

Numéro d'ordre : 40904

**UNIVERSITÉ LILLE NORD-DE-FRANCE**

**THÈSE**

Présentée à

**L'ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES POUR L'INGÉNIEUR**

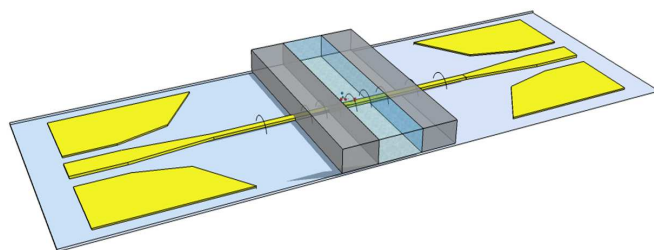
**Spécialité Micro et Nanotechnologies, Acoustique et  
Télécommunications**

par

**Simon LAURETTE**

Titre de la Thèse :

**Métrieologie Terahertz des liquides par  
microsystème microfluidique**



Soutenu le 06 Novembre 2012 devant le jury d'examen :

<b>Président</b>	Mr Aziz BENLARBI-DELAÏ	Professeur, L2E - Université Pierre et Marie Curie
<b>Rapporteur</b>	Mr Jean-Louis COUTAZ	Professeur, IMEP-LAHC - Université de Savoie
<b>Rapporteur</b>	Mr Guilhem GALLOT	Chargé de Recherche, LOB - Ecole Polytechnique
<b>Examineur</b>	Mr Marc LEFRANC	Professeur, PhLAM - Université Lille 1
<b>Examineur</b>	Mr Arnaud POTHIER	Chargé de Recherche, XLIM - Université de Limoges
<b>Examineur</b>	Mr Vincent THOMY	Maître de Conférences, IEMN - Université Lille 1
<b>Directeur de thèse</b>	Mr Bertrand BOCQUET	Professeur, IEMN - Université Lille 1
<b>Co-encadrant</b>	Mr Anthony TREIZEBRE	Maître de conférences, IEMN - Université Lille 1







# Résumé

Cette thèse présente la conception, la caractérisation et l'utilisation d'un microsystème intégrant des fonctions terahertz (THz) guidées. L'interprétation des mesures conduit à la définition d'une métrologie des liquides aux fréquences THz. Ceci est possible par le développement de systèmes robustes, versatiles et sensibles couplant circuits microfluidiques et guides d'ondes THz intégrés. La création d'un procédé technologique compatible avec les processus microélectroniques de fabrication en "salle blanche", et le choix d'une filière silicium/polymère/verre ont permis d'obtenir une résistance à des pressions de plus de 35bar dans des canaux de 50 $\mu$ m de large. De plus, l'assemblage des substrats en amont de la gravure des canaux permet une conception indépendante des circuits électromagnétique et fluide avec une définition de motifs inégalée pour ce type de microsystèmes. Les mesures réalisées avec ce dispositif ont permis d'atteindre une sensibilité aux protéines de l'ordre de 5mg/mL, état de l'art des dispositifs THz conventionnels, améliorant notablement les performances des dispositifs microfluidiques THz. Cette sensibilité a permis la caractérisation de l'hydratation de protéines en solution. Les calibrations in-situ, assurant l'obtention de mesures quantitatives, permettent d'atteindre leur nombre d'hydratation. Le couplage des mesures avec des techniques de chimométrie conduit à l'analyse plus fondamentale de la structure et la dynamique de la couche d'hydratation, confrontée avec succès à des modèles numériques. Nous aboutissons à la définition d'un laboratoire sur puce, couplant modélisation, mesures calibrées et interprétation statistique dans le spectre THz, qui par ses caractéristiques propres, contribue à la compréhension des phénomènes d'hydratation. Le véritable apport de cette technologie réside dans ses perspectives pour le suivi des interactions dynamiques nécessaire à une meilleure compréhension du vivant.

## Mots clés :

terahertz - spectroscopie - microsystèmes - hydratation - microfluidique



# Abstract

## Terahertz metrology on liquids in microfluidic microsystem

This work presents the conception, characterization and use of a microfluidic microsystem dedicated to liquid metrology at THz frequencies. First part focuses on developing a versatile and sensitive microsystem, co-integrating microfluidic and THz integrated functions. A glass/polymer/silicon technological process (clean-room process) has been developed and leads to a robust microfluidic network, where 35bar pressures can be reached without leakage. Since wafer bonding is performed before microchannel etching, a strong versatility is obtained for the microsystem conception. Indeed, microfluidic and electromagnetic circuits can be modified independently without changing technological process parameters. Measurements with the microsystem have shown that a 5mg/mL sensitivity is obtained for protein solutions, which is about the state of the art of conventional THz spectroscopy and which increases performances of THz integrated systems. This sensitivity enables to quantify hydration around soluted proteins by computing their hydration number. Moreover, ethanol/water mixtures measurements with the microsystem coupled with chemometrics analysis leads to a better understanding of hydration phenomenon. Dynamics and structure of hydration shells have been characterized in good agreement with Molecular Dynamics models. Thus, the developed microsystem permits a quantitative analysis of liquids in the THz spectrum, dedicated to dynamics interaction understanding in biological processes.

### Keywords :

terahertz - spectroscopy - microsystems - hydration - microfluidics

**Thèse préparée au sein du laboratoire :**

Institut d'Electronique de Microélectronique et de Nanotechnologies  
UMR CNRS 8520 - BP 60069  
Avenue Poincaré - Cité Scientifique  
59652 Villeneuve d'Ascq







# Remerciements

Les trois années de cette thèse se sont déroulées dans les murs de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologies de Villeneuve d'Ascq. Je remercie Messieurs Alain CAPPY et Lionel BUCHAILLOT, directeurs successifs de ce laboratoire, de m'y avoir accueilli.

Merci également à Vincent SENEZ de m'avoir accueilli au sein de l'axe Microsystèmes et du groupe BioMEMS.

Je remercie Monsieur Aziz BENLARBI-DELAÏ de m'avoir fait l'honneur de présider le jury de thèse.

Je remercie Messieurs Jean-Louis COUTAZ et Guilhem GALLOT d'avoir accepté de rapporter ce travail de thèse ; ainsi que Messieurs Marc LEFRANC, Arnaud POTHIER et Vincent THOMY d'avoir accepté de l'examiner.

Les deux personnes qui ont énormément contribué à l'avancement de ce travail furent mes encadrants. Je tiens à les remercier chaleureusement, et à leur témoigner de toute la gratitude qui leur est due. A Bertrand BOCQUET, pour le développement de cette thématique de recherche originale et pour la capacité à me motiver sans cesse dans le travail. Pour les longues discussions tout au long de ces trois ans sur des sujets variés, mais aussi pour ses qualités de cuisinier que chaque année j'ai eu l'occasion de vérifier (et j'espère que cela continuera !). A Anthony TREIZEBRE, pour le suivi et l'accompagnement au quotidien. Pour les résolutions de problèmes lors des manip, pour la formation durant ces trois années, aussi bien en salle blanche qu'en simulations électromagnétiques. Pour la capacité à faire avancer les choses quand tout paraît bloqué, et puis surtout, pour tous les cafés payés et les bons moments passés, à Groningen comme à Lucerne.

Je n'oublie pas non plus Nour BOURZGUI pour sa constante sympathie et son intérêt régulier pour l'avancement des travaux, aussi bien en recherche qu'en enseignement. Merci aussi à Adil EL AGLI, actuellement en dernière année de thèse dans l'équipe, pour le soutien constant et les discussions nombreuses que nous avons eues. Bonne continuation à toi ! Je remercie également Max BINAGOT et Basak HATIRNAZ pour les quelques mois partagés ensemble au sein de l'équipe.

J'ai pu lors de ce travail côtoyer Frédéric AFFOUARD, Ludovic DUPONCHEL et Rénato FROIDEVAUX pour de nombreuses et fructueuses collaborations. Je tiens sincèrement à les remercier pour leur accueil et leur disponibilité. Les réunions que nous avons eues furent parmi les moments les plus intéressants et captivants de ces trois ans.

Ce travail a bénéficié des instruments de la salle de caractérisation et la salle blanche. Merci beaucoup à Damien DUCATTEAU, Sylvie LEPILLIET et Vanessa AVRAMOVIC pour leur compétence et leur disponibilité lors des mesures haute fréquence. De même, je souhaite remercier l'ensemble du personnel de la salle blanche pour le développement du procédé technologique.

J'aimerais désormais remercier les collègues de bureau, avec qui il fut très sympathique de partager des moments de détente. Je pense aux nombreux conseils de Maxime (et aussi à ses blagues douteuses), à l'humour sans concession d'Alexis, au flegme et la sagesse de Vincent, et aux taquineries et à la bienveillance de Vincent. Merci également à Thomas, pour son aide précieuse dans la dernière ligne droite. Et puis, bien sûr, merci aux thésards du groupe, avec notamment Guillaume et Renaud, compagnons de la première heure et en première loge de tous les moments forts de ces 3 ans ; ainsi que Sébastien et Alfred, arrivés un peu plus tard.

J'ai eu la chance d'intervenir en tant que moniteur à Télécom Lille 1 et à l'UFR d'IEEA et souhaite y remercier toutes les personnes attentionnées avec qui j'ai travaillé : Sophie, Christophe, Kamal, Manuel, Davy, Laurent, Eric et Aurélien. Merci également à Patricia pour le développement du projet "Nano-Ecole" auquel j'ai participé avec beaucoup de plaisir.

Merci à toutes les personnes que j'ai croisées durant ces trois années, qui m'ont rendu un service, ou tout simplement avec qui j'ai pu discuter et passer un moment agréable.

Merci à mes proches de m'avoir permis de trouver un équilibre permanent et un bien-être quotidien. Que ma famille et mes amis trouvent ici un témoignage de la reconnaissance que j'ai envers eux. C'est à eux que je dédie ce manuscrit, avec une pensée particulière pour ceux qui ne sont plus.





# Table des matières

<b>Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1 Investigations Terahertz sur milieux liquides</b>	<b>3</b>
I Dynamique des milieux liquides . . . . .	5
A Spectroscopie diélectrique pour l'étude des protéines . . . . .	5
B Etudes Térahertz pour l'hydratation . . . . .	12
C Autres techniques de caractérisation . . . . .	16
II Les ondes Térahertz . . . . .	20
A Le spectre THz . . . . .	20
B Génération d'ondes THz . . . . .	20
C Domaines d'application des ondes Térahertz . . . . .	28
III Mesures Térahertz sur échantillons biologiques . . . . .	34
A Interaction entre onde THz et échantillon biologique . . . . .	34
B Mesures d'échantillons secs . . . . .	35
C Mesures sur tissus . . . . .	38
D Mesures sur échantillons liquides . . . . .	40
<b>2 Description, conception et tests du BioMEMS THz</b>	<b>45</b>
Introduction . . . . .	48
I Présentation du BioMEMS THz . . . . .	49
A Lignes de Goubau . . . . .	49
B Circuit microfluidique . . . . .	52
II Ancien procédé de fabrication du BioMEMS THz . . . . .	53
A Description . . . . .	53
B Limites du procédé technologique . . . . .	54
III Modifications lors de la fabrication du BioMEMS . . . . .	58
A Réduction de la taille des microsystèmes . . . . .	58
B Collage Quartz/Silicium . . . . .	59
C Gravure des microcanaux . . . . .	62
D Collage des capots par "découpe différentielle" . . . . .	67
IV Test et validation du dispositif . . . . .	70
A Aspect microfluidique . . . . .	70
B Aspect électromagnétique . . . . .	75
C Aspect Thermique . . . . .	76

Conclusion . . . . .	85
<b>3 Etude de l'hydratation de molécules par BioMEMS THz</b>	<b>87</b>
Introduction . . . . .	89
I Hydratation de l'éthanol sondée par BioMEMS THz . . . . .	91
A Protocole expérimental . . . . .	91
B Extraction de l'absorption . . . . .	92
C Absorption des solutions éthanol/eau à 95GHz . . . . .	94
D Etudes en dynamique moléculaire . . . . .	94
E Caractérisation de la couche d'hydratation de l'éthanol . . . . .	99
F Nombre d'hydratation . . . . .	104
II Analyse multivariée pour l'étude de l'hydratation . . . . .	107
A Optimisation du protocole de mesures . . . . .	107
B Caractérisation de l'hydratation par chimiométrie . . . . .	120
C Conclusion intermédiaire . . . . .	128
III Investigations sur protéines . . . . .	130
A Sensibilité des mesures sur protéines . . . . .	130
B Etude de l'hydratation des protéines . . . . .	137
Conclusion . . . . .	142
<b>4 Fonctions électromagnétiques et microfluidiques avancées</b>	<b>143</b>
Introduction . . . . .	145
I Fonctions électromagnétiques sur ligne de Goubau . . . . .	146
A Monter en fréquence . . . . .	146
B Mesurer l'indice de réfraction . . . . .	153
II Spécificité de l'écoulement microfluidique . . . . .	168
A Réaction hémoglobine/pepsine dans les microcanaux . . . . .	169
B Mélangeurs passifs dans les microcanaux . . . . .	176
Conclusion . . . . .	178
<b>Conclusion et perspectives</b>	<b>179</b>
<b>Références</b>	<b>200</b>
<b>Annexe : Protocole Technologique pour le BioMEMS THz</b>	<b>203</b>



# Introduction

La décennie écoulée a vu des développements technologiques et des applications dans une bande de fréquences nouvelle au sein du spectre électromagnétique. Confinée entre les champs scientifiques bien connus de l'optique et de l'électronique, cette bande intermédiaire a longtemps été dénommée "le gap TéraHertz (THz)". En effet, elle fut longtemps inaccessible et ce n'est que depuis récemment, par les progrès conjoints de l'optique et de l'électronique, que des sources et détecteurs d'ondes TéraHertz sont disponibles.

D'abord exploitées en astronomie, les propriétés des matériaux aux fréquences TéraHertz intéressent aujourd'hui chimistes et biologistes. En effet, elles correspondent aux fréquences de création et rupture des liaisons de faible énergie, omniprésentes dans les solutions aqueuses. Analyser la réponse d'un échantillon dans la bande THz, c'est donc sonder de façon directe la présence et l'état de ces liaisons en son sein. On comprend alors pourquoi cette zone du spectre électromagnétique est aujourd'hui plébiscitée dans le cadre de la mesure et de la détection d'interactions dans les milieux biologiques. Par exemple, l'hybridation de brins d'ADN, l'hydratation de molécules, l'état de tissus cellulaires sont des objets d'étude de la spectroscopie par ondes THz qui permet en outre une analyse en temps réel, sans utilisation de marqueurs, et non-ionisante.

Une limite, cependant, de l'analyse THz des milieux liquides est la forte absorption de l'eau à ces fréquences : à une fréquence de 1 THz, la puissance d'une onde traversant 1 mm d'eau est divisée par  $10^9$ . Analyser l'onde THz transmise au travers d'échantillons biologiques est donc, à première vue, complexe. Pour y parvenir, le recours à l'utilisation de sources de forte puissance a notamment été utilisé. L'échauffement induit dans le liquide sondé et l'intégration des sources sont alors des points limitants à prendre en compte. Une autre voie est la réduction des volumes des échantillons sondés. Dans ce cas, le contrôle des dimensions de l'échantillon est crucial et les procédés de fabrication propres aux microtechnologies sont susceptibles d'apporter une réponse adaptée et

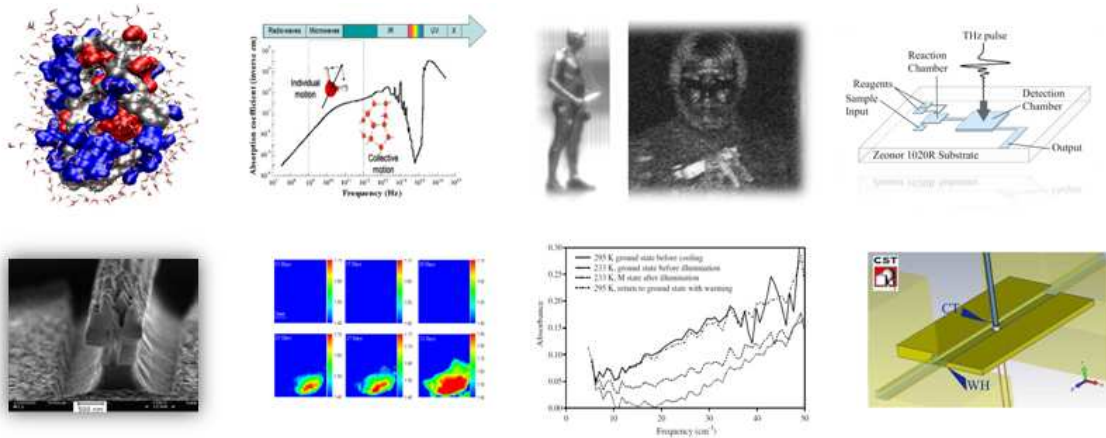
ouvrant des perspectives instrumentales nouvelles et originales. L'objectif du travail ici présenté sera de le démontrer.

A partir de travaux précédents ayant montré la faisabilité d'un microsysteme Téraherz dédié à la spectroscopie des liquides, il sera question ici de développer un microsysteme robuste, reproductible et sensible pour la caractérisation quantitative d'échantillons biologiques. Afin de permettre une variété de configurations expérimentales, le procédé de fabrication se devra d'être versatile.

C'est dans cet esprit qu'est écrit ce manuscrit. Dans un premier temps, les enjeux de l'analyse des interactions, et en particulier de l'hydratation, seront présentés. Pour y parvenir, le procédé de fabrication du microsysteme, l'outil de mesure, sera défini en seconde partie. Ensuite, des mesures sur liquides seront menées dans la troisième partie. En mesurant l'absorption de mélanges eau/alcool et eau/protéines, il sera montré que l'analyse quantitative de l'interaction entre l'eau et une espèce dissoute peut-être fournie. De plus, le couplage des mesures avec des algorithmes avancés de traitement et des simulations de dynamique moléculaire fournira une vision plus détaillée de la configuration moléculaire au sein du liquide. Enfin, de nouvelles configurations de mesure seront proposées pour étendre la bande de fréquences investiguée et pour mesurer l'indice de réfraction des échantillons.

# Partie 1

## Investigations Terahertz sur milieux liquides



Cette bibliographie a pour but de dégager les considérations actuelles en terme de caractérisation de liquides, en particulier pour le cas de l'hydratation. Un accent est mis sur les liquides biologiques, représentés par des protéines en solution. Dans ce contexte, le spectre des ondes Téraherz, son instrumentation et ses applications sont décrits.

## Sommaire

---

<b>I</b>	<b>Dynamique des milieux liquides</b>	<b>5</b>
A	Spectroscopie diélectrique pour l'étude des protéines	5
1	Théorie	5
2	Relaxation diélectrique de protéines en solution	10
B	Etudes TéraHertz pour l'hydratation	12
1	Etude subTHz et THz de solutions eau/alcool	12
2	Hydratation de protéines et de sucres	14
C	Autres techniques de caractérisation	16
1	Diffusion neutronique et effet Mössbauer	16
2	Fluorescence Infrarouge	18
<b>II</b>	<b>Les ondes TéraHertz</b>	<b>20</b>
A	Le spectre THz	20
B	Génération d'ondes THz	20
1	Approche électronique	22
2	Approche optique	25
3	La spectroscopie THz en domaine temporel (THz-TDS)	27
C	Domaines d'application des ondes TéraHertz	28
<b>III</b>	<b>Mesures TéraHertz sur échantillons biologiques</b>	<b>34</b>
A	Interaction entre onde THz et échantillon biologique	34
B	Mesures d'échantillons secs	35
C	Mesures sur tissus	38
D	Mesures sur échantillons liquides	40

---

## **I Dynamique des milieux liquides**

Selon Von Holde [1], le challenge majeur dans l'étude des protéines est la compréhension des mécanismes dynamiques auxquelles elles sont soumises. Dans ce cadre, l'hydratation, qui est l'interaction d'une protéine avec l'eau, joue un rôle prépondérant.

Dès 1917, l'interaction entre l'eau et les protéines est évoquée par Sorensen lorsqu'il étudie des cristaux d'ovalbumine [2, 3]. Il remarque la présence d'une eau résiduelle, liée aux protéines au sein de cristaux solides. La caractérisation de cette eau liée, dite d'hydratation a été ensuite fortement corrélée au développement de techniques instrumentales nouvelles (rayons X, résonance nucléaire magnétique...). Dans la suite, nous nous intéressons à la caractérisation de l'effet d'hydratation grâce à l'interaction d'échantillons avec un champ électrique variable. Ainsi, après une présentation de la spectroscopie diélectrique, les principaux résultats concernant les protéines en solution sont montrés. L'augmentation des fréquences d'investigation vers la bande THz est ensuite décrite ainsi que l'apport d'autres techniques instrumentales.

### **A Spectroscopie diélectrique pour l'étude des protéines**

#### **1 Théorie**

Les molécules d'eau sont des dipôles électrostatiques capables de s'arranger en réseaux par le biais de liaisons de faible énergie (liaisons hydrogène). En tant que dipôles, elles tendent à réagir à la présence d'un champ électrique en s'alignant dans sa direction. En raison du réseau de liaisons hydrogènes dans lequel l'eau est "engluée", cet alignement n'est cependant pas immédiat. L'étude de son amplitude et son déphasage par rapport au champ électrique est l'objet d'étude de la relaxation diélectrique, détaillée par la suite.

La réaction d'un échantillon au champ électrique extérieur (la polarisation) est caractérisée par sa permittivité diélectrique  $\epsilon$ . Elle quantifie la proportionnalité entre le vecteur déplacement  $D$  et le champ électrique  $E$  au sein d'un matériau ( $D = \epsilon E$ ). Dans le cas

d'un champ électrique extérieur permanent  $E_s$ , les dipôles finissent par s'orienter dans le sens du champ et l'échantillon est caractérisé par une permittivité diélectrique statique  $\epsilon_s$ . En revanche, lorsque l'échantillon est soumis à un champ de "très haute fréquence", les dipôles peinent à s'aligner à cause des forces résistives du réseau et la permittivité de l'échantillon est plus faible<sup>1</sup> :  $\epsilon_\infty < \epsilon_s$ . L'étude de la transition  $\epsilon(\omega)$  entre ces deux comportements aux fréquences extrêmes est au coeur de la relaxation diélectrique. Elle permet notamment de déterminer des constantes de temps de relaxation caractéristiques, ensuite reliées à la structure moléculaire de l'échantillon. Lors de l'excitation de l'échantillon par un champ électrique sinusoïdal, un déphasage apparaît entre l'oscillation de l'échantillon et celle du champ, ainsi  $\epsilon(\omega)$  est une grandeur complexe. Sa représentation typique en fonction de la fréquence est donnée en Figure 1.1. D'un point de vue temporel, la fonction  $\epsilon(t)$  donne la réponse de l'échantillon soumis à un échelon de champ électrique.

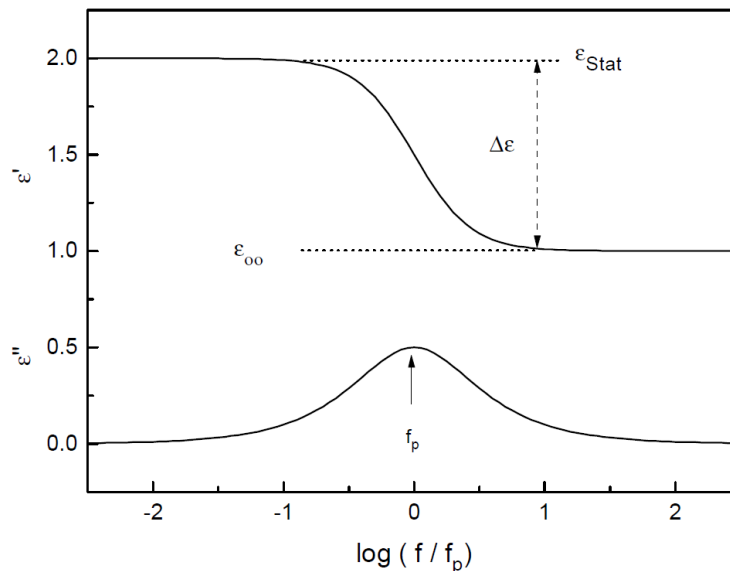


Fig. 1.1 – Exemple général de la dépendance de la permittivité diélectrique avec la fréquence - Mise en évidence d'une fréquence caractéristique [4]

Des modèles mathématiques ont été développés afin de décrire les évolutions de  $\epsilon(\omega)$ . Le plus connu est le modèle de Debye [5, 6]. En partant de l'hypothèse que la variation de la polarisation de l'échantillon est proportionnelle à sa polarisation actuelle, il vient la permittivité diélectrique suivante :

$$\epsilon(\omega) = \epsilon_\infty + \frac{\Delta\epsilon}{1 + j\omega\tau} \quad (1.1)$$

<sup>1</sup>Elle correspond notamment aux polarisations induites électroniques et atomiques.

C'est ce modèle qui est représenté en Figure 1.1. Il présente une fréquence particulière de relaxation  $f = 1/2\pi\tau$  et sa partie imaginaire est symétrique de part et d'autre de cette fréquence. Physiquement, un tel comportement peut-être obtenu par le modèle de "rotation diffusion" dans lequel les dipôles oscillants sont indépendants et subissent un frottement de type visqueux de la part de leur environnement. En réalité, rares sont les cas où le modèle de Debye est obtenu en mesures. Leurs parties imaginaires sont souvent plus étalées voire asymétriques. Une généralisation du modèle de Debye est ainsi nécessaire et est obtenue avec [7] :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta\varepsilon}{(1 + (j\omega\tau)^{\beta})^{\gamma}} \quad (1.2)$$

où  $\beta$  traduit l'élargissement de la courbe et  $\gamma$  son caractère asymétrique. Un tel modèle peut alors traduire des couplages d'oscillateurs ou la formation de "clusters" au sein d'une solution. Dans le cas de l'eau, de nombreux modèles ont été proposés pour expliquer l'élargissement observé. A titre d'exemple, Grant et Sheppard [8] ont montré que l'équation 1.2 pouvait être considérée comme la somme de deux modèles de Debye à temps de relaxation distincts<sup>2</sup>. Ceux-ci correspondraient à la dynamique de cassure de liaison hydrogène entre des molécules d'eau au sein de réseaux symétriques ou asymétriques (voir Figure 1.2).

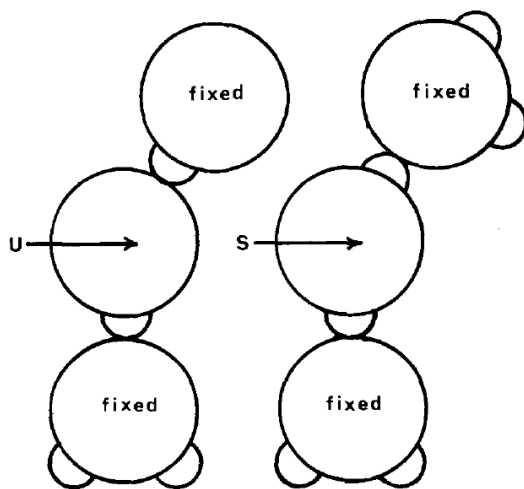


Fig. 1.2 – Réseaux asymétrique (u) et symétrique (s) de molécules d'eau responsables de l'élargissement de la permittivité diélectrique [8]

<sup>2</sup>Le modèle de l'équation 1.2 peut être décomposé en somme de modèles de Debye élémentaires. Pour autant, cette décomposition n'a pas forcément de réalité physique et les modèles de Debye élémentaires ne correspondent pas forcément à des processus de relaxation élémentaires. Une grande précaution doit être prise à ce sujet.

Parmi les résultats fondamentaux de la relaxation diélectrique, l'étude des liquides à des températures proches de la transition vitreuse ("glass-forming liquids") a mis en évidence une relaxation particulière : la relaxation  $\alpha$ . N'obéissant pas à un modèle de Debye pur, elle semble liée aux processus moléculaires opérant lors du changement de phase liquide/verre. La Figure 1.3 représente un exemple de relaxation  $\alpha$  dans le cas du salol [9] en fonction de la fréquence et de la température. La diminution de la température s'accompagne d'une diminution de la fréquence de relaxation, suivant la loi de Vogel-Fulcher-Tammann :

$$f(T) = f_{\infty} \exp\left(\frac{-DT_0}{T - T_0}\right) \quad (1.3)$$

où  $D$  est une constante et  $T_0$  la température idéale de transition vitreuse. Cette relaxation est fortement liée à la viscosité du solvant et est absente en milieu solide.

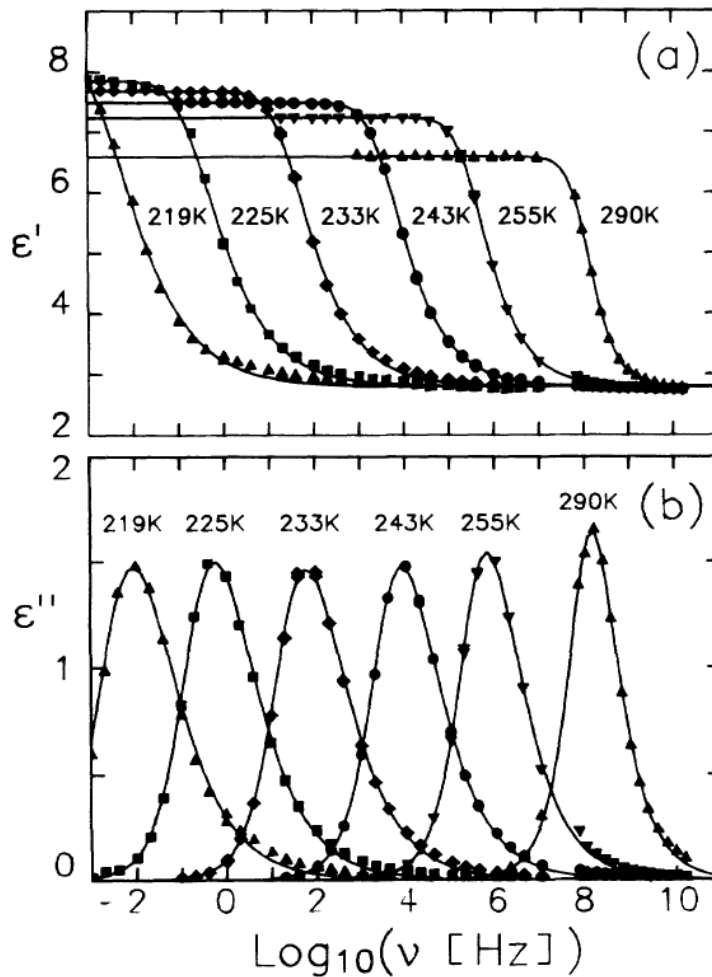


Fig. 1.3 – Relaxation  $\alpha$  dans le salol, en fonction de la fréquence et de la température [9]



A plus haute fréquence, une autre relaxation peut-être observée : la relaxation  $\beta$  qui, de manière simplifiée, peut être vue comme la fluctuation d'une molécule dans la "cage" formée par ses voisins. Son évolution en fonction de la température est caractérisée par une relation de type Arrhenius :

$$f(T) = f_{\infty} \exp\left(\frac{-E_A}{k_B T}\right) \quad (1.4)$$

où  $E_A$  représente l'énergie d'activation et  $k_B$  la constante de Boltzmann. La relaxation  $\beta$  est indépendante de la viscosité du liquide et est même présente en dessous de la température de transition vitreuse  $T_0$ . Une représentation des deux relaxations précédentes est donnée en Figure 1.4. Leur interprétation ainsi que le phénomène de transition vitreuse sont sujets à d'intenses recherches [10].

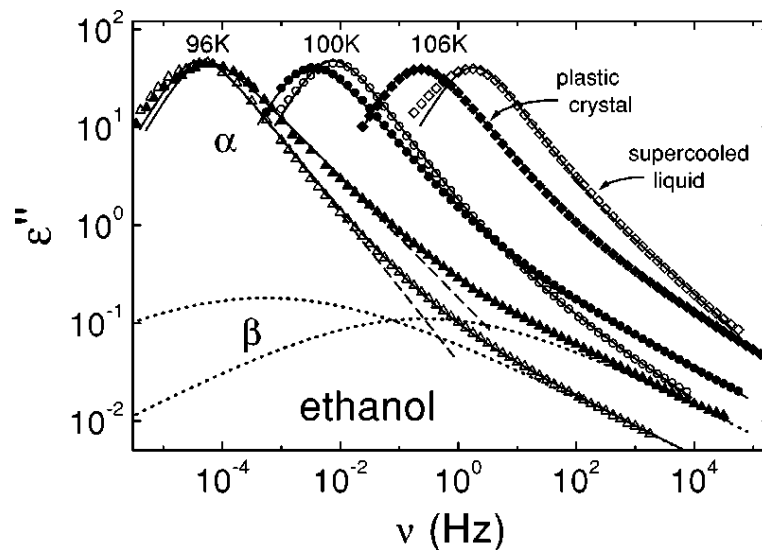


Fig. 1.4 – Relaxations  $\alpha$  et  $\beta$  pour l'éthanol à différentes températures [11]

Le paragraphe suivant s'intéresse à l'application de la relaxation diélectrique aux protéines. Bien que ces matériaux biologiques semblent éloignés des exemples développés précédemment, certaines mesures montreront qu'ils présentent des dynamiques ( $\alpha$  et  $\beta$ ) proches.

## 2 Relaxation diélectrique de protéines en solution

Expérimentalement, les solutions aqueuses de protéines présentent une permittivité diélectrique de la forme [12, 3] :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta_1}{1 + j\omega\tau_1} + \frac{\Delta_2}{1 + j\omega\tau_2} + \frac{\Delta_3}{1 + j\omega\tau_3} + \frac{\Delta_4}{1 + j\omega\tau_4} \quad (1.5)$$

Le terme de Debye d'indice 1 présente un temps de relaxation  $\tau_1$  de l'ordre de 70ns pour le cas d'une solution de myoglobine. Il est associé à la relaxation de la rotation de la protéine. Le terme d'indice 4 présente lui une relaxation  $\tau_4$  de l'ordre de 10ps et correspond à celle de l'eau bulk. Les termes d'indice 2 ( $\tau_2 \sim 10$ ns) et 3 ( $\tau_3 \sim 40$ ps) sont plus complexes. Ils semblent fortement liés à l'interaction entre la protéine et l'eau, c'est-à-dire à l'eau d'hydratation. Ils sont regroupés sous le nom de "dispersion  $\delta$ ". Plusieurs modèles ont été proposés pour les expliquer.

### **Fortement et faiblement liées**

Pethig [3] propose, suite à la comparaison de la relaxation diélectrique de protéines en solutions et de protéines à faibles taux d'hydratation, un modèle dans lequel l'eau d'hydratation se décomposerait en deux :

- une partie des molécules est fortement liée à la protéine et voit ainsi son temps de relaxation fortement augmenté par rapport à l'eau volumique (terme d'indice 2) ;
- l'autre partie des molécules est plus faiblement liée à la protéine mais suffisamment pour voir son temps de relaxation multiplié par 4 par rapport à l'eau bulk (terme d'indice 3).

L'eau d'hydratation ne présente donc pas un caractère unique mais montre deux types de comportements : plus ou moins liée.

### **Echanges dynamiques entre eau liée et eau bulk**

Nandi et Bagchi [13] ont proposé un autre modèle pour expliquer les deux constantes de temps observées par la relaxation diélectrique. Selon eux, l'eau d'hydratation est rigidement liée à la biomolécule et il existe un échange permanent entre l'eau d'hydratation et l'eau bulk. Eau bulk et eau liée sont représentées par deux états énergétiques distincts (Figure 1.5) et l'équilibre entre ces deux états est caractérisé par deux constantes de réaction :  $k_1$  (bulk  $\rightleftharpoons$  lié) et  $k_2$  (lié  $\rightleftharpoons$  bulk). Les auteurs montrent qu'un tel modèle d'échange permanent mène à un schéma à deux constantes de temps distinctes, expliquant ainsi l'ori-

gine des termes d'indice 2 et 3 dans l'équation 1.5.

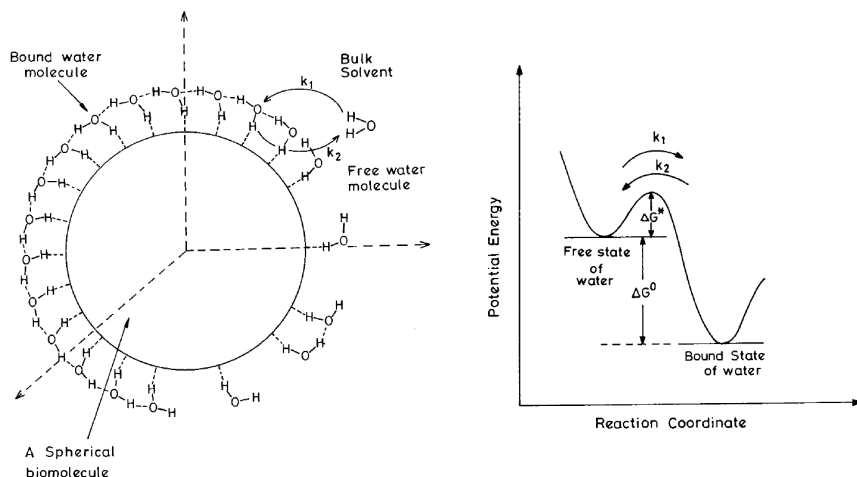


Fig. 1.5 – Modèle d'échange entre eau d'hydratation et eau bulk pour l'explication de la dualité de la couche d'hydratation [13]

### Interactions protéine/eau et orientations parallèles

Dans "What can really be learned from dielectric spectroscopy of protein solutions ?" [14], Oleinikova *et al.* remettent en cause les modèles précédemment présentés. Le modèle de Pethig ne tient pas face à des nouvelles mesures de relaxation magnétique (MRD) et des simulations en dynamique moléculaire (MD) qui ont montré que TOUTES les molécules d'eau d'hydratation présentent la relaxation rapide d'indice 3. Ainsi, un modèle définissant deux dynamiques au sein de la couche d'hydratation n'est pas satisfaisant. De même, le modèle de Nandi et Bagchi est critiqué car il prend pour hypothèse que la couche d'hydratation est rigidement liée à la protéine, ce que réfutent les mesures de MRD et les simulations de MD.

A partir de la synthèse de nombreux résultats de mesures, les auteurs proposent une vision nouvelle de la dynamique de la couche d'hydratation (dispersion  $\delta$ ). Selon eux, elle résulte en fait de 3 dynamiques différentes :  $\delta_1$ ,  $\delta_2$  et  $\delta_3$  associées respectivement aux constantes de temps  $\tau_1$  ( $\sim 2$ ns),  $\tau_2$  ( $\sim 500$ ps) et  $\tau_3$  ( $\sim 35$ ps). La dispersion  $\delta_1$  est reliée aux interactions (corrélations de moments dipolaires) entre la protéine et l'eau d'hydratation.  $\delta_3$  correspond à la relaxation propre des molécules d'eau d'hydratation, dont la dynamique est plus lente que celle de l'eau bulk. Cette diminution s'expliquerait par un arrangement davantage parallèle des moments dipolaires de l'eau dans la couche d'hy-

dratation par rapport à l'eau bulk. Le terme  $\delta_2$  est plus difficile d'interprétation et serait lié à la vibration de certaines chaînes polaires à la périphérie de la protéines. Les auteurs concluent : "In the past decade, there has been a change in paradigm with regard to hydration dynamics of proteins : For a long time, the picture of long-lived, rigid protein hydration has prevailed, and much of this picture has resulted from dielectric relaxation studies. It is now known that the hydration layer is highly mobile, with regard to both molecular reorientation and translational hydration water-bulk water exchange."

Ainsi, un "changement de paradigme" s'opère par la considération d'interactions dynamiques. Il est rendu possible par la diversification et la confrontation des techniques instrumentales (relaxation diélectrique et relaxation magnétique notamment) et par le développement de techniques de simulation comme la dynamique moléculaire. C'est avec cette idée de diversification que la section suivante présente des résultats récents issus du développement des ondes électromagnétiques de hautes fréquences : les TéraHertz (THz).

## **B Etudes TéraHertz pour l'hydratation**

La bande de fréquences THz correspond aux ondes électromagnétiques de fréquence comprise entre 100GHz et 30THz. L'énergie associée à ces ondes les rend sensibles aux liaisons faibles telle la liaison hydrogène rencontrée au sein des liquides. La spectroscopie THz est ainsi attendue comme fortement sensible aux effets d'hydratation, de conformation de protéines ou d'hybridation de l'ADN<sup>3</sup>.

### **1 Etude subTHz et THz de solutions eau/alcool**

Bien que la bande de fréquence THz démarre à 100GHz, il est intéressant de s'arrêter sur l'extension de la relaxation diélectrique jusque 90GHz proposée par Sato *et al.* [15, 16] sur des solutions eau/alcool. En mesurant des solutions eau/alcool à des concentrations différentes (fraction volumique d'alcool  $x$  variant de 0 à 1), ils modélisent la permittivité diélectrique des mélanges comme suit :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 + (j\omega\tau_1)^\beta} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + j\omega\tau_2} + \frac{\Delta\varepsilon_3}{1 + j\omega\tau_3} \quad (1.6)$$

---

<sup>3</sup>Dans ce paragraphe sont présentés des résultats concernant l'hydratation de molécules, sondée par ondes THz. La description plus avancée de cette technique, ainsi que ses principales applications, seront données dans la section suivante de ce manuscrit.

- Dans le cas des alcools purs ( $x = 1$ , éthanol ou isopropanol),  $\tau_1 \sim 350\text{ps}$  est associé à la vibration de chaînes formées de molécules d'alcool reliées par des liaisons hydrogène.  $\tau_2 \sim 20\text{ps}$  est associé à la vibration des molécules d'éthanol en bout de chaînes et  $\tau_3 \sim 2\text{ps}$  correspond aux molécules d'alcool libres.
- Pour l'eau pure ( $x = 0$ ), le terme d'indice 2 du modèle est nul.  $\tau_1 \sim 8\text{ps}$  correspond au temps de cohérence d'un réseau tétraédrique formé de 4 molécules d'eau alors que  $\tau_3 \sim 0.4\text{ps}$  révèle le temps mis pour une molécule d'eau pour passer d'un réseau tétraédrique à un autre.
- L'interprétation du modèle dans le cas des mélanges eau/alcool ( $0 < x < 1$ ) est plus complexe. Pour y parvenir, les auteurs observent la dépendance des paramètres du modèle en fonction de la concentration en alcool. Selon les auteurs,  $\tau_1$  correspondrait toujours à une vibration de chaînes d'alcool dans lesquelles s'intercaleraient petit à petit des molécules d'eau modifiant sa dynamique.  $\tau_2$  correspond à la vibration des molécules d'alcool en fin de chaîne et varie en fonction de la taille des chaînes et donc de la concentration en eau. Enfin,  $\tau_3$  correspond aux "groupes OH mobiles", aussi bien de l'eau libre que de l'alcool libre. Il n'est pas aisé de relier ce modèle avec un modèle d'hydratation de l'alcool. Il est cependant intéressant de remarquer que le terme d'indice 2 correspond aux vibrations des molécules d'alcool en fin de chaînes qui potentiellement interagissent avec de l'eau. Ainsi, c'est ce terme qui semble pertinent pour une interprétation en terme d'hydratation.

Cette étude a été étendue jusque 2.5 THz par Moller *et al.* [17] qui ont montré que l'augmentation en fréquence faisait apparaître un terme de vibration supplémentaire à l'équation 1.6. Celle-ci devient alors :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_\infty + \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 + (j\omega\tau_1)^\beta} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + j\omega\tau_2} + \frac{\Delta\varepsilon_3}{1 + j\omega\tau_3} + \frac{A_v}{\omega_v^2 - \omega^2 - j\omega\gamma_v} \quad (1.7)$$

Le cinquième terme de cette équation mérite une attention particulière. En effet, alors que les premiers termes sont de type "relaxation" (oscillation collective des dipôles), il correspond à une vibration d'oscillateurs à une fréquence de résonance. Andrea Markelz rapporte cette dualité dans [18] en donnant une forme générique pour la permittivité diélectrique :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_0 + \varepsilon_r \int_0^\infty \frac{h(\tau)d\tau}{1 + j\omega\tau} + \int_0^\infty \frac{f(\omega')g(\omega')}{(\omega'^2 - \omega^2) + j\gamma(\omega')\omega} d\omega' \quad (1.8)$$

où  $\epsilon_0$  est la permittivité diélectrique statique. Le second terme du membre de droite rassemble les procédés collectifs de relaxation (ici de types "Debye"). Le troisième terme rassemble les oscillateurs harmoniques, de densité d'état  $g(\omega)$ , d'amplitude  $f(\omega)$  et d'amortissement  $\gamma(\omega)$ . Alors que les phénomènes collectifs de relaxation sont l'apanage traditionnel de la spectroscopie diélectrique, les phénomènes vibrationnels oscillatoires relèvent plutôt d'une tradition des études en optique. Ceci explique que la spectroscopie sub-THz et THz d'échantillons a également pu être abordée par une voie différente de la relaxation diélectrique : celle de l'optique. Dans ce cadre, ce ne sont plus les parties réelle  $\epsilon'$  et imaginaire  $\epsilon''$  de la permittivité diélectrique que l'on cherche à déterminer, mais les paramètres de propagation tels l'indice de réfraction  $n$  et le coefficient d'absorption  $\alpha$ <sup>4</sup>.

Ainsi, Khurgin *et al.* [19] ont mesuré l'absorption de mélanges eau/alcool en fonction de la concentration à 150 GHz. Celle-ci est représentée en Figure 1.6 et montre que l'augmentation de la concentration d'alcool est associée à une chute non linéaire de l'absorption de la solution. L'écart de la courbe  $\delta\alpha$  à la loi linéaire de Beer-Lambert est expliqué par la présence d'eau liée à la molécule d'éthanol : c'est donc l'hydratation qui est responsable de la courbure observée. En supposant que l'eau liée à la molécule d'éthanol possède une absorption négligeable à la fréquence considérée devant l'eau bulk, les auteurs parviennent à déterminer le nombre de molécules d'eau liées à une molécule d'éthanol (nombre d'hydratation) qu'ils estiment à 4.

## 2 Hydratation de protéines et de sucres

L'étude de l'hydratation de protéines et de sucres aux fréquences THz a été fortement développée par l'équipe de Martina Havenith [20]. En étudiant l'absorption à des fréquences de l'ordre de 1 à 3 THz de dilutions de protéines ou de sucres dans l'eau, elle a elle-aussi mis en évidence un écart entre les mesures et la loi de Beer Lambert linéaire (Figure 1.7). L'absorption de la solution est ainsi modélisée comme la somme de l'absorption du soluté  $\alpha_{prot}$  (protéine/sucre), de l'absorption de l'eau bulk  $\alpha_w$  et de l'absorption de l'eau d'hydratation  $\alpha_{shell}$  (ici considérée comme unique<sup>5</sup>) :

$$\alpha = x_{prot}\alpha_{prot} + x_{shell}\alpha_{shell} + (1 - x_{prot} - x_{shell})\alpha_w \quad (1.9)$$

<sup>4</sup>Ces deux couples de grandeurs sont toutefois équivalents et peuvent être déduits l'un de l'autre.

<sup>5</sup>Le caractère unique de la couche d'hydratation est également évoqué par Arikawa *et al.* [21] qui, basant leur travaux sur ceux de Havenith, affirment que l'avantage de la spectroscopie THz est qu'elle voit l'eau d'hydratation comme un tout contrairement aux analyses plus basses fréquences. En revanche, une démonstration pour étayer ce propos n'est pas fournie.

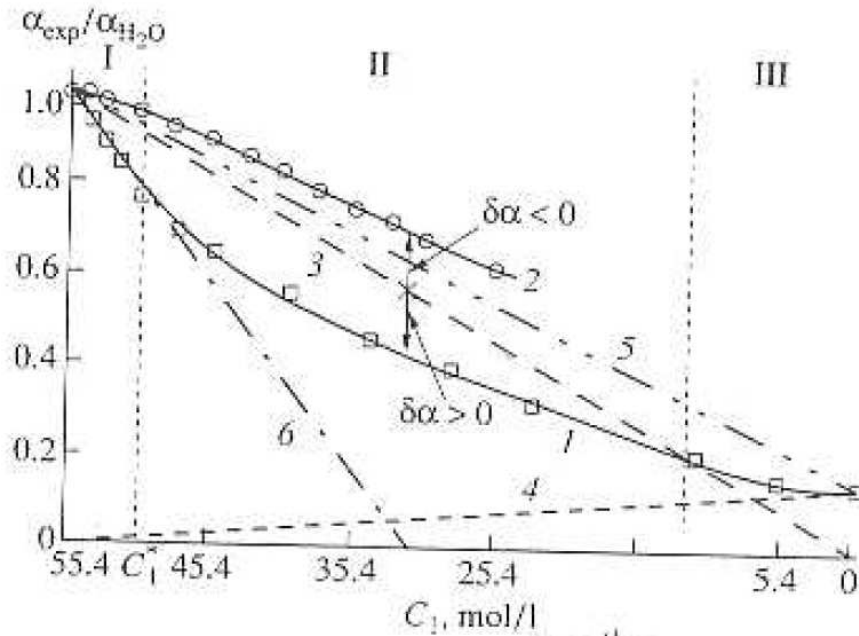


Fig. 1.6 – Absorption de solutions eau/alcool en fonction de la concentration en alcool -  $f=150\text{GHz}$  [19]

où  $x_{prot}$  et  $x_{shell}$  désignent les fractions volumiques de protéine et d'eau d'hydratation. Ce modèle à trois composantes comparé aux mesures permet de déterminer l'absorption de la couche d'hydratation et son extension. De manière surprenante, l'absorption de la couche d'hydratation est trouvée supérieure à celle de l'eau bulk. Les auteurs le justifient par la présence de liaisons hydrogène plus "fortes" au sein de la couche d'hydratation permettant une oscillation collective résonante.

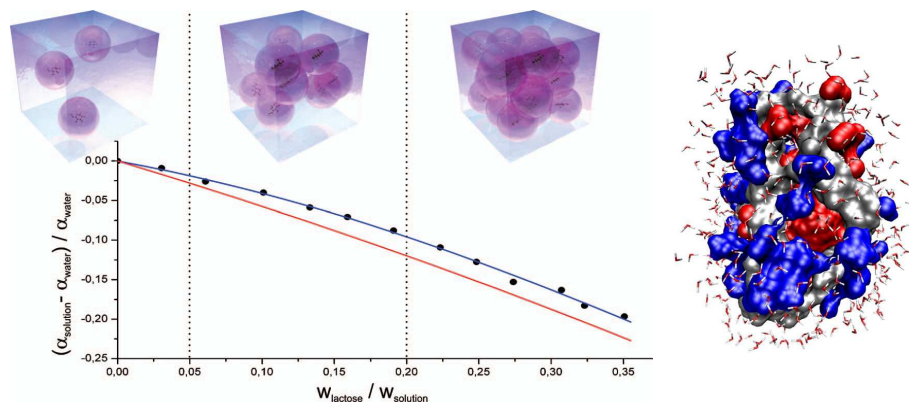


Fig. 1.7 – Absorption de solutions eau/protéines en fonction de la concentration - Hydratation de protéine [22, 23]

L'extension de la couche d'hydratation est trouvée supérieure à celle usuellement déterminée par méthode de rayons X qui, selon les auteurs, ne sondent que la couche d'hydratation "statique" [23]. Dans [24], ils montrent que l'absorption de la couche d'hydratation varie en fonction de la distance entre deux protéines, l'une pouvant influencer sur la couche d'hydratation de l'autre à distance.

Les éléments apportés par ces études montrent que l'interprétation de l'hydratation sondée par les fréquences THz est encore difficile et qu'une investigation approfondie est nécessaire. D'autres techniques expérimentales sont présentées dans la section suivante afin de donner un point de vue plus complet sur la compréhension actuelle de l'hydratation, qui semble être un point clef dans la compréhension des phénomènes biologiques. En effet, la sensibilité à la couche d'hydratation des ondes THz a notamment permis de mesurer également des changements de conformation de protéine, à travers le changement de structure de la couche d'hydratation.

## **C Autres techniques de caractérisation**

### **1 Diffusion neutronique et effet Mössbauer**

Michalarias *et al.* ont utilisé la diffusion neutronique pour la caractérisation de la couche d'hydratation [25]. Sensible à la dynamique des atomes d'hydrogène, cette technique a été utilisée pour caractériser l'hydratation de l'ADN et de protéines à la température de  $-80^{\circ}\text{C}$ . Les auteurs observent qu'une à deux couches d'eau composent l'eau d'hydratation et que les molécules d'eau les plus proches de la protéine ont un comportement de type "glace amorphe". Ensuite, plus l'eau est éloignée de la protéine, plus l'énergie nécessaire à son excitation est faible. Une application est donnée avec la mesure de deux protéines (chymotrypsine et  $\alpha$ -caséine) de conformations distinctes (native et dépliée) et montre une capacité de la diffusion neutronique à les discriminer.

Dans "A unified model of protein dynamics" [26], Frauenfelder *et al.* synthétisent les contributions apportées par la relaxation diélectrique, la diffusion neutronique et l'effet Mössbauer (spectroscopie d'absorption de rayons  $\gamma$ ) pour la compréhension de la dynamique des protéines. Dans ce modèle, le degré d'hydratation  $h$ , rapport des masses d'eau et de protéine, influe la fonction de la protéine.  $h = 0.2$  est nécessaire pour son activation mais  $h > 1$  est souvent nécessaire pour bénéficier d'un fonctionnement optimal. La protéine est représentée comme une macrostructure pouvant posséder un nombre important



d'états et de sous-états de conformation définis par un "paysage énergétique" [27] composé de vallées de stabilité (Figure 1.8). Le déplacement de la protéine dans ces vallées est guidé par ses interactions avec la couche d'hydratation et le solvant.

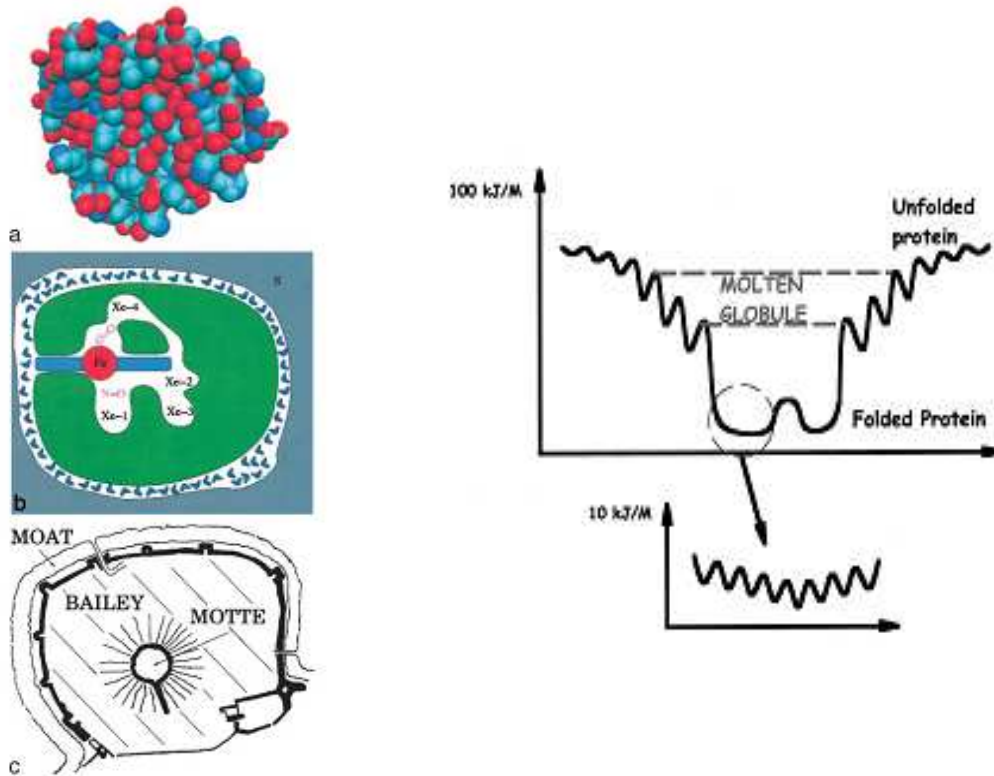


Fig. 1.8 – Gauche : structure de la protéine myoglobine [28]. Droite : Schéma du "paysage énergétique" d'une protéine [29]

Deux relaxations majeures sont mises en évidence pour qualifier ces interactions : une relaxation de type  $\alpha$  et une relaxation de type  $\beta$ , comme observé dans le cas des "glass-forming liquids". Les auteurs montrent que la relaxation  $\alpha$  conditionne les dépliements / repliements de protéine gouvernés par les fluctuations du solvant. En revanche, la relaxation  $\beta$  est liée aux vibrations internes à la protéine et est gouvernée par les fluctuations dans la couche d'hydratation. Autrement dit, les changements de conformations majeurs sont régis par la dynamique du solvant alors que les fluctuations internes sont induites par les vibrations des couches d'hydratation [30]. Ces fluctuations permettent à la protéine de se déplacer au sein du "paysage énergétique" et d'exprimer sa fonction : c'est donc l'environnement de la protéine qui lui permet de réaliser sa fonction. A titre de démonstration expérimentale, les auteurs étudient le cas de la myoglobine et montrent que l'ouverture de la protéine pour permettre le stockage et le relâchement d'un atome d'oxygène est

gouverné par le solvant alors que le déplacement de cet atome au sein de la protéine est gouverné par les fluctuations de la couche d'hydratation.

## 2 Fluorescence Infrarouge

Zhang *et al.* [31] proposent une cartographie de la couche d'hydratation de la myoglobine grâce à l'utilisation de marqueurs fluorescents (tryptophan). La relaxation de ces marqueurs est observée pour seize sites différents. A chaque site, deux relaxations temporelles  $\tau_1 \sim 1 - 8$ ps (10 fois supérieur au temps de relaxation de l'eau bulk) et  $\tau_2 \sim 20 - 200$ ps sont observées.  $\tau_1$  est attribuée à la relaxation de l'eau d'hydratation à proximité du marqueur et  $\tau_2$  au couplage protéine/eau. Les valeurs des constantes de temps diffèrent selon le site étudié et permettent ainsi une caractérisation locale de l'hydratation en différents sites. Précisément, une corrélation est établie entre l'évolution de  $\tau_1$  et  $\tau_2$  et la nature du site protéique occupé par le marqueur (Figure 1.9). Autour des boucles flexibles ("flexible loops") de la protéine, la relaxation est la plus rapide. Elle est ralentie lorsque le site protéique devient de plus en plus chargé ("partial charge", "heavy charge", "dense charge"), par l'augmentation des interactions électrostatiques. L'analyse par fluorescence associée à l'utilisation de marqueurs a ainsi l'avantage de permettre un mappage précis de l'hydratation. Toutefois, la dynamique locale est également modifiée par la présence du marqueur. Ainsi se justifie le couplage de cette méthode avec d'autres non-invasives comme la relaxation diélectrique ou la spectroscopie THz.

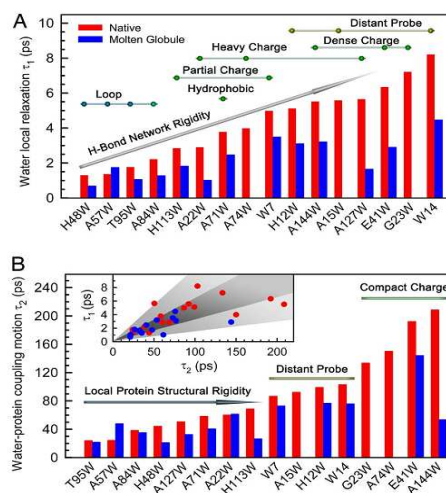
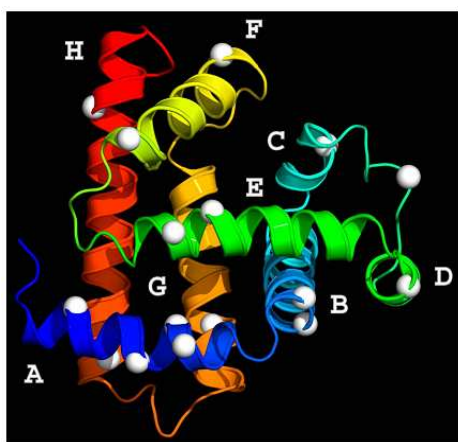


Fig. 1.9 – Gauche : sites protéiques investigués pour la myoglobine. Droite : temps de relaxation  $\tau_1$  et  $\tau_2$  pour les différents sites [31]

## Synthèse

L'amélioration des techniques instrumentales de caractérisation a permis de dégager des modèles d'hydratation des molécules d'intérêt biologique. Il est désormais établi que l'hydratation est nécessaire à l'expression de la fonction d'une protéine et qu'elle résulte de procédés dynamiques. C'est la conjonction de différentes mesures, associée à des calculs en dynamique moléculaire qui permet d'affiner la compréhension moléculaire de ces interactions. La qualité des mesures expérimentales ainsi que la concentration au sein d'une même plateforme de diverses techniques de caractérisation est donc un enjeu. Cette propriété est par ailleurs généralisable à tout problème biologique, complexe par essence. En ce sens, l'approche de miniaturisation et d'intégration qu'apportent les travaux actuels en microfluidique/Lab-on-chip sera peut-être la voie qui permettra des avancées significatives dans la compréhension des systèmes biologiques.

Cette partie s'est attachée à décrire la caractérisation de l'hydratation. Au-delà d'une volonté de comprendre les mécanismes propres à ce phénomène, cette étude mène à d'autres applications pratiques. Par exemple, la propriété de "biopréservation" de certaines espèces vivantes (comme le tardigrade) dans des conditions environnementales extrêmes semble directement liée aux interactions élémentaires entre protéines, sucres et eau. De plus, d'un point de vue instrumental, s'il est possible de sonder l'hydratation, c'est-à-dire l'enveloppe de solvant autour d'une protéine, il est potentiellement possible de :

- distinguer des protéines différentes qui posséderont des enveloppes différentes ;
- distinguer différentes conformations d'une même protéine, chacune ayant sa propre enveloppe.

Dans la suite, nous nous attachons à décrire les résultats dans ces domaines de la spectroscopie Téraherz. Après une brève description de son développement et sa spécificité, les techniques d'investigations THz sur milieux biologiques seront présentées. La problématique de l'analyse d'échantillons liquides sera ainsi soulevée et les solutions mises en oeuvre explicitées.

## **II Les ondes TéraHertz**

### **A Le spectre THz**

Le spectre TéraHertz correspond, d'une manière générale, aux ondes électromagnétiques dont les fréquences sont comprises entre 100GHz et 30THz. Cette bande a longtemps été nommée "Gap THz" car, située entre les champs de l'optique et de l'électronique, l'instrumentation nécessaire à son défrichage s'est développée tardivement. En effet, ce sont les électroniciens en augmentant leurs fréquences d'investigations, et les opticiens en développant des composants en infrarouge lointain, qui ont permis à la bande THz d'être aujourd'hui accessible. Cette double origine laisse des traces sur la manière d'aborder cette gamme de fréquence. Tout d'abord, en terme d'instrumentation, les sources et les détecteurs sont issus des deux communautés et sont le fruit d'une grande diversité (Figure 1.10). Ensuite, en terme de caractérisation d'échantillons, l'utilisation de la permittivité diélectrique (approche électromagnétique) cotoie une approche optique basée sur les notions d'absorption et de réfraction.

Dans un premier temps, une présentation de méthodes standards d'émission et de détection d'ondes TéraHertz sera effectuée. Ensuite, les applications majeures de ces ondes seront présentées et un approfondissement sur les applications biologiques sera mené. Les résultats marquants et les méthodes expérimentales seront ensuite décrits afin de définir la problématique de ce travail de thèse.

### **B Génération d'ondes THz**

Deux approches majoritaires existent pour réaliser la génération d'onde THz : l'approche électronique et l'approche optique/opto-électronique [33]. Dans la première, la génération est réalisée *via* le déplacement haute fréquence des charges électriques mobiles

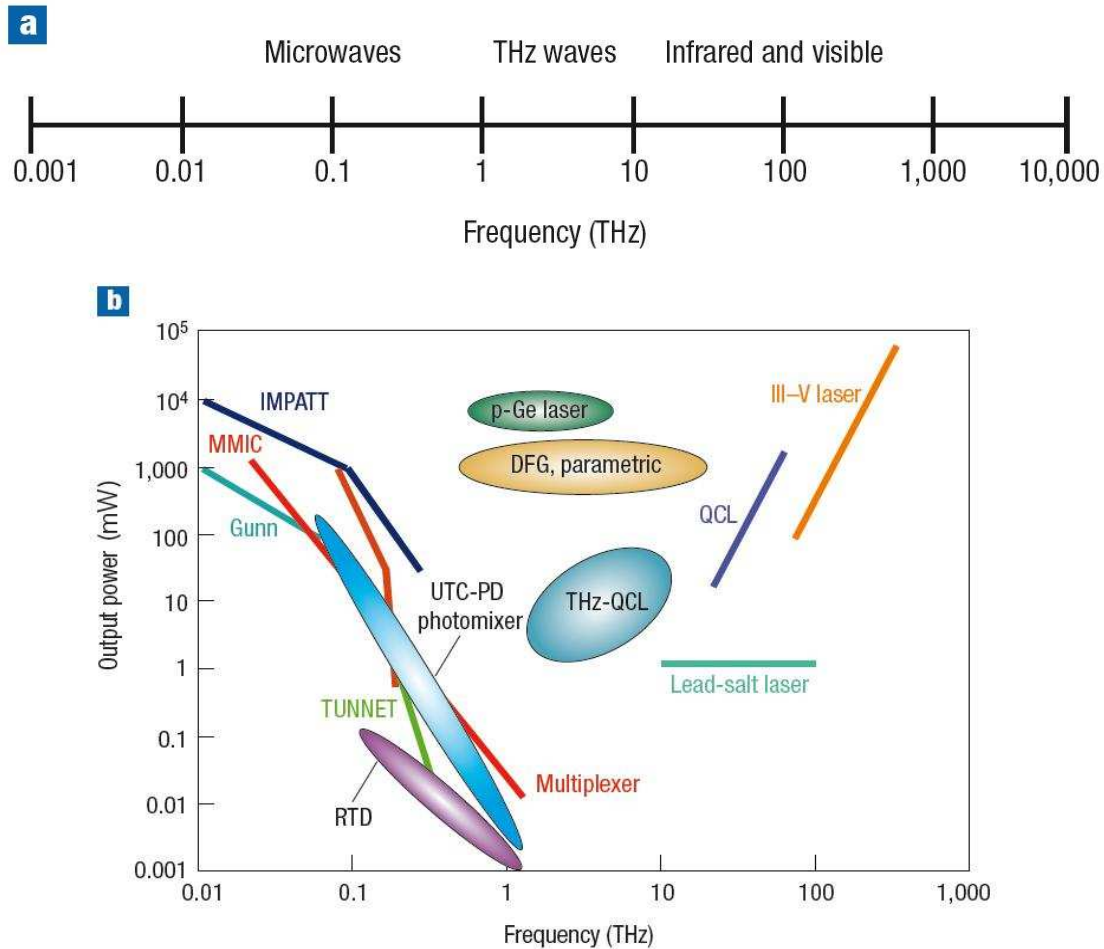


Fig. 1.10 – a : Bande de fréquence TéraHertz. b : Sources THz en fonction de la fréquence d'investigation et de la puissance. [32]

situées dans les matériaux utilisés. La seconde repose sur l'utilisation de transitions interbandes dans les structures énergétiques des matériaux, engendrant l'émission de photons aux fréquences THz désirées. La caractérisation des sources s'effectue notamment sur les fréquences accessibles et la puissance de sortie. Ces qualités sont données pour la panoplie de sources actuelle en Figure 1.10-b. A celles-ci peuvent s'ajouter la qualité spectrale ainsi que la température de fonctionnement. Après une présentation générique des technologies rencontrées dans ces deux approches, l'exemple de la spectroscopie THz en domaine temporel sera détaillé.

## 1 Approche électronique

Une première idée concernant la génération d'ondes TéraHertz est la fabrication d'oscillateurs électroniques fonctionnant aux fréquences THz. Comme pour l'électronique basse fréquence, l'utilisation de composants à "résistance négative" permet un entretien autonome d'oscillations. Un tel comportement est observé dans les diodes Gunn [34, 35]. Lorsqu'une différence de potentiel est appliquée aux bornes de ce composant, les électrons de conduction peuvent passer d'un domaine (vallée) énergétique faible  $\Gamma$  à une vallée énergétique plus haute  $L$  (Figure 1.11-gauche). Or, l'étude de la structure de bandes des diodes Gunn montre que la masse effective des électrons est supérieure dans la vallée de haute énergie, et donc que les électrons y sont ralentis. Autrement dit, l'augmentation de la tension aux bornes de la diode se traduit par leur ralentissement (effet Gunn). L'augmentation de tension s'accompagne d'une diminution de courant : c'est l'effet de résistance négative. Technologiquement, alors que les jonctions PN classiques nécessitent un dopage donneur et accepteur, les diodes Gunn n'utilisent qu'un seul type de dopage sur semi-conducteur III/V (Figure 1.11-droite). Des oscillateurs à base de diodes Gunn sont aujourd'hui disponible à 400-500GHz avec des puissances en sortie appréciables, de l'ordre de quelques mW [36].

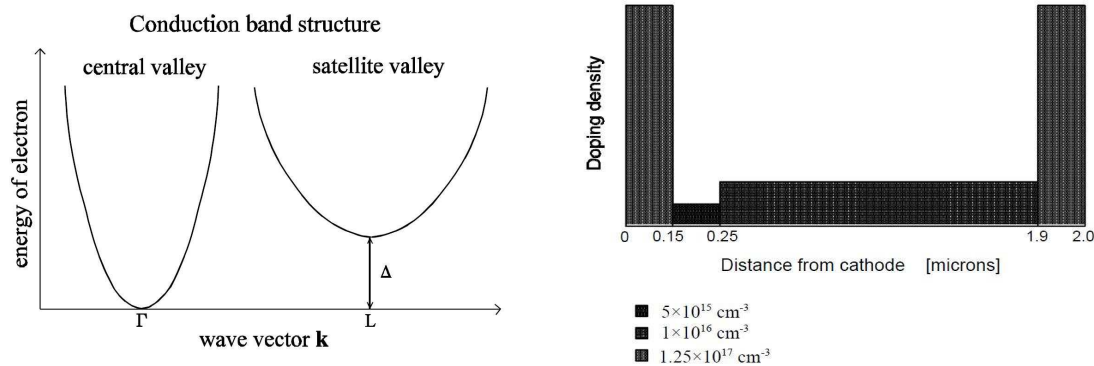


Fig. 1.11 – Gauche : Vallées énergétiques  $\Gamma$  et  $L$  de courbures différentes (masses effectives différentes) au sein d'une diode Gunn - Droite : Exemple de profil de dopage de GaAs pour obtention de l'effet Gunn [34]

La diode à effet tunnel résonnant (RTD) est une autre structure exhibant un comportement de type résistance négative [37, 38]. Par le biais d'hétérojonctions, un puits quantique est créé au sein de la structure dans lequel les niveaux d'énergie sont quantifiés. L'application d'une différence de potentiel aux bornes du composant engendre une inclinaison du diagramme de bande de telle manière à ce que des électrons à gauche du

puits (Figure 1.12-b) puissent traverser par effet tunnel le mur de potentiel et rejoindre le puits. En revanche, au delà d'une certaine tension appliquée, le niveau d'énergie du puits est trop faible et le courant tunnel chute lorsque la tension augmente : c'est l'effet de résistance négative (Figure 1.12-c). Les limites en terme de fréquence de fonctionnement résident dans ce cas dans le temps de passage par effet tunnel et le temps de résidence dans le puits. Ces temps d'origine quantiques étant beaucoup plus courts que les temps de transports rencontrés dans les semi-conducteurs "classiques" (jonction PN, Gunn...), les diodes à effet tunnel résonant peuvent accéder à des fréquences de plus de 700GHz [33], voire 1THz [36], à température ambiante. Cependant, comme le montre la Figure 1.10, les puissances fournies par ces sources sont encore limitées.

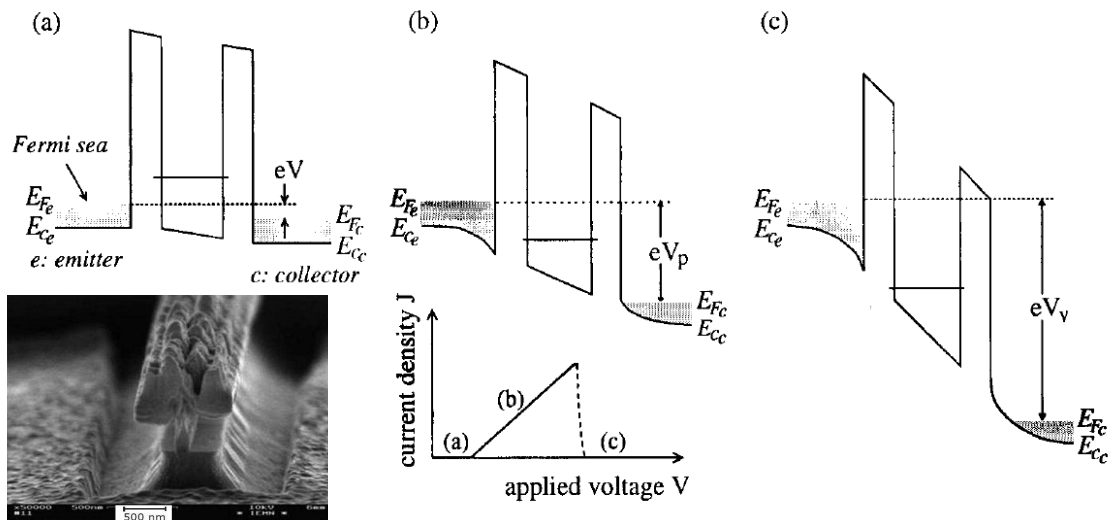


Fig. 1.12 – Principe de fonctionnement de la diode à effet tunnel résonant. Structure de bande et puits quantique. [38, 39]. Photo : vue au microscope électronique à balayage d'une RTD [33].

Les composants qui viennent d'être présentés permettent une génération directe de l'onde THz. D'autres techniques existent, comme la génération indirecte par conversion de fréquence. En effet, lorsqu'un signal périodique est appliqué aux bornes d'un composant non linéaire, une création de signaux harmoniques de fréquences supérieures est observée. En électronique par exemple, le cas du redressement de signaux sinusoïdaux par des diodes est connu pour enrichir le spectre du signal incident. Le filtrage et la sélection des harmoniques générées est possible à l'aide de guides d'ondes. Ainsi l'utilisation de diodes Schottky (jonctions métal/semi-conducteur, reconnues pour leur fréquence de commutation élevée) couplées à des guides d'ondes permet la réalisation de multiplieurs

aux fréquences sub-THz et THz ("multiplexer" sur Figure 1.10). La Figure 1.13-a montre un exemple de multiplieur de fréquence par 2 utilisant des diodes Schottky sur membrane de GaAs ainsi que ses performances [40]. L'association en cascade de ces multiplieurs (par 2 ou par 3) permet l'obtention des performances représentées en Figure 1.13-b. Les fréquences obtenues peuvent atteindre 2.7THz pour des puissances de l'ordre de la dizaine ou centaine de  $\mu\text{W}$ [36].

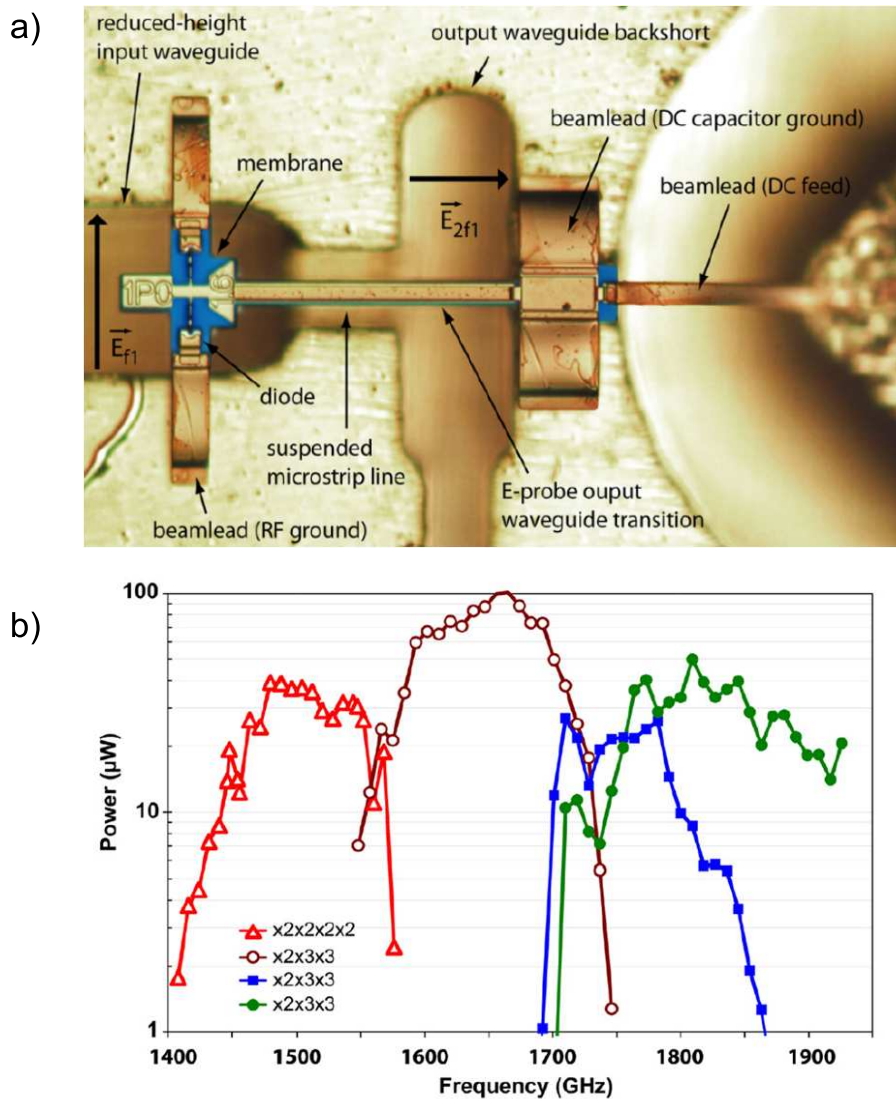


Fig. 1.13 – a) Multiplieur de fréquence à base de diodes Schottky sur membrane de GaAs. Puce de  $300\mu\text{m}$  de long. Les signaux  $E_{f1}$  et  $E_{2f1}$  correspondent au signal initial et au signal en sortie à la fréquence double. b) Performances de l'association de multiplieurs en terme de puissance et de fréquence. [40]



Les composants qui viennent d'être présentés sont basés sur le transport des électrons au sein de matériaux. Leurs fréquences de fonctionnement sont situées dans la partie inférieure de la bande THz. Pour la compléter, d'autres composants, basés sur l'émission de photons, permettent d'atteindre la bande supérieure du spectre THz. Ils sont basés sur une approche optique et sont développés dans le paragraphe suivant.

## 2 Approche optique

Les composants THz d'origine électronique sont limités en fréquence haute par les temps de transit et effets capacitifs en leur sein [41]. Pour générer des fréquences supérieures, la transition d'électrons entre différentes bandes énergétiques est utilisée. Celle-ci s'accompagne de l'émission d'un photon dont la fréquence  $f$  est directement proportionnelle à  $\Delta E = hf$  ( $h$  est la constante de Planck), énergie perdue par l'électron lors de la transition. Au sein des diodes LASER, cette émission est stimulée par un autre photon et permet la formation d'un faisceau optique dont la longueur de cohérence peut atteindre plusieurs mètres. Historiquement, les diodes LASER ont permis l'accès au spectre optique et proche infra-rouge ; la fréquence d'émission résultant de l'ingénierie de "gap" entre les bandes énergétiques par l'usage d'alliages de matériaux [42, 43]. En effet, pour choisir la fréquence d'émission, il faut modifier le gap énergétique entre bande de conduction en bande de valence. Diminuer les fréquences des LASER jusqu'à la bande THz impose donc de réduire considérablement le "gap" énergétique. A titre d'exemple, un LASER émettant à 4THz résulte d'une transition énergétique de  $\Delta E \sim 17\text{meV}$ <sup>6</sup> [33], gap énergétique de trop faible valeur pour être accessible avec des matériaux semi-conducteurs volumiques usuels. L'idée du LASER à Cascade Quantique (QCL) est de créer de nouvelles bandes énergétiques (sous-bandes) séparées par les transitions énergétiques souhaitées [44]. La synthèse de ces sous-bandes se fait *via* la superposition et l'interaction de matériaux de gaps différents. Cet empilement d'hétérojonctions, sous la forme d'une succession de puits quantiques, est appelé "super-réseau". Il permet la création de transitions énergétiques nouvelles grâce à la dégénérescence par couplage des niveaux quantiques de chaque puits et permet ainsi la génération d'ondes de plusieurs THz au niveau de la "zone active" (Figure 1.14). La description plus complète du fonctionnement de ce composant est notamment revue par Capasso *et al.* [45]. Des sources QCL atteignant des fréquences de 1.2THz, voire 0.6THz sous certaines conditions, sont aujourd'hui accessibles [36].

---

<sup>6</sup>Cette énergie doit être mise en regard avec l'énergie thermique de 25meV à température ambiante. Elle justifie la nécessité du refroidissement cryogénique des sources à base de QCL.

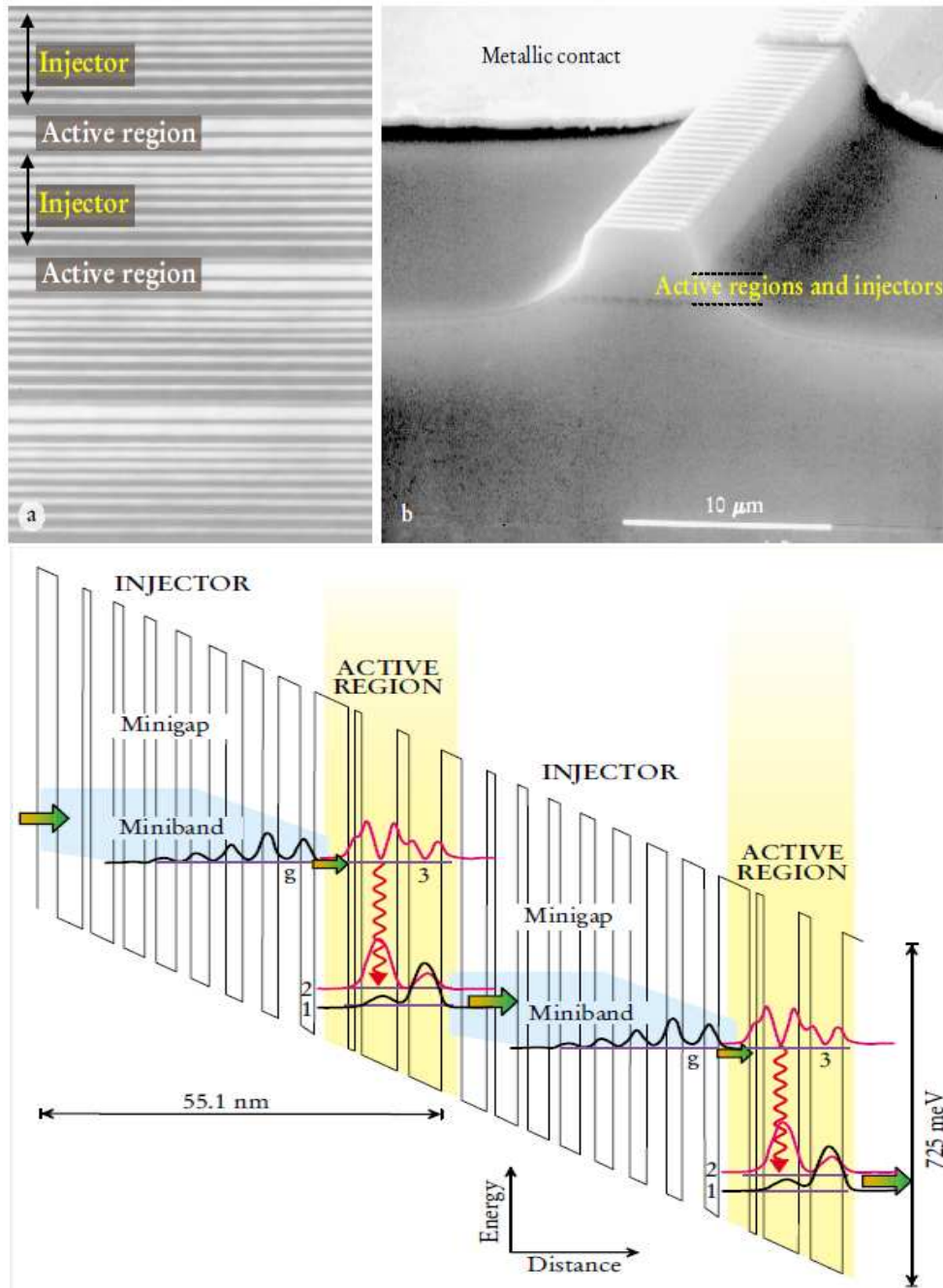


Fig. 1.14 – Haut : vue au microscope électronique d'une laser à cascade quantique. Superposition des matériaux de gap différents. Bas : Principe de fonctionnement d'un QCL : diagramme de bande. [45]

Comme dans le cas de l'approche électronique, il est possible de générer des ondes THz optiquement par le mélange de signaux de fréquences différentes. Cette génération hétérodyne s'effectue par le couplage au sein d'un photo-mélangeur de deux faisceaux laser optiques de fréquences  $f_1$  et  $f_1 + f$ , où  $f$  est une fréquence du spectre THz. Le photo-

mélangeur peut être réalisé dans un matériau semi-conducteur de type GaAs, épitaxié à basse température (LT GaAs). L'éclairement de ce matériau, pré-polarisé électriquement, par les deux précédents faisceaux laser va générer des paires électrons/trous oscillant à la fréquence  $f$  [46]. C'est cette oscillation qui permet ensuite la génération d'une onde électromagnétique THz.

### **3 La spectroscopie THz en domaine temporel (THz-TDS)**

L'utilisation de matériaux semi-conducteurs de type LT GaAs apparaît également dans la spectroscopie THz en domaine temporel (THz-TDS : Figure 1.15) [47, 48]. Cette approche "électro-optique" est basée sur l'utilisation d'impulsions LASER. Un train d'impulsions (impulsions de centaines ou dizaines de femtosecondes) est d'abord généré et divisé en deux. La moitié va servir à l'excitation et l'autre à la détection. Le faisceau d'excitation va impacter un patch de LT GaAs créant ainsi des paires électron/trou en son sein (Figure 1.15b). Pour les séparer, le semi-conducteur est polarisé par une tension continue. Un courant de porteurs va donc transiter dans le semi-conducteur le temps de l'impulsion (0.5 ps par exemple) et être à l'origine de l'émission d'une onde électromagnétique qui peut être guidée ou rayonnée. La dualité temps-fréquence montre que le spectre d'une telle onde atteint les fréquences THz<sup>7</sup>. Cette onde est ensuite propagée vers un échantillon à analyser puis, dans un second temps, vers un deuxième patch semi-conducteur (Figure 1.15c) où elle joue, cette fois, le rôle de polarisateur. C'est le faisceau LASER de détection qui va générer dans ce cas des paires électrons trous et ainsi échantillonner le signal THz de polarisation. Le courant généré est alors détecté. Afin d'échantillonner à divers instants le signal de polarisation pour le reconstruire intégralement (Figure 1.15d), une ligne à retard modulable est placée sur un des deux trajets (faisceau d'excitation ou de détection). L'analyse par transformée de Fourier des ondes incidentes et transmises (ou réfléchies) par l'échantillon permet l'obtention de ses propriétés d'absorption (ou de réflexion) en fonction de la fréquence.

Le développement des sources et systèmes de mesures THz précédemment décrits et leur commercialisation progressive ont permis la multiplication des mesures THz sur échantillons. Le paragraphe suivant s'attache à décrire les applications majeures de cette nouvelle spectroscopie, en détaillant plus précisément les applications biologiques.

---

<sup>7</sup>Contrairement au cas des sources THz présentées précédemment, l'onde générée TDS possède une étendue spectrale large. Elle est ainsi adaptée à une utilisation en spectroscopie.

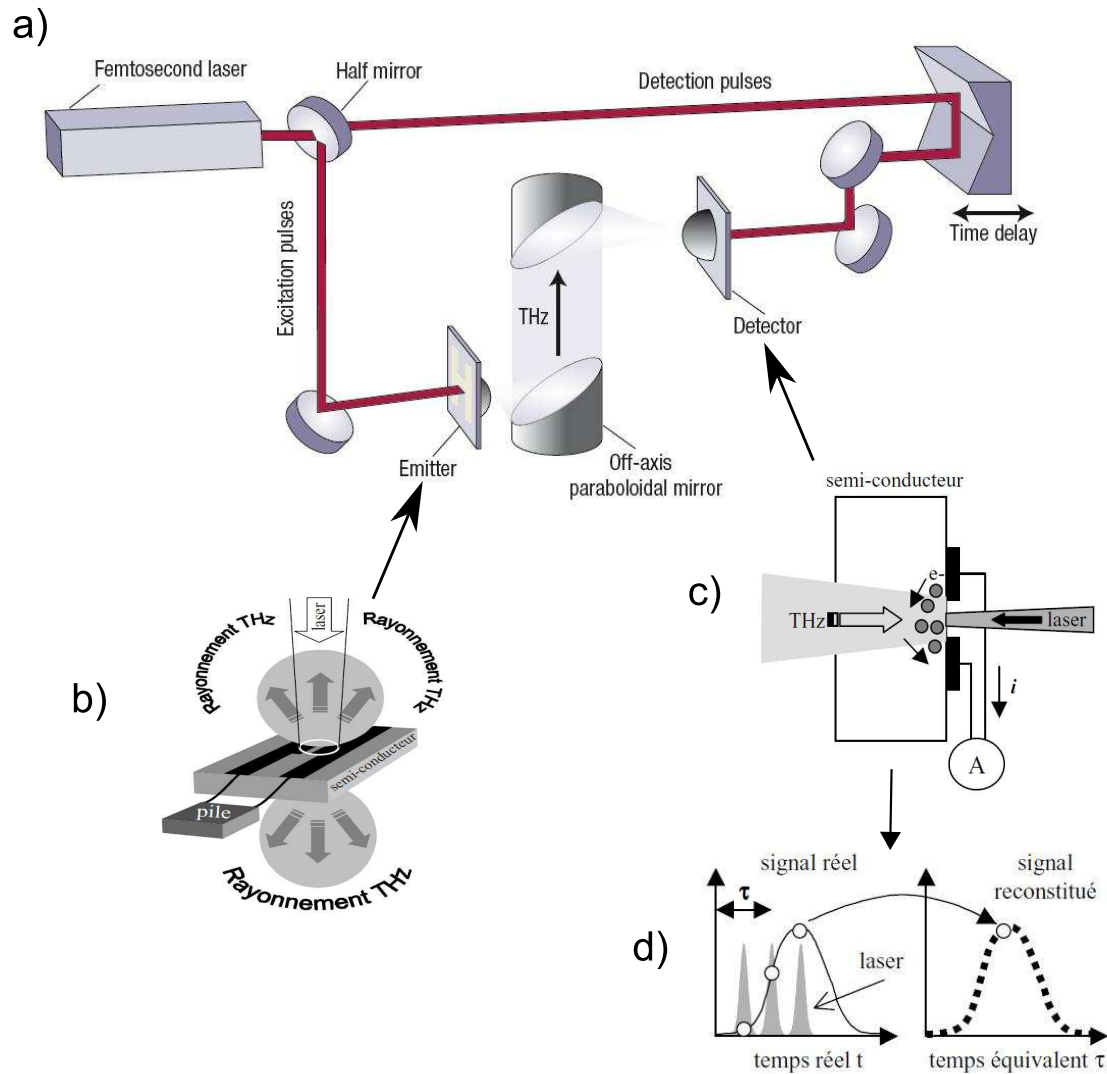


Fig. 1.15 – Spectroscopie TéraHertz en domaine temporel. a) Schéma du banc de mesure [32]. b) Patch LT GaAs d’émission polarisé par une tension continue et impacté par le faisceau d’excitation. c) Patch LT GaAs polarisé par l’onde THz et impacté par le faisceau de détection. d) Reconstruction du signal THz par échantillonnage [49].

## C Domaines d’application des ondes TéraHertz

Historiquement, le premier champ majeur d’application des ondes TéraHertz (sous le nom d’ondes sub-millimétriques) est l’astronomie [50, 41]. En effet, environ la moitié de l’émission électromagnétique cosmique est située dans cette bande de fréquence. A titre d’exemple, la Figure 1.16-gauche montre le spectre d’émission de notre galaxie, la Voie Lactée. Un pic, correspondant à l’émission du carbone ionisé, peut y être ob-

servé. En effet, l'émission électromagnétique cosmique dans la fenêtre sub-millimétrique est caractérisée par une succession de raies caractéristiques d'éléments chimiques (Figure 1.16-droite), des plus lourds (fréquences les plus basses) aux plus légers constitués d'hydrogène (fréquences les plus hautes). Leur observation et quantification permettent de déterminer la nature et la composition des nuages de poussière interstellaires. Cette connaissance permet notamment l'étude de la formation d'étoiles. En effet, chaque étape de ce processus est corrélée à la présence ou non de certaines espèces, considérées alors comme des marqueurs. Par exemple, la présence des molécules CO et H<sub>2</sub>O est un indicateur du refroidissement du nuage de poussière, nécessaire à la formation d'une étoile. De même, l'analyse des raies spectrales sub-millimétriques permet l'analyse des galaxies lointaines. En effet, elles présentent un milieu interstellaire différent selon leur nature. Par exemple, les galaxies de type elliptique possèdent relativement peu de nuages de poussières, les galaxies de type spirale possèdent des nuages plus denses et composées de gaz froids, et les galaxies en collision sont elles aussi constituées de nuages denses mais plus chauds. De telles différences peuvent être détectées par la spectroscopie sub-millimétrique<sup>8</sup>.

Le frein majeur à l'utilisation de ces ondes est leur forte absorption par l'atmosphère. Pour preuve, la Figure 1.17-haut montre la transmission de l'atmosphère en fonction de la fréquence. Seules trois fenêtres sont accessibles : entre 0 et 300GHz, autour de 650GHz et autour de 850GHz [50]. Le reste du spectre est rendu invisible par l'absorption de la vapeur d'eau, prédominante à ces fréquences. Pour remédier à cet obstacle, des mesures en haute atmosphère dans des avions ont été menées. Pour s'affranchir complètement de la contrainte atmosphérique, le satellite Herschel envoyé en 2009 avec l'instrument HIFI (Heterodyne Instrument for the Far-Infrared) a fourni, en 2010, ses premiers résultats. Parmi eux, l'extension de la Figure 1.17-bas à des fréquences autour de 1THz a pu être déterminée [51].

La plupart des molécules observables dans les nuages de poussières interstellaires le sont aussi dans l'atmosphère. Suivre leur abondance ou destruction dans la troposphère ou la stratosphère fournit des marqueurs pour des phénomènes comme la destruction de l'ozone, le réchauffement climatique ou le contrôle de la pollution [52]. De même, l'observation sub-millimétrique des atmosphères de planètes environnantes permet une amé-

---

<sup>8</sup>Pour se convaincre de l'intérêt des fréquences THz en astronomie, il est intéressant de calculer les fréquences correspondant aux énergies thermiques des gaz interstellaires. La température de ces gaz varie de 10K à 100/200K, soit, en fréquence correspondante ( $E = kT = hf$ ) de 200GHz à 4THz.

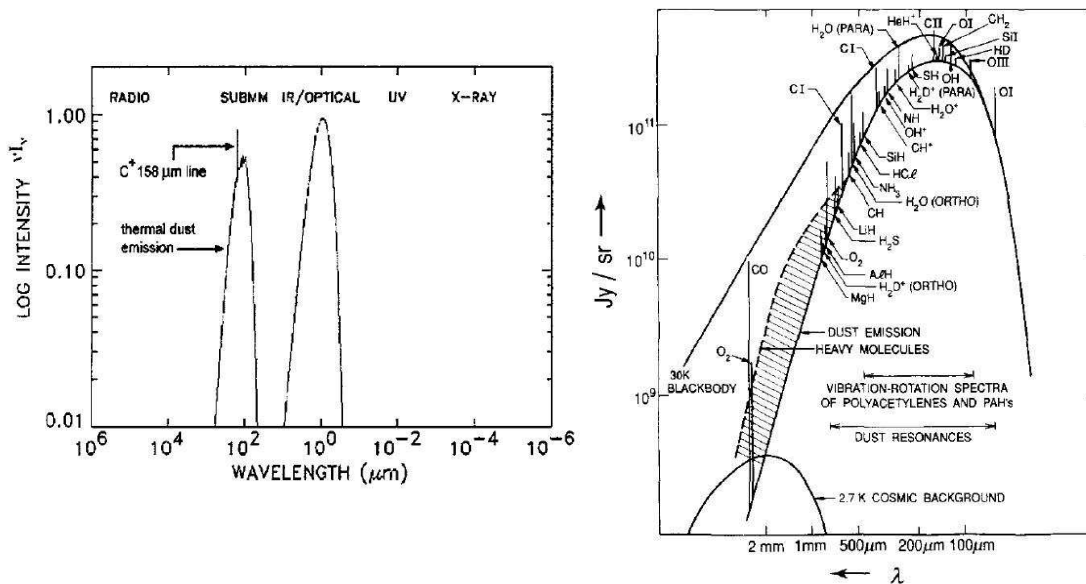


Fig. 1.16 – Gauche : Spectre d’émission de la Voie Lactée montrant qu’environ la moitié de la puissance émise est situé dans le spectre sub-millimétrique [41]. Droite : Raies d’émission caractéristiques des composés chimiques dans la bande sub-millimétrique [50].

lioration des modèles existants, concernant par exemple la formation et l’évolution du système solaire [53]. A l’échelle terrestre, la spectroscopie de gaz est également une application importante des ondes THz. Dû à l’augmentation de l’absorption des espèces gazeuses avec la fréquence (en  $f^2$  ou  $f^3$ ), la bande de fréquence THz permet un accroissement de la sensibilité des mesures. Il est ainsi possible d’établir des bases de données catalogue, permettant l’identification de gaz par des mesures rapides sur échantillons (ex : système FASSST [54, 55]).

Les résultats qui viennent d’être présentés sont liés à la capacité des ondes THz à détecter les signatures spectrales de composés chimiques. D’autres propriétés intéressantes sont propres à ce spectre :

- Les ondes THz traversent la plupart des matériaux non-polaires et non-métalliques (polymères, tissus, bois...). Ainsi elles peuvent être utilisées pour sonder des matériaux déjà emballés, ou pour voir des objets situés derrière des vêtements.
- Leur propagation dans les polymères est influencée par la permittivité diélectrique de ceux-ci. Ainsi, elles possèdent un contraste entre matériaux diélectriques plus important que les techniques de type rayons X.

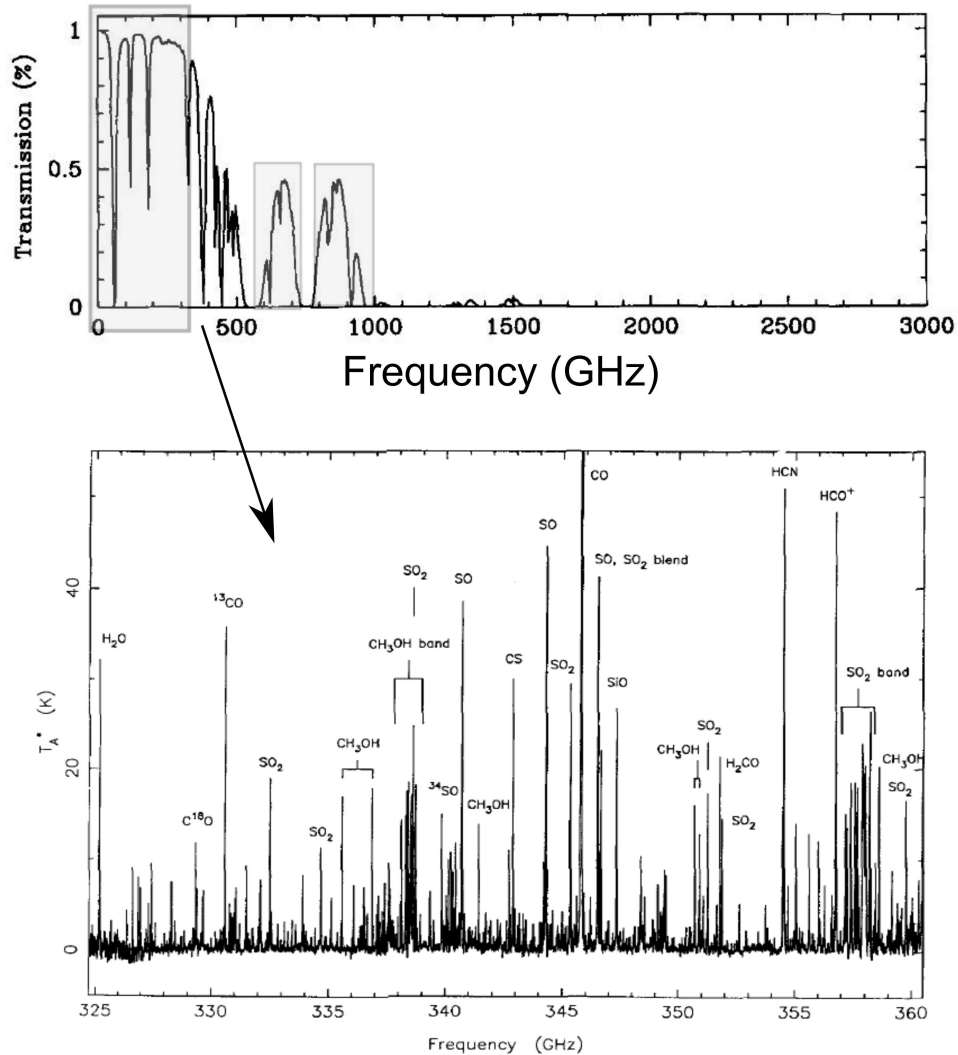


Fig. 1.17 – Haut : Fenêtre de transmission atmosphérique dans la gamme de fréquence sub-millimétrique mesurée à une altitude de 4200m (Mauna Kea). Bas : Observation du nuage moléculaire d'Orion entre 325 et 360GHz [50].

- En comparaison avec les ondes millimétriques, la résolution spatiale atteinte par les ondes THz est accrue. En effet, cette limite est liée à la diffraction et est repoussée avec la diminution de la longueur d'onde.
- En comparaison avec les rayons X, elles sont très faiblement ionisantes. Il est ainsi supposé qu'une personne sondée ou un opérateur de système THz ne sont potentiellement pas soumis à une exposition dangereuse, pourvu que la puissance rayonnée soit faible.

Il faut de plus considérer que l'eau absorbe fortement les ondes THz. En résultent les limitations atmosphériques en radio-astronomie précédemment expliquées, l'absorption de

ces ondes par la peau (dans les 100 premiers  $\mu\text{m}$ ) et leur forte interaction avec les milieux biologiques.

Toutes ces propriétés ont engendré le développement de nouvelles applications des ondes THz. Parmi elles, la sécurité des personnes occupe une place de choix. En effet, la détection d'armes - métalliques et non-métalliques - cachées sous des vêtements ou dans des valises, l'identification d'explosifs solides ou liquides grâce à des signatures spectrales, la détection d'agents biologiques pathogènes ou encore la traque de trafics de médicaments sont possibles par la spectroscopie THz [56]. Ces contrôles peuvent être effectués en contact (objet à sonder très proche du capteur) ou à distance (utilisation dans des portiques pour les gares ou les aéroports). Dans ce dernier cas, l'influence de la variabilité atmosphérique (température, pression, humidité) sur les mesures doit être prise en compte [57]. La Figure 1.18 illustre deux applications : à gauche, la détection d'armes cachées ; à droite, les signatures spectrales THz de plusieurs explosifs. De manière semblable, la sécurité alimentaire également bénéficie de l'imagerie THz. En effet, s'il est facile en général de détecter des objets métalliques dans des produits alimentaires emballés, la détection d'objets non-métalliques reste complexe notamment à cause de leur faible contraste aux rayons X. Les ondes THz, en détectant plastiques, verres ou encore pierres pourraient ainsi être présentes en fin de chaîne de production afin de garantir l'absence d'objets parasites dans les aliments emballés [58, 59].

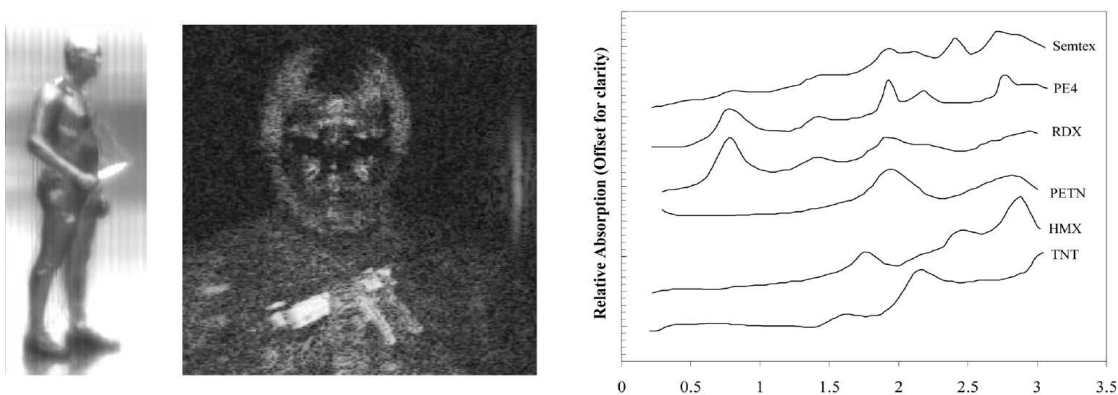


Fig. 1.18 – Gauche : Imagerie THz pour la détection d'armes (couteau sous un journal - pistolet sous un vêtement). Droite : Signatures spectrales de plusieurs explosifs dans la bande THz [57].

L'utilisation du spectre THz dans le contrôle de qualité de produits peut notamment s'étendre à l'industrie des polymères. Dans ce domaine, un premier enjeu est l'étude de la



qualité de dispersion en leur sein. En effet, diverses particules sont souvent incluses dans les polymères afin de contrôler certaines fonctions (comme les propriétés mécaniques, la couleur, l'inflammabilité). L'homogénéité de la dispersion de ces particules et la connaissance de leur concentration sont cruciales et peuvent être sondées dans la gamme THz [60]. De même, le contrôle sans contact et non destructif des soudures plastiques est possible : vérification de l'absence d'inclusions diélectriques (poussière, sable) et de l'absence de décollements locaux [61]. Enfin, dans le cas de polymères renforcés par des fibres, l'imagerie THz peut être utilisée pour vérifier leur concentration et leur orientation [62]. En application de type contrôle, la spectroscopie THz a également été proposée pour mesurer le degré d'hydratation de plantes par l'imagerie de feuilles et ainsi permettre une optimisation des procédés d'irrigation [59]. Plus le contenu en eau de la feuille est important, plus la transmission de l'onde THz à travers elle est faible.

Après l'astronomie et le contrôle, la communication est une troisième application potentielle des ondes THz. Dans ce domaine, l'utilisation de fréquences porteuses du spectre THz permet des débits de transmission importants et une plus forte intégration des antennes par rapport aux ondes millimétriques. De plus, en terme de disponibilité, la bande de fréquence THz est très peu allouée et de nombreux canaux sont ainsi utilisables. Cependant, les freins importants à l'utilisation de ces ondes en communications sont l'absorption atmosphérique et les puissances des sources encore relativement faibles. Néanmoins, elles sont aujourd'hui considérées pour des applications de type communications satellite/satellite ou communications "indoor" [63].

Dans la section précédente, l'intérêt de l'utilisation des ondes THz pour la caractérisation dynamique d'interactions biologiques avait été présenté dans le cas de l'hydratation. L'application du spectre THz à la biologie est en effet un large champ d'application et d'investigation actuel. Ses problématiques et ses enjeux sont l'objet de la section suivante. Au vu des applications qui viennent d'être décrites, deux intérêts majeurs résultent de la compréhension de l'interaction entre ondes THz et matière biologique. Tout d'abord, elle permettra très probablement d'apporter aux biologistes et chimistes de nouveaux outils incontournables pour sonder le vivant. Mais également, en cas de développement des ondes THz dans notre environnement quotidien (comme dans le cas de communications "indoor"), elle permettra d'appréhender les conséquences sanitaires de leur utilisation généralisée.

### III Mesures TéraHertz sur échantillons biologiques

#### A Interaction entre onde THz et échantillon biologique

La Figure 1.19 montre l'absorption des ondes électromagnétiques par l'eau liquide en fonction de la fréquence. Il est remarquable, sur ce spectre, que la fenêtre de fréquences THz représente un maximum d'absorption pour l'eau. Cette absorption traduit notamment, à l'échelle microscopique, une interaction forte entre le réseau de molécules d'eau et l'onde électromagnétique aux fréquences THz. En effet, l'énergie des ondes THz ( $10^{-22} - 10^{-20}$ J [64]) correspond à l'énergie d'excitation des liaisons faibles formées entre les molécules d'eau comme les liaisons hydrogène.

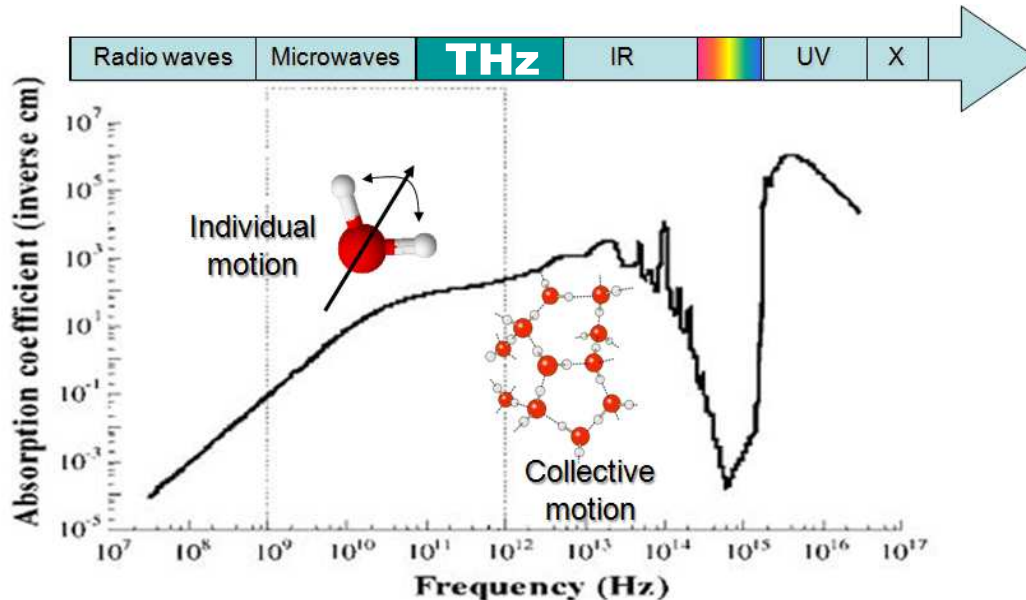


Fig. 1.19 – Absorption des ondes électromagnétiques par l'eau en fonction de la fréquence. Mise en évidence de la bande THz. Excitation des dipôles et du réseau de liaisons hydrogène. Adapté de [65].

Le rôle de ce type de liaisons dans de nombreux processus biochimiques, et la capacité de l'onde THz à les exciter, fait du spectre THz un candidat intéressant pour le suivi en temps réel et sans marqueur de réactions biochimiques. A titre d'exemple, le contenu en eau d'un tissu<sup>9</sup>, sa concentration ionique, l'hydratation ou la conformation de protéines ainsi que l'hybridation d'ADN font intervenir ce réseau de liaisons faibles et sont donc susceptibles d'être sondés par les ondes THz [66, 67, 68, 18].

Cependant, la forte absorption de l'eau génère d'importantes contraintes sur l'instrumentation THz. En effet, un échantillon d'1mm d'eau provoque une atténuation en puissance de l'onde THz d'un facteur d'environ 10<sup>9</sup>. Ceci explique pourquoi la spectroscopie THz sur échantillons biologiques s'est d'abord consacrée à l'analyse d'échantillons secs, présentée dans le paragraphe suivant. Néanmoins, l'utilisation de faisceaux THz de forte puissance, l'analyse d'échantillons par réflexion ou encore l'analyse de faibles volumes d'échantillon ont permis la spectroscopie sur échantillons liquides, comme nous le verrons dans un second temps.

## **B Mesures d'échantillons secs**

Ki Choi *et al.* ont étudié la réponse de diverses poudres à une excitation de fréquence allant jusque 300GHz, en réflexion et transmission [65]. En vue d'applications en terme de sécurité, deux familles de poudres ont été testées : des poudres inoffensives (farine, amidon, talc et sucre) et une poudre toxique (*bacillus cerus* - anthrax). L'étude de la phase des signaux transmis (Figure 1.20) à travers des enveloppes contenant les échantillons permet de distinguer les deux familles de poudre. De plus, l'analyse de l'amplitude de l'onde réfléchiée montre la présence de pics distincts, permettant la discrimination des différentes poudres sondées.

A des fréquences supérieures (0 - 2.4THz), Markelz *et al.* ont étudié le comportement de différentes protéines à l'état de poudre, théoriquement par dynamique moléculaire et expérimentalement par méthode TDS [69]. L'étude des spectres de la myoglobine et de la lysozyme montre peu de différences entre ces deux protéines. Ainsi, les auteurs affirment que la spectroscopie THz n'est pas adaptée pour la différenciation de protéines par signa-

---

<sup>9</sup>Cette information permet dans certains cas la différenciation de tissus sains ou malades. Par exemple, certaines cellules cancéreuses ont des propriétés de rétention d'eau différentes des cellules saines.

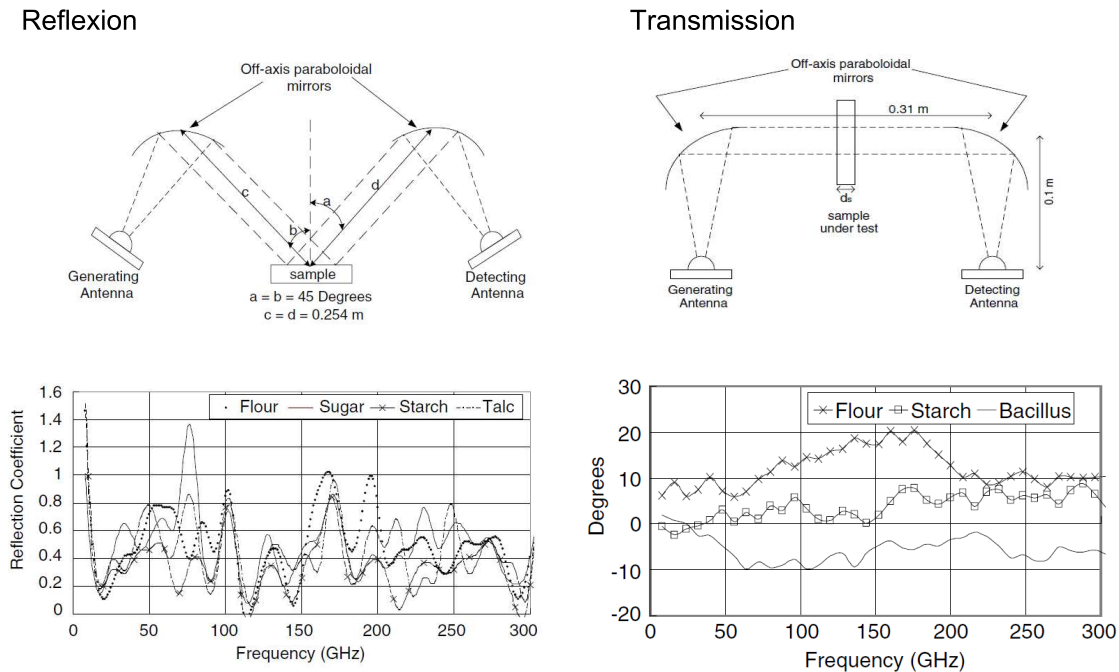


Fig. 1.20 – Mesures en réflexion et transmission de poudres de 10 à 300GHz. Protocoles expérimentaux et résultats principaux [65].

ture spectrale. En revanche, avec l'étude de la bactéριο-rhodopsine<sup>10</sup>, ils montrent qu'elle permet de mesurer la variation de conformation d'une protéine en temps réel. En effet, la protéine subit un cycle de conformations (*via* le contrôle de l'éclairage notamment) qui est sondé par l'onde THz. La Figure 1.21 présente ce cycle et montre les différents spectres d'absorption de l'onde en fonction de l'état de conformation de la protéine. De même, la comparaison des spectres d'absorption de la bactéριο-rhodopsine et d'une mutante de flexibilité conformationnelle moindre a été menée et une nette différence a pu être observée. L'étude montre donc que la spectroscopie THz est un outil potentiel pour la mesure et le suivi de conformation/mutation d'une protéine, davantage que pour la différenciation de protéines.

Les mesures précédentes ont été réalisées avec une propagation de l'onde en "espace libre" : l'onde n'est pas guidée, mais juste focalisée sur l'échantillon. En vue d'une amélioration en termes d'intégration (pour réduire le volume d'échantillon à investiguer), de parallélisation et de résolution spatiale, des structures à base de guides d'onde ont été développées. Dans ce cadre, Nagel *et al.* ont proposé un résonateur THz en anneau sur

<sup>10</sup>Protéine dont la conformation est sensible à l'éclairage reçu. La rhodopsine une protéine rétinienne impliquée dans la perception visuelle. La durée de son cycle d'excitation et de désexcitation est à l'origine du phénomène de "persistance rétinienne".

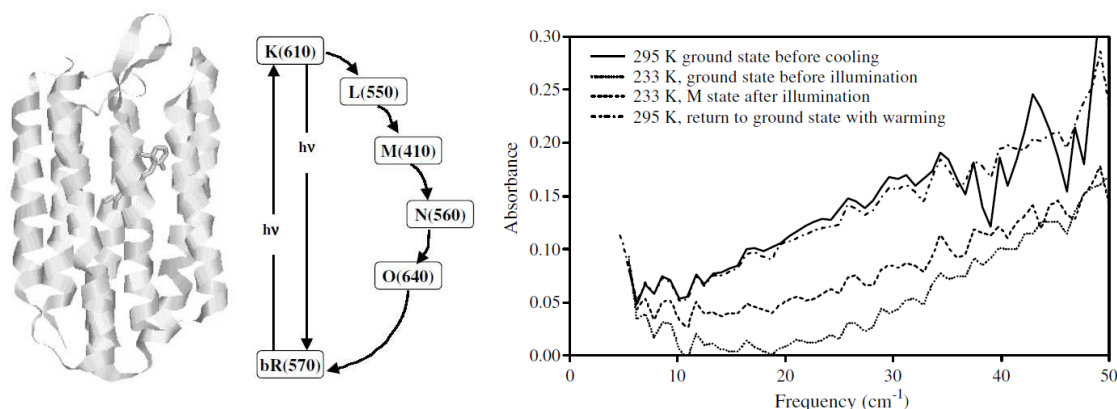


Fig. 1.21 – Cycle de la bactériorhodopsine observé par spectroscopie THz pour des fréquences de 0 à 2.4 THz. Absorptions de la protéine dans différentes conformations. [69]

ligne microruban permettant une détection record de quelques 40fmol d’ADN [70]. En le fonctionnalisant et observant la déviation en fréquence de pics de résonance, les auteurs parviennent à quantifier le nombre d’hybridation de deux brins d’ADN. La sensibilité maximale obtenue pour ce capteur est un décalage de fréquence de  $2.8 \cdot 10^{-14}$  Hz par paire de bases hybridée. Le facteur de qualité maximal obtenu est de 62. La Figure 1.22 montre la topologie du résonateur ainsi que le décalage du pic de résonance en fonction de l’état d’hybridation des brins d’ADN sondés.

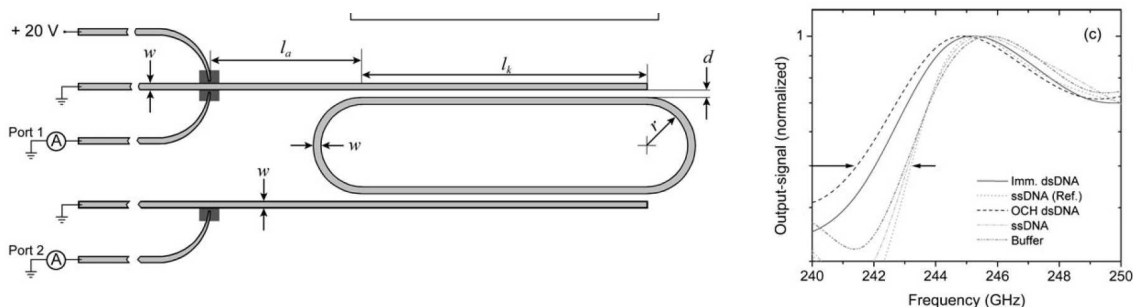


Fig. 1.22 – Structure du résonateur microstrip en anneau. Décalage du pic de résonance pour différents états d’hybridation [70].

Les résultats sur échantillons secs valident la capacité des ondes THz à sonder les phénomènes biologiques comme la conformation de protéines ou encore l’hybridation de l’ADN. Cependant, des mesures sur liquides sont nécessaires pour rendre compte de la spectroscopie THz dans des conditions proches de l’*in vivo*, propres à la biologie. Dans cette optique, des mesures sur tissus cellulaires sont présentées dans le paragraphe suivant.

## C Mesures sur tissus

L'analyse de tissus cellulaires est un champ grandissant de la spectroscopie THz depuis un peu plus de 10 ans. En effet, des variations de comportements diélectriques à ces fréquences peuvent être observées selon les tissus considérés, en fonction de leur composition. Par exemple, Huang *et al.* ont caractérisé, en réflexion, des tissus fraîchement excisés de différents organes de rats (foie, reins, pancréas, muscle et tissu adipeux) [71]. L'extraction des indices de réfraction et des coefficients d'absorption des tissus provenant de chaque organe a été menée et un extrait est présenté en Figure 1.23. Une différence nette est observée entre les tissus adipeux et les autres tissus, expliquée par la teneur en eau moindre dans les tissus adipeux. Ceux-ci sont en effet constitués majoritairement de chaînes hydrocarbonées faiblement polaires. Au sein des autres tissus, des différences plus ténues mais réelles sont également remarquées.

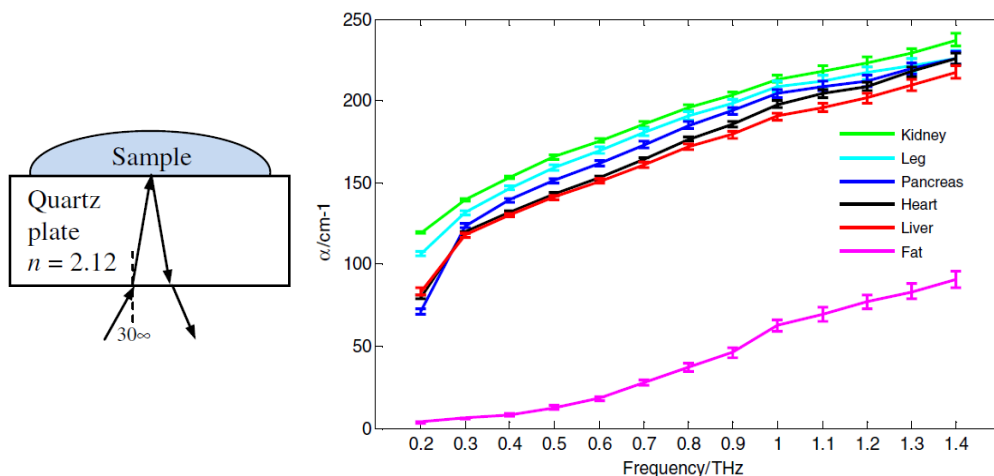


Fig. 1.23 – Coefficient d'absorption des tissus de chaque organe en fonction de la fréquence. Mesure THz par réflexion d'impulsions sur l'échantillons. [71]

Une application majeure de la spectroscopie THz sur tissus est la détection de tumeurs cancéreuses. En effet, l'apparition de cellules cancéreuses s'accompagne souvent d'une augmentation de la vascularisation et donc du contenu en eau local. Eau qui est alors susceptible de fournir un agent de contraste naturel pour la détection THz de cellules malignes [72]<sup>11</sup>. Woodward *et al.* ont démontré que l'analyse d'impulsions THz réfléchies

<sup>11</sup>Même si la littérature se rejoint pour affirmer que les variations de contenu en eau expliquent les modifications des spectres THz des tissus malades, les auteurs précisent régulièrement que cette interprétation n'est probablement que partielle. En effet, le pH, la teneur en oxygène ou encore la concentration en li-

sur échantillons permettait de distinguer, dans le cas de cancers de la peau, des tissus sains et malades excisés [73]. L'étude a été réalisée sur 21 échantillons et les comparaisons avec l'analyse par histologie classique montre une forte corrélation pour 17 cas. Lors d'une étude ultérieure, les auteurs ont mesuré des variations d'absorption et de réfraction notables entre les échantillons sains et malades de 0.2 à 2THz [74]. Ces études ont également été menées sur des tumeurs du sein [75] ou du colon [76], dont l'imagerie THz a été démontrée. A terme, en supplément aux possibilités de détection précoce, cette différenciation entre tissus sains et malins a pour objectif d'assister les opérations chirurgicales. En effet, dans le cadre du retrait d'une tumeur, il est crucial de s'assurer que les tissus cancéreux ont bien tous été extraits afin de limiter le risque de récurrence. Une cartographie rapide de la tumeur *in vivo* avant excision aiderait ainsi le chirurgien dans sa tâche. Dans cette optique, le développement de sondes THz portables [77] ou d'endoscopes [78] est en cours.

En associant l'imagerie THz à des traitements mathématiques avancés<sup>12</sup>, Brun *et al.* sont parvenus à identifier différents types de tumeurs dans le cadre du cancer du poumon [79]. Ils sont également arrivés à délimiter l'extension d'une tumeur très invasive du cancer du pancréas, tâche difficile en lumière visible. Ces mesures, comme les précédentes, ont été réalisées par technique de réflexion de l'onde THz. En effet, les mesures par transmission à travers les tissus restent difficiles en raison de la forte absorption de l'eau. Leur réalisation nécessite l'utilisation de tissus fins [80] ou la congélation des tissus à mesurer [81].

Toutes les mesures jusqu'ici décrites sont effectuées sur des tissus excisés (*ex vivo*). L'extension de ces résultats aux mesures *in vivo* (l'objectif à plus long terme) doit être menée avec précaution. En effet, l'environnement du tissu, sa teneur en eau, sa température, sa teneur en sel (utilisé pour la conservation) sont autant de paramètres variant entre les deux situations et qui influent potentiellement le signal THz mesuré. Des premières expériences *in vivo* ont néanmoins réussi à distinguer, chez la souris, la présence d'une tumeur cancéreuse dans un environnement lipidique [82]. L'imagerie de son évolution en fonction du temps est présentée en Figure 1.24.

---

pides sont d'autres arguments valides. La compréhension des différences observées est donc aujourd'hui lacunaire.

<sup>12</sup>Les auteurs développent notamment ici une Analyse en Composante Principale (PCA), qui sera présentée dans le Chapitre 3.

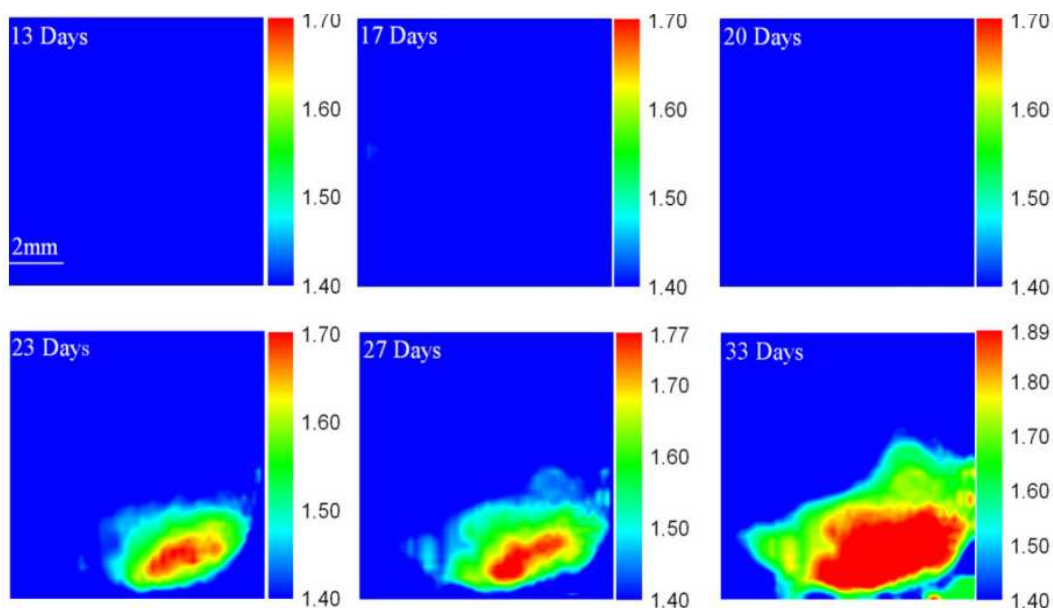


Fig. 1.24 – Imagerie THz *in vivo* de l'évolution d'une tumeur implantée dans une souris [82].

De manière plus générale, des investigations ont été menées sur des tissus cellulaires et ont montré la très grande sensibilité de la spectroscopie THz aux modifications de comportements cellulaires. Par exemple, Liu *et al.* ont montré que la possibilité de distinguer<sup>13</sup> des très faibles changements (non observables en microscopie optique) au sein d'une monocouche de cellules endothéliales, suite à leur exposition à des facteurs de croissance spécifiques [83].

## D Mesures sur échantillons liquides

Concernant la mesure sur liquides à proprement parler, une approche est de caractériser les échantillons par réflexion d'impulsion ("reflection mode TDS") [17]. Ronne *et al.* [84] ont utilisé ce protocole pour étudier le comportement diélectrique de l'eau et du deutérium ( $D_2O$ ) de 0.1 à 2THz. Grâce notamment à l'analyse du déphasage des signaux réfléchis, les auteurs parviennent à déterminer un modèle de Debye à deux composantes pour la caractérisation des deux liquides. Leur évolution en fonction de la température permet ensuite de discuter des modèles physiques aptes à décrire le comportement de l'eau. Moller *et al.* ont de la même manière caractérisé des mélanges binaires eau/éthanol ainsi que

<sup>13</sup>La technique utilisée est basée sur la spectroscopie THz-TDS en mode différentiel (THz-DTDS), pouvant, selon les auteurs, sonder des variations d'épaisseur de liquides de l'ordre du nanomètre.



des solvants organiques [17]. L'utilisation de l'onde réfléchi sur l'échantillon permet de s'affranchir du caractère hautement absorbant de la solution. En revanche, l'analyse des signaux mesurés est plus complexe que pour une analyse en transmission. De plus, la connaissance précise de la phase du signal réfléchi est indispensable afin de caractériser l'absorption de l'échantillon ; en transmission, seule l'amplitude du signal transmis peut suffir.

Afin d'effectuer des mesures en transmission, l'approche suivie par le groupe de Martina Havenith a été l'utilisation de sources de fortes puissances. Les travaux de cette équipe concernant l'hydratation des protéines et sucres aux fréquences THz ont été présentés en première partie de ce chapitre [20]. Pour permettre l'utilisation de sources de faible puissance, une réduction de la taille des échantillons est nécessaire. Dans ce cadre, une approche très originale est celle de Cooksey *et al.* Ils ont, pour s'affranchir de l'absorption de l'eau, utilisé des nano-poches de solutions aqueuses (micelles inverses) à analyser au sein d'un solvant apolaire, l'heptane, transparent aux fréquences Terahertz [85]. De manière plus répandue, l'utilisation de cavités fines (de 50 à 1000 $\mu\text{m}$ ) contenant le liquide à analyser a notamment été proposée par Kindt et Schmuttenmaer [86]. Ce protocole leur a permis d'étendre jusqu'à 1THz les résultats de relaxation diélectrique concernant la permittivité de l'eau, du méthanol, de l'éthanol et du propanol.

Cette idée de réduction de la taille des échantillons à sonder par transmission a été reprise pour l'analyse de solutions à caractère biologique [87]. Globus *et al.* ont caractérisé l'ADN de 0.3 à 0.75 THz [88, 89]. Ils ont montré que la conformation et l'orientation de l'ADN en phase liquide pouvaient être sondées par la spectroscopie THz. En effet, leur modification s'accompagne de variations en intensité et position de pics de résonance. Des signatures spectrales semblent donc apparaître. En revanche, les auteurs insistent sur la nécessité d'un protocole expérimental rigoureux permettant un contrôle précis des échantillons observés (orientation, concentration...). L'étude de protéines en solution a été menée par Xu *et al.* sur l'Albumine de Sérum Bovin (BSA) [90]. L'évolution de son absorption en fonction de sa concentration a été mesurée de 0.3 à 3.72THz. Expérimentalement, la puissance transmise est mesurée pour plusieurs largeurs  $d$  d'échantillon (de 0 à 180 $\mu\text{m}$ , par pas de 20 $\mu\text{m}$ ). Une régression permet ensuite de revenir rapidement à la valeur de l'absorption  $\alpha$  (puissance transmise =  $K \exp(-\alpha d)$ ). Une augmentation monotone de l'absorption de la BSA avec la fréquence est observée et, contrairement aux résultats précédents avec l'ADN, aucune signature spectrale ne peut être extraite. Ces ré-

sultats corroborent ceux obtenus par Markelz *et al.* présentés en phase sèche : *a priori*, la spectroscopie THz n'est pas à même de distinguer des signatures propres à chaque protéine. Les auteurs affirment que cela est dû à la différence de répartition des charges au sein d'une protéine et au sein de l'ADN. En effet, la répartition régulière, périodique, ordonnée des charges sur les brins d'ADN est propice à l'apparition de pics de résonance. En revanche, le caractère désordonné et aperiodique de la répartition de charges sur une protéine ne s'y prête pas. Néanmoins, comme observé en sec, la distinction entre diverses conformations d'une même protéine en milieu liquide est possible. Yoneyama *et al.* ont en effet pu comparer l'absorption d'échantillons de BSA native et dénaturée de 0.5 à 3THz. Pour cela les échantillons liquides ont été placés dans des puits de 100 $\mu$ L comportant une membrane et analysés par spectroscopie TDS [91].

Le développement des mesures sur échantillons de faible volumes et la nécessité de l'établissement de protocoles expérimentaux reproductibles a introduit l'utilisation de circuits microfluidiques, proposée initialement par Mille *et al.* [92]. George *et al.* ont présenté une telle réalisation dans "Microfluidic devices for terahertz spectroscopy of biomolecules" [93]. Ils déclinent l'intérêt de l'utilisation de microcanaux en plusieurs points : (i) l'utilisation de sources de faible puissance pour la mesure en transmission, (ii) la possibilité d'injection et de mesure de réaction en temps réel et (iii) la possibilité de l'intégration de ces circuits dans les plateformes d'analyse multi-paramétriques. Dans le protocole décrit, un faisceau THz est focalisé sur une cavité microfluidique réalisée en polymère Zeonor (Figure 1.25-gauche). Cette configuration permet aux auteurs de détecter et mesurer l'absorption de solutions de BSA concentrées à 101, 200 et 305mg/mL (Figure 1.25-droite). Une configuration similaire avec l'utilisation d'une cuve microfluidique en silicium a été proposée par Baragwanath *et al.* [94]. La transparence du silicium aux fréquences THz et la maîtrise de son usinage (haute précision sur profondeurs/largeurs des microcanaux), malgré son opacité optique, justifient ici son utilisation. Les auteurs sont parvenus à détecter la présence d'alcool à une précision de 2.5% de titre volumique et la présence de la protéine biotine à une concentration de 0,5mg/mL.

L'étape suivante dans le développement d'une spectroscopie THz intégrée est de guider l'onde au sein de la puce microfluidique plutôt que d'utiliser une propagation / focalisation en espace libre. Ohkubo *et al.* ont proposé l'utilisation de lignes micro-strip impactées par un laser femtoseconde pour amener l'onde vers une piscine en polyéthylène contenant l'échantillon à sonder [95]. Dans ce dispositif, les mesures d'absorption de

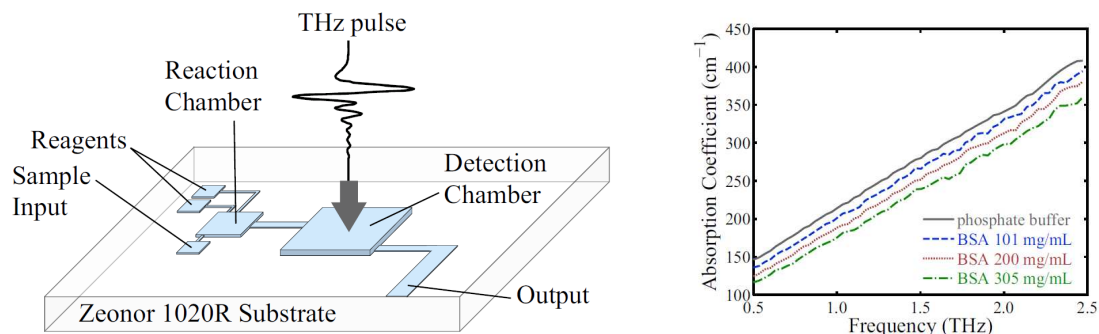


Fig. 1.25 – Gauche : Dispositif expérimental pour la spectroscopie THz en environnement microfluidique. Droite : Absorption de solutions de BSA en fonction de la concentration pour des fréquences de 0.5 à 2.5 THz [93].

la BSA et de l'Arginine ont été effectuées. La limite de détection atteinte est de 50mg/mL et les auteurs sont parvenus à quantifier l'hydratation des deux protéines en solution [96].

D'autres guides d'ondes, de type métallique, ont été proposés pour réaliser des spectroscopies sur échantillons liquides. Par exemple, Mendis *et al.* ont présenté un guide d'onde accompagné d'une cavité permettant à la fois une résonance électromagnétique et l'écoulement d'un fluide [97]. L'observation de l'évolution du pic de résonance en fonction du liquide dans la cavité rend possible la mesure de son indice de réfraction. Toutefois, les liquides utilisés dans cette étude sont des solvants organiques (de l'octane à l'hexadécane) peu absorbants et l'extension de cette technique à des milieux aqueux n'est pas présentée. L'utilisation de guides métalliques creux est aussi à l'origine du travail de Matvejev *et al.* [98]. Dans leur dispositif présenté en Figure 1.26, un capillaire microfluidique commercial en silice (diamètre interne : 100 $\mu$ m et 320  $\mu$ m) est inséré perpendiculairement dans un guide. La simulation de 230 à 330GHz de transmission de l'onde au sein du guide d'onde en fonction de la solution dans le capillaire permet de distinguer deux états de conformation de la protéine HSA (Albumine de Sérum Humain) en milieu liquide.

Les développements actuels semblent donc converger vers une approche intégrée de la spectroscopie TéraHertz par transmission, adoptée par l'équipe M2T, et dont les avantages sont multiples :

- l'utilisation de sources de faibles puissances, éventuellement intégrables ;
- la possibilité, à travers le contrôle des injections, de travailler avec des protocoles expérimentaux reproductibles et variés ;

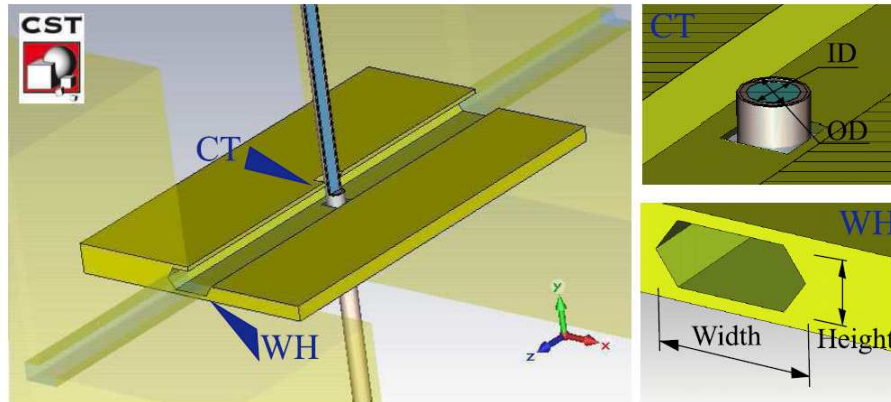


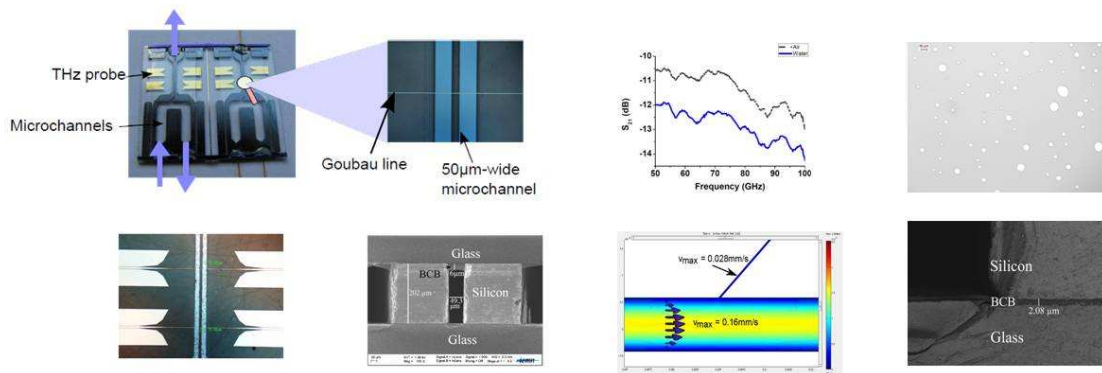
Fig. 1.26 – Intégration d'un guide d'onde métallique creux avec un capillaire commercial pour la spectroscopie de solutions liquides de protéines [98].

- la possibilité de suivi de réaction au sein de microcanaux ;
- l'utilisation de faible quantité d'échantillons.

Si des progrès ont été effectués dans l'intégration des guides ou l'utilisation de microcanaux, la co-intégration des fonctions de guidage électromagnétique et de circulation microfluidique est cependant un enjeu non atteint dans la littérature présentée. C'est l'un des objectifs du travail réalisé ici. En plus de leur co-intégration, l'indépendance de leur réalisation est également un point important. En effet, elle permettra une versatilité en terme de conception et de complexification des systèmes fabriqués. Concrètement, l'amélioration indépendante des fonctions microfluidiques et électromagnétiques permettrait une amélioration des performances et des possibilités des futurs systèmes. C'est dans cet esprit que ce manuscrit est rédigé. Dans la suite, le dispositif co-intégrant les fonctions microfluidiques et électromagnétiques sera présenté et son processus de fabrication détaillé. La version "de base" de ce microsystème sera ensuite utilisée pour caractériser des échantillons liquides tels des mélanges eau/alcool ou eau/protéine. Enfin, le développement de fonctions électromagnétiques et microfluidiques sera présenté afin d'apporter de nouvelles possibilités au dispositif initial.

## Partie 2

# Description, conception et tests du BioMEMS THz



Cette partie s'intéresse au microsystème microfluidique développé dans ce travail de thèse. Après une brève description, les considérations quant à sa fabrication technologique, sous la contrainte d'une propagation THz intégrée, sont développées. La caractérisation du dispositif réalisé est ensuite menée.

## Sommaire

---

<b>Introduction</b>	<b>48</b>
<b>I Présentation du BioMEMS THz</b>	<b>49</b>
A Lignes de Goubau	49
1 Propagation sur fil unique	49
2 Lignes de Goubau planaires	50
B Circuit microfluidique	52
<b>II Ancien procédé de fabrication du BioMEMS THz</b>	<b>53</b>
A Description	53
B Limites du procédé technologique	54
1 Collage BCB	54
2 Gravure KOH du silicium	56
3 Suppression des étapes manuelles	56
<b>III Modifications lors de la fabrication du BioMEMS</b>	<b>58</b>
A Réduction de la taille des microsystemes	58
B Collage Quartz/Silicium	59
C Gravure des microcanaux	62
1 La gravure du silicium par DRIE : le procédé Bosch	63
2 Gravure profonde DRIE des microcanaux	63
3 Gravure du BCB	65
D Collage des capots par "découpe différentielle"	67
1 Collage du substrat de verre	67
2 Découpes partielle et totale des BioMEMS	67
<b>IV Test et validation du dispositif</b>	<b>70</b>
A Aspect microfluidique	70
1 Contrôle qualitatif de l'écoulement	70
2 Pression supportée au sein du dispositif	70
B Aspect électromagnétique	75
C Aspect Thermique	76
1 Puissance dissipée dans le liquide à sonder	76
2 Equation de la chaleur dans la configuration microfluidique	77
3 Résolution de l'équation de la chaleur	79

## PARTIE 2. DESCRIPTION, CONCEPTION ET TESTS DU BIOMEMS THZ

---

4	Influence des paramètres expérimentaux . . . . .	80
5	Conclusion . . . . .	83
<b>Conclusion</b>	. . . . .	<b>85</b>

---

## **Introduction**

Lors de la thèse de Monsieur Anthony Treizebré, un prototype de BioMEMS THz, le premier combinant une propagation électromagnétique sur ligne de Goubau et une circulation fluide au sein de microcanaux, avait été réalisé [99]. La culture cellulaire en son sein avait été démontrée et des premières mesures sur solutions aqueuses avaient été effectuées.

La description de ce microsysteme avec le détail des différentes fonctions sera effectuée dans un premier temps. Ensuite, le procédé technologique précédemment développé sera décrit. Il permettait la fabrication de 8 microsystemes par substrat de 3 pouces et comportait encore quelques étapes manuelles. De plus, des problèmes de fuites des microcanaux étaient parfois observés.

Après avoir mis en avant les points critiques du précédent procédé technologique et en vue de rationaliser et d'interpréter les mesures obtenues grâce au BioMEMS, un procédé technologique optimisé sera présenté [100]. Ses potentialités seront discutées et divers tests seront effectués pour le caractériser. Ce procédé a fait l'objet d'un brevet [101].



## I Présentation du BioMEMS THz

Afin de réaliser la spectroscopie THz de liquides en dépit de la forte absorption de l'eau, la réduction des volumes d'échantillons a été la voie suivie au sein de l'équipe M2T. La réalisation du BioMEMS (Figure 2.1) en est la concrétisation.

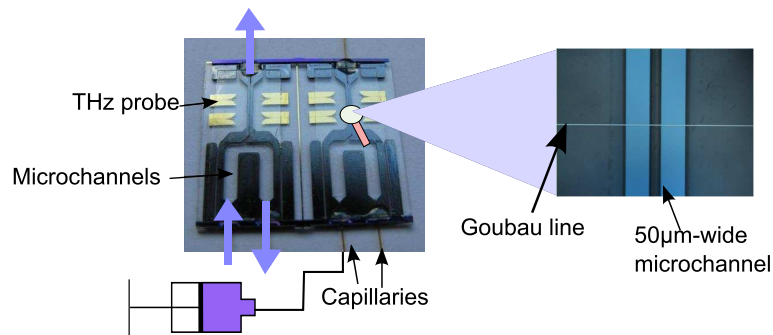


Fig. 2.1 – Couplage des fonctions térahertz et microfluidiques au sein du BioMEMS THz

Dans ce système, l'échantillon à analyser est conduit au sein de microcanaux jusqu'à une zone de mesure où il rencontre l'onde électromagnétique, convoyée perpendiculairement par un guide d'onde. Le guide d'onde en question, composé d'un fil unique, est appelé "Ligne de Goubau". Le couplage intégré de fonctions microfluidiques et électromagnétiques THz est l'originalité fondamentale de ce dispositif. Dans la suite, ces deux fonctions sont détaillées.

### A Lignes de Goubau

#### 1 Propagation sur fil unique

Une onde électromagnétique peut être propagée par un guide d'onde composé d'un simple fil métallique. Cette affirmation non-triviale a été démontrée théoriquement par Sommerfeld en 1899, à partir des équations de Maxwell [102]. Cependant, comme souligné par Goubau en 1950, l'extension du champ électrique autour du fil métallique est tellement large que cette structure ne rencontrait aucun intérêt pratique [103]. Afin de réduire

cette extension, Goubau a proposé de recouvrir le fil métallique d'une fine couche diélectrique ou d'augmenter la rugosité de ce fil. En vue d'applications aux lignes de transmission, il a montré que la propagation d'ondes à des fréquences supérieures à 100MHz était possible dans ces nouvelles configurations. Les principales qualités de ce mode de propagation sont ses faibles pertes, une propagation quasi-TEM, et une extension spatiale d'autant plus faible que la fréquence d'investigation est élevée. Son étude détaillée à plus haute fréquence a été menée par King et Wiltse en 1962 [104]. Qualitativement, l'onde propagée autour du fil est une onde de surface de type plasmonique, résultant de l'oscillation locale des électrons à la surface du métal.

En raison du confinement de l'onde augmentant avec la fréquence d'investigation et de ses propriétés attrayantes en terme de dispersion et d'absorption, le fil métallique unique s'est révélé comme une structure guidante très adaptée au spectre TeraHertz. Wang et Mittleman l'ont démontré en 2004 [105] avec l'expérience présentée en Figure 2.2.

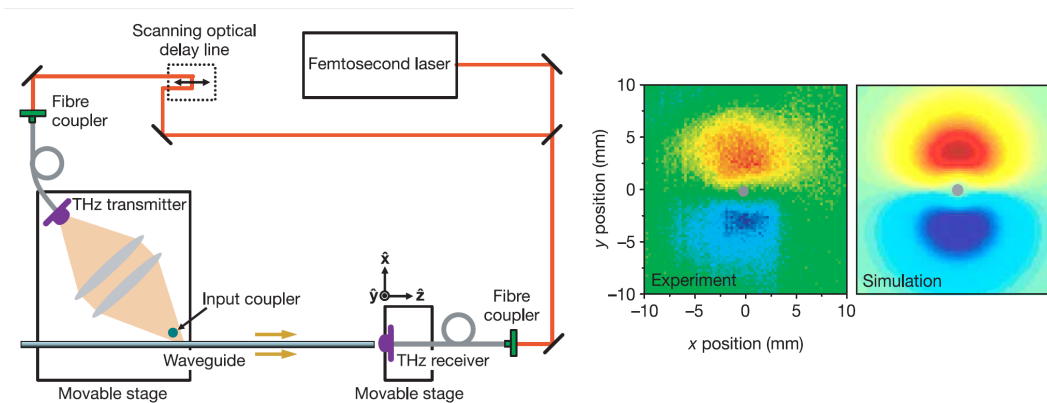


Fig. 2.2 – Gauche : Protocole expérimental pour le test de la propagation THz sur fil unique. Droite : Extension du champ autour du fil expérimentalement et en simulation [105].

## 2 Lignes de Goubau planaires

L'intégration de ces lignes de Goubau sur substrats planaires a été proposé au sein de l'équipe M2T [106, 107, 108]. Les lignes de Goubau planaires sont donc des fils métalliques uniques déposés sur un substrat isolant. Elles possèdent l'avantage de pouvoir être excitées de manière efficace grâce à un Analyseur de Réseau Vectoriel. Dans le cas présent, les lignes de Goubau planaires sont réalisées par un dépôt d'or sur un substrat de verre (Pyrex Borosilicate). L'or est choisi en raison de sa forte conductivité aux fré-

quences THz ( $\sigma \approx 2.5 \cdot 10^7 \text{ S/m}$  à 300GHz [109]). L'utilisation de verre Borosilicate (Pyrex) en tant que substrat s'explique par sa transparence et ses pertes diélectriques hautes fréquences relativement faibles ( $\tan \delta \approx 5 \cdot 10^{-3}$  à 300GHz [109]). L'allure simulée du champ électromagnétique autour de la ligne est donnée en Figure 2.3.

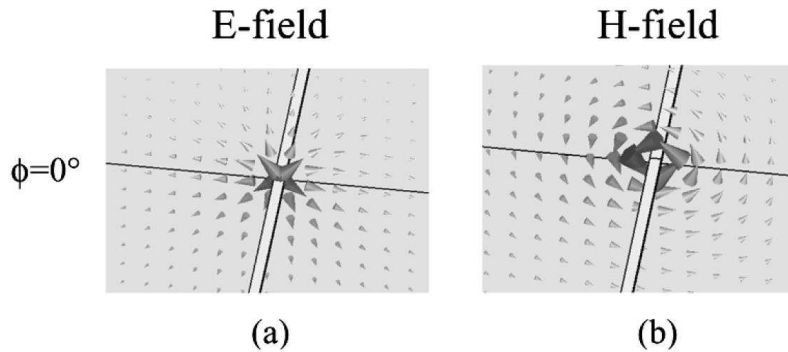


Fig. 2.3 – Allure du champ électromagnétique autour de la ligne de Goubau [108].

Le confinement de l'onde autour du fil est de 10 à 2  $\mu\text{m}$ , en fonction de la largeur de la ligne [110]. Pour une ligne d'une largeur de 5  $\mu\text{m}$  et d'une épaisseur de 500nm, les pertes à 100GHz sont de l'ordre de 2dB/mm et l'impédance d'onde de l'ordre de 250  $\Omega$ . Expérimentalement, le mode de propagation sur la ligne de Goubau est quasi-TEM et est excité par un Analyseur de Réseau Vectoriel (ARV) *via* des pointes coplanaires d'impédance caractéristique 50 $\Omega$ . Une transition coplanaire/Goubau est donc nécessaire pour l'excitation. Elle a ainsi été précédemment réalisée. Les pertes par réflexion qu'elle engendre sont inférieures à -10dB et les pertes en propagation sont de l'ordre de 2.5dB (avec deux transitions) [111]. La structure complète composée de la ligne de Goubau et des deux transitions est présentée en Figure 2.4.

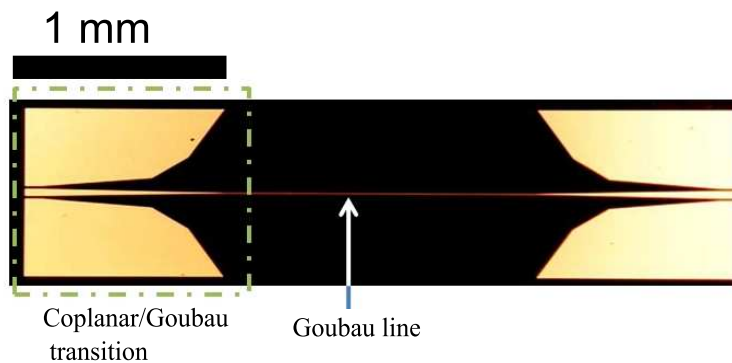


Fig. 2.4 – Ligne de Goubau et transitions Coplanaire/Goubau

## B Circuit microfluidique

Le circuit microfluidique est réalisé grâce à des murs de silicium. L'utilisation du silicium s'explique par le fait qu'il puisse être précisément gravé de manière profonde et anisotropique [112] et qu'il présente des faibles pertes dans la bande THz ( $\tan \delta \approx 5 \cdot 10^{-4}$  à 400GHz [109]). De plus il pourra, à terme, être le support de l'intégration de fonctions électroniques en vue du développement de laboratoires sur puce complètement autonomes. La profondeur des microcanaux est de  $180\mu\text{m}$  pour réaliser la connexion avec des capillaires de  $150\mu\text{m}$  de diamètre extérieur. Le circuit microfluidique est composé d'un canal principal qui mène les échantillons à un canal de mesure de  $50\mu\text{m}$  de large. Une telle configuration permet de combiner une arrivée rapide des échantillons et un débit faible dans la zone de mesure (de résistance hydraulique supérieure) afin d'éviter des contraintes excessives sur les échantillons mesurés (cellules par exemple). La Figure 2.5 démontre ce principe, par la simulation de l'écoulement dans le circuit microfluidique avec le logiciel COMSOL<sup>®</sup> Multiphysics.

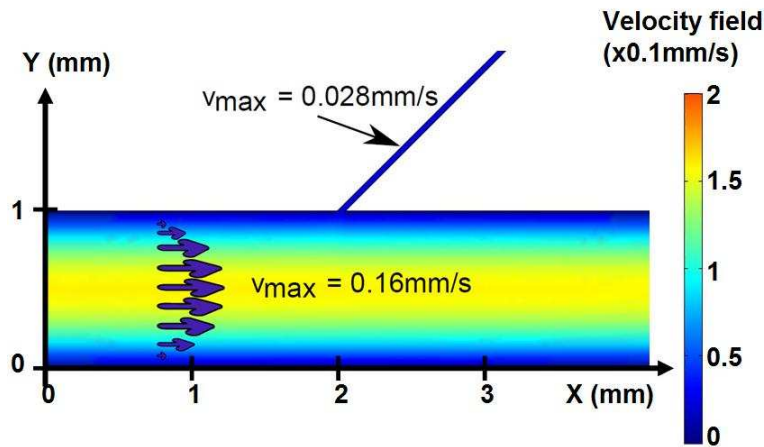


Fig. 2.5 – Simulation de l'écoulement dans le circuit microfluidique

La faisabilité de la fabrication du microsystème présenté a été démontrée dans le travail de thèse de Monsieur Anthony Treizebré. Le procédé technologique alors développé est présenté dans la section suivante.

## II Ancien procédé de fabrication du BioMEMS THz [99]

### A Description

L'ancien procédé utilisé pour la réalisation du BioMEMS THz commence par le dépôt des lignes électromagnétiques d'or (400nm) sur un substrat de quartz de  $350\mu\text{m}$  par évaporation et procédé lift off [113]. Une fine couche de titane (50nm) sert de couche d'accroche de l'or sur le quartz (Figure 2.6).

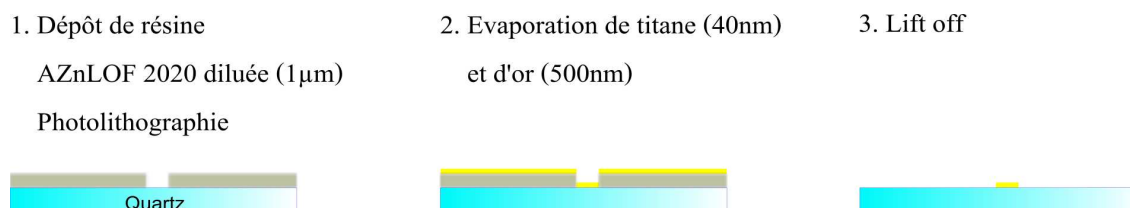


Fig. 2.6 – Dépôt des lignes électromagnétiques sur quartz

Un substrat de silicium de  $350\mu\text{m}$  d'épaisseur est ensuite travaillé pour réaliser la composante microfluidique du dispositif. La face arrière du substrat est profondément gravée ( $180\mu\text{m}$ ) par une attaque ionique (Deep Reactive Ion Etching : DRIE, procédé dit "Bosch" [112], [114]) afin de former les microcanaux. La face avant du substrat est gravée chimiquement à l'hydroxyde de potassium KOH afin d'ouvrir les microcanaux (Figure 2.7).

Les deux substrats ainsi obtenus sont ensuite collés lors d'une thermocompression à l'aide du polymère CYCLOTENE 3022-46 (BCB 3022-46 de Dow Chemicals Company) chauffé à  $160^\circ\text{C}$  sous 1 bar pendant une heure. Le BCB a été choisi en raison de sa planéarité, de sa capacité à être gravé par plasma et de ses pertes limitées dans le domaine THz [115]. Le substrat complet (comprenant 8 dispositifs) est ensuite découpé afin de séparer les différents dispositifs qui sont ensuite individuellement et manuellement fermés par un

capot de pyrex de  $150\mu\text{m}$  grâce à un collage BCB à  $110^\circ\text{C}$  (figure 2.8).

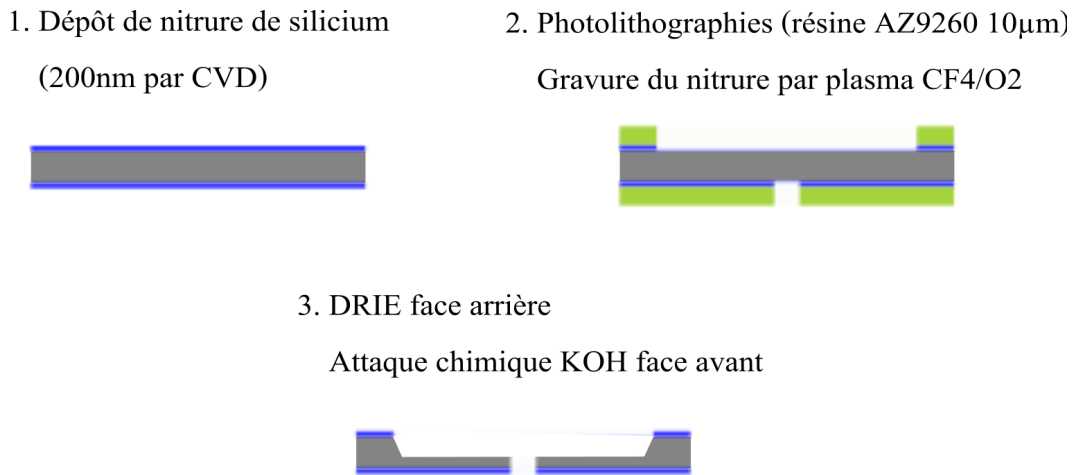


Fig. 2.7 – Procédé technologique sur substrat de silicium

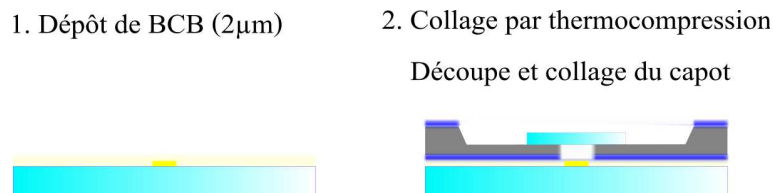


Fig. 2.8 – Collage, découpe et pose des capots

Grâce au microsysteme ainsi réalisé, des premières mesures sur l'eau, l'éthanol ou des protéines comme la lactoferrine ont été réalisées. Elles ont montré la capacité du BioMEMS à les différencier [99]. De plus, le suivi en temps réel d'une réaction enzymatique au sein de ce dispositif a été réalisé [116]. Cependant, l'obtention de mesures plus quantitatives est rendue difficile par certaines limitations du processus de fabrication technologiques.

## **B Limites du procédé technologique**

### **1 Collage BCB**

Tout d'abord, des fuites apparaissent parfois au niveau du microcanal central de mesure. Ceci peut s'expliquer notamment par les paramètres du collage Silicium/Quartz par BCB avec une température inférieure à  $250^\circ\text{C}$  (limitation de la colleuse Logitech

1WBS1). Les propriétés en température du BCB sont représentées en Figure 2.9. Le dépôt de  $2\mu\text{m}$  de BCB3022-46 [115] sur le quartz s'effectue à la tournette. Ensuite, un pré-recuit à  $95^\circ\text{C}$  pendant 5 minutes permet l'évaporation des solvants. De retour à la température ambiante, le film de BCB déposé est solide. Pour effectuer le collage, on superpose manuellement les substrats de quartz et de silicium, puis le tout est chauffé à  $130^\circ\text{C}$  pendant 1 heure sous 1 bar. En se reportant à la Figure 2.9, on voit que dans ces conditions le BCB est en phase liquide lors de toute la phase de collage. Une fois les substrats collés revenus à température ambiante, le BCB n'est que partiellement polymérisé (#30%). Cette faible polymérisation le rend réactif à divers produits utilisés ensuite dans le procédé technologique comme l'acétone ou le KOH, entraînant les fuites constatées. De plus, sans polymérisation complète, le collage est réversible : un nouveau recuit des substrats à une température de l'ordre de  $120^\circ\text{C}$  rend le BCB de nouveau liquide et peut entraîner un décollement. La polymérisation complète et irréversible du BCB apparaît donc comme indispensable. Pour cela, une heure de collage à  $250^\circ\text{C}$  est nécessaire, ce qui implique un changement de colleuse.

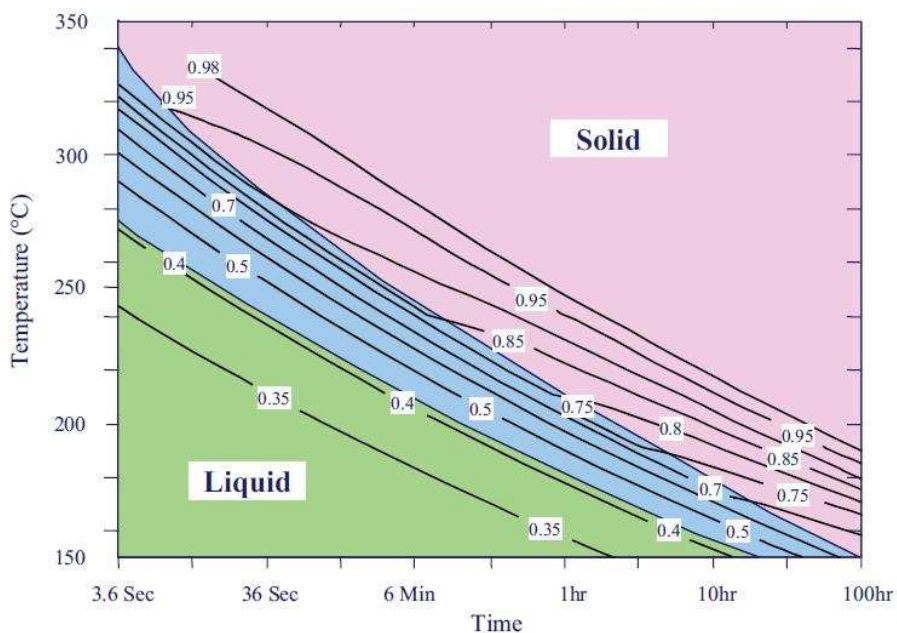


Fig. 2.9 – Etat du BCB en fonction du temps et de la température de recuit [115]

Le collage Silicium/Quartz actuel s'effectue entre le substrat de quartz "pleine plaque" et un substrat de silicium ouvert par endroits (microcanaux). Or, lors du collage, la pression effective sur la zone de collage est fonction de la pression exercée par les parois de la colleuse ET de la surface non gravée du silicium. De manière très simplifiée, si la pres-

sion configurée pour la colleuse est de 1 bar et que la moitié du substrat de silicium est gravée, la pression effective sur la zone de collage est de l'ordre de 2 bars. Ainsi, le paramètre "pression" dans l'étape de collage est dépendant de la géométrie des microcanaux. A chaque modification de celle-ci, l'étape de collage est donc à recalibrer. Placer l'étape de collage en amont de l'étape de gravure des microcanaux dans le silicium permettrait un procédé technologique plus souple.

### **2 Gravure KOH du silicium**

L'attaque au KOH utilisée pour l'ouverture des microcanaux endommage les microcanaux creusés par la gravure DRIE. En effet, lorsque un microcanal est ouvert, le KOH peut s'y insérer et graver le microcanal. Ainsi, la largeur du microcanal de mesure peut fluctuer selon le temps de résidence du KOH en son sein<sup>1</sup>. La largeur du microcanal de mesure est donc sujette à une incertitude et introduit une non-reproductibilité des mesures entre différents BioMEMS.

### **3 Suppression des étapes manuelles**

**Le collage Silicium/Quartz s'effectue suite à un alignement manuel sur plaque chauffante.** En effet, la colleuse Logitech 1WBS1 utilisée lors de cette étape ne permet pas d'alignement au microscope. Cependant, en vue de contrôler précisément la zone de mesure sondée par l'onde THz, un alignement précis des fonctions microfluidiques et électromagnétiques est préférable. Par exemple, dans la perspective de la mesure sur cellule unique, l'alignement de la ligne de Goubau avec la structure microfluidique d'immobilisation cellulaire est indispensable.

**Le collage des capots s'effectue manuellement sur plaque chauffante après la découpe.** Une telle étape est peu compatible avec la volonté de réduire les tailles des BioMEMS (le capot devient alors trop petit pour le coller manuellement), n'assure pas systématiquement un bon collage (pression manuelle sur le BCB à l'aide d'une pince) et est très gourmande en temps (proportionnel au nombre de BioMEMS et non au nombre de substrats).

---

<sup>1</sup>Lors de l'étape d'ouverture, on attend que tous les microsystèmes du substrat soient ouverts avant de le retirer du bain KOH. Ainsi, les premiers microcanaux ouverts baignent plus longtemps que les autres dans le KOH.



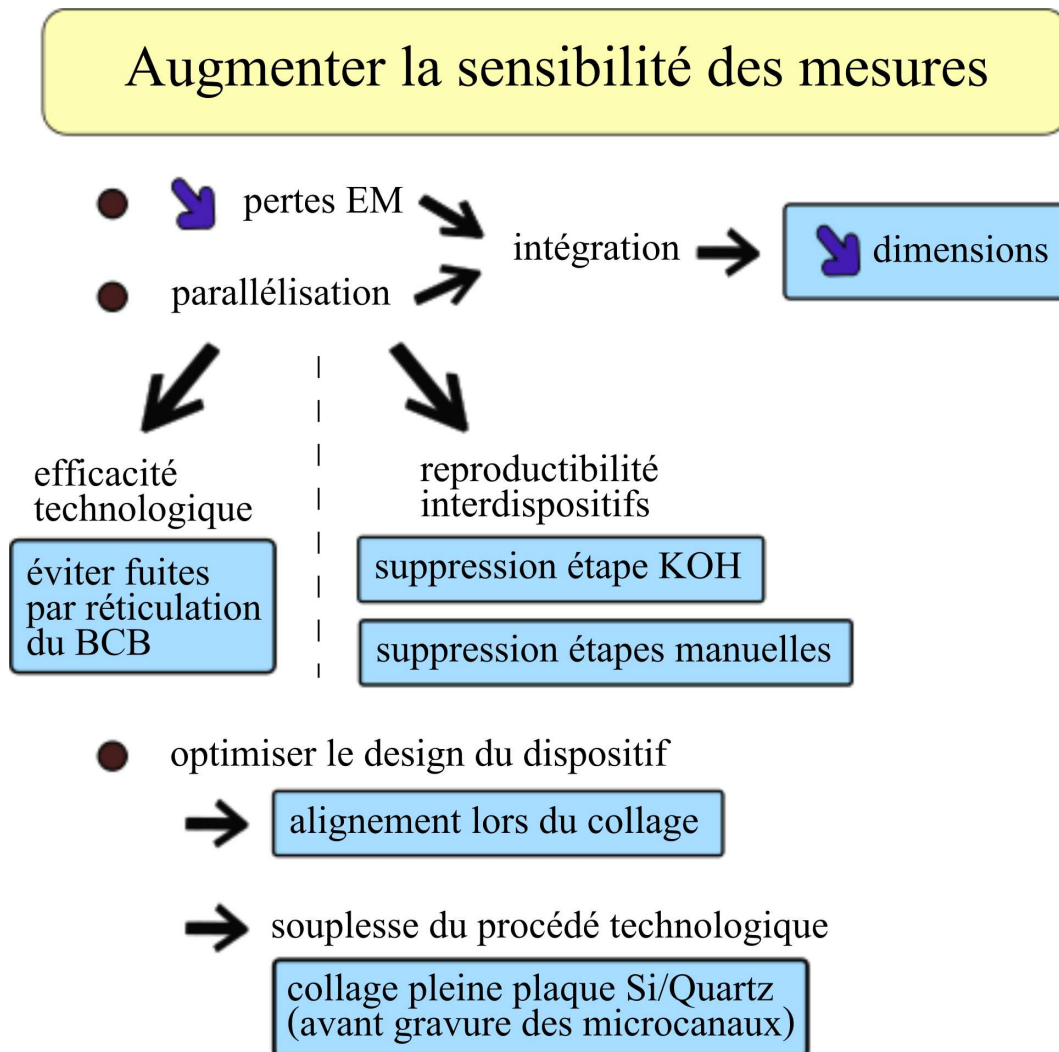


Fig. 2.10 – Modifications technologiques nécessaires à l'amélioration de la sensibilité des mesures

Les limitations précédentes, résumées en Figure 2.10, ont ainsi conduit le travail de redéfinition du procédé technologique.

### **III Modifications lors de la fabrication du BioMEMS**

Cette section explique pas à pas la redéfinition du procédé technologique pour la réalisation du BioMEMS THz. Une vue d'ensemble et un résumé des étapes sont présentés dans l'Annexe. Lors du développement de ce nouveau protocole, l'obtention d'un dispositif versatile a été un leitmotiv sous-jacent. En effet, le procédé de fabrication a été pensé de manière à ce que les fonctions microfluidiques et électromagnétiques puissent être modifiées à souhait, sans changement de paramètres technologiques de fabrication. Pour y parvenir, une modification profonde du procédé est menée concernant le collage quartz/silicium qui s'effectuera dorénavant "pleine plaque". Un tel aménagement permet également une réduction sensible de la taille des microsysteme par augmentation de la résolution des motifs gravés.

#### **A Réduction de la taille des microsystemes**

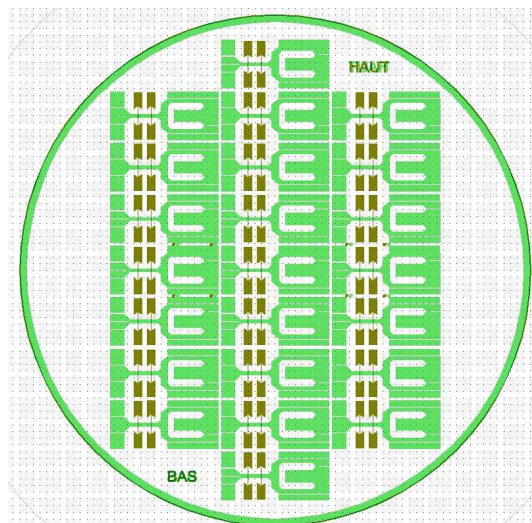


Fig. 2.11 – Masques pour BioMEMS THz permettant une intégration de 23 dispositifs

De nouveaux masques ont été réalisés pour diminuer les dimensions caractéristiques du dispositif et sont présentés en Figure 2.11. Il est désormais possible de réaliser 23 BioMEMS sur une même puce, au lieu de 8. La longueur des lignes coplanaires est diminuée, passant de 6mm à 1.3mm. La taille d'un dispositif passe de 16mm x 19mm à 7.2mm x 16mm, rendant difficile la pose manuelle du capot. De plus, les surfaces des murs de silicium sont diminuées par rapport au masque précédent. Ainsi, les fuites au niveau des collages sont plus probables et ceux-ci doivent donc être redéfinis.

## **B Collage Quartz/Silicium**

Le premier collage à étudier est le collage quartz<sup>2</sup>/silicium. L'objectif est d'effectuer le collage avec polymérisation complète du BCB et avant la gravure des microcanaux. Avant celui-ci, les guides électromagnétiques doivent être déposées sur le quartz. Pour cela, le procédé est similaire à celui précédemment développé. Après un nettoyage du substrat de quartz à l'acétone et l'iso-propanol, un recuit de 5 minutes à 200°C est effectué. Il permet la déshydratation du substrat et améliore l'adhérence des futurs dépôts. Ensuite, de l'HMDS (pour HexaMethylDiSilazane) est centrifugé sur le substrat en tant que promoteur d'adhérence. Les paramètres détaillés de cette étape sont donnés en Table 2.1. La résine AZnLoF2020 diluée (AZnLoF2020/Propylene Glycol Monomethyl Ether Acetate PGMEA - 50/50) est ensuite déposée par centrifugation et recuite pour obtenir une épaisseur de 1.5  $\mu\text{m}$ . Le substrat est ensuite exposé aux radiations UV ( $\lambda = 325\text{nm}$ ), recuit et révélé grâce au développeur AZ326MIF pour graver la résine non exposée. Les produits HMDS, AZnLoF2020, PGMEA et AZ326MIF proviennent de MicroChemicals [117]. Le profil de résine obtenu (de type "casquette") est adapté au procédé Lift Off. Une évaporation de titane (50nm, pour l'adhérence), d'or (400nm) et d'aluminium<sup>3</sup> (50nm) est ensuite réalisée. Le Remover 1165 (de Shipley Company, LLC) est alors utilisé pour graver toute la résine. Les lignes de Goubau ainsi réalisées peuvent être observées en Figure 2.18. Le procédé précédemment décrit est très similaire à celui décrit en Figure 2.6 avec le dépôt supplémentaire d'aluminium. Grâce à l'aligneur MA6/BA6 de SussMicrotec utilisé pour la photolithographie, la résolution des motifs électromagnétiques peut atteindre

<sup>2</sup>ou verre/silicium, le choix du verre n'est pas essentiel dans ce cas, c'est son épaisseur qui importe. En effet, elle impose une fréquence de coupure haute à la propagation électromagnétique par la création de modes de substrats aux hautes fréquences. Plus l'épaisseur du substrat de verre (ou quartz) sera faible, plus cette fréquence sera importante. Ces considérations seront un des objets du Chapitre 4 de ce manuscrit.

<sup>3</sup>Le dépôt d'aluminium, non réalisé dans l'ancien procédé technologique, sera justifié par la suite.

1 $\mu$ m. Dans le cas présent, des lignes de 5 $\mu$ m de large ont été réalisées.

<b>Centrifugation d'HMDS</b>	Recuit de déshydratation : 5min à 200°C (plaque) Vitesse = 2500rpm Accélération = 1000rpm/s Durée = 20s
<b>Centrifugation d'AZnLof2020</b>	Vit. = 2500rpm Acc. = 1000rpm/s Durée = 20s Recuit : 1min à 110°C (plaque) Épaisseur $\sim$ 1.5 $\mu$ m
<b>Exposition UV</b>	Longueur d'onde = 325nm Durée = 4.8s Puissance = 11mW/cm <sup>2</sup> Recuit = 1min at 110°C (plaque) Développement = AZ326MIF pendant 55s
<b>Evaporation de métaux</b>	Ti ; 50nm Au ; 400nm Al ; 50nm
<b>Lift Off</b>	Remover 1165 Température = 70°C Durée = 8h

Tab. 2.1 – Procédé lift-off pour dépôt de lignes de Goubau

Une fois les lignes électromagnétiques déposées, il faut procéder au collage du substrat de silicium, d'épaisseur 200 $\mu$ m et support des futurs murs des microcanaux. Un promoteur d'adhérence du BCB, l'AP3000 (de Dow Chemicals) est d'abord (voir Table 2.2 pour les paramètres détaillés) déposé. Il est centrifugé à 3000 tours/min pendant 20 secondes à la tournette. Ensuite, le BCB est déposé et centrifugé à 3000 tours/min pendant 40 secondes. Durant ces 40 secondes, du T1100 (de Dow Chemical) est déposé sur la circonférence du substrat afin d'y enlever le BCB et d'éviter tout bourrelet néfaste lors de la phase de collage : c'est l'étape de détournement (Figure 2.15). Le tout est ensuite recuit à 110°C pendant 30 minutes sur plaque chauffante sous diazote pour permettre l'évacuation des solvants. Une épaisseur de 2 $\mu$ m de BCB est alors mesurée sur le substrat grâce au profilomètre.

Pour effectuer le collage, un substrat de silicium de 200 $\mu$ m d'épaisseur est ensuite nettoyé et déposé sur le substrat de quartz. Le tout est inséré dans la colleuse "SB6e Bon-

<b>Centrifugation d'AP3000</b>	Vitesse = 2500rpm Accélération = 1500rpm/s Durée = 20s
<b>Centrifugation de BCB30022-46</b>	Vitesse = 2500rpm Acc. = 1500rpm/s Durée = 40s Recuit : 30min à 110°C sous N <sub>2</sub> Epaisseur ~ 2μm
<b>Collage silicium/verre</b>	Durée = 1h Température = 250°C Pression de collage = 2 bars

Tab. 2.2 – Procédé de collage du silicium

der" qui permet notamment d'atteindre la température de 250°C lors du collage. A cette température, le BCB est complètement polymérisé si il est cuit pendant 1h environ (Figure 2.9). Le collage s'effectue donc pendant 1h à 250°C et sous une pression de 2 bars (Figure 2.12). La descente de température est limitée à 50°C par heure, sous pression de 2 bars, afin de libérer au maximum les contraintes engendrées par ce collage à température élevée.

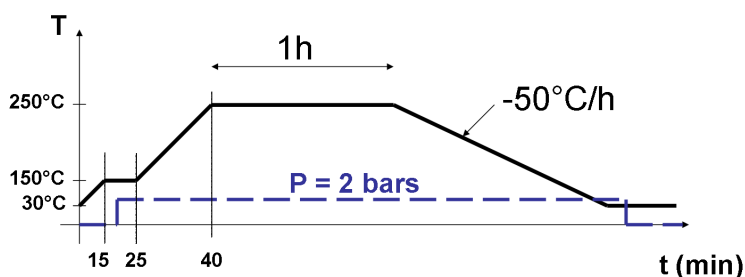


Fig. 2.12 – Paramètres du collage Silicium/Quartz par BCB

Pour réaliser le collage, la colleuse réalise par défaut le vide en son sein. C'est pourquoi lors des premiers tests de collage est apparu le problème de dégazage du BCB, se concrétisant par l'apparition de bulles sur la zone de collage (Figure 2.13). Pour y remédier, le collage s'effectue désormais à pression ambiante atmosphérique.

La Figure 2.14 présente des vues au microscope électronique à balayage du collage. On y aperçoit nettement les substrats de quartz et de silicium, séparés par une fine couche de BCB (2μm).



Fig. 2.13 – Problème de dégazage du BCB lors du collage sous vide

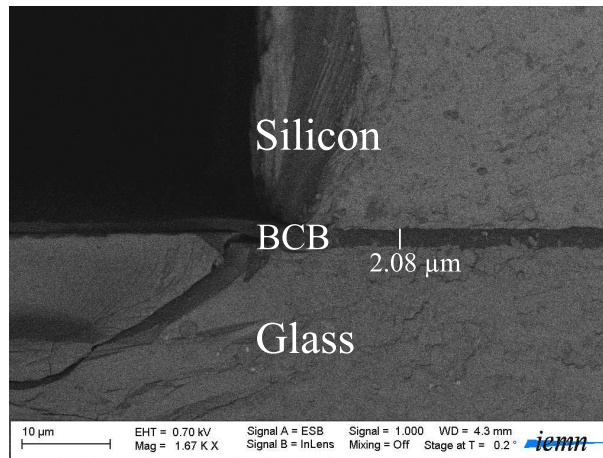


Fig. 2.14 – Observation du collage silicium/verre au microscope électronique à balayage.

### C Gravure des microcanaux

La Figure 2.15 présente l'état d'avancement du procédé technologique après le collage. Il reste désormais à effectuer la gravure profonde des microcanaux. Le diamètre extérieur des capillaires connectés au BioMEMS est de  $150\mu\text{m}$ . Ainsi, la profondeur des microcanaux doit être supérieure à cette valeur. C'est pourquoi le substrat de silicium collé a été choisi avec une épaisseur de  $200\mu\text{m}$ .

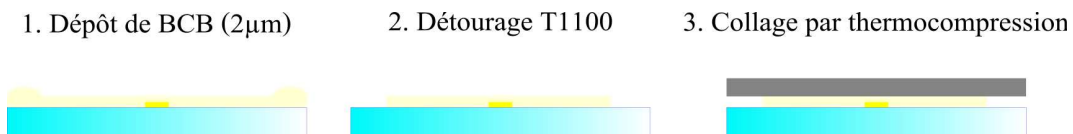


Fig. 2.15 – Avancement du procédé technologique après le collage

## 1 La gravure du silicium par DRIE : le procédé Bosch

Afin de graver de manière profonde et anisotropique les microcanaux dans silicium, le procédé Bosch standard est utilisé. Il est constitué d'une succession d'étapes de gravure (par gaz  $\text{SF}_6$ ) et de passivation ( $\text{C}_4\text{F}_8$ ). Comme dépeint dans la Figure 2.16, les étapes de passivation permettent de protéger les faces latérales du canal lors de l'étape de gravure afin que celle-ci ne s'effectue que dans le sens de la profondeur [118]. Les paramètres expérimentaux de cette étape sont détaillés dans la Table 2.3. La vitesse de gravure obtenue dans ces conditions est de  $4\mu\text{m}/\text{min}$ .

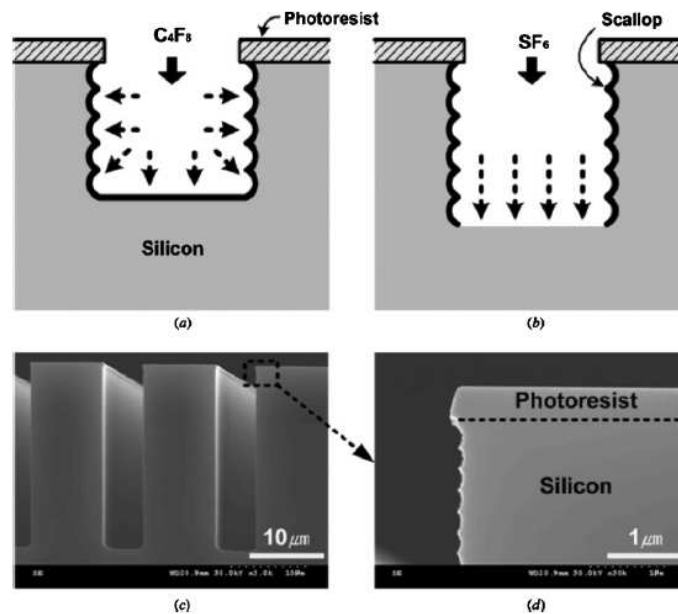


Fig. 2.16 – Procédé Bosch pour la gravure profonde du silicium. a) Etape de passivation. b) Etape de gravure. c) Tranchées obtenues. d) Zoom sur le mur pour mettre en évidence la rugosité liée à la succession des étapes de passivation et de gravure [118].

## 2 Gravure profonde DRIE des microcanaux

La gravure des microcanaux nécessite une étape de photolithographie afin de réaliser un masque en résine sur le substrat avant la gravure. Ce masque est composé d'une fine couche d'aluminium (100nm) surmontée d'une couche épaisse de résine AZ9260 ( $10\mu\text{m}$ , de MicroChemicals). La présence d'aluminium permet l'obtention de flancs de gravure plus nets alors que l'importante épaisseur de résine permet de faire face à l'agressivité de la gravure. L'aluminium est déposé par un procédé de pulvérisation cathodique (les

paramètres détaillés sont donnés en Table 2.3). Celui-ci consiste à faire bombarder une cible d'aluminium grâce à l'excitation d'un plasma d'argon. Les projections d'aluminium sont ensuite recueillies sur le substrat sous forme d'un dépôt. La résine AZ9260 est déposée à la tournette puis recuite. S'en suit l'exposition aux UV puis la révélation. La base (AZ351B, de MicroChemicals) utilisée pour révéler la résine permet également la gravure de l'aluminium. Le tout est ensuite mis à 110°C pendant 1h afin de durcir la résine et de la rendre plus résistante à l'attaque DRIE.

<b>Dépôt d'aluminium</b>	Pulvérisation par plasma d'argon Débit = 30sccm Puissance = 250W Durée = 200s Epaisseur ~ 100nm
<b>Centrifugation d'AZ9260</b>	Vitesse = 1500rpm Accélération = 3000rpm/s Durée = 40s Recuit : 3min à 110°C (plaque) Epaisseur ~ 10µm
<b>Exposition UV</b>	Longueur d'onde = 325nm Durée = 20s Puissance = 11mW/cm <sup>2</sup> Développement AZ351B :H <sub>2</sub> O(1 :2) durant 4min Recuit : 1h at 110°C (four)
<b>Gravure profonde du silicium</b>	Plasmas C <sub>4</sub> F <sub>8</sub> (Passivation) -SF <sub>6</sub> (Gravure) Débit C <sub>4</sub> F <sub>8</sub> = 100sccm Durée de passivation = 2.2s Puissance de passivation RIE/ICP = 20W/1500W Débit SF <sub>6</sub> = 450sccm Durée de gravure = 3s Puissance de gravure RIE/ICP = 50W/2200W Durée totale = 45min Profondeur de gravure ~ 180µm
<b>Gravure plasma du BCB</b>	Plasma CF <sub>4</sub> /O <sub>2</sub> Débit CF <sub>4</sub> = 20sccm Débit O <sub>2</sub> = 20sccm Puissance = 200W Pression = 50mTorr Durée totale = 7min Profondeur de gravure = 2µm

Tab. 2.3 – Gravure des microcanaux



Le substrat est ensuite inséré dans le bâti de DRIE de la société STS (Surface Technology Systems), après un report sur substrat de silicium plan<sup>4</sup>. Lors de la gravure, il faut minimiser l'échauffement de la résine pour qu'elle reste efficace en tant que masque. Autrement dit, il faut permettre une bonne évacuation de la chaleur du substrat. Pour cela, on refroidit le porte-substrat du bâti à  $-10^{\circ}\text{C}$ . Cependant, le silicium à graver étant collé sur du quartz (mauvais conducteur thermique) lui même reporté sur un substrat de silicium plan *via* une graisse, l'évacuation thermique par le porte-substrat est de mauvaise qualité. Ce problème a été contourné en gravant le silicium par pas de 5 minutes afin de permettre un refroidissement suffisant de la résine. L'avancement du procédé technologique est résumé en figure 2.17.

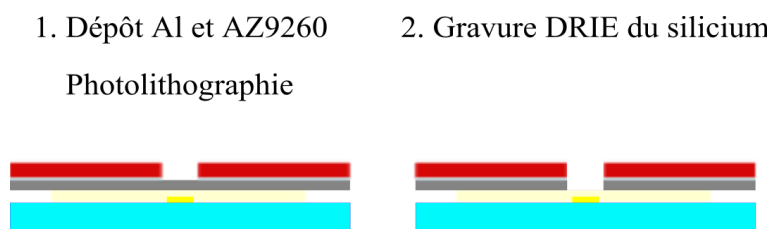


Fig. 2.17 – Etapes pour la gravure des microcanaux par DRIE.

En pratique, l'épaisseur du substrat de silicium initialement collé n'est pas totalement homogène et la gravure pour l'amincissement non plus. Ainsi, lors de la gravure des microcanaux, certains microcanaux (moins profonds) sont gravés entièrement avant d'autres. Ainsi la gravure SF6 de DRIE peut attaquer le BCB et éventuellement les motifs en or au-dessous. Pour protéger l'or, une fine couche d'aluminium (50nm) est déposée au-dessus lors de la phase d'évaporation de l'or juste avant le lift off. Les résultats expérimentaux de l'étape de gravure des microcanaux sont présentés en figure 2.18, avec des motifs de résonateurs sur les lignes de Goubau, au centre des microcanaux.

### 3 Gravure du BCB

Pour permettre l'accès aux lignes coplanaires, le BCB restant au fond des microcanaux doit être enlevé. Lors de la phase de collage, le BCB a été polymérisé à  $250^{\circ}\text{C}$  : sa gravure doit donc s'effectuer *via* une gravure plasma [115], [119]. Les lignes de Goubau situées en-dessous du BCB sont protégées de la gravure du BCB par le dépôt d'alumi-

<sup>4</sup>En effet, l'étape de collage précédente s'accompagne de contraintes menant à une légère courbure du substrat. Afin d'assurer la fixation dans le bâti de gravure silicium, il est nécessaire de reporter l'échantillon à graver sur un substrat de silicium plan.

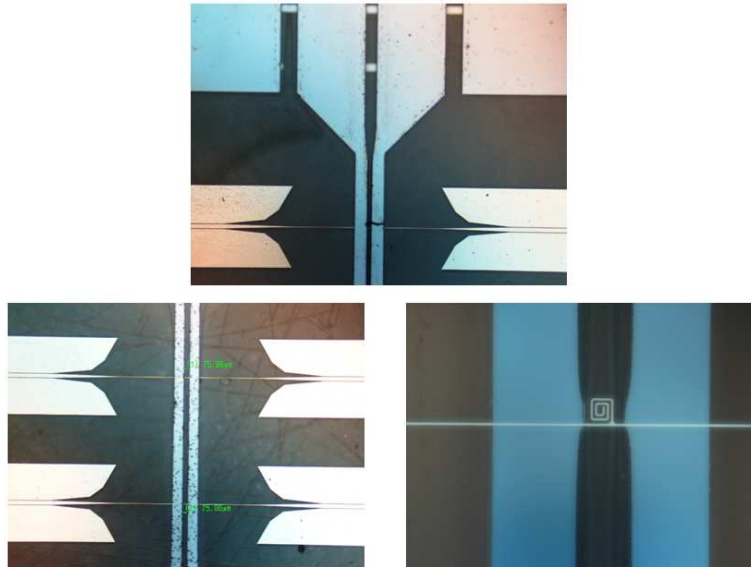


Fig. 2.18 – Vue du BiOMEMS après la gravure des microcanaux par DRIE

niun précédemment évoqué. Une gravure plasma  $\text{CF}_4/\text{O}_2$  du BCB est utilisée avec un mélange aux proportions identiques de ces deux gaz, ce qui maximise *a priori* la vitesse de gravure [120]. Chimiquement, la présence de fluor permet la cassure du squelette du polymère BCB par création de sites réactifs. Ces sites sont ensuite attaqués par l'oxygène pour former des composés volatils, permettant ainsi la gravure du polymère (Figure 2.19). Le bombardement ionique RIE catalyse ces deux phénomènes et permet un gain en anisotropie de la gravure [121].

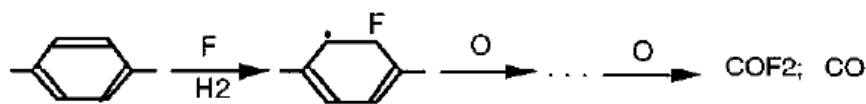


Fig. 2.19 – Gravure du BCB polymérisé par plasma  $\text{CF}_4/\text{O}_2$  [121]

La gravure du BCB est alors réalisée avec les paramètres décrits dans la Table 2.3. La vitesse de gravure mesurée du BCB est de l'ordre de  $0.3\mu\text{m}$  par minute, ce qui est cohérent avec les articles précédemment cités. L'aluminium n'est pas gravé et permet donc une bonne protection pour les lignes de Goubau. Pour vérifier que le BCB a été complètement enlevé, une mesure au profilomètre des lignes de Goubau est effectuée. En l'absence de BCB on observe une marche qui correspond à l'épaisseur de la ligne de Goubau (Titane + Or + Aluminium). En revanche, s'il reste du BCB, sa propriété de planarité estompe le caractère abrupt de la marche et la ligne de Goubau devient quasiment indiscernable au

profilomètre. Une fois le BCB complètement gravé, les masques de résine et d'aluminium sont dissous respectivement dans l'acétone et la base AZ351B.

## **D Collage des capots par "découpe différentielle"**

L'étape de gravure des microcanaux étant terminée, il faut procéder à leur fermeture. Pour maintenir l'originalité du procédé de fabrication du microsystème microfluidique, à savoir une réalisation pleine plaque compatible avec les procédés microélectroniques, une nouvelle voie a été imaginée. L'idée est de coller un substrat de verre au-dessus du substrat complet, de découper partiellement le substrat collé pour libérer l'accès aux lignes de Goubau et enfin, de découper totalement le substrat afin de séparer les dispositifs.

### **1 Collage du substrat de verre**

Le collage d'un substrat de verre de 3 pouces s'effectue par le même procédé BCB que le collage "Quartz/Silicium". La seule différence est la pression de collage qui est ici de 1 bar au lieu de 2, afin de tenir compte de la surface gravée des microcanaux de silicium.

### **2 Découpes partielle et totale des BioMEMS**

Pour réaliser les découpes partielle et totale des dispositifs, un masque (Figure 2.20) a été créé<sup>5</sup> sur lequel des lignes en trait continu montrent les endroits où le substrat doit être complètement découpé (séparation des différents dispositifs). Les traits pointillés montrent les zones où seul le capot de verre supérieur doit être découpé (découpe partielle pour l'accès aux microcanaux et aux lignes métalliques). Cette différenciation entre deux découpes est rendue possible en réglant le paramètre de profondeur de découpe de la scie "référence". La réalisation des lignes pour le guidage de la découpe est présentée en Figure 2.21. Le résumé des étapes technologiques menant à la "découpe différentielle" des dispositifs est donné en Figure 2.22.

Une fois toutes ces étapes réalisées, le BioMEMS THz est quasiment disponible. L'observation au microscope électronique du dispositif est donnée en Figure 2.23. La structure de type "sandwich" peut y être observée. L'épaisseur mesurée de  $6\mu\text{m}$  de BCB sur le capot peut être surprenante compte-tenu des  $2\mu\text{m}$  attendus. Elle s'explique par le fait que le

---

<sup>5</sup>Ces motifs apparaîtront sur la face arrière du quartz (de l'autre côté des lignes de Goubau).

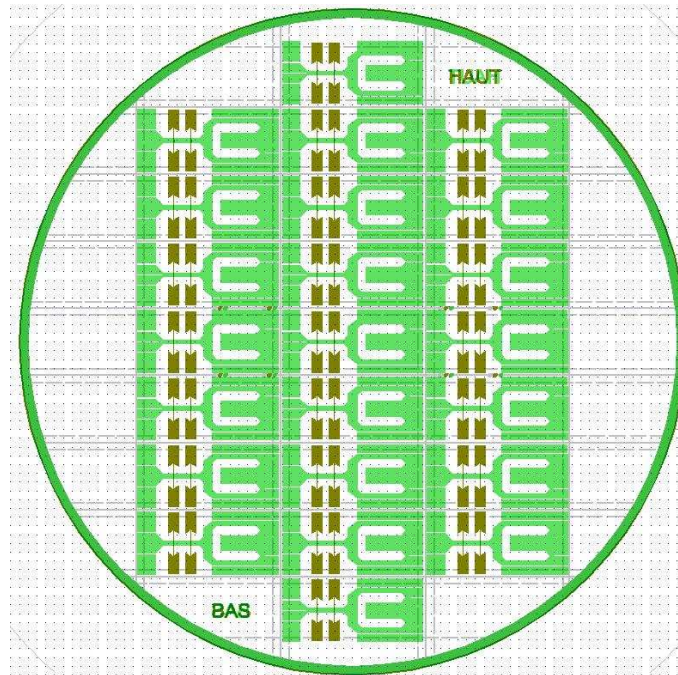


Fig. 2.20 – Masque pour la découpe "différentielle" des dispositifs

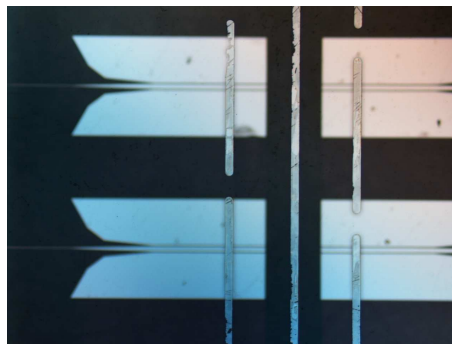
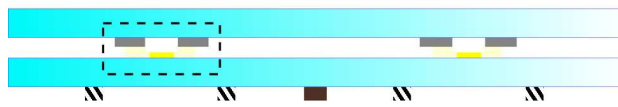


Fig. 2.21 – Lignes pleines et pointillés pour la découpe

deuxième collage s'effectue entre le verre et un substrat de silicium gravé : le BCB sous pression a tendance à rejoindre les zones sans silicium lors de la phase de collage.

Le récapitulatif des étapes est présenté en Annexe. Il ne reste dorénavant qu'à connecter des capillaires (diamètre interne  $75\mu\text{m}$ , diamètre externe  $150\mu\text{m}$ ) aux microcanaux. La colle Araldite 2012 (résine + durcisseur d'Huntsman) est utilisée à cet effet et permet l'obtention du BioMEMS. Celui-ci doit ensuite subir les tests microfluidiques et électromagnétiques afin d'être validé et de permettre les mesures sur composés d'intérêt biologique.

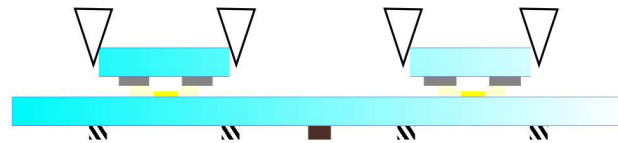
1. Collage du verre pour le capot



⋈ lignes pointillées pour la découpe partielle

■ ligne pleine pour la découpe totale

2. Découpe partielle



⋈ dispositif unique, représenté sur les figures précédentes

3. Découpe totale finale

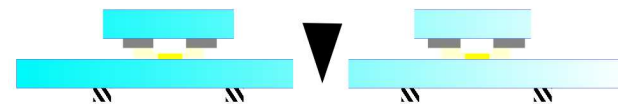


Fig. 2.22 – Procédé de "découpe différentielle"

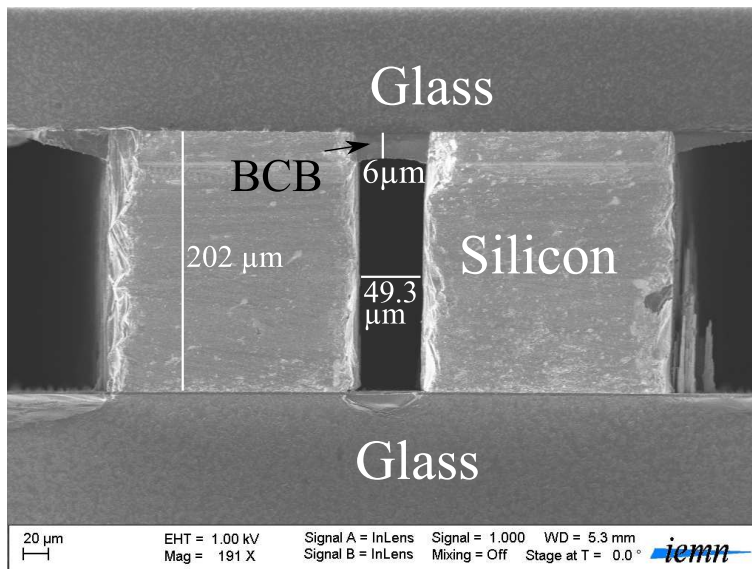


Fig. 2.23 – Vision d'une tranche du microsysteme au microscope électronique à balayage.

## IV Test et validation du dispositif

Afin de garantir la pertinence des mesures effectuées avec le BioMEMS, celui-ci doit être soumis aux contrôles expliqués dans la suite.

### A Aspect microfluidique

#### 1 Contrôle qualitatif de l'écoulement

La première vérification microfluidique consiste à injecter, à l'aide d'une seringue, de l'eau au sein du dispositif. A l'oeil nu, on vérifie si le fluide est évacué par les capillaires de sortie. Au microscope, on vérifie si le fluide s'écoule dans toute la structure microfluidique et si il n'y a pas de fuites au niveau des collages (substrat/substrat au BCB et capillaire/dispositif à la colle Araldite). Avec le procédé technologique détaillé précédemment, on observe une quasi-totalité des dispositifs fonctionnelle.

#### 2 Pression supportée au sein du dispositif

Pour tester la robustesse du dispositif, des tests de pression dans les microcanaux sont nécessaires. Après un rappel sur l'écoulement d'un fluide au sein de microcanaux, des tests à débit ou pression imposés seront présentés.

#### **Écoulement laminaire dans un microcanal**

L'écoulement d'un liquide est caractérisé par trois champs : sa vitesse  $\vec{v}(M)$ , sa pression  $p(M)$  et sa masse volumique  $\rho(M)$  définis en tout point [122]. Avec l'hypothèse supplémentaire d'un liquide incompressible, on obtient que  $\rho(M) = \rho$  valeur constante. Dans ce cas, les paramètres de l'écoulement sont déterminés par la résolution de l'équation de Navier Stokes qui est l'expression du principe fondamental de la dynamique sur une particule de fluide :

$$\rho \left( \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \nabla) \vec{v} \right) = -\nabla p + \rho \vec{g} + \eta \Delta \vec{v} \quad (2.1)$$

avec  $\eta$  la viscosité dynamique du fluide et  $\vec{g}$  le champ de pesanteur. Cette équation stipule que la variation de la vitesse d'une particule de fluide au cours de son déplacement (membre de gauche) est reliée aux forces exercées sur elle (membre de droite) : différence de pression, poids et force de viscosité. Elle ne possède que rarement des solutions analytiques, c'est pourquoi il est important d'en évaluer les termes négligeables afin d'effectuer des approximations. Dans le cas de la microfluidique, la force de pesanteur volumique  $\rho \vec{g}$  devient négligeable devant les forces de pression et de viscosité. De plus, seul le régime permanent dans lequel les débits sont établis sera étudié dans le cas présent, rendant ainsi nulle la dérivée par rapport au temps. L'équation (2.1) devient alors :

$$\underbrace{\rho(\vec{v} \cdot \vec{\nabla}) \vec{v}}_{\text{convection}} = \underbrace{-\vec{\nabla} p}_{\text{pression}} + \underbrace{\eta \Delta \vec{v}}_{\text{viscosité}} \quad (2.2)$$

Pour comparer le caractère "convectif" de l'écoulement au caractère "diffusif" lié aux forces de viscosité, le nombre de Reynolds est introduit à partir de (2.2) :

$$\Re_e = \frac{\text{convection}}{\text{diffusion}} = \frac{\rho v L}{\eta} \quad (2.3)$$

où  $v$  est la norme caractéristique de la vitesse et  $L$  une longueur caractéristique de l'écoulement (largeur de canal). Dans notre cas, pour l'eau, les valeurs caractéristiques sont répertoriées dans le tableau 2.4.

Débit $D$	$0.1 \mu\text{L}/\text{min}$
$L$	$100 \mu\text{m}$
$v$	$D/L^2 = 2.10^{-4} \text{m/s}$
$\eta$	$1.10^{-3} \text{Pa.s}$
$\rho$	$1.10^3 \text{kg/m}^3$
$\Re_e$	$2.10^{-2} \ll 1$

Tab. 2.4 – Calcul du nombre de Reynolds

Le nombre de Reynolds obtenu étant largement inférieur à 1, c'est le phénomène de diffusion lié à la viscosité qui est prédominant. Autrement dit, l'écoulement de l'eau à l'échelle microfluidique est de type visqueux, comme serait celui d'une huile à l'échelle "habituelle" du décimètre (Figure 2.24). La quasi-absence de convection donne à un tel écoulement des propriétés particulières :

- absence de tourbillons et de turbulences ;
- inertie du fluide faible ;

- mélange de deux fluides difficile ;
- homogénéisation des vitesses par le phénomène de diffusion ;
- lignes de champ clairement définies.

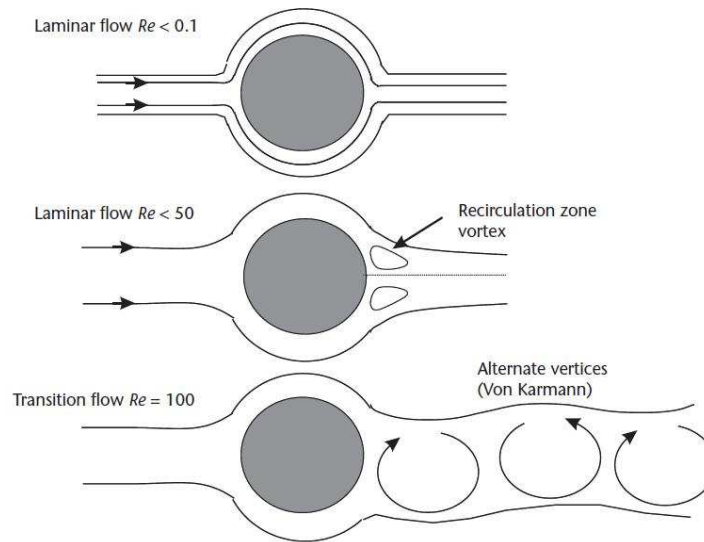


Fig. 2.24 – Champ des vitesses autour d'un obstacle à différents nombre de Reynolds [123]

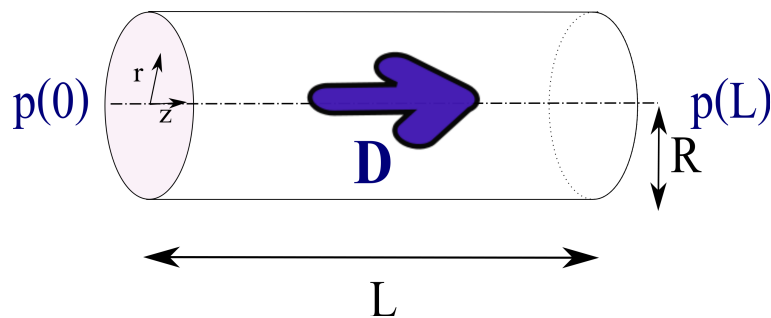


Fig. 2.25 – Conduit modèle pour l'étude de l'écoulement

Dans le cas d'un conduit cylindrique horizontal d'axe  $z$  de rayon  $R$  et de longueur  $L$  (figure 2.25), les invariances géométriques impliquent que les champs de pression et de vitesse sont de la forme :  $\vec{v}(M) = v_z(r, z)\vec{u}_z$  et  $p(M) = p(r, z)$ . L'utilisation de tels champs dans l'équation (2.2) de Navier Stokes avec convection prise égale à 0 donne <sup>6</sup> [122] :

$$p(r, z) = p(z) \quad (2.4)$$

<sup>6</sup>Il faut également écrire en plus l'équation de conservation de la masse.



$$v_z(r, z) = v_z(r) = \frac{(p(0) - p(L))(R^2 - r^2)}{4\eta L} \quad (2.5)$$

Ainsi, le champ de vitesse de l'écoulement est parabolique dans la section de l'écoulement (Figure 2.26).

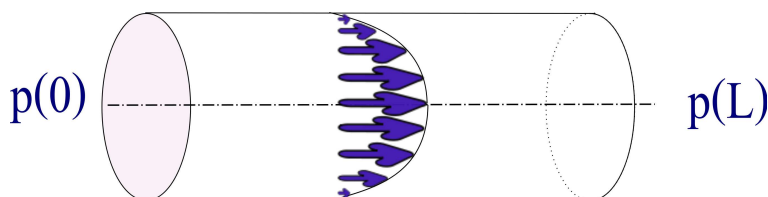


Fig. 2.26 – Profil parabolique des vitesses - Ecoulement laminaire

L'intégration de l'équation (2.5) sur la section du conduit mène à la "loi de Poiseuille" reliant le débit  $D$  dans le conduit à la chute de pression  $\Delta p = p(0) - p(L)$  en son sein :

$$\Delta p = \frac{8\eta L}{\pi R^4} D \quad (2.6)$$

L'analogie entre cette expression et la loi d'Ohm de l'électrocinétique ( $\Delta V = Ri$ ) amène à la définition de la résistance hydraulique :

$$R_h = \frac{8\eta L}{\pi R^4} \quad (2.7)$$

La différence de pression entre le début et la fin d'un microcanal est donc analogue à une différence de potentiel qui met en mouvement le fluide (débit # intensité) à travers une résistance hydraulique d'autant plus élevée que la viscosité du liquide est grande. En pratique, on peut soit imposer le débit dans les microcanaux à l'aide de pousse-seringues ("source de courant") soit imposer la pression à l'entrée des microcanaux par un générateur de pression ("source de tension"), la sortie du microcanal étant à pression atmosphérique (air libre).

### Test en pression du microcanal

Pour caractériser la robustesse en pression du collage, le test représenté Figure 2.27 est mené.

Un capillaire de longueur  $L_2$  est connectée à la sortie du dispositif alors qu'un de longueur  $L_1$  est connectée à son entrée. Le débit volumique est fixé par le pousse-seringue

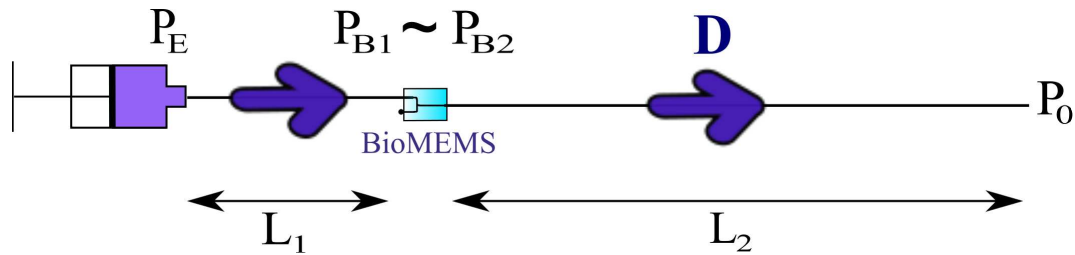


Fig. 2.27 – Expérience de test en pression du dispositif

"Harvard Apparatus PHD 2000". Des seringues en acier inoxydable sont utilisées afin d'éviter toute déformation. L'objectif est de déterminer le débit maximal  $D$  accepté dans le microsysteme sans apparition de fuites (dans cette configuration donnée). La mesure de ce débit permet de déterminer la pression maximale  $P_B$  admissible dans le microsysteme, grâce à la loi de Poiseuille :

$$P_B = P_0 + R_{H_2}D = P_0 + \frac{8\eta L_2}{\pi R_2^4}D \quad (2.8)$$

où  $R_{H_2}$  est la résistance hydraulique du capillaire de sortie et  $R_2$  son rayon interne.  $\eta$  est la viscosité de l'eau. Les valeurs des différents paramètres ainsi que celle de la pression maximale correspondante sont répertoriées dans la Table 2.5.

$R_1 = R_2$	37.5 $\mu$ m
$L_1$	10cm
$L_2$	30cm
$D$	600 $\mu$ L/min
$P_B - P_0$	38 bars

Tab. 2.5 – Calcul de la surpression admissible dans le microsysteme

Avec un débit maximal de 600 $\mu$ L/min dans la configuration du test, la surpression acceptée dans le microsysteme est de 38bars. Quatre microsystemes ont été testés et donnent une distribution de la surpression maximale de 37 bars $\pm$ 1 bar. Cette valeur montre que le BioMEMS peut être utilisé dans des conditions "standard" sans apparition de fuites. En effet, considérant un débit de 1 $\mu$ L/min et  $L_1 = L_2 = 20$ cm, la surpression dans le dispositif est inférieure à 1 bar  $\ll$  37 bars. Le procédé technologique précédemment développé mène donc à un microsysteme robuste, malgré la finesse des motifs microfluidiques, qui pourrait par conséquent être également utilisé pour des applications en synthèse chimique.

## B Aspect électromagnétique

Des mesures sont ensuite menées pour valider la propagation électromagnétique de l'onde sur la ligne de Goubau et son interaction avec le liquide présent dans les microcanaux. En utilisant l'Analyseur de Réseau Vectoriel Agilent 8510XF, les paramètres complexes de réflexion et transmission du dispositif sont mesurés jusque 110GHz. Le module de  $S_{21}$  (transmission) est représenté en Figure 2.28 en présence d'air et d'eau dans les microcanaux. En première remarque, la propagation de l'onde est démontrée sur la ligne de Goubau avec une transmission de -12dB environ à 100GHz. Les pertes à vide sont la somme des pertes au niveau des transitions coplanaire/Goubau, des pertes intrinsèques à la ligne de Goubau, de l'absorption des murs de silicium et du BCB. L'augmentation des pertes avec la fréquence peut être expliquée par la propagation d'une partie de l'onde dans le substrat (mode de substrat). Ce phénomène peut être rejeté vers des plus hautes fréquences en utilisant un substrat de verre plus fin.

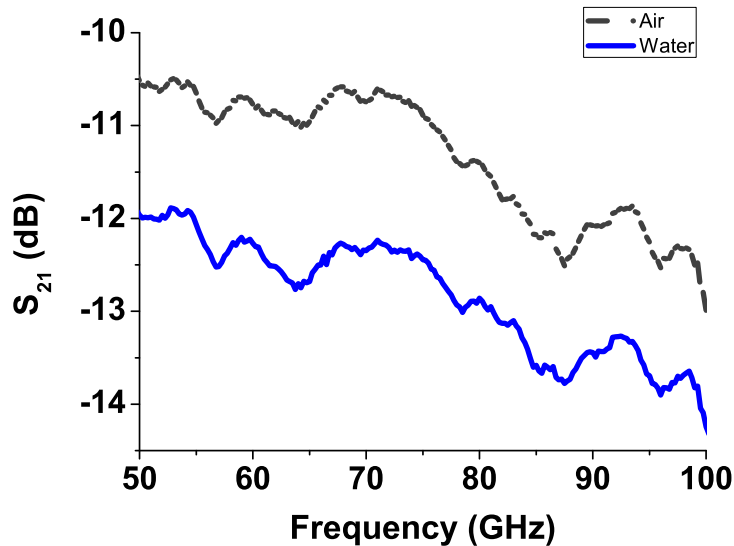


Fig. 2.28 – Test électromagnétique du dispositif

Quand de l'eau est injectée dans les microcanaux de  $50\mu\text{m}$  de largeur, la valeur du paramètre de transmission chute d'environ 1.5dB. Cela est dû à la forte absorption de l'eau dans la bande THz [65] et montre que  $S_{21}$  est sensible au fluide présent dans le microcanal et donc que l'interaction entre l'onde et l'échantillon a bien lieu. En conséquence

le BioMEMS fabriqué pourra bien être utilisé afin de caractériser différents échantillons biologiques dans les parties suivantes.

## C Aspect Thermique

Pour réaliser une spectroscopie de biomolécules avec le microsysteme, l'absorption des échantillons est mesurée en fonction de la fréquence. D'un point de vue énergétique, les molécules en solution absorbent une partie de la puissance du signal incident qu'elles dissipent en agitation thermique. Cette agitation se traduit par une augmentation locale de la température du fluide autour de la sonde de Goubau. Or, les caractéristiques électromagnétiques d'un fluide varient avec sa température et donc l'interaction avec le champ électrique est *a priori* modifiée par l'augmentation de température. Il est donc nécessaire de maîtriser cette augmentation afin de s'assurer que les mesures obtenues ne sont pas biaisées. L'objet de cette section est de déterminer l'ordre de grandeur de l'augmentation en température du fluide autour de la sonde de Goubau.

### 1 Puissance dissipée dans le liquide à sonder

Grâce au logiciel de simulation CST Microwave Studio, la topographie des pertes au sein du liquide (de l'eau dans le microcanal dans le cas présent) est observée en Figure 2.29 pour une fréquence de 100GHz. En extrayant la puissance absorbée par l'eau en fonction de la distance  $r$  à la ligne de Goubau, le graphique  $p(r)$  est obtenu.

L'évolution est de type "exponentielle décroissante" et la puissance volumique absorbée au sein du liquide peut s'écrire :

$$p(r) = A \exp(-r/r_0) \quad (2.9)$$

avec  $r$  la distance du point considéré à la ligne de Goubau.  $r_0$  caractérise l'extension spatiale de la répartition de puissance et la simulation permet d'évaluer  $r_0 \sim 7\mu\text{m}$ .  $A$  dépend de la puissance du signal incident. Lors des mesures, la puissance incidente  $P_i$  est fixée à  $-10\text{dBm}$ , soit  $0.1\text{mW}$ . Sachant que le microcanal possède une largeur  $L \sim 50\mu\text{m}$  et que l'absorption de l'eau à 100GHz est de l'ordre de  $\alpha \sim 60\text{cm}^{-1}$ , la puissance absorbée par le liquide est :

$$P_{abs} = P_i(1 - \exp(-\alpha L)) \sim 2.6.10^{-2} \text{ mW} \quad (2.10)$$

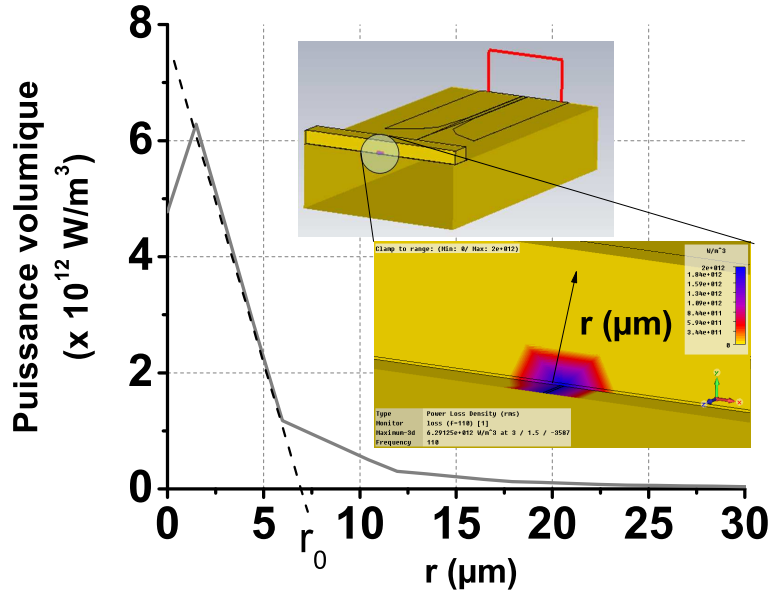


Fig. 2.29 – Puissance dissipée dans le liquide au sein du microcanal. Résultats de simulations CST.

Le calcul de cette puissance permet de déterminer  $A$  en considérant que :

$$P_{abs} = \int_{V_{canal}} A e^{(-r/r_0)} dV = \pi L \cdot \int_0^{\infty} r A e^{-r/r_0} dr \quad (2.11)$$

d'où :

$$A = \frac{P_{abs}/(\pi L r_0^2)}{\int_0^{\infty} x e^x dx} = \frac{P_{abs}}{\pi L r_0^2} \sim 3.4 \cdot 10^9 \text{ W/m}^3 \quad (2.12)$$

## 2 Equation de la chaleur dans la configuration microfluidique

L'expression de la puissance volumique dissipée au sein du microcanal (équation 2.9) étant désormais totalement déterminée, il convient de quantifier l'élévation de température qu'elle engendre. Pour cela, l'équation de la chaleur dans le microcanal est établie en régime permanent par un bilan d'énergie thermique. On considère la portion de fluide représentée sur la Figure 2.30 comprise entre  $r$  et  $r + dr$  et les coordonnées suivantes :

$$0 < z < L \quad (2.13)$$

$$0 < \theta < \pi \quad (2.14)$$

A l'équilibre, la somme des flux thermiques entrant dans cette tranche de fluide est nulle. Ces flux sont :

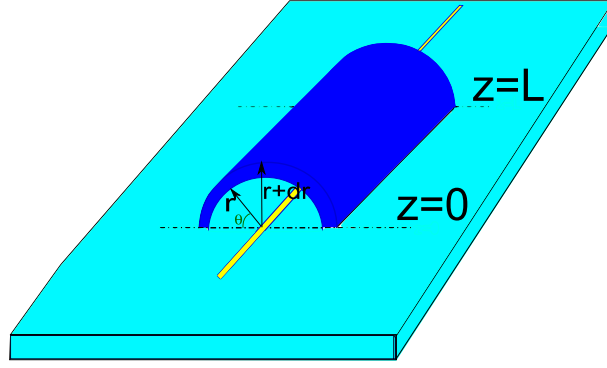


Fig. 2.30 – Géométrie pour le bilan de puissance

- le transfert thermique provenant du fluide situé en dessous de  $r$  :  $\phi(r)$  ;
- le transfert thermique provenant du fluide situé au-dessus de  $r + dr$  :  $-\phi(r + dr)$  ;
- le transfert thermique à travers le substrat de verre :  $-\phi_v$  ;
- le transfert thermique à travers les murs en silicium :  $-\phi_{si}$ .

Soit  $T(r)$  l'élévation de température dans la tranche entre  $r$  et  $r + dr$ . Les flux thermiques peuvent s'exprimer de la manière suivante :

$$\phi(r) = -\lambda \pi r L \overrightarrow{\nabla T}(r) \quad (2.15)$$

$$\phi_v = \lambda_v \frac{T(r)}{H_v} \cdot L dr \quad (2.16)$$

$$\phi_{si} = \lambda_{si} \frac{T(r)}{l_{si}} \cdot 2\pi r dr \quad (2.17)$$

où  $\lambda$ ,  $\lambda_v$  et  $\lambda_{si}$  sont respectivement les conductivités thermiques de l'eau, du verre et du silicium.  $H_v$  est l'épaisseur du substrat de verre et  $l_{si}$  la largeur des murs de silicium. L'équilibre thermique donne ainsi l'équation vérifiée par la température en régime permanent :

$$\lambda \pi L \frac{d\left(r \frac{dT}{dr}\right)}{dr} - 2 \left( \frac{\lambda_v}{H_v} L + \frac{\lambda_{si}}{l_{si}} \pi r \right) T(r) + \pi L r p(r) = 0 \quad (2.18)$$

Le premier terme représente la transmission de proche en proche de la chaleur par diffusion dans l'eau, le second l'évacuation thermique à travers le verre et le silicium. Le dernier quantifie la production locale d'énergie par l'onde incidente.

### 3 Résolution de l'équation de la chaleur

La résolution analytique de l'équation sous Maple menant à des temps de calcul de plusieurs jours, une résolution numérique a été choisie. Elle est réalisée avec les conditions aux limites suivantes<sup>7</sup> :

$$T(\infty) = 0 \quad (2.19)$$

$$\frac{dT}{dr}(r = 0) = 0 \quad (2.20)$$

Les valeurs des paramètres utilisés lors des calculs sont données dans la Table 2.6.

<b>P<sub>i</sub></b> (mW)	0.1
<b>r<sub>0</sub></b> (μm)	7
<b>λ</b> (W.m <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	0.6
<b>λ<sub>v</sub></b> (W.m <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	1.2
<b>λ<sub>si</sub></b> (W.m <sup>-1</sup> .K <sup>-1</sup> )	149
<b>L</b> (μm)	50
<b>H<sub>v</sub></b> (μm)	700
<b>l<sub>si</sub></b> (μm)	200

Tab. 2.6 – Paramètres pour le calcul de l'élévation de température dans le microcanal

Dans ces conditions, la résolution de l'équation 2.18 donne l'évolution de la température représentée en Figure 2.31. L'élévation de température est notable sur une zone située à une distance inférieure à 40μm de la ligne de Goubau. Sa valeur maximale est rencontrée à proximité de la ligne ( $r = 0\mu\text{m}$ ) et vaut  $T(0) = 0.052\text{K}$ . Ainsi, dans des conditions d'utilisation nominales du microsystème, l'augmentation de la température du liquide par l'onde électromagnétique pourra être négligée.

La possibilité d'une augmentation de température peut aussi être un atout lors des campagnes de mesure si l'on souhaite contrôler et modifier ce paramètre afin d'étudier la réponse d'un système biologique. Par exemple, la conformation d'une protéine, et donc son comportement diélectrique THz, varie avec la température. Mesurer une protéine à différentes températures au sein d'un microsystème est ainsi un challenge pour améliorer la compréhension de son comportement dynamique. Pour y parvenir, placer le microsystème

<sup>7</sup>La première condition porte en  $r = \infty$ . Or, lorsque  $r = 200\mu\text{m}$ , une partie du fluide est en contact avec le capot en verre du microsystème, de conductivité supérieure à celle de l'eau. L'évacuation thermique en pratique s'effectuera donc de meilleure manière que celle modélisée ici. L'élévation de température qui sera déterminée majorera donc la valeur réelle.

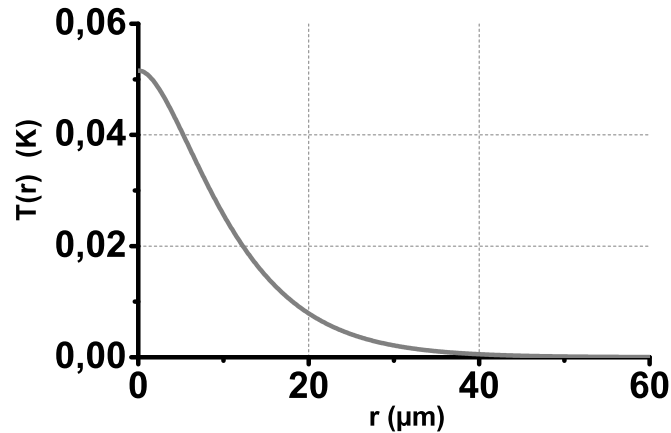


Fig. 2.31 – Elévation de température dans le microcanal en fonction de  $r$

tème sur un tapis chauffant régulé est une option. Une autre option pourrait être d'utiliser le chauffage induit par la sonde THz. Pour cela, il est intéressant d'étudier l'influence des paramètres expérimentaux sur l'élévation de température dans le microcanal.

#### 4 Influence des paramètres expérimentaux

##### Puissance incidente $P_i$

Une première idée pour faire varier l'augmentation de température est de varier la puissance de l'onde incidente  $P_i$ . La linéarité de l'équation 2.18 implique que la multiplication de  $p(r)$  par un facteur  $k$  se traduit immédiatement par une multiplication par  $k$  de l'élévation de température dans le microcanal.  $p(r)$  étant directement proportionnel à  $A$  et donc à  $P_i$ , l'élévation de température dans le microsystème est proportionnelle à  $P_i$ . Pour s'en convaincre, le calcul a été mené pour 3 valeurs de  $P_i$  (Table 2.7) et une situation de proportionnalité est observée.

$P_i$ (mW)	0.1	1	10
$T(0)$ (K)	0.052	0.52	5.2

Tab. 2.7 – Influence de la puissance incidente sur l'élévation de température

##### Epaisseur de verre $H_v$

Augmenter  $P_i$  revient à modifier la puissance thermique créée dans le microcanal. Un autre voie pour varier la température est de modifier l'évacuation thermique de cette



puissance. Celle-ci a notamment lieu *via* le substrat de verre et les murs de silicium, c'est pourquoi l'influence de  $H_v$  est dans un premier temps étudiée et est représentée en Figure 2.32. La diminution de l'épaisseur de verre s'accompagne d'une meilleure dissipation thermique et d'une diminution de la température maximale dans le microcanal. Cependant, la plage de variation de  $T(0)$  avec  $H_v$  est plutôt faible<sup>8</sup> ( $<0.01K$ ) et  $H_v$  ne semble pas être un paramètre pertinent pour contrôler la température dans le microcanal. De plus, l'épaisseur du verre est également corrélée à la présence de modes de substrats indésirables : sa modification a des conséquences non négligeables sur la propagation électromagnétique.

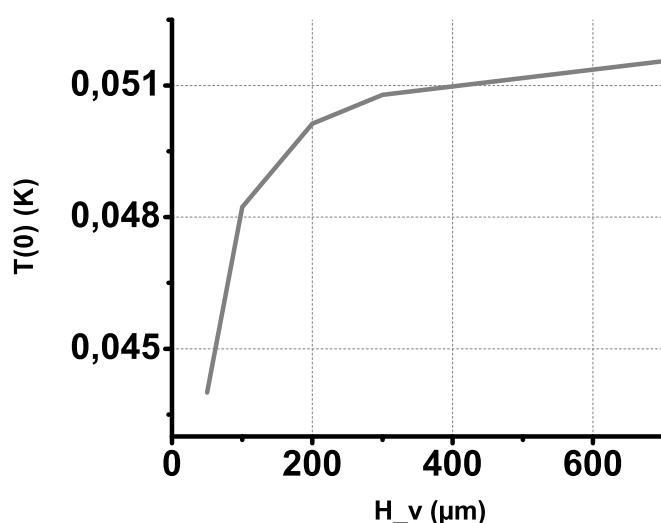


Fig. 2.32 – Elévation de température dans le microcanal en fonction de  $H_v$ .  $P_i = 0.1\text{mW}$ .

### Épaisseur des murs $l_{Si}$

La Figure 2.33 montre l'influence de la variation de l'épaisseur des murs sur l'élévation de température. Bien que l'influence soit supérieure à celle observée pour le verre, la variation de température reste en valeur absolue plutôt faible. En valeur relative, elle peut cependant facilement être doublée. Ainsi la variation de l'épaisseur des murs combinée, par exemple, à la variation de la puissance incidente pourrait se révéler utile pour le contrôle de la température.

<sup>8</sup>Ceci s'explique par le fait que le verre est un mauvais conducteur thermique par rapport au silicium, comme les valeurs de conductivité le montrent. Des calculs ont été effectués en supprimant dans l'équation 2.18 le terme lié au silicium ou celui au verre et il apparaît clairement que l'évacuation thermique a massivement lieu à travers les microcanaux de silicium.

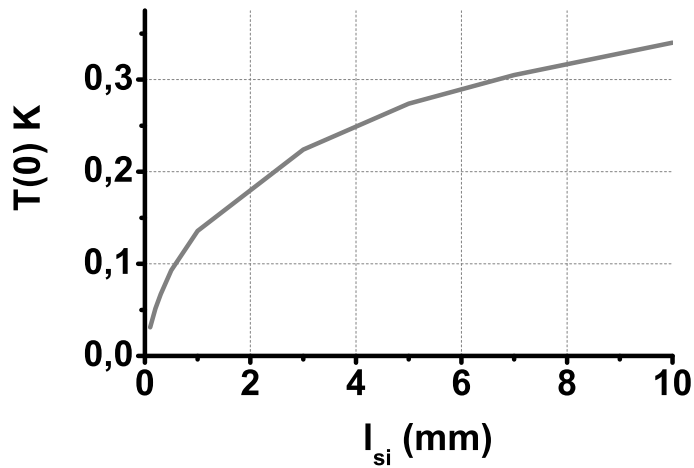


Fig. 2.33 – Elévation de température dans le microcanal en fonction de  $l_{si}$ .  $P_i = 0.1\text{mW}$ .

#### Largeur du canal $L$

Etant donné que la dissipation thermique s'effectue majoritairement *via* les murs de silicium, augmenter la largeur du canal pourrait être une stratégie pour accroître la température dans le microcanal. L'influence de  $L$  sur l'échauffement est représentée en Figure 2.34. Encore une fois, un effet existe, mais est plutôt faible en valeur absolue.

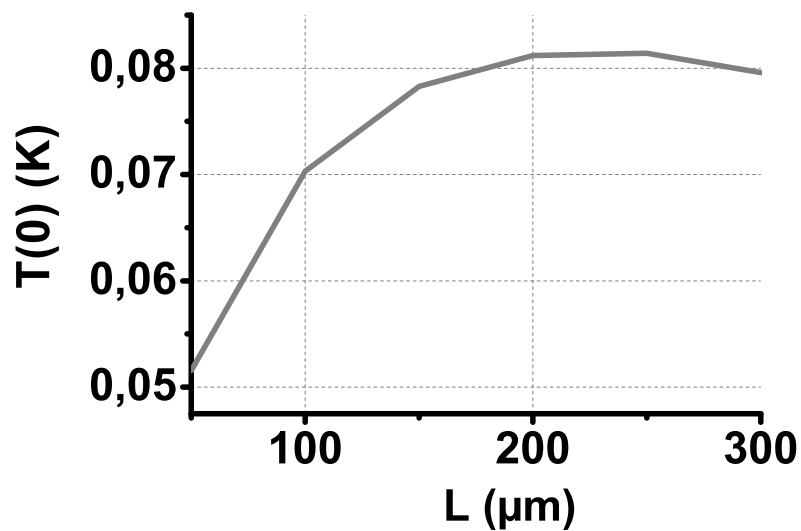


Fig. 2.34 – Elévation de température dans le microcanal en fonction de  $L$ .  $P_i = 0.1\text{mW}$ .

## Synthèse

Des degrés de liberté existent pour faire varier, plus ou moins sensiblement, la température au sein du microcanal. L'action la plus significative consiste à augmenter la puissance de l'onde incidente. Une fois cette puissance choisie, des outils de réglage plus fins comme la modification de la largeur des canaux peuvent être utilisés. La Figure 2.35 montre comment la température au sein du microcanal pourrait être modulée. La largeur de silicium sur la ligne de Goubau étant différente dans les deux cas, et le silicium possédant une absorption non nulle, des précautions devront cependant être prises quant à la comparaison des résultats fournis par les deux lignes. De même, il s'agit de vérifier au préalable quelles sont les puissances incidentes possibles avec l'Analyseur de Réseau Vectoriel<sup>9</sup>.

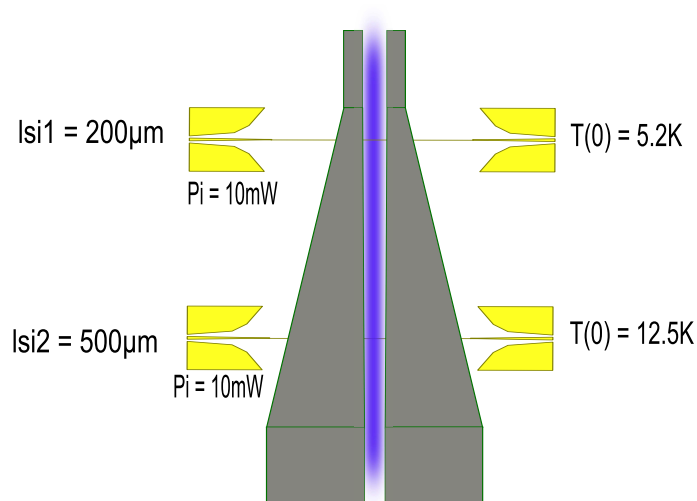


Fig. 2.35 – Géométrie des microcanaux pour mesurer l'échantillon liquide à différentes températures.

## 5 Conclusion

Il est possible d'évaluer l'élévation de température au sein du microcanal et de démontrer qu'elle est négligeable dans des conditions de mesure nominales. Ce résultat est conforme à la capacité des microsystèmes fluidiques, de par leurs faibles dimensions, à évacuer efficacement l'énergie thermique. A titre de comparaison, l'élévation de température dans les mêmes conditions dans un milieu "bulk" serait de 0.4K environ (contrairement à 0.052 K ici). Cependant, sous certaines conditions, il semble possible de contrôler

<sup>9</sup>Dans le cas présent, cette puissance est limitée à 0.1mW. Il est toutefois imaginable d'utiliser d'autres sources pour lesquelles la puissance incidente pourrait être augmentée ou modulée.

et de rendre non négligeable la température dans le microcanal grâce aux paramètres géométriques et expérimentaux.

Tous les résultats présentés ici sont fortement dépendants du modèle utilisé pour parvenir à l'équation 2.18. Des mesures *in situ* de température par caméra thermique seraient les bienvenues afin de vérifier les affirmations ici avancées.

## **Conclusion**

Les précédents tests ont montré la robustesse et la sensibilité du microsystème au liquide présent dans les microcanaux. En effet, une surpression de 37 bars peut être supportée par le collage et une différence de 1.5dB est notée entre le niveau de transmission à vide du dispositif et celui du dispositif rempli d'eau.

Le procédé technologique développé est basé sur un assemblage verre/silicium/verre. De tels matériaux permettent une conception précise ( $\pm 1\mu\text{m}$ ) des microcanaux de par la gravure profonde DRIE du silicium. Cette précision est cruciale pour les mesures THz car l'absorption de l'échantillon augmente de manière exponentielle avec la largeur des microcanaux.

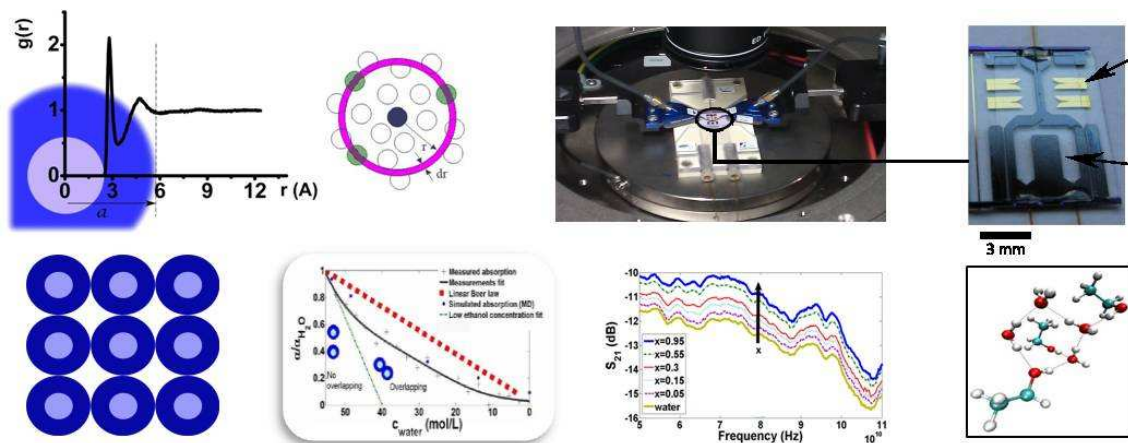
De plus, la versatilité du procédé technologique doit être discutée. Là où la plupart des procédés consistent à coller un substrat de silicium pré-gravé sur un substrat de verre [124, 125], le collage du silicium sur le verre s'effectue ici AVANT sa gravure et constitue l'originalité du procédé de fabrication. Cet ordre chronologique permet une forte indépendance entre les conceptions des circuits électromagnétique et microfluidique. L'un ou l'autre peut être modifié sans changer les paramètres du procédé technologique. Par exemple, des microcanaux de quelques micromètres de large peuvent être réalisés. Il est également possible de concevoir des fonctions électromagnétiques avancées sur la ligne de Goubau. La Figure 2.18-bas/droite montre par exemple l'intégration d'un résonateur dans un microcanal [126]. La conception de fonctions électromagnétiques est également permise : dans la suite de ce travail, des modifications de largeur de microcanaux seront présentées afin d'effectuer des mesures différentielles. L'optimisation effectuée a permis le dépôt d'un brevet [101].

Ainsi, la grande liberté concernant les conceptions des lignes de Goubau ou des microcanaux permettront par la suite d'augmenter la capacité expérimentale de mesure du BioMEMS THz. Dans la partie suivante, le BioMEMS simple (sans fonctions avancées)

est utilisé afin de réaliser des mesures d'absorption sur des mélanges simples eau/alcool. Sa capacité à sonder l'hydratation de molécules dissoutes sera présentée.

## Partie 3

# Etude de l'hydratation de molécules par BioMEMS THz



Le dispositif précédent est utilisé dans cette partie pour la description d'un modèle de mélange eau/alcool. La capacité de la spectroscopie sub-THz dans le microsystème à caractériser la couche d'hydratation de l'alcool est démontrée, ainsi que son avantageux couplage avec des techniques quantitatives de chimométrie. La méthodologie développée est ensuite appliquée sur des protéines en solution.

## Sommaire

---

<b>Introduction</b>	<b>89</b>
<b>I Hydratation de l'éthanol sondée par BioMEMS THz</b>	<b>91</b>
A Protocole expérimental	91
B Extraction de l'absorption	92
C Absorption des solutions éthanol/eau à 95GHz	94
D Etudes en dynamique moléculaire	94
E Caractérisation de la couche d'hydratation de l'éthanol	99
F Nombre d'hydratation	104
1 A partir des mesures	104
2 Dynamique moléculaire	105
<b>II Analyse multivariée pour l'étude de l'hydratation</b>	<b>107</b>
A Optimisation du protocole de mesures	107
1 Etude statistique	107
2 Quelle stratégie pour les mesures ?	114
B Caractérisation de l'hydratation par chimiométrie	120
1 Prétraitement des données	121
2 Analyse en composante principale	122
3 Décomposition de type MCR-ALS	123
C Conclusion intermédiaire	128
<b>III Investigations sur protéines</b>	<b>130</b>
A Sensibilité des mesures sur protéines	130
1 Solubilité des protéines dans l'eau	130
2 Premières mesures sur lysozyme	131
3 Augmentation de la largeur des canaux	132
4 Mesures sur protéines	134
B Etude de l'hydratation des protéines	137
1 Absorption normalisée des échantillons	137
2 Nombre d'hydratation des protéines	138
<b>Conclusion</b>	<b>142</b>

---



## **Introduction**

Présente dans plus de 70% du corps humain, l'eau est une molécule des plus familières. Au point même, parfois, d'en oublier qu'elle présente des particularités physiques d'une singularité extrême, responsables de son rôle prépondérant dans les processus du vivant [127]. Parmi elles, il est utile de citer :

- la présence des trois phases (solide, liquide, gaz) dans des conditions de température et de pression ambiantes ;
- la densité de la glace inférieure à celle de l'eau liquide ;
- sa capacité calorifique élevée ;
- la dissolution de nombreuses espèces chimiques en son sein.

La principale cause de tels comportements réside en partie dans l'agencement des molécules d'eau, polaires, formant entre elles un réseau dynamique de liaisons de faible énergie appelées liaisons hydrogène et présentées en Partie 1. Lorsqu'une espèce chimique hydrosoluble (sucre, alcool, cristal ionique, protéine) est insérée dans une solution aqueuse, ses molécules se voient encerclées par des molécules d'eau formant ainsi une couche d'hydratation. Celle-ci résulte de l'interaction entre le moment dipolaire de l'eau et les charges (globales ou surfaciques) de la molécule dissoute. Les propriétés de l'eau de la couche d'hydratation diffèrent de celles de l'eau "volumique"<sup>1</sup>. Par exemple, des mesures et simulations ont déjà mis en évidence des différences de durées de vie des liaisons hydrogène entre l'eau d'hydratation et l'eau volumique [24]. Cependant, la caractérisation de la couche d'hydratation n'est encore que parcellaire et son rôle dans les processus biologiques dynamiques est non éclairci. Il semble néanmoins établi que la dynamique de la couche d'hydratation conditionne la fonctionnalité de protéines, au travers de leur conformation notamment [30].

Alors que l'analyse de la relaxation diélectrique des échantillons aqueux par les ondes électromagnétiques radio- et hyper-fréquences (jusque quelques dizaines de GHz) sonde

---

<sup>1</sup>L'eau présente seule en solution, sans interaction avec une autre molécule.

les oscillations de la polarisation collective des molécules d'eau [128] et que l'analyse par spectroscopie infra-rouge sonde les mouvements individuels des molécules d'eau [67], la zone intermédiaire des ondes THz permet de sonder directement les vibrations du réseau de liaisons hydrogène (Figure 3.1) [129].

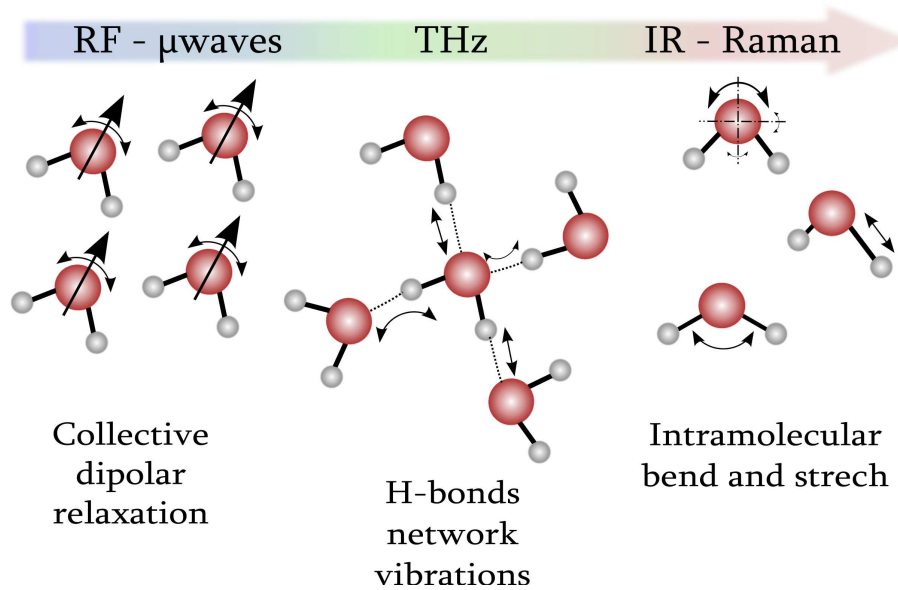


Fig. 3.1 – Analyse des échantillons aqueux par les ondes THz

La spectroscopie THz est donc un nouvel outil pour la caractérisation directe des couches d'hydratation de biomolécules. La partie qui suit montre comment le BioMEMS THz permet la détermination de propriétés d'absorption et de volume de la couche d'hydratation de l'éthanol.

## I Hydratation de l'éthanol sondée par BioMEMS THz

### A Protocole expérimental

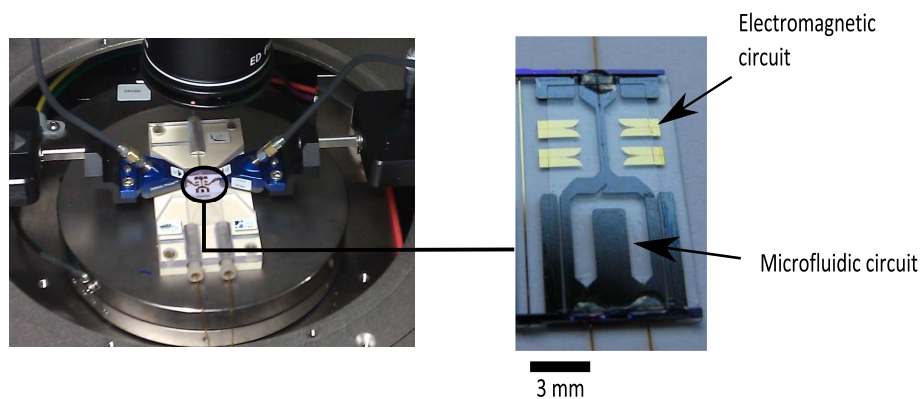


Fig. 3.2 – Système expérimental pour la mesure sub-THz de l'hydratation

Le microsystème est ici utilisé pour réaliser des mesures sur des solutions éthanol/eau de rapports volumiques différents dans la gamme de fréquence subTHz de 0.05THz à 0.11THz. Les rapports volumiques  $x = V_{eth}/V$  utilisés lors des mesures sont 0, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.10, 0.15 et de 0.05 en 0.05 jusque 1 soit au total 22 solutions à injecter dans le microsystème. Les solutions sont injectées dans un ordre aléatoire afin d'éviter tout biais dans les mesures. Pour chaque solution injectée, les paramètres [S] complexes de la ligne de Goubau sont mesurés grâce à un analyseur de réseau vectoriel (VNA) réalisant la moyenne de 30 points de mesure pour chaque fréquence (Figure 3.2). Entre chaque injection, la solution de référence "eau déionisée" est injectée afin de vérifier la stabilité et la reproductibilité entre chaque mesure.

Le module du paramètre de transmission  $S_{21}$  est présenté en Figure 3.3 pour différents rapports volumiques d'éthanol et en fonction de la fréquence. Il montre que le Bio-

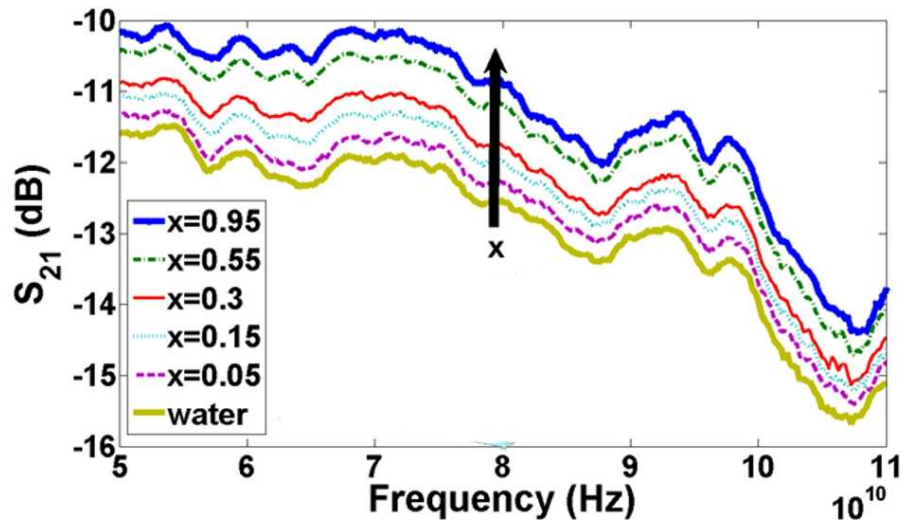


Fig. 3.3 – Mesures brutes du module du paramètre de transmission  $S_{21}$  pour différentes solutions eau/éthanol,  $x$  étant le rapport volumique d'éthanol [130].

MEMS est capable de détecter la concentration en éthanol au sein de la solution mixte eau/éthanol.

## B Extraction de l'absorption

Pour analyser plus finement ces mesures, l'extraction de l'absorption de la solution présente dans le microcanal de mesure est nécessaire. L'absorption  $\alpha$  d'un échantillon est définie par le rapport entre la puissance de l'onde électromagnétique sortante de l'échantillon sondé  $I$  et la puissance incidente  $I_0$  :

$$\frac{I}{I_0} = A \exp(-\alpha d) \quad (3.1)$$

où  $d$  est la longueur de l'échantillon traversée par l'onde (la largeur du microcanal de mesure dans le cas présent) et  $A$  une constante au cours de la mesure. On remarquera que l'absorption  $\alpha$  est très élevée et que la décroissance du signal transmis avec la longueur  $d$  est exponentielle, ce qui rend la spectroscopie THz en milieu liquide difficile d'accès dans des configurations expérimentales classiques. Les solutions apportées à ce verrou ont été l'utilisation de sources THz de puissances élevées [20] (augmenter  $I$ ) ou la diminution du volume des échantillons sondés  $d$  [85, 95, 131, 132]. Dans ce cas, la valeur de  $d$  doit être précisément établie du fait de la sensibilité exponentielle des mesures

à ses variations. C'est la raison pour laquelle l'utilisation de microcanaux a été ici choisie.

La mesure des paramètres  $[S]$  dans le plan des pointes de l'analyseur de réseau donne les informations suivantes :

$$|S_{11}|^2 = \frac{P_r}{P_e}; |S_{21}|^2 = \frac{P_s}{P_e} \quad (3.2)$$

où  $P_e$  est la puissance envoyée par l'analyseur de réseau,  $P_r$  la puissance réfléchie dans le plan des pointes et  $P_s$  la puissance récupérée en sortie, après propagation sur la ligne de Goubau et à travers l'échantillon. Un bilan des puissances donne  $P_e = P_r + P_s + P_{abs} + P_{ray}$  où  $P_{abs}$  est la puissance absorbée au sein du dispositif et  $P_{ray}$  la puissance rayonnée (non guidée : modes de substrats ou rayonnement dans l'air). La puissance rayonnée est négligée pour le moment, l'influence des modes de substrat sera discutée par la suite. La puissance absorbée au sein du dispositif est modélisée de la façon suivante :

$$P_{abs} = (P_e - P_r) - P_s = I_0 - I = I_0(1 - A \exp(-\alpha d)) \quad (3.3)$$

où  $A$  prend en compte l'absorption des lignes électromagnétiques et les pertes liées à la transition coplanaire/Goubau et  $\alpha$  ne correspond qu'à l'absorption au sein de la solution présente dans les microcanaux. Une telle modélisation considère que les pertes de propagation au sein de la ligne de Goubau et lors de la transition sont les mêmes quelque soit le liquide au sein du microcanal et est discutable. En effet, si le liquide dans le microcanal change, la variation de son indice de réfraction aux fréquences THz va modifier les puissances réfléchies aux interfaces mur de silicium/liquide/mur de silicium. En conséquence les puissances absorbées par les lignes de propagation peuvent varier si l'onde réfléchie varie. Cependant, ces variations sont supposées ici négligeables afin d'extraire l'absorption. La suite montrera que les valeurs d'absorption mesurées sont cohérentes avec celles rencontrées dans la littérature.

Si toutefois l'on voulait remonter de manière plus précise à l'absorption de l'échantillon, il faudrait mettre en oeuvre une stratégie pour mesurer les paramètres  $[S]$  non plus dans le plan des pointes mais au niveau des interfaces mur de silicium/liquide/mur de silicium. Des méthodes existent pour réaliser cela lors de la propagation sur lignes coplanares [133]. Leur adaptation sur ligne de Goubau sera discutée plus loin dans ce mémoire.

En combinant les équations (3.3) et (3.2), on obtient :

$$A \exp(-\alpha d) = \frac{|S_{21}|^2}{1 - |S_{11}|^2} \quad (3.4)$$

où  $A$  est déterminé par une mesure du dispositif vide dans lequel on suppose  $\alpha = 0$ . On obtient alors :

$$\alpha d = -\ln \left( \frac{|S_{21}|^2}{A (1 - |S_{11}|^2)} \right) \quad (3.5)$$

$d$  étant le même à chaque mesure, on peut déterminer  $\alpha/\alpha_{H_2O}$  de chaque solution, correspondant à l'absorption de la solution normalisée par rapport à celle de l'eau.

### **C Absorption des solutions éthanol/eau à 95GHz**

L'absorption normalisée des différentes solutions éthanol/eau à 95 GHz est représentée en Figure 3.4. Les résultats de mesure sont similaires à ceux obtenus par Khurgin *et al.* [19], sans l'utilisation de microsystemes, et confirment la capacité du microsysteme à réaliser la spectroscopie d'échantillons liquides. L'observation de la courbe expérimentale montre que l'augmentation de la concentration d'éthanol s'accompagne d'une chute de l'absorption de la solution. Ce résultat s'explique par la différence d'absorption, à 95 GHz, entre l'eau ( $\sim 80\text{cm}^{-1}$ ) et l'éthanol ( $\sim 20\text{cm}^{-1}$ ) [16]. Ainsi, en remplaçant progressivement les molécules d'eau, l'éthanol moins absorbant contribue à faire chuter l'absorption totale de la solution. Cependant, la diminution observée en Figure 3.4 devrait être linéaire avec la concentration, conformément à la loi de Beer Lambert représentée en pointillés rouges. Pour comprendre l'écart observé, des simulations en dynamique moléculaire ont été entreprises grâce à une collaboration avec Frédéric Affouard et Adrien Lerbret de l'Unité des Matériaux et Transformations (UMET) de l'Université de Lille 1.

### **D Etudes en dynamique moléculaire**

Le principe de l'étude en dynamique moléculaire (MD) est de simuler le comportement et les interactions entre les molécules d'eau et celles d'éthanol afin d'en étudier les mouvements respectifs. A cet effet, un champ de force modélisant les interactions inter et intramoléculaires est utilisé. Il prend en compte les flexions, élongations et rotations

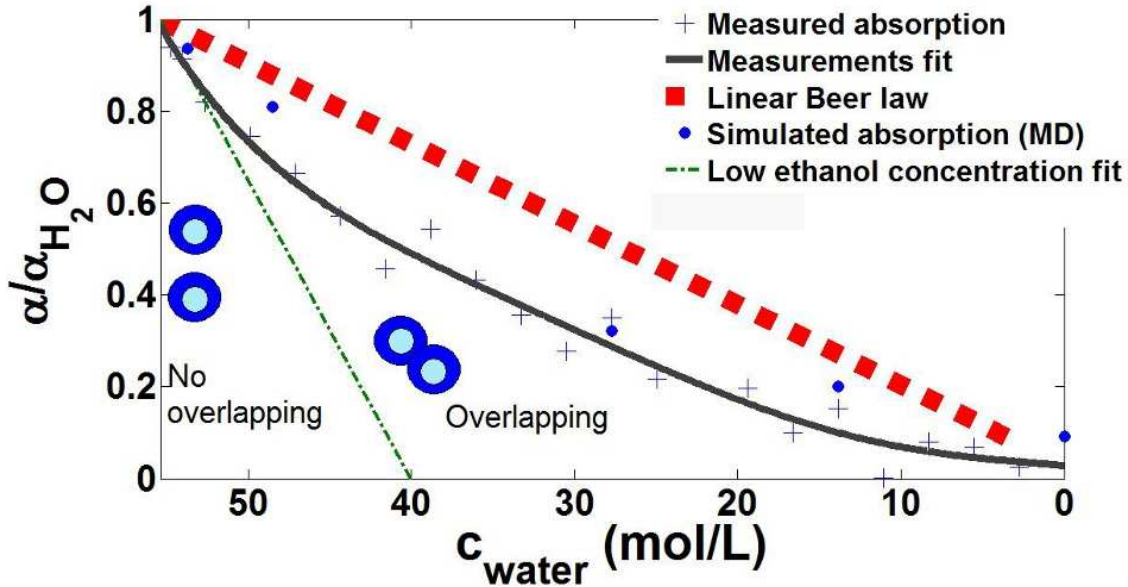


Fig. 3.4 – Absorption normalisée de la solution en fonction de la concentration molaire en eau, à 95 GHz. Résultats de mesure et de simulation.

internes des molécules, les interactions électrostatiques, ainsi que les forces de Van der Waals entre les différents atomes :

$$V(\vec{r}) = \underbrace{\sum V_{\text{intramoléculaires}}}_{\text{Mouvements internes}} + \underbrace{\sum_{i<j} \frac{q_i q_j}{4\pi\epsilon_0 r_{ij}}}_{\text{Electrostatique}} + \underbrace{\sum_{i<j} 4\epsilon_{ij} \left[ \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^{12} - \left( \frac{\sigma_{ij}}{r_{ij}} \right)^6 \right]}_{\text{Van der Waals}} \quad (3.6)$$

où  $q_i$  et  $q_j$  représentent les charges électriques réparties au sein des atomes et  $r_{ij}$  la distance entre deux atomes. Les forces de Van der Waals sont décrites par le potentiel de Lennard-Jones (Figure 3.6-droite), où  $\epsilon_{ij}$  et  $\sigma_{ij}$  sont des paramètres empiriques. Ce champ déterminé, les équations du mouvement de Newton sont intégrées numériquement (équation 3.7) et les nouvelles positions des atomes déterminées. Le champ de force est ensuite recalculé et l'itération reprend pour calculer le mouvement des atomes au cours du temps (Figure 3.5).

$$m_i \frac{d^2 \vec{r}_i(t)}{dt^2} = - \frac{\partial V(\vec{r})}{\partial \vec{r}_i(t)} \quad (3.7)$$

Le mouvement des molécules connu, il est possible de déterminer l'absorption de la solution à une fréquence particulière. Pour cela, le moment dipolaire total de la solution

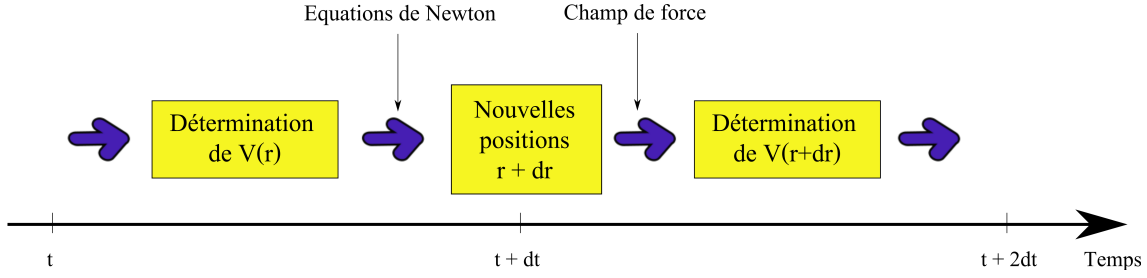


Fig. 3.5 – Processus itératif pour la détermination du mouvement des molécules par dynamique moléculaire

$\overrightarrow{M}(t)$  est calculé (en sommant les dipôles de chaque molécule) et sa variation au cours du temps est évaluée par sa fonction d'autocorrélation  $\phi_{MM}(t)$  qui représente la probabilité que  $\overrightarrow{M}(t_0)$  ( $t_0$  est un instant quelconque) et  $\overrightarrow{M}(t_0 + t)$  soient égaux :

$$\phi_{MM}(t) = \frac{\langle \overrightarrow{M}(0) \cdot \overrightarrow{M}(t) \rangle}{\langle \overrightarrow{M}(0)^2 \rangle} \quad (3.8)$$

A partir de cette fonction, les fréquences de vibration caractéristiques de l'échantillon peuvent être déterminées. C'est pourquoi la transformée de Fourier  $\phi_{MM}(\omega)$  de la fonction d'autocorrélation est directement reliée à la permittivité complexe de l'échantillon par la formule :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon' - j\varepsilon'' = \varepsilon_0 + \frac{\langle \overrightarrow{M}(0)^2 \rangle}{3Vk_B T \varepsilon_0} (1 + j\omega\phi_{MM}(\omega)) \quad (3.9)$$

où  $V$  est le volume de l'échantillon,  $k_B$  la constante de Boltzmann et  $T$  la température en Kelvin. En pratique le calcul de la transformée de Fourier  $\phi_{MM}(\omega)$  nécessite l'obtention d'une fonction d'autocorrélation très lisse, impliquant un moyennage important lors de son calcul. Les temps de mouvement simulés atteignent alors des durées supérieures à 10ns, ce qui rend les temps de calcul très longs. Une technique est alors d'utiliser un modèle de Debye  $\phi_{MM}(t) = A \exp(-t/\tau)$  (ici d'ordre 1) dont les paramètres  $A$  et  $\tau$  sont ajustés pour correspondre aux points obtenus lors de la simulation (voir Figure 3.7). Le calcul de la transformée de Fourier peut alors être effectué analytiquement. Quand  $\varepsilon(\omega)$  est obtenu, l'absorption et l'indice de réfraction de la solution sont données par :

$$\alpha(\omega) = \frac{\omega\varepsilon''(\omega)}{cn(\omega)} \quad (3.10)$$



$$n(\omega) = \left[ \frac{\varepsilon'(\omega) + \sqrt{\varepsilon'(\omega)^2 + \varepsilon''(\omega)^2}}{2} \right]^{1/2} \quad (3.11)$$

Des simulations en dynamique moléculaire ont ainsi été effectuées pour les solutions eau/éthanol. Le modèle utilisé pour l'eau est le TIP4P/2005 (Figure 3.6-gauche), qui est l'un des meilleurs actuellement pour reproduire correctement la plupart des propriétés de l'eau comme son diagramme de phase et sa densité. Ce modèle est composé de 4 sites rigides : un pour l'atome d'oxygène O, deux pour les atomes d'hydrogène H et un sans masse, M pour modéliser le moment multipolaire de la molécule d'eau. Des charges électrostatiques ponctuelles sont positionnées sur les atomes H et sur le site M.

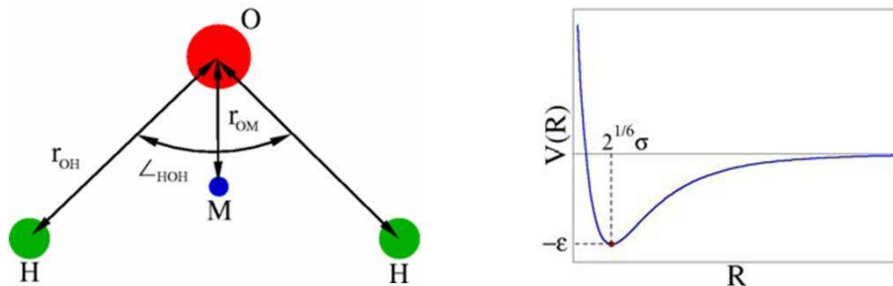


Fig. 3.6 – Gauche : Modèle T14P/2005 à 4 sites rigides pour la modélisation de la molécule d'eau - Droite : Potentiel de Lennard Jones pour les interactions de Van der Waals

Les molécules d'éthanol sont décrites par le champ de force OPLS (Optimized Potential for Liquid Solutions) dans lequel la molécule d'éthanol est considérée comme complètement flexible. Ses mouvements intramoléculaires sont modélisés par des potentiels harmoniques. La Figure 3.7 montre les résultats obtenus pour les calculs de la fonction d'autocorrélation du moment dipolaire total pour différentes fractions massiques d'éthanol. Pour chacune, le modèle de Debye retenu est également représenté.

L'absorption de chacune des solutions peut ensuite être déterminée et est représentée sur la Figure 3.4. L'écart à la loi linéaire de Beer-Lambert est confirmé et les simulations sont d'un bon accord avec les mesures expérimentales. Pour comprendre l'évolution non-linéaire de l'absorption en fonction de la concentration, des "photos" de la solution ont été extraites des simulations pour différentes concentrations d'éthanol (Figure 3.8).

Ces clichés montrent l'interaction entre la molécule d'éthanol et ses molécules d'eau voisines par le biais de liaisons hydrogène, variable en fonction des concentrations en

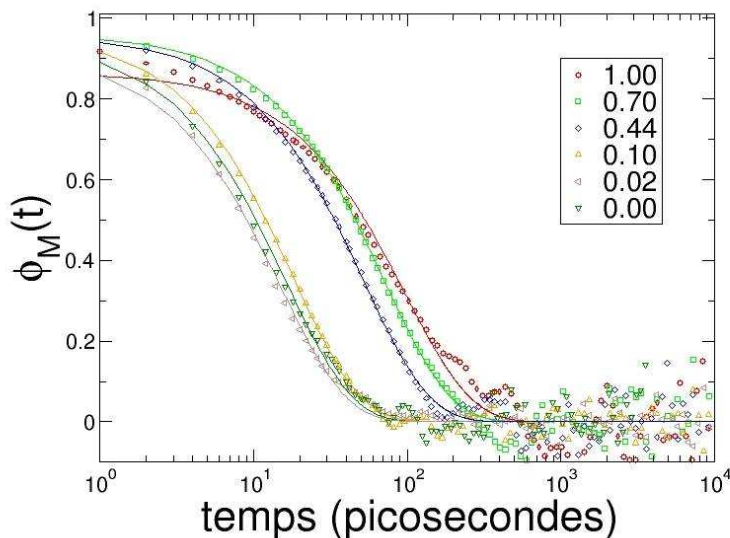


Fig. 3.7 – Fonctions d'autocorrélation de solutions eau/éthanol calculées pour différentes fractions massiques d'éthanol. Approximation par un modèle de Debye. Simulations réalisées par A. Lerbret et F. Affouard de l'UMET.

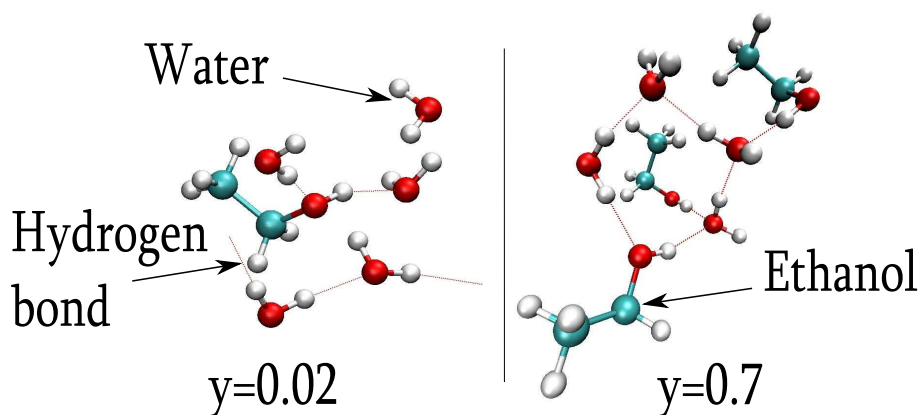


Fig. 3.8 – "Photos" instantanées de solutions eau/éthanol à différentes concentration  $y = N_{eth}/(N_{total})$ . Mise en évidence de la couche d'hydratation.

éthanol. Il s'en suit que le modèle linéaire de Beer Lambert, précédemment présenté et qui néglige l'interaction entre les espèces en solution, ne permet pas de modéliser le mélange à ces fréquences. Le spectre THz possède en effet la spécificité de sonder directement les interactions. C'est donc l'hydratation de l'éthanol (l'interaction ethanol/eau) qui est responsable de l'écart à la loi de Beer-Lambert. En effet, l'eau d'hydratation, dont le comportement est perturbé par la molécule d'éthanol forme la couche d'hydratation de l'éthanol. Aux faibles concentrations d'éthanol ( $c_{eau} > 50\text{mol/L}$ ), chaque molé-

cule d'éthanol est entourée de sa couche d'hydratation propre. L'augmentation du nombre de molécules d'éthanol s'accompagne d'une augmentation proportionnelle de molécules d'eau d'hydratation, d'où l'évolution linéaire, aux basses concentrations en éthanol, de l'absorption (Figure 3.4 - "Low ethanol concentration fit"). Cependant, à partir d'une certaine concentration d'éthanol, les couches d'hydratation commencent à se recouvrir (Figure 3.8-droite : une molécule d'eau peut être liée à plusieurs molécules d'éthanol) et l'augmentation des molécules d'eau d'hydratation n'est plus proportionnelle à celle des molécules d'éthanol. L'évolution de l'absorption devient alors non linéaire. A partir de l'explication précédente, un modèle a été utilisé pour caractériser quantitativement la couche d'hydratation *via* l'évolution non-linéaire de l'absorption, et est l'objet du paragraphe suivant.

## E Caractérisation de la couche d'hydratation de l'éthanol

Pour caractériser la couche d'hydratation de l'éthanol à partir des mesures d'absorption obtenues, un modèle à 3 composantes tenant compte de l'interaction eau/ethanol est utilisé [134, 21]. Il décrit l'absorption totale de la solution comme la somme de l'absorption de l'éthanol  $\alpha_{eth}$ , de celle de la couche d'hydratation  $\alpha_{shell}$  et de celle de l'eau volumique (ou "bulk"), non liée<sup>2</sup>,  $\alpha_{bulk}$  ; pondérée par les volumes respectifs :

$$\alpha = \alpha_{eth} \frac{V_{eth}}{V} + \alpha_{shell} \frac{V_{shell}}{V} + \alpha_{bulk} \frac{V - V_{eth} - V_{shell}}{V} \quad (3.12)$$

Pour les faibles concentrations, chaque molécule d'éthanol possède sa propre couche d'hydratation et ainsi  $V_{shell}$  est proportionnel au volume d'éthanol :  $V_{shell} = k.V_{eth}$ . L'absorption normalisée de la solution peut alors être exprimée de la manière suivante :

$$\frac{\alpha}{\alpha_{H_2O}} = \left[ \left( \frac{\alpha_{eth}}{\alpha_{H_2O}} - 1 \right) + k \left( \frac{\alpha_{shell}}{\alpha_{H_2O}} - 1 \right) \right] \frac{V_{eth}}{V} + 1 \quad (3.13)$$

où  $\alpha/\alpha_{H_2O}$  et  $\alpha_{eth}/\alpha_{H_2O}$  sont obtenus expérimentalement et  $V_{eth}/V$  est connu.  $k$  et  $\alpha_{shell}$  sont les paramètres inconnus à déterminer pour caractériser la couche d'hydratation.  $\alpha_{shell}$  est ici supposée constante. L'expression (3.13), valable pour les faibles concentrations d'éthanol, exprime que la variation d'absorption est linéaire avec la concentration d'éthanol. Elle correspond à la droite en pointillés marrons de la Figure 3.4. La comparaison entre l'équation modèle (3.13) et la mesure linéaire en basses concentrations d'éthanol va

<sup>2</sup>Suffisamment éloignée des molécules d'éthanol pour ne pas en subir l'influence.

donner une équation (égalité des pentes) entre les deux paramètres inconnus. Les résultats de cette équation sont représentés dans le plan  $(k, \alpha_{shell}/\alpha_{H_2O})$  en Figure 3.9 avec la marge d'erreur liée aux mesures.

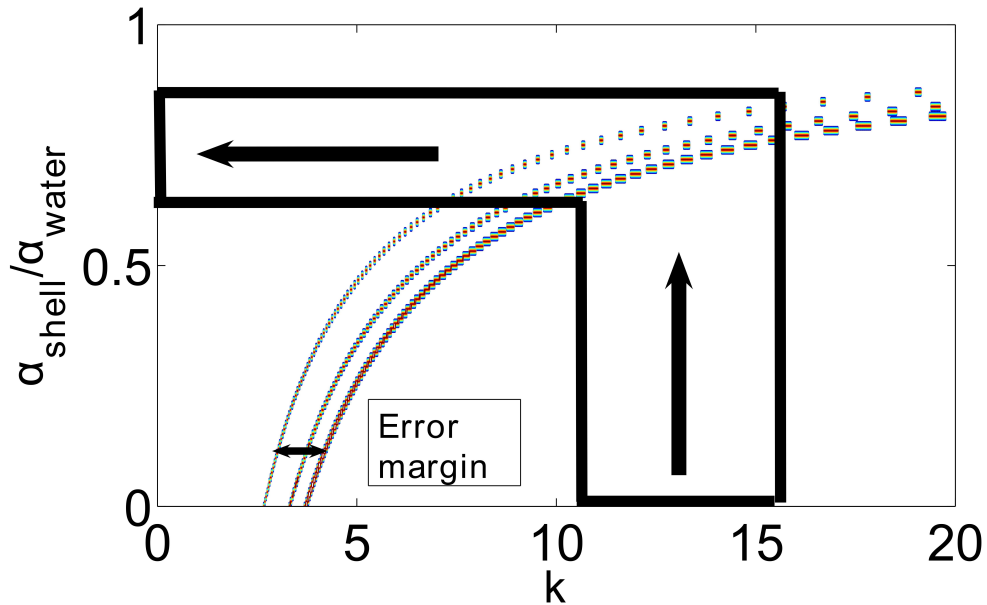


Fig. 3.9 – Détermination des paramètres  $k$  et  $\alpha_{shell}/\alpha_{H_2O}$ .

Une autre équation est ensuite nécessaire afin de déterminer l'unique couple solution. Pour cela, un modèle sphérique est utilisé pour la molécule d'éthanol et sa couche d'hydratation (Figure 3.10).

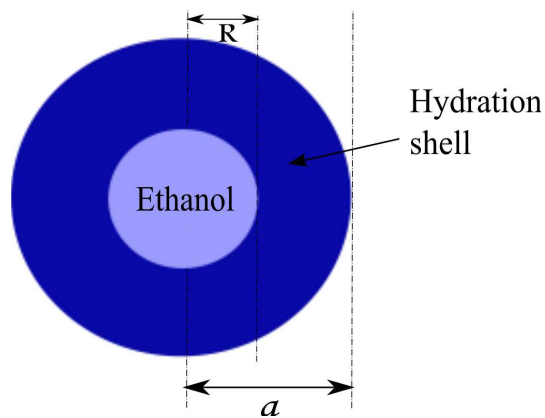


Fig. 3.10 – Modèle sphérique pour la molécule d'éthanol et sa couche d'hydratation

Lorsque la concentration en éthanol augmente, la Figure 3.4 montre que l'évolution de l'absorption quitte le régime linéaire des basses concentrations. Au sein de la solution, cela est interprété comme le recouvrement des couches d'hydratation de différentes molécules d'éthanol. Ainsi, la proportionnalité entre  $V_{shell}$  et  $V_{eth}$  est rompue et le modèle des basses concentrations n'est plus valide. En supposant que les molécules d'éthanol sont distribuées régulièrement au sein de la solution, la Figure 3.11 donne la configuration spatiale des molécules d'éthanol juste avant le recouvrement.

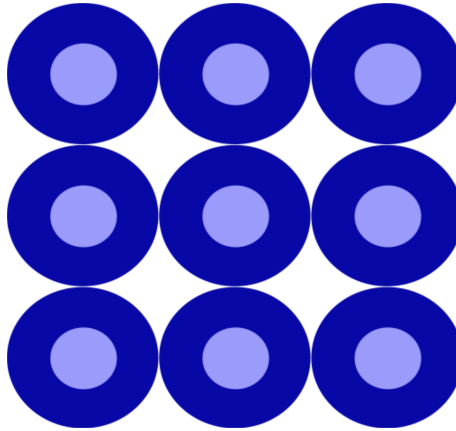


Fig. 3.11 – Configuration géométrique des molécules d'éthanol juste avant le recouvrement de couches d'hydratation

Si dans cette configuration un volume  $V$  de solution contient  $N_{rec}$  molécules d'éthanol, on peut écrire :

$$V = N_{rec} \times (2a)^3 \quad (3.14)$$

Or,  $N_{rec}/V$  peut être déterminé expérimentalement en observant la concentration d'éthanol à partir de laquelle l'absorption de la solution dévie de son évolution linéaire des basses concentrations. Cette déviation est évaluée en observant l'erreur relative  $\delta$  entre l'évolution linéaire des basses fréquences et la courbe lissée d'absorption ("Measurements fit" sur Figure 3.4). On considère ici que l'effet de recouvrement se produit pour  $5\% \leq \delta \leq 10\%$ . Cette condition mène à une concentration en eau, au moment du recouvrement, de  $c_{water} = 51 \pm 0.8 \text{ mol/L}$ . On en déduit, à partir de l'équation (3.14), que  $a = 5.4 \pm 0.4 \text{ \AA}$ . En considérant  $R = 4.46 \text{ \AA}$  le rayon de la molécule d'éthanol, on en déduit que l'extension de la couche d'hydratation  $a - R = 3.2 \pm 0.4 \text{ \AA}$ .  $k$  peut ainsi être calculé en utilisant la formule :

$$k = \frac{a^3 - R^3}{R^3} = 13 \pm 2.5 \quad (3.15)$$

Il suffit ensuite de reporter cette valeur de  $k$  dans la Figure 3.9 pour obtenir la valeur de l'absorption de la couche d'hydratation :

$$\frac{\alpha_{shell}}{\alpha_{H_2O}} = 0.72 \pm 0.1 < 1 \quad (3.16)$$

Ce résultat confirme le fait que l'eau d'hydratation, liée à la molécule d'éthanol, absorbe moins l'onde électromagnétique de 95GHz en raison de la chute de sa mobilité par rapport à l'eau volumique. Ainsi, les mesures expérimentales couplées à un modèle à 3 composantes ont permis de caractériser la couche d'hydratation de l'éthanol en terme d'absorption et d'extension à travers le calcul des paramètres  $\alpha_{shell}/\alpha_{H_2O}$  et  $a$  (ou  $k$ ).

Afin de vérifier la pertinence du modèle proposé malgré ses hypothèses simplificatrices, des études en dynamique moléculaire ont été réalisées. Pour déterminer l'extension de la couche d'hydratation de la molécule d'éthanol, la "fonction de distributions de paires"  $g(r)$  a été calculée. Cette fonction est représentée en Figure 3.12. Elle correspond au nombre de molécules d'eau  $N(r)$  situées à la distance comprise entre  $r$  et  $r + dr$  de l'atome d'oxygène de la molécule d'éthanol, divisé par le nombre de molécules d'eau présent dans le cas d'une distribution homogène. Autrement dit  $g(r) = N(r)/N_0$ , avec  $N_0 = \rho \cdot 4\pi r^2 dr$  où  $\rho$  est la densité de l'eau à la température considérée. Cette fonction montre donc l'influence de l'éthanol sur la structure de l'eau à son voisinage. L'examen de la Figure 3.12 montre que cette influence s'étend jusqu'à une distance de 5.5Å environ, ce qui est cohérent avec la valeur de  $a$  déterminée expérimentalement. Ainsi, le modèle utilisé pour l'hydratation mène à une longueur d'extension en très bon accord avec celle obtenue en dynamique moléculaire.

Le modèle précédemment développé permet également de déterminer la quantité d'eau d'hydratation en solution en fonction de la concentration en alcool. En effet, en considérant l'équation 3.12 et l'équation linéaire de Beer Lambert

$$\alpha_{BL} = \alpha_{eth} \frac{V_{eth}}{V} + \alpha_{bulk} \frac{V - V_{eth}}{V} \quad (3.17)$$

l'écart entre la courbe mesurée et la loi de Beer Lambert est :

$$\Delta\alpha = \alpha_{BL} - \alpha = (\alpha_{bulk} - \alpha_{shell}) \cdot \frac{V_{shell}}{V} \quad (3.18)$$

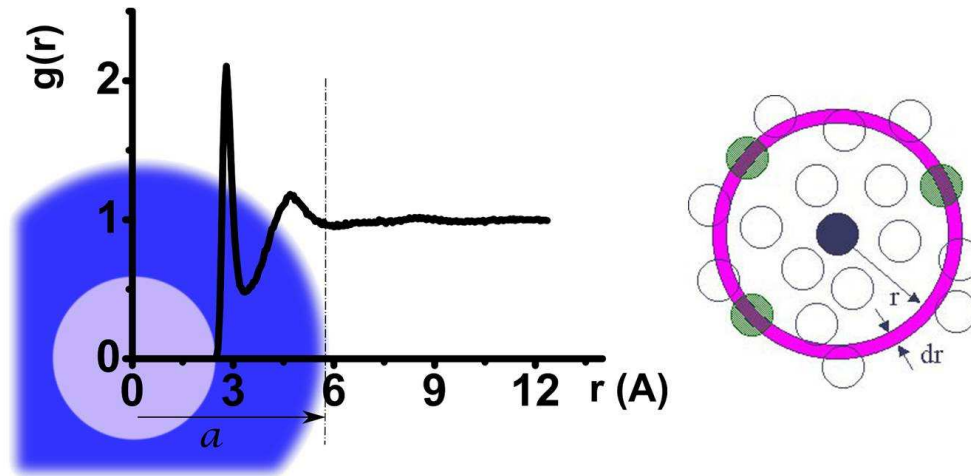


Fig. 3.12 – Gauche : Fonction de distribution de paires calculée entre l’oxygène et l’eau - Droite : Définition de la fonction de distribution de paires

En supposant que  $\alpha_{bulk}$  et  $\alpha_{shell}$  sont constants, il vient que l’écart à la loi de Beer Lambert  $\Delta\alpha$  est directement proportionnel au volume de couche d’hydratation en solution. Cet écart est tracé en Figure 3.13. Trois zones sont remarquables sur cette courbe [20, 22] :

- la zone 1 où les couches d’hydratation sont indépendantes et dans laquelle leur volume est proportionnel au volume d’alcool ;
- la zone 2 dans laquelle apparaît le recouvrement des couches d’hydratation ;
- la zone 3 dans laquelle le volume d’eau d’hydratation diminue due à la saturation de la solution.

Alors que les deux premières zones ont déjà été mises en évidence sur la Figure 3.4, la troisième apparaît nettement grâce à cette représentation.

### **Autres modèles de la littérature**

Il est intéressant de s’arrêter sur une autre approche de l’hydratation abordée dans la littérature. Des études sur la permittivité diélectrique de mélanges eau/alcool ont été menées dans les bandes THz et sub-THz. Elles montrent que la permittivité diélectrique d’un mélange peut s’écrire sous la forme d’un modèle de relaxation de Debye-Cole du troisième ordre [15, 16], complété par un terme de vibration [17] :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \sum_{i=1}^3 \frac{\Delta\varepsilon_i}{1 - (j\tau_i\omega)^{b_i}} + \frac{A_v}{\omega_v^2 - \omega^2 - j\omega\gamma_v} \quad (3.19)$$

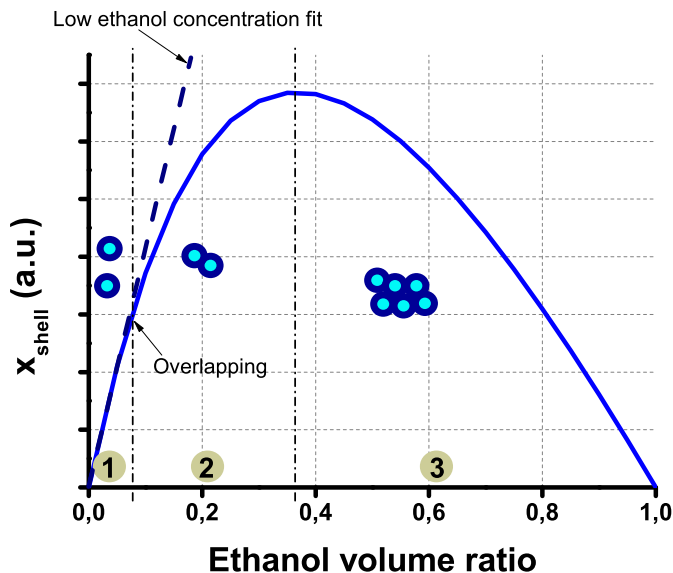


Fig. 3.13 – Ecart à la loi de Beer Lambert en fonction de la concentration en éthanol - Volume de couche d'hydratation en solution

où  $\tau_i$  est la constante de temps de la  $i$ ème relaxation,  $\omega_v$  la fréquence de résonance, et  $\gamma_v$  son facteur d'amortissement. Dans ce modèle, la constante  $\tau_2$  est de l'ordre de 10ps et son évolution en fonction du volume d'éthanol en solution [17] est similaire à celle de la Figure 3.13. Cette évolution "en forme de cloche" est également observée quand l'amplitude de la relaxation d'ordre 2 est tracée en fonction de la concentration en alcool. Il est ainsi possible que les phénomènes à l'origine de la relaxation d'ordre 2 soient similaires aux phénomènes moléculaires responsables de la forme de la Figure 3.13. Or, Sato *et al.* expliquent la relaxation d'ordre 2 par des processus intermoléculaires en bout de chaînes d'alcool. En effet, les molécules d'éthanol peuvent s'associer, par le biais de liaisons hydrogène, en chaînes et la relaxation de l'extrémité de ces chaînes (liée à de l'eau) serait à l'origine du terme d'ordre 2. Ces affirmations semblent donc confirmer que la forme observée en Figure 3.13 est bien liée à des processus d'interaction eau/alcool et donc à l'état d'hydratation des molécules d'éthanol.

## F Nombre d'hydratation

### 1 A partir des mesures

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de la couche d'hydratation, le nombre d'hydratation  $N_h$  (nombre de molécules d'eau de la couche d'hydratation) de l'éthanol a été quantifié. A partir du volume  $V_{shell}$  de la couche d'hydratation, et en supposant que la



densité de l'eau d'hydratation  $\rho$  est constante et similaire à celle de l'eau bulk<sup>3</sup>, on peut écrire que :

$$N_h = \rho \frac{N_A V_{shell}}{M_{H_2O}} \quad (3.20)$$

où  $N_A$  est le nombre d'Avogadro et  $M_{H_2O}$  la masse molaire de l'eau. On trouve dans cette condition  $N_h \sim 30$ . Khurgin [19] propose une autre méthode d'extraction en considérant l'écart de l'absorption mesurée avec la loi de Beer Lambert ( $\alpha_{BL}$ ). En affirmant que le défaut d'absorption  $\delta\alpha = \alpha_{BL} - \alpha$  est dû aux molécules de la couche d'hydratation dont l'absorption est supposée nulle, il écrit que :

$$\delta\alpha = \frac{N_h N_{eth}}{N_A} \times k_{H_2O} \quad (3.21)$$

où  $k_{H_2O}$  est l'absorption molaire de l'eau. Une telle méthode donne un nombre d'hydratation  $N_h = 4$  pour l'éthanol.

## 2 Dynamique moléculaire

Afin de comprendre les différences entre les valeurs obtenues,  $N_h$  est ici évaluée à partir des résultats des simulations. Pour l'obtenir, il suffit d'intégrer la courbe  $g(r)$  sur l'extension de la couche d'hydratation :

$$N_h = \int_{couche} \rho 4\pi r^2 g(r) dr \quad (3.22)$$

L'observation de  $g(r)$  (Figure 3.12) montre que la couche d'hydratation semble formée de deux couches successives, correspondant aux deux pics de  $g(r)$ . Si l'on veut connaître le nombre total de molécules dans la couche d'hydratation, il faut donc intégrer les deux pics, c'est à dire de  $r = 0$  à  $r = 5.5\text{Å}$ . Ce calcul donne  $N_h \sim 26$ , proche de celui obtenu par notre méthode d'extraction. En revanche, si l'on souhaite ne considérer que les molécules d'eau voisines les plus proches ("première couche"), il faut alors intégrer  $g(r)$  entre  $r = 0$  et  $r = 3.3\text{Å}$ . Dans ce cas,  $N_h \sim 2.7$ , plus proche de la valeur obtenue par Khurgin *et al.*.

Ainsi, en fonction du modèle choisi pour décrire la couche d'hydratation (sphérique avec absorption constante non nulle OU absorption nulle) on peut sonder la couche d'hydratation de l'éthanol dans sa globalité OU seulement les molécules d'eau les plus proches.

<sup>3</sup>Il est vrai que la courbe de la Figure 3.12 va contre cette supposition. Cependant, le résultat obtenu avec cette approximation sera cohérent avec celui obtenu par la suite en dynamique moléculaire.

Cette observation laisse à penser que l'absorption d'une molécule d'eau dans la couche d'hydratation doit dépendre de sa distance à la molécule d'éthanol :  $\alpha_{shell} = \alpha_{shell}(r)$ . Plus  $r$  est faible est plus l'absorption diminuerait, en raison de l'augmentation des forces d'interaction entre l'éthanol et l'eau. La conception d'un tel modèle plus réaliste, synthèse des deux précédents, est donc l'étape suivante dans la description quantitative de la couche d'hydratation de l'éthanol. Pour y parvenir, une analyse avancée du jeu de données est effectuée, par l'utilisation de techniques issues de la chimiométrie appliquées à l'ensemble du spectre mesuré. Elle va permettre une mesure différenciée des couches d'hydratation successives.

## **II Analyse multivariée pour l'étude de l'hydratation**

L'étude précédente, qui a mis en évidence l'intérêt du couplage "Mesures sub-THz" et "Dynamique Moléculaire", est basée sur un traitement univarié des données. En effet, l'étude est menée en considérant l'évolution de l'absorption des mélanges eau/éthanol en fonction de la concentration à *une fréquence donnée*. Une étude prenant en compte la variation de concentration ET de fréquence (étude multivariée) est ici proposée afin d'affiner les observations précédentes.

L'utilisation de techniques multivariées basées sur des algorithmes mathématiques avancés nécessite cependant l'optimisation de la qualité des mesures. Ce travail est présenté dans un premier temps. Ensuite, des techniques multivariées issues du domaine de la chimiométrie seront appliquées au jeu de données afin d'en extraire une information maximale et de compléter le modèle précédemment proposé.

### **A Optimisation du protocole de mesures**

En analysant le jeu de données dans son intégralité, les méthodes multivariées sont susceptibles d'apporter des informations supplémentaires sur les échantillons sondés en détectant des corrélations non triviales. En contrepartie, le jeu de données présenté doit être le moins bruité et le plus reproductible possible.

#### **1 Etude statistique**

##### **Résultats bruts**

Afin de caractériser la précision et la reproductibilité des mesures précédentes, une étude statistique a été menée. Les paramètres  $S$  du dispositif rempli d'eau ont été mesurés 30 fois pendant une demi heure, puis par série de 5 fois toutes les demi-heures. L'ensemble des résultats bruts pour  $S_{21}$  est présenté en Figure 3.14.

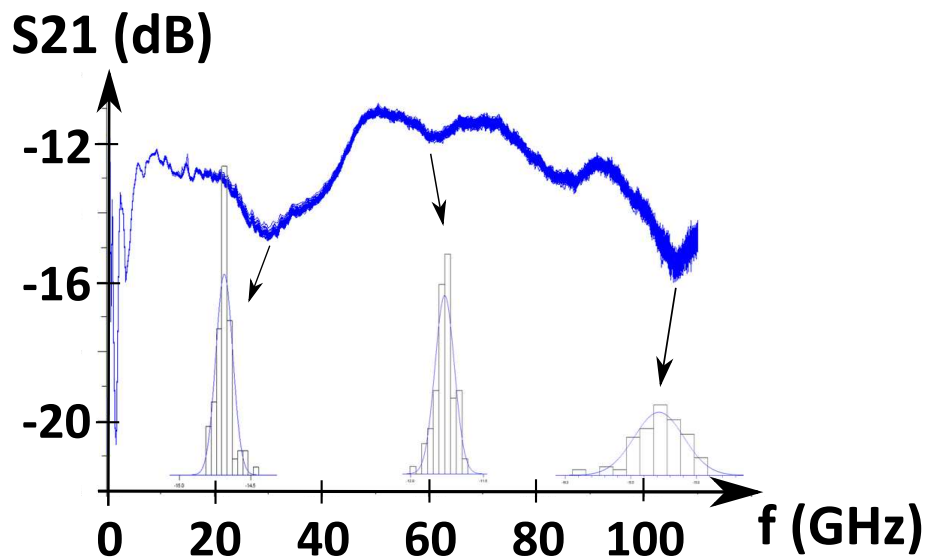


Fig. 3.14 – Mesures brutes de  $S_{21}$  sur l'eau. Histogrammes normalisés pour  $f=30\text{GHz}/62.5\text{GHz}/105\text{GHz}$  avec régression par fonction de Gauss.

Pour chaque fréquence, un comportement de type gaussien est observé autour d'une valeur moyenne  $\mu$ . L'écart-type de la gaussienne est évalué pour chaque fréquence et est représenté en Figure 3.15. L'augmentation de l'écart type en fin de bande ( $f > 100\text{GHz}$ ) peut être liée à un défaut de calibration sur les fréquences limites ainsi qu'à la propagation des modes de substrat. Sur la bande de fréquences pertinente (30GHz - 100GHz), l'écart-type  $\sigma$  relevé est quasiment constant égal à 0.08dB. Pour une loi de répartition gaussienne, 95% des échantillons sont compris entre  $\mu - 2\sigma$  et  $\mu + 2\sigma$ , portant ainsi à  $4\sigma \approx 0.3\text{dB}$  l'intervalle d'incertitude des mesures brutes autour de la valeur moyenne. La loi de répartition mesurée, de type "loi normale", indique *a priori* le caractère aléatoire des variations observées. C'est pourquoi, par la suite, chaque mesure de transmission sera accompagné d'une moyenne sur plusieurs échantillons. Cette moyenne peut être effectuée manuellement *a posteriori* ou automatiquement par l'analyseur de réseau<sup>4</sup>.

### Résultats avec un facteur de moyenne de 200

Des mesures sur l'eau ont donc été menées avec un facteur de moyenne de 200 sur l'analyseur de réseau. Entre les mesures, de l'éthanol est injecté, à différentes concentrations, afin de se placer dans les conditions d'une spectroscopie en concentration de solutions eau/éthanol. Les résultats bruts sont présentés en Figure 3.16.

<sup>4</sup>Dans le cas de l'étude précédente sur l'hydratation de l'éthanol, un moyennage automatique de 30 avait été choisi, compromis entre temps d'acquisition et qualité de mesure.

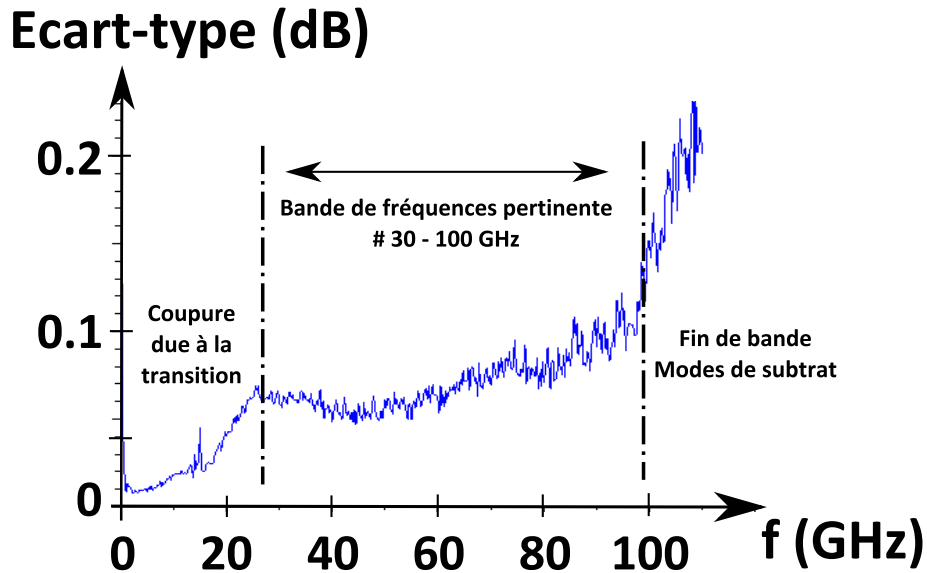


Fig. 3.15 – Evolution de l'écart type des mesures en fonction de la fréquence.

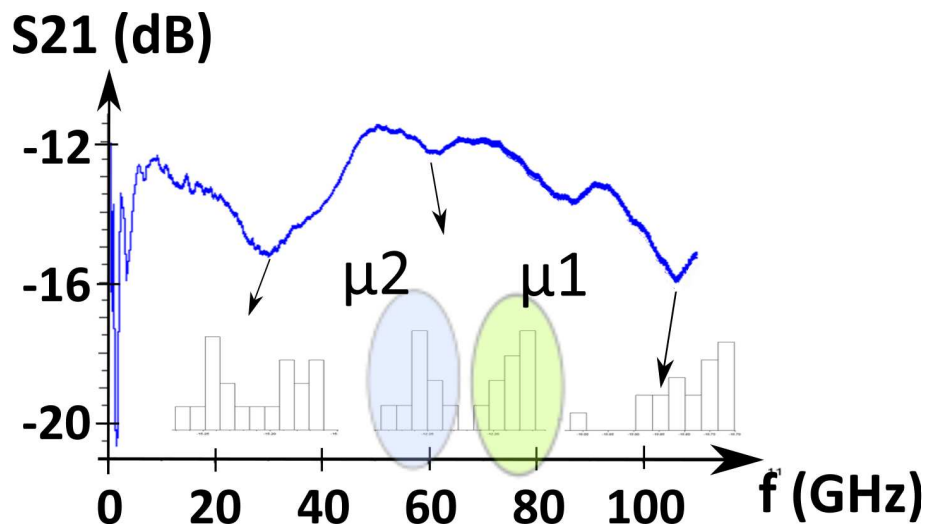


Fig. 3.16 – Mesures brutes et histogrammes de  $S_{21}$  sur l'eau. Facteur de moyenne de 200

La comparaison graphique avec la Figure 3.14 montre une réduction de la zone d'incertitude. Cependant, l'observation des histogrammes montre ici une répartition non gaussienne des échantillons. Ces distributions semblent même bicéphales avec deux valeurs majoritaires disjointes  $\mu_1$  et  $\mu_2$ . L'explication d'une telle répartition peut provenir d'un décalage dans le temps de la valeur moyenne mesurée. Pour s'en convaincre, le tracé du décalage  $\Delta S = S_{21}(t) - S_{21}(0)$  (pour chaque fréquence) en fonction du temps est révélateur. Il est représenté en Figure 3.17. Le décalage de la valeur moyenne est observé après une durée d'1h environ, et est de l'ordre de 0.1dB. En dehors de ce saut, les variations au-

tour de la valeur moyenne donnent une zone d'incertitude  $\delta$  inférieure à 0.05dB. Par comparaison avec celle du cas sans moyenne (0.3dB), un facteur 6 est gagné concernant l'incertitude. Cependant, le décalage de la valeur moyenne dans le temps empêche de profiter de cet avantage car l'incertitude de la mesure sur les 4 heures est  $\Delta S_{max} - \Delta S_{min} \approx 0.15\text{dB}$ . Ainsi, seul un facteur 2 est réellement gagné.

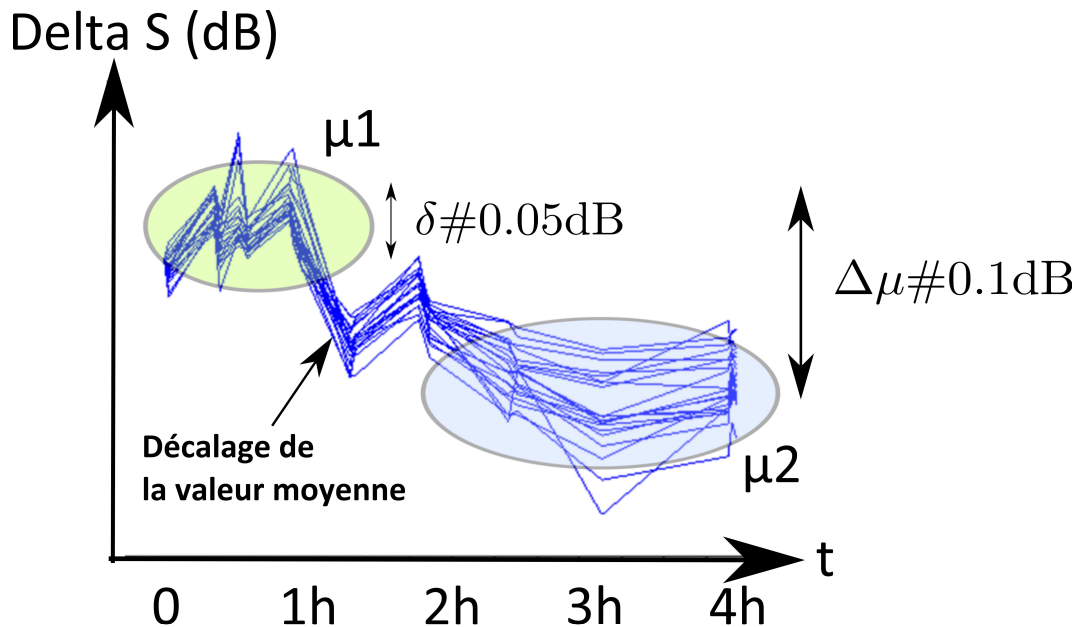


Fig. 3.17 – Variation de  $S_{21}$  en fonction du temps sur la bande de fréquence

La diminution de la zone d'incertitude est un facteur clé dans le cas de la spectroscopie en concentration car c'est la largeur de cette zone qui va déterminer la concentration minimale mesurable. Par exemple, la différence entre une solution d'eau et d'éthanol à 5% est de l'ordre de 0.1 dB. Pour gagner en sensibilité, il est nécessaire de la rendre la plus faible possible. Dans le cas présent, cela passe par la compréhension du décalage de valeur moyenne et, en conséquence, par la définition d'une stratégie de mesure permettant de s'en affranchir. L'origine du décalage observé peut être multiple :

- déviation de la calibration de l'analyseur de réseau ;
- variation de la température en salle de caractérisation ;
- pollution du dispositif, problèmes de rinçages ;
- usure du dispositif ;
- très léger déplacement des pointes lors des injections de produits ;
- ...

Dans la suite, plusieurs tests sont présentés afin de déterminer quelle est l'origine la plus plausible.

### Test de déviation de l'analyseur de réseau

Après avoir effectué une calibration de l'analyseur de réseau, une ligne coplanaire du kit de calibration utilisé a été mesurée pendant environ 3h. Ce test permet de déterminer les déviations dans le temps liées à l'appareil de mesure. Le test est effectué avec un facteur de moyenne de 200 afin de s'affranchir du bruit gaussien. Hormis en fin de bande (au delà de 100GHz), les variations de la mesure au cours du temps sont très faibles par rapport à celles observées lors de la mesure précédente (Figure 3.16). Après traitement des données, elles sont caractérisées par un écart-type maximal  $\sigma_{VNA} \approx 0.01\text{dB}$ .

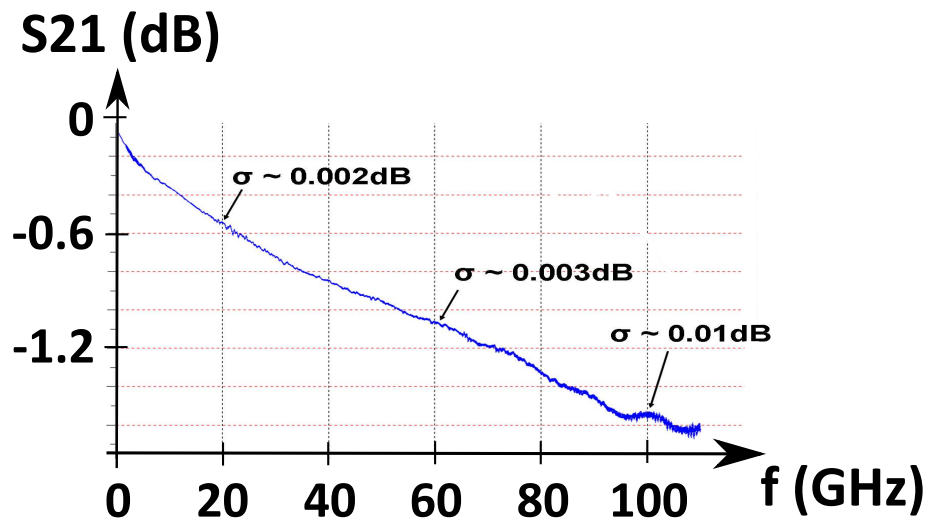


Fig. 3.18 –  $S_{21}$  relevé pendant 3h sur une ligne de référence

### Test du dispositif vide

Le test précédent a mis en évidence que la déviation de l'analyseur de réseau est négligeable par rapport aux variations observées lors des mesures précédentes. Cependant, le niveau de pertes de ce test est compris entre 0 et -2dB, ce qui ne correspond pas réellement aux conditions expérimentales avec le dispositif (environ -10dB à vide). De plus, l'épaisseur des lignes du kit de calibration est bien supérieure à celle des lignes du dispositif (500nm). Ainsi, il est plus facile pour les pointes de se positionner de manière stable (de manière plus profonde) sur les lignes du kit de calibration. C'est pourquoi un test a ensuite été réalisé sur un dispositif vide, sortant du procédé de fabrication. Après

avoir fixé le dispositif par aspiration sur le banc de mesure, les pointes sont posées et les paramètres  $S$  sont mesurés pendant une journée. L'évolution du paramètre  $S_{21}$  au cours du temps est montré en Figure 3.19 à une fréquence de 60GHz. Elle fait apparaître des décalages au cours du temps. Afin d'en déterminer l'origine, de légers tapotages ont été effectués sur le banc de mesure (pouvant simuler la pose d'une seringue d'injection...). Il est alors remarquable que les décalages de  $S_{21}$  apparaissent juste après ces perturbations et que leur amplitude est *a priori* aléatoire. Si aucune perturbation n'est effectuée sur le système,  $S_{21}$  peut rester quasiment constant pendant plus de deux heures, avec une zone d'incertitude  $\delta$  de l'ordre de 0.01dB.

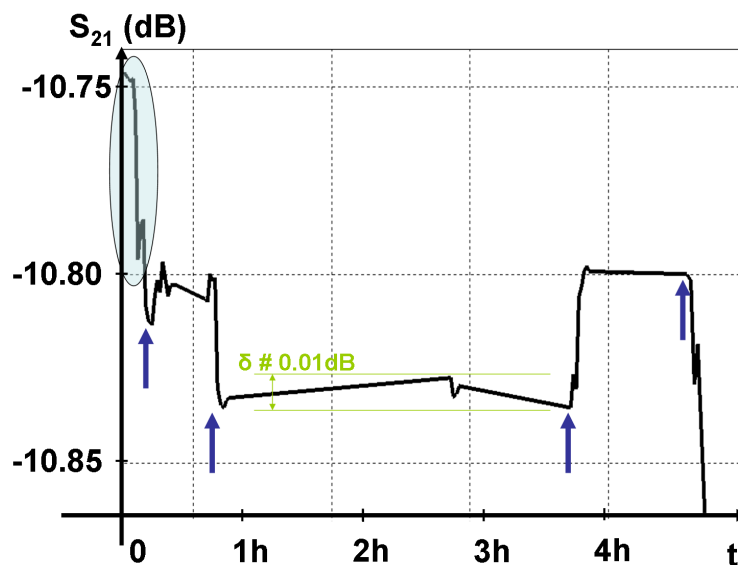


Fig. 3.19 –  $S_{21}$  relevé pendant 5h sur le dispositif vide - Les flèches correspondent à des très légers chocs sur le banc de mesure - La zone entourée est une décroissance du signal non provoquée volontairement au début de la mesure.

Les décalages observés sur toute la durée des mesures aboutissent à une incertitude de plus de 0.1dB, ce qui coïncide avec les observations des mesures précédentes. Il est donc probable que les décalages aient même origine : des petits chocs effectués sur le banc de mesure dus à l'injection et la manipulation des seringues. Ces chocs peuvent entraîner de très légères modifications au niveau du posé de pointes et ainsi faire décaler légèrement le niveau de  $S_{21}$ . Il est à noter qu'une brusque variation de  $S_{21}$  est intervenue au début des mesures (zone entourée) sans apport volontaire de choc sur le banc de mesure. Il est possible que le décalage corresponde à un glissement des pointes, qui viennent d'être posées, vers un état d'équilibre plus stable.



### Influence de la lampe

Le dispositif sous pointes est placé sous une lunette binoculaire pour permettre le posé de pointes par l'opérateur. Celle-ci est accompagnée d'un éclairage focalisé sur le dispositif. L'extinction ou l'allumage de cet éclairage a une influence sur le signal transmis. En effet, un débattement de 0.2dB est observé selon que la lampe est éteinte ou allumée (Figure 3.20). Le régime transitoire de passage entre les 2 états mesuré est de l'ordre de la minute, ce qui laisse à penser à une influence d'origine thermique plutôt qu'électromagnétique. Il est difficile de prédire où l'énergie est stockée (dans le quartz ? dans l'air ?). Pour un cristal, la théorie prévoit une augmentation des pertes avec la température. Cependant, dans les mesures, la transmission est meilleure lampe allumée. Est-ce la température de l'air qui influence ? Ou bien sont-ce les pointes qui, en chauffant légèrement par conduction de la chaleur *via* le quartz, entraînent un décalage par rapport à la calibration ? Cela est probable car le transitoire de changement d'état pour  $S_{21}$  ne démarre pas immédiatement après l'extinction ou l'allumage de la lampe ; le temps de retard pourrait correspondre au temps pour que le transfert thermique par le substrat de quartz atteigne les pointes.

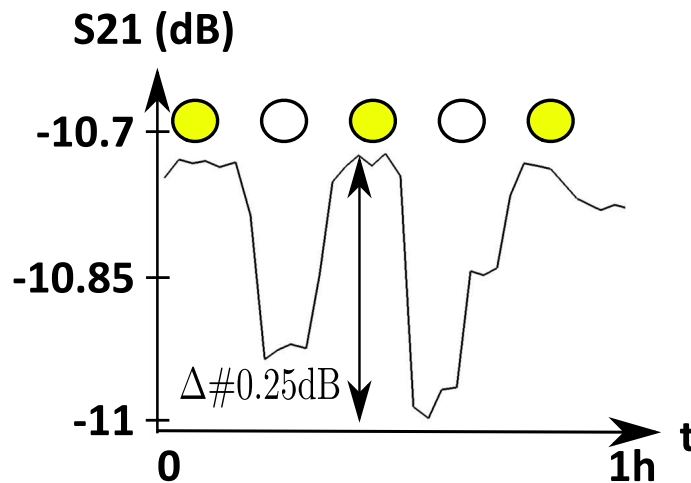


Fig. 3.20 – Influence de l'état de la lumière de la binoculaire sur le paramètre  $S_{21}$

Une autre explication peut résider dans le fait que, en chauffant, la permittivité relative du substrat peut varier et ainsi désadapter la structure de propagation, modifiant ainsi les propriétés de transmission. L'observation des paramètres de réflexion  $S_{11}$  et  $S_{22}$  montre que  $S_{22}$  est fortement altéré par l'état de la lampe alors que  $S_{11}$  ne l'est pas sensiblement. L'explication pourrait alors résider dans une élévation de température qui altérerait les mesures des pointes du port 2. La même expérience menée le lendemain, et donc avec

un nouveau posé de pointes, montre à nouveau cette dissymétrie au niveau des mesures. Actuellement, ce phénomène n'est pas compris clairement. Cependant, il peut être évité par extinction de la lampe lors des mesures, ce qui sera effectué de manière systématique.

## **2 Quelle stratégie pour les mesures ?**

Au regard des tests effectués, il semble que les décalages observés pendant les mesures correspondent à des mouvements subtils des pointes (non observés au microscope) entraînés par des micro-chocs au niveau de la zone expérimentale. Ces micro-chocs sont difficiles à éviter. En effet, entre chaque injection, la seringue doit être changée manuellement par un opérateur<sup>5</sup>. Il est tout de même possible d'enfoncer un peu plus les pointes lors du posé, ce qui peut permettre une plus grande stabilité. De plus, lors des mesures précédentes, le dispositif était fixé par un scotch double-face plastique et donc déformable. Afin de limiter les mouvements du dispositif, autre source possible de déplacement des pointes, une aspiration par le vide a remplacé le scotch. Toutes ces précautions permettent de limiter au maximum les décalages observés.

Toutefois, ces décalages sont ponctuels et *a priori* indépendants du liquide contenu dans le dispositif. Ainsi, en mesurant un signal de référence (eau) entre chaque échantillon, le décalage dû aux mouvements des pointes peut être déterminé et le paramètre  $S_{21}$  peut être corrigé en conséquence<sup>6</sup>. La comparaison des  $S_{21}$  corrigés et non corrigés est présentée en Figure 3.21 en fonction de la portion volumique d'éthanol. La fréquence choisie est de 63GHz, car elle correspond à une zone où le bruit de mesure est minimal. La correction améliore nettement l'allure de la courbe, plus régulière. La zone entourée est caractéristique de la réduction d'erreurs. Pour ces mesures, les échantillons ont été titrés en chromatographie en phase gazeuse afin d'assurer une précision relative de 5% sur les proportions volumiques d'éthanol. L'évolution observée de l'absorption est linéaire, comme attendu aux faibles concentrations. De plus, cette correction permet d'assurer une meilleure résolution : la solution à 0.25% d'éthanol est discriminée, des concentrations d'éthanol de 2mg/mL peuvent donc être détectées dans le dispositif.

L'application de ce protocole de traitement des données aux mesures sur des pourcentages volumiques d'éthanol de 0 à 100, par pas de 5, est montrée en Figure 3.22.

---

<sup>5</sup>L'exploitation de la microfluidique et des pousse-seringues permettant l'automatisation des mesures aurait ici un intérêt certain pour éviter l'intervention de l'opérateur pendant la phase de mesure.

<sup>6</sup>Une limite à cette méthode apparaît si le décalage de pointes a lieu entre la mesure d'eau et celle de l'échantillon.

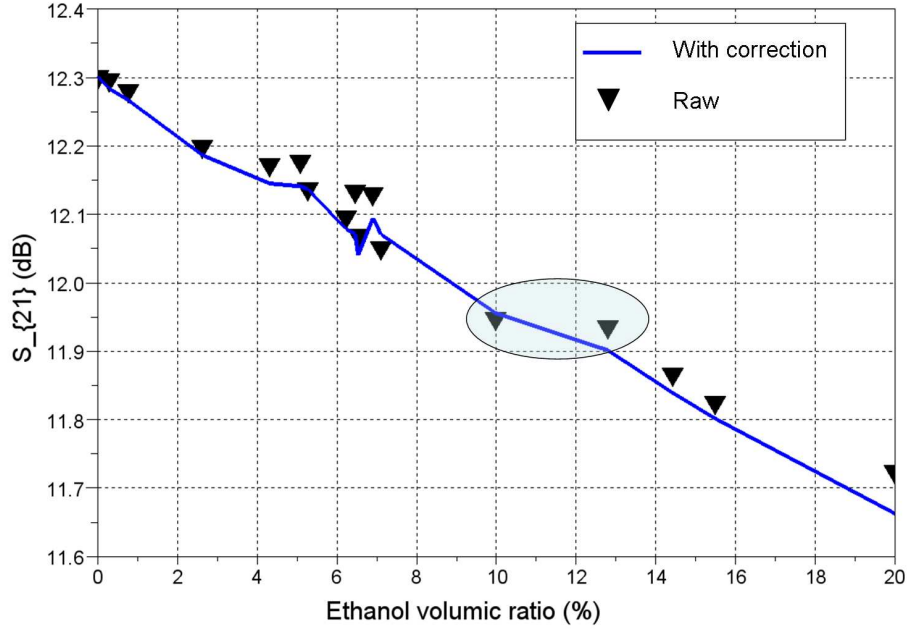


Fig. 3.21 – Comparaison de  $S_{21}$  en fonction de la portion volumique d'éthanol pour les données brutes et corrigées -  $f=63\text{GHz}$

L'absorption est représentée en unité arbitraires définie par<sup>7</sup> :

$$\alpha = \ln \left( \frac{|S_{21}|^2}{1 - |S_{11}|^2} \right) \quad (3.23)$$

En considérant l'incertitude  $\Delta S_{21}$  obtenue après correction du décalage de  $S_{21}$  (en dB) vaut 0.05dB (voire Figure 3.15), en notant que  $S_{21}$  (en dB) =  $20 \log(|S_{21}|)$  et en supposant que  $|S_{11}|^2 \ll 1$ , il vient :

$$\alpha \sim \ln \left( |S_{21}|^2 \right) = 2 \cdot \ln(10) \cdot \frac{S_{21}(\text{en dB})}{20} \quad (3.24)$$

L'incertitude sur l'absorption en unité arbitraire est donc :

$$\Delta\alpha = 2 \cdot \ln(10) \cdot \frac{\Delta S_{21}(\text{en dB})}{20} \sim 0.0116 \quad (3.25)$$

Cette zone d'incertitude est représentée sur la Figure 3.22 et correspond bien à l'écart entre les mesures et la courbe de tendance. La comparaison de la courbe à celle présentée en Figure 3.4 montre l'amélioration engendrée par l'étude statistique précédente.

<sup>7</sup>Cette expression est à mettre en regard avec l'équation 3.5, dans laquelle  $A$  et  $d$  ne sont pas déterminés. C'est pourquoi l'absorption est ici donnée en unité arbitraire.

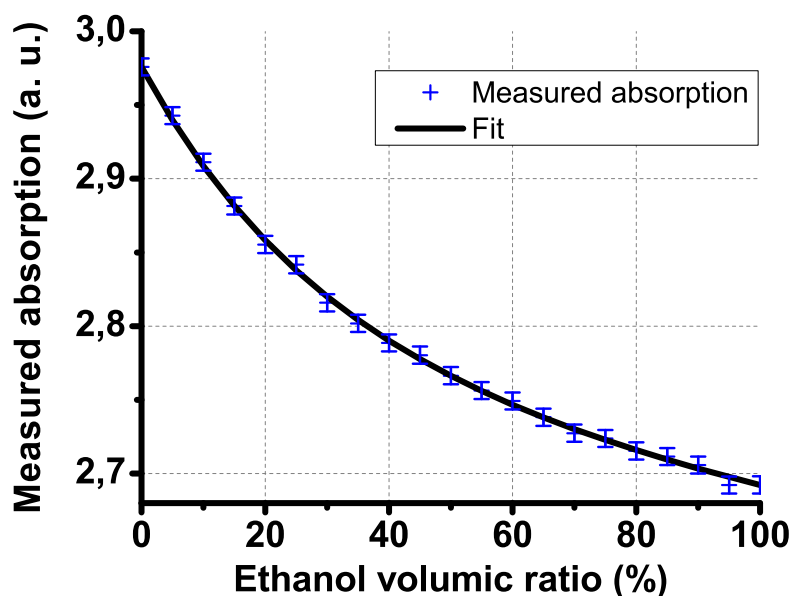


Fig. 3.22 – Absorption des solutions eau/éthanol après l’utilisation du protocole d’extraction et de correction des mesures - Facteur de moyennage de 200 -  $f=63\text{GHz}$

En conséquence, les principes permettant l’amélioration de la qualité des mesures, et qui seront systématiquement appliqués dans la suite, sont :

- expérimentalement, la limitation des accoups sur le banc de mesure et l’amélioration de la stabilité du dispositif
- un moyennage de facteur 200 pour minimiser le bruit gaussien
- une correction des décalages par la mesure de la solution de référence entre chaque échantillon.

La courbe précédente donne l’évolution de l’absorption relative du mélange pour une fréquence donnée. Il est également possible, par une étape de calibration, de donner la valeur absolue de l’absorption des mélanges sur une gamme de fréquence étendue. Pour cela, il suffit de connaître l’absorption de l’éthanol et de l’eau purs. Un modèle pour ces grandeurs est donné par Sato *et al.* jusque 89 GHz [16]. Son utilisation<sup>8</sup> permet de déterminer l’absorption absolue des mélanges eau/éthanol présentée en Figure 3.23 à partir

<sup>8</sup>Il est à noter que le modèle proposé est valable à 25°C, alors que les mesures ont été réalisées à la température ambiante de 20°C. Cependant, les variations engendrées par cet écart semblent négligeables au vu de [19]. De plus, le principe de la calibration sera le même avec un modèle plus adapté. La suite de l’étude s’appuie sur les mesures relatives et ne souffre ainsi pas de cette légère approximation.

des mesures du BioMEMS. Les profils d'absorption ne sont cependant pas complètement plats et des petits pics peuvent être observés. Ils peuvent être attribués à des réflexions internes non-corrigées à l'intérieur du dispositif. Néanmoins, leur amplitude reste négligeable par rapport aux variations d'absorption entre les différents mélanges. Il est ainsi possible, grâce à une calibration adaptée, de revenir à l'absorption absolue des mélanges eau/alcool grâce au microsysteme précédemment développé.

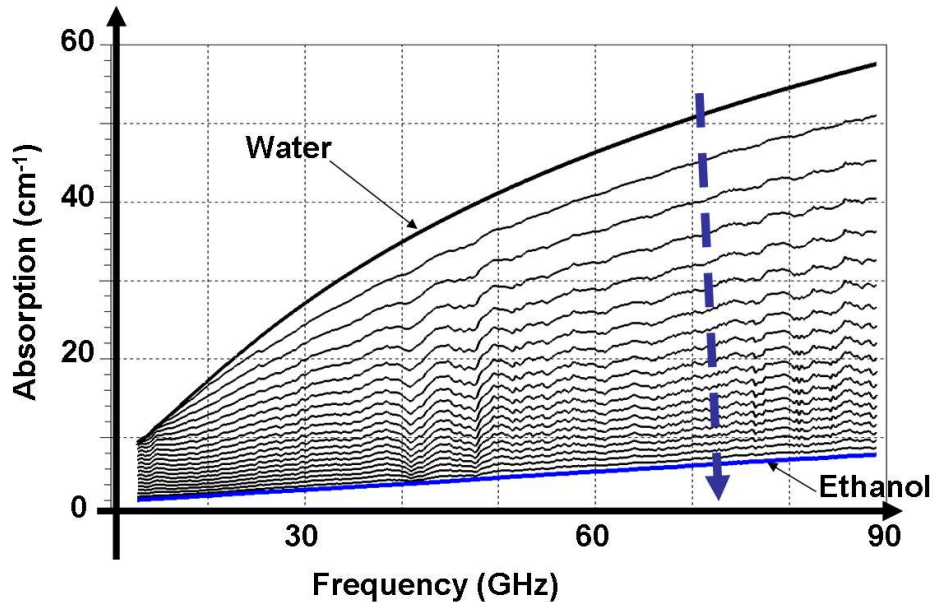


Fig. 3.23 – Absorption des mélanges eau/éthanol en fonction de la fréquence et de la concentration en éthanol. La flèche indique le sens croissant de volume d'éthanol, par pas de 5%.

De la même manière, des mesures sur des solutions eau/propanol et eau/isopropanol ont été réalisées. L'absorption de ces solutions en fonction de la fraction volumique d'alcool est donnée en Figure 3.24. Comme attendu d'après des mesures "macroscopiques" [135], l'absorption de l'isopropanol pur est trouvée inférieure à celle du propanol pur, elle-même inférieure à celle de l'éthanol pur.

Il est également possible de calibrer le dispositif et, comme pour le cas des mélanges eau/éthanol, de donner l'absorption de chaque mélange en fonction de la concentration et de la fréquence. Ces données sont reportées dans les Figures 3.25 et 3.26. Les modèles utilisés pour la calibration du propanol et de l'isopropanol sont de type Debye et proviennent de la littérature [15, 135].

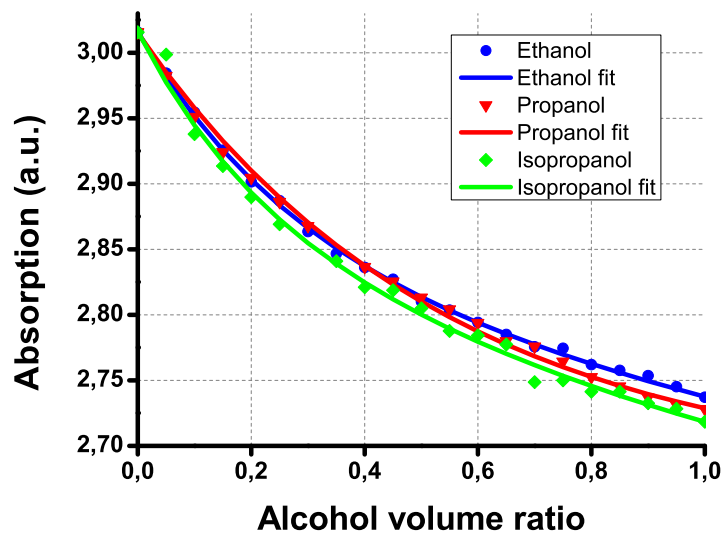


Fig. 3.24 – Absorption des mélanges eau/éthanol, eau/propanol et eau/isopropanol en fonction de la fraction volumique d'alcool. Fréquence : 95GHz.

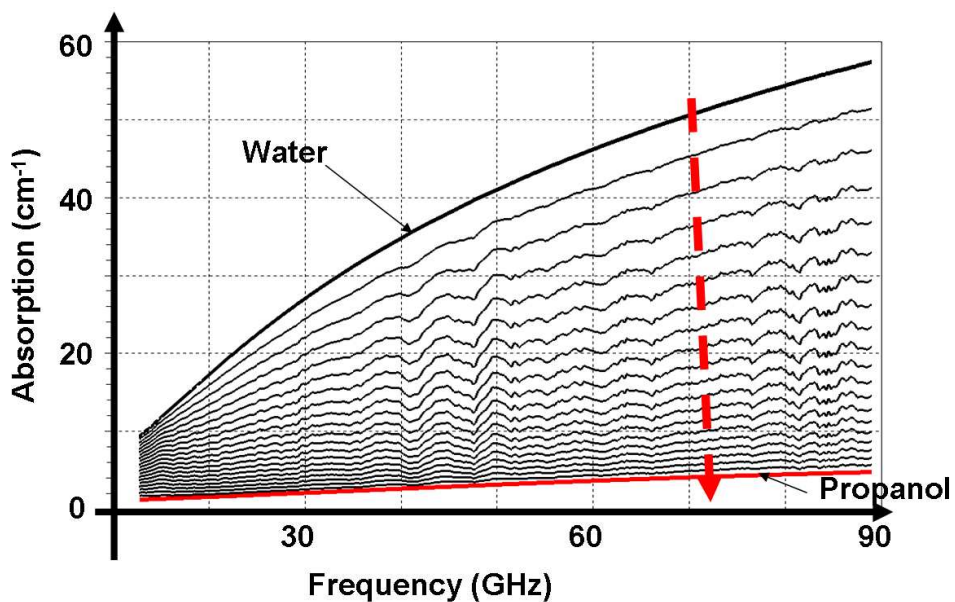


Fig. 3.25 – Absorption des mélanges eau/propanol en fonction de la fréquence et de la concentration en propanol. La flèche indique le sens croissant de volume de propanol, par pas de 5%.

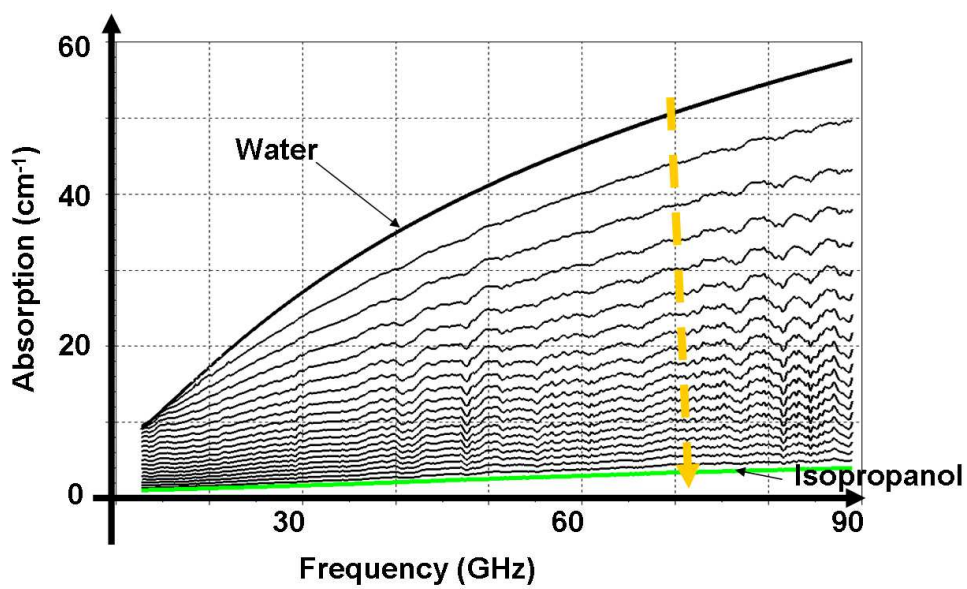


Fig. 3.26 – Absorption des mélanges eau/isopropanol en fonction de la fréquence et de la concentration en isopropanol. La flèche indique le sens croissant de volume d’isopropanol, par pas de 5%.

## **B Caractérisation de l'hydratation par chimométrie**

La caractérisation de l'hydratation précédemment réalisée est basée sur un modèle de la littérature à 3 composantes, concevant l'eau d'hydratation comme une entité unique. Cependant, au vu des résultats de la section précédente, notamment en dynamique moléculaire, il semble raisonnable de penser qu'elle soit elle-même multiple. Le modèle à 3 composantes est probablement restrictif. La suite de l'étude tentera de caractériser l'hydratation des molécules d'alcool en limitant l'utilisation d'*a priori* théoriques (ici le nombre d'espèces postulé *a priori*), compensés par une meilleure utilisation du jeu de données. Les solutions eau/alcool seront désormais considérées comme étant constituées de  $n$  composés de signatures spectrales distinctes. Le spectre d'absorption d'une solution sera donc la somme de chaque signature spectrale, pondérée par la fraction respective du composé associé.

Mathématiquement,  $p$  solutions eau/éthanol de fraction d'éthanol variable sont mesurées sur une bande de fréquence donnée de  $f$  points. Le jeu de données est ainsi une matrice  $D$  ( $pxf$ ), chaque ligne correspondant au spectre d'une des solutions. Les objectifs de la suite sont :

- de déterminer le nombre  $n$  de composés dans les mélanges mesurés ;
- de déterminer la signature spectrale de chacun des composés ;
- de déterminer la concentration de chacun des composés dans chaque mélange mesuré.

Soit  $S^t$  ( $nx f$ ) la matrice comportant les signatures spectrales des  $n$  composés purs et  $C$  ( $pxn$ ) la matrice contenant les concentrations des composés purs dans les mélanges mesurés, la matrice  $D$  s'exprime alors théoriquement comme :

$$D = C.S^t \tag{3.26}$$

L'objet de la suite est donc de déterminer les matrices  $C$  et  $S^t$ . A ces fins, des algorithmes mathématiques de traitement de données vont être utilisés. Ils sont issus des études en chimométrie. Cette science regroupe les outils et méthodes mathématiques permettant une analyse avancée de résultats expérimentaux chimiques [136, 137]. Les méthodes qui seront utilisées dans la suite sont des méthodes bien connues et utilisées en spectroscopie de type vibrationnelle [138, 139, 140].



## 1 Prétraitement des données

Avant d'appliquer les algorithmes de chimiométrie aux données mesurées, une pré-analyse de ces données est menée. Le spectre d'absorption<sup>9</sup> extrait pour chaque solution est présenté en Figure 3.27-A1. Il représente l'absorption en unité arbitraire (équation 3.23).

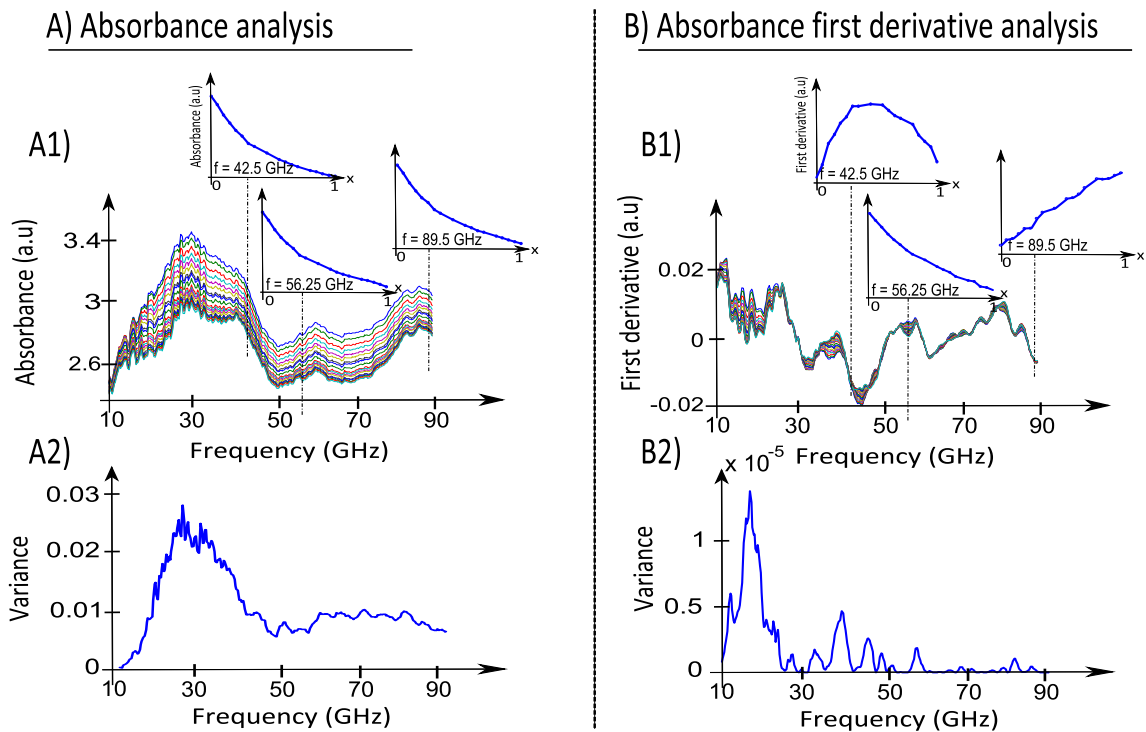


Fig. 3.27 – Analyse des spectres d'absorption mesurés ainsi que de leur dérivée.  $x$  est la fraction volumique d'éthanol

La Figure 3.27-A1 met en évidence que l'augmentation de la fraction volumique d'éthanol  $x$  entraîne une décroissance globale (variance globale) de l'absorption sur tout le domaine de fréquence. En effet, les relevés de l'absorption en fonction de  $x$  présentés en insert pour  $f = 42.5\text{GHz}$ ,  $f = 56.25\text{GHz}$ , et  $f = 89.5\text{GHz}$  montrent une décroissance identique en toute fréquence. Ainsi, il est difficile de trouver des fréquences discriminantes, et des doutes peuvent être émis quant à l'intérêt d'utiliser d'analyser tout le domaine de fréquence plutôt qu'une fréquence unique comme dans la partie précédente.

<sup>9</sup>Il ne s'agit pas rigoureusement du spectre d'absorption pur du mélange dans le BioMEMS, mais d'une convolution entre le spectre d'absorption du mélange et de la fonction d'instrument du dispositif BioMEMS lui-même. En effet, par le biais de réflexions multiples au sein du dispositif, des zones sont amplifiées, comme autour de 30GHz. Ceci n'est cependant pas gênant car cette convolution est *a priori* la même pour tous les mélanges.

Cette affirmation est confirmée par l'observation en Figure 3.27-A2 de la variance entre les différents mélanges en fonction de la fréquence : celle-ci apparaît quasiment constante au-delà de 40GHz et ne présente pas de zone de fréquences privilégiées.

Une solution pour s'affranchir de la variance globale pouvant masquer des informations fréquentielles pertinentes est de dériver les spectres d'absorption obtenus. Cette opération est réalisée par un algorithme de Savitzky et Golay [141] sur 15 points<sup>10</sup> à l'ordre 2. Les spectres dérivés sont donnés en Figure 3.27-B1, et la variance correspondante en 3.27-B2. Les inserts montrent alors que différents comportements des spectres sont observés à différentes fréquences et qu'il n'y a plus de variance globale verticale dans le jeu de données. La courbe de variance met en avant des zones privilégiées et donc des fréquences éventuellement discriminantes. Ce jeu de données a cependant également des travers : l'information contenue dans la variance globale est ici perdue, et l'interprétation physique des spectres dérivés est plus complexe que celle des absorptions.

L'utilisation des outils chimiométriques pourra donc s'effectuer sur deux jeux de données aux propriétés différentes :

- celui de l'absorption, dans lequel l'information principale semble résider dans une variance globale et verticale des spectres et pouvant masquer des fréquences discriminantes ;
- celui des absorptions dérivées, dans lequel la variance globale est supprimée au profit de variances locales à des fréquences discriminantes.

## **2 Analyse en composante principale**

Avant de décomposer notre jeu de données, il faut dans un premier temps estimer le nombre d'espèces indépendantes  $n$  en solution pour réaliser la décomposition de l'équation 3.26. Mathématiquement, cela revient à trouver le rang de la matrice  $D$ . Théoriquement, la détermination du rang d'une matrice est quelque chose de connu et ne pose pas de problème particulier dans le cas d'une décomposition de type 3.26. Cependant, la matrice  $D$  étant issue de mesures, elle est forcément bruitée et la décomposition à réaliser est en réalité de type :

$$D = C.S^t + E \quad (3.27)$$

---

<sup>10</sup>L'idée est de réaliser une dérivé tout en évitant l'amplification du bruit de mesure. Pour cela, grossièrement, en chaque point l'algorithme effectue une régression (fit) des données par un polynôme d'ordre 2, en considérant 7 points à gauche et à droite ; puis calcule la dérivée de ces données lissées.

où  $E$  est la matrice des résidus, correspondant au bruit de mesures. Dans ce cas, l'estimation du rang de  $D$  peut passer par l'utilisation de méthodes avancées de type "Analyse en Composante Principale" (PCA) [142]. Cet algorithme décompose le jeu de données en spectres indépendants (orthogonaux les uns aux autres) : du plus représenté dans le jeu de données, au plus minoritaire. Chaque spectre  $i$  obtenu ( $PC_i$  : "principal component  $i$ ") est associé à un poids (la "valeur propre  $\lambda_i$  : eigenvalue") qui traduit son importance, sa représentativité dans le jeu de données.  $PC_1$  est le spectre majoritaire,  $PC_2$  un spectre orthogonal moins représenté, etc... Ainsi, la suite des  $\lambda_i$  est nécessairement décroissante. Il convient ici de notifier que chaque spectre  $PC_i$  ne correspond pas au spectre d'une espèce en solution (l'eau, l'éthanol...) mais juste, mathématiquement, à des spectres indépendants et récurrents dans le jeu de données. Ils sont donc probablement non-physiques mais vont permettre d'analyser le nombre de composantes indépendantes dans le jeu de données. En effet, l'Analyse en Composante Principale des mesures est donnée en Figure 3.28. Pour chaque composante, le poids en pourcentage est représenté. En raison du bruit, le nombre de composantes  $PC_i$  pouvant être calculé est infini. Toutefois, l'évolution du logarithme du poids  $\lambda_i$  des composantes en fonction de  $i$  représentée en Figure 3.29-A montre une cassure de pente à  $i = 4$ . Ce critère est généralement employé pour séparer les composantes qui sont propres à l'échantillon mesuré et celles liées au bruit. Ainsi, suite à l'analyse en PCA, il semble que le jeu de données soit composé de 4 espèces indépendantes, et donc que le rang de  $D$  soit 4. Ceci-dit, ce nombre de quatre est une estimation et n'est pas, à ce stade de l'étude, une vérité tranchée. Il conviendra par la suite de tester les valeurs voisines, 3 et 5, et de vérifier si elles peuvent également convenir.

### **3 Décomposition de type MCR-ALS**

Il s'agit désormais, après avoir estimé le nombre  $n$  de composés présents en solution, de déterminer le spectre d'absorption de chacun d'entre eux et de déterminer l'évolution de leur concentration dans les différents mélanges eau/éthanol. Pour cela, la technique de résolution choisie est MCR-ALS [143, 144, 145]. C'est une méthode itérative qui permet, à partir de la connaissance de  $n$  et de contraintes réglables (ici : non-négativité des concentrations), de trouver la décomposition de l'équation 3.27. Dans un premier temps, son application aux spectres dérivés sera présentée et confirmera le choix de  $n = 4$ . Ensuite, l'analyse des spectres non dérivés permettra de déterminer la signature spectrale de chaque composé et de leur donner une interprétation physique.

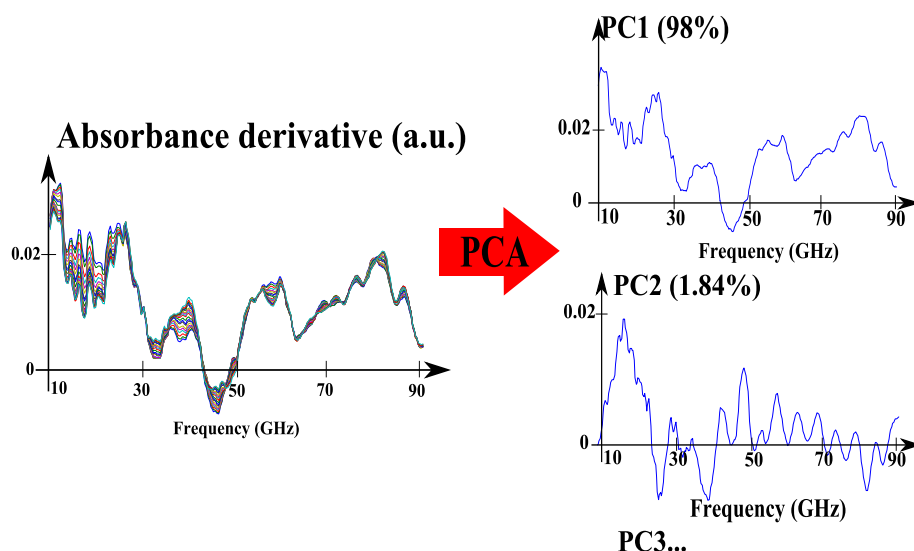


Fig. 3.28 – Analyse PCA sur spectres dérivés. Visualisation du jeu de données et des composantes principales PC1 et PC2.

L'analyse par MCR-ALS des spectres dérivés a été menée pour  $n = 3$  et  $n = 4$ . Les résultats de la décomposition sont données en Figure 3.29. La seule contrainte donnée *a priori* est la non-négativité des éléments appartenant à la matrice  $C$  des concentrations. En Figure 3.29-B1 présentant la résolution à  $n = 3$ , l'évolution des concentrations des espèces avec la fraction volumique d'éthanol montre une espèce 1 dont la concentration décroît non linéairement, une espèce 2 dont la concentration croît linéairement et une espèce intermédiaire 3 dont l'évolution en concentration est non monotone. Ces observations laissent à penser que l'espèce 1 est l'eau bulk, l'espèce 2 est l'éthanol et l'espèce 3 est l'eau d'hydratation. Les spectres dérivés correspondant à chacune des espèces sont donnés dans la même figure (matrice  $S'$ ). Les résidus, qui correspondent à la matrice  $E$  de l'équation 3.27, sont également représentés. Ils représentent un signal non informatif, correspondant généralement au bruit blanc gaussien de mesure, de moyenne nulle. L'observation approfondie des matrices  $C$ ,  $S'$  et  $E$  montre cependant quelques incohérences : (i) pour une fraction d'éthanol de 100%, il reste une proportion non négligeable d'espèce 3 et (ii) la matrice  $E$  montre des pics qui semblent informatifs (A et B).

La décomposition du jeu de données en 4 composantes est alors menée en Figure 3.29-B2. La matrice  $C$  présente alors, comme dans le cas à trois composantes, une espèce dont la concentration décroît et une espèce dont la concentration croît avec la fraction volumique d'éthanol (l'eau bulk et l'éthanol). En revanche, l'espèce intermédiaire 3 dont l'évolution était non monotone semble se subdiviser en 2 espèces : 3' et 3''. Ce choix de

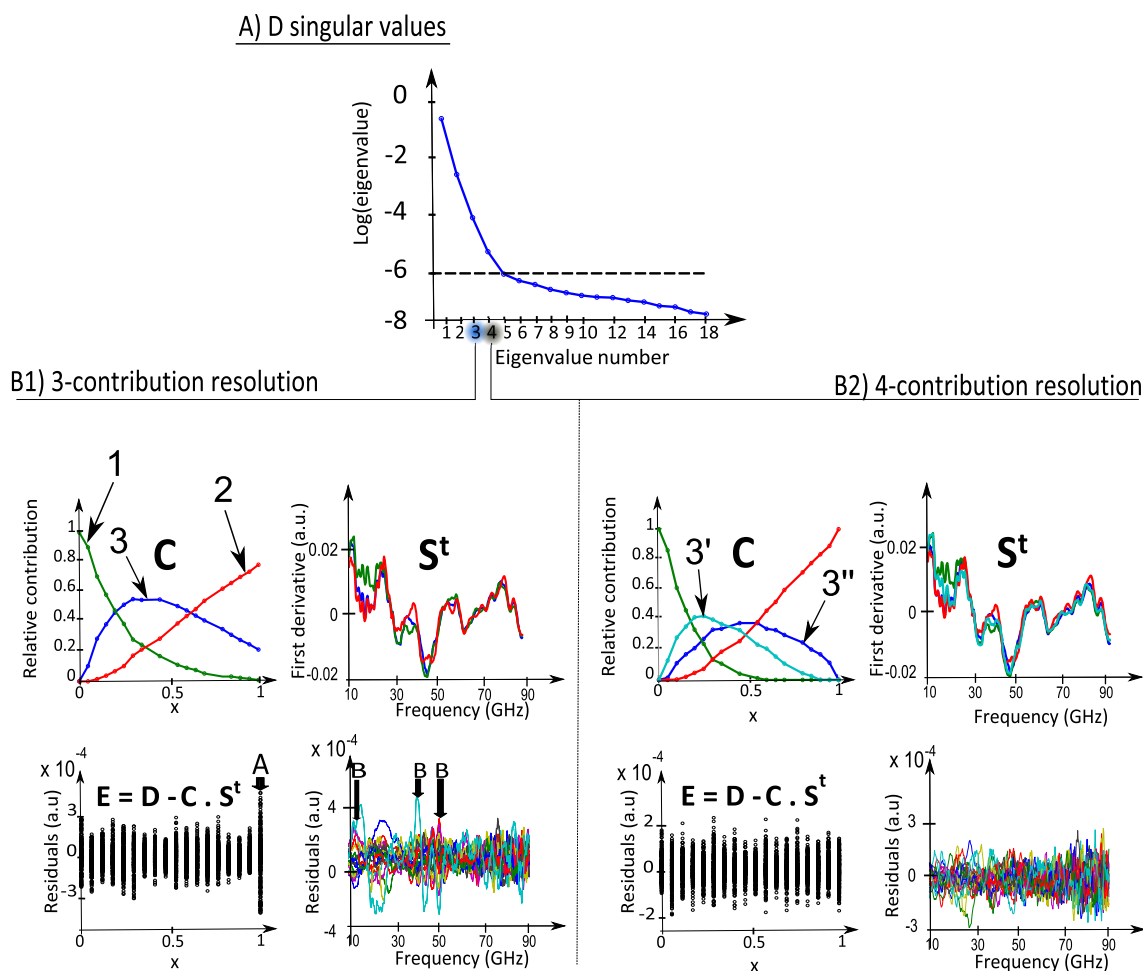


Fig. 3.29 – A - Valeurs propres de la matrice  $D$  : choix du nombre de composantes. B - Résolution MCR-ALS du jeu de données pour  $n = 3$  et  $n = 4$ .

$n = 4$  semble mener à une décomposition plus réaliste car elle permet de supprimer les incohérences observées avec  $n = 3$  : (i) pour une fraction d'éthanol de 100%, seule l'espèce 2 est observée et (ii) la matrice des résidus ne présente plus les pics informatifs A et B. Il semblerait donc que le comportement de la couche d'hydratation ne soit donc pas unique mais dual. Cela doit être rapproché des résultats trouvés lors de l'analyse univariée de l'éthanol. En effet, les résultats en Dynamique Moléculaire (Figure 3.12 représentant la fonction  $g(r)$ ) avaient montré que l'eau d'hydratation était composée de deux couches. L'analyse en terme de nombre d'hydratation avait montré que la première couche était composée de molécules d'eau dont l'absorption était négligeable. En revanche, en prenant une valeur d'absorption de la couche d'hydratation égale à 0.72 fois celle de l'eau bulk, il avait été montré que les deux couches étaient prises en compte. 0.72 était donc probablement une "absorption moyenne" de l'eau d'hydratation, masquant probablement

un comportement dual, ici observé par méthode MCR-ALS.

La décomposition a ici été menée sur les spectres d'absorption dérivés et a permis d'exploiter les changements subtils au sein du spectre d'absorption<sup>11</sup>. En revanche, elle présente des inconvénients en terme d'interprétation des spectres obtenus. La matrice  $S^t$  est en effet composée de spectres dérivés dont l'interprétation n'est pas aisée. C'est pourquoi la méthode MCR-ALS a ensuite été appliquée aux spectres d'absorption non dérivés. Les résidus, non présentés, donnent un comportement identique à ceux obtenus par l'analyse des spectres dérivés : ils semblent moins informatifs pour  $n = 4$  que  $n = 3$ . La matrice  $S^t$  obtenue dans les deux cas ( $n = 3$  et  $n = 4$ ) est présentée en Figure 3.30. L'espèce dont l'absorption est la plus haute est l'eau, celle dont l'absorption est la plus faible est l'éthanol. En position intermédiaire se situe la couche d'hydratation. Dans le cas où la décomposition à  $n = 4$  est effectuée, une partie de la couche d'hydratation (3'') a une absorption très proche de celle de l'éthanol et une autre partie (3') a une absorption intermédiaire. En terme d'interprétation, et au regard des résultats de Dynamique Moléculaire, la composante 3'' de l'eau d'hydratation pourrait correspondre à la première couche d'hydratation (les molécules d'eau au voisinage direct de l'éthanol) alors que la composante 3' correspondrait à la deuxième couche d'hydratation (deuxième pic de la fonction  $g(r)$ ).

Afin de valider ces hypothèses, une analyse indépendante et approfondie en Dynamique Moléculaire a été menée. Pour différentes fractions volumiques d'éthanol, le nombre de molécules d'eau bulk, d'éthanol, d'eau dans la première couche d'hydratation et d'eau dans la deuxième couche d'hydratation ont été calculés. La détermination du nombre de molécules d'eau dans la première ou seconde couche d'hydratation s'effectue par le calcul de l'intégrale de la fonction  $g(r)$ , sous le premier pic ou sous le deuxième pic. Ainsi, les molécules d'eau appartenant à la première et à la seconde couche d'hydratation peuvent être dénombrées séparément. Les résultats de cette investigation sont donnés en Figure 3.31 qui représente l'évolution des populations en fonction de la fraction d'éthanol. La ressemblance avec les données extraites des mesures par techniques chimométriques est forte (Figure 3.29-B2). Ce très bon accord valide donc le microsysteme, le protocole de mesure et les résultats de PCA et MCR-ALS.

Les conclusions qui se dégagent de ces études interdisciplinaires sont donc : (i) la spectroscopie réalisée dans le dispositif permet de mettre en évidence plus de deux es-

---

<sup>11</sup>La décomposition a été également menée pour  $n = 5$ , mais n'a pas conduit à une amélioration significative de la matrice des résidus. Dans ce cas, la décomposition en 5 entités est une surmodélisation.

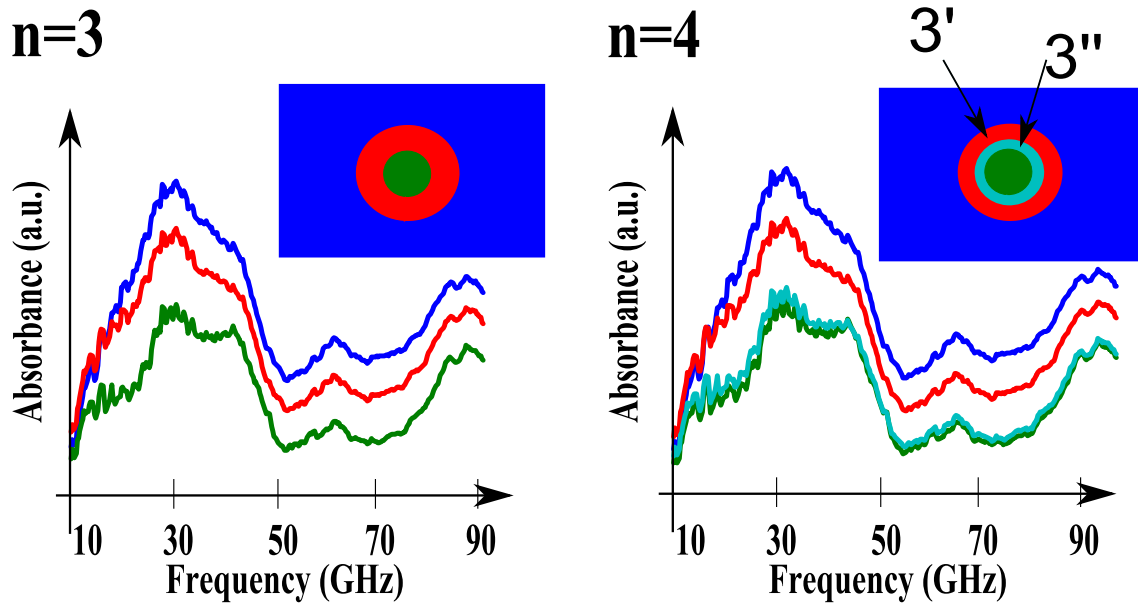


Fig. 3.30 – Décomposition MCR-ALS des spectres non dérivés et interprétation de la dualité de la couche d'hydratation.

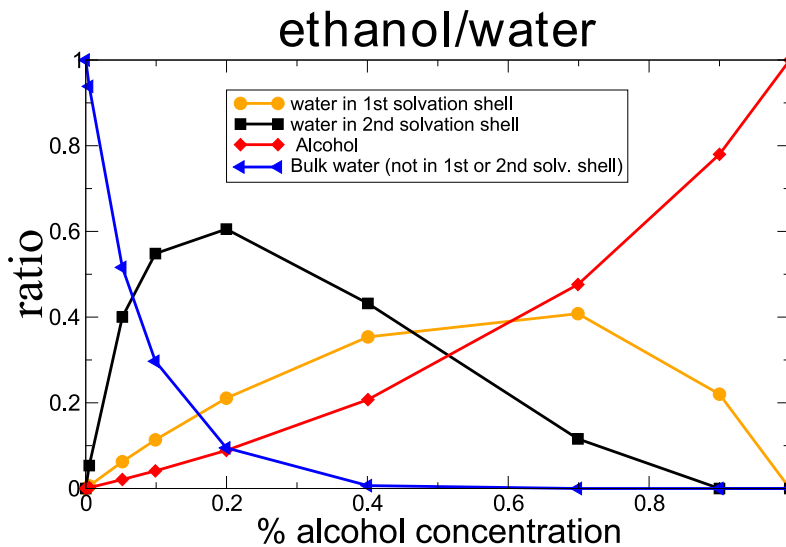


Fig. 3.31 – Calcul du nombre de molécules d'eau, d'hydratation (1ère et 2nde couches) et d'éthanol en fonction de la fraction d'éthanol. Résultats de Dynamique Moléculaire.

pièces en solution et sonde ainsi l'eau d'hydratation ; (ii) cette eau d'hydratation est elle-même duale dans la gamme de fréquence investiguée : une partie absorbe très peu et est directement liée à l'éthanol, une autre plus éloignée présente une absorption intermédiaire. La décomposition MCR-ALS a aussi été réalisée sur les spectres des mesures

eau/propanol et eau/isopropanol qui ont mené aux mêmes conclusions. Il faut garder à l'esprit que la démarche de MCR-ALS repose sur l'hypothèse d'une décomposition linéaire des spectres d'absorption mesurés. Les algorithmes de chimiométrie ne font qu'exploiter au maximum, mathématiquement, les jeux de données obtenus. Il faut les compléter par des analyses physiques afin de tester la validité des interprétations avancées. A ce titre, des analyses en Dynamique Moléculaire ont été menées et ont validé la démarche utilisée. Ainsi, le trio "Mesures Lab-on-Chip intégrées" + "Analyses Chimiométriques" + "Dynamique Moléculaire" semble être une approche adaptée au traitement de phénomènes complexes dans les liquides. La chimiométrie permet de traiter avec efficacité des jeux de données multiparamétriques (concentration, fréquence) complexes et la dynamique moléculaire donne une assise physique aux résultats obtenus.

### **C Conclusion intermédiaire**

Les expérimentations réalisées dans ce chapitre ont permis de montrer que le micro-système fluide précédemment développé permettait la mesure de l'absorption de liquides dans la bande de fréquences sub-THz. De plus, une analyse quantitative de ces échantillons est possible et ainsi, le nombre d'hydratation de l'éthanol a ainsi pu être estimé à partir d'une spectroscopie en fréquence et en concentration au sein du dispositif. De même, l'extension de la couche d'hydratation a été mesurée et donne un résultat en très bon accord avec des investigations en Dynamique Moléculaire.

Par un effort d'optimisation du protocole expérimental et de recherche de variabilités, les performances en reproductibilité et sensibilité du dispositif ont été améliorées et une concentration en éthanol de 2mg/mL a pu être détectée dans le microcanal. Cette sensibilité sera confirmée et discutée dans la suite de ce manuscrit. Ces améliorations ont permis d'appliquer des algorithmes de chimiométrie aux spectres mesurés afin d'extraire un maximum d'information des mesures effectuées et d'améliorer notre connaissance des échantillons. Les spectres d'absorption des mélanges eau/alcool ont ainsi pu être décomposés, sans modèle *a priori* comme étant la somme de l'absorption de l'alcool, de l'eau bulk, et de deux composantes d'eau d'hydratation. Ainsi, au-delà du rôle de capteur reproductible et sensible, le micro-système développé, couplé à des méthodes de chimiométrie et de dynamique moléculaire, s'avère être un outil quantitatif pour la compréhension de phénomènes physiques au sein de solutions liquides. D'un point de vue général, la chimiométrie est l'outil d'analyse dual du Lab-on-chip permettant la réalisation intégrée



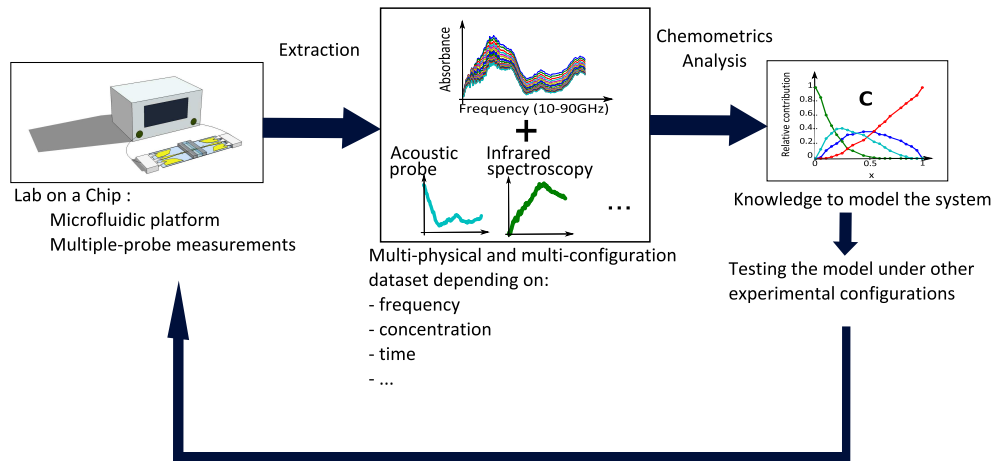


Fig. 3.32 – Couplage de mesures intégrées et d’algorithmes chimiométriques pour la caractérisation d’échantillons liquides

de mesures multi-paramétriques (concentration, température, pH...) et multi-physiques (électromagnétiques, optiques, acoustiques...) d’échantillons liquides. Cette dualité est illustrée en Figure 3.32 qui montre comment ces deux entités peuvent s’associer en cycle pour l’amélioration de la caractérisation des échantillons.

La capacité de réaliser une spectroscopie quantitative dans le microsysteme étant établie, il convient désormais de s’intéresser à son application à des systèmes d’intérêt biologique. C’est l’objet de la section suivante dans lequel le microsysteme est utilisé pour sonder des protéines en solution.

### **III Investigations sur protéines**

La Partie 2 s'est attachée à décrire la fabrication du microsysteme. En Partie 3, sa capacité à mener une analyse quantitative sur des mélanges eau/alcool a été démontrée et une analyse approfondie de la notion d'hydratation a été menée. Sur la base de ces résultats, il convient désormais de s'intéresser à des objets d'intérêt en biologie. Cette section s'attache donc à caractériser des solutions aqueuses de protéines au sein du microsysteme.

En comparaison avec des mélanges eau/alcool, la solubilité des protéines est faible et pose des contraintes supplémentaires en terme de sensibilité. Elles seront adressées dans un premier temps. Puis, des mesures d'absorption sur des solutions aqueuses de lysozyme, BSA et chymotrypsine seront menées. Leur exploitation permettra alors la caractérisation de l'état de ces protéines, par le calcul du nombre d'hydratation.

#### **A Sensibilité des mesures sur protéines**

Afin de transposer les résultats et méthodes obtenus avec les mélanges hydro-alcooliques à des échantillons biologiques, des investigations ont été menées sur des solutions aqueuses de protéines. De même que dans la partie précédente, l'analyse des données sera basée sur l'analyse des spectres d'absorption obtenus avec le microsysteme, suivant l'évolution d'un paramètre telle la concentration en protéine.

##### **1 Solubilité des protéines dans l'eau**

Dans le cas des solutions eau/alcool, il est possible de balayer une large gamme de concentration de l'eau pure à l'alcool pur. C'est ce qui a été effectué lors de la section précédente, par pas de rapport volumique. Cette possibilité s'explique par le fait que alcools et eau sont des solvants miscibles. Le cas des solutions aqueuses de protéines est cependant différent. En effet, en augmentant progressivement la masse de protéine dissoute dans une solution d'eau, il est possible d'augmenter progressivement la concen-

tration massique en protéine de la solution. Cependant, au bout d'une certaine masse à dissoudre, la limite de solubilité de la protéine est atteinte. Ainsi, la gamme de concentrations de solutions eau/protéines est limitée en valeur haute. Cette gamme est d'ailleurs encore restreinte par le fait que pour des valeurs proches et inférieures à la limite de solubilité, les solutions aqueuses de protéines deviennent très visqueuses et inadaptées à une spectroscopie en microcanaux.

Les protéines ici considérées seront l'Albumine de Sérum Bovin (BSA), la lysozyme et la chymotrypsine. Ce choix se justifie par leur utilisation courante en biochimie, leur facilité de manipulation et par le fait que de nombreuses données les concernant sont disponibles dans la littérature. De plus, elles présentent des structures différentes (hélices/feuilletés). Pour ces protéines, la limite de solubilité dans l'eau obtenue expérimentalement est de quelques centaines de milligrammes par millilitre. Ainsi dans les mesures à venir, les concentrations de solutions de protéines seront limitées à 100mg/mL<sup>12</sup>. Pour appréhender qualitativement cette limite, un calcul rapide de la concentration molaire de l'eau dans une solution aqueuse de protéine à  $c = 100\text{mg/mL}$  donne :

$$[H_2O] = \frac{m_{H_2O}}{M_{H_2O}V} = \frac{m_{tot} - cV}{M_{H_2O}V} = \frac{\rho - c}{M_{H_2O}} \sim 50\text{mol/L} \quad (3.28)$$

où  $M_{H_2O} = 18\text{g/mol}$  est la masse volumique de l'eau,  $V$  le volume de solution,  $\rho \sim 1\text{kg/L}$  la masse volumique de la solution,  $m_{H_2O}$  la masse d'eau en solution et  $m_{tot}$  la masse totale de la solution<sup>13</sup>. A titre de comparaison, l'eau pure a une concentration de 55,4 mol/L. En raison de la limite de solubilité des protéines, la fenêtre de concentration en eau disponible pour les analyses sur protéines, représentée en représenté en Figure 3.33, est donc fortement restreinte par rapport à celle des mélanges eau/alcool.

## 2 Premières mesures sur lysozyme

Afin de parvenir à des résultats quantitatifs sur les mesures sur protéines, la sensibilité sera donc un paramètre crucial dans le protocole expérimental. Des premières mesures sur lysozyme ont été effectuées dans le microsysteme, avec un microcanal de mesure de lar-

<sup>12</sup>Dans le cas de la lysozyme, une mesure sur solution de 180mg/mL sera présentée. C'est la seule qui dépassera la concentration de 100mg/mL.

<sup>13</sup>Ce calcul souffre de quelques approximations. Il considère que la densité de la solution aqueuse de protéine est de 1 et que la masse totale de la solution est égale à la somme des masses d'eau et protéines en solution. Cependant, il permet d'obtenir rapidement une valeur cohérente de la concentration en eau de la solution.

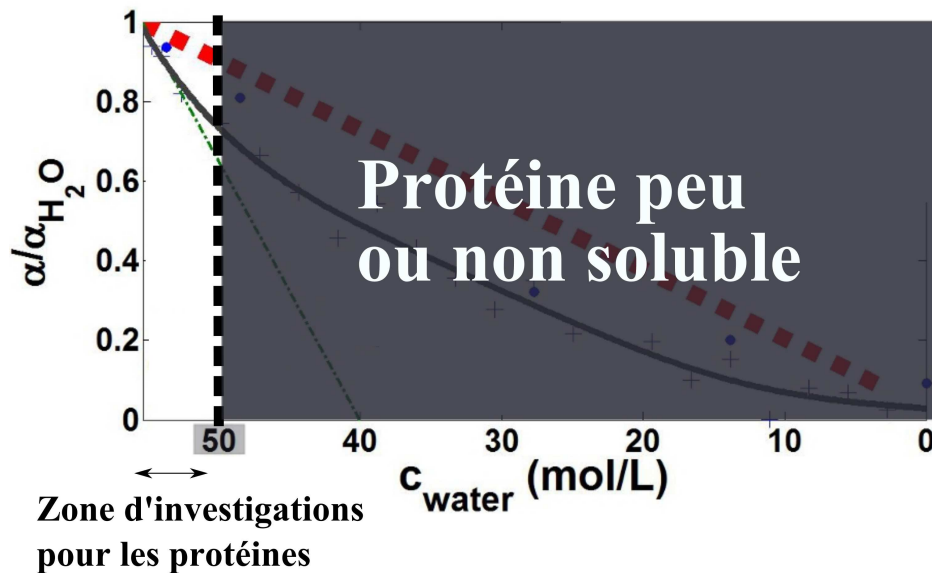


Fig. 3.33 – Zone d’investigations pour les mesures sur protéines. Restriction liée à la limitation en solubilité.

geur de  $50\mu\text{m}$  et avec le protocole de mesure initial pour les mesures sur eau/éthanol<sup>14</sup>. La mesure du paramètre  $S_{21}$  est donnée en Figure 3.34 et permet la détection d’une concentration massique de lysozyme de  $100\text{mg/mL}$ . Elle permet de montrer que la présence de protéine en solution peut être sondée par le microsysteme. En revanche, une sensibilité supérieure est nécessaire afin d’espérer pouvoir réaliser une analyse quantitative des solutions.

### 3 Augmentation de la largeur des canaux

Initialement, la largeur  $L$  du canal de mesure au sein du microsysteme avait été fixée à  $50\mu\text{m}$ . La raison évoquée était de limiter la taille des échantillons afin de limiter l’absorption de l’onde et de permettre l’analyse en transmission. Toutefois, en raison de la dépendance en  $\exp(-\alpha L)$  du signal transmis et à condition de rester dans la dynamique de détection de l’analyseur de réseau, l’augmentation de la largeur des microcanaux devrait conduire à une augmentation de sensibilité. Grâce à la versatilité du procédé technologique, des microsystemes possédant des canaux de mesure de  $50$ ,  $75$  et  $200\mu\text{m}$  ont ainsi été fabriqués. Afin de valider l’hypothèse d’augmentation de la sensibilité, la différence de transmission  $\Delta S_{21}$  entre les microcanaux remplis d’eau ou d’éthanol a été mesurée en fonction de la largeur du canal et est représentée en Figure 3.35. La linéarité de l’évolution de  $\Delta S_{21}$  (dB) en fonction de  $L$  représentée à  $80\text{GHz}$  confirme l’accroissement de sensibi-

<sup>14</sup>Moyennage de 30, ordre aléatoire d’injection et mesure de l’eau pour vérification de la référence.

lité proportionnel à la largeur du canal de mesure. Dans la suite, les microsystèmes avec un canal de mesure large de  $200\mu\text{m}$  seront utilisés afin d'augmenter le seuil de détection de protéines.

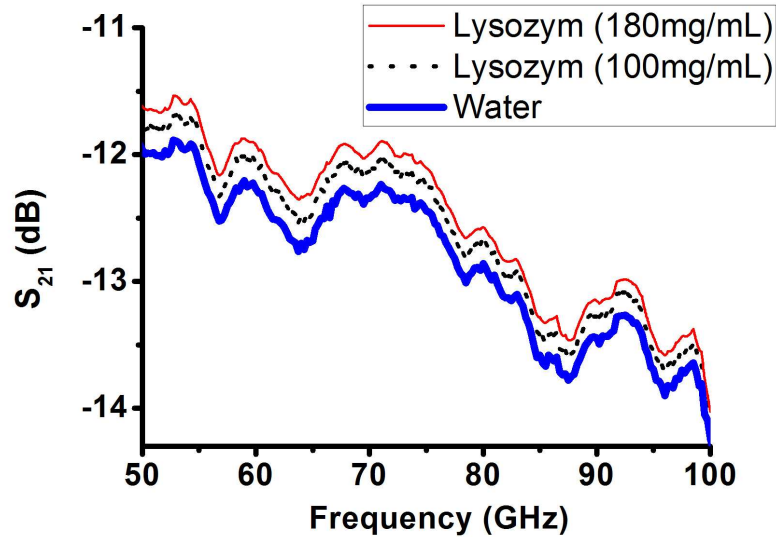


Fig. 3.34 – Transmission de solutions eau/lysozyme en fonction de la fréquence pour des concentrations de 100 et 180mg/mL. Limite de sensibilité à 100mg/mL.

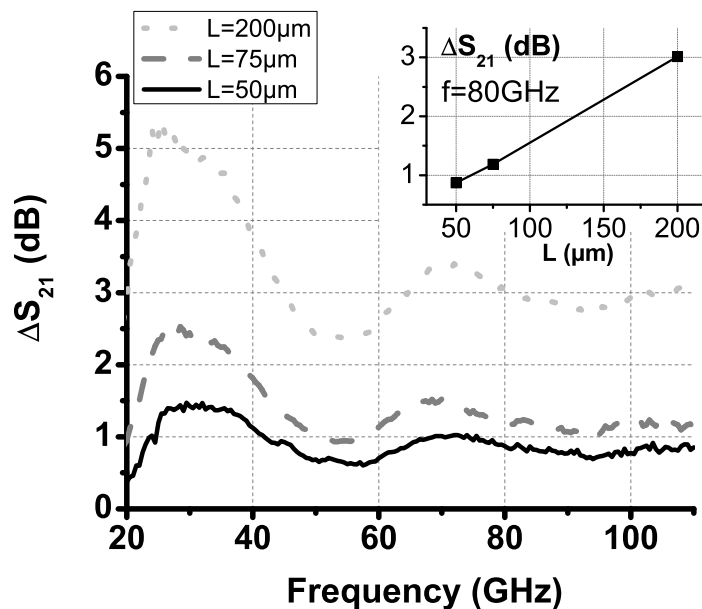


Fig. 3.35 – Ecart de transmission entre eau et éthanol en fonction de la fréquence pour différentes largeurs de canal. Insert : Evolution linéaire de l'écart en fonction de la largeur  $L$  à 80GHz.

#### 4 Mesures sur protéines

Avec ces nouveaux dispositifs, des mesures sur des solutions aqueuses de lysozyme, chymotrypsine et BSA ont été menées. Afin d'optimiser la sensibilité, la stratégie de mesure développée dans le chapitre précédent (moyennage 200 et compensation des décalages de l'eau) a également été utilisée.

L'absorption à 100GHz des différentes solutions mesurées est représentée en Figure 3.36 en fonction de la concentration massique et de la fréquence. Comme attendu, une décroissance de l'absorption de la solution avec l'augmentation de la concentration de protéines est observée, correspondant à une diminution du nombre de molécules d'eau excitées. Le seuil de détection pour les protéines est ici de 5mg/mL pour la BSA et de 10mg/mL pour la lysozyme et la chymotrypsine. Ce résultat est significatif car il dépasse les limites de la littérature dans le cas d'investigations THz en microcanaux<sup>15</sup>. En effet, George *et al.* parvenaient à détecter 100mg/mL de BSA et Kitagawa *et al.* détectaient 50mg/mL de protéines en solution [93, 96].

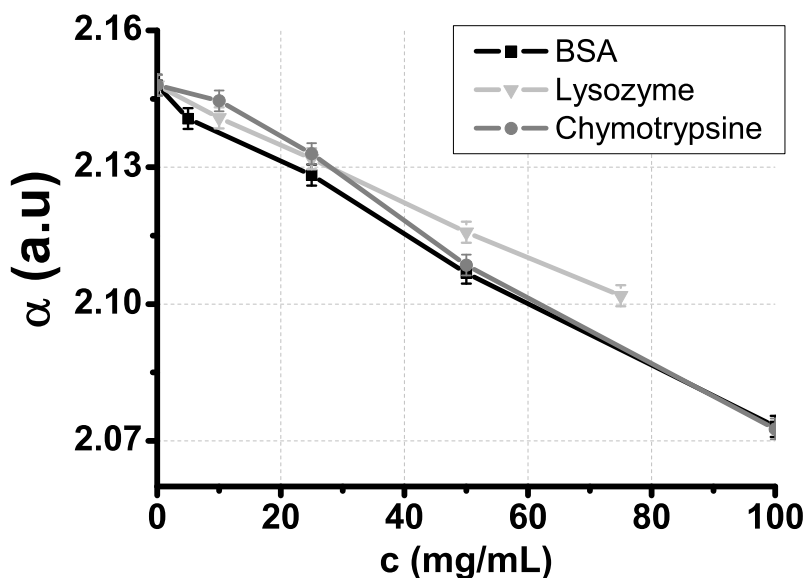


Fig. 3.36 – Absorption des solutions eau/protéine en fonction de la concentration massique pour la BSA, la lysozyme et la chymotrypsine. Fréquence : 100GHz.

<sup>15</sup>Ces sensibilités sont cohérentes avec celle de 2mg/mL déterminée dans le chapitre précédent pour les solutions eau/alcool.

Dans le cas présent, il est impossible en regardant l'absorption à une seule fréquence d'abaisser encore le seuil de détection de la lysozyme et la chymotrypsine. La Figure 3.37 illustre le cas de la lysozyme. Les courbes d'absorption correspondant aux concentrations de 5 et 10mg/mL se recoupent et il paraît difficile de discriminer de manière certaine les deux concentrations.

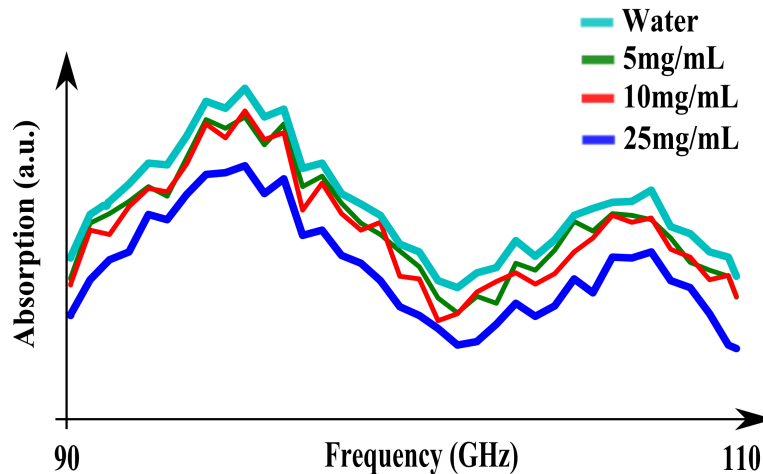


Fig. 3.37 – Absorptions des solutions eau/lysozyme en fonction de la fréquence pour des concentrations massiques de protéines de 0, 5, 10 et 25mg/mL. Confusion entre les courbes à 5 et 10mg/mL.

Toutefois, l'observation fine des spectres d'absorption semble montrer que : "sur la gamme de fréquence étudiée, l'absorption de la solution à 5mg/mL est plus souvent au-dessus qu'en dessous de celle de 10mg/mL". Cependant, cette affirmation qualitative ne permet pas de discriminer à coup sûr les deux concentrations. Il faut la rendre quantitative. Pour cela, une Analyse en Composante Principale des spectres d'absorption est effectuée. La composante principale 1 (PC1) du jeu des spectres d'absorption correspond à la forme globale de l'absorption, qui se reproduit pour chaque solution. En effet, le jeu de données ainsi que la PC1 sont représentés en Figure 3.38.

Au sein de l'absorption de chaque solution, la forme de PC1 est présente avec un certains poids (le "score"). La Figure 3.39 trace les poids en PC1 de chaque solution pour les différentes protéines. Le grandissement en insert montre que les solutions à 5mg/mL et 10mg/mL sont maintenant discriminées à coup sûr pour la lysozyme. Dans le cas de la chymotrypsine, la distinction est possible mais moins nette que la lysozyme. Il faut noter au passage que les poids représentés ne correspondent pas, en toute rigueur, à l'absorption

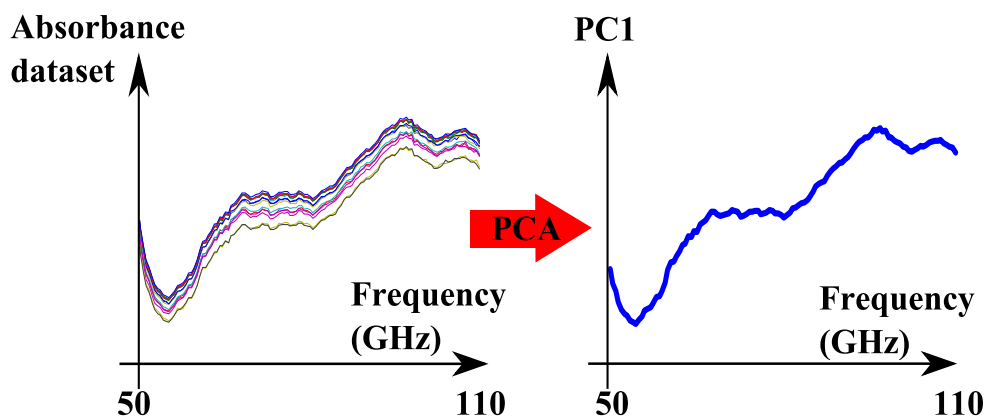


Fig. 3.38 – Jeu de données d’absorptions et première composante principale PC1 en fonction de la fréquence.

des solutions en unité arbitraire. Si ils peuvent être utilisés à des fins d’amélioration de détection/discrimination, ils ne peuvent cependant pas faire l’objet d’une analyse quantitative. Celle qui sera proposée dans les paragraphes suivants reposera ainsi sur les données mesurées représentées en Figure 3.36 pour une fréquence de 100GHz. Néanmoins, l’emploi d’un outil d’origine chimiométrique a permis d’amener la sensibilité du dispositif à 5mg/mL pour toutes les protéines, divisant ainsi par 10 la sensibilité en absorption des dispositifs microfluidiques THz rencontrés dans la littérature.

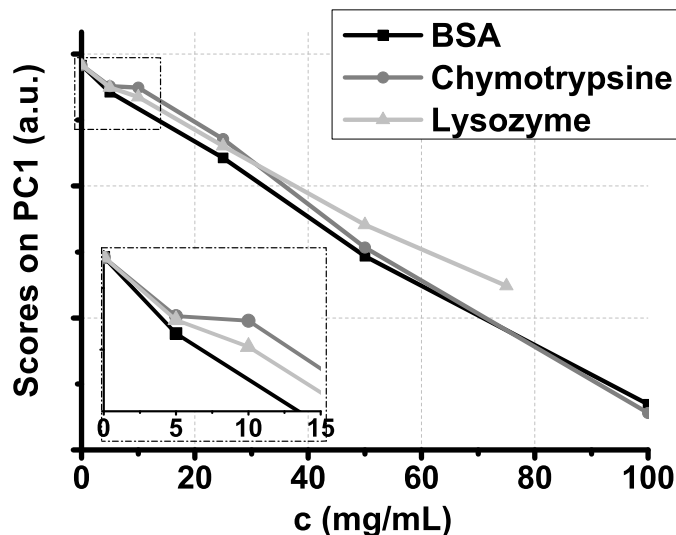


Fig. 3.39 – Poids en PC1 de chaque solution eau/protéine. Zoom sur les faibles concentrations pour voir la détection à 5mg/mL.



Considérant l'extension du champ électrique et les dimensions du canal, le volume de solution sondé par la ligne de Goubau est inférieur à  $V = 200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m} \times 200\mu\text{m} = 8.10^{-12}\text{m}^3$ . En terme de quantité de protéines BSA sondées, 5mg/mL dans le volume  $V$  permet d'atteindre un seuil de détection de BSA de 0.6 picomole au sein du système microfluidique. Comparé aux 10 picomoles atteints par George *et al.*, plus d'un ordre de grandeur a été gagné [93].

La sensibilité en concentration obtenue de 5mg/mL est du même ordre de grandeur que celle obtenue par les groupes utilisant des dispositifs de mesure "classiques" (non intégrés et non microfluidiques). Ainsi, le groupe de Martina Havenith obtient une sensibilité de l'ordre de 1mg/mL sur la protéine  $\lambda_{6-85}^*$  [24] et celui de Kevin Plaxco une sensibilité de l'ordre de 10mg/mL sur la lysozyme [146]. Sur des mélanges eau/alcool, le groupe de Peter Jepsen présente une sensibilité de l'ordre de 30mg/mL [147, 17]. Avec la protéine Subtilisin Carlsberg, mais dans un solvant organique (le dioxane), Mickan *et al.* distinguent des solutions concentrées à 2mg/mL [131]. Enfin, sur des solutions saccharose/eau, Arikawa *et al.* obtiennent une sensibilité de l'ordre de 60mg/mL [21].

## **B Etude de l'hydratation des protéines**

Grâce aux mesures précédemment effectuées, une analyse quantitative de l'hydratation des protéines va être menée. Afin de valider le jeu de données utilisé, une comparaison avec des données disponibles est d'abord effectuée effectuée.

### **1 Absorption normalisée des échantillons**

Dans un premier temps, les tracés de l'absorption normalisée  $\alpha/\alpha_{H_2O}$  des solutions investiguées sont donnés en Figures 3.40 et 3.41. A des fins de comparaison, la Figure 3.40-droite, extraite de l'article de Kitagawa *et al.*, donne ce même rapport pour les solutions BSA/eau et montre un très bon accord avec nos mesures [96]. En effet, les points à 100mg/mL et à 100GHz sont très comparables. La comparaison de ces figures permet visuellement de mettre en évidence le gain en sensibilité acquis dans l'étude présente.

Une fois le jeu de données validé, une analyse quantitative en terme de nombre d'hydratation est effectuée. En raison de la zone restreinte de concentration sondée (dûe à la solubilité des protéines), une méthode différente de celle utilisée pour l'éthanol est utilisée. Elle est décrite dans la suite.

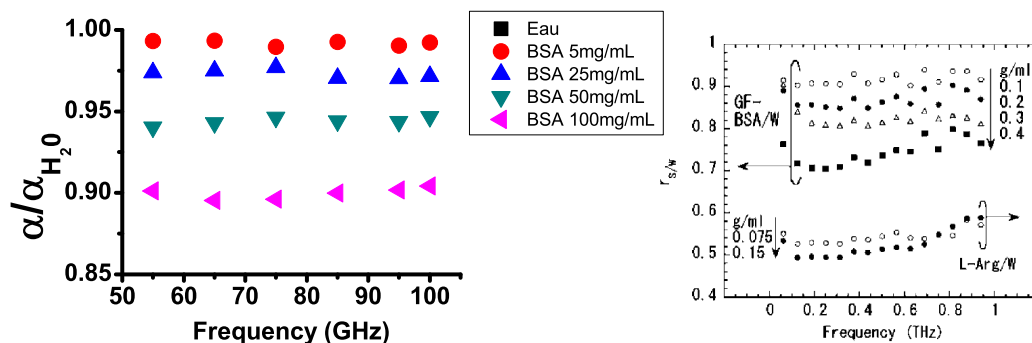


Fig. 3.40 – Gauche : Absorption normalisée des solutions eau/BSA en fonction de la fréquence et de la concentration. Droite : Comparaison avec les données de [96].

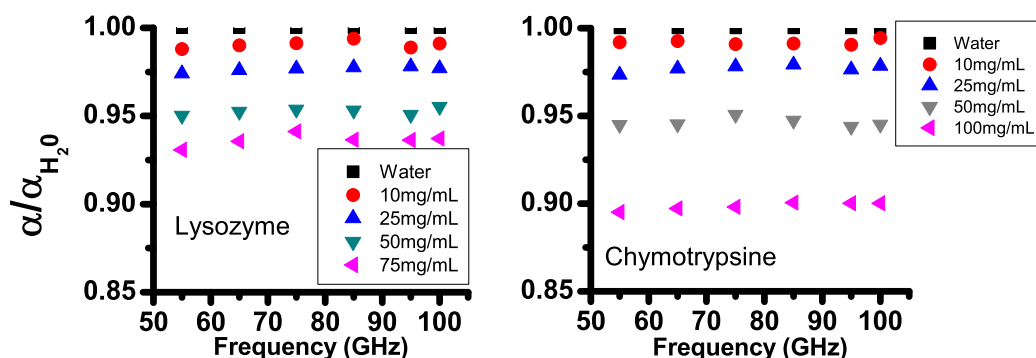


Fig. 3.41 – Gauche : Absorption normalisée des solutions eau/lysozyme en fonction de la fréquence et de la concentration. Droite : Absorption normalisée des solutions eau/chymotrypsine en fonction de la fréquence et de la concentration.

## 2 Nombre d'hydratation des protéines

### Méthode d'extraction du nombre d'hydratation

Les protéines étant des macromolécules, il est possible de négliger leur absorption dans les gammes de fréquence sub-THz et THz. En effet, le Chapitre 1 a montré que la vibration d'une protéine en solution était de l'ordre de plusieurs dizaines de nano-secondes (équation 1.5). Dans le cas de mélanges eau/protéine, et en négligeant pour le moment tout effet d'interaction entre ces deux espèces, l'augmentation de la concentration massique  $c$  en protéine doit donc s'accompagner d'une chute de l'absorption de la solution. En effet, la protéine qui n'absorbe pas remplace de l'eau qui absorbait<sup>16</sup>. Cette chute d'absorption

<sup>16</sup>L'évolution du jeu de données montre en effet cette diminution de l'absorption. Une observation attentive montre même que cette diminution est uniforme sur la gamme de fréquence observée et correspond bien à une diminution de la contribution en eau uniquement. En effet, dans le cas où une contribution de la pro-

$\Delta\alpha$  est proportionnelle au volume occupé par la protéine et peut s'écrire :

$$\Delta\alpha = x_{prot}\alpha_{H_2O} = \alpha_{prot} \quad (3.29)$$

où  $x_{prot}$  est le pourcentage en volume occupé par la protéine en solution. Il est donné par la relation  $x_{prot} = c.V_s$  où  $V_s$  [mL/mg] est le volume partiel spécifique de la protéine. Il correspond au volume qu'occupe 1mg de protéine en solution [148]. En pratique,  $\Delta\alpha$  mesuré est supérieur à celui obtenu par l'équation 3.29 car une fraction de l'eau en solution (l'eau d'hydratation) est altérée par la présence de la protéine. Dans l'hypothèse où cette eau d'hydratation n'absorbe plus l'onde<sup>17</sup>,  $\Delta\alpha$  peut s'écrire :

$$\Delta\alpha = \alpha_{prot} + \alpha_{hydr} = x_{prot}\alpha_{H_2O} + x_{hydr}\alpha_{H_2O} \quad (3.30)$$

où  $\alpha_{hydr}$  est l'absorption de la couche d'hydratation et  $x_{hydr}$  est la fraction volumique occupée par l'eau d'hydratation en solution. Cette dernière peut s'exprimer par

$$x_{hydr} = \frac{N_{hydr}.M_{H_2O}}{N_A.\rho_{H_2O}} \quad (3.31)$$

où  $N_{hydr}$  est le nombre de molécules d'eau d'hydratation en solution,  $N_A$  le nombre d'Avogadro,  $M_{H_2O}$  la masse molaire de l'eau et  $\rho_{H_2O}$  sa masse volumique. Si  $N_h$  est le nombre d'hydratation (nombre de molécules d'eau d'hydratation par protéine en solution) et  $N_{prot}$  le nombre de protéines en solution, alors  $N_{hydr} = N_{prot}.N_h$ . Or,

$$N_{prot} = \frac{c.N_A}{M_{prot}} \quad (3.32)$$

où  $M_{prot}$  est la masse molaire de la protéine considérée. La compilation de toutes les relations précédentes permet d'aboutir à l'obtention du nombre d'hydratation :

$$N_h = \left( \frac{\Delta\alpha}{\alpha_{H_2O}} - c.V_s \right) \cdot \frac{M_{prot}.\rho_{H_2O}}{M_{H_2O}.c} \quad (3.33)$$

téine apparaissait des changements spectraux plus localisés en fréquence seraient susceptibles d'apparaître et la diminution de l'absorption ne serait pas une pure translation. Pour vérifier cet effet, des investigations en PCA ont été réalisées et ont montré que, pour les différentes protéines investiguées, aucune signature spectrale ne pouvait être décelée.

<sup>17</sup>Cette approche est validée par Xu *et al.* qui ont mis en évidence que, dans le cas de la lysozyme investiguée entre 75GHz et 105GHz, seule l'eau libre (bulk water) participe à l'absorption de la solution.

### Incertitude sur le nombre d'hydratation

Avant d'appliquer la méthode précédente aux mesures, un calcul d'incertitude est mené afin de déterminer quels sont les paramètres cruciaux pour la minimiser. L'incertitude majeure vient de la mesure à l'Analyseur de Réseau Vectoriel  $\delta S_{21}$  qui se traduit par une incertitude sur l'absorption mesurée  $\delta\alpha$ , et donc sur la différence d'absorption entre la solution et l'eau  $\delta\Delta\alpha$ . Par l'équation 3.33, il vient que l'incertitude sur  $N_h$  est :

$$\delta N_h = \frac{M_{prot} \cdot \rho_{H_2O}}{c \cdot M_{H_2O} \cdot \alpha_{H_2O}} \delta\alpha \quad (3.34)$$

L'incertitude sur  $N_h$  sera donc d'autant plus grande que la protéine considérée aura une masse molaire grande et que la solution considérée aura une concentration massique faible. Pour cette raison, seules les solutions à 50, 75 ou 100mg/mL seront utilisées pour calculer le nombre d'hydratation.

### Nombre d'hydratation des protéines mesurées

Les valeurs des paramètres nécessaires à l'application de la méthode précédente sont donnés dans la Table 3.1.

$\rho_{H_2O}$ (kg/m <sup>3</sup> )	1000
$M_{H_2O}$ (g/mol)	18
$M_{BSA}$ (g/mol)	66430
$M_{lyso}$ (g/mol)	14600
$M_{chy}$ (g/mol)	25000
$V_{sBSA}$ (mL/g) [148]	0.736
$V_{slyso}$ (mL/g) [148]	0.717
$V_{schy}$ (mL/g) [148]	0.718

Tab. 3.1 – Paramètres nécessaires pour le calcul du nombre d'hydratation.

Les résultats de l'extraction des données sont donnés en Figure 3.42 pour les trois protéines. Pour la BSA, les valeurs trouvées sont légèrement inférieures à celles déterminées par Kitagawa *et al.* [96], et plus conformes à celles données par Suzuki *et al.* [149]. Dans l'étude de Kitagawa, il semble que les auteurs négligent le volume occupé par la protéine en solution pour le calcul du nombre d'hydratation, que donc ils surestiment. Pour la lysozyme, les valeurs trouvées sont en très bonne cohérence avec celles obtenues en mesures "bulk" [150], [146]. La sensible diminution du nombre d'hydratation avec la concentration peut être attribuée au phénomène de recouvrement des couches d'hydra-

tation : plus la densité en protéines est élevée au sein de la solution, plus la probabilité qu'une molécule d'eau appartienne à la couche d'hydratation de deux protéines est élevée. Enfin, il convient de préciser que l'analyse ici menée permet de dénombrer le nombre de molécules d'eau qui n'absorbent plus l'onde électromagnétique. Dans le cas de l'éthanol, il avait été montré que ces molécules correspondent à celles qui sont directement liées à la molécule dissoute (première couche). Des simulations en dynamique moléculaire seraient nécessaires afin de corroborer ce point dans le cas des protéines et de vérifier les nombres d'hydratation ici relevés.

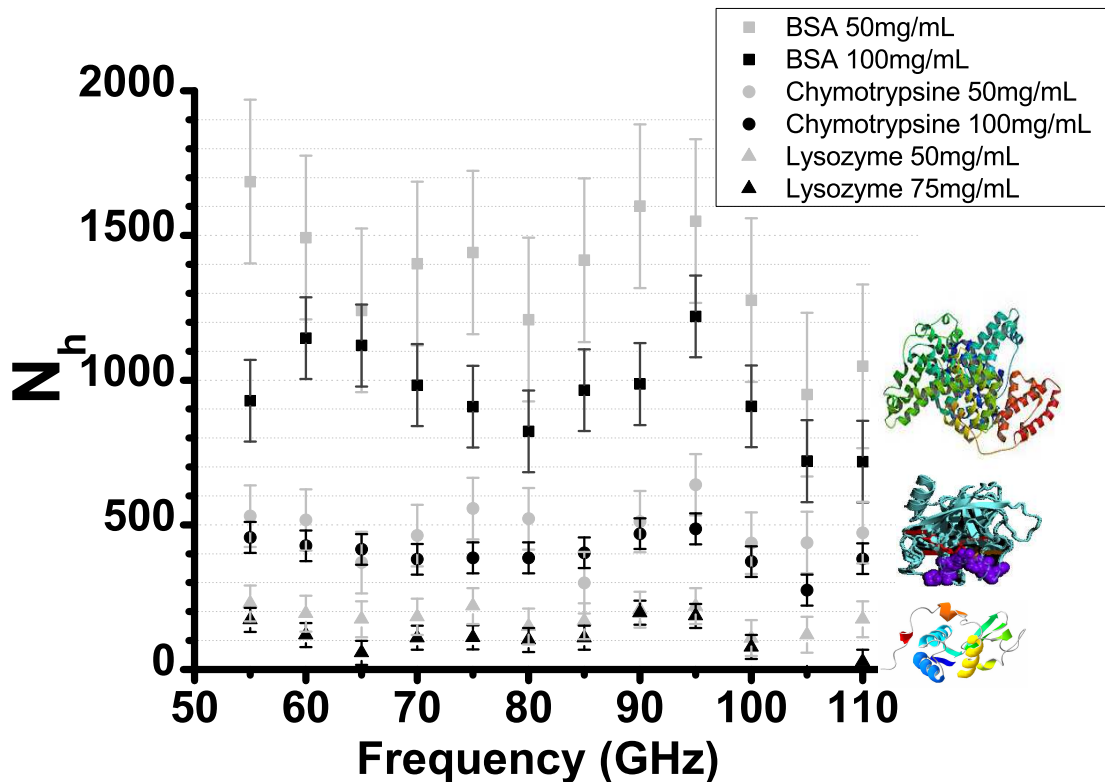


Fig. 3.42 – Nombre d'hydratation de BSA, chymotrypsine et lysozyme en solution.

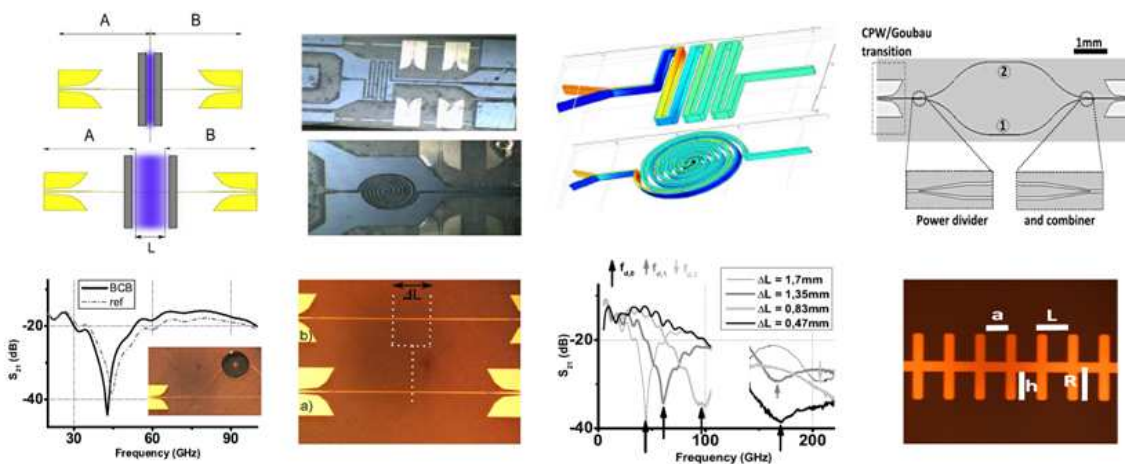
## **Conclusion**

En partant du système développé dans la partie précédente, il a d'abord été possible de caractériser l'interaction eau/alcool grâce à la caractérisation de l'hydratation de l'éthanol. Cette investigation a été d'abord menée à une fréquence particulière, puis étendue au jeu de données complet grâce aux techniques de chimiométrie. Celles-ci ont mis en évidence la présence de deux couches d'hydratation dont les concentrations et spectres ont pu être déterminés.

Cette étude s'est ensuite portée sur des protéines et une sensibilité en absorption de 5mg/mL a été obtenue. Cette valeur est à l'état de l'art des sensibilités en absorption des dispositifs THz "macroscopiques" et dépasse celui des dispositifs microfluidiques. Elle permet des analyses quantitatives directement dans le microsystème et a mené à la caractérisation de l'hydratation de plusieurs protéines. Un objectif est désormais de pouvoir suivre, en temps réel, des changements de conformation de protéines, suite à des modifications de pH ou de température dans le microsystème. Un autre est d'augmenter les fréquences d'investigation afin de réaliser une spectroscopie à quelques THz au sein du dispositif et ainsi exciter davantage de modes vibratoires au sein des protéines. A cette fin, des fonctions électromagnétiques nouvelles doivent être réalisées et sont présentées dans la Partie suivante.

## Partie 4

# Fonctions électromagnétiques et microfluidiques avancées



L'amélioration du circuit électromagnétique est proposée dans cette partie à travers la réalisation de lignes corruguées et d'interféromètres. La spécificité de l'écoulement microfluidique est décrite et exploitée dans le cadre d'une réaction enzymatique.

## Sommaire

---

<b>Introduction</b>	<b>145</b>
<b>I Fonctions électromagnétiques sur ligne de Goubau</b>	<b>146</b>
A Monter en fréquence	146
1 Le problème des modes de substrat	146
2 Plasmons de surface et guides d'onde corrugués	148
B Mesurer l'indice de réfraction	153
1 Méthode de Bianco-Parodi	153
2 Interféromètre THz en topologie Goubau	158
<b>II Spécificité de l'écoulement microfluidique</b>	<b>168</b>
A Réaction hémoglobine/pepsine dans les microcanaux	169
1 Contexte scientifique et applicatif	169
2 Expérimentation et résultats	169
3 Interprétation	170
B Mélangeurs passifs dans les microcanaux	176
<b>Conclusion</b>	<b>178</b>

---



## **Introduction**

Jusqu'à présent, les mesures réalisées au sein du dispositif reposent sur l'utilisation du circuit électromagnétique comme guide d'onde et du circuit microfluidique comme convoyeur d'échantillons. Or, le procédé technologique développé pour la fabrication du BioMEMS permet des conceptions plus avancées de ces deux circuits. Ainsi des structures de ligne de Goubau "améliorées" peuvent être facilement conçues. De même, alors que jusqu'à présent l'usage de microcanaux permettait uniquement la réduction de taille des échantillons, le microsysteme pourrait bénéficier de circuits microfluidiques avancés présents dans la littérature consacrée.

Cette partie s'attache donc à décrire les améliorations envisagées et réalisées au sein du dispositif, d'une part concernant le circuit électromagnétique et d'autre part le circuit microfluidique.

## **I Fonctions électromagnétiques sur ligne de Goubau**

Une limitation du microsysteme actuellement développé est sa capacité à investiguer des plus hautes fréquences jusqu'à plusieurs THz. En effet, la présence de modes de substrat au-delà de plusieurs centaines de GHz ne permet plus le confinement de l'onde autour de la ligne de Goubau planaire. De plus, les mesures actuelles ne reposent que sur l'absorption de l'échantillon. Or des mesures en phase (réfraction de l'échantillon) pourraient apporter des informations complémentaires en vue d'analyse.

Ces deux limites peuvent être levées par le développement de structures électromagnétiques avancées, présentées dans les paragraphes suivants. Il sera montré (i) que la corrugation périodique des lignes de Goubau permet l'amélioration du confinement du champ électromagnétique et (ii) que des méthodes différentielles (de type Bianco-Parodi ou interférométrique) peuvent être mises en oeuvre au sein des dispositifs.

### **A Monter en fréquence**

#### **1 Le problème des modes de substrat**

Lorsque la longueur d'onde propagée dans le dispositif devient suffisamment faible, le champ électromagnétique est capable de se détacher de la ligne de Goubau pour se propager dans le substrat de verre (Figure 4.1-droite). L'onde n'est alors plus détectée en sortie par l'analyseur de réseau. Expérimentalement, une chute brutale du paramètre  $S_{21}$  au-delà d'une certaine fréquence traduit ce phénomène, rendant caduque l'utilisation du dispositif. L'expression de la fréquence de coupure haute limitante est donnée par :

$$f_c = \frac{c}{2 \cdot \sqrt{\mu \epsilon_r}} \sqrt{\left(\frac{m}{a}\right)^2 + \left(\frac{n}{h}\right)^2} \quad (4.1)$$

où  $\epsilon_r$  est la permittivité diélectrique relative du substrat,  $\mu$  sa perméabilité relative,  $h$  son épaisseur et  $a$  la largeur d'excitation de la ligne de Goubau décrite dans [151].  $m$  et  $n$  sont des entiers. Cette expression montre qu'une voie pour repousser à plus haute fré-

quence l'apparition des modes de substrat est de diminuer son épaisseur. L'évolution de la fréquence d'apparition des modes de substrat en fonction de l'épaisseur du substrat est représentée en Figure 4.1-gauche. Utiliser des substrats moins épais est une option. Cependant, pour ces échantillons, les contraintes thermiques issues des collages entraînent une courbure des substrats trop importante pour utiliser le procédé technologique actuel. Une autre voie est l'amincissement des dispositifs après le procédé technologique à l'aide d'un abrasif. Les vitesses d'amincissement sont cependant faibles et l'amincissement de centaines de micromètres de pyrex demande plusieurs jours, ce qui représente un étape coûteuse en temps et en abrasif. Enfin, une autre possibilité est la réalisation de membranes localisées en dessous des lignes de Goubau. Elles peuvent être réalisées à partir d'un bâti de gravure de verre mais nécessitent une nouvelle optimisation du procédé technologique.

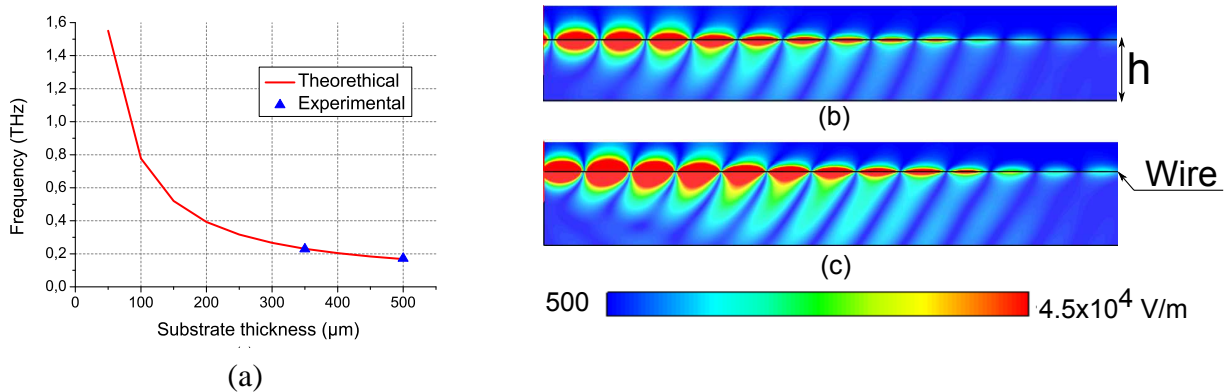


Fig. 4.1 – (a) Fréquence d'apparition des modes de substrat en fonction de l'épaisseur de substrat. (b,c) Topographie de l'amplitude du champ électrique lors de la propagation de modes de substrat pour deux épaisseurs. (b)  $H=350\mu\text{m}$  (c)  $H=500\mu\text{m}$  ( $f=280\text{GHz}$ )

Ainsi, les méthodes "traditionnellement" utilisées pour résoudre le problème des modes de substrat sont non triviales et nécessitent de nouvelles investigations technologiques et une sophistication du procédé de fabrication.

Une solution originale peut être obtenue par une géométrie particulière de la ligne de Goubau. Elle présente l'avantage d'être entièrement compatible avec le procédé technologique développé lors de la thèse. Pour la décrire, un retour sur la propagation électromagnétique sur la ligne de Goubau est nécessaire.

## 2 Plasmons de surface et guides d'onde corrugués

La propagation autour de la ligne de Goubau est de type quasi-TEM. C'est pourquoi une approche "rayon" est souvent suffisante pour la décrire. C'est le cas depuis le début du manuscrit. Il sera d'ailleurs montré par la suite que cette simplification est pertinente même dans le cas de structures avancées de type interférométrique.

Cependant, la théorie des plasmons de surface est nécessaire pour la description approfondie de la propagation autour de la ligne de Goubau. Elle décrit des ondes électromagnétiques propagées par des électrons à des interfaces métal/diélectrique (ondes de surface). La vibration de ces électrons permet la propagation d'une onde progressive dans le plan de l'interface et évanescente dans le plan orthogonal. Pour des fréquences largement inférieures à la fréquence "plasmon" de l'or<sup>1</sup>, la relation de dispersion  $k(\omega)$  est linéaire justifiant l'approche de type rayon aux fréquences THz. Sur ces bases théoriques, Fernandez-Dominguez *et al.* ont démontré que la corrugation "sub-longueur d'onde" d'un guide d'onde métallique THz circulaire (3D) permettait un meilleur confinement du champ électromagnétique [152]. En effet, tout se passe comme si le champ, en moyenne, pénétrait plus profondément dans le métal et y était donc plus "solidaire".

Des lignes de Goubau planaires corruguées ont donc été dessinées et testées afin d'observer leur effet sur la propagation de l'onde. Elles sont représentées en Figure 4.2. Le substrat utilisé est en pyrex, de permittivité diélectrique  $\epsilon_r = 6.5$  et d'épaisseur  $H = 350\mu\text{m}$ .

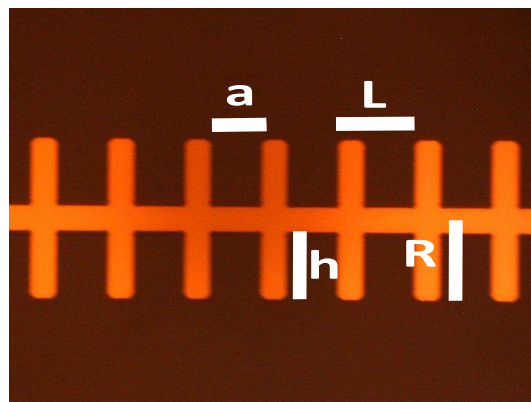


Fig. 4.2 – Ligne de Goubau corruguée sur substrat de verre.  $a = 15\mu\text{m}$ ,  $L = 20\mu\text{m}$ ,  $h = 17.5\mu\text{m}$ ,  $R = 20\mu\text{m}$ .

<sup>1</sup>Située dans la gamme de fréquence optique

La mesure des paramètres  $S$  a été menée jusque 220GHz pour une ligne de Goubau et une ligne de Goubau corruguée de même longueur. L'analyse de  $S_{21}$  (Figure 4.3-gauche) montre que la présence de corrugation fait disparaître la chute de transmission à partir de 150GHz due aux modes de substrat. Jusqu'à 150GHz, la présence de corrugations n'altère pas la propagation puisque le niveau de transmission est sensiblement identique dans les deux cas<sup>2</sup>. Pour la ligne corruguée, une décroissance de la transmission linéaire avec la fréquence est tout de même observée de 150 à 220GHz. Elle correspond cependant aux pertes du substrat en pyrex. En effet, grâce à des simulations sous CST Microwave Studio présentées en Figure 4.3-droite, l'effet de la corrugation sur le rejet des modes de substrat est observé pour un substrat d'épaisseur de 300 $\mu$ m. Ce rejet est similaire à celui obtenu par l'utilisation d'un substrat fin de 50 $\mu$ m d'épaisseur. Il est également observé que l'augmentation des pertes du substrat ( $\tan \delta$ ) conduit à une décroissance du signal transmis avec la fréquence, qui justifie la décroissance linéaire expérimentale observée avec la ligne corruguée. La Figure 4.3-droite suggère que l'utilisation d'un substrat faible perte (en quartz par exemple) permettrait de s'affranchir de cette décroissance.

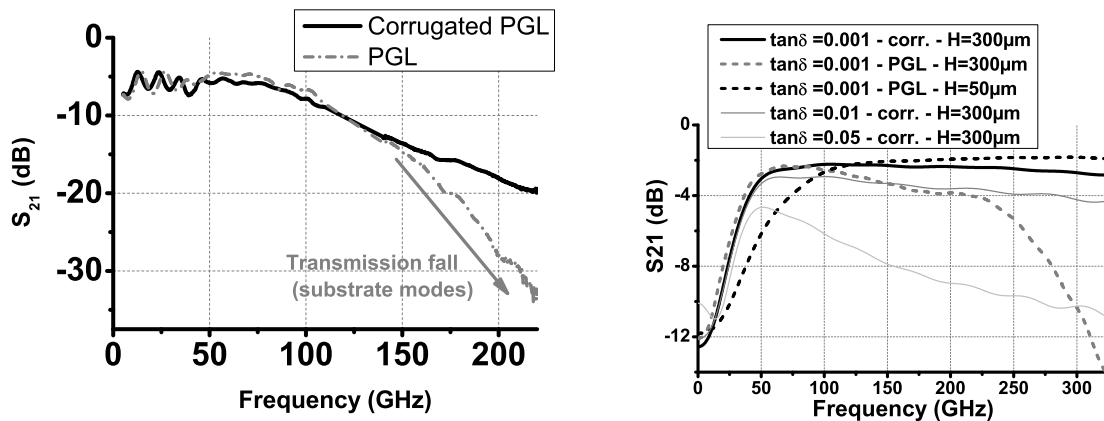


Fig. 4.3 – Gauche : Disparition des modes de substrat lors de l'utilisation de lignes de Goubau corruguées. Résultat expérimental. - Droite : Comparaison ligne simple et corruguée. Influence de l'épaisseur et des pertes du substrat sur la transmission. Résultats de simulation sous CST Microwave Studio.

Pour affiner la compréhension physique et l'influence des paramètres de corrugation sur les modes de substrat, d'autres simulations ont été menées. La Figure 4.4 montre, pour

<sup>2</sup>En réalité, la présence de corrugations introduit certaines pertes supplémentaires. Pour les quantifier, des simulations ont été effectuées sur un substrat de pyrex de pertes :  $\tan \delta = 0.01$ . Les pertes de propagation obtenues pour la structure corruguée (0.13dB/mm à 60GHz) sont légèrement supérieures à celles obtenues pour la structure simple (0.10 dB/mm à 60GHz). Ce léger écart est observable sur la Figure 4.3-gauche.

un substrat d'épaisseur  $300\mu\text{m}$  et de faibles pertes, l'évolution de la transmission en fonction de la profondeur de corrugation  $R$ . Alors que la ligne de Goubau simple est propice à la propagation des modes de substrat, l'augmentation de la profondeur de corrugation s'accompagne d'un rejet de ces modes vers des plus hautes fréquences. La transmission optimale est observée pour  $R = 20\mu\text{m}$ . Au delà, la transmission diminue légèrement en raison de l'absorption créée par la présence des corrugations. L'observation de la répartition de l'amplitude du champ électrique à  $325\text{GHz}$  montre bien la propagation des modes de substrat dans le cas de la ligne simple et le meilleur attachement de l'onde à la ligne pour une corrugation  $R = 20\mu\text{m}$ .

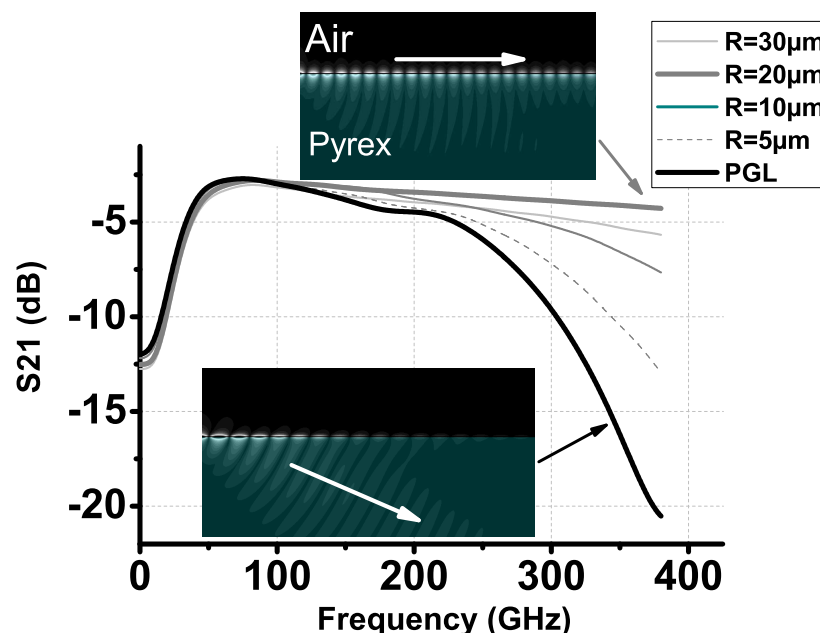


Fig. 4.4 – Influence de la profondeur de corrugation sur le rejet des modes de substrat.  $R - h = 2.5\mu\text{m}$  constant. Zooms : Amplitude du champ électrique à  $325\text{GHz}$  pour ligne simple et ligne corruguée ( $R = 20\mu\text{m}$ ). Résultats de simulation.

Pour appréhender ce meilleur attachement, l'extension du champ électrique côté pyrex et côté air autour de la ligne de Goubau a été quantifiée en fonction des paramètres géométriques pour une fréquence de  $180\text{GHz}$ . La Figure 4.5 représente l'amplitude du champ électrique en fonction de  $r$ , distance perpendiculaire à la ligne de Goubau. La corrugation de la ligne augmente l'extension du champ dans le pyrex et l'air. Par ailleurs, plus la profondeur de corrugation  $R$  est importante, plus l'extension est augmentée. Pour une simple ligne de Goubau non corruguée, les mêmes simulations montrent que l'extension du champ augmente lorsque l'on diminue les fréquences d'investigation. Autre-

ment dit, l'extension du champ autour une ligne corruguée à la fréquence  $f_0$  correspond à l'extension du champ autour d'une ligne simple à la fréquence  $f_0 - \Delta f$ , où  $\Delta f$  est un décalage de fréquence positif. En supposant que l'augmentation des modes de substrat avec la fréquence pour une ligne simple est dû à la diminution de l'extension du champ électrique, il vient que la corrugation, en augmentant cette extension, rejette à des plus hautes fréquences l'apparition des modes de substrat. L'onde électromagnétique est donc plus fortement attachée à la ligne corruguée qu'à la ligne simple.

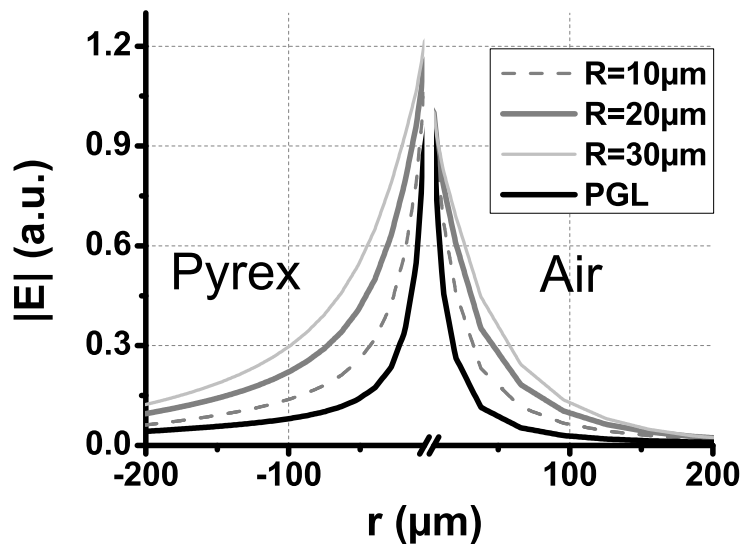


Fig. 4.5 – Extension du champ électrique dans l'air et le substrat pour une ligne simple et diverses lignes corruguées.  $f = 180\text{GHz}$ .  $R - h = 2.5\mu\text{m}$ . Résultats de simulation.

Afin de confirmer ces observations, la mesure du paramètre  $S_{21}$  a été effectuée, pour la même ligne sur le même substrat, avec un substrat reposant sur deux absorbants différents (Eccosorb MFS-117 souple et MF-117 rigide de Emerson and Cuming Microwave Products). Les résultats de la Figure 4.6 montrent que la propagation est insensible au matériau sous le substrat dans le cas d'une PGL corruguée, contrairement à une PGL classique. Cela signifie que, dans le cas d'une ligne simple, la propagation dépend du matériau situé en dessous du substrat (qui agit comme une condition aux limites pour la propagation du mode de substrat). En revanche, avec une ligne corruguée, les modes de substrat sont rejetés et il n'y a pas d'influence significative du matériau situé en dessous du substrat sur les propriétés de propagation.

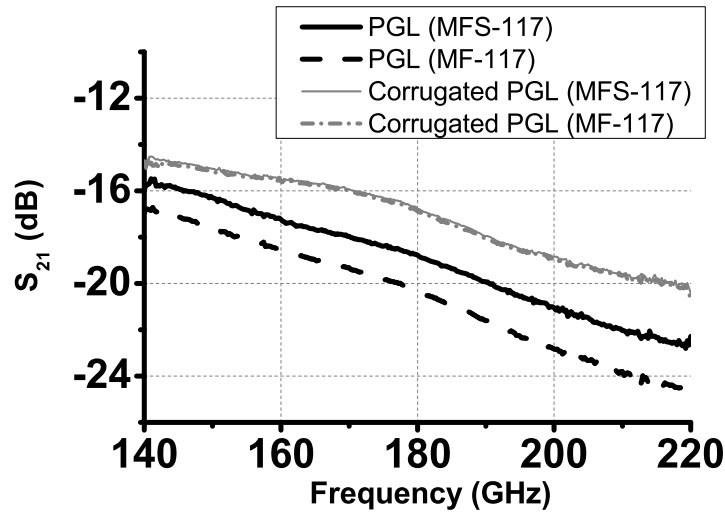


Fig. 4.6 – Variation de  $S_{21}$  en fonction de l'absorbant positionné sous le substrat. Tests avec ligne de Goubau classique et corruguée.

La corrugation des lignes de Goubau est donc un moyen efficace et rapide pour permettre le rejet des modes de substrat vers des horizons lointains. Des mesures à plus hautes fréquences seraient nécessaires pour quantifier leur nouvelle fréquence d'apparition, et ce en fonction des paramètres géométriques de la corrugation. L'intégration de ces lignes au sein du microsysteme est un objectif qui permettra, à court terme, d'accroître la gamme de fréquences d'investigation sur protéines en microcanaux. A plus long terme, la réalisation de lignes corruguées sur membranes pourrait permettre une propagation THz guidée entre 1 et 10THz.

D'un point de vue théorique, la présence de corrugations abaisse la valeur de la fréquence plasma effective [152, 153, 154]. Ainsi, la relation de dispersion caractérisant la propagation est modifiée. Dans la zone de fréquences THz, la pente  $k(\omega)$  est plus faible, ce qui traduit un ralentissement de l'onde par la structure corruguée. La Figure 4.7, obtenue par simulation, confirme cette affirmation. Plus la profondeur de corrugation est importante, plus la courbure de la relation de dispersion est prononcée. Pour l'observer expérimentalement et la caractériser dans la structure présente, des investigations en phase doivent être menées. De manière générale, la capacité de notre système à analyser des échantillons en terme d'absorption et de réfraction est souhaitable pour aboutir à une caractérisation complète. De manière électromagnétique, cela revient à caractériser l'échantillon par sa permittivité diélectrique complexe : en première approximation, la partie réelle correspondrait à la réfraction et la partie imaginaire à l'absorption.



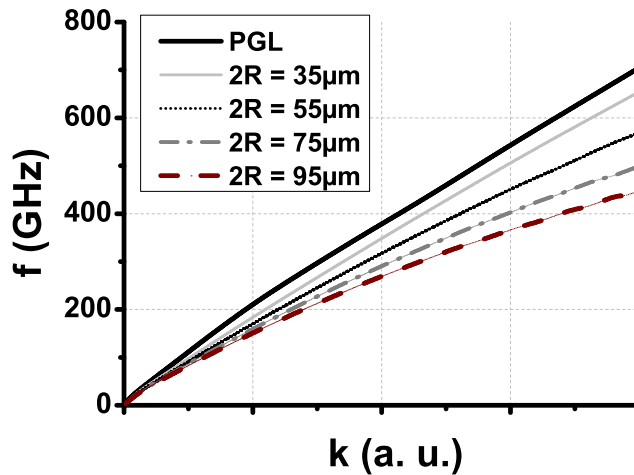


Fig. 4.7 – Relation de dispersion pour la propagation de l'onde électromagnétique autour d'une ligne de Goubau simple et de lignes corruguées pour différentes géométries. Observation de la courbure de la pente.  $R - h = 2.5\mu\text{m}$ .

## B Mesurer l'indice de réfraction

Pour accéder à l'indice de réfraction d'échantillons, deux méthodes basées sur des mesures différentielles seront présentées. L'une dite de "Bianco-Parodi" est inspirée de l'électronique à plus basses fréquences. L'autre d'origine optique consiste à l'intégration d'un interféromètre de Mach Zehnder en technologie Goubau.

### 1 Méthode de Bianco-Parodi

#### Théorie

La méthode de type Bianco et Parodi [133], [155], [156] repose sur la confrontation de deux mesures d'un échantillon de même nature, mais de longueurs différentes ; tous les autres paramètres du système restant invariants (Figure 4.8). En considérant le formalisme usuel pour la description des quadripoles, la matrice de répartition  $[S]$ , mesurée par un Analyseur de Réseau Vectoriel est définie par :

$$\begin{bmatrix} b_1 \\ b_2 \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} S_{11} & S_{12} \\ S_{21} & S_{22} \end{pmatrix} \begin{bmatrix} a_1 \\ a_2 \end{bmatrix} \quad (4.2)$$

Cette matrice n'est pas cascable : la matrice  $[S]$  d'un ensemble de quadripoles en série n'est pas le produit des matrices  $[S]$  de chacun des quadripoles. La matrice cascade  $[T]$  est

alors définie pour y parvenir :

$$\begin{bmatrix} b_1 \\ a_1 \end{bmatrix} = \begin{pmatrix} T_{11} & T_{12} \\ T_{21} & T_{22} \end{pmatrix} \begin{bmatrix} a_2 \\ b_2 \end{bmatrix} \quad (4.3)$$

La comparaison de (4.2) et (4.3) donne l'expression de la matrice  $[T]$  en fonction des paramètres S, mesurables :

$$[T] = \frac{1}{S_{21}} \begin{pmatrix} (S_{12}S_{21} - S_{11}S_{22}) & S_{11} \\ -S_{22} & 1 \end{pmatrix} \quad (4.4)$$

En considérant la Figure 4.8, soient  $[T_a]$ ,  $[T_b]$ ,  $[T_A]$ ,  $[T_B]$  et  $[T_s]$  respectivement les matrices cascades des structures entières a) et b), des tronçons A et B et de l'échantillon ajouté de longueur L. Il vient par la propriété de cascade :

$$T_a = T_A T_B \quad (4.5)$$

$$T_b = T_A T_s T_B \quad (4.6)$$

D'où :

$$T_b T_a^{-1} = T_A T_s T_A^{-1} \quad (4.7)$$

Les matrices  $T_s$  et  $T_b T_a^{-1}$  sont donc semblables et, par conséquent, ont même trace :

$$\text{tr}(T_s) = \text{tr}(T_b T_a^{-1}) \quad (4.8)$$

Les matrices  $T_b$  et  $T_a$  étant connues par la mesures des paramètres S dans les deux situations, le terme de droite est obtenu expérimentalement. De plus, la matrice  $[T_s]$ , dans le cas d'une ligne de transmission idéale caractérisée par le nombre complexe  $\gamma$ , est :

$$[T_s] = \begin{pmatrix} e^{-\gamma L} & 0 \\ 0 & e^{\gamma L} \end{pmatrix} \quad (4.9)$$

On en déduit, à partir de l'équation 4.8, l'expression reliant  $\gamma$  aux paramètres S mesurés dans les deux situations<sup>3</sup> :

$$2 \cosh(\gamma L) = \frac{S_{21,a}^2 + S_{21,b}^2 - 2S_{11,a}S_{11,b} - S_{11,a}^2 - S_{11,b}^2}{S_{21,a}S_{21,b}} \quad (4.10)$$

---

<sup>3</sup>Ici simplifiée pour le cas de structures symétriques et réciproques.

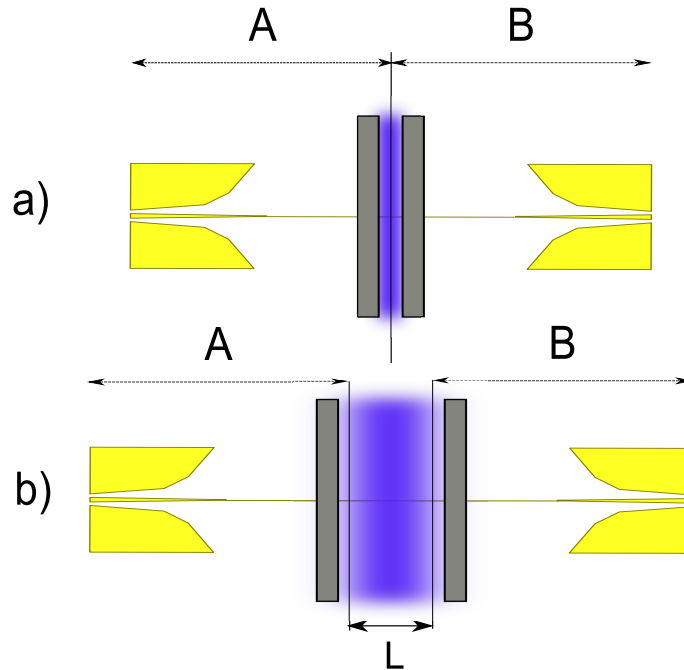


Fig. 4.8 – Méthode de Bianco-Parodi appliquée au BioMEMS THz.

où les paramètres indicés  $a$  et  $b$  correspondent respectivement à ceux de la mesure de la situation a) et b).  $\gamma$  du milieu ajouté, de longueur  $L$ , peut donc être déterminé. A partir des équations présentées dans la partie précédente,  $\gamma$  donne accès à  $\alpha$  et  $\beta$  et permet d'extraire  $n$  et  $k$ . De là,  $\varepsilon(\omega) = \varepsilon'(\omega) - j\varepsilon''(\omega)$  peut être obtenu.

#### Simulations sous CST Microwave Studio

Afin de valider cette approche théorique, des simulations ont été menées avec le logiciel CST Microwave Studio. Divers liquides ont été testés, avec une permittivité suivant un modèle de Debye du second ordre [16], [157] :

$$\varepsilon(\omega) = \varepsilon_{\infty} + \frac{\Delta\varepsilon_1}{1 + j\tau_1\omega} + \frac{\Delta\varepsilon_2}{1 + j\tau_2\omega} \quad (4.11)$$

Les simulations sont lancées sur les structures a) et b), avec une permittivité de type Debye, pour des fréquences de 0 à 110GHz. Les paramètres  $S$  sont récupérés pour chaque simulation et utilisés dans l'expression de Bianco Parodi (BP). A partir de  $\gamma$  extrait, la permittivité de la solution  $\varepsilon_{BP}$  est déterminée et confrontée à celle injectée dans les paramètres de simulation. En réalité, la méthode de Bianco Parodi permet de revenir à la permittivité effective de l'ensemble (liquide + substrat). Dans le cas des milieux à faibles pertes, la permittivité effective est souvent approximée par la moyenne de la permittivité

du milieu à investiguer  $\varepsilon$  et du substrat  $\varepsilon_s$  :

$$\varepsilon_{eff} = \frac{\varepsilon + \varepsilon_s}{2} \quad (4.12)$$

De la même manière, pour les milieux à fortes pertes, on considérera que la permittivité diélectrique effective est une combinaison linéaire de celle de l'échantillon et du substrat comme suit :

$$\varepsilon'(\omega) = A'(\omega)\varepsilon'_{eff} + B'(\omega) \quad (4.13)$$

$$\varepsilon''(\omega) = A''(\omega)\varepsilon''_{eff} + B''(\omega) \quad (4.14)$$

Afin de trouver les fonctions  $A'(\omega)$ ,  $A''(\omega)$ ,  $B'(\omega)$ , et  $B''(\omega)$ , une étape de calibration est nécessaire, avec deux liquides différents (ici eau et éthanol 30%). L'extraction de l'éthanol à 70% est ensuite menée et montrée sur la Figure 4.9. L'extraction est très satisfaisante pour des fréquences supérieures à 40GHz<sup>4</sup>, au prix de deux passages de liquides au préalable pour la calibration. La méthode de Bianco-Parodi est donc transposable aux mesures par ligne de Goubau, permettant ainsi la caractérisation complète d'un échantillon à partir de la mesure des paramètres  $S$ .

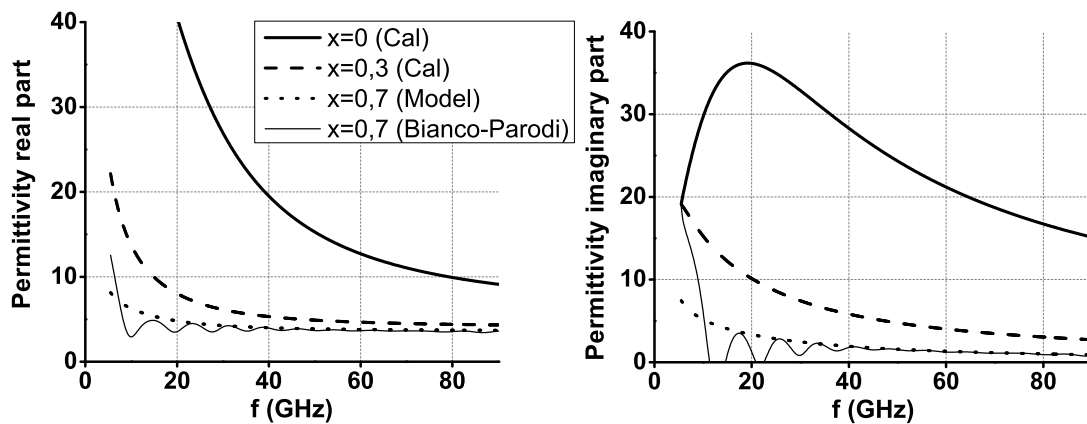


Fig. 4.9 – Extraction de la permittivité diélectrique de l'éthanol à 70%. Calibration grâce à l'eau et à l'éthanol 30 %.  $x$  représente la fraction volumique d'éthanol

### Caractérisation des structures corruguées

L'analyse de la Figure 4.3-gauche a montré que la présence de corrugations sur ligne de Goubau altérait peu la puissance transmise du guide d'onde (peu de pertes supplémentaires). En revanche, elle n'avait pas permis de discuter expérimentalement de l'influence des corrugations sur la vitesse de propagation de l'onde. Pour cela, la méthode de

<sup>4</sup>Domaine de fréquence pour lequel la transition coplanaire/Goubau est optimisée.

Bianco-Parodi précédemment validée par simulation a été mise en oeuvre sur des lignes de Goubau ordinaires et corruguées (Figure 4.10-gauche), de différence de longueur 1mm. L'analyse des résultats en terme d'indice de réfraction est donnée en Figure 4.10-droite et montre un décalage. L'écart est relativement constant sur la bande de fréquence investiguée et vaut  $\Delta n = 0.31$  à 80GHz.

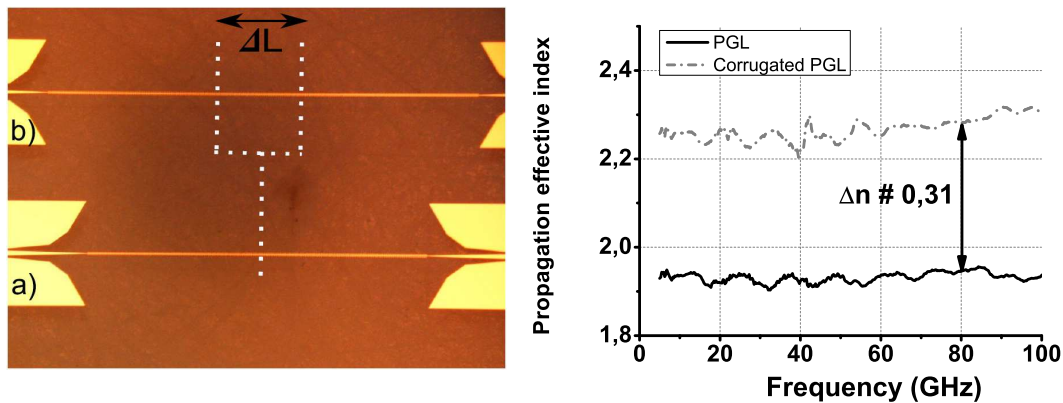


Fig. 4.10 – Gauche : Configuration pour la caractérisation des structures corruguées par méthode de Bianco-Parodi.  $\Delta L = 1\text{mm}$ . Droite : Indice de propagation effectif pour ligne de Goubau ordinaire et corruguée.

L'onde est donc bien ralentie par la présence de corrugations qui permettent la réalisation de fonction "déphaseur". L'étude de l'influence des paramètres géométriques de la corrugation sur l'écart d'indice de propagation a été réalisée en simulation à une fréquence de 100GHz et est présentée en Figure 4.11. Augmenter la profondeur de corrugation  $R$  (en gardant  $R - h = 2.5\mu\text{m}$  constant) augmente le décalage d'indice de propagation avec une ligne de Goubau simple de manière quasi-linéaire. Cette observation est en accord avec [152] et avec la Figure 4.7 qui montraient une augmentation de la courbure de la relation de dispersion avec la profondeur de corrugation. De plus, pour une profondeur de corrugation donnée ( $R = 20\mu\text{m}$ ,  $h = 17.5\mu\text{m}$ ), l'augmentation du rapport de forme  $v/L$  (avec  $L = 20\mu\text{m}$ ) diminue le décalage d'indice. En effet, quand  $v/L$  s'approche de 1, on retombe sur une structure classique de ligne de Goubau et le décalage d'indice tend vers 0.

La méthode de Bianco-Parodi semble donc bien adaptée à la structure ligne de Goubau sub-THz et THz. Elle nécessite cependant deux mesures sur des lignes de longueur différentes avec un positionnement précis des pointes sur les lignes. En effet, entre les deux mesures, l'écart de pose entre les pointes doit être bien inférieur à la longueur d'onde pro-

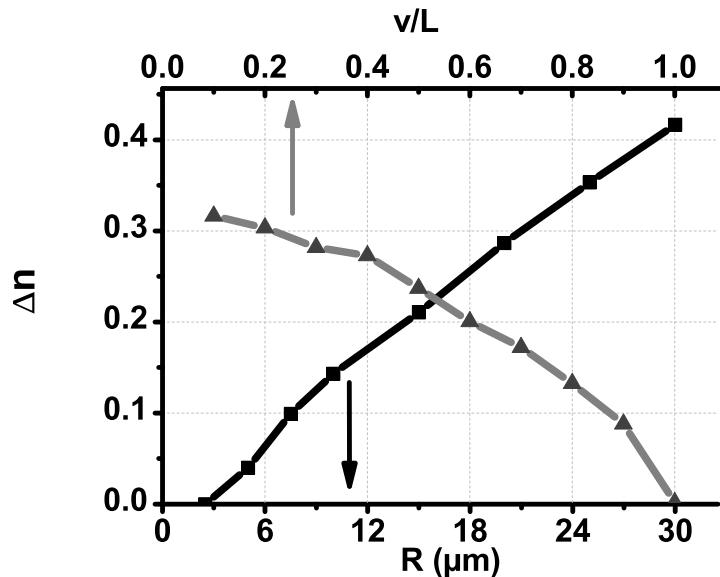


Fig. 4.11 – Décalage de l'indice de réfraction en fonctions des paramètres géométriques.  $f = 100\text{GHz}$ . Résultats de simulation CST. Gris : Influence du rapport  $v/L$  avec  $L = 20\mu\text{m}$ ,  $R = 20\mu\text{m}$  et  $h = 17.5\mu\text{m}$ . Noir : Influence de la profondeur de corrugation avec  $R - h = 2.5\mu\text{m}$ ,  $v = 5\mu\text{m}$  et  $L = 20\mu\text{m}$ .

pagée pour permettre une extraction judicieuse des paramètres de propagation. Pour les fréquences basses de la bande THz, il vient d'être montré que la méthode est toujours pertinente. En revanche, l'augmentation par 10 des fréquences investiguées va contraindre le posé des pointes à une précision dix fois supérieure. En conséquence, le développement d'une mesure différentielle ne nécessitant qu'un posé de pointes pour la caractérisation de la propagation semble nécessaire pour l'investigation à plus haute fréquences. A ce titre, un interféromètre en topologie Goubau planaire a été développé.

## 2 Interféromètre THz en topologie Goubau

### Interféromètre de Mach-Zehnder

La géométrie de l'interféromètre Goubau planaire est présentée en Figure 4.12. Cette architecture, de type Mach-Zehnder, a déjà été utilisée en bande optique dans des laboratoires sur puce pour la détection de protéine ou de l'hybridation de l'ADN [158, 159]. C'est la première fois à notre connaissance qu'elle est adaptée à un mode guidé THz.

Dans l'interféromètre de Mach-Zehnder, un faisceau incident est divisé en deux (diviseur de puissance). Les deux faisceaux produits parcourent les longueurs électriques (1) et (2) et sont recombinaés pour former le signal mesuré  $s$ , fonction de la différence de marche

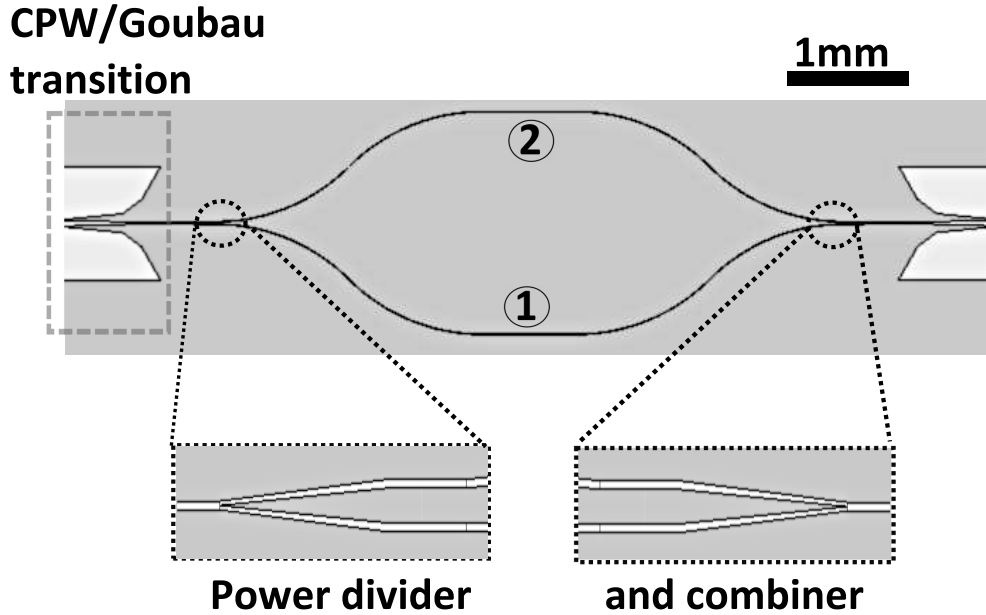


Fig. 4.12 – Structure de l'interféromètre Goubau planaire de type Mach-Zehnder.

$\delta$  entre (1) et (2) :

$$s = s_0 e^{jk\delta} \cos\left(\frac{k\delta}{2}\right) \quad (4.15)$$

où  $s_0$  est une constante complexe et  $k = 2\pi f/c$  le vecteur d'onde.  $c = 3 \cdot 10^8$  m/s est la vitesse de la lumière dans le vide et  $f$  la fréquence de l'onde propagée dans la structure. Pour certaines fréquences ( $f_{d,m}$  : fréquences d'interférence destructive), les deux signaux se recombinant sont en opposition de phase et le signal  $s$  est minimal. Elles sont données par :

$$f_{d,m} = \frac{c}{2\delta} + m \frac{c}{\delta} \quad (4.16)$$

où  $m$  est un entier. Lorsque la structure est équilibrée ( $\delta = 0$ ), il n'existe pas de fréquence d'interférence destructive. La simulation par CST Microwave Studio d'une structure équilibrée est donnée en Figure 4.13 pour deux épaisseurs de substrat de verre  $H$ . Aucun pic d'interférence n'est observé. La décroissance du signal transmis avec la fréquence observée pour  $H = 350 \mu\text{m}$  s'explique par la propagation de mode de substrats évoquée précédemment et disparaît pour  $H = 50 \mu\text{m}$ . Néanmoins, les simulations présentées dans la suite seront réalisées avec un substrat d'épaisseur  $350 \mu\text{m}$  afin de reproduire les conditions expérimentales futures.

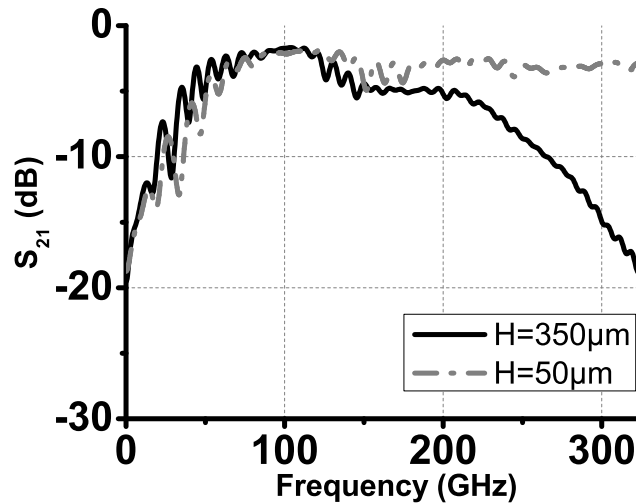


Fig. 4.13 – Transmission de l'interféromètre équilibré en fonction de la fréquence et de l'épaisseur des substrats. Visualisation des modes de substrat. Résultats de simulation CST Microwave Studio.

### Interféromètre déséquilibré

Une voie pour créer un déséquilibre au sein de l'interféromètre est d'allonger une des deux branches intermédiaires d'une longueur  $\Delta L$ . Dans ce cas, la différence de marche entre les deux rayons recombinants est  $\delta = n\Delta L$  où  $n = \sqrt{\epsilon_r} = \sqrt{\frac{\epsilon_s + 1}{2}}$  est l'indice de réfraction effectif de propagation. Le comportement de plusieurs structures déséquilibrées a été simulé et donne les résultats présentés en Figure 4.14-gauche. Comme attendu, des fréquences d'interférence destructive sont observées. La fréquence  $f_{d,0}$  du premier pic observé est représenté en fonction de  $\Delta L$  sur la Figure 4.14-droite. Une très bonne adéquation est trouvée entre les résultats de simulation et de l'équation 4.16 est trouvée. Cela conforte, une fois de plus, l'approche "rayon" utilisée pour la description de l'onde guidée.

Les interféromètres ont été réalisés par un procédé lift-off sur des substrats de verre de  $350\mu\text{m}$  d'épaisseur [100]. Le paramètre  $S_{21}$  de chaque structure est mesuré de 0 à 110GHz par un Analyseur de Réseau Vectoriel (ARV) Agilent 8510XF et de 140 à 220GHz par des multiplieurs connectés à un ARV Rohde et Schwarz ZVA24. La Figure 4.15 présente les résultats expérimentaux et confirme les prédictions théoriques. Les fréquences de première destruction  $f_{d,0}$  sont clairement visibles.  $f_{d,1}$  et  $f_{d,2}$  sont indiquées pour deux configurations. Les valeurs mesurées de  $f_{d,0}$  en fonction de  $\Delta L$  sont reportées dans la Figure 4.14-droite et sont très proches des résultats théoriques. En revanche, augmenter la fréquence d'interférence diminue la précision de mesure car les pics d'interférence



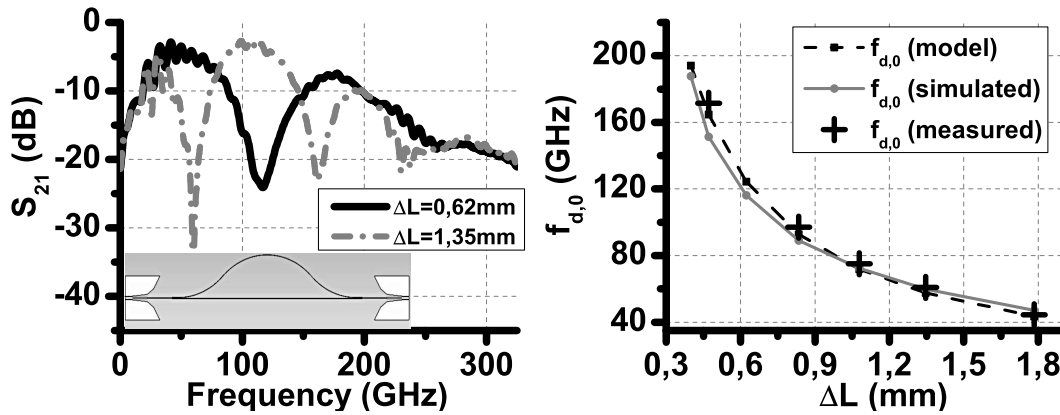


Fig. 4.14 – Gauche : Transmission des interféromètres déséquilibrés en fonction de la fréquence. Droite : Première fréquence d’interférence destructive en fonction de  $\Delta L$ . Résultats du modèle, de simulation et de mesure. L’épaisseur des croix correspond à l’incertitude.

s’élargissent. Ceci s’explique par les pertes au sein du substrat de verre qui détériorent le contraste des franges d’interférence. L’utilisation d’un substrat faibles pertes de type quartz devrait nettement améliorer ce point.

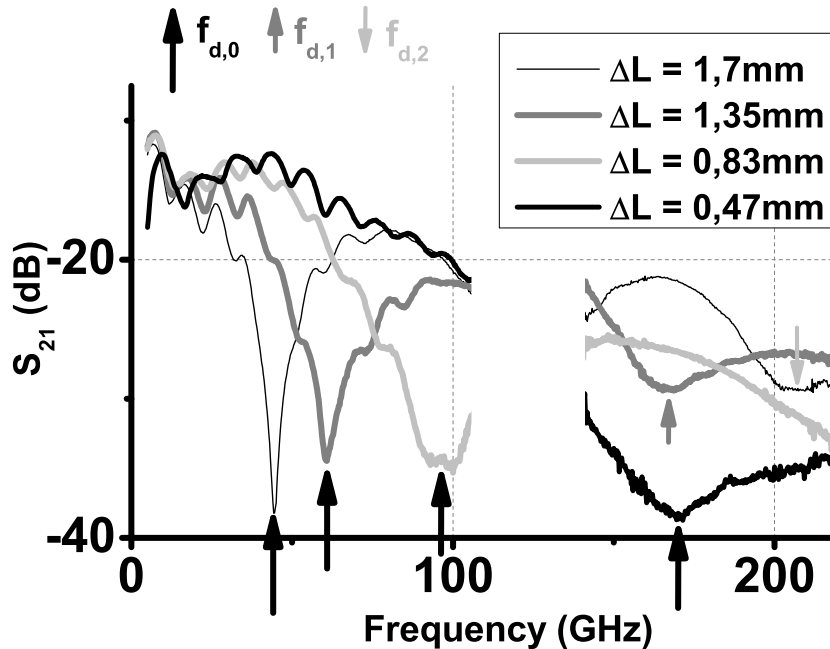


Fig. 4.15 – Transmission des différentes structures d’interféromètre. Les flèches verticales indiquent les premières, secondes et troisièmes fréquences d’interférence destructive.

### Sensibilité à la variation de permittivité

Une autre manière de faire varier la différence de marche entre les chemins (1) et (2) est de modifier localement la permittivité diélectrique rencontrée par l'onde. Pour caractériser la réponse de l'interféromètre à ces variations, la structure déséquilibrée  $\Delta L = 0.62\text{mm}$  a été considérée en simulation. Comme affiché sur la Figure 4.16, un échantillon de longueur  $l = 1\text{mm}$ , d'épaisseur  $100\mu\text{m}$  et de permittivité relative  $\epsilon_r$  a été déposé sur une des branches de l'interféromètre. Un décalage du pic d'interférence en fonction de la valeur de la permittivité est observé en Figure 4.16. En effet, l'indice de réfraction effectif au niveau de l'échantillon devient  $n_r = \sqrt{\frac{\epsilon_s + \epsilon_r}{2}}$ .

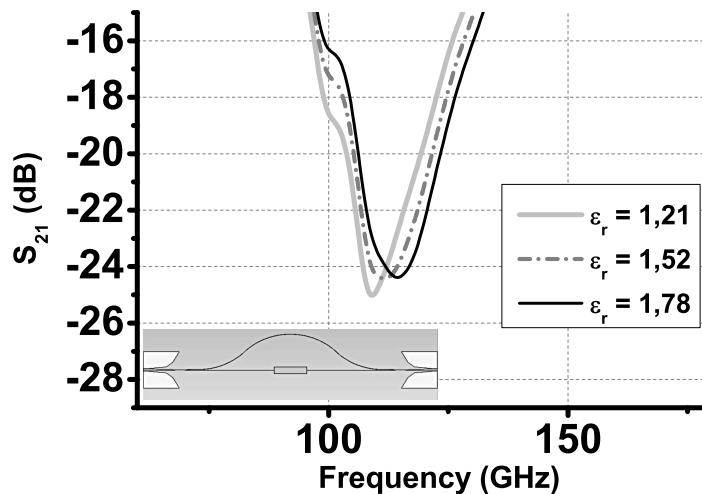


Fig. 4.16 – Transmission de l'interféromètre en fonction de la permittivité de l'échantillon déposé sur une branche. Décalage du pic d'interférence.

Le décalage a été simulé pour d'autres structures déséquilibrées et la Table 4.1 montre que la sensibilité de l'interféromètre augmente avec la fréquence du pic d'interférence. En effet, en considérant des faibles variations de  $\epsilon_r = 1 + d\epsilon$ , la fréquence du pic d'interférence devient  $f = f_0 + df$ ,  $f_0$  étant la fréquence d'interférence de la structure déséquilibrée seule correspondant à la différence de marche  $\delta_0 = n\Delta L$ .  $f$  peut être exprimé comme :

$$f = f_0 + df \sim \frac{c}{2\delta_0} - \frac{2f_0^2}{c} d\delta \quad (4.17)$$

avec  $d\delta$  la différence de chemin optique créée par le dépôt de l'échantillon sur la branche :

$$d\delta = l. \left( \sqrt{\frac{\epsilon_s + 1}{2}} - \sqrt{\frac{\epsilon_s + \epsilon_r}{2}} \right) \quad (4.18)$$

Ces deux équations mènent à l'expression du décalage en fréquence :

$$df = \frac{4f_0^3}{c^2} \cdot l \cdot \Delta L \cdot \frac{d\epsilon}{4} \quad (4.19)$$

Etant donné que  $\Delta L$  est inversement proportionnel à  $f_0$ , la sensibilité de l'interféromètre  $df/d\epsilon$  est proportionnelle à  $f_0^2$ . Cette dépendance explique l'augmentation observée en Table 4.1. Plus loin, il sera montré que la topologie ici présentée pour l'interféromètre permet la réalisation d'interférences à plusieurs THz, menant à une forte augmentation des sensibilités.

$\Delta L$ (mm)	1.34	0.83	0.62
$f_0$ (GHz)	59.8	89	116
$df/d\epsilon$ (GHz)	0.9	2.06	6.02

Tab. 4.1 – Sensibilité de l'interféromètre en fonction de la structure déséquilibrée choisie.

A titre de vérification expérimentale, des gouttes de BCB 3022-46 (de Dow Chemical) ont été manuellement déposées sur une des branches des structures interférométriques réalisées dans la partie précédente. Un décalage de la fréquence d'interférence est observé sur la Figure 4.17. En utilisant l'équation 4.17, la permittivité diélectrique relative du BCB est estimée à  $2.8 \pm 0.3$  entre 40 et 110GHz, résultat en bonne adéquation avec les données constructeur ( $\epsilon_r = 2.65$  jusque 20GHz). Les incertitudes de mesures proviennent essentiellement de la forme de la goutte sur la ligne de Goubau (dépôt manuel, épaisseur non constante, estimation de la longueur  $l$  délicate). En vue d'une amélioration, l'utilisation de BCB photosensible permettrait un dépôt par centrifugation suivi d'une étape d'insolation et de développement. La zone de BCB serait ainsi géométriquement mieux définie. Néanmoins, cette expérience prouve la capacité de l'interféromètre à caractériser des matériaux diélectriques dans la bande sub-THz.

### Caractérisation de la ligne corruguée

La structure interférométrique a ensuite été utilisée pour caractériser le ralentissement de l'onde par la corrugation sur ligne de Goubau. A cette fin, l'interféromètre est composé d'une branche non corruguée et d'une branche corruguée, comme montré en Figure

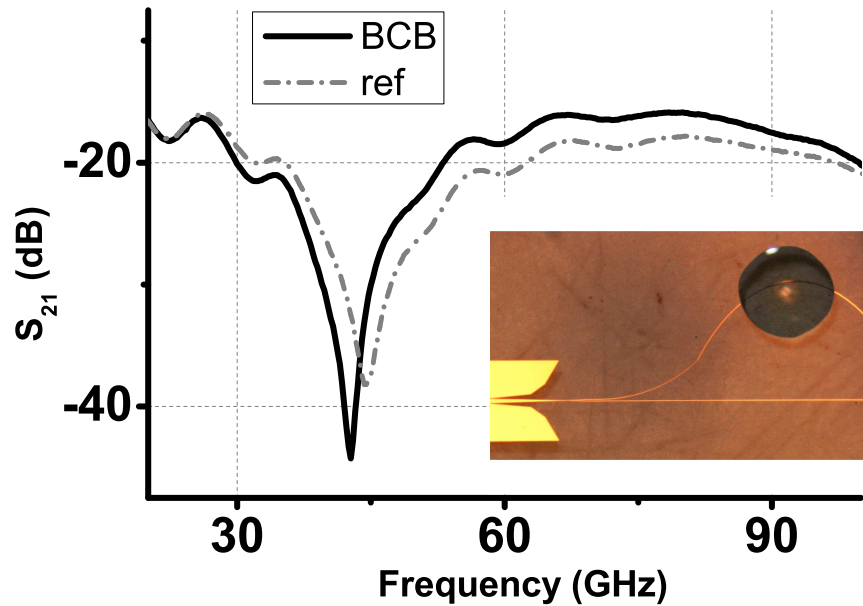


Fig. 4.17 – Transmission de l'interféromètre avec et sans BCB déposé sur une des branches. Décalage du pic d'interférence.

4.18-droite. La longueur d'une branche est  $l = 6.37\text{mm}$ . La transmission de cette structure de 0 à 220GHz est représentée en Figure 4.18-gauche. Un pic d'interférence destructive est obtenu pour  $f_0 \in [72\text{GHz};78\text{GHz}]$ . L'existence de ce pic démontre que les pertes sont quasiment identiques pour les deux branches de l'interféromètre. En considérant  $\Delta n = c/(2f_0l)$ , il vient  $\Delta n \in [0.302;0.327]$ , résultat en accord avec  $\Delta n = 0.31$  déterminé par la méthode de Bianco-Parodi. L'incertitude sur la valeur de  $\Delta n$  provient (i) de la légère différence de pertes entre la ligne corruguée et la ligne simple ainsi que (ii) d'une légère désadaptation d'impédance entre ligne corruguée et ligne simple qui diminuent le contraste des franges d'interférence. Cependant, en considérant l'écart relatif d'indice de réfraction entre la ligne simple  $n_{PGL}$  et la ligne corruguée  $n_{cPGL}$  :  $\Delta n / (n_{PGL} + n_{cPGL}) \sim 7\%$ , la réflexion d'onde à leur interface est faible. Pour le vérifier, la Figure 4.19 montre les signaux transmis et réfléchis à l'interface ligne simple / ligne corruguée. L'amplitude maximale du signal réfléchis est divisée par 10 en comparaison à l'amplitude maximale du signal transmis. La désadaptation d'impédance peut donc être considérée comme négligeable.

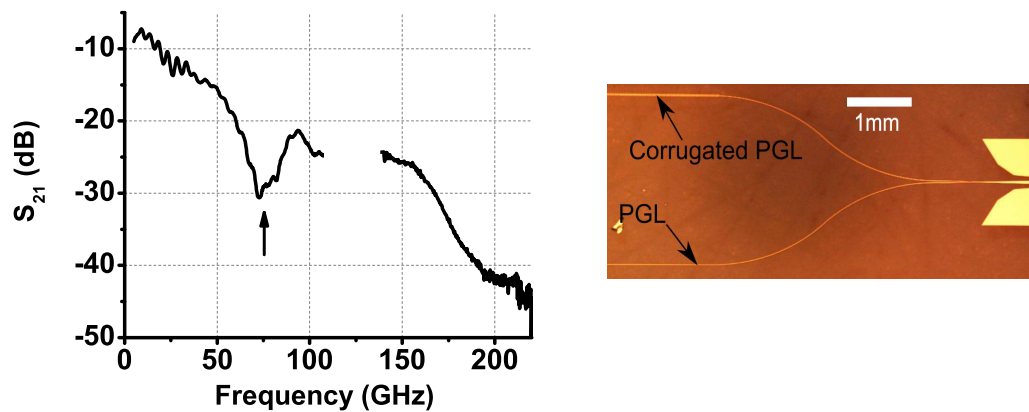


Fig. 4.18 – Transmission de l’interféromètre Goubau composé d’une branche corruguée et d’une branche non corruguée. Visualisation du pic d’interférence destructive.

La cohérence des résultats provenant de la méthode de Bianco Parodi et de la méthode interférométrique valide donc ces deux approches nouvelles pour la caractérisation d’indice de réfraction d’échantillons par technologie Goubau plane dans la bande sub-THz.

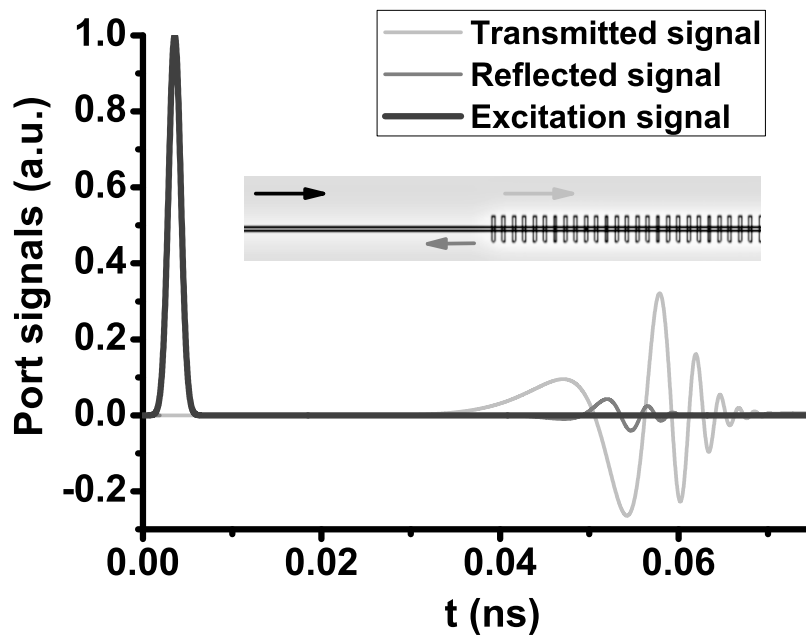


Fig. 4.19 – Signaux incident, réfléchi et transmis à l’interface ligne simple / ligne corruguée. Résultats de simulation.

### Perspectives de l'interféromètre Goubau

La technologie Goubau permet aisément l'accès à des fréquences de l'ordre du THz, sous condition de disposer de sources et détecteurs adéquats. En effet, même si la démonstration expérimentale n'a ici été menée que jusqu'à 220GHz, la simulation présentée en Figure 4.20 montre que des pics d'interférence autour de 1THz sont accessibles grâce à la même topologie. Pour éviter les indésirés modes de substrat, l'épaisseur du substrat a été choisie égale à  $50\mu\text{m}$ . Les dimensions de la structure ont été choisies en utilisant l'équation 4.16. Pour améliorer la sensibilité des mesures, les réflexions multiples apparaissant au niveau du coupleur et du diviseur peuvent être diminuées en insérant une résistance entre les deux branches, en adoptant ici une topologie de type Wilkinson [160, 161]. Enfin, une telle structure pourrait être intégrée dans le BioMEMS THz afin de réaliser des mesures différentielles sur des échantillons biologiques liquides à l'intérieur de microcanaux. Les applications de l'interféromètre Goubau ne se limitent cependant pas aux échantillons biologiques puisque l'étude du BCB a montré qu'il était adapté à la caractérisation diélectrique hautes fréquences de polymères.

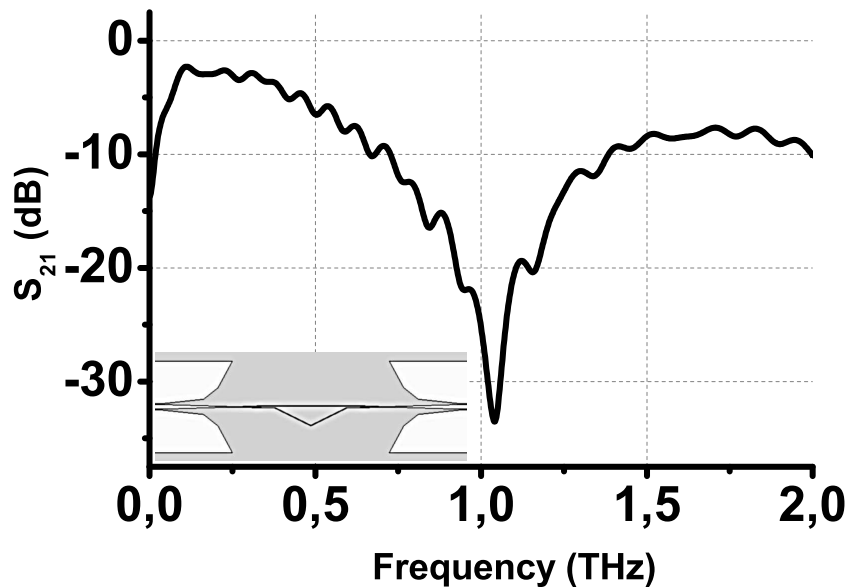


Fig. 4.20 – Transmission et structure d'un interféromètre Goubau autour de 1THz. Résultats de simulation sous CST Microwave Studio.

Deux structures nouvelles en topologie Goubau ont donc été développées et étudiées. D'une part, la corrugation a montré la possibilité de limiter la propagation des modes de substrat et de diminuer la vitesse de propagation de l'onde. Il est à noter que des

structures Goubau corruguées ont déjà été évoquées dans la littérature, mais à des fins de filtrage [162]. D'autre part, la réalisation d'interféromètres a rendu possible la caractérisation de l'indice de réfraction d'échantillons aux fréquences THz. Elles viennent s'ajouter à la librairie grandissante de fonctions sur lignes de Goubau planaires comme les antennes [163], les résonateurs [126], les diviseurs de puissance [161] ou les charges adaptées. L'assemblage de ces briques de base pourrait mener à terme à des applications plus complexes telles que l'intégration de réflectomètres 6-ports directement au sein de microsystèmes THz.

## **II Spécificité de l'écoulement microfluidique**

Comme discuté au début du manuscrit, l'écoulement dans les microcanaux est caractérisé par un comportement laminaire. Les effets visqueux sont prépondérants et le mélange entre produits est essentiellement liée à la diffusion des espèces en solution. En effet, la convection (tourbillons...) est largement minoritaire. De telles propriétés diffèrent des expérimentations classiques à l'échelle du bécher et il est légitime de s'interroger sur leurs conséquences sur les réactions chimiques ou biologiques. Autrement dit, en quoi le confinement de ces réactions dans des micro-réacteurs influe-t-il sur leur déroulement ? De plus, étant donné la versatilité du procédé technologique développé pour le BioMEMS, comment concevoir des géométries de canaux permettant un contrôle des paramètres de réaction ? Des réponses existent dans la littérature à travers la réalisation de fonctions microfluidiques. Mélangeurs, filtres, pompes ont déjà été développés dans des réseaux microfluidiques complexes. La microfluidique, en facilitant la dissipation thermique, permet également de sécuriser des réactions fortement exothermiques. D'autres applications, telle l'étude de la réponse de populations bactériennes à des gradients de concentration dans des microcavités, permettent d'entrevoir de futures développements originaux des microsystèmes fluidiques.

Dans cette section, l'influence du circuit microfluidique développé dans cette thèse sur le déroulement d'une réaction enzymatique a été étudiée. L'étude complète est le travail d'une collaboration avec la thèse de Monsieur Adil Elagli, en cours de réalisation, au laboratoire ProBioGEM de l'Université de Lille 1 et co-encadrée par Messieurs Renato Froidevaux et Bertrand Bocquet. Sa présentation dans ce manuscrit est restreinte à la compréhension des phénomènes microfluidiques et leurs conséquences.



## A Réaction hémoglobine/pepsine dans les microcanaux

### 1 Contexte scientifique et applicatif

Les deux acteurs d'une réaction enzymatique sont une protéine  $S$  (dite substrat) et une enzyme  $E$ . En se rencontrant les deux espèces peuvent former un complexe  $E.S$  qui permet la découpe (hydrolyse) du substrat par l'enzyme. Le complexe  $E.S$  donne donc naissance à des peptides produits  $P$  issus du substrat. Après réaction d'hydrolyse, l'enzyme est à nouveau disponible en solution. La formalisation de cette réaction s'exprime :



Une fois un peptide produit, il peut être resoumis à la même réaction d'hydrolyse pour former des peptides de tailles inférieures. D'un point de vue applicatif, ce type de réactions est notamment utilisé pour la synthèse de peptides fonctionnels. En effet, les peptides produits lors de l'hydrolyse d'un substrat peuvent posséder des propriétés particulières (goût, solubilité, propriétés émulsifiantes, propriétés actives...) [164, 165, 166]. Par exemple, l'hydrolyse de l'hémoglobine mène à la formation de peptides d'activités biologiques diverses : anti-oxydants [167], anti-hypertensif [168], anti-microbiens [169] et opioïdes [170]. L'objectif de ces recherches est d'orienter les réactions enzymatiques afin de "sélectionner" les peptides produits selon l'application désirée. A ces fins, la spécificité de la réaction peut être modulée par l'utilisation de solvants organiques comme des alcools [171], de l'urée ou par un travail en conditions acides [172]. Dans le travail présent, l'objectif est d'étudier l'influence de la configuration microfluidique sur la spécificité de la réaction enzymatique.

### 2 Expérimentation et résultats

La réaction enzymatique entre l'hémoglobine (pH3, 20mg/mL) et la pepsine (0.5mg/mL) a donc été effectuée en milieu "batch" (bécher) et au sein des microcanaux avec des temps de réactions identiques ( $T = 26s$ ). Dans le microsystème, le temps de réaction est défini grâce à la valeur des débits de substrat et d'enzyme égaux à  $1 \mu L/min$ . Le protocole expérimental adopté est présenté en Figure 4.21. Davantage de détails seront donnés dans le manuscrit de thèse de Monsieur Elagli. La réaction est figée après la durée  $T$  grâce à une solution tampon de borate (0.2mol/L, pH10) qui cause la dénaturation de l'enzyme. L'analyse des peptides formés est réalisée grâce à une chromatographie de type "reverse phase" (RP-HPLC sur colonne C4 Vydak 0.46x25cm). Les manipulations expérimentales

et l'analyse des produits sont réalisées par les collègues biochimistes.

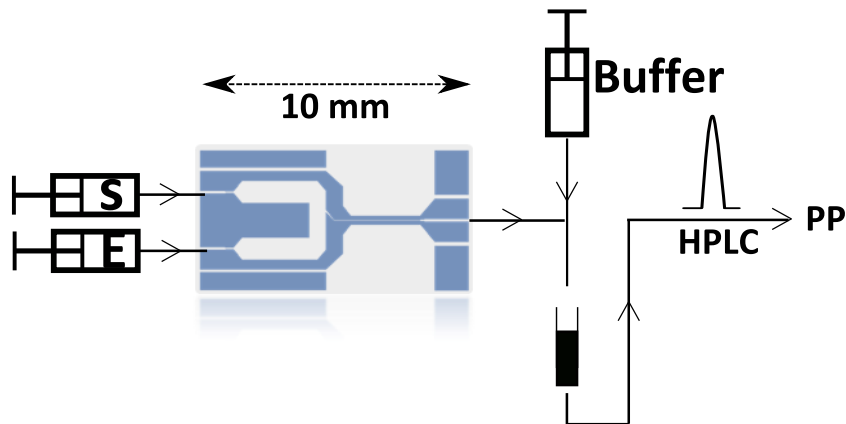


Fig. 4.21 – Protocole expérimental microfluidique pour l'analyse de la réaction enzymatique. PP correspond à "Profil Peptidique".

Les résultats de la chromatographie indiquant la composition de milieu réactif après 30s sont donnés en Figure 4.22. Ce graphique représente la quantité de peptides en fonction du "temps de rétention". Celui-ci est, en première approche, une image de la taille des peptides. Ainsi dans une première analyse, la Figure 4.22 représente la distribution des peptides formés en fonction de leur taille. Une nette différence est observée entre les produits de la réaction en mode microfluidique et en mode batch. En effet, alors que la réaction en mode batch donne naissance à une quantité importante de peptides intermédiaires, la réaction au sein des microcanaux fait apparaître une population de petits peptides et très peu de peptides intermédiaires. La différence entre les deux conditions expérimentales réside, *a priori*, majoritairement dans le type d'écoulement lors de la réaction. Afin d'expliquer les profils obtenus, le paragraphe suivant s'intéresse à l'écoulement au sein des microcanaux lors de la réaction.

### 3 Interprétation

La Figure 4.23 représente les deux configurations expérimentales. Dans le mode batch, les concentrations d'enzyme  $[E]_b$  et de substrat  $[S]_b$  sont supposées uniformes. En mode microfluidique, la simulation de l'écoulement et du mélange par le logiciel COMSOL Multiphysics montre que le mélange entre enzyme et substrat n'est pas immédiat. En effet, dans le microsystème, une interface est visible et est représentée en pointillés. Il apparaît ainsi un "compartiment enzyme" où la concentration en enzyme est  $[E]_{\mu 2} = 2[E]_b$

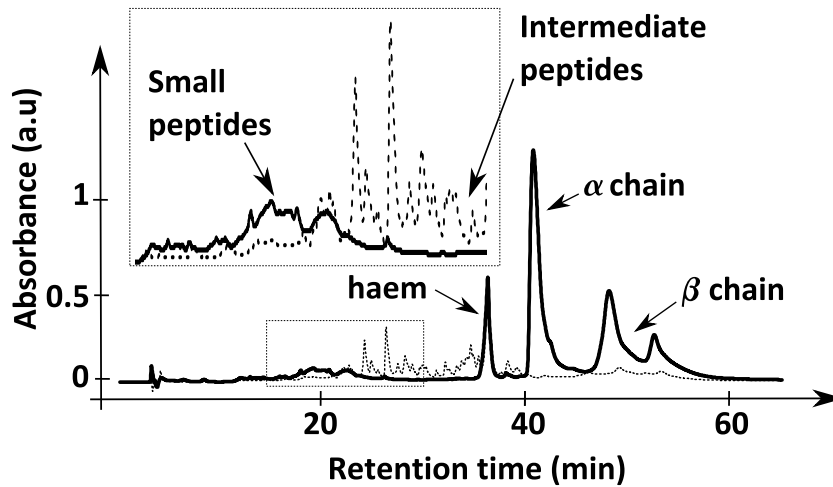


Fig. 4.22 – Chromatogrammes issus de RP-HPLC pour les configurations batch (poinillés) et microfluidique (ligne pleine) après un temps de réaction  $T = 26s$ .

car le volume du compartiment est égal à la moitié du volume total. Au niveau de l'interface, la diffusion moléculaire entraîne une chute de la concentration en enzyme qui devient, en moyenne,  $[E]_{\mu 1} = [E]_b$ . C'est à partir de ce profil de concentration spécifique au sein du microsystème qu'un modèle expliquant les populations peptidiques obtenues a été avancé dans cette thèse.

Pour le mettre en place, la cinétique de la réaction enzymatique doit être considérée. L'équation de la réaction est représentée en Figure 4.23 avec l'indication des constantes cinétiques  $k_1$ ,  $k_2$  et  $k_{cat}$ . Les valeurs de ces constantes définissent les taux et vitesses des réactions associés. Plus de détails théoriques sont accessibles dans la littérature [174], [123]. La description d'une réaction enzymatique est souvent effectuée sous l'hypothèse de Michaelis Menten, supposant la concentration du complexe  $E.S$  comme étant constante. Dans ce cadre, l'évolution de la concentration de produit formé est donnée par :

$$v = \frac{d[P]}{dt} = \frac{k_{cat}[E]_0}{[S] + K_m} [S] \quad (4.21)$$

où  $[E]_0$  est la constante initiale en enzyme et  $K_m = (k_2 + k_{cat})/k_1$  est la constante de Michaelis.  $v$  est appelée vitesse de réaction. Cette expression fait apparaître deux cas asymptotiques :

- si  $[S] \gg K_m$ , la vitesse de réaction est indépendante de la concentration  $[S]$ . Elle est limitée par la concentration en enzyme. Dans cette situation, toutes les molé-

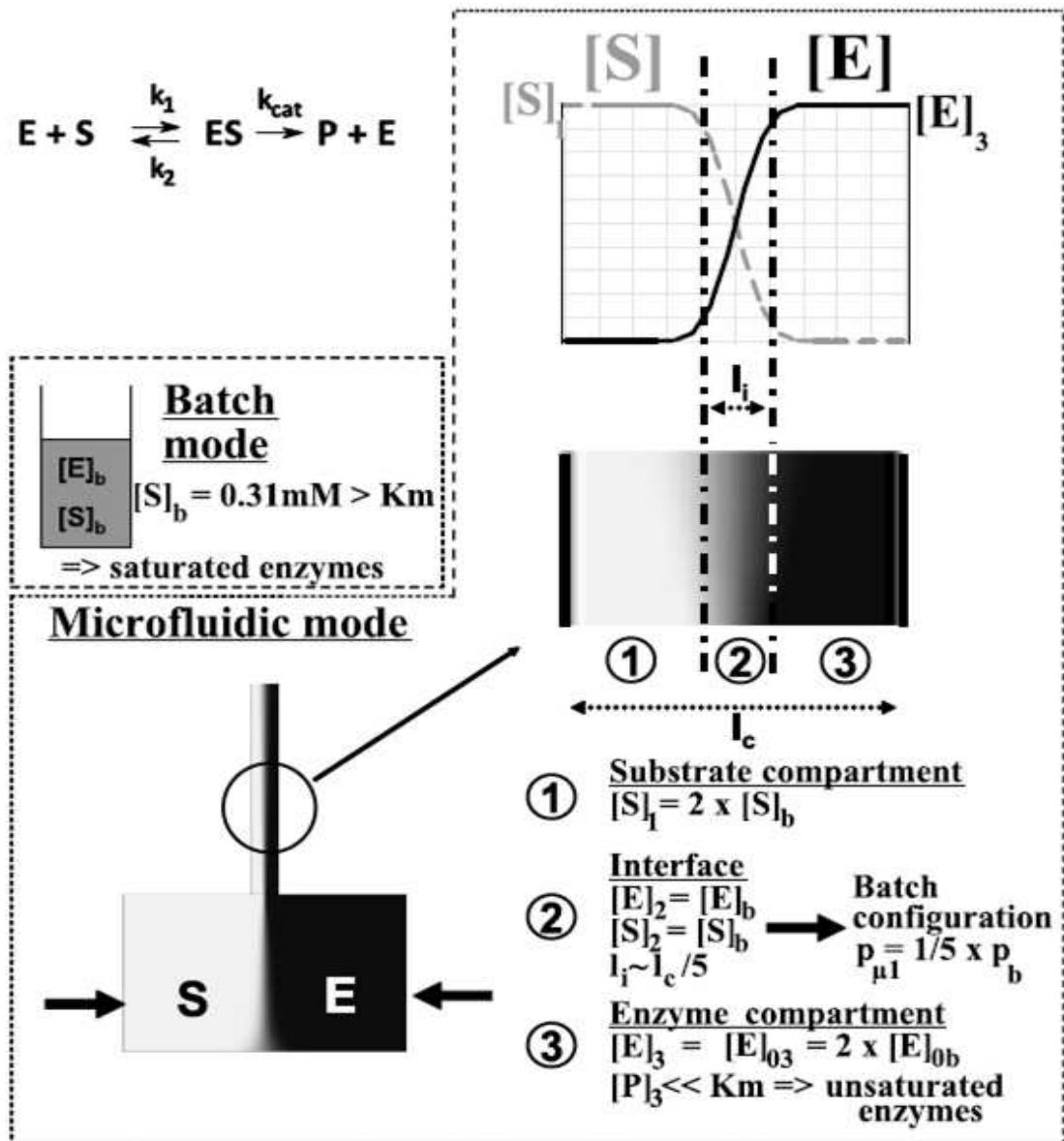


Fig. 4.23 – Modes batch et microfluidique pour la réalisation enzymatique. Profil de concentration au sein du micro-réacteur obtenu par simulation COMSOL Microfluidics. Les coefficients de diffusion pour la simulation sont choisis à  $D = 1.10^{-10}\text{m}^2/\text{s}$ , d'après la formule de Wilke-Chang [173].  $k_1$ ,  $k_2$  et  $k_{cat}$  sont les constantes cinétiques de la réaction [174]. L'interface est définie là où substrats et enzymes sont à une concentration comprise entre 10 et 90% de leur concentration maximale.

cules d'enzyme participent à la réaction ("sont occupées") : les enzymes sont dites "saturées en substrat".

- si  $[S] \ll K_m$ , il y a suffisamment d'enzymes "disponibles" et ainsi, la vitesse de réaction est proportionnelle à la concentration en substrat.

Ces situations vont conduire au développement d'un modèle stochastique sur SciLAB (décrit en Figure 4.24) pour l'explication des chromatogrammes observés. Le modèle développé repose sur les hypothèses suivantes :

- (i) en mode batch, les enzymes sont saturées et toutes les molécules de substrat et de peptides produits ont la même probabilité  $p_b$  de réagir avec une molécule d'enzyme ;
- (ii) en mode microfluidique, la probabilité  $p_{\mu 1}$  qu'une molécule de substrat réagisse avec une enzyme est faible puisque seules les molécules de substrat proches de l'interface peuvent rencontrer une enzyme ; Comme la largeur de l'interface  $l_i$  est environ un cinquième de la largeur du microcanal  $l_c$  et comme les conditions à l'interface sont proches de celles en configuration "batch", il vient  $p_{\mu 1} = p_b/5$ .
- (iii) en revanche, une fois le substrat coupé dans le microcanal, les peptides produits peuvent réagir à nouveau avec l'enzyme avec une probabilité  $p_{\mu 2} \gg p_b$ . En effet, les peptides générés sont situés près de l'interface et, à cause de leur taille plus petite, peuvent diffuser plus facilement vers le "compartiment d'enzyme" où les enzymes sont non saturées ( $[P]_3 \ll K_m$ ) ;
- (iv) la longueur des peptides générés au cours de la réaction enzymatique est aléatoirement choisie entre  $l_0$  (longueur initiale) et  $l_0/25$ , plus petite taille détectée en analyse des peptides produits lors de la réaction par spectrométrie de masse.

L'évaluation des probabilités a été effectuée en adaptant l'équation 4.21. Dans le cas de  $p_b$ , il est obtenu que :

$$p_b \cdot dt = \frac{d[P]_b}{[S]_b} = \frac{k_{cat}[E]_{0b}}{[S]_b + K_m} dt \quad (4.22)$$

où  $[E]_{0b}$  est la concentration initiale en enzyme dans le mode batch.  $K_m$  est choisie à 0.1mM, à partir d'expériences préliminaires sur cette réaction. Dans le mode microfluidique, il a été montré que  $p_{\mu 1} = p_b/5$  en raison de la largeur de l'interface. De plus, la probabilité  $p_{\mu 2}$  de l'hydrolyse d'un produit dans le "compartiment d'enzymes" est donnée par :

$$p_{\mu 2} \cdot dt = \frac{k_{cat}[E]_{03}}{K_m + [P]_3} dt \sim \frac{k_{cat}[E]_{03}}{K_m} dt = 2 \cdot \frac{k_{cat}[E]_{0b}}{K_m} dt \quad (4.23)$$

car :

- toutes les molécules d'enzyme sont non saturées dans le compartiment d'enzymes ( $K_m \gg [P]_3$ ) ;

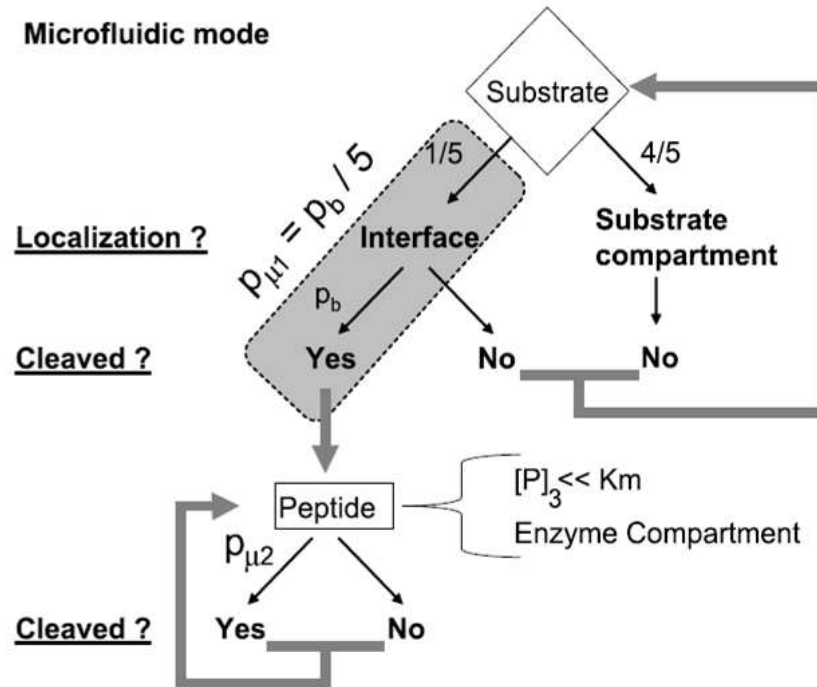


Fig. 4.24 – Algorithme développé pour simuler l’hydrolyse de l’hémoglobine dans les microcanaux

- la concentration initiale en enzymes dans le compartiment d’enzymes est  $[E]_{03} = 2.[E]_{0b}$  car le volume du compartiment enzyme est égal à la moitié du volume du microréacteur complet.

Ces probabilités déterminées, un algorithme Scilab (Figure 4.24) a été écrit pour prédire la composition en peptides des milieux batch et microfluidique. A l’instant initial, les solutions sont composées d’enzymes et de  $N_0$  molécules de substrat de longueur  $l_0$ . A chaque pas de temps  $dt$ , les molécules de substrat et les peptides produits peuvent être hydrolysés par une enzyme avec les probabilités définies précédemment. Après  $T = 30s$ , les profils peptidiques obtenus par le modèle sont donnés en Figure 4.25, pour  $k_{cat} = 0.5s^{-1}$ . Trois points principaux sont en bon accord avec la Figure 4.22 :

- en mode microfluidique, les peptides intermédiaires sont négligeables par rapport au mode batch ;
- après le même temps de réaction, il y a plus de petits peptides obtenus en mode microfluidique qu’en mode batch ;
- les molécules de substrat initiales sont davantage consommées en mode batch qu’en microfluidique.

Cependant, l'apparition de petits peptides en mode batch est surestimée par le modèle. L'explication peut résider dans les hypothèses (i) et (iv). En effet, la probabilité  $p_b$  doit probablement dépendre de la taille des peptides et il existe des sites de coupures préférentiels au sein des chaînes peptidiques. Néanmoins, le modèle développé ici permet une première explication simple de la différence de spécificité entre les modes batch et microfluidique, basée essentiellement sur la différence d'écoulement au sein des deux réacteurs.

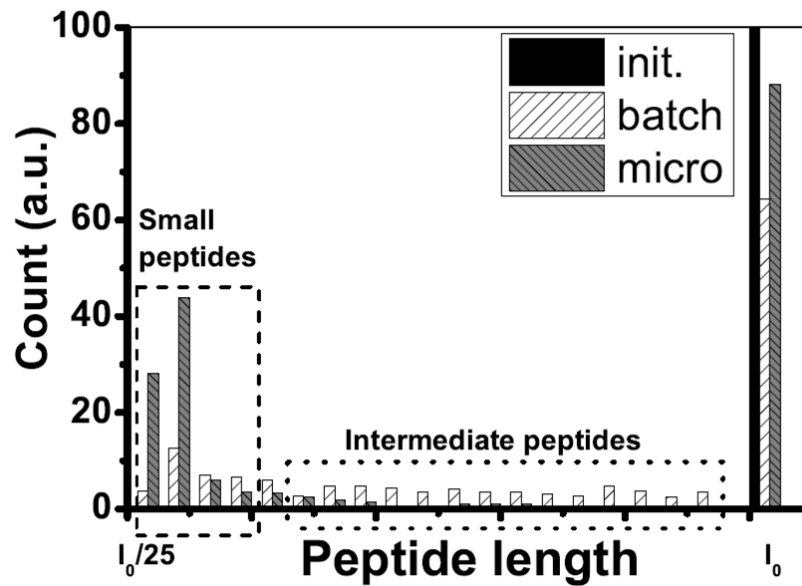


Fig. 4.25 – Populations peptidiques en modes microfluidique et batch après un temps de réaction  $T = 26s$ . Résultats du modèle stochastique de simulation Scilab.

De nouvelles expérimentations sont dorénavant nécessaires, avec des conditions de débit, température et pH différentes afin d'établir l'influence de ces paramètres sur les chromatogrammes mesurés et de tester la robustesse du modèle à d'autres configurations expérimentales. La mesure in-situ par spectroscopie THz devra aussi être envisagée et sa complémentarité avec la chromatographie RP-HPLC pourra être étudiée. A des fins de filtrage des peptides produits, il est envisageable de concevoir des filtres de type "filtre H" pour discriminer les peptides en fonction de leur taille. Au delà de ce tri de peptides, la combinaison du microsystème avec la propagation électromagnétique pourra permettre l'étude de réactions enzymatiques sous rayonnement THz. En excitant l'eau d'hydratation des enzymes, on peut en effet imaginer obtenir des produits de réaction enzymatique différents avec ou sans irradiation THz. De même, l'étude de l'influence de la fréquence et de la puissance de l'irradiation pourront être menées.

## **B Mélangeurs passifs dans les microcanaux**

La versatilité du procédé technologique permet de réaliser des circuits microfluidiques variés. Dans cette partie, deux réalisations de mélangeurs sont présentées à titre d'exemple. Ils visent avant tout à montrer la possibilité d'intégration de fonctions microfluidiques au sein du BioMEMS.

Comme démontré dans la section précédente, le caractère laminaire de l'écoulement microfluidique amène à considérer la notion de mélange de réactifs au sein de microréacteurs. En effet, contrairement aux expérimentations batch où la convection permet une homogénéisation immédiate, le mélange en microréacteurs est le fruit de l'agitation brownienne des molécules : la diffusion. La diffusion d'une espèce en solution est caractérisée par le coefficient de diffusion  $D$ . Dans un microcanal de longueur caractéristique  $L$ , le temps nécessaire à la diffusion pour permettre le mélange est de l'ordre de  $\tau_m = L^2/D$ . Pour que les réactifs soient mélangés en sortie d'un microréacteur (et donc que la réaction puisse avoir lieu), il faut que le temps de séjour du fluide dans le microréacteur soit supérieur au temps de mélange. A titre informatif, le rapport entre ces deux nombres est appelé "nombre de Péclet" et vaut :

$$Pe = \frac{L \cdot v}{D} \quad (4.24)$$

où  $v$  est la vitesse caractéristique du fluide dans le canal. A temps de diffusion donné, l'augmentation du temps de séjour passe par la diminution des débits des espèces à mélanger ou bien l'allongement du microréacteur. Cet allongement dans une puce microfluidique de surface réduite peut s'effectuer par la réalisation de serpentins ou de spirales, réalisés et simulés en Figure 4.26. Grâce à ces structures, l'efficacité de mélange pour une surface donnée peut-être améliorée. L'impact de ces mélangeurs sur les réactions enzymatiques étudiées précédemment est actuellement une préoccupation de la thèse de Monsieur Adil Elagli.

Dire que la convection est absente des investigations microfluidiques est en réalité abusif. En effet, la simulation de l'efficacité de mélange du microréacteur en fonction du débit pour une "structure en Y" donnée est représentée en Figure 4.27. Aux bas nombres de Reynolds (bas débits), l'efficacité du mélange chute avec l'augmentation du débit en raison de la diminution du temps de séjour dans les microcanaux. Cependant, pour des



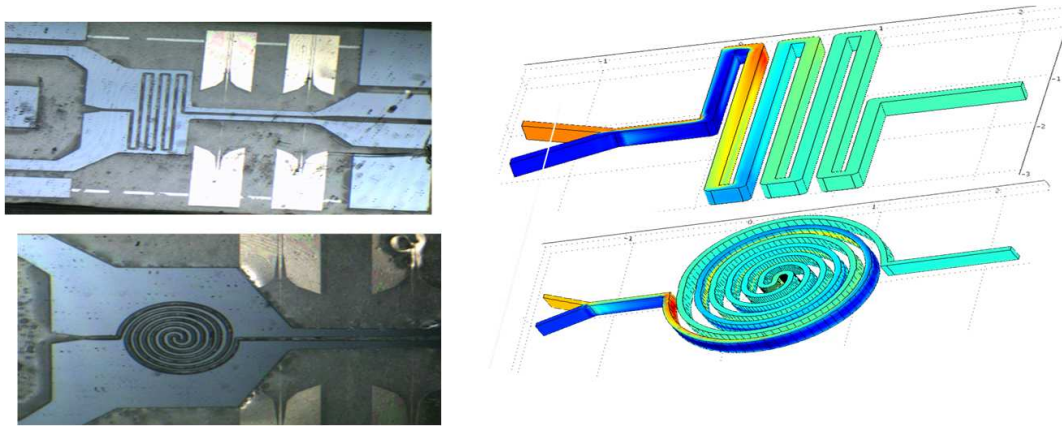


Fig. 4.26 – Réalisation et simulation des mélangeurs spirale et serpentin microfluidiques.

débits plus élevés, le caractère laminaire de l'écoulement s'étiole et des recirculations convectives (tourbillons...) peuvent exister. Ainsi, dans la littérature, des exemples de micro-mélangeurs existent pour favoriser l'apparition de ce "chaos" à de plus faibles débits. L'utilisation de microcanaux définis dans les trois dimensions, la corrugation des murs des microcanaux ou la présence d'obstacles ont été testés avec un certain succès. Cependant, dans les conditions expérimentales autorisées dans le cas présent (débit  $< 50\mu\text{L}/\text{min}$ , en raison des pousse-seringue) et du procédé technologique (structuration 3D impossible), la réalisation de simulations sous COMSOL montre que ces composants ne parviennent pas à une amélioration significative de l'efficacité de mélange par rapport au serpentin et à la spirale.

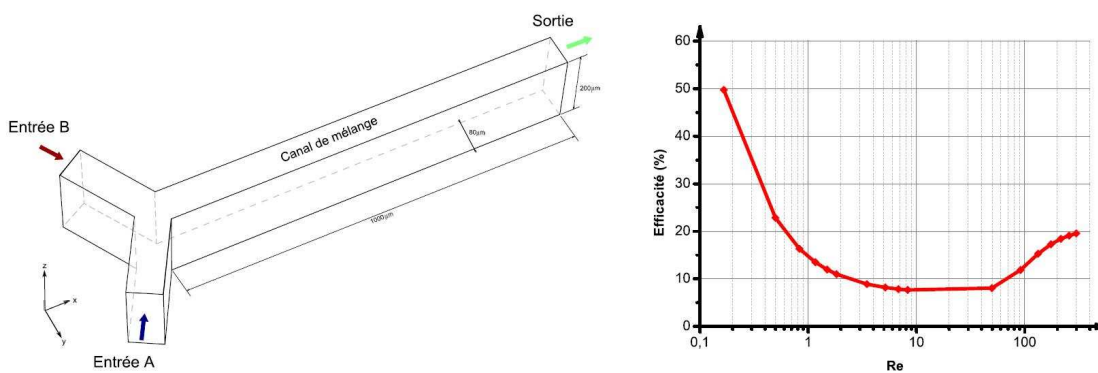


Fig. 4.27 – Efficacité de mélange en fonction du nombre de Reynolds pour une "jonction Y". Résultats de simulation sous COMSOL Multiphysics.

Ce seront donc ces deux dernières structures qui seront retenues et l'influence de chacune d'elle sur le déroulement de réactions (bio)chimiques, au regard des premiers résultats sur la réaction hémoglobine/pepsine, est une perspective d'étude.

### **Conclusion**

En s'appuyant sur les possibilités offertes par le procédé technologique en terme d'indépendance et de versatilité des fonctions électromagnétiques et microfluidiques, diverses structures ont été conçues, réalisées et caractérisées. D'un point de vue électromagnétique, des corrugations sur lignes de Goubau planaires ont permis un meilleur confinement et la diminution des modes de substrat. Elles ont également mis en évidence la possibilité de ralentir l'onde THz et ouvert la porte à la conception de déphaseurs. Pour améliorer la caractérisation des échantillons en terme de phase, deux méthodes instrumentales ont été validées en simulation et expérimentalement. La première est l'adaptation de la méthode de Bianco Parodi à la topologie Goubau et la seconde est l'intégration d'un interféromètre Mach Zehnder THz. La capacité de mesurer l'indice de réfraction d'échantillons aux fréquences sub-THz et THz a été démontrée. Les spécificités des circuits microfluidiques ont aussi été investiguées. A travers le suivi d'une réaction enzymatique, l'influence de l'écoulement microfluidique sur la cinétique réactionnelle a été mise en évidence et demande des approfondissements. Par exemple, le test de mélangeurs serpentin et spirale, déjà réalisés et simulés, doit être effectué.

Ces fonctions ne sont encore que des briques de base qui pourront être assemblées à l'avenir dans un unique microsystème construit selon le procédé technologique développé dans la Partie 2. L'intégration de filtres diffusionnels (filtres H), de pompes intégrées, de capteurs et régulateurs de températures sont autant de voies envisageables pour améliorer le contrôle de réactions directement au sein du microsystème.

## Conclusion et perspectives

L'utilisation des outils de microfabrication a permis la conception d'un système dédié à l'analyse quantitative des liquides par spectroscopie THz.

Le couplage intégré des circuits microfluidique et électromagnétique permet la réduction des tailles des échantillons et ainsi la mesure par transmission de leur absorption en fonction de la fréquence. Cette co-intégration est de surcroit versatile : les deux circuits peuvent être dessinés indépendamment et leurs modifications ne modifient pas les étapes de fabrication. Ceci résulte d'une originalité au sein du procédé de microfabrication, où l'assemblage des substrats est réalisé avant la gravure des microcanaux. La formation de microcanaux à murs fins ( $200\mu\text{m}$ ), qualité nécessaire à la mesure d'absorption, est une autre conséquence de ce procédé. Dans cette configuration, la tenue en pression des canaux est très satisfaisante, avec une pression supportée de l'ordre de 35 bars sans apparition de fuites. En terme d'intégration, 23 microsystèmes peuvent être réalisés sur des substrats de 3 pouces grâce au procédé actuel.

L'analyse de liquides au sein du microsystème a été menée dans la bande sub-THz grâce à un Analyseur de Réseau Vectoriel dédié aux fréquences allant jusque 110GHz. La mesure de transmission de solutions eau/alcool en fonction de la concentration en alcool a été menée. Les absorptions correspondantes ont été déduites et ont permis de montrer que le microsystème permettait la caractérisation de l'interaction entre les molécules d'eau et les molécules d'alcool : l'hydratation. La longueur de cette interaction et le nombre de molécules d'eau dont le comportement est modifié par la présence d'une molécule d'alcool (nombre d'hydratation) ont pu être déterminés à partir des mesures à une fréquence donnée. La validation du protocole de mesure et de la méthode d'inversion des données ont été validées par la réalisation de simulations en Dynamique Moléculaire, retrouvant la longueur d'interaction et le nombre d'hydratation.

Afin d'aller plus loin dans la caractérisation de l'hydratation, l'utilisation d'algorithmes plus avancés a ensuite été envisagée. Ceux-ci nécessitent une haute reproductibilité des mesures effectuées et a engendré une étude approfondie du protocole de mesure dans laquelle les différentes variances expérimentales ont été caractérisées. Une stratégie de mesure a ensuite été mise au point, de manière à minimiser les incertitudes. Avec ce nouveau protocole, des sensibilités en absorption de l'ordre de 2mg/mL pour des solutions eau/éthanol et de 5mg/mL pour des solutions eau/protéine sont obtenues. Ces valeurs correspondent à l'état de l'art des dispositifs usuels (échelle macroscopique) dédiés à la spectroscopie THz. En revanche, elles améliorent sensiblement l'état de l'art des systèmes microfluidiques THz. La plus-value en sensibilité réside dans la co-intégration de lignes électromagnétiques et des microcanaux ainsi que dans l'utilisation d'Analyseurs de Réseau.

Les mesures effectuées avec ce nouveau protocole et leur couplage avec les techniques algorithmiques avancées de chimométrie ont permis, en analysant toutes les fréquences du jeu de données, la détection de deux comportements spectraux distincts dans l'interaction eau/éthanol. Deux couches d'hydratation distinctes sont observées : les molécules d'eau à proximité de l'éthanol voient leur absorption fortement chuter en raison de leur interaction forte, alors que celles qui sont un peu plus éloignées voient leur absorption chuter modérément. L'évolution des concentrations de chaque couche en fonction de la concentration d'éthanol et celle de leurs spectres d'absorption ont pu être observées. Pour valider les conclusions tirées de cette étude expérimentale, des simulations en Dynamique Moléculaire ont été menées et confirment largement les résultats obtenus.

L'amélioration de la compréhension des phénomènes observés dans le microsysteme a ensuite permis l'analyse sur protéines. En mesurant l'absorption de solutions eau/protéines en fonction de la concentration en protéines (détection à 5mg/mL), le nombre de molécules d'eau d'hydratation compris dans la première couche a pu être déterminé pour la BSA, la lysozyme et la chymotrypsine, en bon accord avec d'autres résultats expérimentaux présents dans la littérature.

L'hydratation d'une protéine est corrélée au dépliement de cette protéine dans l'espace et donc à sa conformation. Dans ce cadre, l'analyse de la variation de l'hydratation en fonction du pH de la solution, de sa concentration en ions, ou de la température sont des mesures qui devront être réalisées au sein du microsysteme. Leur analyse avec des

outils chimométriques devrait permettre la distinction de modifications subtiles au sein des couches d'hydratation en fonction de ces paramètres, ainsi que des modifications de conformation de la protéine. De plus, en comparaison aux techniques expérimentales macroscopiques, les mesures d'interactions et de conformation peuvent ici être dynamiques grâce à l'utilisation d'un microsysteme. En effet, plutôt que d'injecter successivement des solutions de pH différents contenant la protéine d'étude, la circulation microfluidique pourrait permettre, par le contrôle en temps réel des injections (pression/débit), une modulation en temps réel du pH dans les microcanaux. Des techniques instrumentales avancées, comme une modulation sinusoïdale du pH (variation sinusoïdale du débit) pourraient alors mener, comme dans le cas de la détection synchrone en électronique, à une métrologie fiable et sensible grâce à l'utilisation de microsystemes fluidiques.

De plus, le rapport surface/volume augmenté en configuration microfluidique favorise les phénomènes diffusifs. Ainsi, les temps des régimes transitoires de chauffage sont considérablement réduits et sont quasi-instantanés. La réponse de l'absorption d'une solution protéique suite à un échelon de température pourrait alors être observée. Là encore, c'est la spécificité de l'écoulement microfluidique qui permet l'émergence de nouvelles opportunités en terme de caractérisation expérimentale, et qui n'est encore ici qu'à ses prémices.

Il est à noter que les nouvelles fonctions nécessaires à ces fins (contrôle instantané du débit et de la température) peuvent être directement intégrées au microsysteme existant, sans modification du procédé technologique. Par exemple, le contrôle du débit peut être réalisé par l'intégration de pompes électro-osmotiques et le contrôle de température par l'intégration de résistances chauffantes et de capteurs thermiques. Des premières expérimentations ont été menées pour y parvenir et ont fourni des résultats encourageants.

Un autre axe de recherche est l'augmentation de la complexité biologique des systèmes étudiés. Après l'étude d'alcools et de protéines diluées en solution, l'étude de réactions enzymatiques ou l'analyse de cellules pourraient être réalisées. Une thèse interdisciplinaire est actuellement en cours dans laquelle Monsieur Adil Elagli étudie des réactions enzymatiques au sein du microsysteme. Il a déjà été montré que le caractère laminaire de l'écoulement microfluidique menait à des sélectivités de réactions différentes par rapport à des réactions effectuées en volume macroscopique. L'évolution de la réaction enzyme/protéine en temps réel doit maintenant être visualisée par spectroscopie THz afin de

déterminer les entités et paramètres observables. Plus encore, l'influence du rayonnement THz comme outil de pilotage en temps réel de la sélectivité de la réaction devra être étudié. En ce qui concerne l'étude de cellules au sein du dispositif, la croissance cellulaire au sein du microsysteme placé en étuve a déjà été démontrée. Une fois la régulation de température intégrée dans les microcanaux, la spectroscopie THz de cultures cellulaires pourra être menée en temps réel. Différentes lignées mutantes pourront être analysées et des différences en terme de réponse THz pourraient apparaître. En effet, diverses lignées cellulaires présentent des protéines membranaires différentes. Il est envisageable de les discriminer au sein du microsysteme.

L'augmentation de la complexité au sein des liquides sondés sera plus facilement analysée si le jeu de données obtenu par le microsysteme est lui-même augmenté. A cet effet, l'augmentation des fréquences d'investigation jusque 325GHz semble désormais accessible par la levée du verrou que représentaient les modes de substrat. En effet, il était difficile de monter au-delà de 180GHz avec le dispositif en raison du détachement de l'onde de la ligne de Goubau au profit d'une propagation dans le substrat. L'utilisation de lignes de Goubau corruguées, en renforçant le couplage onde/ligne permet d'envisager dorénavant une montée en fréquence plus aisée. A plus hautes fréquences encore, le couplage d'un spectromètre THz avec la ligne de Goubau est aussi envisageable afin de monter à une propagation guidée de quelques THz dans le microsysteme.

Enfin, d'un point de vue plus fondamental, il est nécessaire de compléter la caractérisation des échantillons liquides par une mesure de leur indice de réfraction en fonction de la fréquence. Cette donnée, couplée avec la mesure d'absorption, caractérise de manière exhaustive le comportement diélectrique de l'échantillon. Elle est donc susceptible d'apporter des informations supplémentaires sur la structure moléculaire des liquides observés. Pour la réaliser, une première étape a été franchie en réalisant des structures différentielles pour l'analyse de l'indice de réfraction. En effet, l'interféromètre Goubau planaire ainsi que la méthode de Bianco Parodi ont été appliqués avec succès pour la caractérisation de milieux faiblement absorbant. Il s'agit maintenant de les intégrer dans un microsysteme et de voir leurs performances expérimentales lors de l'étude de solutions aqueuses fortement absorbantes.

Ainsi, l'ensemble de ce faisceau théorique, expérimental et d'exploitation de données est susceptible de définir une véritable métrologie dans le domaine électromagnétique complexe que sont les THz.





# Bibliographie

- [1] K. E. van Holde. Reflections on a century of protein chemistry. *Biophysical Chemistry*, 100(1-3) :71 – 79, 2003.
- [2] S.P.L Sorensen. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg*, 12 :1–372, 1917.
- [3] R. Pethig. Protein-water interactions determined by dielectric methods. *Annual Review of Physical Chemistry*, 43 :177–205, 1992.
- [4] A. Schonhals. Dielectric spectroscopy on the dynamics of amorphous polymeric systems. *Novocontrol - Application Note Dielectrics*, 1, 1998.
- [5] P. Debye. Part i. dielectric constant. energy absorption in dielectrics with polar molecules. *Trans. Faraday Soc.*, 30 :679–684, 1934.
- [6] F. Kremer and A. Schonhals. *Broadband Dielectric Spectroscopy*. Springer, 2003.
- [7] .S Havriliak and S. Negami. A complex plane analysis of alpha-dispersions in some polymer systems. *Journal of Polymer Science Part C-polymer Symposium*, (14PC) :99, 1966.
- [8] E. H. Grant and R. J. Sheppard. Dielectric relaxation in water in the neighborhood of 4°c. *The Journal of Chemical Physics*, 60(5) :1792–1796, 1974.
- [9] P. K. Dixon, L. Wu, S. R. Nagel, B. D. Williams, and J. P. Carini. Scaling in the relaxation of supercooled liquids. *Physical Review Letters*, 65(9) :1108–1111, August 1990.
- [10] P. G. Debenedetti and F. H. Stillinger. Supercooled liquids and the glass transition. *Nature*, 410(6825) :259–267, March 2001.
- [11] R. Brand, P. Lunkenheimer, and A. Loidl. Relaxation dynamics in plastic crystals. *The Journal of Chemical Physics*, 116(23) :10386–10401, 2002.
- [12] E. H. Grant, V. E. R. McClean, N. R. V. Nightingale, R. J. Sheppard, and M. J. Chapman. Dielectric behavior of water in biological solutions : Studies on myoglobin, human low-density lipoprotein, and polyvinylpyrrolidone. *Bioelectromagnetics*, 7(2) :151–162, 1986.

- [13] N. Nandi and B. Bagchi. Dielectric relaxation of biological water. *Journal of Physical Chemistry B*, 101(50) :10954–10961, December 1997.
- [14] A. Oleinikova, P. Sasisanker, and H. Weingartner. What can really be learned from dielectric spectroscopy of protein solutions ? a case study of ribonuclease a. *The Journal of Physical Chemistry B*, 108(24) :8467–8474, June 2004.
- [15] T. Sato and R. Buchner. Dielectric relaxation spectroscopy of 2-propanol-water mixtures. *Journal of Chemical Physics*, 118(10) :4606–4613, March 2003.
- [16] T. Sato and R. Buchner. Dielectric relaxation processes in ethanol/water mixtures. *Journal of Physical Chemistry A*, 108(23) :5007–5015, June 2004.
- [17] U. Moller, D. G. Cooke, K. Tanaka, and P. U. Jepsen. Terahertz reflection spectroscopy of debye relaxation in polar liquids [invited]. *Journal of the Optical Society of America B-optical Physics*, 26(9) :A113–A125, September 2009.
- [18] A. G. Markelz. Terahertz dielectric sensitivity to biomolecular structure and function. *Ieee Journal of Selected Topics In Quantum Electronics*, 14(1) :180–190, 2008.
- [19] Y. I. Khurgin, V. A. Kudryashova, and V. A. Zavizion. Absorption millimeter wave spectroscopy : Intermolecular interactions and hydration. *Radiotekhnika I Elektronika*, 41(6) :737–743, 1996.
- [20] B. Born and M. Havenith. Terahertz dance of proteins and sugars with water. *Journal of Infrared Millimeter and Terahertz Waves*, 30(12) :1245–1254, 2009.
- [21] T. Arikawa, M. Nagai, and K. Tanaka. Characterizing hydration state in solution using terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 457(1-3) :12 – 17, 2008.
- [22] D. M. Leitner, M. Gruebele, and M. Havenith. Solvation dynamics of biomolecules : modeling and terahertz experiments. *Hfsp Journal*, 2(6) :314–323, December 2008.
- [23] Matthias Heyden and Martina Havenith. Combining thz spectroscopy and md simulations to study protein-hydration coupling. *Methods*, 2010.
- [24] S. Ebbinghaus, S. J. Kim, M. Heyden, X. Yu, U. Heugen, M. Gruebele, D. M. Leitner, and M. Havenith. An extended dynamical hydration shell around proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(52) :20749–20752, December 2007.

- [25] I. Michalarias, X. L. Gao, R. C. Ford, and J. C. Li. Recent progress on our understanding of water around biomolecules. *Journal of Molecular Liquids*, 117(1-3) :107–116, March 2005.
- [26] H. Frauenfelder, G. Chen, J. Berendzen, P. W. Fenimore, H. Jansson, B. H. McMahon, I. R. Stroe, J. Swenson, and R. D. Young. A unified model of protein dynamics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(13) :5129–5134, March 2009.
- [27] H. Frauenfelder, S. G. Sligar, and P. G. Wolynes. The energy landscapes and motions of proteins. *Science*, 254(5038) :1598–1603, December 1991.
- [28] H. Frauenfelder, B. H. McMahon, and P. W. Fenimore. Myoglobin : The hydrogen atom of biology and a paradigm of complexity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(15) :8615–8617, July 2003.
- [29] H. Frauenfelder, P. G. Wolynes, and R. H. Austin. Biological physics. *Reviews of Modern Physics*, 71(2) :S419–S430, March 1999.
- [30] P. W. Fenimore, H. Frauenfelder, B. H. McMahon, and R. D. Young. Bulk-solvent and hydration-shell fluctuations, similar to alpha- and beta-fluctuations in glasses, control protein motions and functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(40) :14408–14413, October 2004.
- [31] L. Y. Zhang, L. J. Wang, Y. T. Kao, W. H. Qiu, Y. Yang, O. Okobiah, and D. P. Zhong. Mapping hydration dynamics around a protein surface. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(47) :18461–18466, November 2007.
- [32] M. Tonouchi. Cutting-edge terahertz technology. *Nature Photonics*, 1(2) :97–105, 2007.
- [33] Lippens D. Sources et détecteurs aux fréquences térahertz. *Techniques de l'ingénieur*, 5(Re 73) :1–12, 2007.
- [34] R. Van Zyl, W. Perold, and R. Botha. The gunn-diode : fundamentals and fabrication. In *Communications and Signal Processing, 1998. COMSIG '98. Proceedings of the 1998 South African Symposium on*, pages 407–412, sep 1998.
- [35] Simone Montanari, Arno Förster, Mihail Ion Lepsa, and Hans Lüth. High frequency investigation of graded gap injectors for gas gun diodes. *Solid-State Electronics*, 49(2) :245 – 250, 2005.

- [36] G. Chattopadhyay. Technology, capabilities, and performance of low power terahertz sources. *IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology*, 1(1) :33–53, 2011.
- [37] N. C. Kluksdahl, A. M. Kriman, D. K. Ferry, and C. Ringhofer. Self-consistent study of the resonant-tunneling diode. *Phys. Rev. B*, 39 :7720–7735, Apr 1989.
- [38] Figueiredo J.M.L. *Optoelectronic properties of Resonant Tunnelling Diodes*. PhD thesis, Faculdade de Ciencias do Porto, 2000.
- [39] J.H. Davies. *The physics of low-dimensional semiconductors : an introduction*. Cambridge University Press, 1998.
- [40] A. Maestrini, B. Thomas, H. Wang, C. Jung, J. Treuttel, Y. Jin, G. Chattopadhyay, I. Mehdi, and G. Beaudin. Schottky diode-based terahertz frequency multipliers and mixers. *Comptes Rendus Physique*, 11(7–8) :480–495, 2010.
- [41] P.H. Siegel. Terahertz technology. *Microwave Theory and Techniques, IEEE Transactions on*, 50(3) :910–928, mar 2002.
- [42] R. Dupuis. An introduction to the development of the semiconductor laser. *Quantum Electronics, IEEE Journal of*, 23(6) :651–657, jun 1987.
- [43] Russell D. Dupuis. The diode laser : The first 30 days, 40 years ago. *Opt. Photon. News*, 15(4) :30–35, Apr 2004.
- [44] Jerome Faist, Federico Capasso, Deborah L. Sivco, Carlo Sirtori, Albert L. Hutchinson, and Alfred Y. Cho. Quantum cascade laser. *Science*, 264(5158) :553–556, 1994.
- [45] Federico Capasso, Claire Gmachl, Deborah L. Sivco, and Alfred Y. Cho. Quantum cascade lasers. *Physics Today*, 55(5) :34–40, 2002.
- [46] E.R. Brown, F.W. Smith, and K.A. McIntosh. Coherent millimeter-wave generation by heterodyne conversion in low-temperature-grown gas photoconductors. *Journal of Applied Physics*, 73 :1480, 1993.
- [47] B. Ferguson and X.-C. Zhang. Materials for terahertz science and technology. *Nature Materials*, 1 :26–33, 2002.
- [48] C.A. Schmuttenmaer. Exploring dynamics in the far-infrared with terahertz spectroscopy. *Chemical Reviews*, 104 :1759–1779, 2004.
- [49] J.L. Coutaz, L. Duvillaret, and F. Garet. Les ondes térahertz : techniques optoélectroniques temporelles. *Revue de l'Electricité et de l'Electronique*, 5, 1999.

- [50] T.G. Phillips and J. Keene. Submillimeter astronomy. *Proceedings of the IEEE*, 80(11) :1664–1678, 1992.
- [51] Th. De Graw *et al.* The herschel-heterodyne instrument for the far-infrared (hifi). *Astronomy and Astrophysics*, 518(L6), 2010.
- [52] J.W. Waters. Submillimeter-wavelength heterodyne spectroscopy and remote sensing of the upper atmosphere. *Proceedings of the IEEE*, 80(11) :1679–1701, 1992.
- [53] M.C. Gaidis. Space-based applications of far-infrared systems. *8th International Conference on Terahertz Technology, Darmstadt, Germany*, 2000.
- [54] D.T. Petkie, T.M. Goyette, R.P.A. Bettens, S.P. Belov, S. Albert, P. Helminger, and F.C. De Lucia. A fast scan submillimeter spectroscopic technique. *Review of Scientific Instruments*, 68(4) :1675–1683, 1997.
- [55] S. Albert, D.T. Petkie, R.P.A. Bettens, S.P. Pelov, and F.C. De Lucia. Fsst : A new gas-phase analytical tool. *Analytical Chemistry News and Features*, pages 719A–727A, nov 1998.
- [56] J.F. Federici, B. Schulkin, F. Huang, D. Gary, R. Barat, F. Oliveira, and D. Zimdars. Thz imaging and sensing for security applications-explosives, weapons and drugs. *Semiconductor Science and Technology*, 20 :S266–S280, 2005.
- [57] R. Appleby and H. Bruce Wallace. Standoff detection of weapons and contraband in the 100 ghz to 1 thz region. *IEEE Transactions on antennas and Propagation*, 55(11), 2007.
- [58] C. Jördens and M. Koch. Detection of foreign bodies in chocolate with pulsed terahertz spectroscopy. *Optical Engineering*, 47(3) :037003, 2008.
- [59] C. Jansen, S. Wietzke, O. Peters, M. Scheller, N. Vieweg, N. Salhi, M. Krumbholz, C. Jördens, T. Hochrein, and M. Koch. Terahertz imaging : applications and perspectives. *Applied Optics*, 49(19) :E48–E57, 2010.
- [60] S. Wietzke, C. Jansen, F. Rutz, D.M. Mittleman, and M. Koch. Determination of additive content in polymeric compounds with terahertz time-domain spectroscopy. *Polymer Testing*, 26(5) :614–618, 2007.
- [61] S. Wietzke, C. Jördens, B. Baudrit, M. Bastian, and M. Koch. Terahertz imaging : a new non-destructive technique for the quality control of plastic weld joints. *Journal of the European Optical Society - Rapid Publications*, 2 :07013, 2007.
- [62] F. Rutz, S. Wietzke, M. Koch, H. Richter, S. Hickmann, V. Trappe, and U. Ewert. Non-destructive testing of glass-fibre reinforced polymers using terahertz spectroscopy. *ECNDT*, 2006.

- [63] M.J. Fitch and R. Osiander. Terahertz waves for communications and sensing. *John Hopkins Apl Technical Digest*, 25(4), 2004.
- [64] S.W. Smye, J.M. Chamberlain, A.J. Fitzgerald, and E. Berry. The interaction between terahertz radiation and biological tissue. *Physics in Medicine and Biology*, 46 :R101–R112, 2001.
- [65] Min Ki Choi, Kimberly Taylor, Alan Bettermann, and D W van der Weide. Broadband 10-300 ghz stimulus-response sensing for chemical and biological entities. *Physics in Medicine and Biology*, 47(21) :3777, 2002.
- [66] J.B. Masson, M.P. Sauviat, J.L. Martin, and G. Gallot. Ionic contrast terahertz near-field imaging of axonal water fluxes. *PNAS*, 103(13) :4808–4812, 2006.
- [67] E. Pickwell and V. P. Wallace. Biomedical applications of terahertz technology. *Journal of Physics D-applied Physics*, 39(17) :R301–R310, September 2006.
- [68] E. Pickwell-MacPherson and V.P. Wallace. Terahertz pulsed imaging - a potential medical imaging modality ? *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, 6 :128–134, 2009.
- [69] A. Markelz, S. Whitmire, J. Hillebrecht, and R. Birge. Thz time domain spectroscopy of biomolecular conformational modes. *Physics in Medicine and Biology*, 47 :3797–3805, 2002.
- [70] M. Nagel, F. Richter, P. Haring-Bolivar, and H. Kurz. A functionalized thz sensor for marker-free dna analysis. *Physics in Medicine and Biology*, 48 :3625–3636, 2003.
- [71] S.Y. Huang, Y.X.J. Wang, D.K.W. Yeung, A.T. Ahuja, Y.T. Zhang, and E. Pickwell-MacPherson. Tissue characterization using terahertz pulsed imaging in reflection geometry. *Physics in Medicine and Biology*, 54 :149–160, 2009.
- [72] C. Yu, S. Fan, and E. Pickwell-MacPherson. The potential of terahertz imaging for cancer diagnosis : A review of investigations to date. *Quantitative Imaging in Medicine and Surgery*, 2(1) :33–45, 2012.
- [73] R.M. Woodward, V.P. Wallace, R.J. Pye, B.E. Cole, D.D. Arnone, and M. Linfield, E.H. Pepper. Terahertz pulse imaging of *ex vivo* basal cell carcinoma. *The Journal of Investigative Dermatology*, 120(1) :72–78, 2003.
- [74] V.P. Wallace, A.J. Fitzgerald, E. Pickwell, R.J. Pye, P.F. Taday, N. Flanagan, and T. Ha. Terahertz pulsed spectroscopy of human basal cell carcinoma. *Applied Spectroscopy*, 60(10) :1127–1133, 2006.

- [75] A.J. Fitzgerald, V.P. Wallace, M. Jimenez-Linan, L. Bobrow, R.J. Pye, A.D. Purushotham, and D.D. Arnone. Terahertz pulsed imaging of human breast tumors. *Radiology*, 239(2), 2006.
- [76] G. Reese, R. Goldin, M.H. Tran-Dang, A. Fitzgerald, P. Tekkis, and V.P. Wallace. Using terahertz pulsed imaging (tpi) to identify colonic pathology. *33rd International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves*, page 1, 2008.
- [77] P.C. Ashworth, P. O’Kelly, A.D. Purushotham, S.E. Pinder, M. Kontos, M. Pepper, and V.P. Wallace. An intra-operative thz probe for use during the surgical removal of breast tumors. *33rd International Conference on Infrared, Millimeter and Terahertz Waves*, pages 1–3, 2008.
- [78] Y.B. Ji, E.S. Lee, S.-H. Kim, J.-H. Son, and T.-I. Jeon. A miniaturized fiber-coupled terahertz endoscope system. *Optics Express*, 17(19) :17082–17087, 2009.
- [79] M.-A. Brun, F. Formanek, A. Yasuda, M. Sekine, N. Ando, and Y. Eishii. Terahertz imaging applied to cancer diagnosis. *Physics in Medicine and Biology*, 55 :4615–4623, 2010.
- [80] F. Wahaia, G. Valusis, L.M. Bernardo, A. Almeida, J.A. Moreira, P.C. Lopes, J. Matcukevic, I. Kasalynas, D. Seliuta, R. Adomavicius, R. Henrique, and M. Lopes. Detection of colon cancer by terahertz techniques. *Journal of Molecular Structure*, 1006 :77–82, 2011.
- [81] H. Hoshina, A. Hayashi, N. Miyoshi, F. Miyamaru, and C. Otani. Terahertz pulsed imaging of frozen biological tissues. *Applied Physics Letters*, 94 :123901, 2009.
- [82] H. Chen, T.-H. Chen, T.-F. Tseng, J.-T. Lu, C.-C. Kuo, S.-C. Fu, W.-J. Lee, Y.-F. Tsai, Huang Y.-Y., E.Y. Chuang, Y.-J. Hwang, and C.-K. Sun. High-sensitivity *in vivo* thz transmission imaging of early human breast cancer in a subcutaneous xenograft mouse model. *Optics Express*, 19(22) :21552–21562, 2011.
- [83] H.-B. Liu, G. Plopper, S. Earley, Y. Chen, B. Ferguson, and X.-C. Zhang. Sensing minute changes in biological cell monolayers with thz differential time-domain spectroscopy. *Biosensors and Bioelectronics*, 22 :1075–1080, 2007.
- [84] C. Ronne, P.O. Astrand, and S.R. Keiding. Thz spectroscopy of liquid h<sub>2</sub>o and d<sub>2</sub>o. *Physical Review Letters*, 82(14) :2888–2891, 1999.
- [85] C. C. Cooksey, B. J. Greer, and E. J. Heilweil. Terahertz spectroscopy of l-proline in reverse aqueous micelles. *Chemical Physics Letters*, 467(4-6) :424–429, 2009.

- [86] J.T. Kindt and C.A. Schmuttenmaer. Far-infrared dielectric properties of polar liquids probed by femtosecond terahertz pulse spectroscopy. *J. Phys. Chem.*, 100 :10373–10379, 1996.
- [87] G.C. Walker, J.W. Bowen, M. Naftaly, and R.A. Dudley. A simple fluid cell for the study of aqueous solutions using thz time-domain spectroscopy. *Meas. Sci. Technol.*, 22 :037003, 2011.
- [88] T. Globus, D. Woolard, T.W. Crowe, T. Khromova, B. Gelmont, and J. Helser. Terahertz fourier transform characterization of biological materials in a liquid phase. *Journal of Physics D : Applied Physics*, 39 :3405–3413, 2006.
- [89] R. Parthasarathy, T. Globus, T. Khromova, N. Swami, and D. Woolard. Dielectric properties of biological molecules in the terahertz gap. *Applied Physics Letters*, 87 :113901, 2005.
- [90] J. Xu, K.W. Plaxco, and S.J. Allen. Probing the collective vibrational dynamics of a protein in liquid water by terahertz absorption spectroscopy. *Protein Science*, 15 :1175–1181, 2006.
- [91] H. Yoneyama, M. Yamashita, S. Kasai, K. Kawase, R. Ueno, H. Ito, and T. Ouchi. Terahertz spectroscopy of native-conformation and thermally denatured bovine serum albumin (bsa). *Physics in Medicine and Biology*, 53 :3543–3549, 2008.
- [92] V. Mille, N.E. Bourzgui, F. Medjdoub, and B. Bocquet. Design of silicon-ptmbs bio-mems with millimeter and sub-millimeter waves transducers. *European Microwave Conference*, 1 :169–172, 2004.
- [93] P. A. George, W. Hui, F. Rana, B. G. Hawkins, A. E. Smith, and B. J. Kirby. Microfluidic devices for terahertz spectroscopy of biomolecules. *Opt. Express*, 16(3) :1577–1582, February 2008.
- [94] A.J. Baragwanath, G.P. Swift, A.J. Gallant, and J.M. Chamberlain. Silicon based microfluidic cell for terahertz frequencies. *Journal of Applied Physics*, 108 :013102, 2010.
- [95] T. Ohkubo, M. Onuma, J. Kitagawa, and Y. Kadoya. Micro-strip-line-based sensing chips for characterization of polar liquids in terahertz regime. *Applied Physics Letters*, 88(21) :212511, 2006.
- [96] J. Kitagawa, T. Ohkubo, M. Onuma, and Y. Kadoya. Thz spectroscopic characterization of biomolecule/water systems by compact sensor chips. *Applied Physics Letters*, 89 :041114, 2006.



- [97] R. Mendis, V. Astley, J. Liu, and D.M. Mittleman. Terahertz microfluidic sensor based on a parallel-plate waveguide resonant cavity. *Applied Physics Letters*, 95 :171113, 2009.
- [98] V. Matvejev, C. De Tandt, W. Ranson, J. Stiens, R. Vounckx, and D. Mangelings. Integrated waveguide structure for highly sensitive thz spectroscopy of nano-liter liquids in capillary tubes. *Prog. Electromagn. Res.*, 121 :89–101, October 2011.
- [99] Treizebre A. *BioMEMS Terahertz pour l'étude du trafic informationnel de cellules biologiques*. PhD thesis, Université de Lille 1, 2007.
- [100] S. Laurette, A. Treizebre, and B. Bocquet. Co-integrated microfluidic and thz functions for biochip devices. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 21(6) :065029, 2011.
- [101] B. Bocquet, A. Treizebre, and S. Laurette. Microsystem having a microelectrical and microfluidic function, and method for manufacturing same. *WO2012072917*, 2012.
- [102] A. Sommerfeld. Ueber die fortpflanzung elektrodynamischer wellen längs eines drahtes. *Ann. Phys. u. Chemie*, 67 :233–290, 1899.
- [103] G. Goubau. Surface waves ant their application to transmission lines. *Journal of Applied Physics*, 21 :1119–1128, 1950.
- [104] M.J. King and J.C. Wiltse. Surface-wave propagation on coated or uncoated metal wires at millimeter wavelengths. *IRE Transactions on Antennas and Propagation*, AP-10 :246–254, 1962.
- [105] K. L. Wang and D. M. Mittleman. Metal wires for terahertz wave guiding. *Nature*, 432(7015) :376–379, 2004.
- [106] A. Treizebre. *Sonde millimétrique pour microscopie d'éléments biologiques*. PhD thesis, DEA - Université de Lille 1, 2004.
- [107] A. Treizebre, T. Akalin, and B. Bocquet. Planar excitation of goubau transmission lines for thz biomems. *Ieee Microwave and Wireless Components Letters*, 15(12), 2005.
- [108] T. Akalin, A. Treizebre, and B. Bocquet. Single-wire transmission lines at terahertz frequencies. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 54(6) :2762–2767, 2006.
- [109] J. W. Lamb. Miscellaneous data on materials for millimetre and submillimetre optics. *International Journal of Infrared and Millimeter Waves*, 17(12) :1997–2034, 1996.

- [110] A. Treizebre and B. Bocquet. Nanometric metal wire as a guide for thz investigation of living cells. *International Journal of Nanotechnology*, 5(6-8) :784–795, 2008.
- [111] A. Treizebre, B. Bocquet, Y. S. Xu, and R. G. Bosisio. New thz excitation of planar goubau line. *Microwave and Optical Technology Letters*, 50(11) :2998–3001, 2008.
- [112] F. Laermer and A. Schilp. Method of anisotropically etching silicon, 1996.
- [113] D. W. Widmann. Metallization for integrated circuits using a lift-off technique. *IEEE Journal of Solid-State Circuits*, 11(4) :466 – 471, 1976.
- [114] S. A. McAuley, H. Ashraf, L. Atabo, A. Chambers, S. Hall, J. Hopkins, and G. Nicholls. Silicon micromachining using a high-density plasma source. *Journal of Physics D-applied Physics*, 34(18) :2769–2774, 2001.
- [115] CYCLOTENE Advanced Electronic Resins. *Processing Procedures for CYCLOTENE 3000 Series Dry Etch Resins*. DOW, 2005.
- [116] A. Abbas, A. Treizebre, P. Supiot, N. E. Bourzgui, D. Guillochon, D. Vercaigne-Marko, and B. Bocquet. Cold plasma functionalized terahertz biomems for enzyme reaction analysis. *Biosens. Bioelectron.*, 25(1) :154–160, September 2009.
- [117] MicroChemicals. *Lithography - Theory and Application of Photoresists, Developers, Solvents and Etchants*. 2008.
- [118] B. Wu, A. Kumar, and S. Pamarthy. High aspect ratio silicon etch : a review. *Journal of Applied Physics*, 108 :051101, 2010.
- [119] R.W. et al Johnson. Benzocyclobutene interlayer dielectrics for thin film multichip modules. *IEEE Transactions on components, hybrids, and manufacturing technology*, 13 No 2, 1990.
- [120] M. Schier. Reactive ion etching of benzocyclobutene using a silicon nitride dielectric etch mask. *J. Electrochem. Soc.*, 142 No 9, 1995.
- [121] M.R. Baklanov. Effects of oxygen and fluorine on the dry etch characteristics of organic low-k dielectrics. *J. Vac. Sci. Technol. B*, 17 No 2, 1999.
- [122] Olivier S. More C. *Physique 2nde année PSI PSI\**. Tec&Doc - Lavoisier, 2004.
- [123] J. Berthier and P. Silberzan. *Microfluidics for biotechnology*. Artech House integrated microsystems series. Artech House, 2009.
- [124] F. Iancu, X. W. Zhu, Y. X. Tang, D. Alsam, and N. Muller. Design and fabrication of microchannel test rig for ultra-micro wave rotors. *Microsystem Technologies-micro-and Nanosystems-information Storage and Processing Systems*, 14(1) :79–88, 2008.

- [125] F. A. Shaikh and V. M. Ugaz. Collection, focusing, and metering of dna in microchannels using addressable electrode arrays for portable low-power bioanalysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(13) :4825–4830, 2006.
- [126] A. Treizebre, M. Hofman, and B. Bocquet. Terahertz spiral planar goubau line rejectors for biological characterization. *Progress In Electromagnetics Research M*, 14 :163–176, 2010.
- [127] Teixeira J. Les mystères de l'eau. *Techniques de l'ingénieur*, RE 53, 2006.
- [128] R. Buchner, J. Barthel, and J. Stauber. The dielectric relaxation of water between 0°C and 35°C. *Chemical Physics Letters*, 306(1-2) :57 – 63, 1999.
- [129] H. Yada., M. Nagai, and K. Tanaka. Origin of the fast relaxation component of water and heavy water revealed by terahertz time-domain attenuated total reflection spectroscopy. *Chemical Physics Letters*, 464(4-6) :166 – 170, 2008.
- [130] S. Laurette, A. Treizebre, F. Affouard, and B. Bocquet. Subterahertz characterization of ethanol hydration layers by microfluidic system. *Appl. Phys. Lett.*, 97(11) :111904, September 2010.
- [131] S. P. Micken, J. Dordick, J. Munch, D. Abbott, and X. C. Zhang. Terahertz spectroscopy of bound water in nano suspensions. *Biomedical Applications of Micro- and Nanoengineering*, 4937 :49–61, 2002.
- [132] J. E. Boyd, A. Briskman, C. M. Sayes, D. Mittleman, and V. Colvin. Terahertz vibrational modes of inverse micelles. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106(24) :6346–6353, 2002.
- [133] B. Bianco and M. Parodi. Determination of the propagation constant of uniform microstrip lines. *Alta Frequenza*, 45 :107–110, February 1976.
- [134] U. Heugen, G. Schwaab, E. Brundermann, M. Heyden, X. Yu, D. M. Leitner, and M. Havenith. Solute-induced retardation of water dynamics probed directly by terahertz spectroscopy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(33) :12301–12306, August 2006.
- [135] J. Barthel and R. Buchner. High-frequency permittivity and its use in the investigation of solution properties. *Pure and Applied Chemistry*, 63(10) :1473–1482, October 1991.
- [136] P. Lanteri and R. Longaray. Chimimétrie : outils du xxème siècle, méthode du xxième siècle ? *Analisis Magazine*, 26(8) :M15–M18, 1998.

- [137] R.G. Brereton. *Chemometrics : Data analysis for the laboratory and chemical plant. John Wiley and Sons, Ltd., 2003.*
- [138] N. Gracia, S. Thomas, F. Thibault-Starzyk, O. Lerasle, and L. Duponchel. Combination of mid-infrared spectroscopy and curve resolution method to follow the antioxidant action of alkylated diphenylamines. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 106(2) :210 – 215, 2011.
- [139] C. Ruckebusch, L. Duponchel, J. P. Huvenne, and J. Saurina. Matrix merging arrangements for the study protein dynamics by time-resolved step-scan fourier transform infrared spectroscopy and multivariate curve resolution. *Analytica Chimica Acta*, 515(1) :183 – 190, 2004.
- [140] C. Ruckebusch, A. De Juan, L. Duponchel, and J.P. Huvenne. Matrix augmentation for breaking rank-deficiency : A case study. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 80(2) :209 – 214, 2006.
- [141] A. Savitzky and M.J.E. Golay. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Analytical Chemistry*, 36(8) :1627–1639, 1964.
- [142] E. Malinowski. *Factor analysis in chemistry - 2nd edition.* Wiley-Interscience, New York, 1992.
- [143] R. Tauler, A. Smilde, and B. Kowalski. Selectivity, local rank, three-way data analysis and ambiguity in multivariate curve resolution. *Journal of Chemometrics*, 9(1) :31–58, 1995.
- [144] E. Casassas, I. Marqués, and R. Tauler. Study of acid-base properties of fulvic acids using fluorescence spectrometry and multivariate curve resolution methods. *Analytica Chimica Acta*, 310(3) :473 – 484, 1995.
- [145] A. de Juan, E. Casassas, and R. Tauler. *Soft Modeling of Analytical Data.* John Wiley & Sons, Ltd, 2006.
- [146] N.Q. Vinh, S.J. Allen, and K.W. Plaxco. Dielectric spectroscopy of proteins as a quantitative experimental test of computational models of their low-frequency harmonic motions. *Journal of the American Chemical Society*, 133 :8942–8947, 2011.
- [147] P.U. Jepsen, U. Moller, and H. Merbold. Investigation of aqueous alcohol and sugar solutions with reflection terahertz time-domain spectroscopy. *Optics Express*, 15(22) :14717–14737, 2007.
- [148] K. Gekko and H. Noguchi. Compressibility of globular proteins in water at 25°C. *The Journal of Physical Chemistry*, 83(21) :2706–2714, 1979.

- [149] M. Suzuki, J. Shigematsu, and T. Kodama. Hydration study of proteins in solution by microwave dielectric analysis. *J. Phys. Chem.*, 100 :7279–7282, 1996.
- [150] J. Xu, K.W. Plaxco, and S.J. Allen. Collective dynamics of lysozyme in water : Terahertz absorption spectroscopy and comparison with theory. *J. Phys. Chem. B*, 110 :24255–24259, 2006.
- [151] A. Treizebre, B. Bocquet, Y. S. Xu, and R. G. Bosisio. New thz excitation of planar goubau line. *Microw. Opt. Techn. Let.*, 50(11) :2998–3001, November 2008.
- [152] A.I. Fernandez-Dominguez, L. Martin-Moreno, F.J. Garcia-Vidal, S.R. Andrews, and S.A. Maier. Spoof surface plasmon polariton modes propagating along periodically corrugated wires. *IEEE J. Sel. Topics Quantum Electron.*, 14(6) :1515–1521, November 2008.
- [153] Linfang Shen, Xudong Chen, and Tzong-Jer Yang. Terahertz surface plasmon polaritons on periodically corrugated metal surfaces. *Opt. Express*, 16(5) :3326–3333, March 2008.
- [154] G. Kumar, S. Pandey, A. Cui, and A. Nahata. Planar plasmonic terahertz waveguides based on periodically corrugated metal films. *New J. Phys.*, 13 :033024, March 2011.
- [155] R. B. Marks. A multiline method of network analyzer calibration. *Ieee Transactions On Microwave Theory and Techniques*, 39(7) :1205–1215, 1991.
- [156] M. D. Janezic and J. A. Jargon. Complex permittivity determination from propagation constant measurements. *Ieee Microwave and Guided Wave Letters*, 9(2) :76–78, 1999.
- [157] C. Gabriel, S. Gabriel, E. H. Grant, B. S. J. Halstead, and D. M. P. Mingos. Dielectric parameters relevant to microwave dielectric heating. *Chemical Society Reviews*, 27(3) :213–223, 1998.
- [158] B. Sepulveda, J. S. del Rio, M. Moreno, F. J. Blanco, K. Mayora, C. Dominguez, and L. M. Lechuga. Optical biosensor microsystems based on the integration of highly sensitive mach-zehnder interferometer devices. *Journal of Optics A-pure and Applied Optics*, 8(7) :S561–S566, 2006.
- [159] M. I. Lapsley, I. K. Chiang, Y. B. Zheng, X. Y. Ding, X. L. Mao, and T. J. Huang. A single-layer, planar, optofluidic mach-zehnder interferometer for label-free detection. *Lab On A Chip*, 11(10) :1795–1800, 2011.
- [160] E. J. Wilkinson. An n-way hybrid power divider. *IEEE Transactions on Microwave Theory and Techniques*, 8 :116–118, 1960.

- [161] Y. Xu, C. Nerguizian, and R. G. Bosisio. Wideband planar goubau line integrated circuit components at millimetre waves. *IET Microw. Antenna P.*, 5(8) :882–885, June 2011.
- [162] T. Akalin, E. Peytavit, and J.-F. Lampin. Bendings and filters with single strip thz plasmonic waveguides. In *Infrared and Millimeter Waves, 2007 and the 2007 15th International Conference on Terahertz Electronics. IRMMW-THz. Joint 32nd International Conference on*, pages 75 –76, September 2007.
- [163] Emond J. *Contribution à l'étude des structures passives verre-silicium dans le domaine millimétrique*. PhD thesis, Université Paris Est, 2010.
- [164] S. Jung, P. A. Murphy, and L. A. Johnson. Physicochemical and functional properties of soy protein substrates modified by low levels of protease hydrolysis. *Journal of Food Science*, 70(2) :C180–C187, March 2005.
- [165] B. Yang, H. S. Yang, J. Li, Z. X. Li, and Y. M. Jiang. Amino acid composition, molecular weight distribution and antioxidant activity of protein hydrolysates of soy sauce lees rid f-1842-2010. *Food Chemistry*, 124(2) :551–555, January 2011.
- [166] G. L. Zhao, Y. Liu, M. M. Zhao, J. Y. Ren, and B. Yang. Enzymatic hydrolysis and their effects on conformational and functional properties of peanut protein isolate. *Food Chemistry*, 127(4) :1438–1443, August 2011.
- [167] C. Y. Chang, K. C. Wu, and S. H. Chiang. Antioxidant properties and protein compositions of porcine haemoglobin hydrolysates. *Food Chemistry*, 100(4) :1537–1543, 2007.
- [168] J. T. Wei and B. H. Chiang. Bioactive peptide production by hydrolysis of porcine blood proteins in a continuous enzymatic membrane reactor. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 89(3) :372–378, February 2009.
- [169] R. Froidevaux, F. Krier, N. Nedjar-Arroume, D. Vercaigne-Marko, E. Kosciarz, C. Ruckebusch, P. Dhulster, and D. Guillochon. Antibacterial activity of a pepsin-derived bovine hemoglobin fragment. *Febs Letters*, 491(1-2) :159–163, February 2001.
- [170] Q. Zhao, I. Garreau, F. Sannier, and J. M. Piot. Opioid peptides derived from hemoglobin : Hemorphins. *Biopolymers*, 43(2) :75–98, 1997.
- [171] E. Y. Adje, R. Balti, M. Kouach, P. Dhulster, D. Guillochon, and N. Nedjar-Arroume. Obtaining antimicrobial peptides by controlled peptic hydrolysis of bovine hemoglobin. *International Journal of Biological Macromolecules*, 49(2) :143–153, August 2011.

- [172] B. Lignot, R. Froidevaux, N. Nedjar-Arroume, and D. Guillochon. Solvent effect on kinetics of appearance of haemorphins in the course of peptic hydrolysis of bovine haemoglobin. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 29 :25–30, February 1999.
- [173] C. R. Wilke and Pin Chang. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *AIChE Journal*, 1(2) :264–270, 1955.
- [174] W. D. Ristenpart, J. D. Wan, and H. A. Stone. Enzymatic reactions in microfluidic devices : Michaelis-menten kinetics. *Analytical Chemistry*, 80(9) :3270–3276, May 2008.

## Références

Ce travail de thèse a mené ou participé aux publications suivantes :

### Développement Technologique

*Article :*

- S. Laurette, A. Treizebre, B. Bocquet, *Co-integrated microfluidic and THz functions for biochip devices*, Journal of Micromechanics and Microengineering, Vol. 21 (6), 065029, 2011.

*Conférence :*

- S. Laurette, A. Treizebre, A. Elagli, B. Bocquet. *Microfluidic and Terahertz integrated functions for biomolecules spectroscopy*. MMB 2011, Lucerne, Switzerland, may 4-6, 2011.

*Brevet :*

- B. Bocquet, A. Treizebre and S. Laurette, *Microsystem Having a Microelectrical and Microfluidic Function, and Method for Manufacturing Same*. WIPO Patent Application WO/2012/072917, 2012.

### Hydratation :

*Articles :*

- S. Laurette, A. Treizebre, F. Affouard, B. Bocquet, *Subterahertz Characterization of Ethanol Hydration Layers by Microfluidic System*, Applied Physics Letters, Vol. 97, Issues 11, pp 111904, 2010.
- S. Laurette, A. Treizebre, A. Elagli, B. Hatirnaz, R. Froidevaux, F. Affouard, L. Duponchel, B. Bocquet, *Highly sensitive terahertz spectroscopy in microsystem*, RSC Advances, Accepté pour Publication.
- L. Duponchel, S. Laurette, B. Hatirnaz, A. Treizebre, F. Affouard, B. Bocquet, *Probing hydration shell of molecules with a lab-on-chip / chemometrics combination*. Soumis à Analytica Chimica Acta.

*Conférences :*

- S. Laurette, A. Treizebre, B. Bocquet, *Hydration layers of alcohol and proteins analyzed by THz BioMEMS*, MicroTAS 2010 - The 14th International Conference for Chemistry and Life Sciences, Groningen, The Netherlands, Oct 3-7, pp1964-1966



- 
- L. Duponchel, S. Laurette, A. Treizebre and B. Bocquet, *Probing hydration shell of molecules with a lab-on-chip / chemometrics combination*. XIII Chemometrics in Analytical Chemistry, Budapest, Hungary, jun 25-29, 2012.

### **Fonctions Electromagnétiques :**

#### *Articles :*

- S. Laurette, A. Treizebre and B. Bocquet, *Corrugated Goubau lines to slow down and confine THz waves*, IEEE Transactions on Terahertz Science and Technology, Vol. 2(3), 340-344, 2012.
- S. Laurette, A. Treizebre, N.-E. Bourzgui, and B. Bocquet, *Terahertz interferometer for integrated goubau-line waveguides*, Progress In Electromagnetics Research Letters, Vol. 30, 49-58, 2012.
- A. Treizebre, S. Laurette, Y. Xu, R.G. Bosisio, B. Bocquet, *THz power divider circuits on planar goubau lines (pgls)*, Progress In Electromagnetics Research C, Vol. 26, 219-228, 2012.

### **Microfluidique et réactions enzymatiques :**

#### *Articles :*

- S. Laurette, R. Dufour, F. Brendriaa, V. Thomy et N.-E. Bourzgui, *Physique des fluides aux échelles microscopiques pour l'ingénierie des microsystèmes : l'apprentissage par la simulation*, J3EA, 2011
- A. Elagli, S. Laurette, A. Treizebre, G. Le Flem, P. Dhulster, B. Bocquet, R. Froidevaux. *Enzymatic reaction selectivity modification by microfluidic flow regime*. A soumettre.

#### *Conférences :*

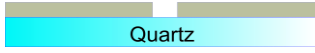


- A. Elagli, A. Treizebre, S. Laurette, D. Vercaigne-Marko, D. Guillochon, P. Dhulster, B. Bocquet and R. Froidevaux. *Enzymatic catalysis study in microfluidic devices*. A Greener Chemistry for Industry, Lille, France, dec 12-14, 2011.
- A. Elagli, A. Treizebre, S. Laurette, D. Vercaigne-Marko, D. Guillochon, P. Dhulster, B. Bocquet and R. Froidevaux. *Kinetic Study of Enzyme-Catalyzed Reaction at Microscale Level*. MMB 2011, Lucerne, Switzerland, may 4-6, 2011.



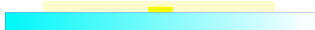






# Annexe

## Annexe : Procédé technologique pour le BioMEMS THz

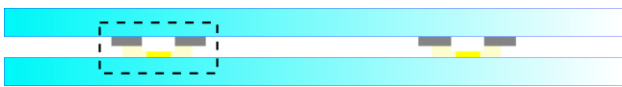
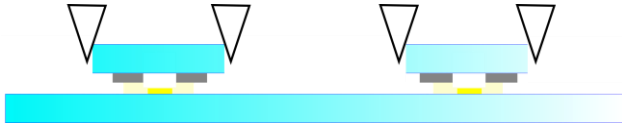
### 1 – Dépôt des lignes d’or sur le substrat :

<b>Glass wafer cleaning</b>	Acetone/Ethanol	 <p>Quartz</p>
<b>Dehydration bake</b>	5min - 200°C	
<b>HMDS spin-coating</b>	V=2500rpm - T=20s	
<b>AZn Lof 2020 resist spin-coating</b>	V=2500rpm - T=20s - 1µm	
<b>Soft bake</b>	1min - 110°C	
<b>Photo exposition</b>	325nm - 4.8s – 11mW/cm <sup>2</sup>	
<b>Soft bake</b>	1min – 110°C	
<b>Development</b>	AZ326MIF - 55s	
<b>Metal evaporation</b>	Ti 500A – Au 4000A – Al 500A	
<b>Lift Off</b>	Remover 1165 – 70°C	

### 2 - Gravure des microcanaux de silicium :

<b>AP3000 spin-coating</b>	V=2500rpm - T=20s	
<b>BCB3022-46 spin-coating</b>	V=2500rpm - T=40s - 2µm	
<b>Soft bake</b>	30min – 110°C – (N <sub>2</sub> )	
<b>Silicon/Quartz bonding</b>	1h – 250°C – 2bars	
<b>Silicon DRIE etching</b>	SF <sub>6</sub> etching : 200µm -> 180µm	
<b>Aluminium deposition</b>	Sputtering : 100nm (Ar plasma)	
<b>AZ9260 resist spin coating</b>	V=1500rpm – T=40s – 10µm	
<b>Soft bake</b>	3min – 110°C	
<b>Photo exposition</b>	325nm – 20s – 11mW/cm <sup>2</sup>	
<b>AZ9260 Development and Al etching</b>	AZ351B:H <sub>2</sub> O 1:2 – 4min	
<b>Silicon DRIE etching</b>	SF <sub>6</sub> -C <sub>4</sub> F <sub>8</sub> plasmas - 45min	
<b>BCB etching</b>	CF <sub>4</sub> /O <sub>2</sub> plasma – 7min	
<b>AZ9260 and Al removing</b>	Acetone – AZ351B	

**3 – Fermeture des microcanaux :**

<p><b>AP3000 spin-coating on a new quartz wafer (2)</b></p>	<p>V=3000rpm - T=20s</p>	
<p><b>BCB3022-46 spin-coating</b></p>	<p>V=3000rpm - T=40s - 2μm</p>	
<p><b>Quartz (2) /Silicon bonding</b></p>	<p>1h – 250°C – 2bars</p>	
<p><b>Partial cut</b></p>		
<p><b>Final cut</b></p>		