape

supplémentaire de la préparation des échantillons qui peut être considérée comme un inconvénient du point de vue de l'automatisation de la technique.

#### e. Techniques microfluidiques

Grâce aux développements de l'industrie de la micro-électronique, une nouvelle discipline reposant sur les mêmes avancées technologiques a vu le jour : la microfluidique. La microfluidique est la science qui traite des écoulements de liquides dans des canaux de taille micrométrique [48]. Ses développements sont liés à une forte demande dans les domaines de la science de la vie, la médecine, la chimie et l'environnement. Les dispositifs utilisés en microfluidique sont souvent destinés à être à usage unique, ce qui est un avantage pour éviter la contamination potentielle entre 2 échantillons successifs. C'est pourquoi, les matériaux utilisés ne doivent pas présenter un coût trop important ; l'utilisation de polymère est donc une bonne solution. Dans les laboratoires de recherche, une grande partie des dispositifs microfluidiques sont réalisés en polydiméthylsiloxane (PDMS) [49]. Cet élastomère, qui combine les avantages d'être chimiquement inerte, biocompatible, et transparent pour permettre le couplage avec de la vidéo-microscopie, est plébiscité dans les laboratoires de recherche. Cependant, il n'est pas compatible avec une fabrication de masse.

Les microsystèmes fluidiques pour la mesure de déformabilité cellulaire ont pour ambition de combiner les avantages des méthodes sur cellules individuelles, tout en traitant une grande population de cellules en un temps réduit. Cette approche présente également l'avantage de pouvoir fournir un environnement biomimétique, en reproduisant le mieux possible par exemple les conditions physiologiques du flux de globules rouges dans la microcirculation sanguine. Dans cette partie, nous présentons une grande variété d'essais biophysiques expérimentaux utilisant des microsystèmes pour sonder la déformabilité des cellules vivantes.

#### *Écoulement dans des restrictions géométriques*

L'approche microfluidique la plus couramment rapportée dans la littérature, est l'étude du comportement dynamique des cellules en écoulement dans un canal de taille inférieure à la taille de la cellule à caractériser. L'étude de paramètres, tels que le temps de transit, l'indice de déformation ou le temps de relaxation d'une cellule s'écoulant dans une constriction microfluidique est un moyen simple pour sonder sa déformabilité. Plusieurs designs de restrictions géométriques ont été utilisés pour caractériser les phénotypes mécaniques des cellules. Par exemple, Selby et al [50] ont développé un modèle comportant des constriction géométriques de 2 à 8  $\mu\text{m}$  de largeur pour discriminer les globules sains de ceux qui sont infectés par le parasite du paludisme. Ces derniers, moins déformables restent coincés à l'entrée des constriction les plus petites comme illustré sur la *Figure 14*. On y voit le colmatage d'un canal de 6  $\mu\text{m}$  de large par

des globules rouges infectés, alors qu'un globule rouge sain, mis en évidence par la flèche blanche, parvient à se déformer pour dépasser le bouchon.

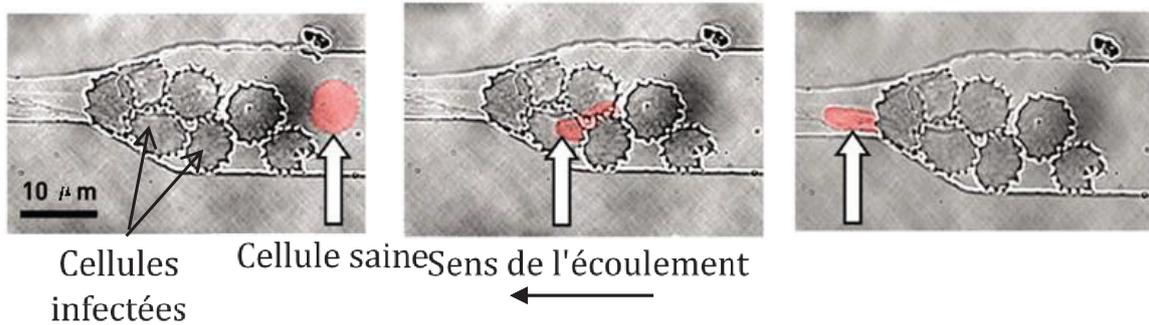


Figure 14 : Images microscopiques de globules rouges infectés par le parasite du paludisme, bloqués à l'entrée d'une constriction microfluidique. Les images montrent une cellule saine (flèche blanche) capable de se déformer au-delà du bouchon. D'après [33].

L'utilisation de constriction géométriques en série, de forme asymétrique ou encore de taille décroissante au fur et à mesure que la cellule s'écoule dans la géométrie ont été rapportées dans la littérature pour la caractérisation de cellules biologiques [51]–[54].

Une version microfluidique de la technique d'aspiration par micropipette a même été développée par Guo et al [55]. Le nouveau dispositif met en œuvre de multiples constriction en forme d'entonnoir avec des ouvertures allant de 5 à 1 μm, comme représenté sur la Figure 15. Les cellules se retrouvent bloquées au niveau de la buse de cet entonnoir, puis la pression appliquée est manuellement augmentée jusqu'à une valeur critique qui va permettre aux globules rouges de se faufiler au-delà de la restriction.

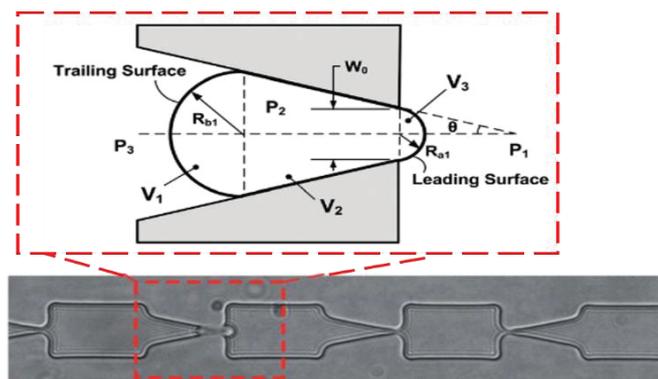


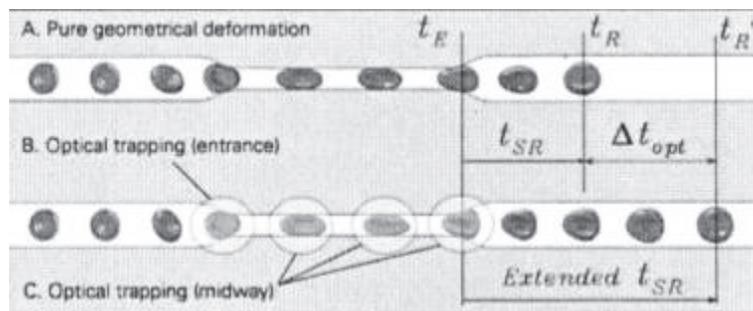
Figure 15 : Image illustrant un globule rouge déformé lors du passage de l'entonnoir et le modèle géométrique associé. D'après [55].

La pression critique est ensuite utilisée pour déterminer la tension corticale  $T_c$  de chaque cellule, en considérant le globule rouge comme une goutte de liquide newtonienne à volume constant :

$$P_{seuil} = T_c \left( \frac{1}{R_a} - \frac{1}{R_b} \right) \quad (10)$$

Où  $P_{seuil}$  est le gradient de la pression critique à appliquer pour amener la cellule à s'écouler à travers la restriction en entonnoir,  $R_a$  et  $R_b$ , les rayons de courbure avant et arrière du globule rouge respectivement, lorsqu'il traverse la restriction géométrique.

Enfin, *Lee et al* [56] ont décrit une nouvelle approche pour mesurer la déformabilité des globules rouges uniques en combinant le piégeage optique et l'écoulement dans un canal microfluidique. Tous les globules rouges de l'échantillon s'écoulent dans une restriction géométrique qui correspond à environ 50% de leur diamètre moyen, puis retrouvent leur forme d'équilibre, comme nous montre la *Figure 16*. Au cœur de la restriction microfluidique, le couplage d'une force optique aux forces hydrodynamiques permet d'augmenter les modifications morphologiques subies par les cellules. Le temps nécessaire au globule rouge pour récupérer sa forme stationnaire est mesuré par analyse d'images.



*Figure 16 : Schéma de configuration expérimentale. En haut, les cellules s'écoulent au travers d'une restriction géométrique. En bas, l'ajout d'une force optique permet de solliciter la déformabilité des globules rouges de manière plus importante. D'après [56].*

Le temps de récupération de la forme stationnaire est de l'ordre de quelques secondes grâce en présence du piège optique, alors que la méthode conventionnelle basée sur les forces hydrodynamiques permet de mesurer des temps de retour à l'équilibre du globule rouge est de l'ordre de la centaine de millisecondes.

### 1.1.4 Synthèse

Dans les sections précédentes, nous avons présenté divers types de techniques expérimentales développées pour sonder les propriétés mécaniques de cellules biologiques. Elles ont toutes des avantages et des inconvénients qui sont rassemblés dans le *Tableau 1*. Par exemple, les méthodes collectives, permettent d'obtenir en quelques minutes des informations rhéologiques sur un échantillon sanguin. Cependant, puisqu'elles reposent sur des mesures moyennées sur l'ensemble des cellules de l'échantillon, elles ne sont pas en mesure de détecter des variations de comportement d'une petite partie de la population et ne sont donc pas adaptées au diagnostic médical de maladies telles que le paludisme, où le nombre de cellules affectées mécaniquement peut être aussi bas que 0,002% [57].

Les techniques sur cellules individuelles ont comme leur nom l'indique, l'avantage de réaliser des mesures à l'échelle de la cellule unique. L'AFM, l'aspiration par micropipette et les pinces optiques nécessitent de disposer d'un personnel qualifié, peuvent être difficile à automatiser et présentent des débits lents - quelques dizaines de cellules traitées par heures - ce qui les rend difficilement compatibles avec les applications diagnostiques. Quant à l'électro-déformation, l'utilisation d'un milieu de faible conductivité peut avoir un impact négatif sur la déformation mesurée puisqu'il a été montré que ce type d'environnement induit un vieillissement prématuré des cellules.

Les approches microfluidiques prétendent associer les avantages des techniques collectives et sur cellules individuelles pour réaliser des caractérisations à l'échelle cellulaire tout en permettant l'étude sur des grandes populations. Cependant, pour l'instant, les approches microfluidiques ne présentent pas un débit d'analyse suffisant pour permettre leurs applications à du diagnostic médical de routine.

En effet, afin de pouvoir détecter des altérations mécaniques touchant très peu de cellules de l'échantillon, il faut pouvoir analyser un nombre de cellules statistiquement pertinent. Par exemple, pour détecter 0,002% de cellules affectées mécaniquement, il faut pouvoir analyser au moins 1 million de cellules, le tout dans un temps raisonnable. Même en considérant que 30 minutes est un temps raisonnable (en réalité on compte plutôt sur une dizaine de minutes dans le cas idéal), cela demanderait des débits de l'ordre de 33 000 cellules analysées par minute.

Techniques		Caractéristiques mesurés	Débit de mesure	Analyse de cellules uniques	Evite l'utilisation d'imagerie	
Techniques collectives	Viscosimétrie	Viscosité	😊	😞	😊	
	Rhéométrie	temps de relaxation	😊	😞	😊	
	Ektacytométrie.	Taux de déformation	😊	😞	😞	
Techniques à l'échelle de la cellule unique	Aspiration par micropipette	module d'extension	😞	😊	😞	
	AFM	module d'Young, temps de relaxation	😞	😊	😊	
	Pincés optiques	Etirement par des pinces optiques	module d'extension	😞	😊	😞
		Mesure de fluctuations Browniennes	module d'extension	😞	😊	😞
		Piégeage sous écoulement	module de cisaillement	😞	😊	😞
		Déformation optique en flux	déformabilité	😊	😊	😞
		Électro déformation	Viscosité, module de cisaillement	😞	😊	😞
	Microfluidique	Ecoulement dans des constriction géométriques	temps de relaxation, temps de passage, taux de déformation	😊	😊	😞
		Aspiration par micropipette fluidique	Tension corticale	😞	😊	😞

*Tableau 1: Résumé des différentes techniques proposées dans la littérature pour la caractérisation mécanique de cellules biologiques, les divers paramètres mécaniques mesurés et les avantages et inconvénients établis sur 3 critères.*

A part l'AFM, toutes les approches sur cellules individuelles discutées dans ce manuscrit se heurtent à la même limitation en termes de mise en œuvre d'une analyse qui se voudrait en temps quasi-réel : elles reposent sur l'utilisation d'imagerie vidéo-microscopique pour enregistrer et analyser la déformation associée. La quantité de données vidéo générées doit être traitée afin de pouvoir en sortir une réponse mécanique pour chaque cellule, ce qui impose des temps une puissance de calcul et des temps d'analyse incompressible. Nous avons donc identifié 3 critères importants qu'une approche mécanique doit respecter afin de pouvoir prétendre être appliqué au diagnostic du paludisme : (i) réaliser des analyses sur cellules individuelles, (ii) avoir un débit de mesure performant et (iii) éviter l'utilisation d'imagerie.

Si on se réfère au *Tableau 1*, une approche qui semble particulièrement prometteuse est celle de la déformation optique sous flux. Afin d'améliorer encore ses performances en termes de débit d'analyse, il faudrait pouvoir se défaire de l'observation vidéo-microscopique. Les approches « tout optique » semblent de bons candidats pour permettre une détection sans imagerie, avec des temps de traitement en temps réel. Dans ce contexte, nous proposons d'évaluer les capteurs photoniques, que nous allons détailler dans la section suivante. Pour cela, nous faisons un rappel sur le principe des cristaux photoniques ainsi que leurs applications dans les domaines de la détection optique.

## 1.2 Composants nanophotoniques à base des cristaux photoniques

Nous présentons dans ce qui suit les composants nanophotoniques, notamment les composants basés sur les cristaux photoniques et leurs applications dans la détection optique de micro, nano-objets.

La photonique existe fortement dans notre vie, dans la nature, comme par exemple dans les ailes des papillons. Ici [58], l'auteur mentionne le *Cyanophrys Acaste* qui est un papillon originaire du Brésil, dont la couleur bleue des ailes (*Figure 17-a*) n'est pas liée à un pigment quelconque, mais à une nanostructure comme nous montre le zoom de la *Figure 17-b*. Dans cette image on remarque un réseau de trous arrangés de manière hexagonale dont la période spatiale est de l'ordre de la longueur d'onde du bleu (environ 400 nm).

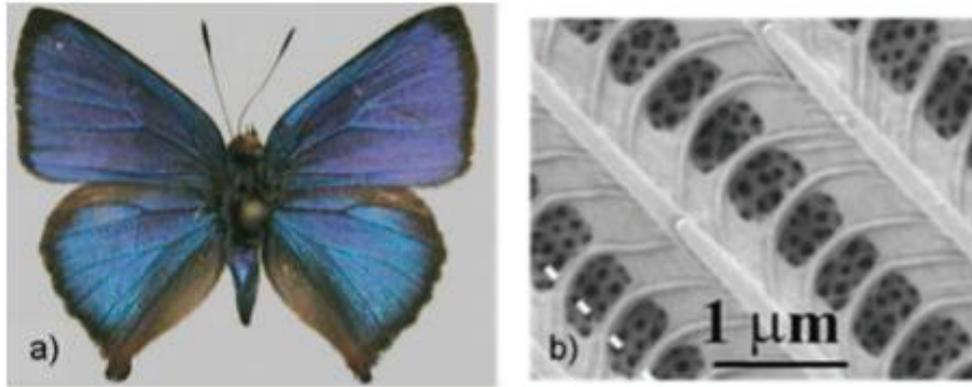


Figure 17 : a) Photographie du papillon *Cyanophrys Acaste* et b) Image MEB de son aile, d'après [58].

Ces trous rendent l'aile semblable à un réseau de diffraction bidimensionnel fortement réfléchissant dans le bleu. Les ondes réfléchies par chacun des trous sont en phase et s'ajoutent de manière cohérente. C'est cette approche qui est utilisée dans les cristaux photoniques. Les matériaux à bandes photoniques interdites sont des structures artificielles qui présentent une modulation périodique de la constante diélectrique dans une ou plusieurs directions [59]. Selon le nombre de directions, ces structures sont désignées par l'appellation de cristaux photoniques à une, deux ou trois dimensions comme illustré sur la *Figure 18*.

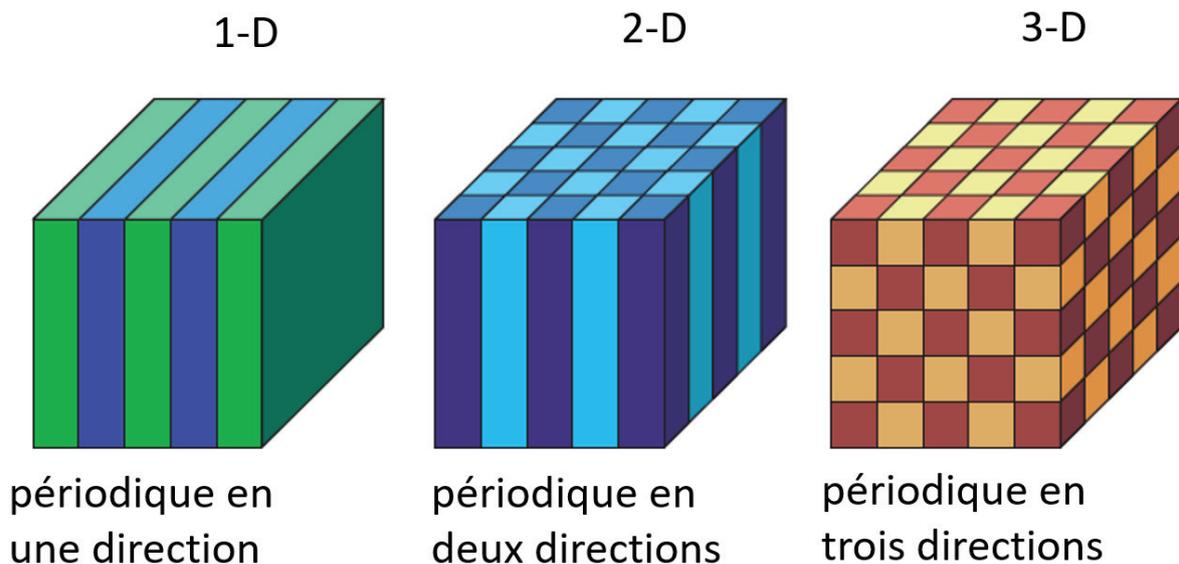
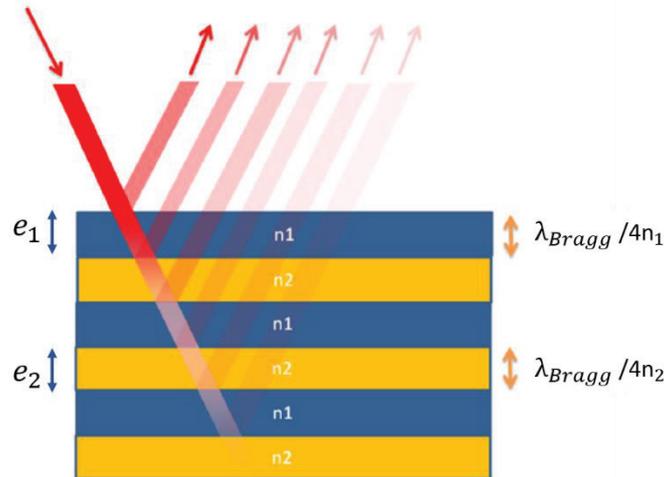


Figure 18 : Exemples simples de cristaux photoniques à une, deux et trois dimensions. Les différentes couleurs représentent des matériaux ayant des constantes diélectriques différentes. D'après [60].

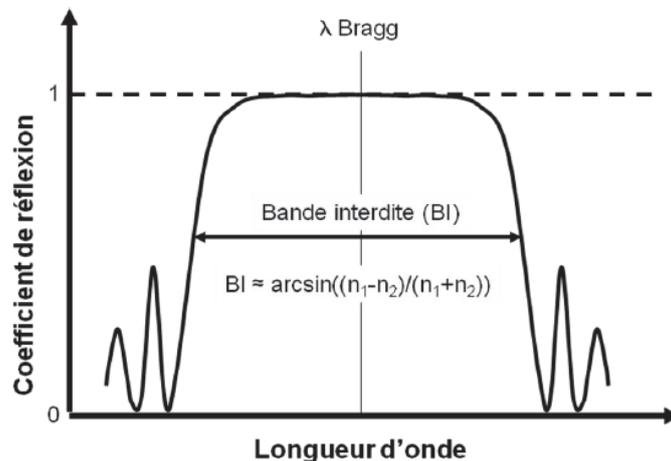
Ces matériaux ont été découverts par Eli Yablonovitch [61] à la fin des années 80. Il a notamment montré que ces matériaux dont la constante diélectrique était structurée périodiquement, possédaient des fréquences pour lesquelles il n'existait aucun mode de propagation possible, d'où l'appellation de matériaux à Bandes Interdites Photoniques (BIPs). Le cristal photonique à une dimension n'est autre qu'un miroir de Bragg, *i.e.* un

empilement périodique de couches diélectriques d'indice  $n_1$  et  $n_2$  et d'épaisseur  $e_1$  et  $e_2$  respectivement [62] (voir *Figure 19*). À la frontière entre deux couches, il se produit une réflexion partielle des ondes. Pour les ondes dont la longueur d'onde est égale à environ quatre fois l'épaisseur optique d'une couche, ( $\lambda_{Bragg}$ ), les réflexions se combinent par interférences constructives, et les couches agissent comme un miroir de grande qualité.



*Figure 19 : Représentation d'un miroir de Bragg d'indice  $n_1$  et  $n_2$  et d'épaisseur  $e_1$  et  $e_2$  respectivement [62].*

Une onde incidente sur une telle structure donne naissance à des ondes réfléchies en phase (interférences constructives) et à des ondes transmises en opposition de phase (interférences destructives). La réflectivité obtenue peut alors dépasser 99% et augmente avec le nombre de période et le contraste d'indice entre les couches. La réponse spectrale d'un miroir de Bragg est représentée dans la *Figure 20*.



*Figure 20 : Spectre de réflectivité sous incidence normale d'un miroir de Bragg. D'après [62].*

On montre qu'en incidence normale, la structure présente un maximum de réflectivité à la longueur d'onde  $\lambda_{Bragg}$ . On remarque une plage de longueurs d'onde réfléchies autour de  $\lambda_{Bragg}$ , où la lumière ne peut pas se propager dans la structure, on parle de bande interdite de photon dont la largeur dépend du contraste d'indice ( $n_1-n_2$ ) et sa valeur est de l'ordre de  $\arcsin((n_1-n_2)/(n_1+n_2))$ .

Un cristal photonique bidimensionnel est périodique le long de deux de ses axes et homogène le long du troisième axe. La périodicité est obtenue en gravant un substrat (typiquement du silicium) pour avoir une rangée des trous bien espacés. Comme dans les semi-conducteurs, des défauts peuvent être volontairement introduits dans les cristaux photoniques. Les défauts dans les semi-conducteurs ont pour effet d'introduire des niveaux d'énergie autorisés dans la bande interdite. Dans le cas des cristaux photoniques, la création de défauts dans la périodicité de la structure (absence de trous ou modification de la taille des trous) conduit également à créer des cavités résonnantes dans la bande interdite. Une des caractéristiques de la cavité photonique est son facteur de qualité  $Q$ , qui dépend autant de sa conception théorique que de sa qualité de fabrication [63].  $Q$  représente physiquement le nombre d'aller - retours effectués par un photon dans la cavité. Il se calcule de la manière suivante, avec  $\lambda_r$  la longueur d'onde de résonance de la structure et  $\Delta L$  la largeur à mi-hauteur de la résonance :

$$Q = \frac{\lambda_r}{\Delta L} \quad (11)$$

Ainsi, plus la largeur de la résonance est fine, plus le facteur de qualité est élevé et, par conséquent, plus la sensibilité de la détection des objets au-dessus de la cavité est importante.

Dans notre étude, nous nous intéressons à une cavité ayant les meilleures performances pour détecter la faible variation d'indice de réfraction au-dessus de sa surface. Cette variation d'indice se traduit par un décalage spectral de la résonance. Nous cherchons donc une cavité qui maximise l'interaction lumière-matière à sa surface, et qui accueille un mode optique dont la répartition du champ est concentrée à l'intérieur des trous (dans l'air), au plus près de la surface. Dans cette perspective, nous utilisons une cavité photonique double période intégrée dans un cristal photonique à deux dimensions. Cette cavité a été développée par Laurent Millord [64] dans sa thèse à l'INL.

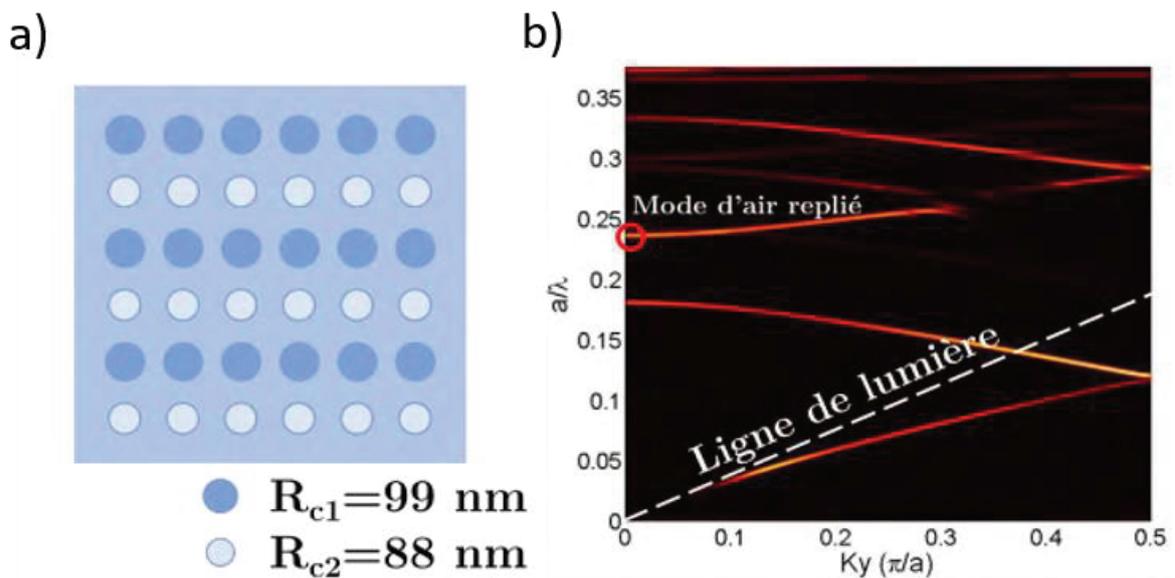


Figure 21 : a) Schémas de la cavité à double période. b) Structures de bande associée. D'après [64].

Nous représentons dans la *Figure 21-a* un exemple de la cavité à double période dont les rayons de trous  $R_{c1} = 99 \text{ nm}$  et  $R_{c2} = 88 \text{ nm}$ . La *Figure 21-b* présente les modes optiques associés, dans lesquels on remarque deux types de modes : les modes au-dessus de la ligne de lumière  $w > k_{\text{vecteur } c}$  qui peuvent communiquer avec le monde extérieur et celle au-dessous qui ne le peuvent pas. Nous nous intéressons au mode d'air qui se trouve en gamma ( $k_{\text{vecteur } y} = 0$ ). Son champ électrique est maximum au niveau des trous du cristal et sa relation de dispersion est à peu près plate, donc il sera facile d'utiliser le mode dans la cavité. De plus, vu que ce mode d'air se trouve au-dessus de la ligne de lumière, alors il peut être excité facilement dans l'espace libre dans une direction perpendiculaire à la surface de l'échantillon.

Le principe de fonctionnement des capteurs basés sur des cristaux photoniques repose sur le décalage de la longueur d'onde de résonance dans le spectre de transmission ou de réflectivité lorsque l'indice de réfraction du milieu environnant change. Cunningham et al. ont proposé dès 2003, les premiers capteurs à cristaux photoniques en polymère 1D [65]. Ces biocapteurs constitués d'un matériau plastique avec une fine couche structurée périodiquement d'un matériau diélectrique à la surface, montrent un décalage de la longueur d'onde lors de la reconnaissance de l'ADN sur la surface du cristal photonique. Chow et al. ont montré la détection d'une variation d'indice de réfraction de 0,002 avec une microcavité photonique 2D ayant un facteur de qualité d'environ 400 [66]. Une cavité photonique recouverte d'un film mince de polymère a permis la détection spécifique d'ions en milieu liquide à une concentration micromolaire [67]. En 2007, Lee et Fauchet ont présenté un biocapteur à base des cristaux photoniques sur silicium permettant de suivre l'adsorption des protéines sur les parois des trous de la cavité et de mesurer quantitativement le diamètre des protéines en question [68]. En utilisant des cristaux photoniques destinés à la détection de molécules uniques, Lin et al. ont réussi en 2012 à détecter un nombre fini de molécules dans une solution complexe [69]. Chakravarty et al. ont fabriqué quant à eux, un biocapteur avec une cavité photonique en silicium et l'ont utilisé pour détecter le facteur de transcription de la transition épithélio-mésenchymateuse, issu de cellules cancéreuses du poumon (NCI-H358) [70]. De plus, plusieurs recherches ont étudié des biocapteurs optiques basés sur des structures à cristaux photoniques, comme un capteur de glycémie, un capteur de concentration d'urée et un capteur d'hémoglobine [71]–[74].

Therisod et Tardif [75] ont utilisé la transmission optique pour différencier les espèces bactériennes piégées sur un cristal photonique comme illustré sur la *Figure 22-a*. Cette technique peut remplacer la coloration de Gram, la méthode habituelle qui permet de séparer les bactéries à paroi épaisse des bactéries à paroi fine (*Figure 22-b* et *c*) selon la couleur qu'elles prennent après avoir subi un processus chimique. De plus, il faut noter que cette nouvelle approche de détection évite l'utilisation de produits chimiques toxiques et cancérogènes et qu'elle n'est ni restrictive, ni destructive comme peut l'être la coloration de Gram. Enfin, l'identification de trois types de bactéries différents a été

démontré grâce aux observations spatiales et temporelles de l'interaction bactérie-cavité [76].

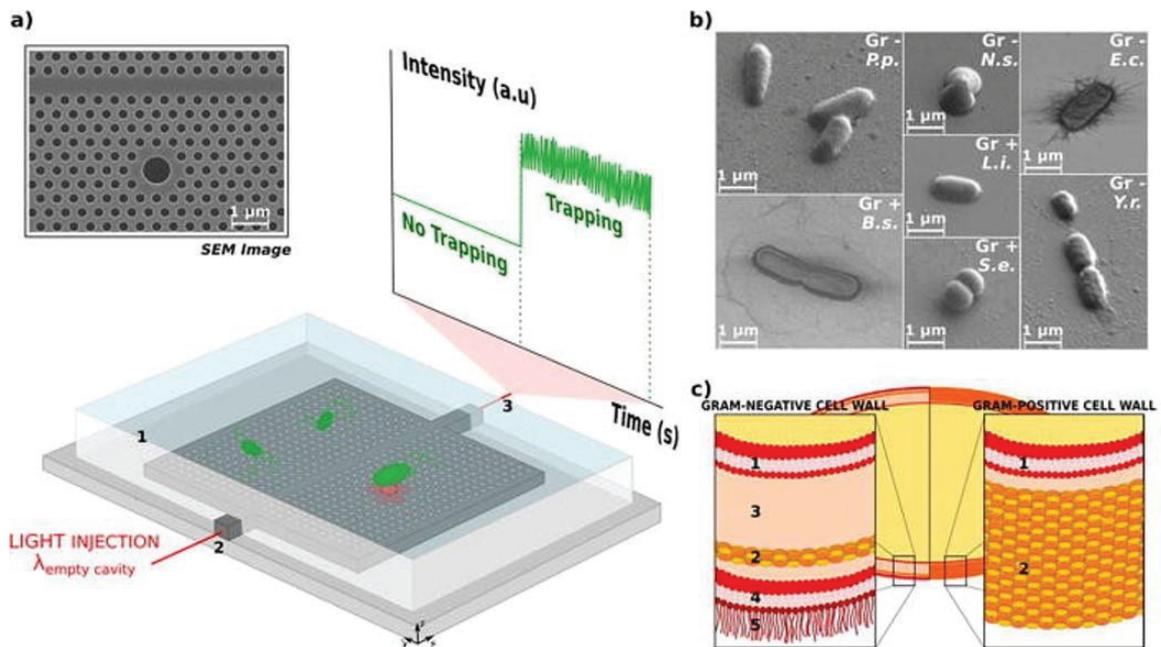


Figure 22 : (a) Image MEB de la cavité creuse en cristal photonique 2D et schéma du dispositif expérimental, (b) Images MEB des bactéries étudiées, (c) Représentation des différences structurales de la paroi cellulaire pour les bactéries Gram-négatives et Gram-positives.

Donato et son équipe [77] ont proposé une approche électro-photonique pour l'analyse et le suivi de la sensibilité au niveau de bactéries individuelles. Pendant que les bactéries sont au-dessus de la cavité, des antibiotiques peuvent être ajoutés au milieu et les changements correspondants dans les propriétés optiques et la motilité des bactéries peuvent être surveillés *via* des changements de la longueur d'onde de résonance et de la transmission du cristal photonique. Kang et son équipe [78] ont conçu une cavité photonique pour détecter le virus de la grippe et sa liaison aux anticorps correspondant, immobilisés à la surface du cristal photonique, le tout en temps réel. Nicolas Gaignebet dans sa thèse à l'INL [79], a montré la détection d'une monocouche de BSA en mesurant le décalage spectral de la résonance de cristaux photoniques. De plus, il a montré la détection d'une monocouche de molécule de streptavidine grâce à des mesures spectrales couplées à un contrôle par fluorescence. Ici [80] Araf *et al.*, ont étudié un capteur à fibre de cristal photonique à canal elliptique unique (voir Figure 23) pour la détection potentielle du paludisme en utilisant l'indice de réfraction des globules rouges.

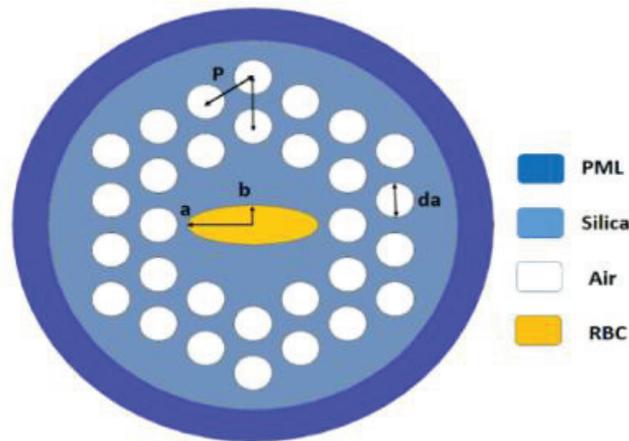


Figure 23 : Vue en coupe du biocapteur proposé pour la détection du paludisme [80].

*Shanker et al* [81], ont étudié un système similaire basé sur une fibre de cristal photonique immobilisée sur de l'or pour la détection du paludisme.

Les capteurs photoniques basés sur des cristaux photoniques [82]–[84] ont montré donc leur compatibilité avec les entités biologiques telles que les biomolécules [85], [86], les virus [78] et les bactéries [87] grâce au mécanisme de confinement de la lumière fourni par la bande interdite photonique. La majorité de ces études reposent sur le fait que la présence d'un objet ou d'une molécule sur le cristal photonique induit un changement local d'indice de réfraction, associé à un décalage du spectre de résonance. Nous proposons d'étudier l'extension de ce concept à la mesure de la déformabilité des cellules, notamment des globules rouges.

### 1.3 Notre approche

L'idée de notre projet est donc de combiner une sollicitation mécanique sur cellules individuelles en utilisant des pinces optiques couplées à de la microfluidique pour analyser une large population, avec une détection utilisant des cavités photoniques, le tout sans nécessiter l'intervention d'un opérateur. L'originalité de notre approche repose sur la lecture optique, sans imagerie, des propriétés mécaniques d'une cellule, appliquée au diagnostic de pathologies telles que le paludisme. Cette lecture optique repose sur des cristaux photoniques qui ont la particularité, lorsqu'on les excite avec un laser, de générer un mode photonique capable de détecter des entités biologiques sur leurs surfaces comme illustré par la revue bibliographique ci-dessus. En réponse à la force exercée par la pince optique, la cellule peut se déformer ; cette déformation va modifier la résonance du cristal photonique. L'utilisation de la microfluidique a pour avantage de (i) permettre d'acheminer la cellule jusqu'au cristal photonique, (ii) nous assurer que celle-ci soit assez proche de la surface de la cavité pour être facilement détectée et (iii) permettre la mesure d'un grand nombre de cellule.

Techniques		Caractéristiques mesurés	Débit de mesure	Analyse de cellules uniques	Evite l'utilisation d'imagerie
<b>Notre approche</b>	Système optofluidique	Taux de déformation	😊	😊	😊

Tableau 2 : résumé notre approche pour la caractérisation mécanique de cellules biologiques, les divers paramètres mécaniques qui peuvent être mesurés et les bénéfices établis sur 3 critères.

Comme le montre le *Tableau 2*, notre approche devrait respecter les 3 critères identifiés plus haut comme étant importants pour l'application au diagnostic du paludisme : (i) réaliser des analyses sur cellules individuelles, (ii) avoir un débit de mesure performant et (iii) éviter l'utilisation d'imagerie.

Les objectifs de cette thèse sont la démonstration de principe de cette approche sur un système modèle d'abord (une goutte d'huile) puis sur des globules rouges humains. Pour démontrer la preuve de concept, il faut prouver que nous sommes capables de détecter la présence d'un objet au-dessus du cristal photonique et de mesurer leur déformabilité. Dans cette thèse, nous nous focalisons sur la partie photonique du système optofluidique et travaillons donc sur une version simplifiée, en se découplant dans un premier temps de la microfluidique. Nous travaillons donc dans un environnement statique, *i.e.* sans écoulement. De plus, nous utilisons deux sources de lumière comme le montre la *Figure 24* : (i) un laser (en haut) pour piéger, positionner les cellules au-dessus du cristal photonique et la déformer grâce aux forces de radiation, et (ii) une source large bande ou SLED (en bas), en face arrière du cristal photonique, pour mesurer le spectre de réflectivité de la cavité et suivre la position de la résonance.

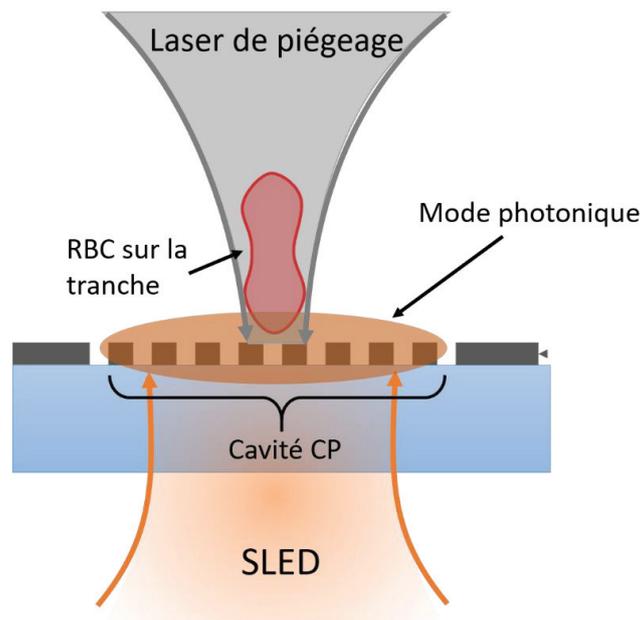
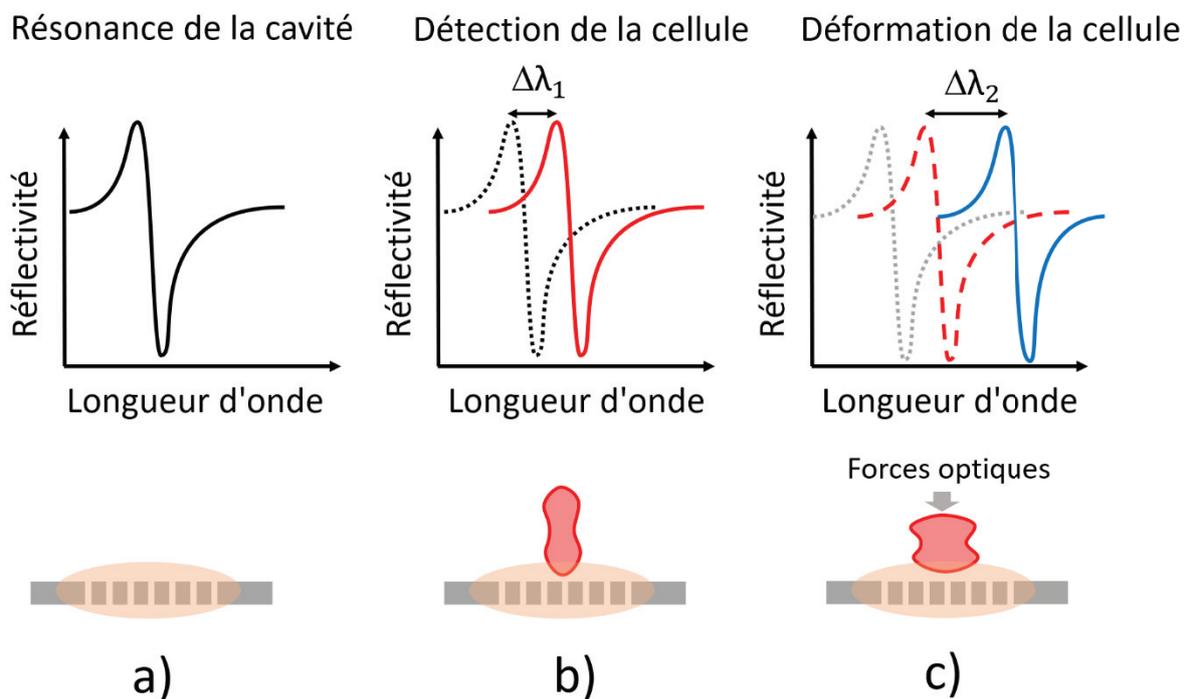


Figure 24 : Représentation schématique de l'approche utilisée dans le cadre de cette thèse pour démontrer la détection optique (sans imagerie) de la déformabilité des globules rouges.

Comme le suggère la représentation schématique de la *Figure 24*, la cellule poussée vers la surface par la pression de radiation, peut se déformer, ce qui va modifier la résonance du cristal photonique qui est mesurée avec la SLED. Nous espérons ainsi parvenir à mesurer des variations d'indice de réfraction de l'environnement proche de la cavité photonique correspondant à la déformation des micro-objets au-dessus de sa surface.

La *Figure 25* illustre le principe de notre approche photonique pour la détection de la déformation d'un globule rouge. En l'absence de cellule (*Figure 25-a*), la résonance mesurée (spectre noir) correspondant à la cavité « vide », *i.e.* sans cellule. Lorsqu'une cellule est positionnée au-dessus de la cavité grâce à la pince optique à une puissance de 0,1 mW - elle se met sur la tranche car elle s'aligne dans la direction du faisceau laser - son indice de réfraction perturbe le champ électromagnétique dans la cavité et la résonance se décale de  $\Delta\lambda_1$  pour donner la courbe rouge (*Figure 25-b*). Puis, en augmentant la puissance de la pince, si la cellule est suffisamment déformable, elle va « s'écraser » contre la surface. Le champ électromagnétique sera donc perturbé sur une surface plus importante, ce qui va avoir pour effet de décaler encore plus la résonance de  $\Delta\lambda_2$  comme illustré par le spectre bleu dans la (*Figure 25-c*). L'étude de la résonance du cristal photonique permettrait donc, non seulement de détecter la présence d'un objet sur le cristal, mais aussi de détecter sa déformation le cas échéant.



*Figure 25 : Schémas représentant la cavité photonique et la position du spectre de la résonance, a) en l'absence de cellule sur la cavité, b) en présence d'une cellule avec une puissance laser de 0.1 mW et c) après la déformation de la cellule sous l'action des forces optiques à plus forte puissance laser.*

Le décalage spectral  $\Delta\lambda_2$  est une mesure directe de la déformabilité du globule rouge. C'est sur cette mesure que s'appuie notre approche. Un globule rouge sain, fortement

déformable, présentera un décalage plus important qu'un globule rouge plus rigide. L'objectif dans le cadre de cette thèse est la démonstration expérimentale de cet effet. La mesure de ce décalage peut se faire simplement en regardant la variation de transmission à la résonance. L'avantage de cette approche, c'est qu'elle ne nécessite pas d'analyse d'image et peut se faire dans une gamme de fréquence très importante (de quelques Hz à un centaine de MHz) grâce à la souplesse qu'apporte la modulation optique

## 1.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons d'abord présenté les globules rouges, notamment le lien entre leur structure et leurs propriétés mécaniques. Nous avons ensuite présenté de manière non exhaustive, les différentes techniques rapportées dans la littérature pour étudier et caractériser les propriétés mécaniques de cellules biologiques, en pointant leurs avantages et inconvénients. Les techniques collectives, reposant sur des mesures moyennées sur l'ensemble des cellules de l'échantillon, ne sont pas adaptées à la détection de maladies n'impliquant que très peu de cellules. Les techniques sur cellules individuelles présentent un taux d'acquisition trop faible pour passer un nombre suffisant de cellules. L'utilisation de la microfluidique permet d'augmenter considérablement le débit de mesure, tout en conservant le côté individuel de la caractérisation. Cependant, l'utilisation d'imagerie pour quantifier la réponse des cellules impose un post-traitement des images qui demande des ressources de calcul et peuvent être chronophages, impactant une fois de plus le débit d'analyse correspondant. Une façon d'améliorer le débit d'analyse serait donc de se défaire de l'utilisation d'imagerie pour la détection de la déformation cellulaire résultante. Nous avons ensuite détaillé plus particulièrement les approches optiques, à base de cristaux photoniques, permettant une détection sans imagerie. Nous avons présenté les applications de ces composants pour la détection d'entités biologiques telles que les biomolécules, les virus, les bactéries et les cellules.

Finalement, nous avons introduit notre approche, qui vise à étendre les concepts des composants nanophotoniques à la mesure de la déformabilité des cellules, notamment des globules rouges, afin d'avoir une méthode qui permette l'analyse de cellules uniques, à fort débit d'analyse et sans aucune nécessité d'imagerie. L'objectif de cette thèse est la preuve de principe de cette approche en milieu statique.

# Chapitre



## Matériels et Méthodes

### Sommaire

---

2.1 Dispositif visé .....	44
2.2 Fabrication de la chambre optofluidique .....	45
2.2.1 Technologie des cristaux photoniques. ....	45
2.2.2 Fabrication du réservoir fluide.....	48
2.2.3 Traitement des surfaces et conservation des cristaux photoniques ....	49
2.3 Préparation des échantillons biologiques .....	52
2.3.1 Préparation des globules rouges sains et rigidifiés .....	52
2.3.2 Mesure de module d'Young .....	53
2.4 Montage expérimental .....	54
2.4.1 Module 1 : Mesure de micro-réflexivité.....	54
a. Source de lumière et caractéristique de faisceau.....	56
b. Visualisation infra-rouge et collecte de signal.....	58
2.4.2 Module 2 : Positionnement des cellules et déformation optique. ....	60
2.5 Conclusion.....	61

---

Dans le présent chapitre, nous décrivons les procédures expérimentales ainsi que le banc optique utilisés dans le cadre de cette thèse pour nos expériences de lecture optique de déformation des cellules biologiques. Nous introduisons d'abord notre dispositif constitué d'un cristal photonique (CP par la suite) et d'un réservoir fluide. Nous présentons aussi les caractéristiques de la cavité photonique utilisée. Puis, après avoir brièvement expliciter les étapes de fabrication des CPs et du réservoir fluide, nous décrivons les procédures développées dans ce travail, comprenant la préparation des surfaces de la chambre optofluidique, ainsi que la préparation des échantillons biologiques. Finalement, nous détaillons le banc optique utilisé dans les expériences de piégeage, de déformation optique des cellules et de la mesure de réflectivité des cavités photoniques.

## 2.1 Dispositif visé

Le dispositif que nous proposons de développer est une chambre optofluidique formée d'un réservoir fluide - permettant de maintenir la suspension de cellules au-dessus de la cavité photonique - et d'un substrat intégrant des CPs pour la détection, comme illustré sur la *Figure 26*. Nous utilisons un réservoir fabriqué en polydiméthylsiloxane (PDMS) qui nous permet de faire nos expériences dans un milieu liquide statique. Ce système protège en plus les CPs de la poussière et des contaminants en suspension dans l'air et fournit une surface plane et fixe, mieux adaptée aux mesures de réflectivité et à l'imagerie des CPs, que l'interface courbée d'une goutte de liquide pouvant fluctuer. Une fois rempli de la suspension biologique, le réservoir (pointillé en rouge) vient se reporter sur les structures photoniques.

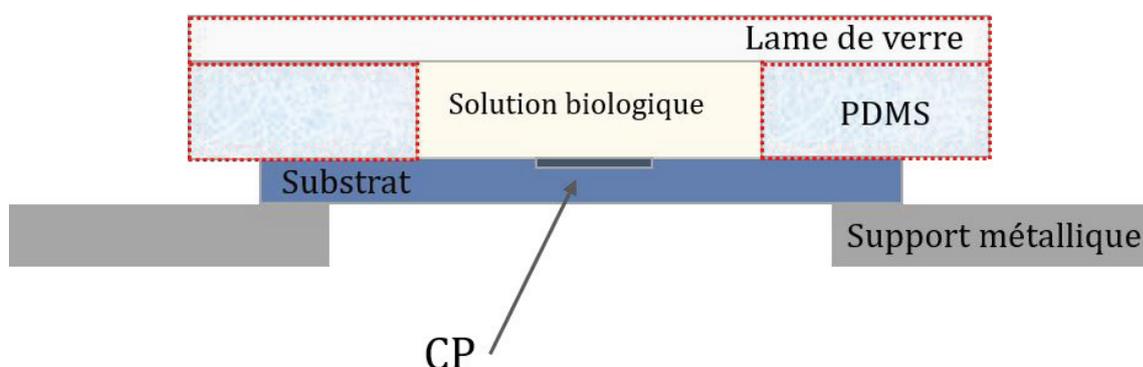


Figure 26: Vue en coupe de la chambre optofluidique, composée du réservoir fluide au-dessus du substrat contenant les cristaux photoniques.

Concernant la structure photonique, nous utilisons une cavité intégrée dans un cristal photonique de deux dimensions et dont la taille est comparable à celle d'une cellule sanguine. Il s'agit d'une cavité double période à haut facteur de qualité, avec deux rayons de trous différents  $R_{c1}$  et  $R_{c2}$ , comme illustré dans la Figure 27-a. la cavité délimitée en noir dans la Figure 27-b est entourée d'une barrière photonique avec des trous de rayon  $R_b$ . La structure est gravée dans une couche de 300 nm de silicium (Si), reportée sur une couche de silice ( $\text{SiO}_2$ ) de 2  $\mu\text{m}$ , elle-même déposée sur un substrat épais de Si. Nous appelons ce type d'empilement du SOI (Silicone On Insulator ou silice en isolant). La structure de cette cavité photonique a été développée durant la thèse de Laurent Milord à l'INL [64].

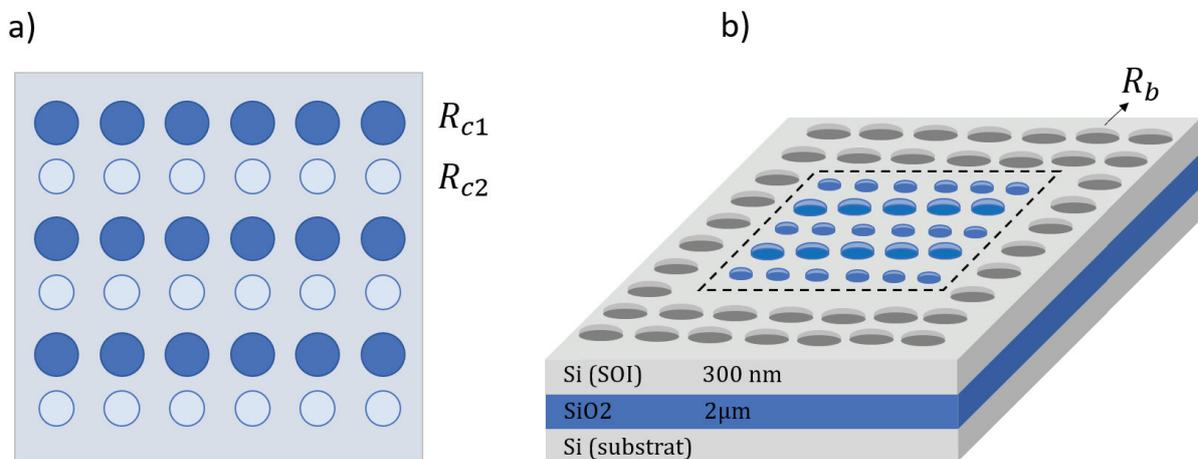


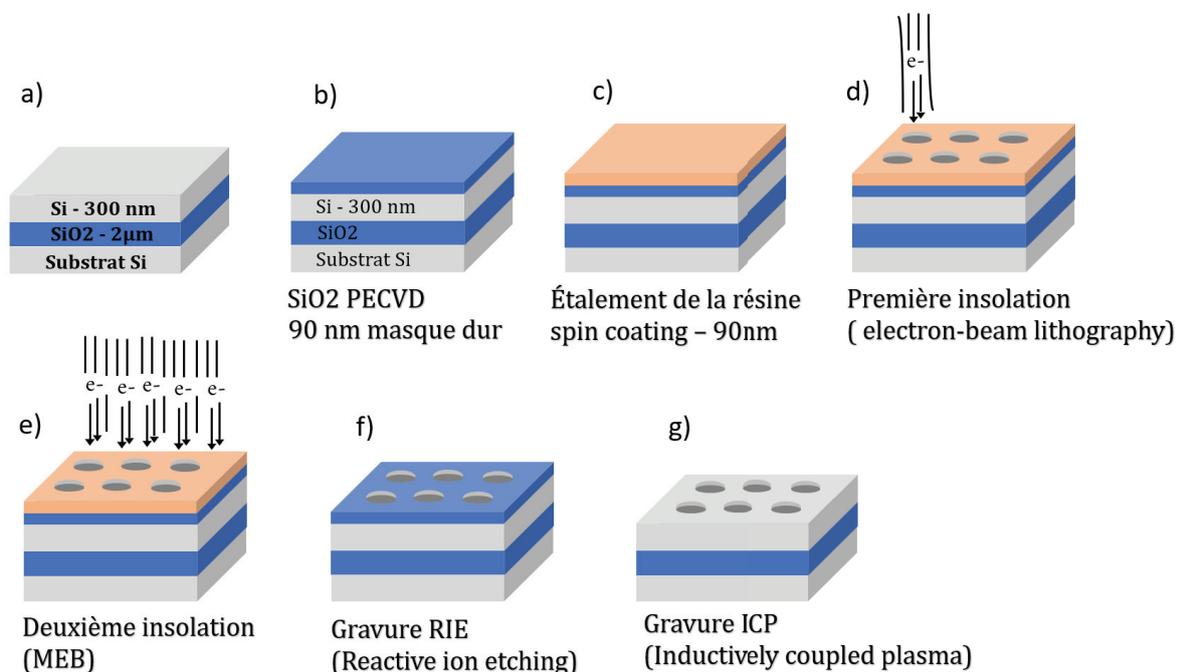
Figure 27: Schéma de la structure photonique présentant : a) la cavité à double période avec des rayons des trous  $R_{c1}$  et  $R_{c2}$  dont l'écart fait de quelques nanomètres, et b) le cristal photonique gravé dans le substrat SOI avec la cavité entourée d'une barrière photonique composée de trous de rayon  $R_b$ .

## 2.2 Fabrication de la chambre optofluidique

### 2.2.1 Technologie des cristaux photoniques.

Les cristaux photoniques que nous utilisons dans le cadre de cette thèse ont été fabriqués sur la plateforme Nanolyon de l'INL. Les CPs sont entièrement gravés dans 300 nm de SOI en utilisant une étape de lithographie électronique à haute résolution suivie d'une gravure ionique pour transférer les motifs sur la couche de Si. Ce procédé global de fabrication, développé à l'INL [64], est illustré dans la Figure 28. Nous explicitons ici brièvement les différentes étapes.

On part d'un substrat SOI constitué d'une couche de Si de 300 nm sur une couche enterrée de SiO<sub>2</sub> de 2 μm et un substrat de Si (*Figure 28-a*). À cause du facteur d'aspect important de gravure, nous ne pouvons pas graver le Si avec un simple masque en résine. La première étape consiste donc à déposer un masque dur en SiO<sub>2</sub> par dépôt chimique en phase vapeur assisté par plasma (PECVD) (voir *Figure 28-b*). Une couche de 90 nm de résine positive électrosensible PMMA-A4 (représenté en rose sur la figure) est ensuite étalée grâce à une tournette à 4000tr/min, pendant 30 secondes et recuite à 180°C pendant 90 secondes pour la durcir (*Figure 28-c*). On insole ensuite la résine par lithographie électronique avec une tension d'accélération de faisceau de 30 kV, pour transférer les motifs des CPs (*Figure 28-d*). Après développement de la résine insolée avec un mélange Methyl IsoButyl Ketone : isopropanol (MIBK : IPA) 1:1 pendant 50 secondes, suivi d'un rinçage à l'isopropanol, on insole une deuxième fois la résine, mais cette fois de manière uniforme grâce au faisceau d'un microscope électronique à balayage (MEB) (*Figure 28-e*), afin d'améliorer la qualité des trous dans la résine. Ensuite, on transfère les motifs de la résine dans le masque de silice par une gravure sèche ionique (Reactive Ion Etching ou RIE) représentée sur la *Figure 28-f*, en utilisant un mélange de gaz CHF<sub>3</sub>/Ar de proportion 8 sccm/40 sccm. On termine en gravant le silicium de la couche SOI par une gravure à plasma couplé par induction (Inductively Coupled Plasma, plasma à couplage inductif ou ICP) avec un mélange de gaz Cl<sub>2</sub>/O<sub>2</sub> de proportion 22 sccm/4 sccm. On obtient ainsi les motifs des cristaux photoniques gravés dans le silicium (voir *Figure 28-g*).



*Figure 28: Etapes technologiques de fabrication d'un cristal photonique.*

La *Figure 29-a* présente l'image de notre échantillon obtenue par MEB. On mesure une période de cristal photonique de 300 nm. La cavité de 5 x 5 μm<sup>2</sup> (encadrée en jaune) est

composée de 8 périodes doubles et demie. On remarque que les trous sont régulièrement espacés et bien arrondis grâce à la technique de la double insolation. Le zoom au bord de la cavité (*Figure 29-b*) illustre les rangées alternées de trous. Les trous délimités en blanc ont un rayon moyen  $R_{c1} = 71$  nm et ceux délimités en rouge ont un rayon moyen  $R_{c2} = 76$  nm. Le rayon des trous de la barrière photonique à l'extérieur de la cavité est  $R_b = 96$  nm. On peut remarquer la qualité de l'échantillon réalisé, les trous sont bien circulaires avec une faible rugosité. La faible différence de taille des trous dans la cavité permet d'obtenir un facteur de qualité optique  $Q$ , de plusieurs milliers dans l'eau ; typiquement pour cette cavité,  $Q=10\,000$  ( $Q$  est calculé selon l'équation 11 - chapitre 1). L'obtention de facteur de qualité de cet ordre valide les réalisations technologiques présentés dans cette section pour la fabrication des cristaux photoniques à haut facteur de qualité.

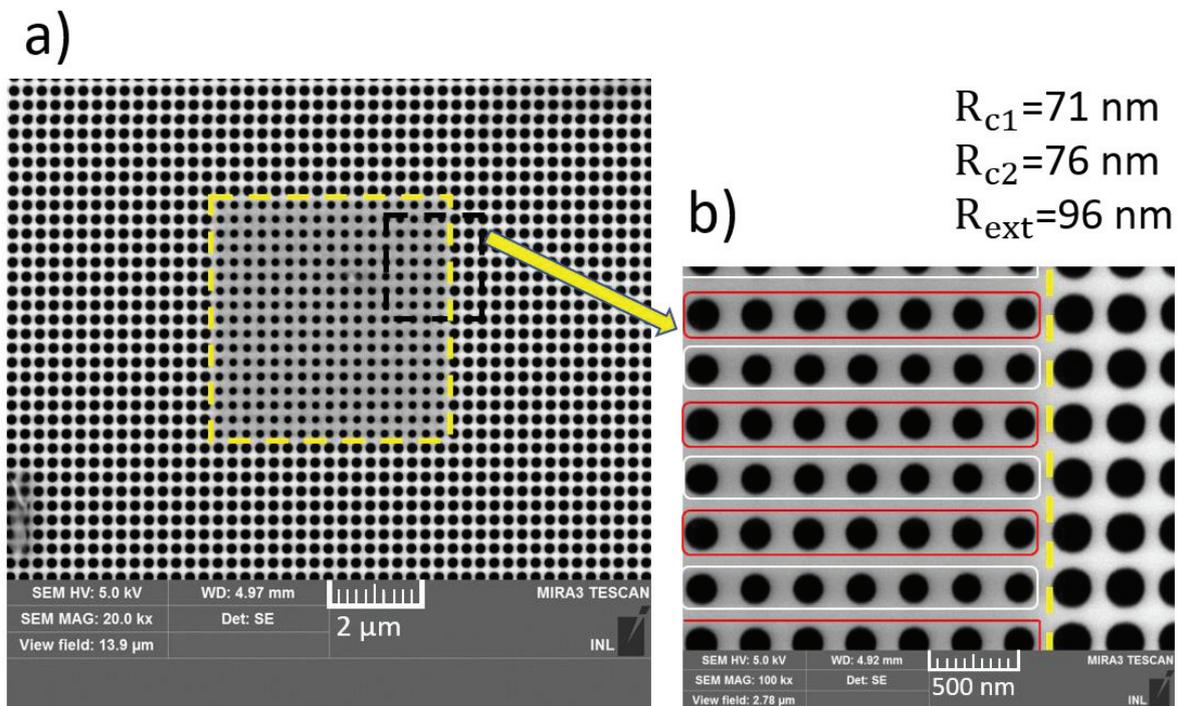
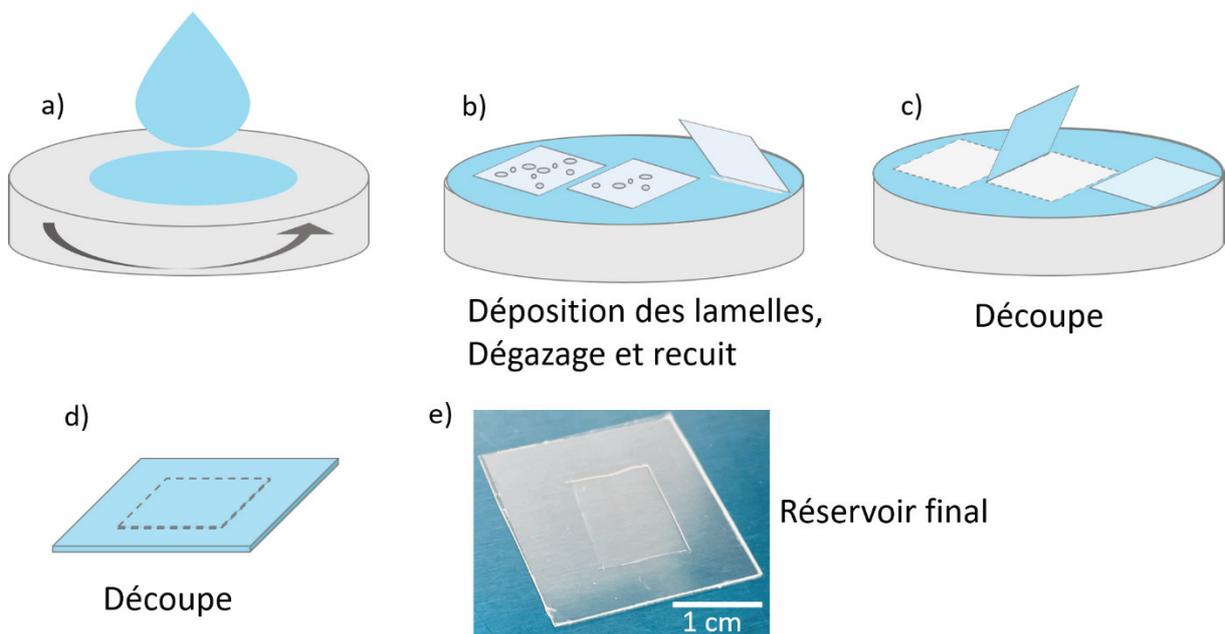


Figure 29: Images MEB d'une cavité photonique à double période, fabriquée par lithographie électronique. a) La cavité de  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  délimitée en jaune est composée de 8 doubles périodes et demie. b) Agrandissement du bord de la cavité double période. Les trous délimités en blanc ont un rayon moyen  $R_{c1} = 71$  nm et ceux délimités en rouge ont un rayon moyen  $R_{c2} = 76$  nm. De l'autre côté de la ligne jaune pointillée, on retrouve la barrière photonique avec des trous de rayon  $R_{ext} = 96$  nm. La période du cristal est autour de 300 nm.

Maintenant que nous avons vu le processus de fabrication des cristaux photoniques, nous présentons par-là suite les étapes de fabrication du réservoir fluide.

## 2.2.2 Fabrication du réservoir fluide.

Le réservoir fluide que nous utilisons dans cette thèse est constitué d'une couche de PDMS étalée sur une fine lamelle de verre. Le choix du PDMS est basé sur plusieurs critères. Tout d'abord sa biocompatibilité [49] puisqu'il va être utilisé avec des cellules biologiques. Ensuite, pour sa transparence ce qui permet d'envisager un couplage avec une visualisation optique nécessaire pour les phases de développement de la chambre. Enfin ses capacités d'adhésion réversible sur silicium permettent de réutiliser plusieurs fois le cristal photonique, moyennant une procédure de nettoyage adaptée qui sera présentée plus loin (voir section 2.2.3). En effet, étant donné le coût et le temps de fabrication des CPs, nous avons réutilisé les mêmes puces photoniques pour plusieurs expériences. Le procédé de fabrication du réservoir est illustré dans la *Figure 30*.



*Figure 30: Etapes de fabrication du réservoir microfluidique.*

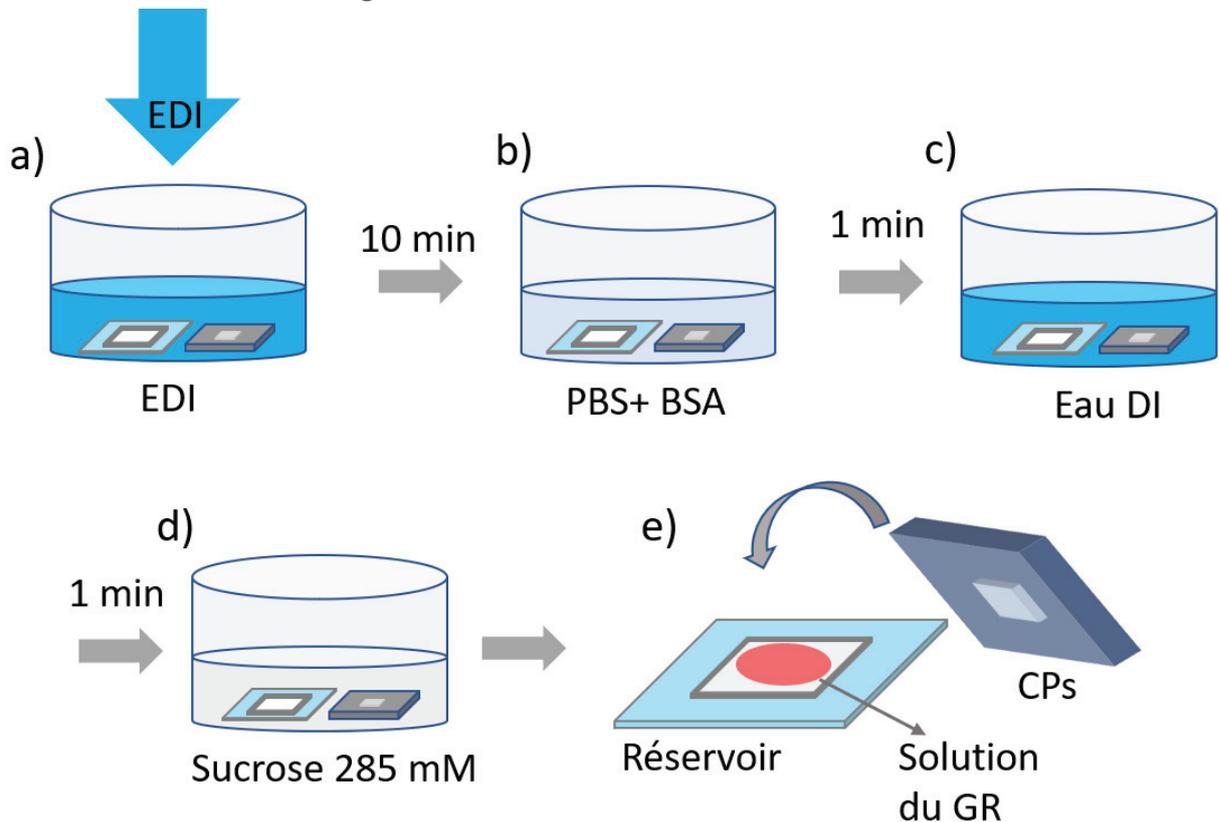
On prépare tout d'abord le PDMS (Sylgard 184), avec un rapport 9/1 w/w (base/réticulant). Puis, après l'avoir étalé via une tournette à 2000 tr/minute sur la face arrière d'une boîte de pétri (*Figure 30-a*), on vient déposer sur le PDMS des lamelles de verre de  $25 \times 25 \text{ mm}^2$  (*Figure 30 -b*). Ces dernières restent à la surface du PDMS car elles sont assez légères pour ne pas « couler » dans le polymère. On fait ensuite dégazer l'ensemble sous cloche à vide pour éliminer les éventuelles bulles d'air et nous laissons réticuler dans le four à une température de  $70^\circ\text{C}$  pendant 4H00. Enfin, on découpe le PDMS autour des lamelles de verre (*Figure 30-c*), puis nous les retournons de façon à ce que le PDMS soit sur le dessus (*Figure 30-d*) pour y découper ce qui deviendra le réservoir final illustré dans la *Figure 30-e*. La profondeur du réservoir déterminée par l'étape d'étalement à la tournette est environ de  $70 \mu\text{m}$ . Après la phase de fabrication, les

réservoirs sont rincés dans un bain d'éthanol, puis dans de l'eau désionisée (EDI par la suite), afin de nettoyer tous les résidus et la poussière sur la surface.

Maintenant que nous avons fabriqué le réservoir fluide, nous passons à la description de la préparation des surfaces du réservoir et des CPs et à l'assemblage des 2 parties pour former la chambre optofluidique.

### 2.2.3 Traitement des surfaces et conservation des cristaux photoniques

Nous étudions des globules rouges dont les membranes interagissent avec la surface du silicium, ce qui pose des problèmes d'adhésion qui seront discutés dans le Chapitre 4 "Adhésion non-spécifique de globules ". La procédure optimisée qui découle de cette étude est illustrée dans la *Figure 31*.

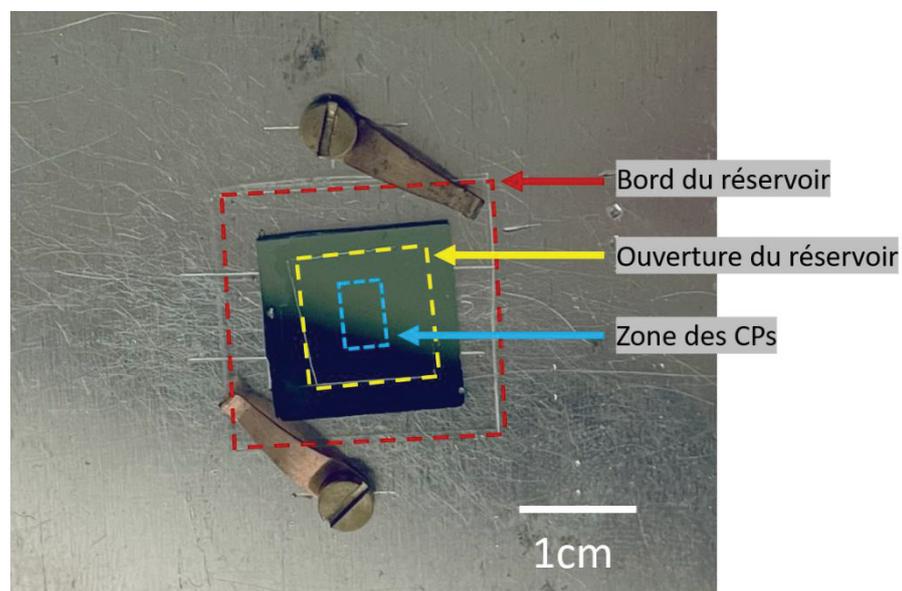


*Figure 31: Etapes de préparation des surfaces de la chambre optofluidique.*

Le traitement commence par un rinçage des CPs, qui ont été stockés dans l'eau depuis leur fabrication, et du réservoir en PDMS sous un flux d'EDI (*Figure 31-a*). Puis on plonge les deux éléments de la chambre pendant 10 minutes dans une solution de phosphate tamponnée (PBS 1X) contenant de l'albumine de sérum bovin (BSA) à 0.02% w/w (*Figure 31-b*) pour passiver les surfaces. Ensuite, on rince les échantillons dans un bain

d'EDI pendant 1 minute (*Figure 31-c*) pour diluer les ions du PBS qui favorisent l'adhésion des globules rouges sur le silicium. Après un deuxième rinçage de 1 minute dans un bain de sucrose à 285 mM pour remplacer l'eau par la solution de sucrose (*Figure 31-d*), on introduit la suspension de globules rouges à caractériser dans le réservoir et on ferme la chambre optofluidique avec le substrat contenant les CPs (*Figure 31-e*).

La *Figure 32* présente une photographie de la chambre optofluidique finale, placée sur le support métallique troué du montage, de manière à pouvoir avoir accès à la face arrière de la chambre pour exciter la cavité photonique. On peut distinguer une zone contenant les cristaux photoniques, contenus dans l'ouverture carrée du réservoir de  $\sim 1$ cm de côté.



*Figure 32: Photo de la chambre optofluidique.*

Après chaque utilisation, il est fondamental de nettoyer minutieusement la surface des cristaux photoniques pour ôter les cellules qui auraient quand même adhéré. En effet, étant donné les coûts de fabrication des CPs, ils sont réutilisés plusieurs fois et nous avons dû développer une stratégie pour nous assurer que les performances des CPs étaient les mêmes quel que soit le nombre d'utilisation. Pour cela, nous avons développé un protocole de nettoyage illustré dans la *Figure 33*. On commence par un nettoyage des CPs par ultrason pendant  $\sim 5$  min dans un bain de PBS+BSA à 0,02% w/w (*Figure 33-a*). Puis on applique des ultrasons dans un bain d'EDI pendant 2 min (*Figure 33-b*), avant de rincer l'échantillon de CPs sous un flux d'EDI pendant 5 min (*Figure 33-c*). Finalement, le substrat contenant les CPs est conservé dans un flacon rempli d'EDI, et cela jusqu'à la prochaine utilisation.

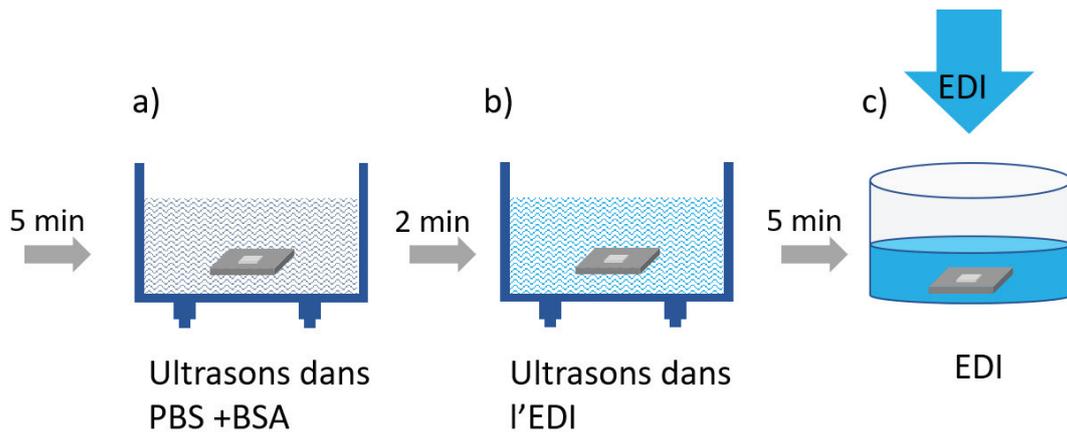


Figure 33: Etapes de nettoyage des surfaces des cristaux photoniques par ultrasons.

La surface en PDMS du réservoir étant légèrement poreuse, elle peut stocker des poussières et des impuretés et les relarguer dans l'échantillon suivant de globules rouges. Le réservoir est donc considéré à usage unique et est changé à chaque expérience.

Un des phénomènes qui a motivé le développement de ce protocole de nettoyage et de conservation des cristaux photoniques, est l'apparition d'un décalage de la résonance du CP inexplicable avec notre protocole de nettoyage initial, qui consistait à des bains successifs dans de l'eau, de l'éthanol et de l'acétone. La Figure 34 compare le décalage de la résonance de la cavité en fonction du nombre d'utilisations, avec notre protocole de nettoyage de départ (noté protocole initiale sur la figure) et celui qui a été développé durant la thèse (noté nouvelle protocole). Pour valider notre nouveau protocole de nettoyage, nous avons utilisé deux cavités de  $5 \mu\text{m}$  de côté, avec un facteur de qualité dans l'eau de 8 000 et 9 000, et qui pouvait être sacrifiées. Les chambres optofluidiques sont remplies avec la suspension de globules rouges et la position de la résonance est mesurée à température ambiante pour chaque chambre, en l'absence de globules rouges sur la cavité. Puis les chambres sont nettoyées selon l'un ou l'autre des protocoles et une nouvelle expérience est réalisée. Nous calculons le décalage de la résonance des CPs en prenant comme référence la résonance lors de la 1<sup>ère</sup> utilisation. Comme mentionné plus haut, le protocole de nettoyage initial induit un décalage de la résonance vers le rouge. Dès la seconde expérience, la résonance se déplace de 3,3 nm, puis elle continue à se décaler pour atteindre 10,5 nm après la cinquième utilisation, comme illustré par les carrés noirs de la Figure 34. Nous attribuons ce phénomène à la création d'une multicouche de biomolécules typiquement de la BSA sur la surface de la cavité, ou bien à des dépôts de résidus de membrane de globules rouges lysés par le premier rinçage à l'eau du protocole de nettoyage initial. Ces multicouches peuvent également limiter l'interaction entre le globule rouge et la cavité dont la portée est de  $\sim 200 \text{ nm}$ .

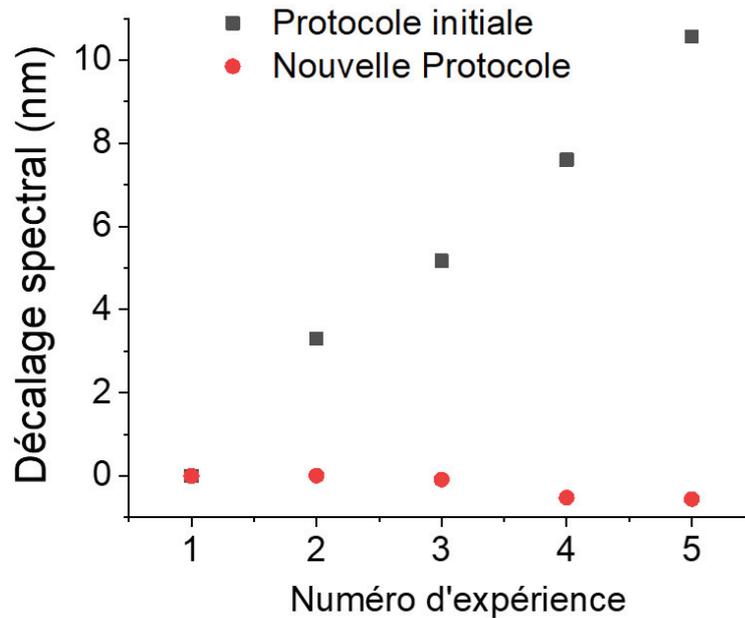


Figure 34 : Effet du protocole de nettoyage et de conservation des CPs sur le décalage de résonance selon le nombre d'utilisations.

Par opposition, la *Figure 34* montre que le nouveau protocole de nettoyage (cercles rouges sur le graphique) prévient cette dérive et permet de maintenir le décalage de la résonance quasiment stable avec une déviation maximale de 0,4 nm par rapport à la position initiale (la résolution de la mesure avec le spectromètre est de l'ordre de 0,008 nm). Cette petite fluctuation de la position de résonance peut être attribuée à une variation de l'indice de réfraction de la suspension biologique lors de la préparation d'une expérience à l'autre. Ces résultats mettent en évidence la bonne reproductibilité de mesure que nous pouvons l'avoir en utilisant notre nouveau protocole de nettoyage.

## 2.3 Préparation des échantillons biologiques

### 2.3.1 Préparation des globules rouges sains et rigidifiés

Au cours de cette thèse, nous avons travaillé sur deux types d'échantillons biologiques : des globules rouges sains et des globules rouges artificiellement rigidifiés par un traitement pharmacologique.

Pour la préparation des suspensions de globules rouges sains (hRBCs), 5  $\mu$ L de sang total frais sont obtenus par piqûre au bout du doigt du donneur sain, et dilués dans 1 mL de PBS 1X. Puis après avoir centrifugé la suspension pendant 2 minutes à 1 000 G, le surnageant est retiré et les hRBCs ont été remis en suspension dans 1mL de PBS. Cette étape de lavage a été répétée trois fois pour : (i) isoler les globules rouges des autres composants sanguins, et (ii) éviter la coagulation de l'échantillon. Enfin, 30  $\mu$ L de

suspension de hRBCs dans du PBS, ont été mélangés avec 100  $\mu\text{L}$  de sucrose à une concentration de 285 mM.

Les globules rouges artificiellement rigidifiés (rRBCs) sont obtenus par un traitement chimique des globules sains à la glutaraldéhyde (Glut). Cette molécule est un fixateur non spécifique connu pour agir sur tous les composants cellulaires, réduisant la déformabilité globale [88]. Pour préparer des globules rigidifiés, 65  $\mu\text{L}$  de solution de Glut à 12.5% ont été ajoutés à 130  $\mu\text{L}$  d'une suspension de hRBCs lavés selon le protocole explicité ci-dessus. Après homogénéisation à la micropipette, la solution a été incubée pendant 1 heure à température ambiante. Les cellules ont été lavées 3 fois dans du PBS et ont été re-suspendues dans du PBS. Finalement, 30  $\mu\text{L}$  de suspension de rRBCs dans du PBS ont été mélangé avec 100  $\mu\text{L}$  de sucrose à 285 mM.

### 2.3.2 Mesure de module d'Young

Nous avons utilisé un microscope à force atomique (AFM MFP-3D Asylum Research, Oxford Instrument) pour mesurer la rigidité des deux types cellulaires que nous allons étudier dans cette thèse. Les mesures sont effectuées par *Marie-Charlotte Audry-Deschamps* de l'équipe DSE de l'INL. Nous mesurons la force entre un cantilever flexible à pointe pyramidale (PNP-TR, NanoWorld, de raideur nominale 0,08 N/m), et les cellules adhérentes au fond d'une boîte de Pétri grâce à un traitement de surface à la poly-L-lysine à 0,001 mg/mL (voir *Figure 35*). La rigidité du cantilever a été déterminée par la méthode du bruit thermique et donne une constante de ressort de 0,03 N/m. Les mesures de force ont été effectuées à une vitesse d'approche de 200 nm/s et une vitesse de rétraction de 2  $\mu\text{m/s}$  sur une distance de 5  $\mu\text{m}$ , un taux d'échantillonnage de 500 Hz, et un point de consigne de 1 nN.

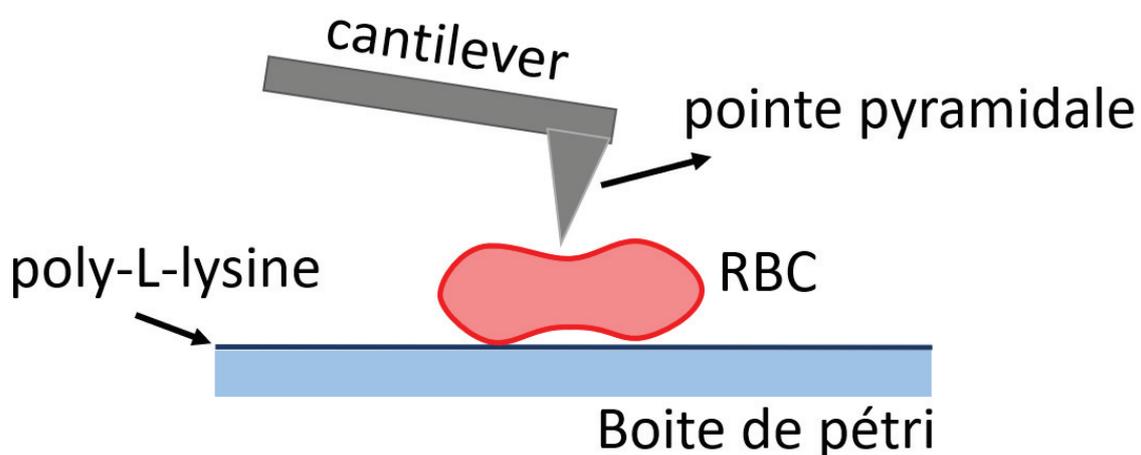


Figure 35 : Illustration schématique du setup de mesure par AFM.

Les mesures ont été effectuées sur 50 hRBCs et 50 rRBCs, dans du PBS à température ambiante. La portion de la courbe force  $F$ , vs indentation  $\delta$ , pendant l'approche a été utilisée pour déterminer le module de Young  $E$  des cellules par le modèle de Hertz approprié pour une pointe pyramidale [89]-[91] :

$$F = \frac{3.E.\tan(\theta)}{4.(1-\nu^2)} \cdot \delta^2 \quad (12)$$

Où  $\nu$  est le coefficient de Poisson (fixé à 0,5 pour les cellules biologiques) et  $\theta$  est le demi-angle de la pointe pyramidale (ici  $36^\circ$ ). Nous avons constaté que le module de Young moyen des hRBCs est  $E_{hRBCs} \sim 10^2$  Pa, soit 100 fois moins que celui des rRBCs, pour lesquels  $E_{rRBCs} \sim 10^4$  Pa.

Le module de Young rapporté dans la littérature pour les globules rouges traités avec de glutaraldéhyde à 0,0025% est de  $1000 \pm 300$  Pa, ce qui est dix fois supérieur à celui des globules rouges humains, qui est d'environ  $100 \pm 30$  Pa [25] . Ces résultats mettent en valeur la forte rigidité des cellules après application du traitement pharmacologique.

Après avoir détaillé la préparation de la chambre optofluidique et de la solution de globules rouges, nous présentons maintenant le montage expérimental qui nous permet de piéger, positionner et déformer une cellule au-dessus de la cavité photonique et de mesurer le spectre de réflectivité en parallèle.

## 2.4 Montage expérimental

Le schéma de principe du banc expérimental est présenté sur la *Figure 36*. Il est constitué de deux modules : (i) un module pour mesurer la réflectivité de la cavité photonique dans le proche infra-rouge (NIR), et une partie qui sert à piéger les globules rouges, les positionner sur la cavité et les déformer.

### 2.4.1 Module 1 : Mesure de micro-réflectivité.

Ce module est utilisé pour faire des mesures de micro-réflectivité sur nos cavités, dans le NIR. Nous mesurons en face arrière la réflectivité des cavités à l'aide d'une source large bande (désignée sous le terme SLED sur la *Figure 36* et dans la suite du document) dont la taille de faisceau est ajustée pour correspondre à celle de la cavité. Le faisceau réfléchi par l'échantillon passe par un analyseur de spectre pour la caractérisation

spectrale. On obtient ainsi le spectre de réflectivité de la cavité, contenant la résonance du mode fondamental avec une largeur à mi-hauteur fait de centaines de picomètres

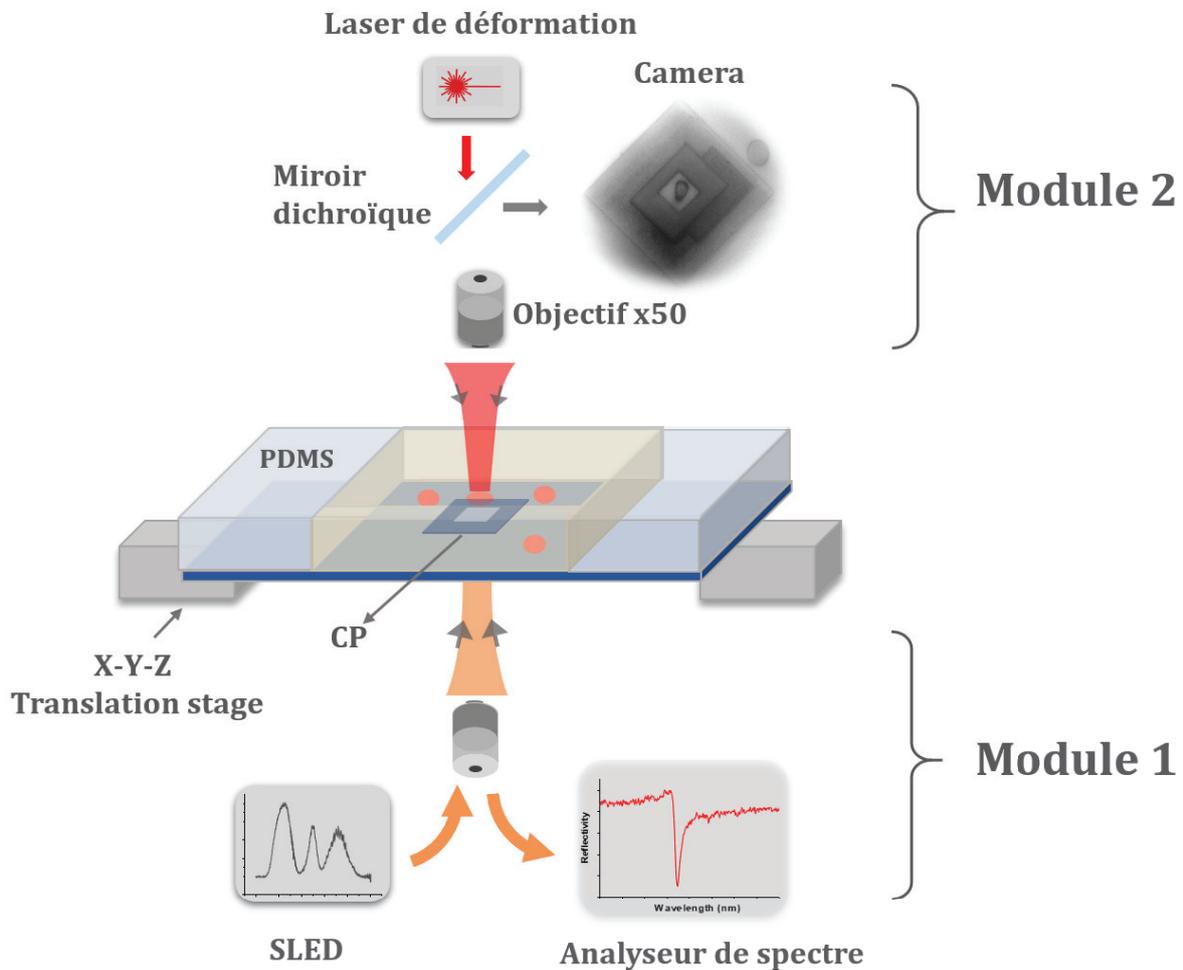


Figure 36: Schéma du banc expérimental de mesures optiques

Le montage expérimental utilisé dans ce module se base sur les travaux des 2 dernières thèses menées dans l'équipe i-LUM à l'INL [64], [92]. Il est constitué de plusieurs éléments, détaillés dans la Figure 37.

On trouve sur cette figure, le circuit optique avec la source large bande dans le NIR et l'analyseur de spectre qui compose la partie de mesure de la micro-réflectivité, et le système d'imagerie IR qui nous permet d'aligner le faisceau laser avec la cavité. L'optique mise en œuvre est entièrement fibrée avec des fibres monomodes adaptées pour fonctionner dans la gamme IR entre 1260 nm et 1625 nm. La source large bande de marque Amonics recouvre une gamme de longueur d'onde de 1250 à 1650 nm. Le faisceau passe tout d'abord par un contrôleur de polarisation fibré, qui permet d'obtenir une polarisation linéaire selon l'axe désiré. La lumière passe ensuite à travers un circulateur optique fibré et collimaté par la lentille (L1). Une fois le faisceau en espace libre, il est réfléchi par un miroir et focalisé sur l'échantillon par un objectif de microscope (O1). Le grandissement de l'objectif varie selon la taille de la cavité à étudier.

Après réflexion, le faisceau fait le chemin inverse : il repasse par l'objectif (O1) et est réfléchi par le miroir vers le collimateur, puis il est redirigé par le circulateur vers l'analyseur de spectre.

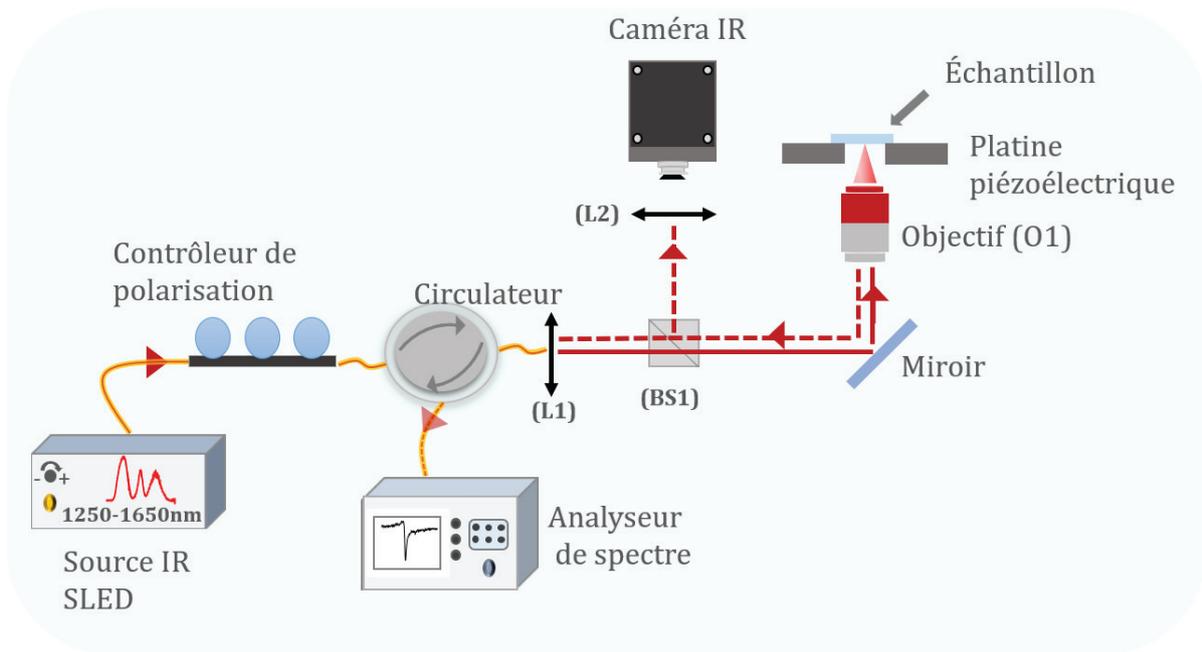


Figure 37: Schéma du montage optique de micro-réflexivité dans le NIR.

Nous allons maintenant détailler les composants de ce module.

#### a. Source de lumière et caractéristique de faisceau.

Figure 38 représente le spectre, la courbe que l'on obtient lors de la réflexion de la source NIR sur la surface de Si, à côté du CP. On remarque dans le spectre, trois pics d'intensité qui correspondent aux trois LED qui constituent la source. La SLED est connectée à une fibre monomode avec une taille de mode de  $W_{fibre-SLED} \approx 5 \mu\text{m}$  autour de 1300 nm. Le faisceau en espace libre est collimatée par une lentille (L1) de 12 mm de focale.

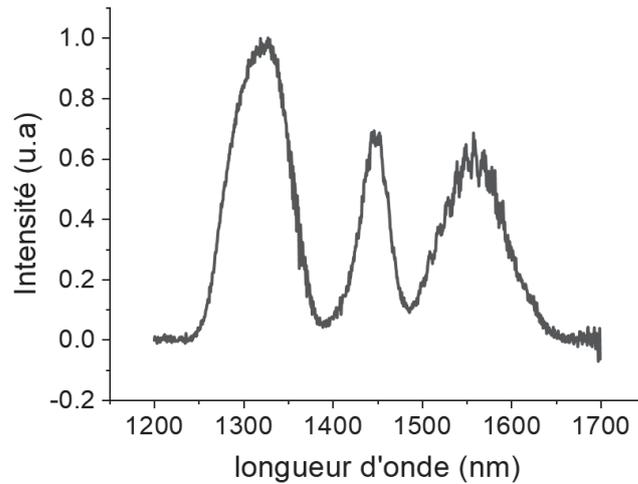


Figure 38: Spectre d'émission de la SLED en réflexion sur le substrat à côté du cristal photonique.

La plage de résonances visée est dans la gamme de 1250 nm à 1330 nm. Le spectre de la SLED est donc particulièrement adapté aux mesures à effectuer et assure un bon recouvrement spectral du faisceau avec les modes optiques des CPs. En plus du recouvrement spectral, il doit y avoir un recouvrement spatial pour pouvoir coupler le faisceau avec les modes optiques de la cavité. La taille du faisceau doit donc être en adéquation avec celle de la cavité et respecter les mêmes symétries.

Pour estimer son diamètre, nous pouvons calculer la taille de waist (ou rayon du faisceau) passant par une lentille et un objectif de microscope, en utilisant l'équation suivante :

$$W_{\text{sortie de objectif}} = \frac{f_{\text{objectif}}}{f_{\text{lentille}}} \times W_{\text{fibre-SLED}}, \quad (13)$$

Avec  $f_{\text{lentille}}$ , la distance focale de la lentille qui vaut 12 mm,  $f_{\text{objectif}} = \frac{D}{M}$  celle de l'objectif, où  $D = 200$  mm est la taille de l'objectif,  $M$  est son grossissement. Comme le montre l'équation, la taille du faisceau peut être ajustée en changeant le grossissement de l'objectif avec une lentille de focale fixe. Nous avons calculé le diamètre du faisceau par l'équation ci-dessus à la sortie d'objectifs de microscope de différents grossissements. Le banc permet d'obtenir des tailles de spots qui s'échelonnent de 3 à 16  $\mu\text{m}$ , comme reporté *Tableau 3*. Ceci nous permet d'adapter l'objectif à la taille de la cavité utilisée.

Objectif	Diamètre de spot
×50, NA= 0,65	3,33 $\mu\text{m}$
×20, NA= 0,40	8,33 $\mu\text{m}$
×10, NA= 0,26	16,66 $\mu\text{m}$

*Tableau 3: Diamètres de spot laser à la sortie des objectifs microscopiques de différents grossissements, calculés par l'équation (13).*

## **b. Visualisation infra-rouge et collecte de signal.**

La deuxième partie de ce module est consacrée à l'alignement du faisceau de la SLED dans la cavité pour pouvoir la caractériser. Il faut pour cela visualiser simultanément le faisceau et le substrat photonique. Dans ce but, on utilise un cube séparateur nommé BS1 dans la *Figure 37* qui envoie une partie du faisceau réfléchi par l'échantillon vers une caméra IR en passant par la lentille (L2) (ce cube sera enlevé une fois l'alignement du spot avec la cavité fait). Nous utilisons une caméra de modèle Xenics XS-1264. Le plan de l'échantillon est éclairé par une lampe halogène pour distinguer la cavité dans l'IR. Le positionnement du spot dans la cavité se fait à l'aide d'une plateforme piézoélectrique 3 axes, pilotée informatiquement en utilisant le logiciel Labview. Nous utilisons également des vis micrométriques pour contrôler l'inclinaison et acquérir une incidence normale du spot par rapport à la cavité. Après avoir aligné le spot dans la cavité, le mode optique peut être mesuré avec la source large bande. En parallèle, nous collectons le faisceau réfléchi et le circulateur transmet ce signal à l'analyseur de spectre (Anritsu MS9740A) ayant une résolution de quelque picomètres. Cette résolution nous permet de mesurer des facteurs de qualité allant jusqu'à 100 000. Les données de l'analyseur de spectre sont collectées par ordinateur via Labview pour faciliter la lecture et le traitement des données.

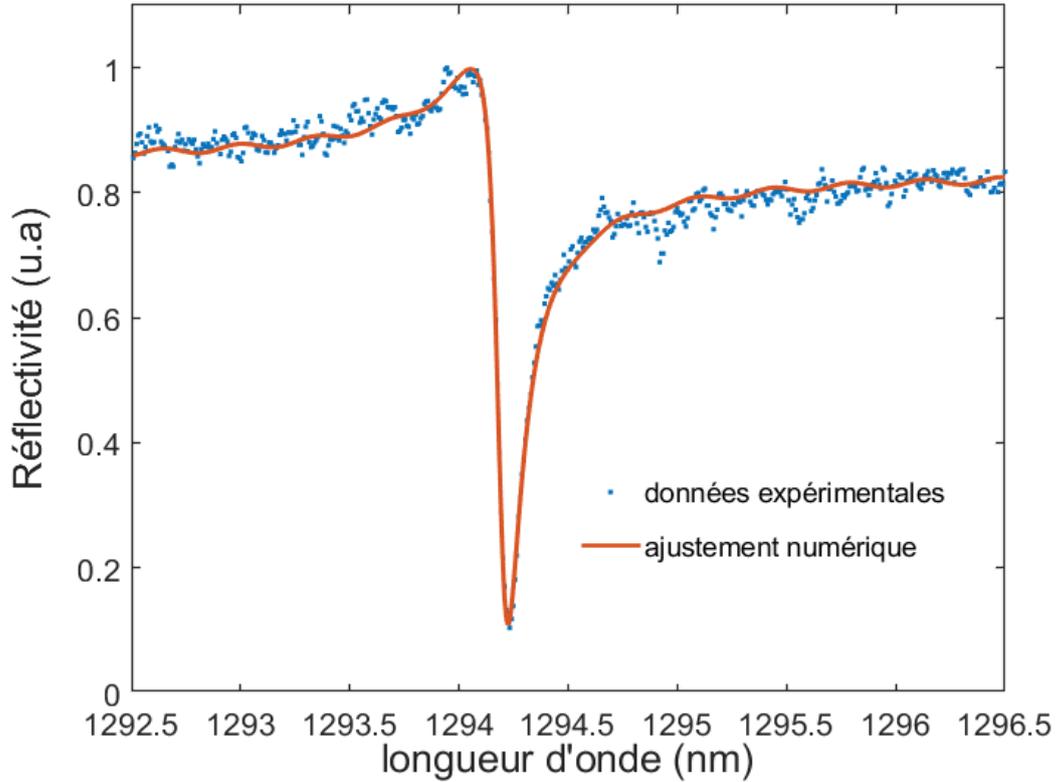


Figure 39: Spectre de réflectivité d'une cavité de 5  $\mu\text{m}$  de côté, dans l'eau.

Dans la *Figure 39*, nous avons reporté le spectre de réflectivité d'une cavité photonique double période de 5  $\mu\text{m}$  de largeur, immergée dans l'eau. La résonance présente un profil de Fano bien définie [93]–[96]. Les oscillations de faible amplitude que nous voyons sur la ligne de base correspondent aux l'interférences qui se produisent dans l'échantillon SOI. En effectuant un ajustement des données expérimentales par une résonance de Fano, nous pouvons extraire les paramètres de résonance tels que la longueur d'onde de résonance  $\lambda_0$ , et son facteur de qualité  $Q$ . La fonction de Fano utilisée est définie par l'équation ci-dessous :

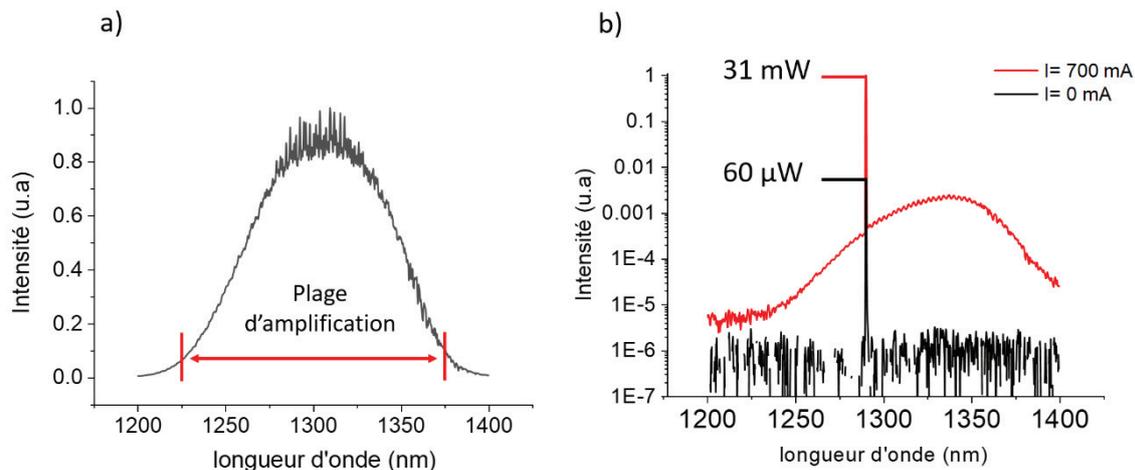
$$a + c * \frac{\left(\frac{\tan(\theta) + 2 * (w - w_0)}{\gamma}\right)^2}{1 + \left(\frac{2 * (w - w_0)}{\gamma}\right)^2} * \frac{1}{1 + \tan(\theta)^2} \quad (14)$$

Avec  $a$  et  $c$  des variables d'ajustement,  $\theta$  la phase en radian,  $w = \frac{1}{\lambda}$ ,  $w_0 = \frac{1}{\lambda_0}$  et  $\gamma = \frac{w_0}{Q}$ .

Dans le cas illustré sur la *Figure 39*, nous obtenons une résonance située à 1294.19 nm dans l'eau, présentant un facteur de qualité remarquable de  $\sim 10\,000$ . Le minimum du spectre de réflectivité est proche de zéro, ce qui indique un bon couplage du mode de la cavité avec le faisceau de la SLED et atteste de la capacité du montage expérimental à mesurer nos spectres de résonance. Cela valide en conséquence sa conception. Ce banc est utilisé pour la caractérisation optique des cavités utilisées durant la thèse et sert également dans notre étude de déformation de globules rouges où les cavités sont utilisées comme détecteur optique.

## 2.4.2 Module 2 : Positionnement des cellules et déformation optique

Comme mentionné dans la présentation de notre approche (voir Section 1.3), nous avons fait l'hypothèse que la résonance du CP devait subir un décalage spectral sous l'effet du changement d'indice de réfraction dû à la déformation du globule rouge au-dessus de sa surface. Pour atteindre cet objectif, il nous faut trouver une façon d'induire une déformation contrôlée de la cellule au-dessus de la cavité. Nous utilisons un laser accordable (noté laser de déformation sur la *Figure 36*) TSL 510, entre 1260 et 1680 nm de chez Santec, pour piéger la cellule, la positionner sur la cavité, puis la déformer grâce aux forces de radiation. Nous avons ajouté un amplificateur optique après le laser, pour compenser les pertes de puissance dans notre chemin optique. Nous nous servons d'un amplificateur à large bande centré sur 1300 nm et dont la gamme d'amplification est montrée dans la *Figure 40-a*.



*Figure 40 : Spectre expérimental d'amplification : a) de l'amplificateur sans laser. b) du laser accordable à 1290 nm suivant l'intensité du courant de l'amplificateur.*

La puissance de sortie est ajustée en contrôlant manuellement le courant de 0 à 700 mA. A la sortie de l'amplificateur, le faisceau est acheminé par une fibre optique et collimaté par une lentille de 12 mm de focale. Ce faisceau est focalisé sur l'échantillon avec un objectif de microscope X50, d'ouverture numérique,  $NA= 0,42$ , et de manière à avoir un waist de  $1,66 \mu\text{m}$ . Dans la *Figure 40-b*, nous représentons les spectres obtenus à la sortie de l'amplificateur lorsqu'on excite avec un laser à 1290 nm. On relève un facteur de 500 entre la puissance crête du laser sans amplification et la puissance au maximum d'amplification. La mesure de la puissance est effectuée avec un puissance-mètre à la sortie de l'objectif.

La *Figure 41* représente la puissance mesurée en fonction de courant de l'amplificateur. La puissance du laser injecté dans l'amplificateur est d'environ 1mW à 1290 nm. On remarque une réponse non linéaire de l'amplificateur entre 0 et 100 mA. Au-delà, la puissance croît linéairement avec le courant, ce qui permet de faire varier la puissance du laser de déformation de  $\sim 1 \text{ mW}$  à  $\sim 30 \text{ mW}$  pour un courant de l'amplificateur compris entre 100 mA et 700 mA.

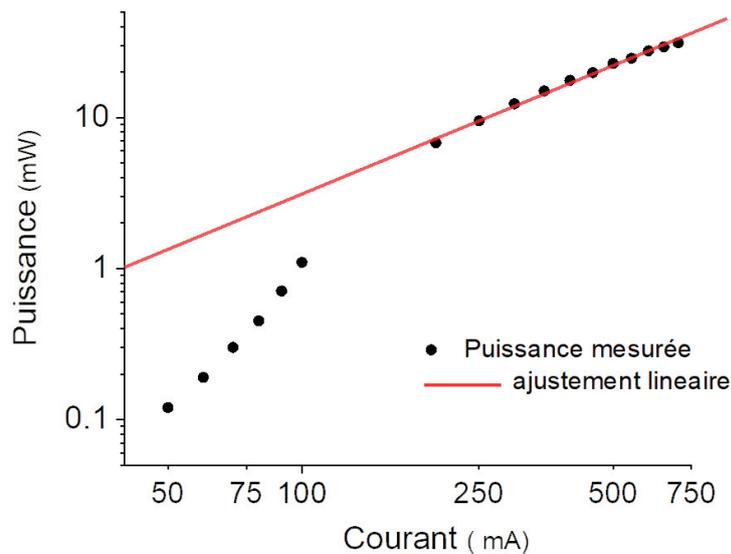


Figure 41 : Puissance du laser de déformation à 1290 nm mesurée en sortie d'objectif en fonction du courant de l'amplificateur.

## 2.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté la structure de notre dispositif, à savoir une chambre optofluidique constituée d'un réservoir fluide de  $\sim 70 \mu\text{m}$  de profondeur et fabriquée en PDMS et d'un substrat contenant les cristaux photoniques. Pour ces derniers, nous avons illustré les procédés technologiques qui nous ont permis de réaliser des cavités photoniques dont le facteur de qualité peut atteindre  $Q \sim 10\,000$  dans l'eau.

Nous avons aussi détaillé les procédures expérimentales mises en place telles que la préparation des surfaces de la chambre optofluidique avec un traitement à la BSA à 0,02% en masse et le protocole de nettoyage avec les ultrasons que nous avons développé. Nous avons également présenté la préparation des 2 types d'échantillons biologiques utilisés au cours de ce travail de thèse : les globules rouges sains et artificiellement rigidifiés avec le glutaraldéhyde. Nous avons ensuite décrit le banc optique expérimental, constitué de deux modules : (i) une source large bande permettant la mesure du spectre de réflectivité de nos cavités photoniques dans le NIR et (ii) un laser dédié au positionnement des globules rouges, et à leur déformation au-dessus de la cavité.

Avant de nous attaquer à la caractérisation d'objets aussi complexes que des cellules biologiques aux propriétés visco-élastiques, nous avons voulu démontrer la preuve de concept de notre approche sur des objets dont la physique est bien plus simple. Nous

avons donc travaillé dans un premier temps sur des microgouttes d'huile minérale dans l'eau. Dans le chapitre suivant, nous allons expliciter la fabrication et la caractérisation de ces microgouttes. Nous présenterons les adaptations du montage expérimental qui ont été nécessaires pour mesurer les déformations de ces objets modèles. Et enfin, nous comparerons les résultats obtenus avec les premières mesures réalisées sur des globules rouges sains.





## Etudes sur des microgouttes d'huile et des globules rouges

### Sommaire

---

3.1	Microgouttes d'huile dans l'eau .....	65
3.1.1	Fabrication des microgouttes d'huile .....	65
3.1.2	Mesure de la tension superficielle des microgouttes. ....	67
3.1.3	Déformation des microgouttes à l'aide de forces optiques .....	68
	a. Conditions expérimentales.....	68
	b. Piégeage et déformation des microgouttes par une pince optique classique .....	69
3.1.4	Etudes en fonction de la puissance du laser de déformation.....	71
3.2	Etude sur les globules rouges sains .....	76
3.3	Conclusion .....	78

---

L'objectif de cette thèse est de démontrer que l'on peut détecter des changements de forme d'objets mous, en réponse à l'application d'une contrainte mécanique, via la mesure de la résonance d'une cavité photonique. Avant de travailler avec des objets aussi complexes que des cellules biologiques qui présentent une architecture complexe, leur conférant des propriétés particulières et hétérogènes (visco-élasticité de la membrane et viscosité du cytoplasme), nous avons voulu obtenir une première preuve de concept sur des objets dont la physique est plus simple. Nous avons choisi de travailler dans un premier temps avec des microgouttes d'huile minérale dans l'eau. Dans ce chapitre, nous allons donc expliciter la fabrication et la physique de ces microgouttes. Nous présenterons les adaptations du montage expérimental qui ont été nécessaires pour mesurer les déformations de ces objets modèles moins denses que leur milieu environnant. Et enfin nous comparerons les résultats obtenus avec les premières mesures réalisées sur des globules rouges sains.

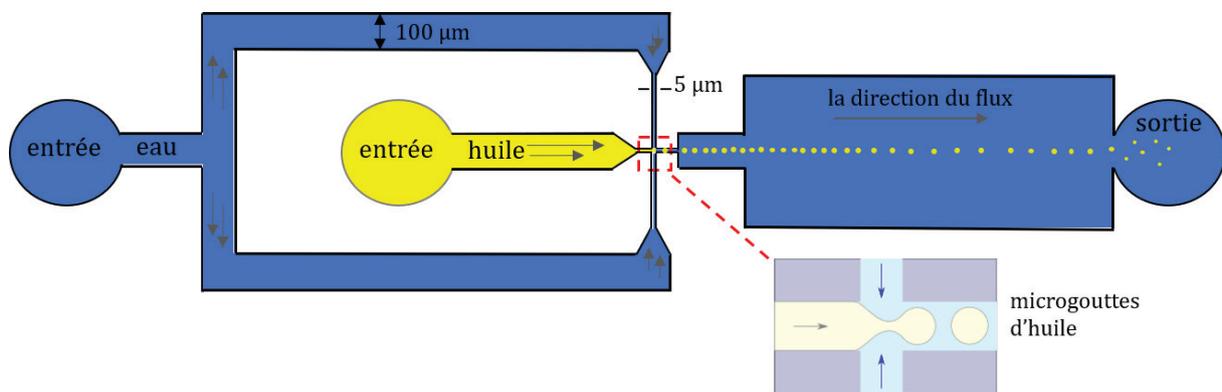
### 3.1 Microgouttes d'huile dans l'eau.

Pour réaliser la preuve de concept de notre approche, nous avons choisi d'étudier un objet modèle : des microgouttes d'huile minérale dans l'eau. Ce choix est motivé par la forme sphérique des gouttes et leur structure uniforme (elle sont composé d'un seul matériau), plus facile à analyser et à simuler que la forme biconcave et la structure complexe des globules rouges. De plus, la simplicité de fabriquer des microgouttes d'huile, de taille comparable aux globules rouges, via des techniques microfluidiques maîtrisées au laboratoire en ont fait des candidats de choix. Enfin, le fort contraste d'indice de réfraction entre l'huile minérale ( $n_{\text{huile}} = 1,467$ ) et l'eau ( $n_{\text{EDI}} = 1,328$ ) rend propice l'utilisation d'approches optiques, que ce soit pour la détection ou pour leur déformation. La première partie de ce chapitre est consacrée à l'étude des microgouttes d'huile. Nous illustrons donc d'abord leur fabrication en microsystème, puis l'étude physique de leurs propriétés mécaniques et enfin la capacité de les déformer à l'aide de pinces optiques classiques. Nous utilisons ensuite la force de radiation générée par la pince optique pour déformer les gouttes au-dessus de la cavité photonique. Et nous examinons l'effet de la déformation des gouttes sur le décalage de la résonance de la cavité.

#### 3.1.1 Fabrication des microgouttes d'huile

La fabrication des microgouttes d'huile minérale (light de chez Sigma Aldrich) dans l'EDI s'est faite en microfluidique de manière à pouvoir obtenir une suspension monodisperse de gouttes de taille comparable à celle des globules rouges (RBCs). La géométrie utilisée,

dite par focalisation de l'écoulement (ou flow focusing geometry en anglais) est illustrée dans la *Figure 42* et sa fabrication est détaillée en Annexe B. Le principe du flow focusing a été largement utilisé dans la littérature pour fabriquer des microgouttes avec des rendements de productions assez importants [97]–[99]. Il est basé sur la focalisation du flux de la phase dispersée (ici l'huile) s'écoulant dans le canal central (en jaune sur la *Figure 42*), par les deux flux de la phase continue (ici l'EDI) qui s'écoulent dans les canaux supérieur et inférieur (en bleu). Le « tube » d'huile entouré d'eau dans la restriction de 5  $\mu\text{m}$  dans la zone après la rencontre des deux phases, comme nous montre le zoom de la *Figure 42*, se fractionne alors en gouttelettes monodisperses (ayant les mêmes propriétés physiques : taille, composition, vitesse, etc...) à cause de l'instabilité de Rayleigh-Plateau [100].



*Figure 42: Schéma montrant la géométrie du système de flow focusing utilisé pour la génération des gouttes d'huile dans l'eau. Le zoom montre de manière plus détaillée, la rencontre entre les deux phases.*

La génération des gouttes est contrôlée en pression (MFCS, Fluigent), dans une gamme comprise entre 300 et 900 mBar. La taille des gouttes peut être ajustée via le rapport des pressions [101] afin d'obtenir une gamme comparable à celle des globules rouges, c'est-à-dire comprise entre 5  $\mu\text{m}$  et 15  $\mu\text{m}$ . Afin de stabiliser les gouttes et contrôler leur déformabilité, nous utilisons un tensio-actif non-ionique et soluble dans la phase aqueuse, le TWEEN 80 à 0,032 g/mL. Les tensio-actifs ou surfactants, sont généralement des composés organiques amphiphiles, c'est à dire qui contient à la fois des groupes hydrophobes (leurs "queues" qui sont attirées préférentiellement par un solvant non polaire comme l'huile) et des groupes hydrophiles (leurs « têtes » qui sont attirées par l'eau). Ils servent à réguler la tension de surface (définie dans la section suivante) à l'interface des 2 phases liquides et empêcher la coalescence des gouttes.

L'observation de la fabrication des microgouttelettes à l'intérieur du système microfluidique est assurée par un microscope (Thunder, Leica Microsystems) équipé d'une caméra rapide (Phantom MIRO Lab310, Vision Research) à des taux d'acquisition de 2 000 images/seconde. La *Figure 43* présente une image microscopique typique de notre système durant la production des microgouttes, où on peut observer un train des gouttes de  $\sim 5 \mu\text{m}$  de diamètre centré au milieu du canal de sortie. La pression d'entrée

de l'EDI est de 500 mBar et celle de l'huile de 400 mBar. Ces gouttes sont ensuite collectées et conservées à température ambiante jusqu'à leur utilisation.

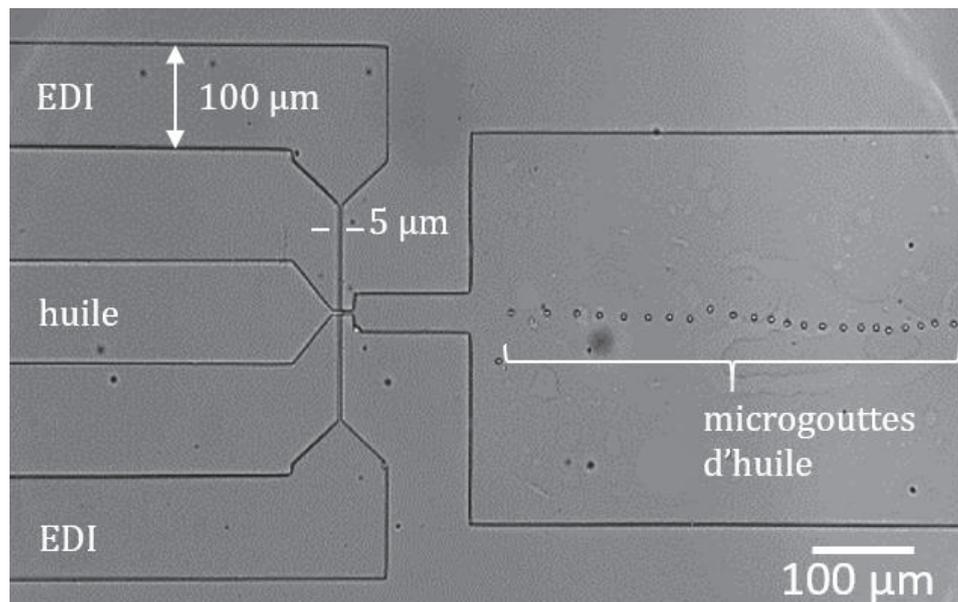


Figure 43: Image microscopique du système microfluidique illustrant la fabrication des gouttes d'huile dans l'eau.

Ayant décrit la fabrication des microgouttes d'huile dans l'eau, nous allons voir dans la section suivante leur caractérisation physique.

### 3.1.2 Mesure de la tension superficielle des microgouttes

La tension de surface est liée aux interactions intramoléculaires des fluides au niveau de l'interface fluide-fluide. Elle correspond à l'énergie qui doit être fournie pour créer plus d'interface et donc s'écarter de la forme sphérique comme forme d'équilibre, qui correspond à la plus petite surface pour un volume donné. La tension de surface est définie par  $\gamma = \partial F / \partial A$ , où  $F$  est l'énergie libre de la goutte et  $A$  son aire.  $\gamma$  diminue avec l'augmentation de la concentration en surfactant. Plusieurs méthodes sont utilisées pour caractériser la tension superficielle, dont la méthode de la goutte pendante [102], [103]. Le principe de cette mesure repose sur l'analyse de la forme d'une goutte liquide pendante, plongée dans un autre liquide immiscible. Les forces qui déterminent la forme de la goutte sont la tension superficielle et la gravité. La tension superficielle cherche à minimiser la surface et maintenir la goutte sphérique alors que les effets de la gravité vont causer des déformations en volume.

La tension de surface étant une propriété intrinsèque des matériaux qui composent l'interface entre deux phases, la mesure de la tension d'une goutte d'huile dans l'eau donne le même résultat que la mesure d'une goutte d'eau dans l'huile, tant que la composition des 2 phases est strictement identique. Nous avons donc choisi de générer une goutte d'EDI dans l'huile comme illustré dans la *Figure 44-a*, et non l'inverse, car

l'huile étant moins dense que l'eau (densité relative de 0,9), la goutte d'huile aurait eu tendance à flotter vers la surface de l'eau et ainsi perturber la mesure.

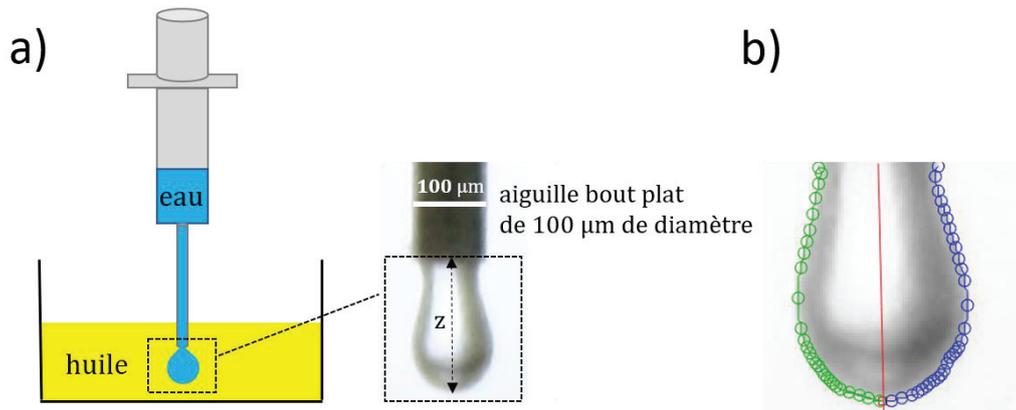


Figure 44: a) Schéma de la technique de la goutte pendante permettant la mesure de la tension superficielle avec une image de goutte au bout de la seringue prise par une caméra. b) Ajustement du contour de la goutte via Matlab pour déterminer la tension de surface.

La procédure consiste à former une goutte d'EDI au bout d'une aiguille à bout plat de 100 µm de diamètre, dans un réservoir d'huile et à enregistrer une image, à l'équilibre, juste avant que la goutte ne se détache. En déterminant la courbure  $C$  de la goutte par un ajustement de la forme réalisé via un script Matlab, comme illustré dans la *Figure 44-b*, nous pouvons extraire la tension de surface  $\gamma$  entre l'EDI et l'huile, en présence de surfactant, par l'équation :

$$\gamma C = \rho g z \quad (15)$$

Où  $\rho$  est la densité relative huile/eau,  $g$  la constante de gravité et  $z$  la longueur de la goutte comme défini *Figure 44-a*. La valeur moyenne mesurée pour la tension de surface de nos gouttes est  $\gamma \sim 0.05$  mN/m soit  $\sim 5 \cdot 10^{-5}$  N/m, valeur comparable avec celle trouvé dans la littérature pour les mêmes matériaux [104].

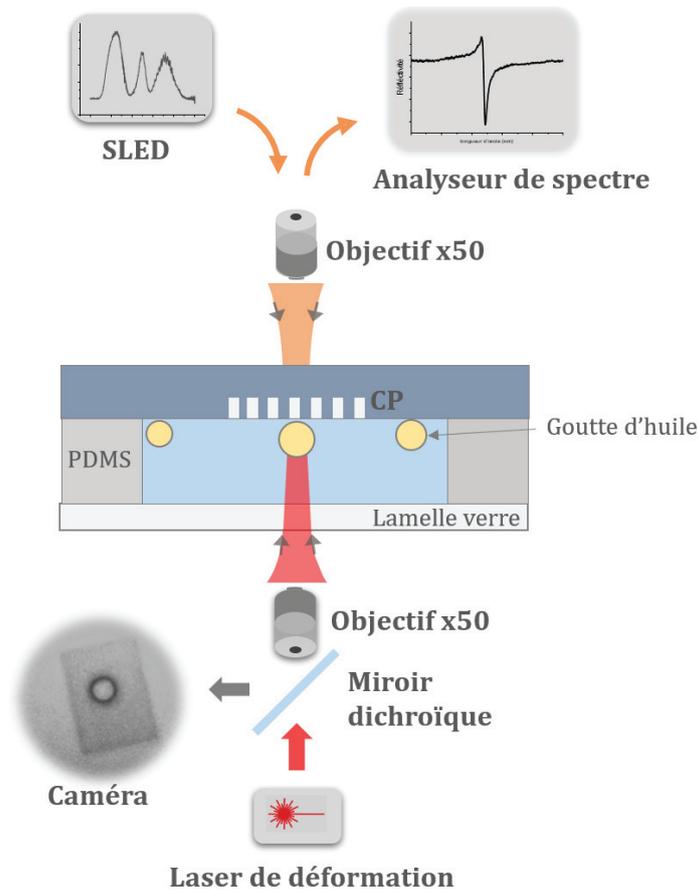
### 3.1.3 Déformation des microgouttes à l'aide de forces optiques

L'objectif de cette étude est de quantifier d'abord la déformation des microgouttes d'huile par les forces optiques exercées par une pince optique classique, via de l'imagerie classique. Pour cela nous avons dû modifier le montage optique présenté dans le Chapitre 2 pour prendre en compte la densité relative EDI/huile.

#### a. Conditions expérimentales

Comme explicité plus haut, les gouttes d'huile moins denses que l'eau ont tendance à flotter à la surface. Afin de ne pas introduire de forces supplémentaires, telle que la force d'Archimède, dans le problème qui nous intéresse, nous avons renversé la chambre optofluidique et le montage optique associé par rapport à celui présenté dans le

Chapitre 2, comme le montre la *Figure 45*. De cette manière, les gouttes flottent vers le substrat intégrant les CPs. Nous appelons cette configuration "cavité en haut". Nous utilisons dans ce montage une caméra scientifique "Andor" dans le visible, dont la taille des pixels fait  $6,5 \times 6,5 \mu\text{m}^2$ .

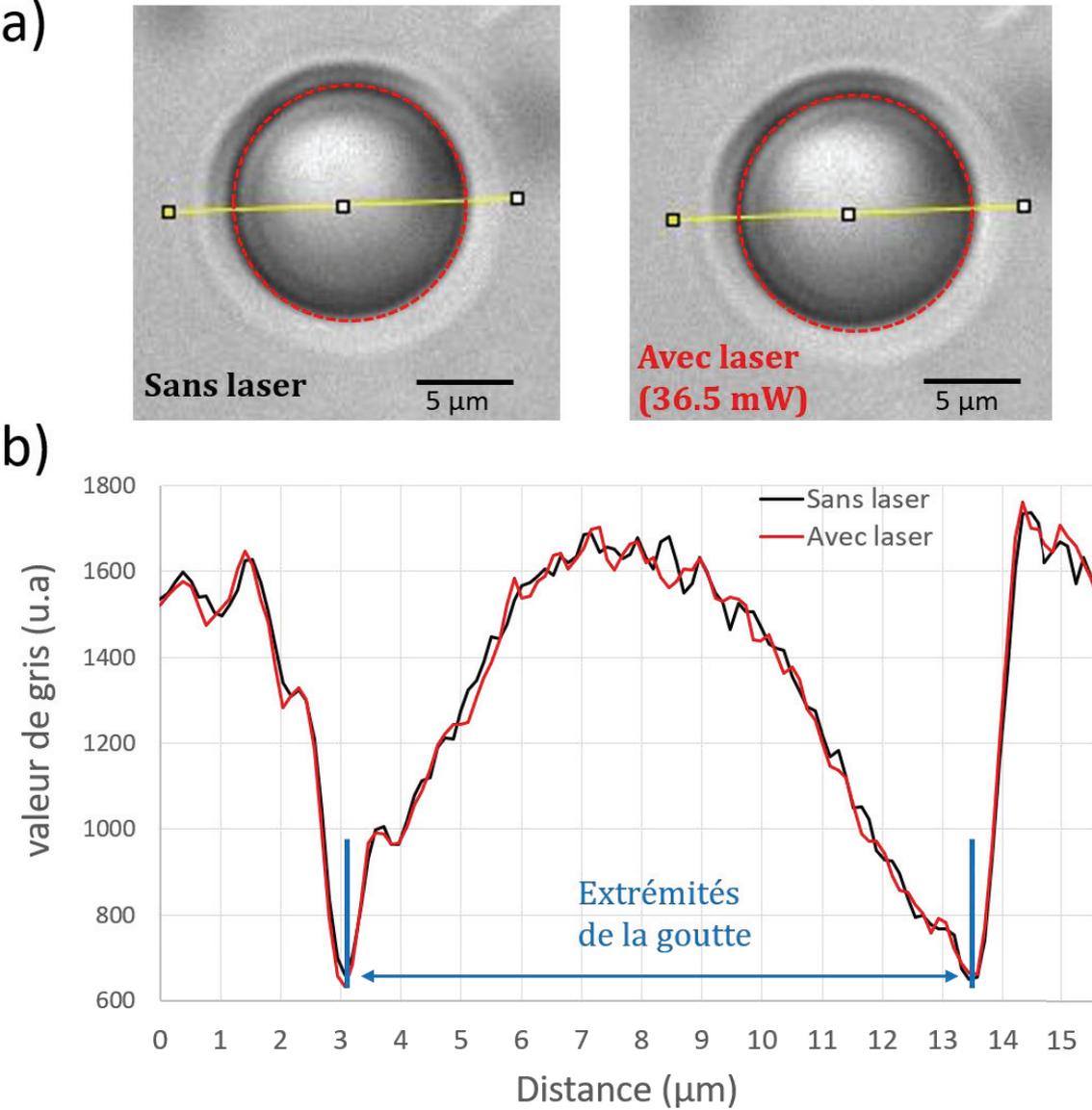


*Figure 45 : Schéma du montage expérimental de mesures optiques adapté aux microgouttes d'huile.*

## b. Piégeage et déformation des microgouttes par une pince optique classique

Dans cette expérience, nous utilisons le laser de déformation avec une longueur d'onde de 1320 nm et un diamètre de  $3,3 \mu\text{m}$  pour à la fois, piéger les microgouttes d'huile et les pousser vers le substrat, afin de les déformer grâce aux forces de radiation du laser. Nous faisons des enregistrements vidéo-microscopiques à 20 images/seconde de l'événement de déformation avec la caméra scientifique. La *Figure 46-a* présente deux images d'une même microgoutte d'huile de  $\sim 10 \mu\text{m}$  de diamètre, avant et après l'application du laser à la plus forte puissance accessible ( $\sim 36.5 \text{ mW}$ ). Le contour de la goutte est mis en évidence en pointillés rouges. Les niveaux de gris sont plus clairs proches du centre de la goutte et deviennent de plus en plus foncés à mesure qu'on se rapproche de l'interface de la goutte, à cause de l'éclairage perpendiculaire à la goutte sphérique. On peut ainsi distinguer les taches d'Airy [105] autour de la goutte.

Afin d'essayer de détecter l'éventuelle déformation de la goutte associée à l'application des forces optiques, les tailles de gouttes sont mesurées sur chacune des deux images et comparées. Pour estimer le diamètre de la goutte, le profil des niveaux de gris de chaque pixel présent le long d'une coupe traversant la goutte en passant par son centre (en jaune sur la *Figure 46-a*) est mesuré grâce au logiciel Image J®. Sur la *Figure 46-b*, on peut visualiser le profil des niveaux de gris en fonction de la position le long du segment. Les graphiques noir et rouge représentent respectivement les valeurs de niveaux de gris sur la goutte avant et après l'application du laser. A cause de la présence des taches d'Airy, il est difficile de savoir exactement où se trouve l'interface de la goutte. Dans une première approximation, nous estimons que l'interface entre l'eau et l'huile est là où le niveau de gris est le plus faible (gris le plus foncé), comme reporté sur *Figure 46-b*. En comparant les deux courbes noire et rouge, sans et avec laser respectivement, nous n'avons pas pu mesurer précisément de déformation.



*Figure 46: a) Photos d'une goutte d'huile avant et après l'application du laser de déformation. b) Le profil des niveaux de gris le long du segment jaune, correspondant aux deux images précédentes.*

Malheureusement la résolution du système d'imagerie utilisé (de centaines de nanomètres) n'est pas adaptée pour détecter des déformations trop faibles. Par contre, nous avons quand même choisi d'essayer de lire optiquement cette déformation en utilisant des cavités photoniques de facteur de qualité élevé ( $Q \sim 6\,000$ ) car cette approche permet des mesures bien plus fines que l'imagerie. Dans la section suivante, nous allons donc déformer les microgouttes au-dessus de la cavité photonique et étudier l'effet de la déformation sur le décalage de la résonance.

### 3.1.4 Etudes en fonction de la puissance du laser de déformation

Comme explicité au Chapitre 1, l'hypothèse sur laquelle repose notre approche est que la variation d'indice de réfraction induit par la déformation d'un objet au-dessus de cavité photonique se traduit par un décalage spectral spécifique de la résonance. Nous avons estimé d'après la section précédente que les déformations pouvaient être inférieures à la résolution de notre système d'imagerie et donc de l'ordre de la dizaine de nanomètres. Cependant, les CPs ont déjà démontré de leur grande sensibilité, puisqu'ils sont capables de détecter le couplage de molécules à leur surface (voir Section 1.2). Nous voulons donc évaluer leur capacité à mesurer ces déformations.

Dans cette perspective, nous avons piégé et positionné des microgouttes d'huiles sur la cavité avec le laser de déformation dans les mêmes conditions que précédemment, *i.e.* à une longueur d'onde de 1320 nm et une taille de faisceau de 3,3  $\mu\text{m}$ . Puis, nous avons appliqué à cette goutte des forces de radiation avec le même laser pour la déformer, selon la même procédure que la Section 3.1.3-b. En parallèle, nous mesurons le spectre de réflectivité de la cavité avec la source à large bande (SLED) dont la taille de faisceau de 3,3  $\mu\text{m}$ , est adaptée à la cavité de 5  $\mu\text{m}$  de côté utilisé. Dans la *Figure 47*, nous avons rapporté le spectre expérimental de réflectivité du CP, en fonction de la longueur d'onde pour la cavité vide et en présence d'une goutte soumise ou non aux forces de déformation optiques.

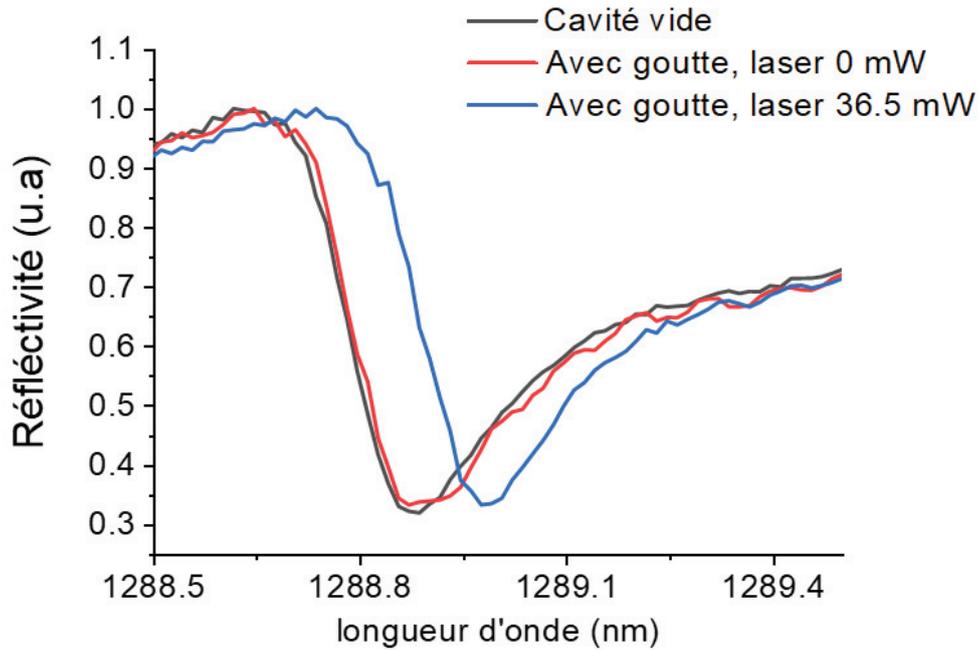


Figure 47: Spectre de réflectivité de la cavité associée avec une expérience de déformation de microgoutte d'huile dans de l'eau. La courbe noire illustre la résonance de notre cavité sans goutte, celle en rouge représente la résonance associée à la présence de la microgoutte d'huile dans la cavité sans laser, et la courbe bleue représente la résonance suite à l'application du laser à une puissance de 36.5 mW.

En l'absence d'une goutte dans la cavité, la longueur d'onde de résonance extraite avec l'ajustement de Fano à partir du spectre de réflectivité mesuré (courbe noire, *Figure 47*) se situe à 1288,81 nm. Lorsqu'une goutte de  $\sim 10 \mu\text{m}$  de diamètre est placée sur la cavité, la résonance se déplace très légèrement vers 1288,82 nm, comme le montre la courbe rouge. Soit un décalage dû à la présence d'une goutte au-dessus de la cavité,  $\Delta\lambda_1$  de 10 pm. Suite à l'application d'une puissance laser de déformation de 36,5 mW sur la goutte, la résonance se décale à 1288,92 nm (courbe bleue), soit un décalage supplémentaire  $\Delta\lambda_2$  de 100 pm par rapport au spectre rouge. Nous avons vérifié que dans nos conditions expérimentales, ce décalage ne peut pas être expliqué par l'excitation du laser de piégeage.

Nous avons répété cette mesure sur dix gouttes différentes en variant cette fois la puissance du laser appliqué à la goutte de 0 à 36,5 mW. La variation de la puissance laser nous permet d'évaluer si le décalage pourrait être lié à différents degrés de déformation de la goutte. L'expérience a été réalisée en augmentant puis en rediminuant la puissance laser pour évaluer la précision et la reproductibilité des mesures. Le spectre de réflectivité est donc mesuré en présence d'une cellule et la longueur d'onde de résonance estimée par un fit de Fano, pour chaque puissance laser appliquée. Le décalage de la résonance est ensuite calculé en prenant la résonance de la cavité vide comme référence. Les résultats sont représentés dans la *Figure 48*.

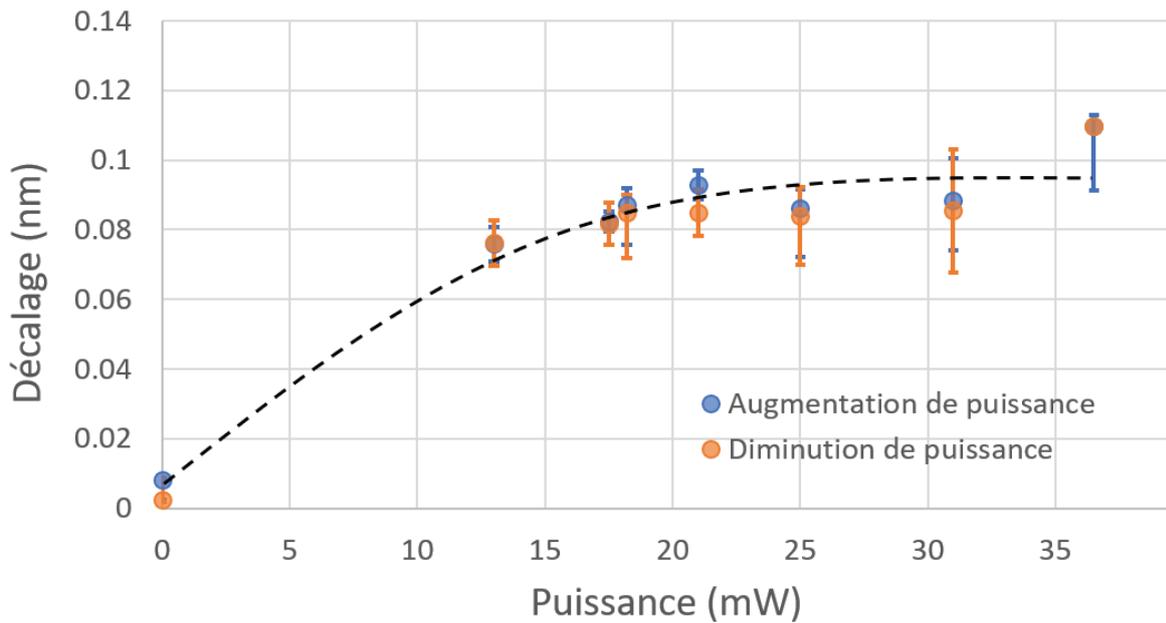


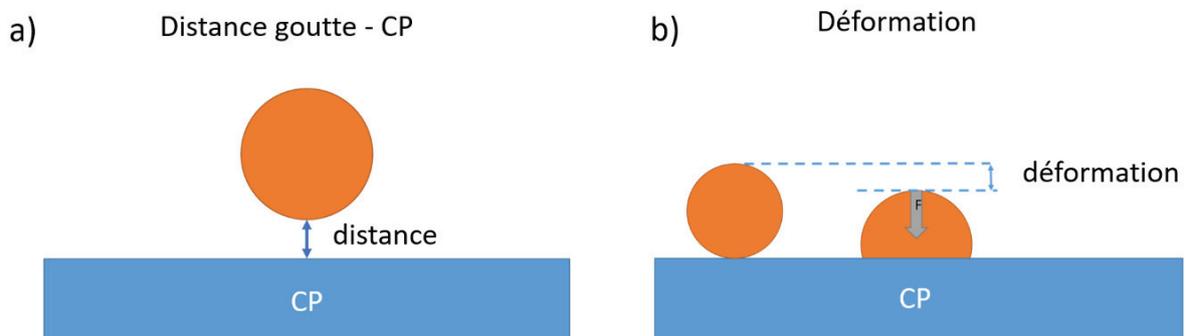
Figure 48: Décalage de la résonance du CP estimés sur 10 microgouttes d'huile, en fonction de la puissance laser appliquée, lorsque la puissance est augmentée (points bleus) et rediminuée (points oranges). Les données sont représentées en terme de médiane et les barres d'erreur représentent les quartiles. La courbe pointillée représente un guide pour les yeux.

Le graphique montre les décalages de la résonance (par rapport à la cavité vide), en fonction de la puissance du laser de déformation, en présence des microgouttes de  $\sim 10 \mu\text{m}$  de diamètre. Nous voyons clairement l'accord entre les mesures de puissance croissantes et décroissantes, ce qui souligne l'absence d'hystérésis dans les mesures et leur bonne reproductibilité. On peut noter ici que les microgouttes flottent naturellement vers la surface de la cavité, les données à la puissance de 0 mW, correspondent à la présence de des gouttes à l'équilibre sur la surface du CP, sans laser. Ce point présente un décalage médian de la résonance de  $\sim 10 \text{ pm}$  vers le rouge (les plus grandes longueurs d'onde). Ce décalage s'accroît fortement jusqu'à  $\sim 80 \text{ pm}$  lorsque la puissance du laser est augmentée à 18 mW, jusqu'à atteindre un plateau autour de  $\sim 90 \text{ pm}$ . Les écarts observés autour de cette valeur moyenne sont attribués à la légère variabilité de taille et de position des microgouttes sur le CP. Ce comportement pourrait s'expliquer par une augmentation de la déformation de la goutte, en réponse à l'augmentation de la puissance de la pince optique et cela jusqu'à un point de saturation où la goutte ne pourrait plus se déformer, limitée par la tension de surface. Cependant, à cause de la limitation de notre système d'imagerie, qui ne permet pas de regarder ces déformations, les décalages spectraux observés ne peuvent pas être directement reliés à la déformation de la micro-goutte.

Nous pouvons remarquer dans ces mesures que le décalage lié à la présence de la goutte d'huile au-dessus de la cavité à 0 mW,  $\Delta\lambda_1$ , est effectivement très faible par rapport au décalage correspondant à l'application du laser de déformation. Ce faible décalage  $\Delta\lambda_1$  est dû à une faible interaction entre la goutte et le mode optique de la cavité, qui peut être expliqué par le fait que la goutte se trouve initialement à une certaine distance du

champ évanescent de la cavité. Cette distance goutte – cavité pourrait être due à une couche de lubrification qui se forme sur la surface de silicium intégrant les cristaux photoniques, ce qui empêche la goutte de s'approcher plus près de la cavité. Lorsque nous allumons le laser, nous forçons la goutte vers la cavité, en plus de la déformer, ce qui augmente l'interaction entre la goutte et le mode optique de la cavité, et explique par conséquent le déplacement remarquable de la résonance.

Afin de clarifier ces résultats expérimentaux, nous avons étudié numériquement l'interaction d'une goutte d'huile avec la cavité photonique. L'étude numérique par la méthode des éléments finis, menée par Taha Benyattou, étudie deux aspects : (i) l'effet de l'approchement de la goutte d'huile vers la cavité (illustré par la *Figure 49-a*), et (ii) la déformation latérale de la goutte en contact avec la cavité (*Figure 49-b*) sur le décalage de résonance.



*Figure 49 : Schéma illustrant les deux origines de la transduction optique avec un objet déformable. a) la distance goutte – CP et b) la déformation de goutte sur le CP.*

La *Figure 50-a* montre le décalage de la résonance induit par l'approchement de la goutte d'huile vers la surface de la cavité. Le décalage est très faible lorsque la goutte est à plus de  $\sim 200$  nm de la surface. Ceci est lié à l'étendue de la partie évanescente du mode optique qui peut s'étendre jusqu'à 200 nm environ de la surface. Au-delà, l'interaction entre le mode de cavité et la goutte est négligeable. En-deçà, le décalage augmente exponentiellement en s'approchant de la surface pour atteindre 450 pm lorsque la goutte touche la surface de la cavité. Nous avons représenté dans la *Figure 50-b*, le décalage de la résonance dû à la déformation latérale de la goutte en contact avec la surface de la cavité. Comme le montre le graphique, le décalage augmente linéairement avec la déformation de la goutte entre 0 et 100 nm, avec une pente de 3 pm de décalage spectral pour 1 nm de déformation. Cette pente peut être considérée comme le coefficient de sensibilité théorique de la cavité, à la déformation de la goutte.

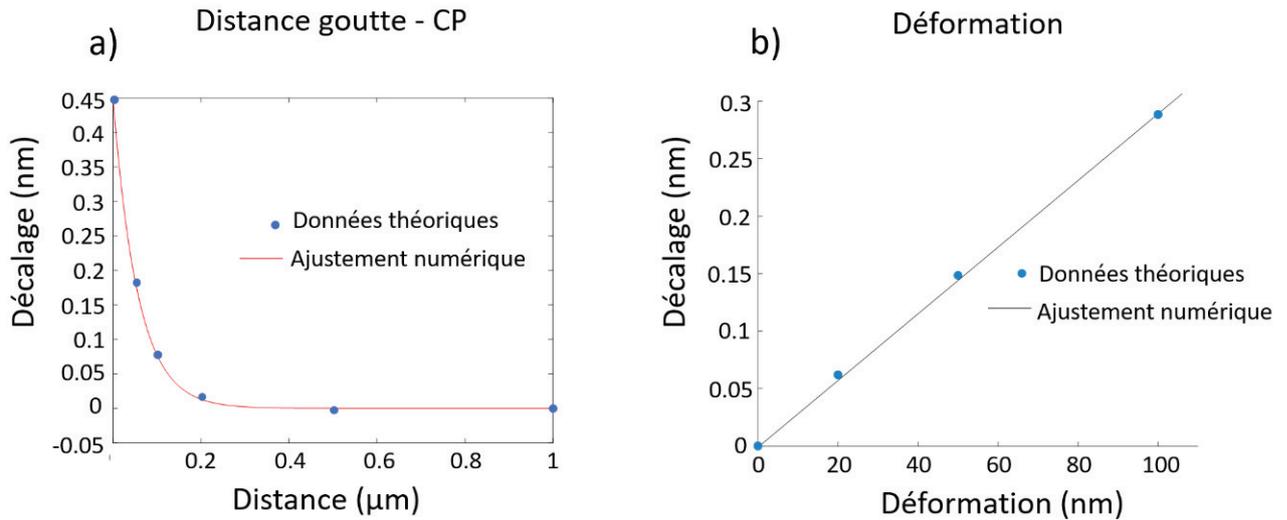


Figure 50: Étude théorique du décalage de la résonance d'une cavité de  $5 \mu\text{m}$  en fonction de : a) la distance goutte - CP, et b) la déformation de la goutte sur la cavité. Le diamètre de la goutte est de  $10 \mu\text{m}$ .

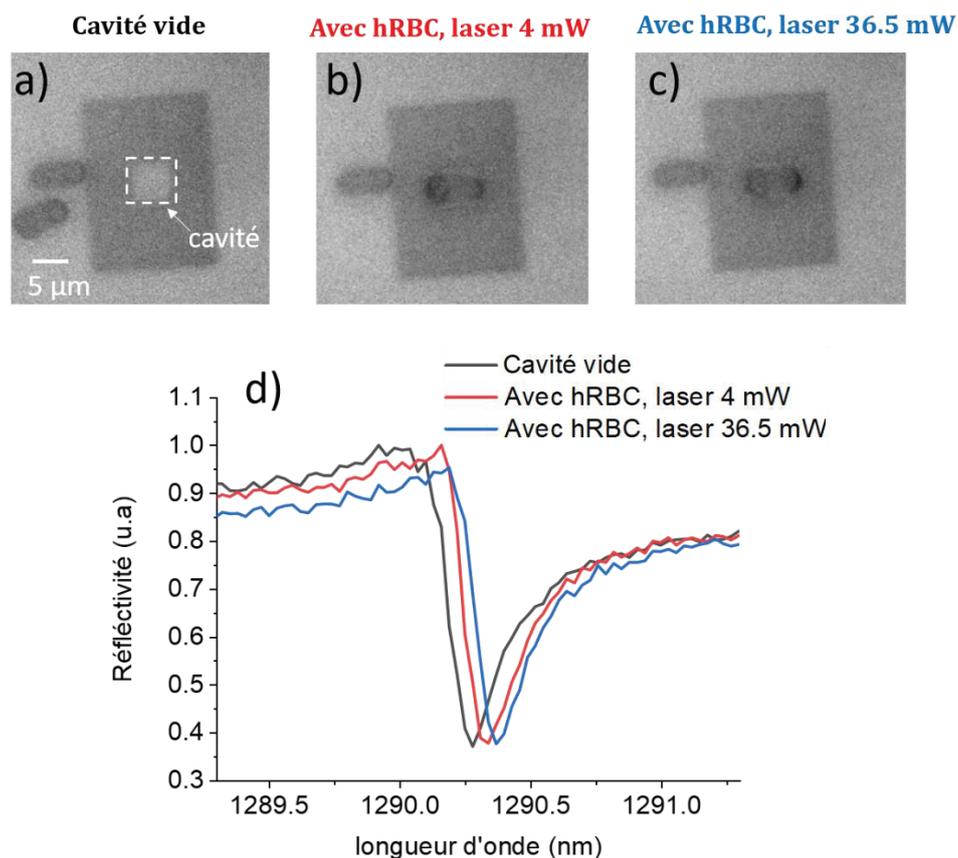
En comparant les résultats de cette étude théorique avec les résultats expérimentaux présentés dans la section précédente, nous pouvons interpréter le décalage expérimental de la résonance, représenté dans la *Figure 48*. L'étude statistique montre que le décalage expérimental médian, induit par la présence d'une goutte d'huile au-dessus de la cavité, sans application de laser, est  $\sim 10 \text{ pm}$ . Ceci correspond à une distance goutte - cavité de  $\sim 200 \text{ nm}$  (d'après la *Figure 50-a*). Le décalage expérimental moyen augmente ensuite avec la puissance laser pour atteindre  $\sim 90 \text{ pm}$  sur la *Figure 48*. Trois possibilités pourraient expliquer l'amplitude de ce décalage : (i) soit il correspond à un rapprochement de la goutte jusqu'à  $\sim 100 \text{ nm}$  de la surface, (ii) soit à une déformation de la goutte de  $\sim 40 \text{ nm}$  au-dessus de la cavité, ou encore (iii) à la combinaison d'un rapprochement et d'une déformation. Comme la résolution du système d'imagerie n'est pas assez performant pour imager une déformation des gouttes de l'ordre de la dizaine de nm, nous n'avons pas pu identifier l'origine de ces décalages spectraux lors de l'application du laser.

A ce stade, nous avons deux options, soit améliorer la qualité de l'imagerie pour mesurer si possible des déformations de l'ordre de la dizaine de nanomètres, soit examiner directement les globules rouges dont les déformabilités sont plus importantes et dont la déformation résultante devrait être plus facile à détecter. Nous avons opté finalement pour l'étude des globules rouges.

## 3.2 Etude sur les globules rouges sains

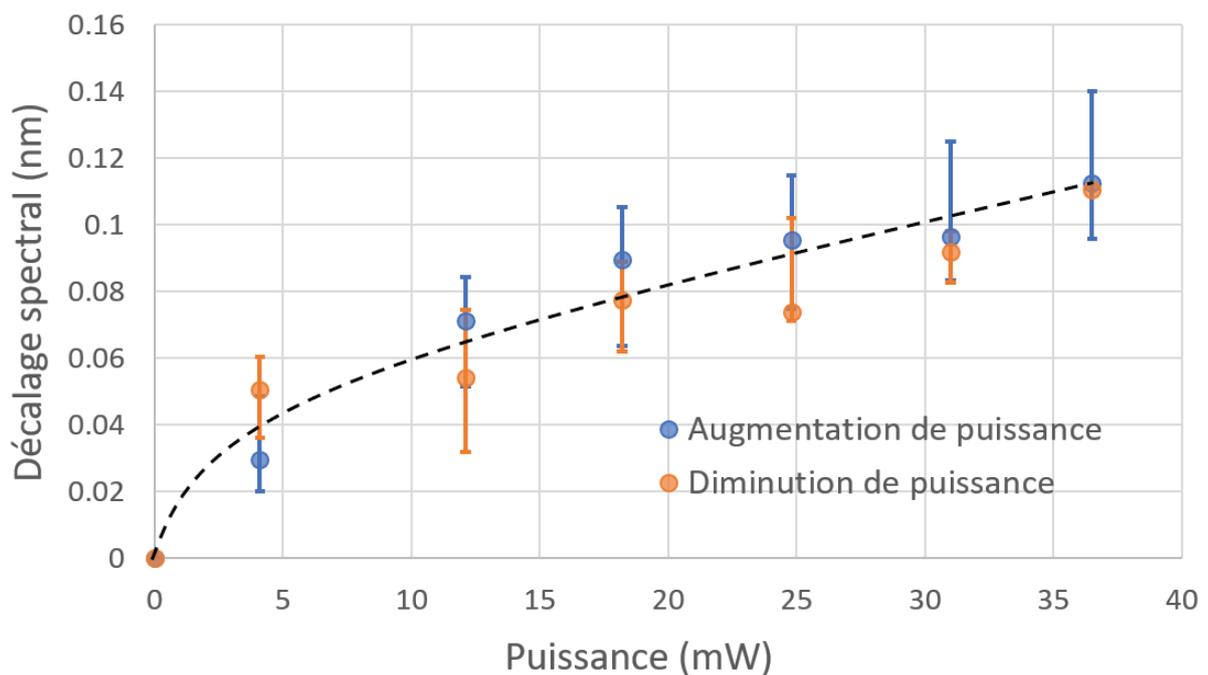
Dans ces expériences, nous utilisons le même montage que pour les gouttes d'huile (voir *Figure 45*) ; le laser de déformation sert à pousser les RBCs suspendus dans du PBS 1X, vers le substrat contenant les CPs, les positionner sur la cavité photonique et enfin à les déformer de manière contrôlée grâce aux forces de radiation. La configuration utilisée est la même que pour les gouttes d'huile. Dans la *Figure 51*, nous avons reporté les images prises avec la caméra scientifique illustrant un RBC sain sur une cavité de 5  $\mu\text{m}$  de côté, pour différentes puissances du laser de déformation. Les spectres de réflectivité associés sont également représentés en fonction de la longueur d'onde.

Nous avons remarqué que le globule rouge avait systématiquement tendance à tourner et se positionner sur la tranche, après avoir été pris dans la pince optique. Ce phénomène, déjà rapporté dans la littérature sous le terme de "repli du RBC dans un piège optique"[106], [107], est attribué au moment des forces optiques générées sur le globule rouge de forme biconcave.



*Figure 51 : Spectre de réflectivité de la cavité. La courbe noire illustre la résonance sans cellule, celle en rouge représente la résonance associée à la présence d'un hRBC dans la cavité avec un laser de puissance 4 mW, et la courbe bleue représente la résonance suite à l'augmentation de la puissance laser à 36,5 mW.*

La première mesure de réflectivité a été effectuée dans le cas d'une cavité vide - dont le facteur de qualité a été évalué à  $Q \sim 6\,000$  dans la solution biologique - comme le montre la *Figure 51-a*, et correspondant au spectre noir de la *Figure 51-d* ; elle permet d'évaluer la longueur d'onde de la résonance du CP sans cellule, à 1290,218 nm. Puis un globule rouge sain (hRBC) est positionné sur la cavité, avec une puissance laser de 4 mW (*Figure 51-b*). Cela correspond à la puissance minimale nécessaire pour maintenir la cellule contre la cavité et compenser la force gravitationnelle qui attire la cellule au fond du réservoir. Le spectre de réflectivité correspondant (courbe rouge, *Figure 51-d*) est enregistré permettant de mesurer la résonance, située à 1290,268 nm, soit un décalage de  $\sim 50$  pm. Nous augmentons ensuite la puissance du laser jusqu'à 36,5 mW pour déformer le RBC (*Figure 51-c*), ce qui a pour effet de décaler encore la résonance de  $\sim 44$  pm, comme indiqué par la courbe bleue dans la *Figure 51-d* (soit 1290,312 nm). Nous avons effectué cette mesure sur dix hRBCs avec différentes puissances laser afin de recueillir des informations statistiques sur la réponse spectrale de la cavité. Les décalages spectraux ainsi mesurés sont reportés sur la *Figure 52* ;



*Figure 52: Décalage de la résonance du CP estimées sur 10 hRBCs, en fonction de la puissance laser appliquée, lorsque la puissance est augmentée (points bleus) et rediminuée (points orange). Les données sont représentées en termes de médiane et les barres d'erreur représentent les quartiles. La courbe pointillée représente un guide pour les yeux.*

Les mesures ont été faites avec des puissances laser croissantes puis décroissantes, comme le montre les points bleus et oranges respectivement. Nous avons calculé les décalages spectraux, par rapport au point de référence à 0 mW qui correspond à la résonance de la cavité vide, *i.e.* en l'absence de hRBCs. En présence d'un hRBC au-dessus

de la cavité, avec une puissance laser de 4mW, la résonance se décale de 30 pm en moyenne vers le rouge. Puis elle continue à se décaler progressivement avec la puissance du laser pour atteindre  $\sim 110$  pm à 36,5 mW. Les barres d'erreur (qui représentent les quartiles) plus importantes pour les cellules biologiques que pour les microgouttes sont attribuées aux variations biologiques entre les hRBCs qui peuvent avoir un « âge » différent et donc un taux d'hydratation qui peut varier, impactant par la même la même concentration en hémoglobine, la déformabilité cellulaire et l'indice de réfraction globale de la cellule. Le test statistique de Kolmogorov-Smirnov [108] calculé via le logiciel Statext (V3.2.1), montre que, tout comme pour les microgouttes d'huile, il n'y a pas de différences statistiques entre les décalages spectraux lors de l'augmentation et de la diminution de la puissance laser (la probabilité de recouvrement de deux mesures  $p > 0.05$ ).

Malgré l'utilisation de hRBCs dont la déformabilité est bien supérieure à celle des microgouttes d'huile, nous n'avons toujours pas été en mesure de visualiser via l'imagerie, de déformation des objets *in situ* sur la cavité photonique. Nous ne pouvons donc toujours pas corrélérer directement le décalage de la résonance du CP observé lors de l'application des forces optiques, aux déformations. De plus, dans la configuration "cavité vers le haut" du banc optique que nous utilisons, la gravité attire les cellules vers le fond de la chambre optofluidique, et donc en appliquant une force optique (avec le laser) sur la cellule, les décalages de résonance pourraient être dus soit (i) à un rapprochement des globules rouges de la surface du CP, soit (ii) à une déformation de la cellule, ou encore (iii) la combinaison de ces 2 évènements.

Pour mettre en évidence l'origine du décalage de la résonance, nous proposons de comparer les décalages spectraux entre des globules rouges sains, et des globules rouges artificiellement rigidifiés. En effet, ces deux types d'échantillon sont identiques en tout point puisque le second est obtenu par traitement pharmacologique du premier. La seule différence entre ces deux échantillons est leur déformabilité. Si le décalage spectral à forte puissance laser a pour origine le rapprochement de la cellule, nous mesurerons des décalages de la résonance, comparables entre les cellules déformables et rigides. Si l'origine est due à une déformation de la cellule, alors les décalages spectraux seront différents.

### 3.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons décrit l'objet simplifié avec lequel nous avons effectué nos premières expériences, à savoir des microgouttes d'huile minérale légère dans l'eau, stabilisées au TWEEN 80 à 0.032 g/mL. Les gouttelettes ont été produites à une taille comparable à celle des RBCs dans le système microfluidique dit de "Flow focusing".

Nous avons mesuré une tension de surface des gouttes de  $5 \cdot 10^{-5}$  N/m avec la méthode de la goutte pendante, ce qui correspond à des mesures rapportées dans la littérature pour des matériaux équivalents. Puis, nous avons essayé de mesurer les déformations induites par une pince optique classique grâce à la résonance des CPs, puisque les déformations étaient trop petites (dizaines de nm) pour notre système de visualisation. Pour cela, nous avons dû modifier notre banc optique afin de l'adapter aux mesures de réflectivité de la cavité photonique en présence de gouttes d'huile plus légère que le milieu suspendant ("configuration cavité en haut").

L'un des résultats les plus importants de ce chapitre est la démonstration expérimentale du décalage de la résonance en présence de gouttes d'huile au-dessus de la cavité. Nous avons en effet démontré, par une étude statistique sur dix gouttes d'huile, un décalage de la résonance  $\Delta\lambda_1 \sim 10$  pm attribué à la présence d'une goutte sur la cavité, sans laser. Ce décalage augmente progressivement et sature autour de  $\sim 90$  pm avec l'application d'une force optique sur la goutte via un laser dont la puissance varie de 13 à 36,5 mW. L'étude théorique de l'origine du décalage optique observé révèle que la goutte d'huile est initialement située à une distance de  $\sim 200$  nm de la cavité. Par contre, nous n'avons pas été en mesure d'attribuer le décalage spectral en fonction de la puissance laser à l'une ou à l'autre des 3 hypothèses : (i) l'approchement de la goutte vers la cavité, (ii) la déformation de la goutte au-dessus de la cavité, ou bien (iii) une combinaison des 2 événements.

Nous nous sommes donc retournés vers des objets plus mous en espérant que les déformations résultantes seraient suffisantes pour être visualisées avec notre système d'imagerie. Pour cela, nous avons étudié les décalages spectraux associés à l'application de forces optiques de plus en plus importantes sur des globules rouges sains, au-dessus de la cavité. Les mesures effectuées sur dix hRBCs ont montré un décalage progressif de la résonance de  $\sim 30$  pm à 110 pm quand la puissance laser est augmentée de 4 mW à 36.5 mW sur le RBC. Malheureusement les déformations associées n'ont pas pu être plus facilement détectées.

De plus, la configuration "cavité vers le haut" du banc optique impose de devoir appliquer une puissance minimale de 4 mW afin de maintenir la cellule à la proximité immédiate de la surface du CP, en raison de la gravité qui attire les cellules vers le fond de la chambre optofluidique. Or nous ne pouvons pas être sûr que la cellule n'est pas déjà déformée lorsqu'elle est soumise à une telle puissance. Afin de partir d'un état d'équilibre, il faudrait pouvoir faire une mesure de la résonance pour une cellule « au repos » sur la cavité, *i.e.* sans laser. Pour y parvenir, nous avons retravaillé le montage optique pour aboutir au montage dans la configuration "cavité vers le bas" qui a été décrite au Chapitre 2 (voir Section 2.4). Nous avons également travaillé à l'amélioration de la résolution et la qualité de l'imagerie afin de pouvoir observer les déformations des RBCs et les corrélérer avec les décalages spectraux mesurés.

Enfin, toutes les expériences que nous avons menées avec les hRBCs ont révélé une tendance des cellules à adhérer de manière non spécifique à la surface des CPs, imposant ainsi un nettoyage quasi systématique de la surface entre chaque mesure. Ce qui rend très difficile la réalisation d'une étude statistique de la mesure de déformabilité. Dans le chapitre suivant, nous abordons donc ce problème d'adhésion non spécifique des RBCs sur la surface des substrats intégrant des cavités photoniques, ainsi que les efforts déployés dans cette thèse pour le résoudre.





## Adhésion non spécifique de globules

### Sommaire

---

4.1 Globules en suspension dans une solution de phosphate tamponnée (PBS) - Problème d'adhésion sur les surfaces .....	83
4.2 Approches initiales de la résolution du problème .....	84
4.2.1 Techniques de passivation de surface.....	84
a. Traitement avec l'albumine de sérum bovin.....	84
b. Silanisation de surface .....	85
4.2.2 Modification de la solution tampon.....	86
a. Globules rouges dans un milieu isotonique de sucre .....	87
b. Variabilité intra-donneur.....	88
c. Variabilité inter-donneurs. ....	89
4.2.3 Bilan.....	90
4.3 Nouvelle approche .....	91
4.4 Conclusion. ....	93

---

Comme mentionné à la fin du chapitre précédent, nos études de déformabilité des globules rouges (RBCs) avec la cavité photonique ont révélé que les cellules, suspendues dans une solution de phosphate tamponnée adhèrent à la surface des cristaux photoniques (CPs). Dans ce chapitre, nous décrivons ce problème technique auquel nous avons été confrontés dans cette thèse. Nous présentons ensuite les différentes approches qui ont été étudiées pour résoudre ce problème et nous décrivons la démarche qui a permis d'aboutir à la nouvelle stratégie qui a été développée pour la résolution du problème.

## 4.1 Globules rouges en suspension dans du PBS. Problème d'adhésion sur les surfaces.

Dans la première partie de notre étude discutée au Chapitre 3, les globules rouges (RBCs) étaient suspendues dans une solution de phosphate tamponnée (ou PBS 1X) qui est fréquemment utilisée comme milieu de suspension dans les études sanguines [109]. Il fournit un milieu isotonique et une formulation optimale pour les expériences de biologie cellulaire, garantissant le maintien de la plupart des propriétés physiologiques des RBCs, telles que leur morphologie et leur déformabilité. C'est donc naturellement que nous avons commencé nos études expérimentales en utilisant le PBS comme milieu de suspension pour les RBCs.

Cependant, nous avons remarqué que peu de temps après avoir rempli la chambre optofluidique avec la suspension de cellules biologiques, les RBCs adhéraient à la surface des CPs. Une observation typique de ce problème est rapportée sur la *Figure 53*. On y voit un RBC suspendu dans du PBS, sédimenté à plat sur la surface du CP dans la configuration "cavité vers le bas" qui a été décrite au Chapitre 2 (voir Section 2.4). Dans cette solution isotonique, le RBC présente une forme discocyte normale, comme on peut le voir *Figure 53-a*. La pince optique créée par le laser focalisé a un diamètre de spot de  $3,33 \mu\text{m}$ . Dans la *Figure 53-b*, nous allumons le laser pour attraper la cellule dans la pince optique, dont la position est identifiée par la croix verte. Celle-ci tourne et se positionne sur la tranche sous l'effet de la force optique, comme illustré sur la *Figure 53-b* et discuté précédemment. Ensuite, nous déplaçons le laser en vue de bouger la cellule sur le substrat, mais bien qu'elle se déforme, se replie et pivote pour essayer de suivre le mouvement de la pince, elle reste attachée à la frontière du CP, comme le montre la *Figure 53-c*.

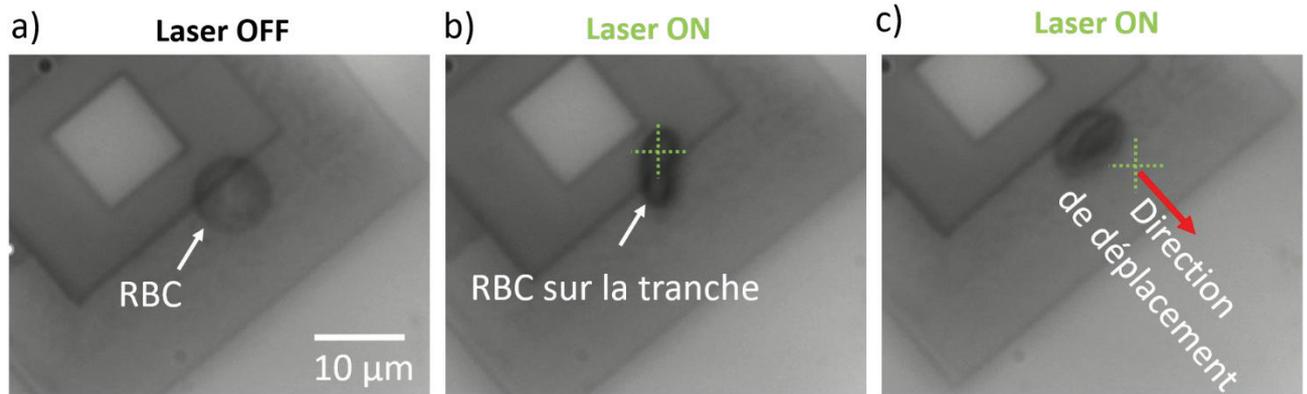


Figure 53 : Images issues d'une séquence vidéo-microscopique mettent en évidence l'adhésion des RBCs sur la surface d'un CP. a) Image de la position initiale d'un RBC à plat sans laser. b) Image avec piégeage de la cellule dans la pince optique (Laser ON) et c) image de la cellule qui n'arrive pas à suivre lorsque la pince optique est déplacée. La croix pointillée verte indique la position du piège optique.

Nous avons répété l'expérience sur plusieurs dizaines de globules rouges situés à différentes positions sur le substrat par rapport aux CPs (dans la cavité, sur la barrière photonique, en dehors des CPs, etc...), mais nous n'avons pu déplacer aucune cellule avec le laser. Cette observation, qui est typique du comportement des RBCs quel que soit la puce photonique utilisée, le donneur ou la « fraîcheur » de la solution, met en évidence l'adhésion de globules rouges en suspension dans du PBS, sur le substrat de silicium. Ce problème d'adhésion rend toute étude de la mesure de la déformabilité de RBCs très difficile, voire impossible à effectuer. Nous avons donc testé plusieurs approches pour résoudre ce problème.

## 4.2 Approches initiales de la résolution du problème

### 4.2.1 Techniques de passivation de surface

#### a. Traitement avec l'albumine de sérum bovin

Afin de limiter l'interaction entre les RBCs et les surfaces de la chambre optofluidique, nous essayé de recouvrir la surface par une couche d'albumine de sérum bovin (BSA) [110]. La BSA est une protéine naturellement présente dans le sang qui est très utilisée pour passiver les surfaces et ainsi limiter l'adhésion, grâce à d'une part sa faible interaction avec les autres protéines - dont celles présentes sur la membrane des RBCs - et d'autre part à son fort pouvoir couvrant. Pour ce faire, les CPs sont plongés dans une solution de PBS 1X contenant de la BSA. Nous avons testé différentes concentrations de BSA dans la solution de PBS, allant de 0,02% à 1% w/w. Pour chaque concentration, nous avons testé plusieurs temps d'incubation de 10 à 120 minutes. Après absorption, la

suspension de RBCs suspendues dans le PBS est introduite dans la chambre optofluidique et l'expérience est répétée.

Malgré la présence de BSA (même aux fortes concentrations), les RBCs adhèrent à la surface. Nous avons supposé que ce résultat peut être lié à un phénomène de désorption de BSA une fois en présence de la solution biologique qui ne contenait pas. Même en maintenant durant les expériences, dans le PBS contenant les cellules, la concentration en BSA utilisée pour passiver les CPs, nous n'avons pas réussi à diminuer l'adhésion non spécifique des RBCs. Nous n'avons pas testé des concentrations de BSA supérieur à 1 % w/w de peur de boucher les trous nanométriques des cristaux photoniques.

Nous avons également essayé de passiver la surface avec d'autres protéines, par exemple du dextran, mais nous n'avons pas obtenu de meilleurs résultats concernant l'adhésion.

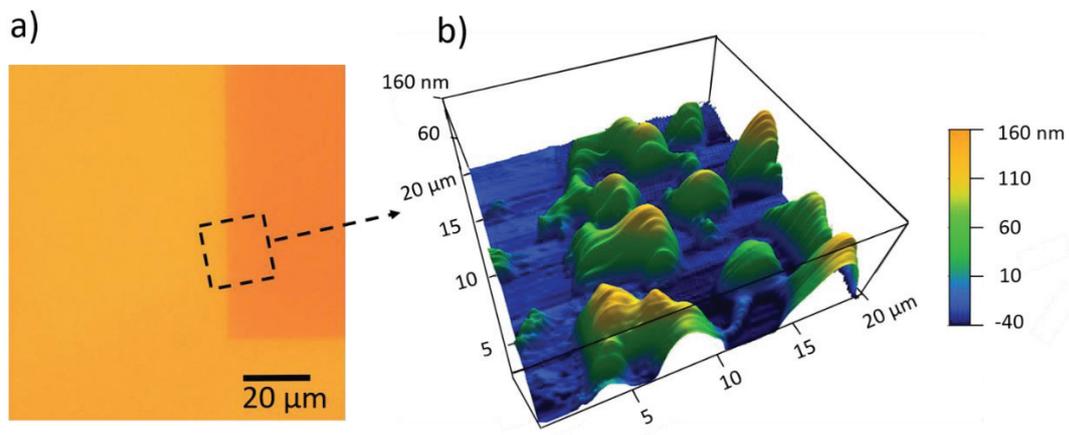
## b. Silanisation de surface

Une autre solution pour couvrir la surface de l'échantillon des CPs a consisté à greffer une couche de molécules de silane. Nous avons essayé d'utiliser le "Trichloroperfluorosilane" [111] disponible au laboratoire. Pour ces tests, nous avons utilisés des CPs fabriqués par lithographie UV dans l'équipe i-LUM à l'INL, dans le cadre de la thèse de Nicolas Gaignebet [79]. Le choix s'est porté sur ces CPs, car on pouvait les « sacrifier » si les résultats impactaient la qualité de détection des puces photoniques. De plus, ils ont été gravés dans un substrat SOI ayant subi le même processus de gravure ionique que nos échantillons et présentent donc la même chimie de surface.

Le procédé de silanisation commence par un nettoyage en oxydant l'échantillon dans un four à 300°C pendant 1 heure, puis en le désoxydant pendant 1 minute dans une solution d'oxyde gravant tamponné (BOE - buffered oxide etch en anglais) à 12,5 % diluée 20 fois dans de l'éthanol, pour éliminer les impuretés de surface. La surface est ensuite oxydée dans un ozoneur sous flux d'oxygène pendant 30 min pour l'enrichir en liaisons Si-OH (fonctions silanol), sur lesquelles seront fixées les molécules de silane. Après la préparation de surface, le silane est greffé par adsorption en phase gazeuse. Elle consiste en la vaporisation des molécules de silane liquide sous cloche à vide à 160 mbar et à température ambiante pendant 3 heures. On dépose ainsi une couche de silane sur la surface.

La surface nano-structurée du CP est initialement hydrophobe après les étapes technologiques de fabrication [112]. Elle devient fortement hydrophile après traitement le passage à l'ozoneur, puis redevient hydrophobe après silanisation [113]. Cela rend difficile la pénétration de la solution dans les trous nanométriques du CP. Le traitement de surface à la BSA, est donc nécessaire pour rendre la surface hydrophile et assurer une bonne pénétration du tampon dans les trous. Pour cela, nous avons immergé l'échantillon de CPs dans une mixture de PBS et BSA à 0.02% w/w pendant 10 minutes. Puis nous avons rempli la chambre optofluidique avec l'échantillon biologique (RBCs en suspension dans du PBS 1X). Le test d'adhésion avec des pinces optiques classiques

montre qu'aucun globule n'adhère à la surface, et qu'ils ont une forme biconcave normale. Nous avons ensuite voulu étudier la topologie de la surface du CP à l'AFM (mesures réalisées par Marie-Charlotte Audry de l'INL) et nous assurer de sa propreté. En effet, dès que les CPs étaient silanisés, des traces semblaient apparaître sur sa surface. Les résultats obtenus à l'AFM sont présentés dans la *Figure 54*.



*Figure 54 : a) Image microscopique du substrat au bord d'un CP dans l'eau. La partie plus foncée représente le CP. b) L'étude topologique réalisée à l'AFM illustre la présence de résidus à la surface du cristal photonique.*

Nous présentons dans la *Figure 54-a* une image microscopique de la surface d'un échantillon de CPs dans l'eau. L'image montre un bord du CP dont la surface semble être dépourvue de toute impureté. Cependant, une étude topologique réalisée à l'AFM (dans l'eau) révèle l'existence de résidus, dont la hauteur peut atteindre plus de 160 nm, et qui s'étendent sur la surface et bouchent ainsi les trous des cristaux photoniques (*Figure 54-b*). Nous associons ces résidus au "Trichloro-perfluorosilane" utilisé pour silaniser la surface. En effet, cette molécule possède 3 sites fonctionnels et peut par conséquent se polymériser sur la surface. Pour s'en assurer, il faudrait toutefois réaliser des mesures par spectrométrie photoélectronique X (XPS). Il faudrait aussi pouvoir tester avec une molécule de silane qui ne possède qu'un seul site fonctionnel. Cependant nous n'avons pas pu avoir accès à une telle molécule dans le temps de cette thèse. La silanisation résout le problème de l'adhésion des RBCs, mais la présence de ces résidus à la surface peut limiter fortement leurs interactions avec le mode optique de la cavité (qui s'étend jusqu'à 200 nm de la surface). Il a donc fallu chercher une autre solution.

#### 4.2.2 Modification de la solution tampon

Nous avons également cherché à modifier la solution de suspension des RBCs, soit en ajoutant du surfactant typiquement de l'acide pluronique à la suspension de globules, soit en remplaçant le tampon par une autre substance comme le sucrose. L'ajout de surfactant à la solution des globules n'a pas montré de résultats remarquables dans la résolution du problème d'adhésion. Nous ne rentrons donc pas dans les détails de cette

approche. Dans la section suivante, nous décrivons les résultats obtenus pour la suspension des RBCs dans une solution de sucre.

### a. Globules rouges dans un milieu isotonique de sucre

Le problème de l'adhésion non spécifique des RBC (suspendus dans du PBS) sur une surface de verre [114] et une surface de verre revêtue de silicium [115], a déjà été rapporté dans la littérature. De plus, il existe une autre étude qui rapporte un problème d'adhésion similaire sur une surface de guide d'ondes en pentoxyde de tantale [116].

L'hypothèse proposée est que la présence d'ions dans le PBS favorise l'adhésion des cellules sur les surfaces. Pour éviter cela, ils suggèrent que le milieu de suspension PBS 1X peut être remplacé par un milieu isotonique de sucre, dont la solution contient des molécules de sucre exemptes d'ions. Dans cette section, nous examinons l'effet de l'utilisation de sucre comme tampon de suspension des RBCs, sur leur adhésion, ainsi que sur leur morphologie.

Dans la première expérience, le test d'adhésion des RBCs en suspension dans du sucre, montre qu'aucun globule n'adhère sur la surface. Cependant nous avons remarqué que les globules ne se présentent pas sous leur forme discocyte normale mais plutôt sous une forme d'échinocyte. Ceci est dû à l'osmolarité du milieu qui n'est pas exactement ajusté à la concentration en ion à l'intérieur des cellules, et qui peut être corrigé par l'optimisation de la concentration en sucre dans la solution. Pour ce faire, nous avons préparé plusieurs solutions de sucre [117] dans l'EDI, puis nous avons mesuré l'osmolarité des solutions en fonction de la concentration en masse de sucre. Les mesures ont été faites en utilisant un osmomètre à point de congélation au sein du laboratoire ILM. Les résultats sont présentés dans la *Figure 55*.

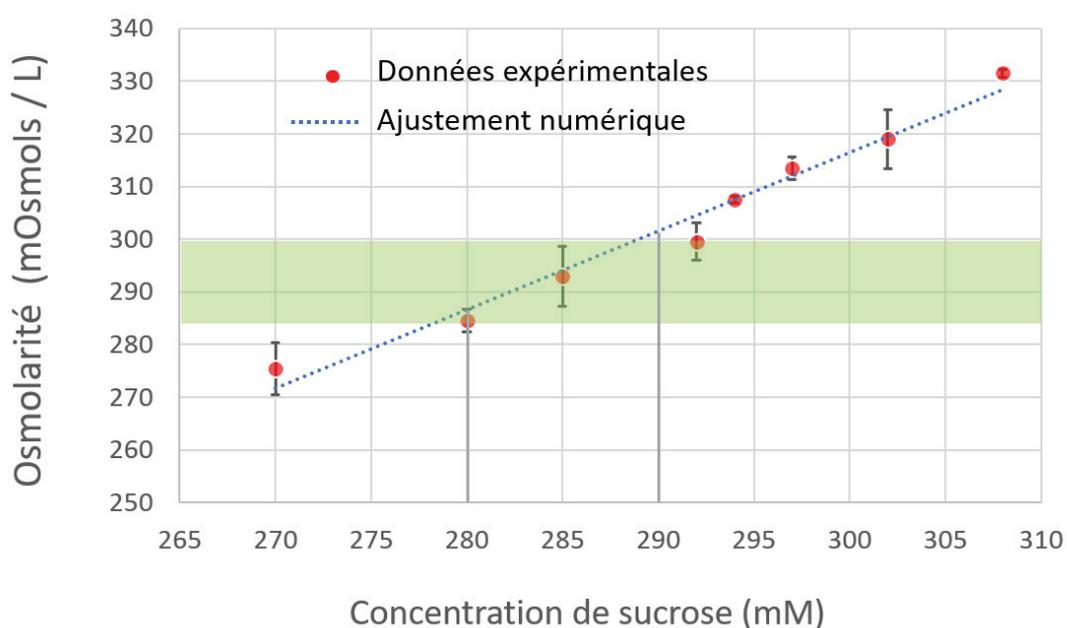


Figure 55 : Mesures d'osmolarité de solutions en fonction de la concentration de sucre.

Comme attendu, on remarque sur le graphique que l'osmolarité du milieu augmente avec la concentration de sucrose. Comme mentionné au chapitre 1, les milieux physiologiques dont l'osmolarité se situe entre 285 et 300 mOsmols/L (zone foncée sur la figure) fournissent des conditions isotoniques pour les RBCs. Nous constatons que les milieux isotoniques correspondent à des concentrations de sucrose comprise entre 280

et 290 mM. Les milieux dont la concentration en sucrose est inférieure à 280 mM sont des milieux hypotoniques. Ceux dont la concentration est supérieure à 290 mM sont des milieux hypertoniques.

Nous avons étudié la morphologie des RBCs dans des solutions de sucrose à 270 mM, 285 mM et 294 mM. Les RBCs sont lavés trois fois dans le PBS 1X puis suspendus dans les solutions de sucrose. Nous avons ensuite déposé une goutte de chaque suspension de globules rouges sur la surface d'une boîte de pétri pour les observer au microscope optique à transmission.

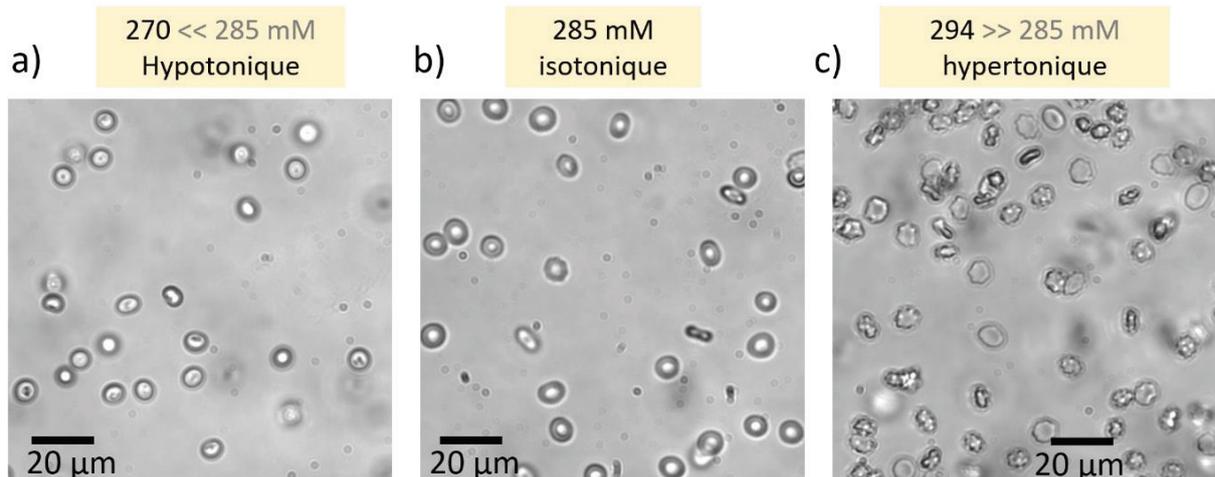


Figure 56 : Images microscopiques illustrant la morphologie des RBCs sur la surface d'une boîte de pétri en suspension dans une solution, a) hypotonique, b) isotonique, c) hypertonique de sucrose.

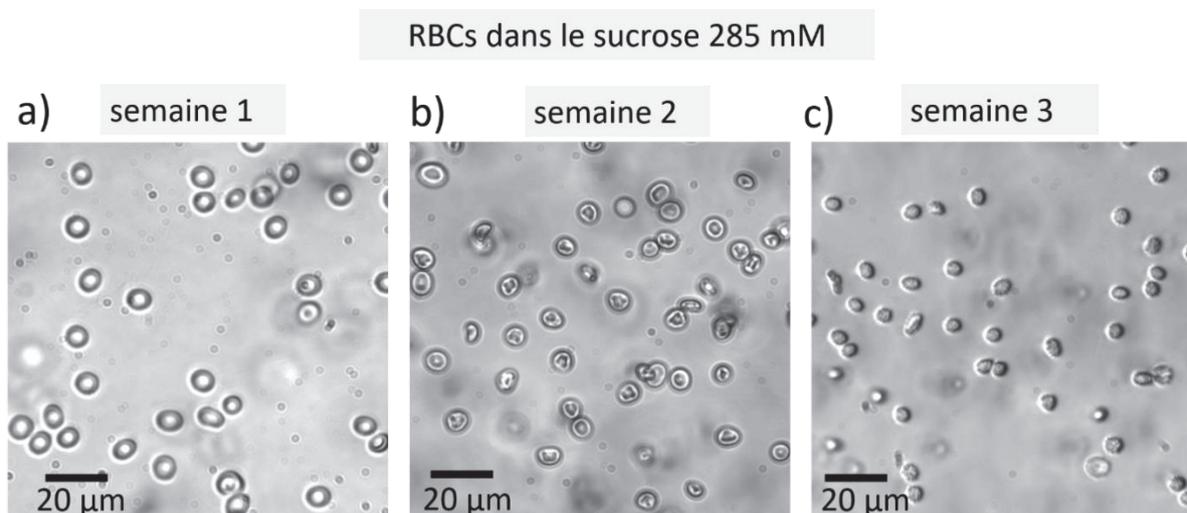
La Figure 56 montre la morphologie des RBCs dans des milieux hypotonique (Figure 56-a), isotonique (Figure 56-b), et hypertonique (Figure 56-c). Les premières observations lors du test d'adhésion, qui montraient des RBCs échinocytes, semblent donc indiquer que nous étions plutôt dans d'une solution hypertonique.

Maintenons que nous avons déterminé la bonne gamme de concentration en sucrose à utiliser, nous examinons la variabilité morphologique des RBCs pour un même donneur (intra-donneur) et ensuite la variabilité inter-donneurs pour deux donneurs différents dans ce nouveau milieu.

### b. Variabilité intra-donneur

Nous avons étudié la variation de morphologie des RBCs dans une solution à 285 mM de sucrose pour différents prélèvements d'un même donneur dans le temps. Pour ce faire,

nous préparons une suspension de RBCs dans du sucrose selon le protocole décrit à la Section 2.3.1 et nous prenons une image microscopique des cellules déposées sur une boîte de pétri juste après l'homogénéisation de la suspension. Nous avons répété cette expérience chaque début de semaine pendant 3 semaines, en utilisant un nouveau prélèvement de sang frais et une nouvelle solution de sucrose à 285 mM à chaque fois. Nous présentons dans la *Figure 57* les images microscopiques des cellules sur la boîte de pétri avec un grossissement X40. On remarque une forme discocyte normale de RBCs la première semaine (*Figure 57-a*), alors qu'ils présentent une forme légèrement stomatocyte au cours de la deuxième semaine (*Figure 57-b*). Dans la troisième semaine, les RBCs présentent cette fois une forme d'échinocytes comme le montre la *Figure 57-c*.



*Figure 57 : Images microscopiques illustrant la variation morphologique des RBCs frais suspendus dans du sucrose 285 mM, selon les semaines.*

Cette variation morphologique des RBCs peut être attribuée, soit aux variabilités biologiques intra-donneur d'une semaine à l'autre (tels que le taux de sucre par exemple), soit aux erreurs de préparation des solutions de sucrose à chaque semaine. Néanmoins, nous constatons que les RBCs en suspension dans le sucrose ont une forte sensibilité morphologique à de faibles variations de la concentration de sucrose, ce qui peut poser un problème pour la répétabilité de nos mesures dans le temps.

### c. Variabilité inter-donneurs

Nous avons également étudié la variabilité inter-donneurs. Pour cela, les RBCs de chaque donneur sont collectés par prélèvements au bout du doigt et sont d'abord lavés dans du PBS 1X, puis une partie est mise en suspension dans du PBS 1x et l'autre dans la solution de sucrose à 285 mM. La *Figure 58-a* présente des images microscopiques de RBCs suspendus dans la solution de PBS 1X et étalé sur une boîte de pétri. Nous remarquons la forme discocyte normal des RBCs pour les échantillons des deux donneurs différents.

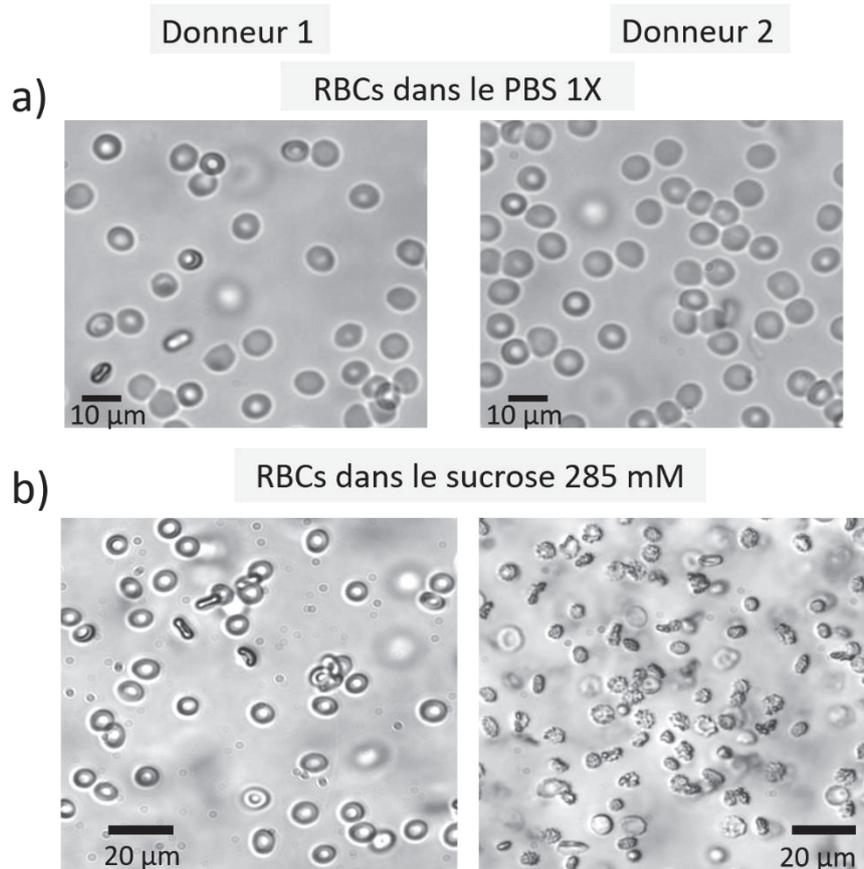


Figure 58 : Images microscopiques de RBCs pour deux donneurs différents en suspension dans a) du PBS 1X et b) dans une solution de sucrose à 285 mM.

Cependant nous remarquons clairement la différence morphologique d'un donneur à l'autre, lorsque les RBCs sont suspendus dans le sucrose à 285 mM. Dans la *Figure 58-b*, on voit les cellules du donneur 1 qui conservent globalement une forme discocyte, tandis que les globules rouges provenant du donneur 2 sont en forme d'échinocytes. Ceci suggère donc que la concentration de sucrose doit être optimisée pour chaque donneur, ce qui limite l'utilisation de cette approche pour une application généralisée.

### 4.2.3 Bilan

Dans les sections précédentes, nous avons présenté les différentes approches évaluées en vue de résoudre le problème d'adhésion non spécifique des globules rouges sur les surfaces en silicium des CPs. Cependant, certaines de ces approches ne parviennent pas à résoudre l'adhésion cellulaire, et d'autres semblent fonctionner du point de vue de l'adhésion mais présentent des effets secondaires importants, notamment du point de vue de la morphologie des cellules. Le *Tableau 4* résume les différentes approches mentionnées précédemment et les résultats obtenus.

Solution proposée	Non-adhésion sur la surface	morphologie de RBCs	propreté de la surface
PBS			
PBS + BSA ( 0.02 % à 1 % en masse)			
PBS + dextran			
Acide pluronique			
Silanisation de surface			
Sucrose			

Tableau 4 : Résumé des différentes approches explorées pour résoudre le problème d'adhésion non-spécifique des globules rouges sur la surface de Si et des résultats obtenus.

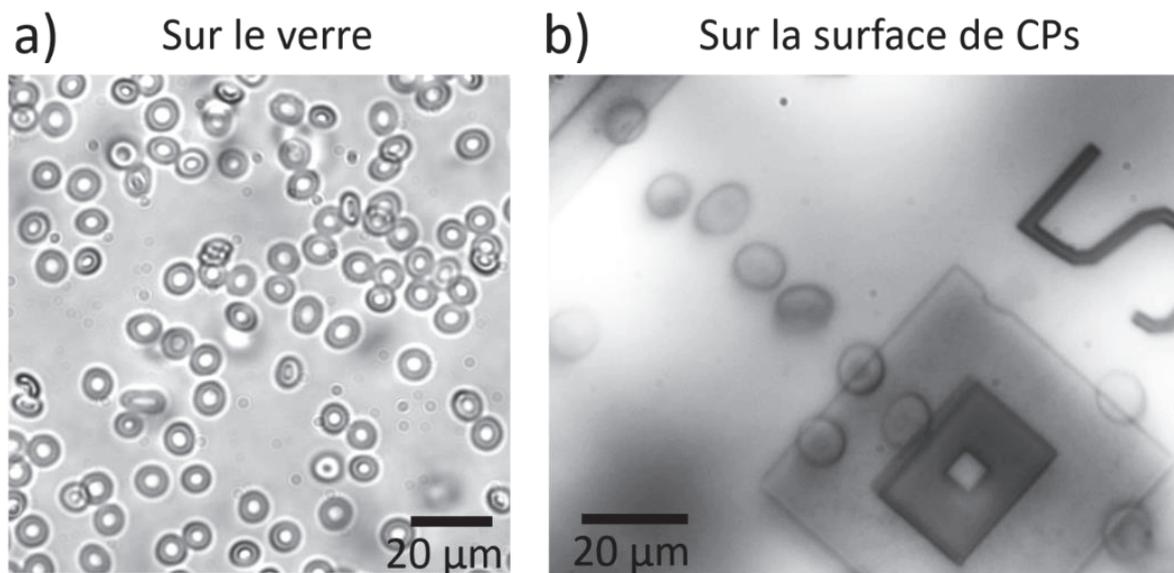
La passivation de la surface avec des molécules de silane a résolu le problème de l'adhésion, mais les résidus formés sur la surface après traitement rendent difficile la détection optique des cellules au-dessus de la cavité photonique. La solution de sucrose se montre efficace du point de vue de l'adhésion, cependant son effet sur la morphologie des cellules est tel qu'elle devient difficile à utiliser puisque les cellules sont sensibles au moindre changement de concentration de sucrose. Pour toutes ces raisons, nous avons besoin d'une nouvelle approche pour résoudre ce problème avec le moindre effet secondaire, et dans laquelle les cellules maintiennent leur forme normale de discocytes.

### 4.3 Nouvelle approche

Nous avons vu dans les sections précédentes que les RBCs dans le PBS 1X maintiennent leur forme de discocyte, mais que la présence des ions dans le PBS pose le problème d'adhésion des globules sur les surfaces. D'autre part, les RBCs dans le sucrose isotonique sont libres de se déplacer sur la surface. Mais il est très difficile et chronophage d'ajuster la concentration de sucrose pour chaque échantillon utilisé, ce qui limite l'application généralisée de cette approche. Notre solution propose de tirer partie des avantages de ces deux tampons (PBS et sucrose) afin d'obtenir des globules de forme discocyte et qui n'adhèrent pas aux surfaces. Nous proposons de diluer les ions

contenus dans le PBS 1X avec la solution de sucrose à 285 mM pour avoir une plus faible concentration en ions et donc moins d'adhésion.

La *Figure 59* montre des RBCs, en suspension dans la solution mixte (PBS + sucrose), sur une boîte de pétri (*Figure 59-a*) et sur le substrat photonique (*Figure 59-b*). La forme discoocyte des RBCs est clairement visible quel que soit le matériau. La *Figure 59-b* montre également que les RBCs dans la même solution mixte, peuvent être positionnés pour « faire la queue » devant la cavité photonique, grâce à leur manipulation avec la pince optique. Ceci a été rendu possible par la "non-adhésion" des RBCs sur la surface de silicium contenant les cavités photoniques et illustre bien l'efficacité de l'approche mise en place.



*Figure 59 : Images microscopiques de RBCs en suspension dans notre solution mixte (sucrose + PBS), mettant en évidence la forme discoocyte des cellules sur a) la boîte de pétri et b) le silicium, ainsi que la "non-adhésion" des RBCs à la surface des CPs.*

La proportion des 2 solutions, traduite par le paramètre  $V_{\text{sucrose}}/V_{\text{PBS}}$  est un facteur essentiel pour assurer le caractère non-adhérent des cellules sur les CPs. Dans ce but, nous avons expérimenté plusieurs proportions pour trouver la solution idéale qui satisfasse les 2 critères : morphologique et non-adhésion. Nous avons donc examiné l'adhésion des RBCs en fonction du paramètre  $V_{\text{sucrose}}/V_{\text{PBS}}$  ; dans chaque condition, nous avons effectué le test d'adhésion sur 30 RBCs, avec la pince optique sur nos substrats photoniques. Des images microscopiques illustrant les tests d'adhésion sont présentées en annexe C. Nous résumons les résultats de ces essais dans le *Tableau 5*. Le test d'adhésion sur 30 RBCs dans une solution contenant uniquement du sucrose 285 mM montre que 98% des globules sont libres de se déplacer à la surface. Mais comme nous l'avons mentionné précédemment, la morphologie des RBCs est très sensible et n'est pas toujours adéquate. Pour  $V_{\text{sucrose}}/V_{\text{PBS}} \sim 3,3$ , les cellules présentent une forme de discoytes et le test d'adhésion révèle que 56 % des RBC n'adhèrent pas à la surface. Dans les solutions mixtes dont  $V_{\text{sucrose}}/V_{\text{PBS}} \leq 3,3$  les cellules présentent une morphologie normale, mais le taux de cellules non adhérentes à la surface diminue avec

l'augmentation de la proportion de PBS dans la solution. Nous montrons que seulement 16% des cellules sont non-adhérentes dans une solution où  $V_{\text{sucrose}}/V_{\text{PBS}} \sim 0,4$ , et seulement une cellule sur 30 est libre dans une solution pure de PBS 1X. Ce résultat confirme donc l'hypothèse rapportée dans la littérature sur l'effet des ions dans le PBS sur l'adhésion. Nous en concluons finalement que la solution mixte avec  $V_{\text{sucrose}}/V_{\text{PBS}} \sim 3,3$  est l'optimum pour assurer une solution isotonique dans laquelle les RBCs maintiennent leur forme discocyte tout en diminuant l'adhésion d'au moins 50%.

Solution	Morphologie de RBCs	Non-adhésion sur la surface
sucrose (285 mM)		98 % de RBCs libres
sucrose (285 mM) +PBS 1X $\frac{V_{\text{sucrose } 285 \text{ mM}}}{V_{\text{PBS}}} = 3.3$		56 % de RBCs libres
sucrose (285 mM) +PBS 1X $\frac{V_{\text{sucrose } 285 \text{ mM}}}{V_{\text{PBS}}} = 0.4$		16 % de RBCs libres
PBS 1X		0% _ 0.5 % de RBCs libres

Tableau 5 : Résumé des essais illustrant la morphologie ainsi que le taux d'adhésion des RBCs sur la surface en fonction du rapport  $V_{\text{sucrose}}/V_{\text{PBS}}$  dans la solution mixte.

## 4.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté dans un premier temps le problème technique auquel nous sommes confrontés au cours de cette thèse, à savoir l'adhésion non-spécifique des globules rouges à la surface des CPs. Ce problème est un point important de cette thèse, puisqu'il rend très difficile toute étude de la mesure de la déformabilité de cellules. Pour cela nous avons testé différentes approches pour résoudre le problème, typiquement la passivation de surface et la modification de la solution tampon. Nous avons vu que la passivation de surface avec des molécules de BSA ne résout pas l'adhésion. En revanche, l'utilisation de molécules de silane semble fonctionner du point de vue de l'adhésion, mais elle laisse des résidus sur la surface de plus de 160 nm de

hauteur qui pourraient limiter l'interaction entre les RBCs et le mode optique de la cavité photonique. De même, l'utilisation du sucre comme milieu de suspension des globules rouges résout ce problème d'adhérence. Par contre nous avons montré que la morphologie des cellules dans une telle solution est très sensible aux variabilités inter- et intra-donneurs.

Nous avons ensuite détaillé notre approche de solution mixte qui consiste à diluer les ions du PBS 1X (qui favorisent l'adhésion) avec une solution isotonique de sucre à 285 mM. Nous avons révélé qu'avec une solution mixte dont la proportion  $V_{\text{sucrose}}/V_{\text{PBS}} \sim 3,3$ , les RBCs présentent une forme discocyte et que plus de 50% des RBCs n'adhèrent pas à la surface. Ce résultat important nous permet d'aborder le point principal de notre étude, à savoir la mesure de la déformabilité des RBCs. Maintenant nous pouvons poursuivre nos études sur les RBCs et mener des études statistiques. Dans le prochain chapitre, nous allons étudier l'effet de la déformation des RBCs sains et artificiellement rigidifiés sur la résonance de la cavité photonique (configuration cavité en bas).



# Chapitre



## Démonstration de la mesure de déformabilité

### Sommaire

---

5.1	Etudes des décalages spectraux sur cellules individuelles.....	97
5.1.1	Globules rouges sains.....	98
5.1.2	Globules rouges artificiellement rigidifiés.....	100
5.2	Eude statistique .....	102
5.3	Discussion.....	104
5.4	Conclusion.....	106

---

Ce chapitre est au cœur de ce travail de thèse. Nous voulons ici donner la démonstration de la mesure optique de déformabilité de globules rouges uniques et valider ainsi notre approche. Des décalages de résonances liés à la puissance du laser ont été mis en évidence dans le Chapitre 3, néanmoins, l'attribution de ces décalages reste une question ouverte. Les origines possibles de ces décalages sont : (i) un rapprochement de la cellule vers la surface de la cavité et (ii) sa déformation, ou (iii) une combinaison de ces deux phénomènes. Les problèmes de l'adhésion non spécifique de globules rouges étant résolu (voir Chapitre 4), nous sommes maintenant armés pour aborder ce point central. Pour cela, nous avons changé la configuration expérimentale et fait une étude comparative entre des globules sains (hRBC) et rigidifiés (rRBC). Pour cela nous allons étudier la réponse des cristaux photoniques en présence de globules rouges sains et déformables et de globules rouges artificiellement rigidifiés par un traitement pharmacologique.

## 5.1 Etudes des décalages spectraux sur cellules individuelles

Le but de ce chapitre est donc la preuve de principe de notre approche. Pour ce faire, nous devons démontrer que nous sommes capables de détecter la présence des globules rouges au-dessus du cristal photonique et de mesurer leur déformabilité. Pour lire cette déformabilité, notre approche détaillée dans le Chapitre 1 (Section 1.3) est brièvement rappelée ici. La présence d'une cellule au-dessus de la cavité, perturbe le champ électromagnétique dans la cavité et la résonance se décale vers le rouge par rapport à une cavité sans objet. Ce premier décalage est donc dû à la présence du globule rouge sur la cavité. Puis, en appliquant une force optique sur la cellule, si cette dernière est suffisamment déformable, elle va se déformer sur la surface, et le champ électromagnétique sera donc perturbé sur une surface plus importante, ce qui va avoir pour effet de décaler encore plus la résonance vers le rouge. C'est ce second décalage qui est selon nous une signature de la capacité de la cellule à se déformer.

Pour réaliser la preuve de concept, nous utilisons le banc optique détaillé dans le Chapitre 2 (Section 2.4), configuration « cavité vers le bas » pour ne pas avoir à lutter contre la gravité comme c'était le cas dans le Chapitre 3. Comme indiqué précédemment, le RBC a tendance à tourner et à se positionner sur la tranche après avoir été pris dans la pince optique. Donc pour pouvoir mesurer l'effet de la présence (sans déformation) de cellule sur la tranche, nous positionnons cette dernière au-dessus de la cavité avec une puissance laser de 0.1 mW. Il s'agit de la puissance minimale pour maintenir la cellule sur la tranche au-dessus de la cavité et nous considérons dans un premier temps que s'il y a déformation de la cellule, elle est négligeable.

En outre, le choix de la structure photonique dans nos expériences est lié à plusieurs aspects, en particulier à la position de la résonance entre 1250 nm et 1350 nm pour éviter l'absorption dans l'eau. L'utilisation d'une cavité avec un haut facteur de qualité permet aussi de détecter de faibles variations d'indice de réfraction à proximité immédiate de la cavité. Enfin, la taille du mode optique, qui est liée à la taille de la cavité, doit être comparable à celle de la cellule. Pour cela, nous avons opté pour une cavité de 5  $\mu\text{m}$  de côté avec un facteur de qualité remarquable de  $\sim 9\,000$ .

### 5.1.1 Globules rouges sains

Dans cette expérience, nous étudions l'effet de la présence et de la déformation des globules rouges sains (hRBC) avec le laser de déformation, sur le décalage de la résonance de la cavité précédemment présentée. Nous avons reporté dans la *Figure 60*, les spectres de réflectivité de la cavité en fonction de la longueur d'onde à partir d'expériences réalisées sur un hRBC. Le spectre noir pointillé de la *Figure 60-a* correspondant à la cavité vide, permet de mesurer la résonance du CP dans la solution biologique (composée de PBS + Sucrose) à 1338,23 nm. Lorsqu'un hRBC est positionné sur la tranche à une faible puissance laser de 0,1 mW, au-dessus de la cavité, la résonance se décale de  $\Delta\lambda_1 \sim 22$  pm donnant le spectre rouge (*Figure 60-a*). Ce spectre et le décalage associé, correspondent à la présence du hRBC sur la tranche, supposé sans déformation, au-dessus de la cavité. A titre d'illustration, une image de la cellule saine sur la tranche à faible puissance laser, au-dessus du CP, est présentée dans la figure. Ensuite, nous augmentons la puissance du laser à 30 mW afin de déformer fortement la cellule, ce qui a pour effet de décaler encore la résonance comme le montre le spectre bleu dans la *Figure 60-b*. La valeur de ce second décalage  $\Delta\lambda_2$  est d'environ 85 pm. En comparant l'image microscopique de la cellule à forte puissance (*Figure 60-b*) avec celle à faible puissance (*Figure 60-a*), il est difficile de détecter la déformation de la cellule au-dessus de la cavité, malgré les efforts fournis pour améliorer la résolution du système d'imagerie.

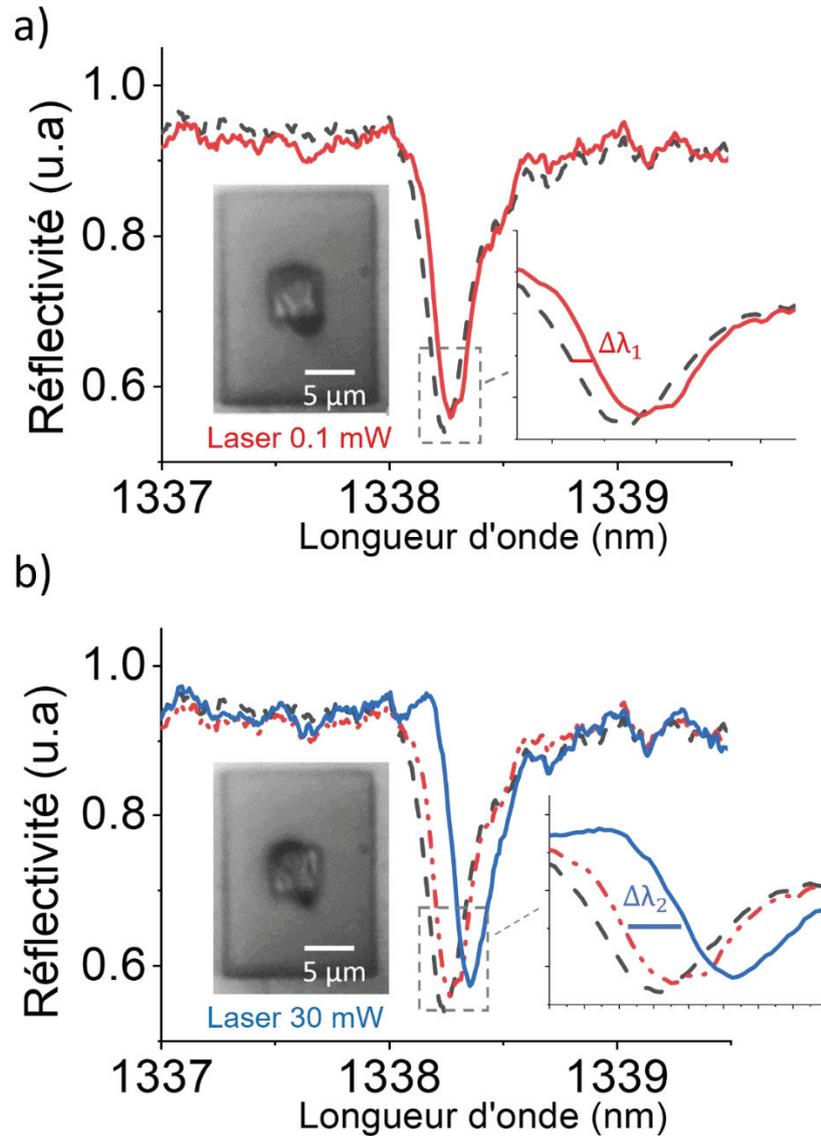


Figure 60: Mesures expérimentales de la résonance de la cavité photonique en présence d'un hRBC sur la tranche, a) à faible puissance laser (ligne rouge) et b) à forte puissance laser (ligne bleue). A titre indicatif, le spectre noir représente la mesure réalisée sur la cavité en l'absence de cellules. Les images associées à chaque condition sont également présentées.

Pour des mesures plus fines, nous avons réalisé une série de mesures en faisant varier la puissance du laser entre 0,1 mW et 30 mW. Nous représentons dans la *Figure 61*, le décalage spectral de la résonance en fonction de la puissance laser appliquée sur la cellule au-dessus de la cavité. Nous avons pris comme référence la résonance de la cavité vide dans la solution biologique (PBS + Sucrose). En positionnant un hRBC sur la tranche au-dessus de la cavité avec une puissance laser de 0,1 mW, la résonance se décale de  $\sim 20$  pm vers le rouge. Lorsque nous augmentons ensuite la puissance laser à 1 mW, la résonance se décale fortement de  $\sim 62$  pm. Puis elle continue à se décaler progressivement avec l'augmentation de la puissance du laser de déformation pour atteindre  $\sim 120$  pm à 30 mW.

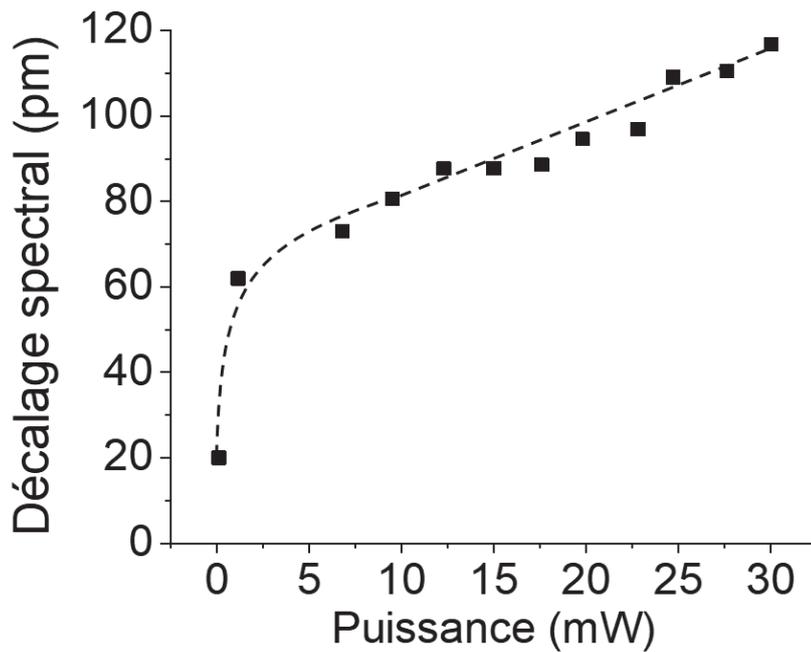


Figure 61 : Décalage de la résonance de la cavité en fonction de la puissance laser appliquée sur un hRBC. Les points correspondent aux données expérimentales et la courbe pointillée représente un guide pour les yeux.

Nous distinguons donc deux régimes sur le graphique : un premier régime entre 0,1 mW et 1 mW dans lequel on voit un saut de décalage de 20 pm à 62 pm et un deuxième régime entre 1 mW et 30 mW dans lequel la variation de décalage est approximativement linéaire avec une pente de  $\sim 2$  pm/mW. Ce qui suggère qu'il y a deux processus physiques mis en œuvre dans cette expérience.

Cependant, comme il est encore difficile de quantifier la déformation avec le système d'imagerie, il est également difficile d'identifier l'origine des décalages dans chacun de ces régimes. Pour mettre en évidence l'effet de la déformation de la cellule sur la résonance de la cavité, nous menons des expériences sur des globules rouges artificiellement rigidifiés (rRBCs) qui contrairement aux hRBCs - qui sont des objets hautement déformables - possèdent des propriétés mécaniques fortement affectées par le traitement pharmacologique appliqué.

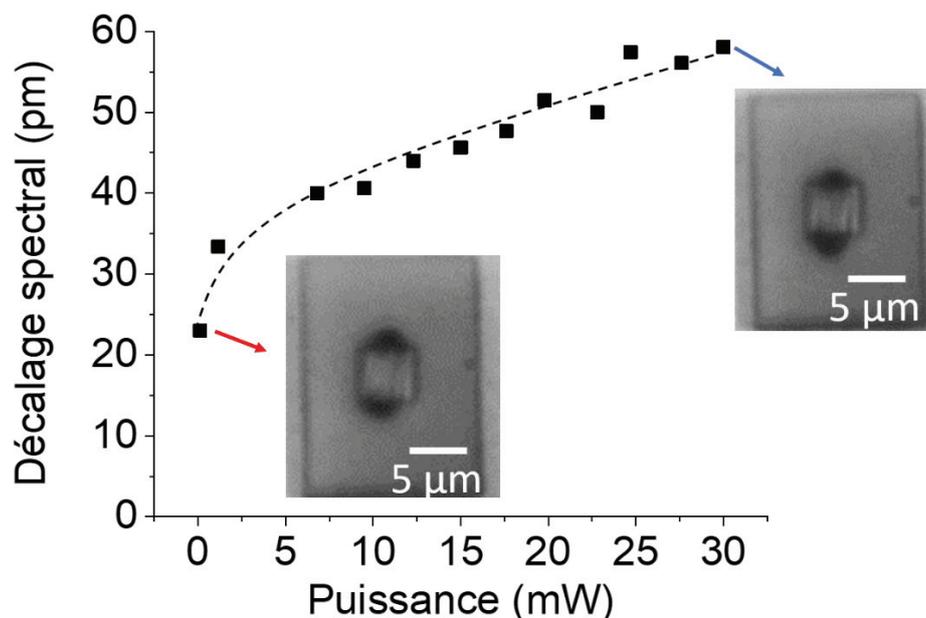
### 5.1.2 Globules rouges artificiellement rigidifiés

L'intérêt d'utiliser des cellules rigidifiées réside dans le fait que ces cellules conservent toutes les propriétés des cellules saines mais ne sont pas déformables. La caractérisation mécanique réalisée par AFM de ces objets, présentée dans le Chapitre 2 (Section 2.3.2) montre un facteur 100 en termes de module d'Young entre les cellules saines et rigidifiées. Elles sont donc de très bons candidats pour mettre en évidence la différence de réponse du CP par rapport aux globules rouges déformables. Ce choix est également

motivé par la simplicité de rigidifier les globules rouges par voie chimique (avec le glutaraldéhyde) maîtrisée au laboratoire.

Dans cette expérience, nous étudions l'effet des forces optiques appliquées sur les rRBCs, sur la résonance de la cavité photonique. En utilisant les mêmes conditions expérimentales que pour le hRBC, nous avons effectué la mesure sur le rRBC en augmentant progressivement la puissance du laser de 0,1 mW à 30 mW. Nous avons calculé le décalage par rapport au point de référence qui correspond à la résonance de la cavité vide. Les résultats sont présentés dans la *Figure 62*. À 0,1 mW nous avons mesuré un décalage de la résonance de  $\sim 23$  pm ; soit approximativement la même valeur que pour le hRBC. En appliquant une puissance laser de 1 mW à la cellule, la résonance se déplace de 33 pm. Puis elle continue de se décaler progressivement avec l'augmentation de la puissance du laser de déformation jusqu'à  $\sim 58$  pm à 30 mW. A titre de comparaison avec les images de la *Figure 60*, les images du rRBC correspondant à la faible et à la forte puissance laser sont reportées sur la *Figure 62*.

Contrairement aux mesures sur le hRBC nous ne distinguons pas clairement les deux régimes sur le graphique. Entre 0,1 mW et 1 mW on voit une faible variation de décalage de 23 pm à 33 pm alors que pour les hRBC les décalages passent de 20pm à 62pm. Puis, on retrouve la variation de décalage approximativement linéaire avec  $\sim 1,1$  pm/mW. Cela met en évidence que le processus physique est presque le même entre 0,1 et 30 mW.



*Figure 62 : Décalage de la résonance de la cavité en fonction de la puissance laser appliquée sur un rRBC. Les points correspondent aux données expérimentales et la courbe pointillée représente un*

*guide pour les yeux. Les images correspondant au rRBC à faible et à forte puissance sont également présentée à titre indicatif.*

Cette étude ayant été réalisée pour un seul globule rouge sain et son corollaire rigidifié, une étude sur une population plus importante est nécessaire afin de différencier de réelles tendances et de simples variations entre cellules. Pour être plus quantitatif, nous avons donc répété cette mesure sur 17 cellules de chaque population (hRBCs et rRBCs) pour obtenir des informations statistiques.

## 5.2 Eude statistique

Dans cette partie, nous présentons une étude statistique réalisée sur 17 hRBCs et 17 rRBCs pour lesquels nous avons mesuré le décalage de la résonance en fonction de la puissance du laser de piégeage. Nous avons réalisé cette étude statistique pour un même donneur à des jours différents. Pour chaque expérience, nous prélevons un échantillon de sang total du donneur sain et une partie des cellules sont rigidifiées avec du glutaraldéhyde selon le protocole explicité précédemment, alors que l'autre partie est conservée telle quelle. Ensuite, nous réalisons des mesures de déformabilité sur quelques hRBCs et rRBCs. En adoptant cette stratégie, nous tenons compte de la variabilité intra-donneur, ainsi que des erreurs de mesure lors de la préparation de la solution mixte de (PBS + sucre). La *Figure 63* représente la statistique sur les décalages expérimentaux de la résonance, calculés par rapport à la cavité vide, en fonction de la puissance du laser de déformation, pour les hRBCs (points rouges) et les rRBCs (carrés gris). Nous avons calculé le décalage par rapport aux points de référence qui correspond à la résonance de la cavité dans la suspension des globules.

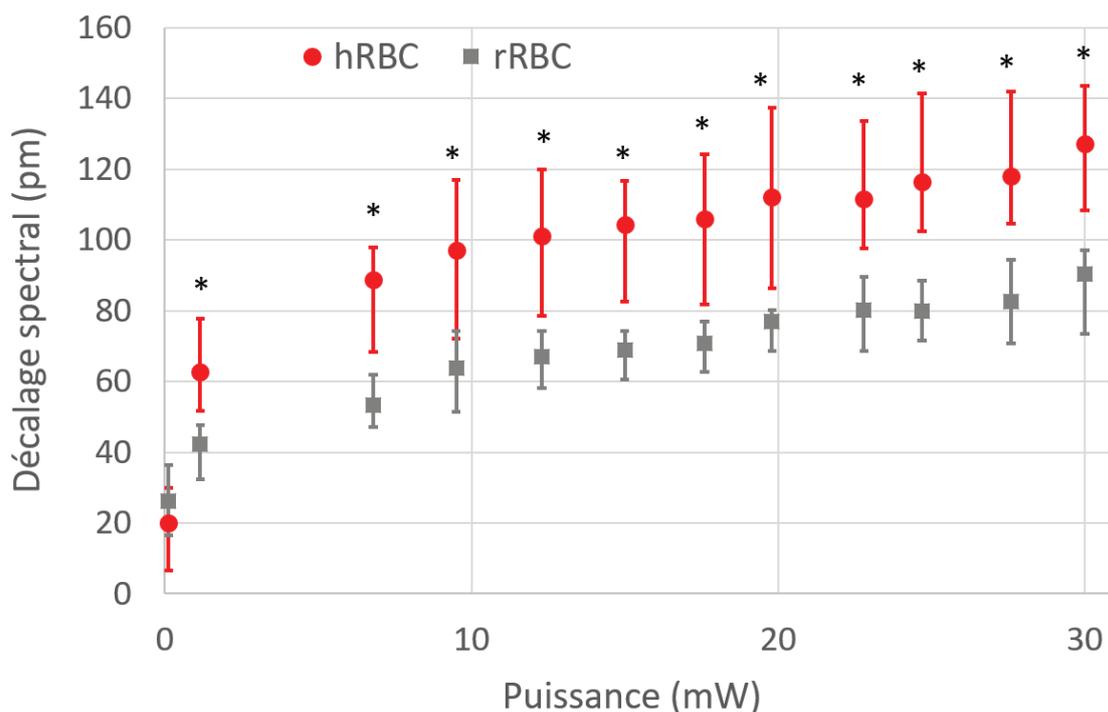


Figure 63 : Décalages spectraux de la résonance de la cavité calculées sur 17 hRBCs (points rouges) et 17 rRBCs (carrés gris) en fonction de la puissance du laser de déformation appliqué. Les données sont représentées en terme de médiane et les barres d'erreurs représentent les quartiles, les étoiles indiquent une différence statistique entre les deux populations à une puissance laser donnée, selon le test de Kolmogorov-Smirnov ( $p^* < 0.01$ ).

Cette étude statistique conforte les résultats obtenus précédemment. Le point le plus important est que pour des puissances supérieures à 1mW les populations de hRBC et rRBC ont un comportement statistiquement différent selon le test de Kolmogorov-Smirnov ( $p^* < 0,01$ ). Il y a un écart d'environ 40 pm entre les deux courbes. Ce résultat est l'un des plus importants de ce travail puisqu'il montre que l'on peut discriminer les différents types de globules rouges en fonction de leurs propriétés mécaniques. Le fait que cet écart soit constant est aussi significatif. Dans les deux cas pour cette gamme de puissance on a une évolution similaire, quasi-linéaire, avec une pente d'environ 2,2pm/mW.

Il faut aussi souligner que le décalage de résonance dû à la présence de cellules saines et rigides à 0,1 mW est approximativement le même dans le deux cas, d'environ 20 pm. C'est entre 0,1mW et 1mW que l'écart entre hRBC et rRBC se creuse. Il semble qu'il y ait deux régimes différents pour l'évolution du décalage spectral en fonction de la puissance. Entre 0.1 mW et 1 mW, les comportements des globules sains et rigidifiés sont très différents. Les hRBCs présentent un décalage important avec la puissance alors que les rRBCs sont beaucoup moins affectés. Au-delà de 1mW, l'évolution du décalage est similaire pour les deux types de globules rouges. On peut faire l'hypothèse que ce comportement est lié à deux processus différents donnant lieu aux décalages spectraux observés.

## 5.3 Discussion

A 30mW, nous avons mesuré un décalage spectral qui est à peu près de 1 fois et demi plus grand pour le hRBCs par rapport au rRBCs. Cependant, et conformément aux mesures AFM du module de Young, nous nous attendions à un facteur de deux ordres de grandeur en termes de décalage de la résonance entre les hRBCs et les rRBCs. Ce résultat est surprenant. Il montre de manière claire que le décalage observé ne peut être attribué à la déformation seule du globule rouge.

Une explication possible de ce phénomène réside dans le fait que le RBCs se trouve initialement à une certaine distance de la cavité à cause de forces électrostatiques répulsives entre le RBC et la surface du CP [118], [119]. Lorsque nous augmentons la puissance du laser, non seulement nous déformons la cellule mais nous la poussons aussi vers la cavité.

Pour identifier l'origine des décalages spectraux, nous avons étudié théoriquement l'interaction du RBC avec la cavité photonique. Les simulations numériques par la méthode des éléments finis réalisées par Taha Benyattou à l'INL, s'intéresse à deux aspects sur le décalage de la résonance : l'effet de l'approche d'une particule discocyte vers la cavité, et l'effet de sa déformation au-dessus de la cavité

Nous représentons dans la *Figure 64-a* le décalage de la résonance théorique induit par l'approche d'un hRBC vis-à-vis de la surface de la cavité. On remarque que le décalage est très faible, quelque picomètres lorsque la cellule se trouve à plus de  $\sim 200$  nm de la surface. Ceci est lié à l'étendue de la partie évanescente du mode. Au-delà, l'interaction entre le mode de la cavité et la cellule est négligeable. En dessous de cette distance, le décalage augmente de manière exponentielle à mesure que la cellule s'approche de la surface, atteignant  $\sim 150$  pm lorsque le hRBC se trouve à  $\sim 20$  nm de surface de la cavité.

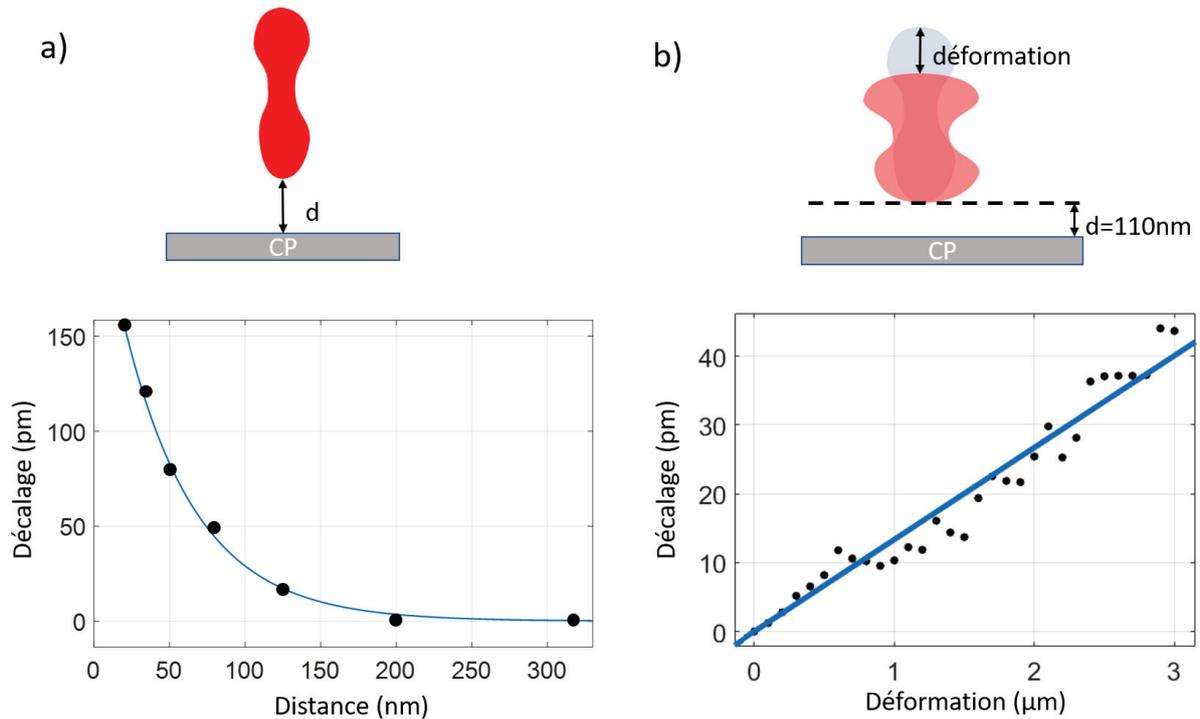


Figure 64 : Etude théorique du décalage de la résonance de notre cavité de  $5\ \mu\text{m}$  en fonction de : a) la distance globule rouge sain – CP, et b) la déformation du hRBC à une distance de  $110\ \text{nm}$  de la surface de la cavité.

En utilisant les résultats de cette étude théorique, nous pouvons estimer la distance RBC cavité à partir des résultats expérimentaux.

Comme nous l'avons vu précédemment, l'étude statistique montre que la présence du hRBCs au-dessus de la cavité à faible puissance laser ( $0,1\ \text{mW}$ ) induit un décalage dans le rouge de  $\sim 20\ \text{pm}$ . En corrélant cette valeur avec la simulation, cela correspond à une distance RBC / cavité de  $\sim 110\ \text{nm}$ . Le fait que les décalages de résonance pour les hRBCs et RRBCs sont statistiquement identiques à  $0,1\ \text{mW}$ , montre que les deux populations sont initialement à la même distance de  $\sim 110\ \text{nm}$  de la cavité et ont des propriétés similaires d'un point de vue purement optique.

Ensuite, nous avons simulé les effets d'une déformation d'un globule rouge situé à  $110\text{nm}$ . La Figure 64-b présente les décalages de résonance dus à la déformation. Le décalage est linéaire pour des déformations allant jusqu'à  $3\ \mu\text{m}$  avec une pente de  $\sim 11\ \text{pm}/\mu\text{m}$ . Cette pente peut être considérée comme le coefficient de sensibilité théorique de la cavité à la déformation du globule rouge.

Ces simulations nous montrent que deux phénomènes peuvent participer au décalage spectral en fonction de la puissance du laser : le rapprochement du globule rouge de la surface du CP et sa déformation. L'ordre de grandeur des décalages obtenus est similaire pour les deux effets de l'ordre de plusieurs dizaines de picomètres. Néanmoins, les effets du rapprochement semblent plus importants car le décalage peut atteindre une valeur de  $150\text{pm}$  pour un distance CP-RBC de  $20\text{nm}$ .

Nous avons proposé trois possibilités qui pourraient expliquer le décalage de résonance expérimentale dans la *Figure 63*: il correspond (i) soit à l'approche du RBC vers la cavité, (ii) soit à sa déformation au-dessus de la surface du CP, ou encore (iii) à la combinaison d'un rapprochement et d'une déformation. En regardant l'évolution des décalages pour les hRBCs et les rRBCs en fonction de la puissance du laser de déformation, nous avons distingué deux zones : une partie entre 0,1 et 1 mW qui montre une variation de décalage différente pour les 2 populations, et une autre zone entre 1 et 30 mW où les décalages suivent approximativement la même tendance pour les hRBCs et les rRBCs, avec des pentes du même ordre de grandeur (2,2 pm/mW et 2,1 pm/mW respectivement).

Nous savons que comparativement aux globules rouges sains, les globules rouges rigidifiés ne sont quasiment pas déformables. Ainsi, le décalage observé pour les rRBC entre 0,1mW et 30 mW ne peut être attribué qu'à un rapprochement du globule rouge rigidifié de la surface de la cavité. Ils constituent ainsi une référence qui permet d'avoir accès à la distance globule rouge - cavité. D'après la simulation, la variation de décalage entre 0,1 mW et 30 mW de 64 pm correspond à un rapprochement des cellules à 70 nm de la cavité.

Pour les globules rouges sains, il y a clairement deux régimes en fonction de la puissance laser. Pour la plage de puissance comprise entre 1mW et 30 mW, le comportement est similaire à celui des globules rigidifiés avec une pente pour le décalage spectral qui est identique et donc à un rapprochement à 70 nm de la cavité. On peut donc dire que pour cette gamme de puissance l'effet prépondérant est aussi le rapprochement de la surface.

Entre 0,1mW et 1mW la situation est très différente. On constate un saut significatif de 43 pm dans le décalage spectral pour les globules rouges sains. Pour les globules rouges rigidifiés, la variation est si faible qu'elle est dans la barre d'incertitude statistique. Cela nous indique sans ambiguïté que dans cette gamme de puissance, c'est la déformation mécanique du hRBC qui est mise en évidence. A partir des simulations, on peut dire que la déformation définie selon la figure 64-b est de l'ordre de  $3\mu\text{m}$ , ce qui correspond à une déformation latérale  $\sim 800$  nm de chaque côté. Ce résultat est des plus importants, il montre que nous avons réussi à obtenir une signature optique directement liée à la déformation du globule rouge sain.

## 5.4 Conclusion

Le but de ce chapitre était la preuve de principe de notre approche. Nous avons présenté dans un premier temps la structure photonique utilisée (cavité de  $5\mu\text{m}$  de côté avec un facteur de qualité de 9 000 dans l'eau). Nous avons étudié ensuite l'effet des forces optiques appliquées sur un hRBC et rRBC, sur la résonance de la cavité photonique. Nous

avons effectué cette étude sur plusieurs cellules pour obtenir des informations statistiques. Nous avons constaté que l'amplitude du décalage est d'environ 1 fois et demi plus importante pour le hRBCs que pour le rRBCs. Ces résultats n'étaient pas cohérents avec un facteur 100 entre les modules d'Young des 2 populations mesurés par AFM. Pour cela, nous avons étudié avec une simulation numérique l'interaction du RBC avec la cavité photonique (approchement de la cellule vers la cavité et déformation au-dessus de la cavité). Nous avons constaté que les cellules saines et rigides se trouvent initialement à une même distance de 110 nm de la cavité (à une puissance laser de 0,1 mW).

Le décalage observé pour les rRBCs (quasiment pas déformables) entre 0,1mW et 30 mW ne peut être attribué qu'à un rapprochement du globule de la surface de la cavité. Le 64pm de décalage correspond donc à un rapprochement des rRBCs à 70 nm de la cavité. Pour le hRBCs, le comportement est similaire à celui des rRBCs pour la plage de puissance comprise entre 1mW et 30 mW et donc à un rapprochement de hRBCs à 70 nm de la cavité. Cependant, entre 0,1 mW et 1 mW, les comportements sont très différents. On constate un saut significatif de 43 pm dans le décalage spectral. Cela nous indique sans ambiguïté que dans cette gamme de puissance, c'est la déformation mécanique du hRBC qui est mise en évidence. A partir des simulations, on peut dire que la déformation latérale est de l'ordre de  $\sim 800$  nm de chaque côté

Nous avons donc pu pour la première fois, détecter la déformation des cellules, et discriminer optiquement entre des globules rouges sains et des globules rouges artificiellement rigidifiés. Ces résultats expérimentaux sont à l'état de l'art mondial et consiste en une première étape vers la démonstration de notre nouvelle approche pour la détection du paludisme dans un contexte diagnostique.

## Conclusions et perspectives

Dans cette thèse, nous avons développé un dispositif optofluidique de biodétection par voie optique, pour sonder les propriétés mécaniques d'une cellule en s'appuyant sur une approche originale développée à l'INL. L'originalité de notre approche repose sur la lecture tout-optique de la déformabilité des cellules en utilisant le mode résonant de micro-cavités de cristaux photoniques (CPs). Ce dispositif intègre donc comme capteur, un cristal photonique dans un réservoir fluidique. Nous nous sommes intéressés à plusieurs enjeux principaux liés à ce système. Effectivement, c'est la première fois que nos cristaux photoniques sont appliqués à des entités biologiques. En effet, en manipulant des globules rouges, nous avons été confrontés au problème de l'adhésion non-spécifique dans lequel les cellules adhèrent à la surface des CPs. En outre, le point central était que nous n'étions pas sûrs que le système soit suffisamment sensible pour détecter les décalages spectraux associés aux déformations de cellules vivantes.

Pour cela, nous avons mis en place des procédures expérimentales pour la préparation et le nettoyage des surfaces et de stockage de la chambre optofluidique. Nous avons également développé un banc optique expérimental qui nous permet à la fois de mesurer le spectre de réflectivité de nos cavités photoniques dans le proche infrarouge avec une source large bande et de piéger, positionner et déformer les globules rouges au-dessus de la cavité avec un second laser de piégeage.

Nous avons réalisé nos premières expériences de détection de la déformabilité sur un objet modèle, à savoir des microgouttes d'huile dans l'eau d'une taille comparable à celle des RBCs. Un des principaux résultats de cette thèse est la démonstration expérimentale, avec une étude statistique, le décalage de la résonance en fonction de la puissance laser appliquée sur la goutte. L'étude théorique de l'interaction goutte-cavité montre que la goutte est initialement située à une distance de 200 nm de la cavité. Par contre, nous n'avons pas été en mesure d'attribuer le décalage spectral en fonction de la puissance laser à l'une ou à l'autre des 3 hypothèses : (i) l'approchement de la goutte vers la cavité, (ii) la déformation de la goutte au-dessus de la cavité, ou bien (iii) une combinaison des 2 évènements.

Nous avons donc orienté nos études directement vers les globules rouges plus mous en espérant que les déformations induites seraient plus importantes. Nous avons démontré, sur le même banc optique - configuration cavité en haut - que nous étions capable d'obtenir des décalages spectraux, en appliquant des forces optiques sur les RBCs au-dessus de la cavité. Cette démonstration constitue une première étape importante de la thèse. Cependant, la configuration "cavité vers le haut" du banc optique ne permet pas de détecter la présence, au repos, de RBCs au-dessus de la cavité en

raison de la force gravitationnelle qui attire les cellules vers le bas. Pour y parvenir, nous avons travaillé dans la configuration " cavité vers le bas " .

De plus, comme mentionné précédemment, un point important de cette thèse était le problème technique auquel nous sommes confrontés, à savoir l'adhésion non-spécifique des RBCs à la surface des cristaux photoniques. Nous avons testé plusieurs approches pour résoudre ce problème, typiquement la passivation de surface et la modification de la solution tampon. Nous avons finalement proposé une nouvelle formulation de la solution tampon qui consiste à diluer les ions de PBS 1X - qui favorisent l'adhésion - avec une solution isotonique de sucrose de concentration 285 mM. Nous avons révélé qu'avec une solution mixte dont le rapport volumique est  $V_{\text{sucrose}}/V_{\text{PBS}} \sim 3.3$ , les RBCs présentent une forme discocyte et qu'au moins 50% des cellules n'adhèrent pas à la surface. Ce résultat important nous permet d'aborder le point principal de notre étude, à savoir la mesure de la déformabilité des RBCs.

La seconde étude représente la partie centrale de cette thèse dans lequel nous avons réussi à démontrer le concept de notre approche sur des globules rouges sains (hRBCs) et rigidifiés (rRBCs), obtenus par un traitement chimique des globules sains à le glutaraldéhyde. Un premier résultat important est que le décalage spectral en fonction de la puissance du laser de piégeage appliqué à un hRBC est  $\sim 1$  fois et demi plus important que celui d'un rRBC. Une étude statistique sur 17 hRBCs et 17 rRBCs a montré que cet écart était statistiquement significatif. Ceci constitue la démonstration la plus importante de ce travail de thèse qui valide ainsi notre approche. Cependant, ces résultats n'étaient pas cohérents avec un facteur 100 entre les modules d'Young des 2 populations mesurés par AFM. Les modélisations numériques réalisées montrent que ce décalage a deux origines : un rapprochement du globule rouge vers la surface de la cavité sous l'effet de la pression de radiation et sa déformation résultante. En corrélant l'étude statistique des décalages expérimentaux avec des modélisations, nous avons montré que les cellules saines et rigides se trouvent initialement à la même distance de 110 nm de la cavité. Ensuite, nous avons montré que l'application d'une puissance supérieure du laser de déformation entre 0,1 W et 30 mW, induit un rapprochement des rRBCs de  $\sim 70$  nm de la surface de la cavité.

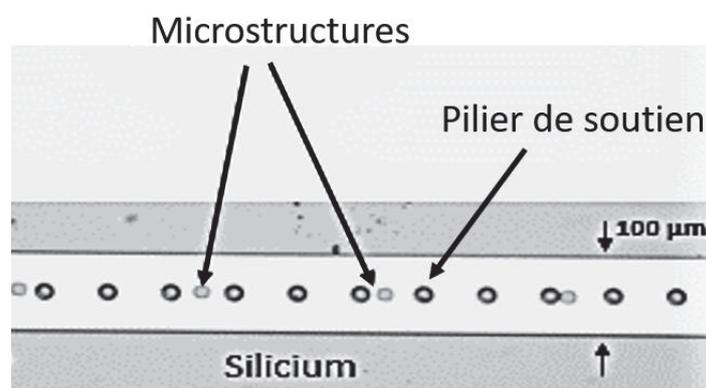
Cependant, dans le cas des hRBCs, deux processus physiques selon la puissance laser appliquée. Le premier, entre 0,1 mW et 1 mW est dominé par la déformation, et le second entre 1 mW et 30 mW est dominé par le rapprochement. Et donc, le saut de décalage spectral de  $\sim 43$  pm entre 0,1 et 1 mW correspond à une déformation latérale de l'ordre de  $\sim 800$  nm de chaque côté de hRBC , à une distance de 110 nm de la cavité. Et la variation de décalage de  $\sim 64$  pm entre 1 mW et 30 mW, correspond à un rapprochement des hRBCs de 70 nm de la surface de cavité. La détection optique de la déformation des globules rouges et la capacité à discriminer les cellules saines et rigides constituent l'aboutissement de cette thèse. Par conséquent, nous avons fait la démonstration du système qui a deux propriétés importantes : (i) une compatible avec

la manipulation d'objets biologiques et (ii) une mesure de déformabilité suffisamment sensible pour permettre la discrimination entre hRBCs et rRBCs.

Les perspectives directes de ce travail sont multiples. Sur le plan expérimental, une amélioration du système d'imagerie permettrait d'envisager d'imager directement la déformation des cellules et de corrélérer cette déformation avec le décalage de la résonance pour réaliser une calibration et ainsi mieux comprendre les phénomènes sous-jacents. Notons que la mise au point d'un système d'imagerie plus performant n'est pas directement nécessaire pour l'application de l'approche, mais qu'elle est indispensable dans la phase de développement du système. En outre, l'intégration d'un système d'interférométrie sur le banc optique permettrait en plus de suivre en temps réel « l'altitude » des globules rouges au-dessus de la cavité.

Il serait aussi intéressant de voir jusqu'où l'on peut aller pour discriminer des cellules rigidifiées présentant différentes signatures mécaniques. Pour cela la mesure de la déformabilité des globules rouges traités avec différents taux de rigidification permettrait d'évaluer la sensibilité de notre dispositif sur la détection de faible variation de déformation. Enfin, la validation de notre chambre optofluidique directement sur des cellules infectées par le parasite du palu seraient le point culminant de notre démarche.

Une des perspectives les plus importantes de cette thèse dans le but de voir notre approche appliquée un jour au diagnostic du paludisme est l'augmentation du débit d'analyse. Un point important qui n'a pas été abordé dans cette thèse est l'intégration d'un circuit microfluidique au-dessus des cavités photoniques. Cette fonctionnalité permettra des mesures dynamiques à haut débit. L'écoulement serait chargé d'acheminer les cellules vers les cavités et de s'assurer qu'elles sont suffisamment proches de leur surface pour effectuer la mesure et de permettre de passer une grande population de cellules. Dans ce contexte, des premiers essais d'alignement des cavités photoniques dans un système microfluidique ont été réalisées. Nous avons mis au point une méthode expérimentale performante qui nous permet d'aligner un microcanal avec des microstructures de l'ordre d'une dizaine de micromètre de côté, comme le montre la *Figure 65*.



*Figure 65 : Images microscopiques de l'alignement d'un canal microfluidique de 100 µm de large avec des microstructures représentant des cavités photoniques, sur un substrat de silicium.*

D'un autre côté, la technique que nous utilisons actuellement nécessite l'alignement de deux faisceaux : un pour piéger et déformer les cellules et l'autre pour lire optiquement cette déformation. Dans ce contexte, nous ne bénéficions pas de l'amplification des forces optiques permise par l'excitation de la cavité à la résonance. En effet, les cavités photoniques double période que nous utilisons ont été conçues pour générer des nanopinces optiques ayant des forces environ cent fois supérieures à celles générées par les pinces optiques classiques. Donc, l'excitation de la cavité photonique à la résonance permettrait d'augmenter les forces optiques appliquées aux cellules et par conséquent de déformer de manière plus importante les cellules sur la surface de la cavité. En outre, l'utilisation d'un même laser pour à la fois piéger, déformer et lire optiquement la déformation sera l'étape la plus importante pour simplifier et compacter le montage expérimental.

Maintenant que nous avons un outil pour étudier la déformabilité des globules rouges, nous pourrions aller plus loin dans l'étude physique du système biologique. Pour cela, il serait important de coupler l'aspect mécanobiologique à l'aspect photonique dans les modélisations numériques. A titre d'exemple, l'inclusion de la structure fine du globule rouge dans le modèle qui étudie la réponse mécanique dans le domaine fréquentiel. Cela aiderait à déterminer rapidement la corrélation entre les propriétés mécaniques pertinentes d'un seul RBC, comme les propriétés viscoélastiques dynamiques des cellules saines et infectées, ce qui permettrait de déterminer avec précision le stade d'infection des globules rouges.

# Annexe A

## Pinces optiques classique

### A.1. Propriétés des faisceaux gaussiens

La forme du faisceau lumineux émis par un laser est particulière, et correspond à un faisceau gaussien, ainsi nommé car l'intensité décroît suivant une loi gaussienne lorsqu'on s'écarte du centre du faisceau. Dans ce paragraphe, nous rappelons quelques propriétés importantes de ce type de faisceaux ce qui facilitera la compréhension du fonctionnement d'une pince optique.

L'allure du faisceau est représentée dans la figure A1. Il a une symétrie de révolution autour de l'axe Oz.

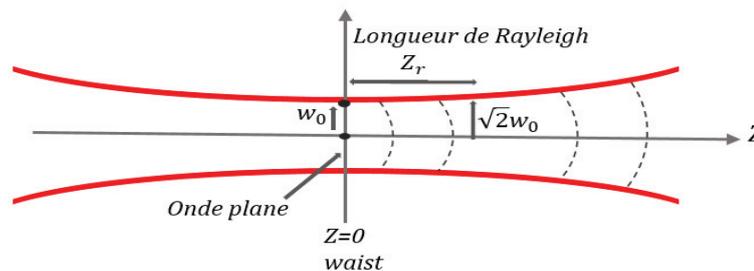


Figure A1 : Propriétés d'un faisceau gaussien [120]

W est le rayon du faisceau en un point de Oz, la loi d'évolution de W en fonction de Z est donné par [120]:

$$W(z) = w_0 \sqrt{1 + \left(\frac{z}{Z_R}\right)^2} \quad (A1)$$

Avec  $w_0$  est la taille minimale du faisceau qui diverge à partir de ce point. On l'appelle le "waist" du laser. Près du waist, l'onde gaussienne se comporte comme une onde plane et le faisceau est presque parallèle. Loin du waist, elle se comporte comme une onde sphérique centrée en  $Z=0$ . Le fait d'être "près du waist" signifie que Z est petit par rapport à une longueur caractéristique du faisceau appelée "longueur de Rayleigh" notée  $Z_R$  au bout de laquelle la taille du faisceau augmente d'un facteur  $\sqrt{2}$ , selon :

$$Z_R = \frac{\pi w_0^2}{\lambda} \quad (A2)$$

## A.2. Forces optiques

Les forces optiques peuvent être résumées en deux composantes principales, force de pression de radiation et force de gradient.

La force de pression radiative s'exprime avec la formule suivante :

$$\langle \overrightarrow{F_{rad}} \rangle = \frac{n_m k_{vecteur}^3}{c \times 6\pi} |\alpha_0|^2 I \overrightarrow{k_{vecteur}} \quad (A3)$$

Où  $n_m$  est l'indice optique de la particule,  $k_{vecteur}$ , le vecteur d'onde,  $I$ , l'intensité du faisceau,  $c$ , la célérité de la lumière et  $\alpha_0$ , la polarisabilité de la particule. Cette force est orientée dans la direction de propagation du laser.

La force de gradient est la force qui va attirer la particule vers un extremum d'intensité du faisceau, en fonction de sa polarisabilité. Cette polarisabilité est la capacité d'un objet à se comporter comme un dipôle électrique, en présence d'un champ électromagnétique. Plus la particule verra ses charges se séparer "facilement", plus elle sera polaire. On calcule la polarisabilité comme suit :

$$\alpha_0 = 4.r^3 \frac{(\epsilon_m - \epsilon_0)}{(\epsilon_m + 2\epsilon_0)} \quad (A4)$$

Avec  $r$ , le rayon de la particule,  $\epsilon_m$ , la permittivité de la particule  $\epsilon_m = \sqrt{n_m^2}$  et  $\epsilon_0$ , la permittivité du milieu. Notons que cette expression n'est valable que dans le cas de particules diélectriques.

Lorsque l'on travaille avec des particules dont l'indice du matériau est supérieur à celui du milieu, on a une polarisabilité positive. On se trouve donc dans le cas où la force de gradient entraine la particule vers l'intensité la plus élevée du faisceau, soit le centre. La force de gradient peut s'exprimer avec la formule ci-dessous :

$$\langle \overrightarrow{F_{grad}} \rangle = \frac{n_m}{2c} \alpha_0 \overrightarrow{\nabla I} \quad (A5)$$

Elle dépend donc du volume de la particule, des indices des milieux (fluide et particule) et du gradient d'intensité du faisceau  $\overrightarrow{\nabla I}$ . On peut donc résumer les forces optiques par la formule suivante :

$$\langle \overrightarrow{F_{tot}} \rangle = \langle \overrightarrow{F_{grad}} \rangle + \langle \overrightarrow{F_{rad}} \rangle = \frac{n_m}{2c} \alpha_0 \overrightarrow{\nabla I} + \frac{n_m k_{vecteur}^3}{c \times 6\pi} |\alpha_0|^2 I \overrightarrow{k_{vecteur}} \quad (A6)$$

Cette formule permet de calculer les forces optiques et de connaître, celle qui est prépondérante. La force de gradient est dirigée selon le gradient d'intensité et donc selon un profil de champ sphérique qui la concentre vers le centre du faisceau, peu importe sa position initiale.

## A.3. Stabilité d'une pince classique

Ici  $F_g \equiv F_{grad}$  et  $F_s \equiv F_{rad}$ .

L'expression de l'intensité d'un faisceau laser gaussien dans le système de coordonnées cylindrique est donnée par [64] :

$$I(z, \rho) = \frac{I_0}{\left(1 + \left(\frac{z\lambda}{\pi w_0}\right)^2\right)} e^{-\frac{2\rho^2}{w_0^2 \left(1 + \left(\frac{z\lambda}{\pi w_0}\right)^2\right)}} \quad (A7)$$

Avec  $I_0$  l'intensité de laser au point (0,0),  $\lambda$  sa longueur d'onde et  $w_0$  son waist.  
En remplaçant (A1) et (A2) dans (A7), on obtient

$$I(z, \rho) = I_0 \frac{w_0^2}{w(z)^2} e^{-\frac{2\rho^2}{w(z)^2}} \quad (A8)$$

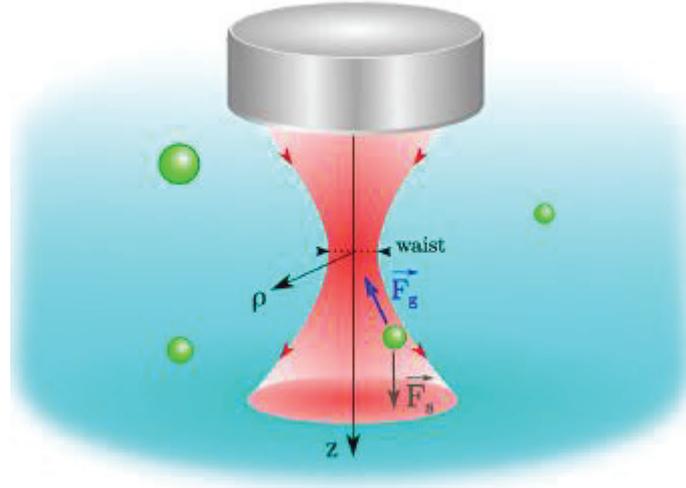


Figure A.3 : Illustration d'une pince optique classique dans un milieu aqueux, la particule qui rencontre le faisceau laser reste piégée dans le waist du laser à cause de la force de radiation.  
D'après [64].

La force de gradient est nulle lorsque la particule se trouve en  $z=0$ , et  $\rho = 0$ , là où le champ est le plus intense. Mais dès que la particule s'éloigne de ce point, elle subit une force qui va la ramener vers ce point d'équilibre (figure A.3). En résumé, les rayons réfléchis vont pousser la particule dans la direction du faisceau laser grâce à la force de pression de radiation, et ceux qui sont réfractés vont prendre la bille par le côté et la maintenir dans le point de focalisation du laser grâce à la force de gradient.

Donc, pour étudier la stabilité du laser, on cherche à quel moment la force de gradient devient plus grande que la pression de radiation. Les forces optiques s'écrivent :

$$\langle \vec{F}_g(\rho, z) \rangle = \frac{n_m}{2c} \alpha_0 \vec{\nabla} I = \frac{n_m}{2c} \alpha_0 \left( \frac{\partial I}{\partial \rho} \vec{e}_\rho + \frac{\partial I}{\partial z} \vec{e}_z \right) \quad (A.9)$$

$$\text{Et} \quad \langle \vec{F}_s \rangle = \frac{n_m k_{\text{vecteur}}^4}{c \times 6\pi} |\alpha_0|^2 I \vec{e}_z \quad (A.10)$$

On calcule la position  $z_m$  pour laquelle la force de gradient est maximale ( pour  $\rho = 0$  )

$$\frac{\partial \overline{Fg}_{(0,z)}}{\partial z} \Big|_{z=z_m} = \frac{n_m}{2c} \alpha_0 \left( \frac{\partial^2 I_{(0,z)}}{\partial z^2} \vec{e}_z \right) \quad (A.11)$$

$$\text{On obtient} \quad z_m = \pm \frac{z_R}{\sqrt{3}} \quad (A.12)$$

$z_m$  Admet deux solutions, parce que la force de gradient est maximal en deux positions avant et après le point d'équilibre.

On calcul maintenant les valeurs des forces de gradient et la pression de radiation en  $(0, z_m)$  :

$$\langle \overline{Fg}_{(0,z_m)} \vec{e}_z \rangle = \frac{n_m}{2c} \alpha_0 \frac{\partial I}{\partial z} \Big|_{\rho=0, z=z_m} = \frac{n_m}{2c} \alpha_0 \frac{-2I_0}{z_R^2} \frac{z_m}{\left(1 + \left(\frac{z_m}{z_R}\right)^2\right)^2} = \frac{3\sqrt{3}n_m\alpha_0 I_0}{16c z_R} \quad (A.13)$$

$$\text{Et} \langle \overline{Fs}_{(0,z_m)} \vec{e}_z \rangle = \frac{n_m k_{vecteur}^4}{c \times 6\pi} |\alpha_0|^2 I_{(0,z_m)} = \frac{2\pi^3 n_m \alpha_0^2 I_0}{c \lambda^4} \quad (A.14)$$

On cherche le rapport entre les deux forces selon l'axe Z :

$$R = \frac{\langle \overline{Fg}_{(0,z_m)} \vec{e}_z \rangle}{\langle \overline{Fs}_{(0,z_m)} \vec{e}_z \rangle} = \frac{3\sqrt{3}\lambda^4}{32\pi^3 z_R \alpha_0} \quad (A.15)$$

On obtient :

$$R = \frac{3\sqrt{3}\lambda^5}{128\pi^5 a^3 w_0^2 \alpha_0 \frac{(\epsilon_m - \epsilon_0)}{(\epsilon_m + 2\epsilon_0)}} \quad (A.16)$$

On aura un piège stable si ce rapport est supérieur à 1. On remarque que la stabilité est proportionnelle à la longueur d'onde et est inversement proportionnelle à la taille de la particule et au waist du faisceau laser. Par conséquent, plus le faisceau est bien focalisé, plus le waist du faisceau est petit, et plus le piège optique sera stable. D'autre part, lorsqu'elle est immergée dans l'eau, la particule est soumise à une force aléatoire liée au mouvement brownien, en plus des forces optiques. Cela ajoute une force supplémentaire. L'agitation thermique fait que la particule a maintenant une énergie cinétique moyenne équivalente à  $\frac{3}{2}k_b T$ , et ce qui aura pour conséquence de déstabiliser le piège optique.

#### A4. Piégeage dans un milieu aqueux

Albert Einstein a expliqué le mouvement brownien en 1905 [121], en termes de mouvement thermique aléatoire d'une molécule de fluide frappant la particule microscopique et lui faisant subir un mouvement aléatoire.

Comme le mouvement de la particule est aléatoire, nous pouvons alors utiliser les résultats de la physique statistique qui nous permettent de deviner la dynamique de la

particule. Selon la distribution de Boltzmann, la probabilité de trouver une particule à une position  $x$ , soumise à un potentiel  $U$ , et à une température  $T$  est définie par :

$$p(x) \propto e^{\frac{-U(x)}{k_b T}} \quad (A.17)$$

La probabilité de trouver une particule dans une position donnée est liée directement au potentiel dans lequel elle se trouve. La particule va explorer le potentiel avec une énergie d'environ  $k_b T$ , et suivant le profil de potentiel celle-ci reste piégée si la profondeur du puit est supérieure à  $10 k_b T$ .

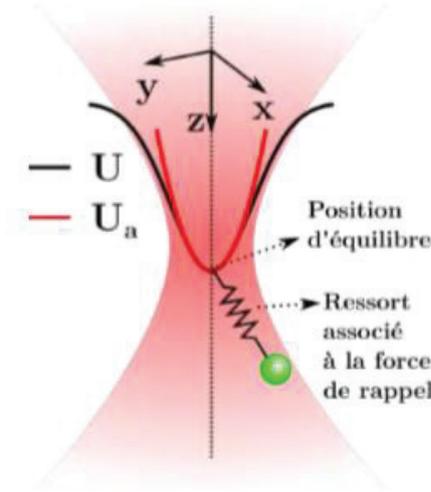


Figure A.4 : Potentiel associé à la force de gradients. La courbe noire représente le potentiel gaussien et la courbe rouge son approximation quadratique. Le ressort est associé à la force de rappel qui ramène la particule vers sa position d'équilibre. D'après [64].

La figure A.4 représente le potentiel associé aux forces de gradients, on remarque que ce potentiel devient anharmonique en éloignant de la position d'équilibre. Nous exprimerons le potentiel  $U$  dans les coordonnées cartésiennes, il correspond à un potentiel gaussien car il dérive de l'intensité du laser, la force de gradient s'écrit :

$$\langle \vec{F}_g \rangle = \frac{n_m}{2c} \alpha_0 \vec{\nabla} I = -\vec{\nabla} U \quad \text{avec} \quad U = -\frac{n_m}{2c} \alpha_0 I \quad (A.18)$$

Le potentiel  $U$  est symétrique en  $x$ ,  $y$  et  $z$  par rapport à la position d'équilibre de la particule qui correspond au maximum d'intensité donc au minimum du potentiel.

Nous ferons une approximation quadratique de ce potentiel au voisinage de la position d'équilibre. Cette approximation revient à considérer les forces optiques comme des forces de rappel auxquelles sont associées des constantes de raideurs.

$$\text{Soit} \quad U_a = \frac{1}{2} k_x x^2 + \frac{1}{2} k_y y^2 + \frac{1}{2} k_z z^2 \quad (A.19)$$

On calcule théoriquement les constantes de raideurs  $k_x$ ,  $k_y$  et  $k_z$  en faisant un développement limité de l'intensité. Comme l'intensité est une fonction paire de  $\rho$  et  $z$  par rapport à la position d'équilibre ( $\rho = 0$ ,  $z = 0$ ), on écrit alors :

$$I(z, \rho) \cong I(0, 0) + \frac{1}{2} \rho^2 \frac{\partial^2 I}{\partial \rho^2} \Big|_{\rho=0, z=0} + \frac{1}{2} z^2 \frac{\partial^2 I}{\partial z^2} \Big|_{\rho=0, z=0} + \rho z \frac{\partial^2 I}{\partial \rho \partial z} \Big|_{\rho=0, z=0}$$

On développe  $I$  en  $z$ , avec  $\rho = 0$  :

$$I(z, \rho = 0) = \frac{I_0}{1 + \frac{z^2}{z_R^2}} \cong I_0 \left(1 - \left(\frac{z}{z_R}\right)^2\right) \Rightarrow \frac{\partial^2 I}{\partial z^2} \Big|_{\rho=0, z=0} = \frac{-2}{z_R^2} \quad (\text{A.20})$$

Et de même on développe I en  $\rho$  avec  $z=0$  :

$$I(z=0, \rho) = I_0 e^{\frac{-2\rho^2}{w_0^2}} \cong I_0 \left(1 - \frac{2\rho^2}{w_0^2}\right) \Rightarrow \frac{\partial^2 I}{\partial \rho^2} \Big|_{\rho=0, z=0} = \frac{-4}{w_0^2} \quad (\text{A.21})$$

Et  $\frac{\partial^2 I}{\partial \rho \partial z} \Big|_{\rho=0, z=0} = 0$  car dans l'expression de I il n'y a pas de termes croisés entre  $z$  et  $\rho$

$$\text{Soit } I(z, \rho) \cong I_0 - \frac{z^2}{z_R^2} - \frac{2\rho^2}{w_0^2} \quad (\text{A.22})$$

$$\text{Alors } U_a \cong -\frac{n_m}{2c} \alpha_0 \left(I_0 - \frac{z^2}{z_R^2} - \frac{2\rho^2}{w_0^2}\right) = \frac{1}{2} k_\rho \rho^2 + \frac{1}{2} k_z z^2 \quad (\text{A.23})$$

Par identification on obtient :

$$k_\rho = \frac{n_m \alpha_0 I_0}{c} \frac{1}{w_0^2} \quad \text{et} \quad k_z = \frac{n_m \alpha_0 I_0}{c} \frac{1}{z_R^2} = \frac{n_m \alpha_0 I_0}{c} \frac{\lambda^2}{\pi^2 w_0^4} \quad (\text{A.24})$$

La constante de raideur radiale  $k_\rho$  est plus grande que celle de raideur axiale  $k_z$ , c'est-à-dire que la particule voit un potentiel moins raide selon l'axe du laser que selon son axe transversal, et on remarque que les deux raideurs sont proportionnelles à l'intensité et à la polarisabilité, donc au volume de la particule.

Par ailleurs, on peut remonter aux constantes de raideurs à partir de mesures expérimentales, on réécrit la probabilité de trouver une particule suivant  $x$  :

$$p(x) \propto e^{\frac{-U(x)}{k_b T}} \propto e^{\frac{-k_x}{2k_b T} x^2} \quad (\text{A.24})$$

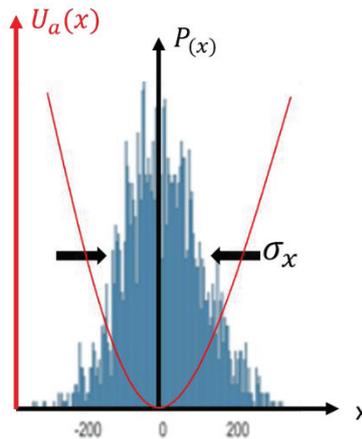


Figure A.5 : Histogramme expérimental de probabilité suivant un degré de liberté  $x$  d'une particule de  $1 \mu\text{m}$  piégée dans un potentiel et soumise au mouvement brownien.

Nous représentons dans la figure A.5 l'histogramme expérimental de la probabilité de présence de la particule piégée suivant le degré de liberté  $x$ . La distribution de l'histogramme étant directement liée à la forme du potentiel, on peut alors en déduire sa

forme. La probabilité  $P_{(x)}$  suit une loi normale. En effet il est possible d'utiliser le théorème d'équipartition de l'énergie lorsque la particule piégée est à l'équilibre thermodynamique, ce qui permet d'associer à chaque degré de liberté l'énergie  $\frac{1}{2}k_bT$ . Ce théorème nous permet d'écrire :

$$\frac{1}{2}k_x\langle x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_bT \quad (\text{A.25})$$

L'écart type de la particule selon x est donnée par la formule suivante :

$$\sigma_x^2 = \langle x^2 - \langle x \rangle^2 \rangle \quad (\text{A.26})$$

Or  $\langle x \rangle = 0$

$$\Rightarrow \sigma_x^2 = \langle x^2 \rangle$$

On aura donc,  $k_x = \frac{k_bT}{\sigma_x^2}$  et de même  $k_y = \frac{k_bT}{\sigma_y^2}$  (27)

En calculant l'écart type expérimentalement, on peut déduire les valeurs des constantes de raideurs.

# Annexe B

## Fabrication des canaux microfluidiques

La fabrication de microcanaux en PDMS repose sur la technique de lithographie douce. Dans cette annexe, nous détaillons les étapes de fabrication du maître-moule, le moulage puis démoulage du PDMS et finalement la fermeture du microsystème par collage plasma.

### B1. Fabrication du maître-moule

Pour fabriquer le maître-moule, nous utilisons la technique de lithographie qui permet de transférer un design d'un masque vers une résine photosensible déposée sur un substrat (qui peut être en verre ou bien en silicium). Les résines peuvent être classées en deux groupes : (i) les résines positives et (ii) les résines négatives. Une résine positive est un type de résine photosensible pour laquelle la partie exposée à la lumière devient soluble au révélateur et où la partie de résine photosensible non exposée reste insoluble. Par opposition, Une résine négative est un type de résine photosensible pour laquelle la partie exposée à la lumière devient insoluble au révélateur et où la partie de résine photosensible non exposée reste soluble. Pour la fabrication des microcanaux, nous avons utilisés de la résine négative SU82010 [122].

On dispose le substrat (galette de silicium) sur un plateau tournant à haute vitesse, afin d'étaler la résine de façon uniforme par force centrifuge. L'épaisseur de la couche déposée dépend de plusieurs facteurs liés au spin-coater, comme la vitesse de rotation, l'accélération et, dans une moindre mesure, le temps de l'opération. Ici pour obtenir des canaux de 10  $\mu\text{m}$  d'épaisseur, nous avons utilisé une vitesse de rotation de 500 rpm pendant 10 sec et avec une accélération de 200 rpm<sup>2</sup>, puis une vitesse de 3500 rpm pendant 30 sec et avec une accélération de 300 rpm<sup>2</sup>. Le solvant est évaporé par chauffage à 95°C pendant 2.5 min et à 95°C pendant 3.5 min. Ensuite, nous utilisons la photolithographie par contact, qui consiste à mettre le masque, présentant le design des canaux, en contact avec le substrat.

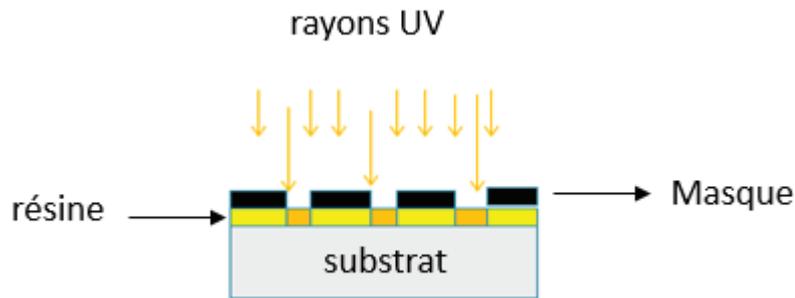


Figure B.1 : Schéma représentant l'insolation de la résine déposée sur le substrat, à l'aide d'un masque.

La résine ainsi déposée est sélectivement insolée par les rayons ultra-violet (UV), de puissance  $23 \text{ mW/cm}^2$ , pendant 5s à travers le masque (figure B.1). Après un dernier recuit à  $95^\circ\text{C}$  pendant 2.5 min et à  $95^\circ\text{C}$  pendant 3.5 min, le substrat est plongé dans le solvant Propylène glycol methyl ether acetate (PGMEA) [123] pendant 2.5 minutes pour dissoudre la résine qui n'a pas été exposée aux UV. Finalement une étape de silanisation en phase gazeuse est réalisée afin de faciliter le démoulage du PDMS sur la résine. Pour cela, le maître-moule est exposé sous vide à du silane (Trichloro 1H,1H,2H,2H-perfluorooctyl) [111] pendant au moins 3H00.

## B2. Le moulage puis démoulage du PDMS

Tout d'abord, on réalise le mélange de PDMS (Sylgard 184), avec un rapport 1/9 (base/réticulant). Pour éliminer les bulles formées lors du mélange, on centrifuge la solution à une vitesse de 1500 rpm pendant 1,5 minutes. Après la centrifugation, on verse le mélange obtenu sur le maître moule des canaux microfluidiques, et on le met sous vide pendant 5 minutes pour enlever les petites bulles générées au moment où le PDMS a été versé. Enfin on laisse réticuler dans le four sous une température de  $70^\circ\text{C}$  pendant une heure. On découpe soigneusement l'échantillon, en s'éloignant suffisamment des canaux pour éviter de les abimer et on démoule le PDMS délicatement à l'aide de pinces pour ne pas arracher la résine du maître-moule. Puis, on perce les trous correspondant aux entrées et sorties fluidiques grâce à un poinçon (0.75 mm) de taille adaptée au tube qui sera utilisé pour le transport des fluides.

## B3. Fermeture du microsystème par collage plasma.

Pour fermer le microsystème, il faut coller le PDMS sur un substrat. Celui-ci peut être une lame de verre, du silicium ou bien un autre substrat de PDMS. Dans notre cas nous utilisons des lames de verre pour qu'on puisse observer les canaux grâce au microscope optique en transmission. On met les deux surfaces à coller dans la chambre de l'ozonneur plasma et on les expose à un plasma oxygène pendant 3 minutes. L'oxygène ionisé modifie la chimie de surface du PDMS et produit des terminaisons silanol (Si-OH) à sa

surface. Cela permet de coller le PDMS de manière covalente (à l'échelle atomique) sur la surface des lames de verre également oxydée grâce à la création de liaison Si-O-Si [124].

## Annexe C

### Images microscopiques des tests d'adhésion de cellules

Nous montrons dans cette annexe les images microscopiques des tests d'adhésion, discutés dans le Chapitre 4, réalisés avec des globules rouges (RBCs) sur la surface des cristaux photoniques (CPs), en fonction du volume de PBS dans la solution mixte (PBS 1X + sucrose à 285 mM). L'objectif est de piéger les globules un par un avec une pince optique classique et de les déplacer sur la surface pour valider qu'elles ne sont pas collées sur celle-ci. Nous avons réalisé les tests sur 30 RBCs dans chaque condition.

Le premier essai sur 30 RBCs dans une solution contenant uniquement de sucrose à 285 mM montre que presque la totalité (98%) des globules rouges sont libres de se déplacer sur la surface (figure C.1). L'image microscopique de la figure C.1-a montre les globules distribués aléatoirement sur la surface de l'échantillon avant la manipulation. En utilisant les pinces optiques, nous avons pu organiser et regrouper ces globules rouges dans la zone encadrée en rouge de la figure C.1-b. Ceci permet de mettre en évidence la non-adhésion des RBCs dans la solution de sucrose. Cependant, les cellules présentent une forme de stomatocyte qui est liée à la sensibilité morphologique des RBCs à la variabilité inter/intra-donneur dans une telle solution.

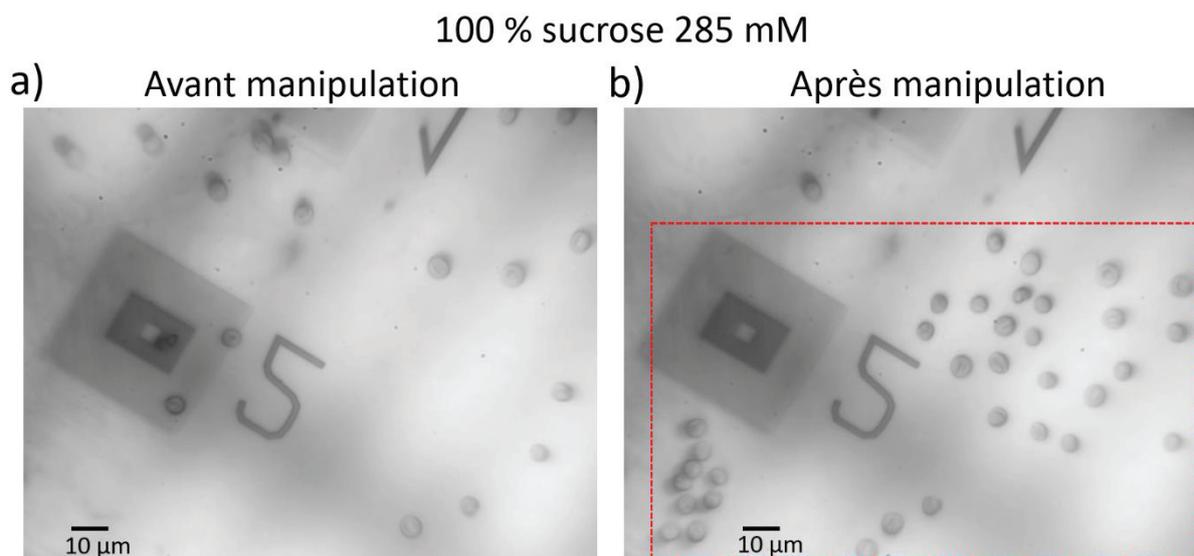


Figure C.1 : Images microscopiques de RBCs dans une solution 100% sucrose 285 mM sur la surface de l'échantillon contenant les CPs. a) avant manipulation avec le pince optique et b) après manipulation où les RBCs sont regroupé dans la zone encadrée en rouge.

Le test d'adhésion sur les RBCs suspendus dans notre solution mixte révèle que 56% de RBCs sont libres de se déplacer sur la surface. Les images microscopiques avant et après la manipulation sont présentées dans la figure C.2. De plus, Les RBC sont de forme discocyte dans notre solution mixte (sucrose 285 mM + PBS 1X) avec un ratio  $V_{\text{sucrose}}/V_{\text{PBS}} \sim 3.3$ .

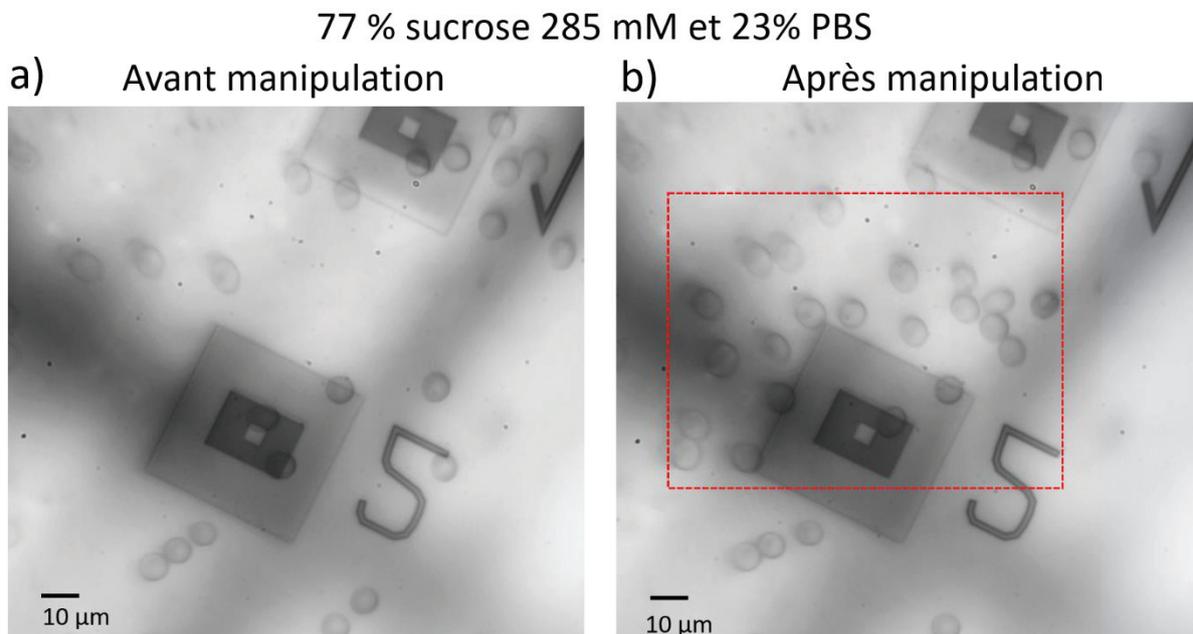
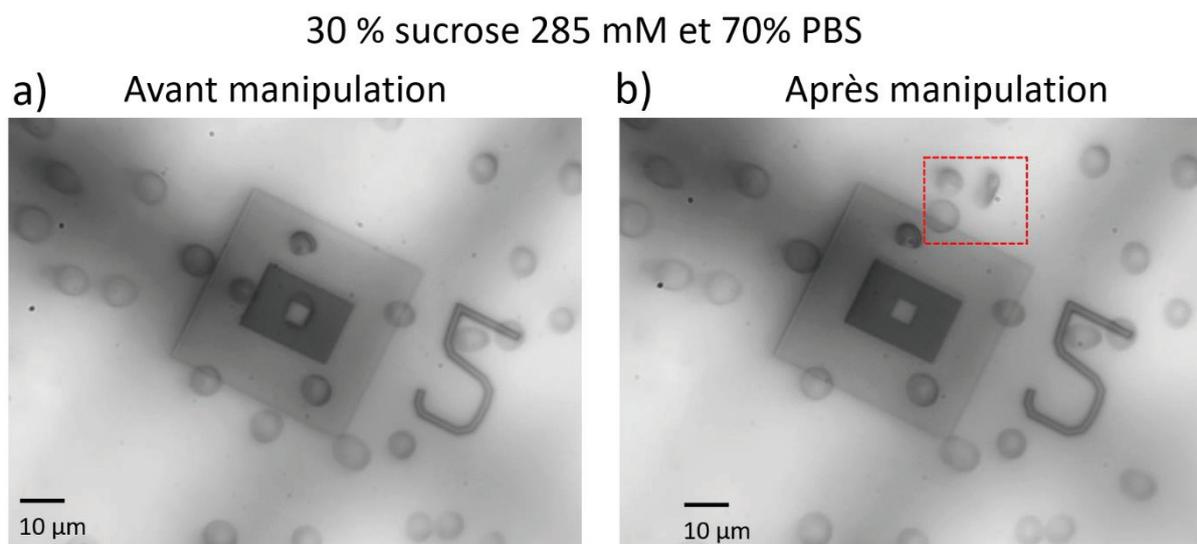


Figure C.2 : Images microscopiques de RBCs dans notre solution mixte (77 % sucrose 285 mM et 23 % PBS 1X) sur la surface de l'échantillon contenant les CPs. a) avant manipulation avec le pince optique et b) après manipulation où les RBCs sont regroupé dans la zone encadrée en rouge.

De même, nous montrons que 16% des cellules sont non-adhérentes sur la surface dans une solution contenant 70% de PBS 1X et 30 % de sucrose à 285 mM. La figure C.3 montre les images microscopiques avant (figure C.3-a) et après l'utilisation des pinces optiques (figure C.3-b).



*Figure C.3 : Images microscopiques de RBCs dans une solution 30 % sucrose 285 mM et 70 % PBS 1X) sur la surface de l'échantillon contenant les CPs. a) avant manipulation avec le pince optique et b) après manipulation où les RBCs sont regroupé dans la zone encadrée en rouge.*

Le test d'adhésion sur des RBCs en suspension dans une solution PBS 1X pure montre que presque une seule cellule sur 30 est libre de se déplacer sur la surface. Ceci met en évidence l'effet des ions dans la solution de PBS sur l'adhésion des cellules à la surface du substrat contenant les CPs.

## Bibliographie

- [1] « Propriétés mécaniques locales de cellules cancéreuses de la vessie mesurées par AFM - TEL - Thèses en ligne ». <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01234563> (consulté le 19 août 2022).
- [2] « La drépanocytose - ScienceDirect ». <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0338989800803078> (consulté le 19 août 2022).
- [3] D. E. McMillan, N. G. Utterback, et J. L. Puma, « Reduced Erythrocyte Deformability in Diabetes », *Diabetes*, vol. 27, n° 9, p. 895-901, sept. 1978, doi: 10.2337/diab.27.9.895.
- [4] K. J. Van Vliet, G. Bao, et S. Suresh, « The biomechanics toolbox: experimental approaches for living cells and biomolecules », *Acta Materialia*, vol. 51, n° 19, p. 5881-5905, nov. 2003, doi: 10.1016/j.actamat.2003.09.001.
- [5] « World malaria report 2021 ». <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240040496> (consulté le 31 août 2022).
- [6] F. Pages, E. Orlandi-Pradines, et V. Corbel, « Vecteurs du paludisme: biologie, diversité, contrôle et protection individuelle », *Médecine et Maladies Infectieuses*, vol. 37, n° 3, p. 153-161, mars 2007, doi: 10.1016/j.medmal.2006.10.009.
- [7] A. F. Cowman et B. S. Crabb, « Invasion of Red Blood Cells by Malaria Parasites », *Cell*, vol. 124, n° 4, p. 755-766, févr. 2006, doi: 10.1016/j.cell.2006.02.006.
- [8] L. M. Milne, M. S. Kyi, P. L. Chiodini, et D. C. Warhurst, « Accuracy of routine laboratory diagnosis of malaria in the United Kingdom. », *Journal of Clinical Pathology*, vol. 47, n° 8, p. 740-742, août 1994, doi: 10.1136/jcp.47.8.740.
- [9] G. Snounou, S. Viriyakosol, W. Jarra, S. Thaithong, et K. N. Brown, « Identification of the four human malaria parasite species in field samples by the polymerase chain reaction and detection of a high prevalence of mixed infections », *Molecular and Biochemical Parasitology*, vol. 58, n° 2, p. 283-292, avr. 1993, doi: 10.1016/0166-6851(93)90050-8.
- [10] « Detection of Plasmodium falciparum malaria parasites in vivo by real-time quantitative PCR ». <https://www.infona.pl/resource/bwmeta1.element.elsevier-ec746b7d-d49e-3e17-bce5-7206252c2ff3?&locale=pl> (consulté le 31 août 2022).
- [11] R. E. Coleman *et al.*, « Comparison of PCR and microscopy for the detection of asymptomatic malaria in a Plasmodium falciparum/vivax endemic area in Thailand », *Malar J*, vol. 5, n° 1, p. 121, déc. 2006, doi: 10.1186/1475-2875-5-121.
- [12] R. H. Gilman *et al.*, « ENDEMIC MALARIA IN THE PERUVIAN AMAZON REGION OF IQUITOS », *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, vol. 69, n° 1, p. 45-52, juill. 2003, doi: 10.4269/ajtmh.2003.69.45.
- [13] P. O. Ali, J. Okebe, et O. A. Oduwale, « Malaria rapid diagnostic tests for the case management of febrile children in Nigerian primary healthcare settings: a cross-sectional study », *Journal of the Egyptian Public Health Association*, vol. 97, n° 1, p. 10, mai 2022, doi: 10.1186/s42506-022-00105-5.
- [14] M. Mishra et R. Misra, « Immunochromatographic Methods in Malaria Diagnosis », *Medical Journal Armed Forces India*, vol. 63, n° 2, p. 127-129, avr. 2007, doi: 10.1016/S0377-1237(07)80054-2.
- [15] B. G. Andryukov, N. N. Besednova, R. V. Romashko, T. S. Zaporozhets, et T. A. Efimov, « Label-Free Biosensors for Laboratory-Based Diagnostics of Infections:

- Current Achievements and New Trends », *Biosensors*, vol. 10, n° 2, Art. n° 2, févr. 2020, doi: 10.3390/bios10020011.
- [16] S. Suresh *et al.*, « Connections between single-cell biomechanics and human disease states: gastrointestinal cancer and malaria », *Acta Biomaterialia*, vol. 1, n° 1, p. 15-30, janv. 2005, doi: 10.1016/j.actbio.2004.09.001.
- [17] C.-H. Wang et A. S. Popel, « Effect of red blood cell shape on oxygen transport in capillaries », *Mathematical Biosciences*, vol. 116, n° 1, p. 89-110, juill. 1993, doi: 10.1016/0025-5564(93)90062-F.
- [18] E. Evans et Y.-C. Fung, « Improved measurements of the erythrocyte geometry », *Microvascular Research*, vol. 4, n° 4, p. 335-347, oct. 1972, doi: 10.1016/0026-2862(72)90069-6.
- [19] « Membrane cytoplasmique : définition et explications », *AquaPortail*. <https://www.aquaportail.com/definition-2727-membrane-cytoplasmique.html> (consulté le 5 octobre 2022).
- [20] G. Tomaiuolo, « Biomechanical properties of red blood cells in health and disease towards microfluidics », *Biomicrofluidics*, vol. 8, n° 5, p. 051501, sept. 2014, doi: 10.1063/1.4895755.
- [21] C. Duprat et H. A. Shore, *Fluid-Structure Interactions in Low-Reynolds-Number Flows*. Royal Society of Chemistry, 2015.
- [22] T. E. Moschandreu, *Blood Cell: An Overview of Studies in Hematology*. BoD – Books on Demand, 2012.
- [23] W. Rawicz, K. C. Olbrich, T. McIntosh, D. Needham, et E. Evans, « Effect of Chain Length and Unsaturation on Elasticity of Lipid Bilayers », *Biophysical Journal*, vol. 79, n° 1, p. 328-339, juill. 2000, doi: 10.1016/S0006-3495(00)76295-3.
- [24] S. Hénon, G. Lenormand, A. Richert, et F. Gallet, « A New Determination of the Shear Modulus of the Human Erythrocyte Membrane Using Optical Tweezers », *Biophysical Journal*, vol. 76, n° 2, p. 1145-1151, févr. 1999, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77279-6.
- [25] A. Abay *et al.*, « Glutaraldehyde – A Subtle Tool in the Investigation of Healthy and Pathologic Red Blood Cells », *Frontiers in Physiology*, vol. 10, p. 514, 2019, doi: 10.3389/fphys.2019.00514.
- [26] I. Dulińska *et al.*, « Stiffness of normal and pathological erythrocytes studied by means of atomic force microscopy », *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 66, n° 1, p. 1-11, mars 2006, doi: 10.1016/j.jbbm.2005.11.003.
- [27] G. Prado, A. Farutin, C. Misbah, et L. Bureau, « Viscoelastic Transient of Confined Red Blood Cells », *Biophysical Journal*, vol. 108, n° 9, p. 2126-2136, mai 2015, doi: 10.1016/j.bpj.2015.03.046.
- [28] E. A. Evans, « Bending elastic modulus of red blood cell membrane derived from buckling instability in micropipet aspiration tests », *Biophysical Journal*, vol. 43, n° 1, p. 27-30, juill. 1983, doi: 10.1016/S0006-3495(83)84319-7.
- [29] W. H. Reinhart, N. Z. Piety, J. S. Goede, et S. S. Shevkoplyas, « Effect of osmolality on erythrocyte rheology and perfusion of an artificial microvascular network », *Microvascular Research*, vol. 98, p. 102-107, mars 2015, doi: 10.1016/j.mvr.2015.01.010.
- [30] P. M. S. Roma, L. Siman, B. Hissa, U. Agero, E. M. Braga, et O. N. Mesquita, « Profiling of individual human red blood cells under osmotic stress using defocusing microscopy », *JBO*, vol. 21, n° 9, p. 090505, sept. 2016, doi: 10.1117/1.JBO.21.9.090505.

- [31] M. Friebel, J. Helfmann, et M. C. Meinke, « Influence of osmolarity on the optical properties of human erythrocytes », *JBO*, vol. 15, n° 5, p. 055005, sept. 2010, doi: 10.1117/1.3486542.
- [32] « L'osmose dans notre cas : les globules rouges », *tpe sur les formes d'un globule rouge*, 1 février 2015. <https://tpeglobulerouge.wordpress.com/reveilleau/losmose-dans-notre-cas-les-globules-rouges/> (consulté le 15 juin 2022).
- [33] A. Amirouche, « Integration of functions dedicated to the mechanical solicitation and characterization of biological cells in microfluidic devices », phdthesis, Université de Lyon, 2017. Consulté le: 4 septembre 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01707400>
- [34] H. Schmid-Schönbein, J. V. Gosen, L. Heinich, H. J. Klose, et E. Volger, « A counter-rotating “rheoscope chamber” for the study of the microrheology of blood cell aggregation by microscopic observation and microphotometry », *Microvascular Research*, vol. 6, n° 3, p. 366-376, nov. 1973, doi: 10.1016/0026-2862(73)90086-1.
- [35] C. Renoux *et al.*, « Impact of surface-area-to-volume ratio, internal viscosity and membrane viscoelasticity on red blood cell deformability measured in isotonic condition », *Sci Rep*, vol. 9, n° 1, Art. n° 1, mai 2019, doi: 10.1038/s41598-019-43200-y.
- [36] E. A. Evans et R. M. Hochmuth, « Membrane viscoelasticity », *Biophysical Journal*, vol. 16, n° 1, p. 1-11, janv. 1976, doi: 10.1016/S0006-3495(76)85658-5.
- [37] R. Waugh et E. A. Evans, « Thermoelasticity of red blood cell membrane », *Biophysical Journal*, vol. 26, n° 1, p. 115-131, avr. 1979, doi: 10.1016/S0006-3495(79)85239-X.
- [38] E. A. Evans, « New Membrane Concept Applied to the Analysis of Fluid Shear- and Micropipette-Deformed Red Blood Cells », *Biophysical Journal*, vol. 13, n° 9, p. 941-954, sept. 1973, doi: 10.1016/S0006-3495(73)86036-9.
- [39] G. Binnig, C. F. Quate, et Ch. Gerber, « Atomic Force Microscope », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 56, n° 9, p. 930-933, mars 1986, doi: 10.1103/PhysRevLett.56.930.
- [40] Y. Yang, Y. Ren, M. Chen, Y. Arita, et C. Rosales-Guzmán, « Optical trapping with structured light: a review », *AP*, vol. 3, n° 3, p. 034001, mai 2021, doi: 10.1117/1.AP.3.3.034001.
- [41] L. Milord, « Dispositifs photoniques innovants pour le piégeage optique : Cavité étendue à double période et structure hybride cristal photonique-nano antenne », phdthesis, Université de Lyon, 2016. Consulté le: 4 septembre 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-01503154>
- [42] T. J. Smart, C. J. Richards, R. Bhatnagar, C. Pavesio, R. Agrawal, et P. H. Jones, « A study of red blood cell deformability in diabetic retinopathy using optical tweezers », in *Optical Trapping and Optical Micromanipulation XII*, août 2015, vol. 9548, p. 342-348. doi: 10.1117/12.2191281.
- [43] V. Saraogi, P. Padmapriya, A. Paul, U. S. Tatu, et V. Natarajan, « Change in spectrum of Brownian fluctuations of optically trapped red blood cells due to malarial infection », *JBO*, vol. 15, n° 3, p. 037003, mai 2010, doi: 10.1117/1.3427142.
- [44] A. Fontes *et al.*, « Mechanical properties of stored red blood cells using optical tweezers », in *Optical Trapping and Optical Micromanipulation II*, août 2005, vol. 5930, p. 439-444. doi: 10.1117/12.620758.
- [45] J. Guck *et al.*, « Optical Deformability as an Inherent Cell Marker for Testing Malignant Transformation and Metastatic Competence », *Biophysical Journal*, vol. 88, n° 5, p. 3689-3698, mai 2005, doi: 10.1529/biophysj.104.045476.

- [46] H. Engelhardt et E. Sackmann, « On the measurement of shear elastic moduli and viscosities of erythrocyte plasma membranes by transient deformation in high frequency electric fields », *Biophysical Journal*, vol. 54, n° 3, p. 495-508, sept. 1988, doi: 10.1016/S0006-3495(88)82982-5.
- [47] I. Doh, W. C. Lee, Y.-H. Cho, A. P. Pisano, et F. A. Kuypers, « Deformation measurement of individual cells in large populations using a single-cell microchamber array chip », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 100, n° 17, p. 173702, avr. 2012, doi: 10.1063/1.4704923.
- [48] « Institut Pierre-Gilles de Gennes pour la Microfluidique ». <https://www.institut-pgg.fr/> (consulté le 4 septembre 2022).
- [49] E. Team, « PDMS: A review », *Elveflow*, févr. 2021, Consulté le: 17 juin 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/general-microfluidics/the-polydimethylsiloxane-pdms-and-microfluidics/>
- [50] J. P. Shelby, J. White, K. Ganesan, P. K. Rathod, et D. T. Chiu, « A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by Plasmodium falciparum-infected erythrocytes », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, n° 25, p. 14618-14622, déc. 2003, doi: 10.1073/pnas.2433968100.
- [51] J. Picot *et al.*, « A biomimetic microfluidic chip to study the circulation and mechanical retention of red blood cells in the spleen », *American Journal of Hematology*, vol. 90, n° 4, p. 339-345, 2015, doi: 10.1002/ajh.23941.
- [52] H. Bow *et al.*, « A microfabricated deformability-based flow cytometer with application to malaria », *Lab Chip*, vol. 11, n° 6, p. 1065-1073, févr. 2011, doi: 10.1039/C0LC00472C.
- [53] « Dynamic deformability of Plasmodium falciparum-infected erythrocytes exposed to artesunate in vitro | Integrative Biology | Oxford Academic ». <https://academic.oup.com/ib/article-abstract/5/2/414/5204178> (consulté le 8 octobre 2022).
- [54] S. Braunmüller, L. Schmid, E. Sackmann, et T. Franke, « Hydrodynamic deformation reveals two coupled modes/time scales of red blood cell relaxation », *Soft Matter*, vol. 8, n° 44, p. 11240-11248, oct. 2012, doi: 10.1039/C2SM26513C.
- [55] Q. Guo, S. J. Reiling, P. Rohrbach, et H. Ma, « Microfluidic biomechanical assay for red blood cells parasitized by Plasmodium falciparum », *Lab Chip*, vol. 12, n° 6, p. 1143-1150, févr. 2012, doi: 10.1039/C2LC20857A.
- [56] W. G. Lee *et al.*, « Single red blood cell deformability test using optical trapping in plastic microfluidic chip », in *2005 3rd IEEE/EMBS Special Topic Conference on Microtechnology in Medicine and Biology*, mai 2005, p. 389-390. doi: 10.1109/MMB.2005.1548483.
- [57] T. Hänscheid, « Diagnosis of malaria: a review of alternatives to conventional microscopy », *Clinical & Laboratory Haematology*, vol. 21, n° 4, p. 235-245, 1999, doi: 10.1046/j.1365-2257.1999.00220.x.
- [58] K. Kertész *et al.*, « Gleaming and dull surface textures from photonic-crystal-type nanostructures in the butterfly *Cyanophrys remus* », *Phys. Rev. E*, vol. 74, n° 2, p. 021922, août 2006, doi: 10.1103/PhysRevE.74.021922.
- [59] S. Massaoudi, « Etude théorique et expérimentale des matériaux à bandes interdites photoniques bidimensionnels en micro-onde: application à l'ultraréfraction », phdthesis, Université Paris Sud - Paris XI, 2005. Consulté le: 4 septembre 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00178075>

- [60] « Photonic Crystals: Molding the Flow of Light ». <http://ab-initio.mit.edu/book/> (consulté le 4 septembre 2022).
- [61] E. Yablonovitch, « Photonic Crystals: Semiconductors of Light », *Scientific American*, vol. 285, n° 6, p. 46-55, 2001.
- [62] T. BENYATTOU, « La lumière manipulée par la matière: les cristaux photoniques », *La lumière manipulée par la matière: les cristaux photoniques*, p. 113-137, 2012.
- [63] « Experimental demonstration of a high quality factor photonic crystal microcavity: Applied Physics Letters: Vol 83, No 10 ». <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.1606866> (consulté le 4 septembre 2022).
- [64] M. Laurent, « Dispositifs photoniques innovants pour le piégeage optique : cavité étendue à double période et structure hybride cristal photonique-nano antenne », p. 183.
- [65] B. Cunningham, B. Lin, J. Qiu, P. Li, J. Pepper, et B. Hugh, « A plastic colorimetric resonant optical biosensor for multiparallel detection of label-free biochemical interactions », *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 85, n° 3, p. 219-226, juill. 2002, doi: 10.1016/S0925-4005(02)00111-9.
- [66] E. Chow, A. Grot, L. W. Mirkarimi, M. Sigalas, et G. Girolami, « Ultracompact biochemical sensor built with two-dimensional photonic crystal microcavity », *Opt. Lett., OL*, vol. 29, n° 10, p. 1093-1095, mai 2004, doi: 10.1364/OL.29.001093.
- [67] S. Chakravarty, J. Topol'ančik, P. Bhattacharya, S. Chakrabarti, Y. Kang, et M. E. Meyerhoff, « Ion detection with photonic crystal microcavities », *Opt. Lett., OL*, vol. 30, n° 19, p. 2578-2580, oct. 2005, doi: 10.1364/OL.30.002578.
- [68] M. Lee et P. M. Fauchet, « Two-dimensional silicon photonic crystal based biosensing platform for protein detection », *Opt. Express, OE*, vol. 15, n° 8, p. 4530-4535, avr. 2007, doi: 10.1364/OE.15.004530.
- [69] H. Lin, Z. Yi, et J. Hu, « Double resonance 1-D photonic crystal cavities for single-molecule mid-infrared photothermal spectroscopy: theory and design », *Opt. Lett., OL*, vol. 37, n° 8, p. 1304-1306, avr. 2012, doi: 10.1364/OL.37.001304.
- [70] S. Chakravarty *et al.*, « Multiplexed specific label-free detection of NCI-H358 lung cancer cell line lysates with silicon based photonic crystal microcavity biosensors », *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 43, p. 50-55, mai 2013, doi: 10.1016/j.bios.2012.11.012.
- [71] Z. Gharsallah, M. Najjar, B. Suthar, et V. Janyani, « High sensitivity and ultra-compact optical biosensor for detection of UREA concentration », *Opt Quant Electron*, vol. 50, n° 6, p. 249, juin 2018, doi: 10.1007/s11082-018-1520-2.
- [72] A. H. Aly, Z. A. Zaky, A. S. Shalaby, A. M. Ahmed, et D. Vigneswaran, « Theoretical study of hybrid multifunctional one-dimensional photonic crystal as a flexible blood sugar sensor », *Phys. Scr.*, vol. 95, n° 3, p. 035510, févr. 2020, doi: 10.1088/1402-4896/ab53f5.
- [73] Z. Gharsallah, M. Najjar, B. Suthar, et V. Janyani, « Slow light enhanced bio sensing properties of silicon sensors », *Opt Quant Electron*, vol. 51, n° 11, p. 358, oct. 2019, doi: 10.1007/s11082-019-2067-6.
- [74] S. E.-S. A. El-Ghany, W. M. Noum, Z. S. Matar, Z. A. Zaky, et A. H. Aly, « Optimized bio-photonic sensor using 1D-photonic crystals as a blood hemoglobin sensor », *Phys. Scr.*, vol. 96, n° 3, p. 035501, déc. 2020, doi: 10.1088/1402-4896/abd49c.
- [75] R. Therisod *et al.*, « Gram-type differentiation of bacteria with 2D hollow photonic crystal cavities », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 113, n° 11, p. 111101, sept. 2018, doi: 10.1063/1.5037849.

- [76] M. Tardif *et al.*, « Single-cell bacterium identification with a SOI optical microcavity », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 109, n° 13, p. 133510, sept. 2016, doi: 10.1063/1.4963070.
- [77] D. Conteduca, G. Brunetti, F. Dell’Olio, M. N. Armenise, T. F. Krauss, et C. Ciminelli, « Monitoring of individual bacteria using electro-photon traps », *Biomed. Opt. Express*, *BOE*, vol. 10, n° 7, p. 3463-3471, juill. 2019, doi: 10.1364/BOE.10.003463.
- [78] P. Kang, P. Schein, X. Serey, D. O’Dell, et D. Erickson, « Nanophotonic detection of freely interacting molecules on a single influenza virus », *Sci Rep*, vol. 5, n° 1, Art. n° 1, juill. 2015, doi: 10.1038/srep12087.
- [79] N. Gaignebet, « Réalisation et caractérisation de puces de capteurs à cristaux photoniques : Vers un dispositif de biodétection intégré », These de doctorat, Lyon, 2020. Consulté le: 4 juillet 2022. [En ligne]. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2020LYSEI128>
- [80] A. Shafkat, A. N. Z. Rashed, H. M. El-Hageen, et A. M. Alatwi, « Design and analysis of a single elliptical channel photonic crystal fiber sensor for potential malaria detection », *J Sol-Gel Sci Technol*, vol. 98, n° 1, p. 202-211, avr. 2021, doi: 10.1007/s10971-021-05490-5.
- [81] V. S. Chaudhary, D. Kumar, et S. Kumar, « Gold-Immobilized Photonic Crystal Fiber-Based SPR Biosensor for Detection of Malaria Disease in Human Body », *IEEE Sensors Journal*, vol. 21, n° 16, p. 17800-17807, août 2021, doi: 10.1109/JSEN.2021.3085829.
- [82] J. Liao, C. Ye, P. Agrawal, Z. Gu, et Y. S. Zhang, « Colloidal Photonic Crystals for Biomedical Applications », *Small Structures*, vol. 2, n° 5, p. 2000110, 2021, doi: 10.1002/sstr.202000110.
- [83] Ankita, S. Bissa, B. Suthar, et A. Bhargava, « Optical sensor for biomedical application based on photonic crystal with double defect », *Materials Today: Proceedings*, vol. 62, p. 5407-5410, janv. 2022, doi: 10.1016/j.matpr.2022.03.616.
- [84] F. Parandin, F. Heidari, Z. Rahimi, et S. Olyaei, « Two-Dimensional photonic crystal Biosensors: A review », *Optics & Laser Technology*, vol. 144, p. 107397, déc. 2021, doi: 10.1016/j.optlastec.2021.107397.
- [85] S. Mandal, J. M. Goddard, et D. Erickson, « A multiplexed optofluidic biomolecular sensor for low mass detection », *Lab on a Chip*, vol. 9, n° 20, p. 2924-2932, 2009, doi: 10.1039/B907826F.
- [86] H. Zhu, I. M. White, J. D. Suter, P. S. Dale, et X. Fan, « Analysis of biomolecule detection with optofluidic ring resonator sensors », *Opt. Express, OE*, vol. 15, n° 15, p. 9139-9146, juill. 2007, doi: 10.1364/OE.15.009139.
- [87] « Identification of Gram Negative Bacteria Using Nanoscale Silicon Microcavities | Journal of the American Chemical Society ». <https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/ja016555r> (consulté le 4 septembre 2022).
- [88] A. M. Forsyth, J. Wan, W. D. Ristenpart, et H. A. Stone, « The dynamic behavior of chemically “stiffened” red blood cells in microchannel flows », *Microvascular Research*, vol. 80, n° 1, p. 37-43, juill. 2010, doi: 10.1016/j.mvr.2010.03.008.
- [89] G. G. Bilodeau, « Regular Pyramid Punch Problem », *Journal of Applied Mechanics*, vol. 59, n° 3, p. 519-523, sept. 1992, doi: 10.1115/1.2893754.
- [90] J. Alcaraz *et al.*, « Microrheology of Human Lung Epithelial Cells Measured by Atomic Force Microscopy », *Biophysical Journal*, vol. 84, n° 3, p. 2071-2079, mars 2003, doi: 10.1016/S0006-3495(03)75014-0.

- [91] F. Rico, P. Roca-Cusachs, N. Gavara, R. Farré, M. Rotger, et D. Navajas, « Probing mechanical properties of living cells by atomic force microscopy with blunted pyramidal cantilever tips », *Phys. Rev. E*, vol. 72, n° 2, p. 021914, août 2005, doi: 10.1103/PhysRevE.72.021914.
- [92] E. Gerelli, « Nanopinces optiques à base de modes de Bloch lents en cavité », phdthesis, INSA de Lyon, 2012. Consulté le: 28 mai 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00838792>
- [93] M. F. Limonov, M. V. Rybin, A. N. Poddubny, et Y. S. Kivshar, « Fano resonances in photonics », *Nature Photon*, vol. 11, n° 9, Art. n° 9, sept. 2017, doi: 10.1038/nphoton.2017.142.
- [94] M. V. Rybin *et al.*, « Fano Resonance between Mie and Bragg Scattering in Photonic Crystals », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 103, n° 2, p. 023901, juill. 2009, doi: 10.1103/PhysRevLett.103.023901.
- [95] W. Zhou *et al.*, « Progress in 2D photonic crystal Fano resonance photonics », *Progress in Quantum Electronics*, vol. 38, n° 1, p. 1-74, janv. 2014, doi: 10.1016/j.pquantelec.2014.01.001.
- [96] M. Galli, S. L. Portalupi, M. Belotti, L. C. Andreani, L. O'Faolain, et T. F. Krauss, « Light scattering and Fano resonances in high-Q photonic crystal nanocavities », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 94, n° 7, p. 071101, févr. 2009, doi: 10.1063/1.3080683.
- [97] A. M. Gañán-Calvo et J. M. Gordillo, « Perfectly Monodisperse Microbubbling by Capillary Flow Focusing », *Phys. Rev. Lett.*, vol. 87, n° 27, p. 274501, déc. 2001, doi: 10.1103/PhysRevLett.87.274501.
- [98] « Formation of dispersions using “flow focusing” in microchannels: Applied Physics Letters: Vol 82, No 3 ». <https://aip.scitation.org/doi/abs/10.1063/1.1537519> (consulté le 30 mai 2022).
- [99] L. Yobas, S. Martens, W.-L. Ong, et N. Ranganathan, « High-performance flow-focusing geometry for spontaneous generation of monodispersed droplets », *Lab on a Chip*, vol. 6, n° 8, p. 1073-1079, 2006, doi: 10.1039/B602240E.
- [100] P.-G. de Gennes et F. Brochard-Wyart, *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Humensis, 2015.
- [101] T. Ward, M. Faivre, M. Abkarian, et H. A. Stone, « Microfluidic flow focusing: Drop size and scaling in pressure versus flow-rate-driven pumping », *ELECTROPHORESIS*, vol. 26, n° 19, p. 3716-3724, 2005, doi: 10.1002/elps.200500173.
- [102] J. D. Berry, M. J. Neeson, R. R. Dagastine, D. Y. C. Chan, et R. F. Tabor, « Measurement of surface and interfacial tension using pendant drop tensiometry », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 454, p. 226-237, sept. 2015, doi: 10.1016/j.jcis.2015.05.012.
- [103] H. H. J. Girault, D. J. Schiffrin, et B. D. V. Smith, « The measurement of interfacial tension of pendant drops using a video image profile digitizer », *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 101, n° 1, p. 257-266, sept. 1984, doi: 10.1016/0021-9797(84)90026-2.
- [104] A. D. Ward, M. G. Berry, C. D. Mellor, et C. D. Bain, « Optical sculpture: controlled deformation of emulsion droplets with ultralow interfacial tensions using optical tweezers », *Chemical Communications*, vol. 0, n° 43, p. 4515-4517, 2006, doi: 10.1039/B610060K.
- [105] M. Cagnet, M. Françon, et J. C. Thrierr, « Image d'une source ponctuelle dans le cas d'une ouverture circulaire. », juill. 2011, Consulté le: 10 juin 2022. [En ligne]. Disponible sur: <https://hal-sfo.ccsd.cnrs.fr/sfo-00608275>

- [106] A. Paul, P. Padmapriya, et V. Natarajan, « Diagnosis of malarial infection using change in properties of optically trapped red blood cells », *Biomedical Journal*, vol. 40, n° 2, p. 101-105, avr. 2017, doi: 10.1016/j.bj.2016.10.001.
- [107] S. K. Mohanty, K. S. Mohanty, et P. K. Gupta, « Dynamics of Interaction of RBC with optical tweezers », *Opt. Express, OE*, vol. 13, n° 12, p. 4745-4751, juin 2005, doi: 10.1364/OPEX.13.004745.
- [108] J. W. Pratt et J. D. Gibbons, « Kolmogorov-Smirnov Two-Sample Tests », in *Concepts of Nonparametric Theory*, J. W. Pratt et J. D. Gibbons, Éd. New York, NY: Springer, 1981, p. 318-344. doi: 10.1007/978-1-4612-5931-2\_7.
- [109] P. K. Dagur et J. P. McCoy Jr., « Collection, Storage, and Preparation of Human Blood Cells », *Current Protocols in Cytometry*, vol. 73, n° 1, p. 5.1.1-5.1.16, 2015, doi: 10.1002/0471142956.cy0501s73.
- [110] « Bovine serum albumin | Sigma-Aldrich ». <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/search/bovine-serum-albumin?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=bovine%20serum%20albumin&type=product> (consulté le 19 juillet 2022).
- [111] « 'trichloro | Sigma-Aldrich ». <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/search/'trichloro?dym=%27%27trichloro-per%20fluoro%20silane&focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=%27%27trichloro&type=product> (consulté le 20 juillet 2022).
- [112] H. M. Shang, Y. Wang, K. Takahashi, G. Z. Cao, D. Li, et Y. N. Xia, « Nanostructured superhydrophobic surfaces », *J Mater Sci*, vol. 40, n° 13, p. 3587-3591, juill. 2005, doi: 10.1007/s10853-005-2892-9.
- [113] A. Petreto, « Fonctionnalisation optimisée de différentes surfaces par des paires de FRET pour des applications de biodétection en plasmonique et en microfluidique », p. 175.
- [114] J. N. George, R. I. Weed, et C. F. Reed, « Adhesion of human erythrocytes to glass: The nature of the interaction and the effect of serum and plasma », *Journal of Cellular Physiology*, vol. 77, n° 1, p. 51-59, 1971, doi: 10.1002/jcp.1040770107.
- [115] N. Mohandas, R. M. Hochmuth, et E. E. Spaeth, « Adhesion of red cells to foreign surfaces in the presence of flow », *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 8, n° 2, p. 119-136, 1974, doi: 10.1002/jbm.820080203.
- [116] B. S. Ahluwalia, P. McCourt, T. Huser, et O. G. Hellesø, « Optical trapping and propulsion of red blood cells on waveguide surfaces », *Opt. Express, OE*, vol. 18, n° 20, p. 21053-21061, sept. 2010, doi: 10.1364/OE.18.021053.
- [117] « Sucrose | Sigma-Aldrich ». <https://www.sigmaaldrich.com/FR/fr/search/sucrose?focus=products&page=1&perpage=30&sort=relevance&term=sucrose&type=product> (consulté le 19 juillet 2022).
- [118] R. F. Furchgott et E. Ponder, « ELECTROPHORETIC STUDIES ON HUMAN RED BLOOD CELLS », *J Gen Physiol*, vol. 24, n° 4, p. 447-457, mars 1941.
- [119] H. P. Fernandes, C. L. Cesar, et M. de L. Barjas-Castro, « Electrical properties of the red blood cell membrane and immunohematological investigation », *Rev Bras Hematol Hemoter*, vol. 33, n° 4, p. 297-301, 2011, doi: 10.5581/1516-8484.20110080.
- [120] « Optique des Lasers et Faisceaux Gaussiens - Propriétés des faisceaux gaussiens ». <http://www.optique->

- ingenieur.org/fr/cours/OPI\_fr\_M01\_C03/co/Contenu\_08.html (consulté le 4 septembre 2022).
- [121] D. S. Lemons et A. Gythiel, « Paul Langevin's 1908 paper "On the Theory of Brownian Motion" ["Sur la théorie du mouvement brownien," C. R. Acad. Sci. (Paris) 146, 530–533 (1908)] », *American Journal of Physics*, vol. 65, n° 11, p. 1079-1081, nov. 1997, doi: 10.1119/1.18725.
- [122] « SU-82000DataSheet2000\_5thru2015Ver4.pdf ». Consulté le: 6 septembre 2022. [En ligne]. Disponible sur: [https://kayakuam.com/wp-content/uploads/2019/09/SU-82000DataSheet2000\\_5thru2015Ver4.pdf](https://kayakuam.com/wp-content/uploads/2019/09/SU-82000DataSheet2000_5thru2015Ver4.pdf)
- [123] « Propylene glycol monomethyl ether acetate ReagentPlus, = 99.5 108-65-6 ». <http://www.sigmaaldrich.com/> (consulté le 6 septembre 2022).
- [124] « "Soft" lithography Soft lithography and PDMS. Micro-contact printing. - ppt video online download ». <https://slideplayer.com/slide/3504828/> (consulté le 5 septembre 2022).

