

**THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DES
SCIENCES ET TECHNOLOGIES DE LILLE**

SPECIALITE : MICRO-ONDES ET MICROTECHNOLOGIES
ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES POUR L'INGENIEUR

Présentée par
Elisabeth Galopin

**ADRESSAGE PAR MICROFLUIDIQUE DIGITALE :
APPLICATION A LA DETECTION DE MARQUEURS
BIOLOGIQUES PAR PLASMON DE SURFACE ET
DETECTION INTEGREE.**

Soutenu le 27 novembre 2007 devant la commission d'examen :

<u>Président :</u>	A. CAPPY	Professeur à l'USTL (Lille1) -IEMN
<u>Rapporteurs :</u>	N. JAFFREZIC	Directrice de Recherche CNRS - Ecole Centrale de Lyon - IFOS
	C. BERGAUD	Chargé de Recherche CNRS – LAAS Toulouse
<u>Directeur de thèse:</u>	J.C. CAMART	Professeur à l'USTL (Lille1) - IEMN
<u>Codirecteur:</u>	V. THOMY	Maître de conférences à l'USTL (Lille1) - IEMN
<u>Examineurs :</u>	S. SZUNERITS	Professeur à l'ENSEEG / INP Grenoble - LEPMI
	B. PINCHEMEL	Professeur à l'USTL (Lille1) - PhLAM
	PM. DANZE	Maitre de conférences des Universités, Praticien Hospitalier, Université de Lille 2 – IFR114

Remerciements

Cette thèse a été réalisée à l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie (IEMN) au sein du nouveau groupe BIOMEMS sous la direction de J.C. Camart, Professeur à l'Université de Lille1 et de V. Thomy, Maître de Conférences à l'Université de Lille1. Je remercie le Centre National de la Recherche Scientifique et la Région Nord Pas de Calais de m'avoir attribué une bourse BDI.

J'exprime d'abord ma plus vive reconnaissance à Alain Cappy, Professeur à l'Université de Lille1 et directeur de l'IEMN, de m'avoir accueillie au sein du laboratoire et de me faire l'honneur de présider la commission d'examen. Je remercie les professeurs Christian Druon et Pierre Tabourier, et Vincent Senez, Chargé de recherche CNRS, de m'avoir intégrée dans leur groupe.

Je voudrais remercier Jean-Christophe Camart de m'avoir permis d'accéder à ce contexte de recherche très porteur puis d'avoir dirigé ce travail. Je souhaite ensuite exprimer ma plus grande reconnaissance à Vincent Thomy, qui a co-encadré ce travail. Sa bonne humeur et sa positivité m'ont aidée à aborder avec confiance le projet au fur et à mesure des développements. Son recul et son esprit de synthèse ont été précieux pour débroussailler de nouvelles thématiques pour l'équipe. Je le remercie de s'être plongé avec moi dans ces notions également nouvelles pour lui. Je le remercie pour son soutien et ses encouragements et pour avoir cru en moi.

Je suis très reconnaissante envers Christian Bergaud, Chargé de Recherche CNRS au LAAS, et Nicole Jaffrezic-Renault, Directrice de Recherche CNRS à l'Université Claude Bernard Lyon1, qui ont accepté de rapporter ce travail, pour le vif intérêt qu'ils ont porté à mon travail, et leur lecture approfondie du manuscrit. Nos discussions et leurs suggestions perspicaces ont été pour moi très constructives. Mes remerciements vont également à Sabine Szunerits, Professeur à l'INP Grenoble et Pierre-Marie Danzé, Maître de Conférences à l'Université de Lille2 et Practicien Hospitalier, pour avoir accepté de participer à ce jury de thèse, et pour avoir contribué à ce travail notamment en me prodiguant de précieux conseils en SPR et en biologie. Je remercie vivement Bernard Pinchemel, Professeur à l'Université de Lille1, qui a fait montre d'une grande ouverture d'esprit pour accueillir cette nouvelle thématique dans son laboratoire, qui a lui-même subi quelques bouleversements...Il s'y est plongé généreusement en ne ménageant pas son temps et ses efforts. Son enthousiasme et son expérience ont été déterminants à un moment clé de ma thèse. Je le remercie également d'avoir accepté d'examiner mon travail.

Un grand merci à Nicolas Verplanck, mon collègue de bureau et ancien camarade de promotion, d'avoir partagé le quotidien du travail pendant 4 ans. Nous n'avons pas partagé que

des process techno, mais aussi, les responsabilités de l'organisation des JNRDM'07 et les hauts et les bas liés à la thèse...Un merci tout particulier à Maxime Beaugeois, notre collaboration a apporté une autre dimension à ce travail. Les longues séances de travail sur le banc DSPR ont été l'occasion de discussions animées et variées qui me laissent d'excellents souvenirs. Merci également à Florian Lapiere, qui m'a permis grâce à son travail de Master de finaliser un certain nombre de manipulations en microfluidique ou en plasmon de surface. Mille mercis à Yves Deblock, collègue et ami dont la présence fidèle et rassurante a beaucoup contribué à ma persévérance.

Merci à Farzam Zouhestiagh, Maître de Conférences à l'Université de Lille1, m'avoir offert la possibilité de profiter des nombreuses ressources de la plateforme MEOL, tout en me prodiguant de précieux conseils. Merci également à Ikram ElYazidi-Belkoura, Maître de Conférences à Lille1, de s'être lancée avec moi dans de nombreuses expériences de culture de cellules en gouttes, et de m'avoir enseigné un certain nombre de notions et de réflexes en culture cellulaire.

Je remercie également le personnel de la centrale de technologie et de la centrale de caractérisation. Leur sympathie, leurs compétences techniques et leurs conseils avisés ont grandement contribué à la réussite de ce travail. Une pensée particulière à Elisabeth Delos pour les caractérisations réalisées ensemble, et à Mohammed Zaknour, Chargé de recherche CNRS, pour les conseils technologiques avisés.

Je remercie vivement Rabah Boukherroub, Directeur de recherche CNRS, qui, tout au long de mon master et de ma thèse, a été si prompt à répondre par ses précieux conseils à mes multiples interrogations. Je le remercie également de me confier un projet de post-doc prometteur. C'est avec enthousiasme que je m'engage dans cette collaboration.

Je remercie chaleureusement le personnel administratif, qui au cours de ces années ont contribué nous rendre la vie administrative moins obscure et plus facile ! Je remercie enfin amicalement tous ceux qui à travers des discussions ont alimenté mes connaissances dans ces sujets interdisciplinaires. Je me dois de profiter de l'occasion qui m'est offerte pour témoigner ma reconnaissance à ceux que j'ai côtoyés pendant ces trois années..., en salle blanche, au troisième étage, au café ou ailleurs. Mille mercis à chacun d'entre eux.

Un grand merci à mes parents pour leur soutien inconditionnel, leur présence et la confiance qu'ils m'ont témoignée.

Et enfin, the last but not the least, merci à Olivier Ducloux. Tous les remerciements que je pourrais lui exprimer ici ne seront jamais que des euphémismes maladroits. Ce travail n'aurait tout simplement jamais abouti sans lui.

- SOMMAIRE -

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 MICROFLUIDIQUE POUR DETECTION DE BIOMARQUEURS.....	6
1. INTRODUCTION	8
2. MOLECULES CIBLES : DEFINITIONS ET PRINCIPES	8
2.1. De l'ADN aux protéines	8
2.2. Le système anticorps/antigène	10
2.3. Cinétique de réaction analyte - ligand.....	12
3. DETECTION VERSUS ANALYSE.....	12
3.1. Analyse par spectrométrie de masse	13
3.2. Quelques systèmes de détection classiques	13
3.2.1. ELISA	13
3.2.2. IPCR : la sensibilité de la PCR au service des tests immunologiques	14
3.2.3. Puces à protéines	15
3.2.4. Résonance de plasmon de surface	15
3.3. Les nanobiodétecteurs.....	16
4. SELECTIVITE ET SENSIBILITE.....	18
4.1. La sélectivité	18
4.1.1. Fonctionnalisation de surface	18
4.1.2. Immobilisation covalente	19
4.2. La sensibilité	20
4.2.1. Sensibilité de la spectrométrie de masse.....	21
4.2.2. Sensibilité des systèmes de détection classiques	21
4.2.3. Sensibilité des nanodétecteurs	21
5. CONTROLER UN LIQUIDE BIOLOGIQUE A L'ECHELLE D'UN MICROSYSTEME.....	24
5.1. Grandeurs caractéristiques.....	24
5.1.1. Le mouillage.....	24
5.1.2. La longueur capillaire.....	25
5.1.3. Le nombre de Reynolds.....	25
5.1.4. Le nombre de Pecllet et la convection	26
5.1.5. Le nombre de Damköhler et le transport de masse.....	27
5.2. Adressage microfluidique.....	28
5.2.1. Les concentrateurs.....	28
5.2.2. Les micromélangeurs.....	30
6. MICROFLUIDIQUE DISCRETE: INTEGRATION ET SENSIBILITE.....	30
6.1. Pourquoi la microfluidique discrète.....	31
6.2. Les types de microfluidiques discrètes	31
6.2.1. Les écoulements di-phasiques	32
6.2.2. L'électromouillage sur diélectrique.....	32
6.2.3. Les ondes acoustiques de surface	33
7. CONCLUSION	35

CHAPITRE 2 MICROMELANGE SAW ET INTERACTION LIQUIDE SURFACE46

1. INTRODUCTION	48
2. LES ONDES ACOUSTIQUES DE SURFACE : PRINCIPE ET REALISATION.....	48
2.1. <i>Les ondes acoustiques de surface de type Rayleigh</i>	48
2.2. <i>Génération d'ondes acoustiques de surface</i>	50
2.2.1. Principe de fonctionnement des IDTs.....	50
2.2.2. Impédance électrique et adaptation des IDTs	51
2.2.3. Réalisation des IDTs	52
2.2.4. Réponse fréquentielle des IDTs.....	53
2.3. <i>Traitement de surface pour la manipulation de gouttes</i>	56
2.3.1. Angle de contact statique.....	56
2.3.2. Hystérésis de surface et force de déplacement d'une goutte.....	57
2.3.3. Caractérisation de la mouillabilité	57
2.3.4. Traitements de surface.....	58
2.3.5. Monocouche hydrophobe	58
2.3.6. Revêtements superhydrophobes	60
3. INTERACTION ONDES DE SURFACE/GOUTTE.....	62
3.1. <i>Principe de l'interaction ondes de surface / goutte</i>	62
3.2. <i>Contrôle de température des gouttes de milieu biologique</i>	63
3.2.1. Principe	63
3.2.2. Contrôle de la température	64
3.3. <i>Microbrassage ou micromélange interne</i>	65
3.3.1. L'interaction liquide/surface.....	65
3.3.2. Caractérisation de l'écoulement : mélange contrasté.....	67
3.3.3. Caractérisation par suivi de particules en gouttes	69
4. UTILISATION COMME METHODE D'ADRESSAGE FLUIDIQUE	73
4.1. <i>Transport de masse</i>	73
4.1.1. Diffusion : les lois de FICK.....	74
4.1.2. La convection	75
4.1.3. Cinétique de réaction dans un flux	76
4.2. <i>Modélisation FEM du mélange couplé à un détecteur</i>	76
4.2.1. Principe général.....	77
4.2.2. Implantation dans Comsol.....	78
4.2.3. Concentration à la surface du capteur	79
4.2.4. Etude sur différentes interactions	81
5. CONCLUSION	82

CHAPITRE 3 SPR ET SAW : PERFORMANCES D'UN SYSTEME DE PLASMON DE SURFACE EN GOUTTE ET MICROFLUIDIQUE ASSOCIEE86

1. INTRODUCTION	88
2. SUIVI D'INTERACTIONS PAR PLASMON DE SURFACE	89
2.1. <i>Principe physique</i>	89
2.1.1. La réflexion interne totale et l'onde évanescente.....	89

2.1.2. Le plasmon de surface à l'interface métal noble/ diélectrique.....	90
2.1.3. Les conditions d'excitation.....	91
2.2. <i>SPR pour le suivi d'interactions biologiques</i>	93
2.2.1. L'interaction Antigène-Anticorps à la surface du capteur.....	93
2.2.2. Dosage et analyse des cinétiques.....	95
2.3. <i>SPR en goutte : Droplet based SPR (DSPR)</i>	97
2.3.1. Equilibre et dosage en goutte.....	97
2.3.2. Couplage DSPR/micromélange SAW : solution au transport de masse.....	97
3. MISE EN PLACE : OPTIMISATION DES PARAMETRES.....	99
3.1. <i>L'indice du prisme</i>	99
3.2. <i>La longueur d'onde</i>	99
3.3. <i>Le métal</i>	100
3.3.1. Le choix du métal.....	100
3.3.2. L'épaisseur de métal.....	102
3.4. <i>Les surfaces SPR et SiO_x</i>	102
4. MONTAGES.....	103
4.1. <i>Banc expérimental</i>	104
4.2. <i>Acquisition Labview</i>	104
4.3. <i>Détails expérimentaux</i>	106
4.4. <i>Premiers résultats de suivi d'interactions biologiques en goutte</i>	108
5. PRINCIPE DU DSPR COUPLE AUX ONDES ACOUSTIQUES.....	109
5.1. <i>Couplage entre microfluidique discrète et SPR</i>	109
5.1.1. Micromélange.....	109
5.1.2. Déplacement.....	111
5.2. <i>Influence de la température</i>	112
5.3. <i>Contrôle par effet Peltier</i>	113
5.4. <i>Contrôle par excitation pulsée</i>	114
6. INTERACTIONS EN GOUTTE.....	116
6.1. <i>Résultats préliminaires</i>	116
6.2. <i>Systèmes Anticorps/Antigène retenus</i>	117
6.3. <i>Protocole d'immobilisation et d'interaction</i>	118
6.3.1. Sur surface Au.....	118
6.3.2. Sur surface Au/SiO _x	119
6.4. <i>Comparaison Biacore/DSPR dans le cas de la transferrine</i>	119
6.4.1. Détermination des conditions d'expérimentation sur Biacore.....	120
6.4.2. Lame IEMN sur Biacore.....	122
6.4.3. Interaction en goutte.....	125
7. CONCLUSION.....	127

CHAPITRE 4 NANOIDTS POUR BIODETECTION INTEGREE	132
1. INTRODUCTION	134
2. PRINCIPE DE LA DETECTION	134
2.1. Biodétection par ondes acoustiques de surface.....	134
2.2. Mesures préliminaires à 48 MHz sur LiNbO ₃	136
2.3. Montée en fréquence	137
3. NANOIDTS SUR LiNbO ₃ ET ALN.....	137
3.1. Adaptation d'impédance et design	137
3.2. Réalisation par lithographie électronique.....	139
3.2.1. Essais sur LiNbO ₃	140
3.2.2. Réalisation sur AlN/Si.....	144
3.3. Caractérisation (paramètres S _{ij}).....	145
4. DETECTION D'INTERACTIONS BIOLOGIQUES	146
4.1. Fonctionnalisation de l'AlN.....	146
4.2. Mesure électrique de l'interaction Ab-Ag	146
4.2.1. Mesure des paramètres S _{ij}	147
5. CONCLUSION	149
CHAPITRE 5 CULTURE DE CELLULES EN GOUTTE ET MICROFLUIDIQUE DISCRETE.....	152
1. INTRODUCTION	154
2. CULTURE DE CELLULES EN GOUTTES	155
2.1. La manipulation de cellules en microfluidique	155
2.2. La culture de cellules en gouttes	157
2.3. Proposition de système de culture de cellules en goutte	157
2.4. Préparation du substrat (chimie).....	158
2.5. Culture de cellules.....	159
2.6. Tests préliminaires : culture en gouttes statiques	160
3. ACTIONNEMENT DES GOUTTES PAR SAW	161
3.1. Opérations fluidiques en gouttes.....	161
3.2. Test préliminaire : effet des ondes	162
3.3. Culture et actionnement sur le substrat	163
3.4. Culture sur le substrat et actionnement par le capot	164
3.5. Expulsion de goutte	164
4. PERSPECTIVES.....	165
4.1. La communication intercellulaire	165
4.2. Vers une analyse ou une détection intégrée en capot.....	166
5. CONCLUSION	167
CONCLUSION GENERALE	172
ANNEXE 1.....	178
ANNEXE 2.....	188

Introduction générale

**Problématique NaSCell et Cell On Chip
protéomique pour l'analyse de cellules**

La présente thèse, finalisée dans le contexte de la constitution du nouveau groupe BIOMEMS dirigé par V. Senez à l'IEMN, a été réalisée au sein de l'équipe 'Microfluidique'. Créée en 2001 par les professeurs P. Tabourier et C. Druon, cette équipe a travaillé sur divers systèmes microfluidiques (EWOD, SAW, soft lithographie, SU8,...) dédiés à l'analyse par spectrométrie de masse (contrat BiochipLab™ en collaboration avec le CEA-LETI, Osmooze et Sanofi-Aventis). Le travail présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans le projet interdisciplinaire NaSCell (Nanofluidic for Single Cell), à l'interface physique / biologie ; il poursuit le développement d'outils microfluidiques dans la continuité des travaux d'Alan Renaudin sur les ondes acoustiques de surface, avec l'objectif affirmé d'y intégrer la culture de cellules sur puce, ainsi que de nouveaux outils de détection ultra sensibles permettant d'analyser des populations restreintes de cellules.

Cette thèse vise donc à la conception, la réalisation et la caractérisation de briques élémentaires permettant la constitution d'un laboratoire sur puce pour l'analyse ultrasensible de protéines sécrétées par un nombre restreint de cellules. De nombreuses collaborations ont été initiées au cours de ce travail afin de mener à bien ce projet interdisciplinaire ; notamment avec l'équipe Biointerfaces de l'IRI (Institut de Recherche Interdisciplinaire), le Laboratoire de Biologie du Développement (Université de Lille1), l'équipe Photonique du PhLAM (Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules), le LML (Laboratoire de Mécanique de Lille) et l'IRF114, Plateforme d'Interactions Moléculaires et Nanotechnologies (CHR de Lille).

Un laboratoire sur puce vise à intégrer sur une puce de quelques cm² des composants ayant les mêmes fonctions qu'un laboratoire traditionnel ; la réduction d'échelle permet d'améliorer les temps et les sensibilités d'analyse. Ceci offre, en plus de ces améliorations analytiques attendues, une diminution des volumes d'analyse, une automatisation des mesures, ainsi qu'une réduction des coûts de production. Cependant, la réalisation d'un tel dispositif ne se limite pas à une simple miniaturisation des instruments conventionnels ; il faut également contrôler les phénomènes physiques à différentes échelles (centimétrique à nanométrique), tout en joignant diverses disciplines comme les microtechnologies, la chimie, la biologie, la physique, la microfluidique...

Depuis que Manz a imaginé le concept de laboratoire sur puce en 1990, la miniaturisation des instruments d'analyse en biologie et en chimie connaît un réel essor scientifique. Les enjeux sont à la mesure des attentes (diagnostics précoces, allègement des traitements et des analyses, puces intégrées, ou encore compréhension de mécanismes biologiques encore mal connus...)

Des progrès majeurs dans le domaine de la microfluidique ont déjà permis d'intégrer sur puce de nombreuses fonctionnalités des laboratoires (lyse de cellules, hybridation, chromatographie, amplification d'ADN). Ainsi, grâce aux évolutions de la génomique et des puces à ADN, il est maintenant possible d'analyser en parallèle des milliers d'ARNm et de déterminer si leur expression est corrélée à une maladie. Cependant, alors que ce sont les protéines qui sont les acteurs majeurs impliqués dans les processus physiologiques, l'étude du génome ne reflète pas nécessairement son expression en protéines dans les cellules. Quantifier la présence des protéines donne une image de l'activité d'un gène et les données recueillies sur le génome nécessitent souvent une analyse protéomique complémentaire. La réalisation de puces à protéines demeure cependant plus complexe que celle de puces à ADN : la cellule comprend plus d'un million de protéines différentes, dont certaines en très faibles quantités. De plus, la conformation spatiale des protéines les rend très fragiles et délicates à manipuler.

L'étude sur cellules uniques est par ailleurs un domaine en pleine expansion¹. Il s'agit d'appliquer les outils des micro/nanotechnologies à la biologie pour atteindre des seuils de sensibilité ultimes permettant la détection de molécules cibles sur cellules uniques. Par exemple, la compréhension du mécanisme de développement des cellules cancéreuses par analyse protéomique est un enjeu scientifique majeur². Le laboratoire de biologie du développement avec lequel nous avons travaillé étudie en particulier le rôle du facteur de croissance NGF (Nerve Growth Factor) dans la cancérisation mammaire³. La réalisation d'un laboratoire sur puce permettant à la fois la culture de cellules, la collecte des protéines exprimées par une population restreinte de cellules (une cellule unique isolée de façon ultime) et une biodétection ultrasensible de ces protéines, in-situ, représente ainsi une avancée expérimentale majeure.

Le travail de thèse a donc consisté :

- à étudier les systèmes de détection existants de manière à déterminer le plus adapté à l'analyse protéomique précitée,
- à fabriquer et caractériser le système retenu,
- à mettre au point et caractériser son intégration dans un environnement microfluidique permettant l'exaltation de sa sensibilité,
- à poser les briques de base permettant la culture de cellules in-situ en gouttes et l'adressage du milieu extracellulaire vers le capteur.

La description de ce travail est organisée en cinq chapitres.

Le chapitre 1 expose les bases de la biodétection intégrée de molécules cibles dans les laboratoires sur puce. Les principes biologiques élémentaires de la structure et des propriétés des molécules cibles ainsi que les mécanismes de reconnaissance y sont présentés. Quelques outils classiques d'analyse et de détection sont exposés, ainsi que les techniques de fonctionnalisation les plus répandues. Enfin, ce chapitre développe les spécificités des outils microfluidiques permettant d'intégrer de tels systèmes de biodétection et illustre les multiples possibilités de la microfluidique discrète dans les laboratoires sur puce, et en particulier celles à base d'ondes acoustiques de surface.

Le chapitre 2 présente le principe physique des ondes acoustiques de surface, ainsi que le phénomène de micromélange induit par l'interaction onde de surface/goutte. Tout d'abord, les caractéristiques électriques puis les caractéristiques de surface pour l'utilisation des SAW en microfluidique sont abordées. Alors que l'intégration de techniques de mélanges efficaces dans les laboratoires sur puce demeure un thème important de la microfluidique actuelle, nous abordons l'étude de l'interaction 'ondes de surface/liquide' et en particulier le micromélange acoustique généré par ces ondes de surface. Dans une deuxième partie, les différents moyens de caractérisation mis au point durant cette thèse sont développés. Nous démontrons ensuite, dans une troisième partie, le bénéfice de l'utilisation des ondes acoustiques de surface comme méthode d'adressage fluide. Les simulations par éléments finis permettant d'évaluer l'efficacité de l'interaction avec un détecteur au sein d'un microréacteur en goutte, sont enfin exposées.

Le chapitre 3 expose le développement d'un concept original de détection en temps réel fondé sur un dispositif de plasmon de surface (SPR) en goutte, outil que nous avons baptisé DSPR (Droplet based SPR). Dans un premier temps, nous expliquons le principe physique du plasmon de surface classique, ainsi que son utilisation dans l'étude des interactions biomoléculaires. Puis, nous montrons les avantages d'une technique de dosage et de détection SPR en goutte, et détaillons la démarche utilisée dans le développement et la mise au point de cette technique. Nous exposons également l'intégration d'un actionnement (déplacement et mélange) par ondes acoustiques de surface à ce système, qui ajoute aux potentiels de la technique DSPR la souplesse d'utilisation d'une microfluidique discrète. Des premiers résultats d'interaction en goutte sont présentés; une étude comparative avec un système SPR commercial est menée.

Dans le chapitre 4, parmi la multiplicité des dispositifs de nanobiodétection présentés au chapitre 1, nous présentons un des outils de détection testés, basé sur un effet piézoélectrique d'ondes acoustiques de surface. Nous l'avons choisi pour sa facilité d'intégration dans un système 'tout SAW'. Le principe de fonctionnement de la détection à base d'ondes acoustiques de surface

est présenté, puis, la réalisation technologique de peignes interdigités en lithographie électronique est détaillée. Enfin, nous montrons dans ce chapitre une interaction de type anticorps/antigène à partir des systèmes réalisés, et discutons de leur sensibilité.

Le chapitre 5 présente les premiers résultats de culture de cellules en gouttes. Un état de l'art rapide sur les systèmes d'isolement et de culture de cellules est d'abord proposé et le concept de culture de cellules en goutte est exposé. Nous présentons ensuite les différents moyens d'actionnement possibles par ondes acoustiques de surface et démontrons les avantages de l'utilisation d'un tel système dans l'étude de la communication intercellulaire. Nous proposons finalement un système complet comprenant la culture de cellules en goutte, l'actionnement microfluidique, ainsi qu'une zone de détection intégrée.

¹ H. Andersson, A. Van den Berg, "Microfluidic devices for cellomics", *Sens&Act B.* (2003), 92, pp. 315-325.

² H. Hondermarck, "Breast cancer: when proteomics challenges biological complexity", *Molecular and Cellular Proteomics* (2003), 2, pp. 281-291.

³ L. Dollé, I. El-Yazidi, E. Adriaenssens, H. Hondermarck, "Nerve Growth Factor over-expression and autocrine loop in breast cancer cells", *Oncogene* (2003), 22, pp. 5592-5601.

Chapitre 1

Microfluidique pour détection de

biomarqueurs

1. Introduction

Nous ciblons ce travail sur le développement d'outils dédiés à la détection de marqueurs protéiques. En effet, le rôle des protéines est primordial et ce sont elles qui réalisent les tâches cellulaires. Ce premier chapitre définit alors quelques notions essentielles dans le domaine de la microfluidique et des laboratoires sur puce dédiés à la détection de protéines.

Nous présentons d'abord les principes biologiques élémentaires de la constitution et la reconnaissance des molécules cibles. Les notions de protéine, de système anticorps-antigène, et de cinétique de réaction y sont explicitées.

Ensuite, nous nous penchons sur quelques systèmes de référence en analyse ou en détection biomoléculaire. Alors que les systèmes d'analyse permettent d'accéder à une cartographie complète d'un milieu, les systèmes de détection permettent un test en tout ou rien : en ciblant une molécule particulière, il est possible de confirmer ou non sa présence et ensuite de la quantifier. Les avantages et inconvénients de ces techniques sont abordés.

Enfin, nous exposons les spécificités des outils microfluidiques permettant d'intégrer de tels systèmes d'analyse et de détection biomoléculaires. Nous abordons ensuite quelques grandeurs caractéristiques importantes pour le contrôle des milieux biologiques dans les microsystèmes pour enfin faire ressortir les atouts dans l'utilisation de la microfluidique discrète.

2. Molécules cibles : définitions et principes

Afin de mieux comprendre comment les marqueurs précoces ou d'autres biomolécules peuvent être détectés, il est important de connaître leur structure et leurs propriétés.

2.1. De l'ADN aux protéines

L'information génétique contenue dans le génome au niveau de l'ADN est exprimée sous forme de protéines par l'intermédiaire des étapes de transcription puis de traduction impliquant l'ARN (Figure 1). Le rôle des protéines est primordial dans les processus de régulations cellulaires¹.

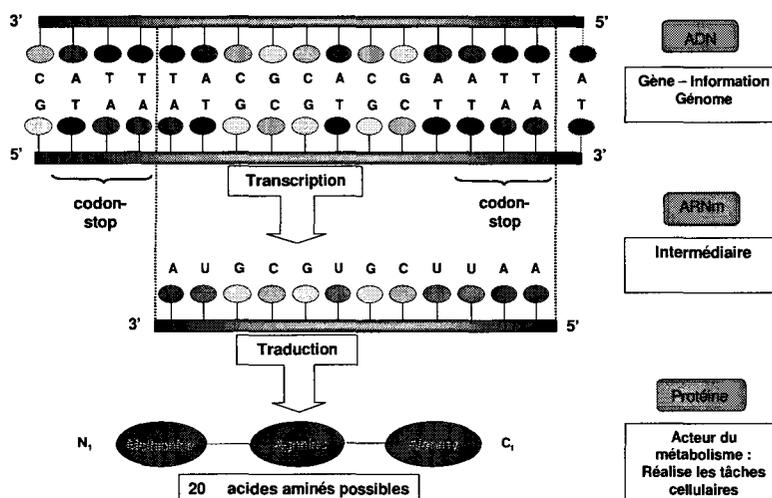


Figure 1 Etapes conduisant à l'expression des protéines à partir de l'information du génome.

La commercialisation de puces à ADN permet d'analyser en parallèle des milliers de gènes et de déterminer si leur expression est corrélée à une maladie. Cependant, l'abondance des protéines exprimées par un seul gène ne correspond malheureusement pas aux quantités génétiques^{2,3,4}. Les travaux pionniers de Anderson et Seilhamer⁵ mettent en évidence la différence marquante entre les données contenues dans l'ARNm et la quantité de protéines exprimées dans le foie humain. Ainsi, la quantification de la présence des protéines donne une image complémentaire de celle obtenue sur les gènes. Les données recueillies sur le génome nécessitent des analyses protéomiques complémentaires.

Les protéines sont des ensembles de chaînes polypeptidiques, elles mêmes composées d'un enchaînement d'acides aminés (AA). Chaque protéine a une structure tridimensionnelle propre qui lui confère des propriétés fonctionnelles. Ces conformations spatiales sont stabilisées par différentes interactions faibles et non covalentes (hydrogènes, ponts disulfures, etc...) et sont donc très fragiles, sachant que la perte de la conformation spatiale d'une protéine entraîne une perte de fonction. Les protéines présentent, en plus de leur fonction biologique, des caractéristiques pouvant être détectées par des systèmes physiques : leur charge ou leur masse par exemple.

La charge d'une protéine est très sensible au pH du milieu. Le point isoélectrique (pI) correspond au pH auquel la protéine possède une charge totale nulle. En travaillant à $pH < pI$ ou $pH > pI$, la protéine aura une charge respectivement positive ou négative. Le pI est différent suivant chaque acide aminé ou protéine et joue un rôle primordial pour les conditions de détection. Par exemple, le NGF (Nerve Growth Factor), facteur de croissance étudié dans le processus de cancérisation du sein, possède un pI de 9,3. C'est une protéine 'basique' qui a en général une charge positive au pH de la mesure.

La masse des protéines (liée à leur encombrement stérique) est également déterminante dans la sensibilité de détection (§4.2 et §5.1.5). Pour exprimer la masse molaire de molécules protéiques, on utilise le Dalton (Da), équivalent au gramme par mole (g/mol). Une masse de 75kDa signifie qu'une mole de protéine pèse 75000g. Une protéine de faible masse pèse environ 10kDa, une masse moyenne est de 50kDa alors qu'une masse importante correspond à 100kDa et plus.

2.2. Le système anticorps/antigène

Nous avons précisé que les molécules d'intérêt étaient dans notre cas les protéines. Il est alors nécessaire de pouvoir les capter depuis un milieu complexe sur la surface de détection. Pour ce faire, nous utilisons un système de reconnaissance naturel : l'interaction entre la molécule d'intérêt et son anticorps spécifique.

Les antigènes (Ag), molécules de masse supérieure à 1 kDa, sont des protéines ou des acides nucléiques qui peuvent être produits par exemple par des micro-organismes, ou présents à la surface d'une bactérie ou d'un virus. L'antigène est constitué de deux parties distinctes : une substance protéique et un haptène. C'est une zone localisée à la surface de l'antigène, l'épitope, qui est reconnu par l'anticorps.

Les anticorps (Ab), comme les immunoglobulines (Ig), sont des glycoprotéines (masse moléculaire de 150 kDa) dont la synthèse est déclenchée dans l'organisme par injection d'un antigène : c'est le produit d'une réponse immunitaire.

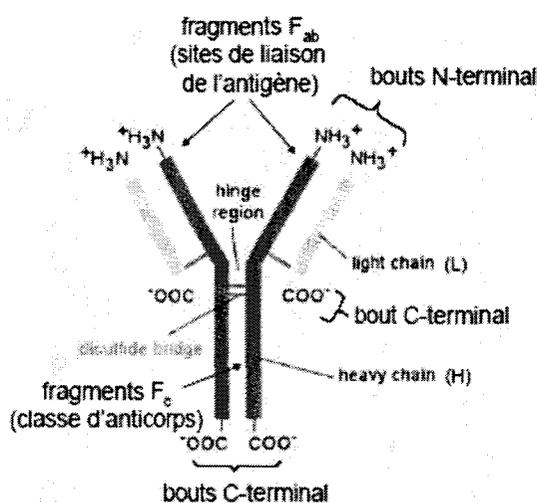


Figure 2 Schéma représentatif d'un anticorps.⁶

La structure de base des immunoglobulines est composée de quatre chaînes polypeptidiques (Figure 2): deux longues (lourdes : 50 kDa) et deux courtes (légères : 25 kDa). Ces quatre chaînes sont associées par des liens disulfures et des interactions non-covalentes. Chaque molécule est un dimère symétrique bivalent en forme de 'Y' (deux sites de liaison identiques). Ils sont bifonctionnels : l'extrémité F_{ab} est le site d'attachement aux antigènes, l'autre extrémité F_c permet la fixation aux cellules ou au complément.

Les anticorps (Ab) et antigènes (Ag) contiennent des sites de reconnaissance moléculaire, respectivement les 'paratopes' et 'épitopes'. Un anticorps réagit spécifiquement avec un antigène complémentaire pour former un complexe Ab-Ag, formé par l'intermédiaire de paratopes et épitopes assortis. (Figure 3). Sa formation est réversible et implique de nombreuses interactions faibles non-covalentes de types électrostatique, hydrophobe, Van der Waals et pont hydrogène.

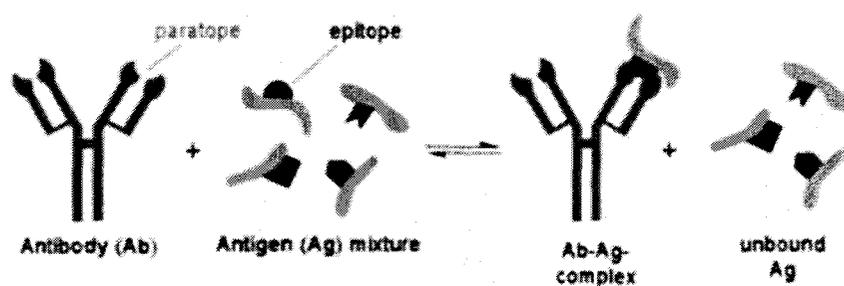


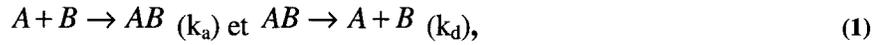
Figure 3 Formation du complexe Anticorps-Antigène (Ab-Ag)⁶.

L'affinité K_A est la force d'interaction entre épitopes et paratopes assortis, et elle dépend du nombre et de la force des liaisons formées entre ces derniers. Elle est quantifiée par la constante à l'équilibre K_{eq} (§2.3). Plus cette constante est élevée, plus l'interaction est forte. Un ordre de grandeur d'affinité pour des interactions Anticorps-Haptène (Ab-H) est de 10^5 à $10^{12} M^{-1}$. La rupture de la liaison Ab-H peut seulement être accomplie sous des conditions extrêmes de pH (eg. chapitre 3, pH Scouting). Toutefois, il est souvent plus facile d'appréhender le K_D (qui sera défini au §2.3) car il est exprimé en une grandeur physique, la mole.

Pour qu'une interaction Ab-Ag efficace ait lieu, l'épitope et le paratope doivent être accessibles et intacts. En effet, un anticorps reconnaît plus la structure spatiale que la nature chimique d'une molécule. Si ces sites sont altérés (eg. méthode de fixation, changement de pH), cela risque de perturber l'interaction. La reconnaissance et la spécificité de l'interaction nécessitent de réaliser une chimie de surface de bonne qualité et adaptée (§4.1.1) en visant la meilleure orientation des sites et la meilleure conservation de la conformation spatiale possibles.

2.3. Cinétique de réaction analyte - ligand

La formation d'un complexe Ab-Ag ou plus largement celle d'un complexe 'analyte A - ligand B' est décrite par un modèle de cinétique d'ordre 2 :



où k_a la constante d'association [$M^{-1}s^{-1}$] et k_d la constante de dissociation [s^{-1}] (typiquement, nous avons $10^{-6} < k_d < 10^4 \text{ s}^{-1}$ et $10^4 < k_a < 10^9 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$)⁷. On pourra remarquer que la gamme du k_d est beaucoup plus étendue que celle du k_a ; ceci implique que les temps de vie $t_d=1/k_d$ d'une liaison peut s'étendre de quelques millisecondes à plusieurs jours. Les vitesses d'association et de dissociation sont données par :

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A][B] \text{ et } -\frac{d[AB]}{dt} = k_d[AB] \quad (2)$$

A l'équilibre, les vitesses d'association et de dissociation sont égales. On obtient:

$$\frac{k_d}{k_a} = \frac{[A][B]}{[AB]} = K_d \text{ ou encore } \frac{k_a}{k_d} = \frac{[AB]}{[A][B]} = K_a \quad (3)$$

On appelle K_D la constante de dissociation à l'équilibre en M et K_A la constante d'association à l'équilibre [M^{-1}]. K_A (aussi appelée constante d'affinité ou constante à l'équilibre K_{eq}) décrit la quantité de complexe à l'équilibre.

Les constantes k_a et k_d dépendent bien-entendu du couple A-B et des conditions physico-chimiques, mais également des contraintes mécaniques appliquées aux molécules⁸. D'où la difficulté de les déterminer précisément même pour un type de molécule et la nécessité de développer des outils efficaces d'analyse de cinétique.

3. Détection versus Analyse

Une analyse permet de déterminer la composition d'un milieu complexe. Il n'est donc pas nécessaire de savoir au préalable ce que l'on est susceptible d'observer. Parmi ces systèmes, on peut noter la spectrométrie de masse. Une détection, quant à elle, permet de déterminer si une molécule cible, définie au préalable, est présente dans le milieu et dans l'affirmative, en quelle quantité. Les systèmes de détection sont donc basés sur une réaction de spécificité comme le couple anticorps/antigène. Le test de la présence de plusieurs molécules nécessite de paralléliser les mesures en réalisant du 'multiplexage'.

3.1. Analyse par spectrométrie de masse

Le MALDI (désorption-ionisation laser assistée par matrice) est une technique d'ionisation dite 'douce' de biomolécules cristallisées dans une matrice pour l'analyse par spectrométrie de masse. L'ESI (Electrospray Ionisation) est une technique d'ionisation douce de biomolécules en phase liquide pour l'analyse par spectrométrie de masse. Ces deux types de sources d'ions ont été couplés à une large palette d'analyseurs mais le MALDI est le plus souvent couplé à un analyseur à temps de vol (TOF) et l'ESI à des quadripôles (QqQ). Les molécules ionisées sont analysées en fonction de leur rapport masse/charge. Ces deux techniques présentent des caractéristiques communes : elles génèrent toutes deux des molécules protonées et possèdent les avantages suivants :

- détermination de la masse moléculaire jusqu'à plusieurs centaines de kDa
- limite de détection inférieure à la picomole
- analyse de mélanges de biomolécules
- possibilité d'intégration dans un microsystème microfluidique (ESI⁹, MALDI¹⁰).

Cependant, la spectrométrie de masse n'est pas une analyse en temps réel, d'autant plus que pour les grosses molécules ou des faibles concentrations, des traitements préalables sont nécessaires (désalage, trypsinisation, électrophorèse, chromatographies...). D'autre part, les analyses en 'basses masses' sont encore difficiles à réaliser.

3.2. Quelques systèmes de détection classiques

Nous présentons ici quelques systèmes de référence en détection de molécules cibles.

3.2.1. ELISA

Le test ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) permet de détecter et quantifier des molécules cibles dans un liquide biologique. Une réaction en 'sandwich', directe (immobilisation de l'anticorps) ou indirecte (immobilisation de l'antigène), est réalisée. A titre d'exemple, les différentes étapes d'une réaction ELISA indirecte (Figure 4) sont:

- immobilisation de l'anticorps de capture
- interaction des molécules cibles avec les anticorps
- ajout d'une solution d'anticorps conjugués à des enzymes : ces derniers se fixent sur les molécules cibles capturées
- réaction des enzymes conjuguées avec un substrat incolore donnant un produit de réaction coloré, dont l'intensité est mesurée par des méthodes optiques.

Le nombre d'anticorps traceurs fixés dépend du nombre de molécules d'antigène immobilisé par l'anticorps de capture. On remonte alors à la quantité de molécules d'intérêt. C'est un test utilisé même cliniquement (eg. dépistage du VIH), pour sa simplicité et sa facilité d'emploi¹¹. L'inconvénient est l'usage unique associé à la nécessité d'utiliser un grand nombre de réactifs différents (coûts). La difficulté d'utilisation à faibles concentrations ainsi que l'impossibilité de déterminer les paramètres cinétiques posent également des limitations à cette technique.

On assiste à l'apparition de l'ELISA sous forme de micropuits fonctionnalisés, comme les micropuits en PDMS/verre (PolyDiMethylSiloxane) proposés par Zhu et al¹². Malgré l'amélioration analytique et la baisse des coûts apportées par cette miniaturisation, l'inconvénient est la nécessité d'utiliser un équipement dédié pour remplir les puits (incompatible avec les technologies de puces classiques).

3.2.2. IPCR : la sensibilité de la PCR au service des tests immunologiques

La 'Polymerase Chain Reaction' (PCR) est une technique d'amplification de l'ADN, permettant de répliquer jusqu'à plusieurs milliards de fois une séquence spécifique à partir de quantités très faibles (pg). C'est un outil simple et puissant dédié à la détection de très faibles quantités d'acides nucléiques¹³. Cependant, nous avons insisté sur l'importance de l'analyse des protéines et sur sa complémentarité avec les analyses génomiques. La technique PCR classique ne permet pas de détecter et quantifier des protéines. Afin d'élargir le champ d'investigation de la PCR aux tests immunologiques et ainsi bénéficier de la grande sensibilité de cette technique dans la détection de protéines, Sano et al. ont établi la méthode d'immuno-PCR (IPCR)¹⁴. Comme il est montré sur la Figure 4, en remplaçant dans un système ELISA l'enzyme par une sonde d'acides nucléiques, il est possible de coupler la détection de protéines à une amplification PCR, pour atteindre des sensibilités plus faibles que l'ELISA classique¹⁵. L'efficacité de l'amplification PCR amène alors une augmentation de sensibilité de 100 à 10 000 fois celle d'un test ELISA.

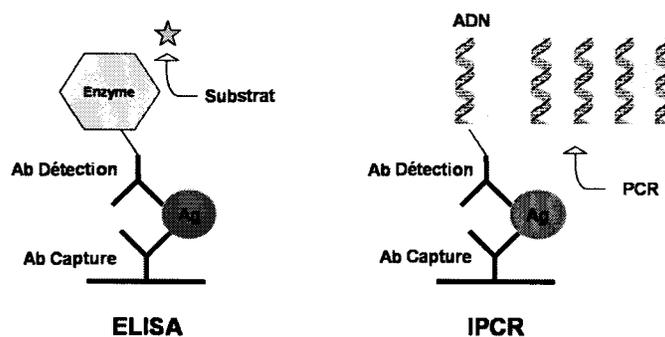


Figure 4 Comparaison des méthodes ELISA et IPCR.

L'IPCR est une technique attractive, même si, du fait de l'extrême sensibilité de l'étape de PCR, les exigences, entre autres en termes de constitution des complexes Ab-ADN, sont rudes. Rappelons également que cela reste une méthode d'amplification et non une méthode directe de détection, ce qui peut être un facteur d'erreurs.

3.2.3. Puces à protéines

Nous avons vu que la quantification des protéines nous donnait une image de l'expression d'un gène, mais que cette tâche n'était pas aisée en raison du grand nombre de protéines existantes. Les puces à protéines peuvent être vues comme une solution à ce problème¹⁶. Elles sont généralement réalisées sur un substrat de verre comprenant plusieurs milliers de plots composés de sondes de capture (bientôt jusqu'à 10000¹⁷). Elles permettent des analyses multiplexées d'interactions protéine-protéine. De plus, elles ont l'avantage d'être compatibles avec les technologies répandues de puces à ADN et d'être réalisées en 'technologie bas coût'¹⁸. Cependant, elles présentent un taux d'évaporation élevé et sont exposées aux réactions croisées, qui augmentent le nombre de faux positifs¹⁹.

3.2.4. Résonance de plasmon de surface

Les précédentes techniques de détection (puce à protéine, IPCR, ELISA) nécessitent de marquer les molécules à identifier, ce qui peut entraîner la déformation de la conformation spatiale de la molécule ou le blocage de son site de reconnaissance. Le développement de techniques sans marquage est donc d'un intérêt certain.

Le système de résonance de plasmon de surface (SPR) est une détection optique permettant de suivre une variation de l'indice d'un milieu où a lieu une interaction biomoléculaire²⁰. C'est une technique très répandue dans l'étude des interactions entre une molécule cible et un récepteur immobilisé sur la surface métallique. C'est une référence pour les études de cinétique.

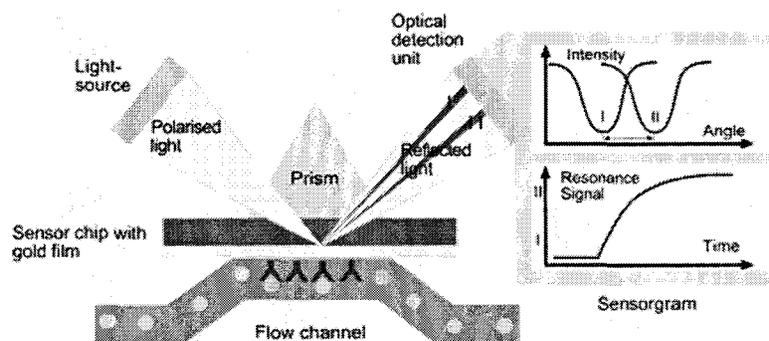


Figure 5 Principe de fonctionnement d'un système de Résonance de Plasmon de Surface (SPR), permettant l'analyse d'interactions au sein d'un canal microfluidique²¹.

Le principe est basé sur l'utilisation de la résonance plasmonique de surface qui détecte des variations d'indice à la surface sur laquelle le ligand est immobilisé. Les analytes sont injectés par un système microfluidique dans un flux continu au dessus de la surface active (Figure 5).

Sensible, elle ne nécessite aucun marquage préalable des molécules d'intérêt. Les systèmes commerciaux SPR dédiés à la détection d'évènements biologiques se développent à grande vitesse. Voici quelques exemples de sociétés proposant des systèmes SPR : Biacore, Autolab, Texas instruments, Genoptics, IBIS technologies, GWC technologies,... avec chacun ses spécificités (imagerie, multiplexage, cellule, flux...). Malgré une couverture conséquente de ce marché, le développement des méthodes SPR s'intensifie, et les applications continuent de se diversifier²². Les grandes lignes de développement concernent le couplage avec d'autres techniques, l'utilisation de nouveaux matériaux ou la mise au point de nouvelles méthodologies. Ces perspectives en font un outil à fort potentiel pour l'étude des interactions biomoléculaires²³. La technique SPR classique présente toutefois des difficultés d'intégration sur puce.

3.3. Les nanobiodétecteurs

Pour allier la sensibilité aux possibilités d'intégration, les nouveaux développements s'orientent vers la microfabrication de biodétecteurs, basés sur des principes physiques variés. De nombreux travaux depuis 2001 explorent les potentialités des nanobiodétecteurs, aussi bien optiques, mécaniques, qu'électriques. La volonté est de détecter des concentrations de plus en plus faibles, en un temps de réponse de plus en plus court. Les travaux montrent la grande sensibilité intrinsèque des nanostructures par rapport aux systèmes planaires. Ainsi, du point de vue strict de transduction du signal, grâce à son grand rapport surface sur volume (S/V), un nanobiodétecteur est plus sensible aux évènements en surface qu'un système planaire. Pour donner un ordre de grandeur, un microcanal de $50\mu\text{m}\times 50\mu\text{m}$ sur 30mm (volume de 75 nl) possède un rapport $S/V=800\text{cm}^{-1}$. Pour un nanofil de silicium de $50\text{nm}\times 30\mu\text{m}$ de long, ce rapport atteint 800000cm^{-1} . L'augmentation du rapport S/V est donc de 10^3 avec le même rapport d'aspect.

R. Bashir dans son état de l'art sur les systèmes de biodétection distingue trois grands types de détecteurs: électriques, mécaniques, et optiques.

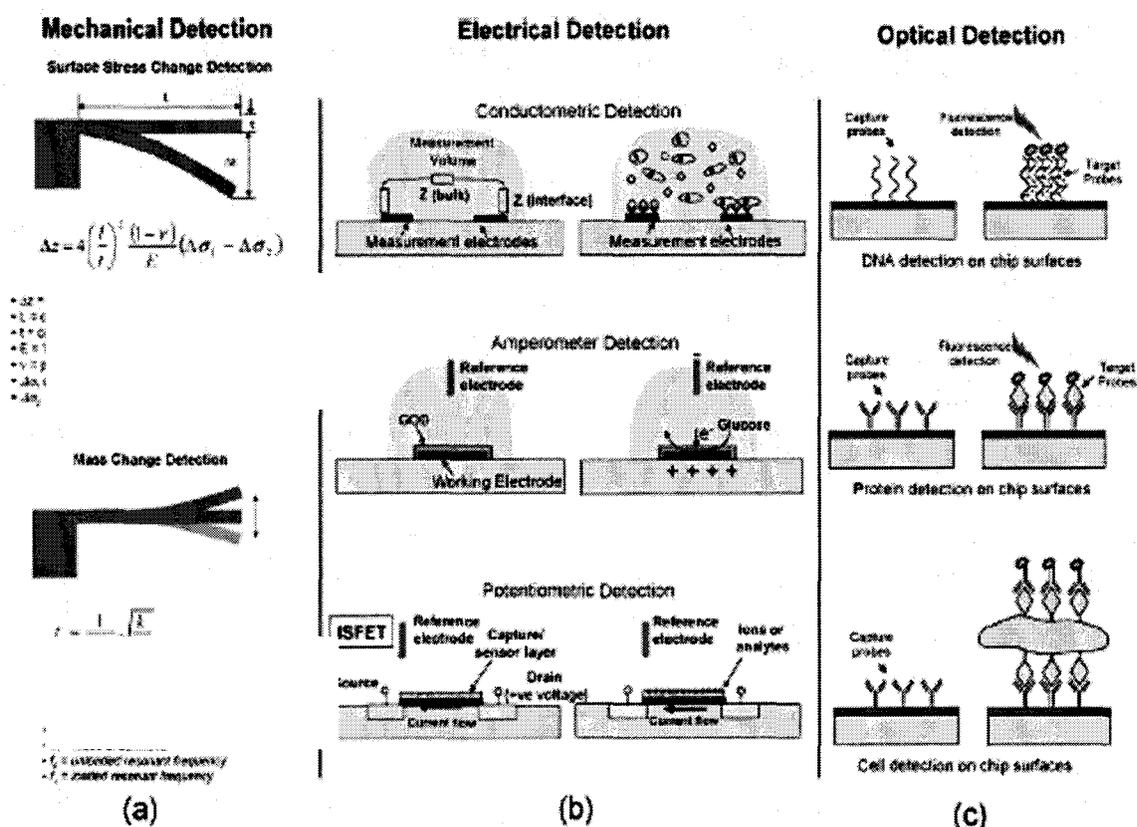


Figure 6 Les trois grands types de biodétecteurs (a) mécaniques (b) électriques (c) optiques.²⁴

A titre d'exemple, nous exposons rapidement dans cette partie ces trois grandes familles de détecteurs en donnant quelques exemples de réalisations et en apportant des éléments de réponse en termes de sensibilité, même si une étude comparative au sens strict est difficilement réalisable.

Détecteurs électriques (exemples)	Espèce détectée - Sensibilité
FET (Field Effect Transistor)	
- à canal SiNW (VLS)	Streptavidine (pM) ²⁶
- à canal SiNW (SOI)	12mer oligonucléotide (tens of pM) ²⁷ PSA (1fg/ml) ²⁸
- à canal CNT ²⁵	ADN (pM to μM) ²⁹
- à grille suspendue	ADN -25mer oligonucleotide (nM) ³⁰
Nanogap (impédancemétrie)	Anticorps, ARN-Aptamer (nM) ³¹
Electrodes interdigitées (impédancemétrie)	ADN (nM) ³²
HEMT (High Electron Mobility Transistor)	
- à hétérostructures GaN/AlGaN	Streptavidine (5 mg/ml) ³³

Détecteurs mécaniques (exemples)	Espèce détectée - Sensibilité
Poutres ³⁴	
-à déflexion statique (silicium)	ADN (femtoM) ³⁵
Déflexion canal microfluidique	Avidin (10^{-17} g/ μm^2) ³⁶
NEMS	4 kDa molécules (zeptog) ³⁷
Ondes acoustiques de surface	BSA (mg/ml) ³⁸
Détecteurs optiques (exemples)	Espèce détectée - Sensibilité
Silicium poreux ³⁹	25mer oligonucléotide (3 fmol/mm ²) ⁴⁰
LSPR	Streptavidine (pM) ⁴¹
Nanoparticules d'or	Séquences d'ADN (mutations d'une base) ⁴²
Bande interdite photonique	Protéine A, Ig(G) (inférieure au nanomolaire) ⁴³
Fibre optique	Cy5-ADN (0.1 μM) ⁴⁴

Nous avons vu les différents types de biodétection envisageables, ainsi que quelques exemples associés. On note des seuils de sensibilité plus bas que ce qui a été vu précédemment (§3.2). Toutefois, nous verrons par la suite que la réduction d'échelle amène aussi des effets spécifiques qui ne sont pas en faveur d'une détection ultra sensible et rapide. Bien que les principes physiques soient très diversifiés, les deux grandes caractéristiques communes de ces systèmes sont la sensibilité et la sélectivité.

4. Sélectivité et sensibilité

On s'intéresse ici aux propriétés (sélectivité et sensibilité) d'un système de détection, à ne pas confondre avec les notions bien pointues de spécificité et sélectivité liées aux marqueurs cliniques. La sensibilité d'un détecteur est la caractéristique qui définit le niveau de détection minimum, et la sélectivité du capteur assure que l'on détecte bien la molécule ciblée.

4.1. Sélectivité et fonctionnalisation

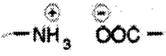
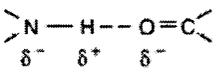
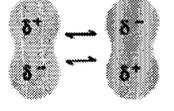
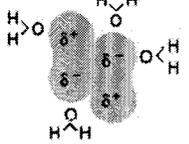
La sélectivité est apportée au biocapteur par la fonctionnalisation permettant la réaction de reconnaissance entre un anticorps et un antigène. Parmi les deux types d'anticorps, polyclonaux et monoclonaux, les anticorps de choix pour les essais analytiques sont les anticorps monoclonaux. En effet, ils se lient à un épitope unique particulier, sont plus spécifiques et possèdent des propriétés plus reproductibles que les polyclonaux. Sans surprise, ils sont aussi plus coûteux.

4.1.1. Fonctionnalisation de surface

Les systèmes à base de molécules biologiques immobilisées sur une surface sont impliqués dans de nombreuses applications : capteurs, purification, biocompatibilité clinique, etc. La création

de couches biomoléculaires organisées pour des applications de biodétection est donc un domaine de recherche en pleine croissance, se situant à la frontière entre chimie, biologie et micro/nanotechnologies, trois domaines dont les évolutions convergent selon la loi de Moore. Un grand nombre de méthodes existent dans la littérature pour immobiliser des protéines⁴⁵:

- Les méthodes non covalentes comme l'adsorption directe, les liaisons électrostatiques (eg. amines primaires), les liaisons hydrogènes, les liaisons biospécifiques (eg. avidine/biotine)...
- Les méthodes covalentes par l'utilisation d'agents couplants.

Forces Non-Covalentes	Origine	
Electrostatiques	Attraction entre charges opposées	
Liaisons hydrogène	Hydrogènes partagés entre atomes électronégatifs (N, O)	
Van Der Waals	Fluctuations dans les nuages électroniques autour de molécules comportant des atomes de polarité opposées	
Forces hydrophobes	Les groupes hydrophobes interagissent difficilement avec l'eau et tendent à se réunir pour en exclure les molécules. Leur attraction implique aussi les forces de Van der Waals.	

Afin de ne pas perdre les fonctions biologiques de la protéine, il est primordial de ne pas la dénaturer et de ne pas modifier sa conformation spatiale pendant l'immobilisation. Une adsorption non contrôlée sur une surface peut effectivement affecter son activité et sa stabilité, menant à une biointerface moins efficace voire inactive. L'immobilisation doit être spécifique d'un couple biomolécule/surface. En effet, le choix dépend du type de ligand (protéine, ADN, enzyme, acide aminé...), et de l'objectif de l'immobilisation (spécificité, concentration, affinité, cinétique...).

Dans certains cas particuliers, une chimie de surface n'est pas nécessaire. Par exemple, des protéines très basiques et positivement chargées ($pI \gg pH$), peuvent être adsorbées sur une surface naturellement négative (surface non modifiée de mica, certaines surfaces piézoélectriques comme le GaN). Mais dans la majorité des cas, l'adsorption de la protéine risque d'induire une perte de sa fonction biologique et une immobilisation covalente est nécessaire.

4.1.2. Immobilisation covalente

La liaison covalente est réalisée grâce à des réactions de couplage entre la surface chimiquement modifiée, et les molécules biologiques. Les molécules à immobiliser (Ab, Ag...)

possèdent de nombreux groupements fonctionnels permettant un lien covalent: amines, acides, thiols... Il est préférable de privilégier un groupement qui n'intervient pas dans l'activité biologique.

- Les liaisons amines primaires sont les plus utilisées car très abondantes (situées sur les résidus de lysine) et réactives du fait de leur situation à la surface des protéines. Le couplage par liaison amine est la méthode la plus recommandée. Les seules situations où l'amine est moins efficace sont l'utilisation de ligands acides ($pI < 3,5$) ou de ligands où l'amine est présente sur le site actif.

- La deuxième liaison la plus utilisée est la liaison thiol. Ce choix dépend surtout de la présence d'un groupement thiolé sur le ligand (histidine...).

- Les liaisons acides sont également très abondantes et accessibles. Cependant, elles ne réagissent pas aussi facilement que les liaisons amines, et elles nécessitent l'utilisation d'un agent couplant (eg. NHS/EDC).

La surface d'immobilisation peut posséder naturellement un groupement permettant une immobilisation covalente (eg. groupement -OH sur verre), sinon il est nécessaire de la modifier pour introduire les groupements spécifiques au couplage (eg. groupements acides sur Au).

Dans ce travail de thèse, nous avons utilisé deux grands types de chimie de surface, basées sur deux types de supports très utilisés en biosystèmes: les silanisations pour les surfaces de verre, et l'auto-organisation de thiols pour les surfaces d'or. Les protocoles utilisés seront détaillés dans les chapitres associés ainsi qu'en Annexe 1.

4.2. La sensibilité

Réussir à comparer précisément la sensibilité des différents systèmes est complexe, car les informations fournies dans la littérature sont souvent incomplètes. Nous nous efforçons dans cette partie d'évaluer la sensibilité des systèmes d'analyse et de détection que nous avons évoqués plus haut. Ceci peut être schématiquement représenté comme sur la Figure 7.

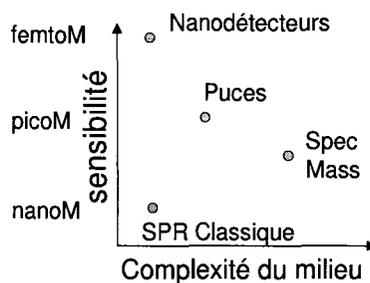


Figure 7 Sensibilité de quelques systèmes de détection/d'analyse en fonction de la complexité du milieu analysé.

Il est intéressant de noter que parler de sensibilité en terme de masse moléculaire apporte des informations surtout sur la performance de transduction en elle-même : c'est-à-dire, à un signal biologique donné (eg. une masse) la capacité du détecteur à le transformer en signal physique. Par contre, si on parle de sensibilité en termes de concentration, cela apporte des informations sur le système global de détection : la performance du détecteur associé à son environnement fluide.

4.2.1. Sensibilité de la spectrométrie de masse

La spectrométrie de masse, dont nous avons vu les avantages (§3.1), est actuellement une des méthodes les plus utilisées pour l'identification de biomolécules. Suivant la taille des molécules, le type de spectrométrie, ainsi que les traitements d'échantillons associés, la sensibilité peut varier dans une gamme allant jusqu'au picomolaire. Mais, pour prendre l'exemple du MALDI, le laser ionisant le mélange matrice/molécules est typiquement de 100nm de diamètre, alors que celui des spots des cibles est de 2,5mm. Donc, seule une faible fraction de l'échantillon est ionisée à chaque tir. Ceci pose deux problèmes pour la sensibilité :

- un analyte présent en très petite quantité est éparpillé sur l'ensemble du spot,
- un grand nombre de tirs lasers doit être réalisé afin d'obtenir une moyenne sur l'ensemble de l'échantillon, car la différence de polarité entre la matrice et les protéines implique une cristallisation non homogène.

4.2.2. Sensibilité des systèmes de détection classiques

Théoriquement, les tests ELISA possèdent des sensibilités de quelques pg/ml⁴⁶. Par exemple, la sensibilité de détection du NGF y est de 5-15 pg/ml, ce qui correspond à 0,34 pmol/ml de NGF, sachant que le NGF a un poids moléculaire de 12/14 kDa. Cependant, en routine, il est difficile d'atteindre réellement ces limites, et en pratique, on obtient plutôt des sensibilités de l'ordre du ng/ml. L'efficacité de l'amplification PCR dans l'immuno-PCR amène à une augmentation de sensibilité de 100 à 10 000 fois comparée à un test ELISA classique¹⁵. Quant à la sensibilité de la méthode SPR, elle se trouve typiquement aux alentours du nanomolaire pour des molécules de taille moyenne²⁰.

4.2.3. Sensibilité des nanodétecteurs

Pour améliorer la sensibilité, nous avons vu que la tendance est au développement de systèmes de détection nanométriques. La plupart des travaux mettent en avant la grande sensibilité de transduction du signal intrinsèque aux nanostructures : la miniaturisation augmente le rapport signal sur bruit, en bénéficiant d'un rapport surface sur volume important. On espère ainsi atteindre des seuils de sensibilité ultimes. Dans le cas d'une mesure électrique sur nanofil par

exemple, ce dernier sera plus sensible aux charges adsorbées (donc aux analytes tels protéines ou ADN) qu'un système planaire comme un ISFET. D'un point de vue strict de transduction du signal, un nanobiodétecteur est plus sensible aux évènements en surface qu'un système plan.

Cependant, en pratique, un système nanométrique est-il réellement plus sensible qu'un système micrométrique ? L'effet global de la miniaturisation sur la sensibilité n'est pas forcément évident, car on enregistre dans la majorité des publications des performances de détection des nanodétecteurs (femto/picomolaires) en-dessous de celles attendues théoriquement. Ces limites montrent donc qu'au-delà de la performance intrinsèque du transducteur, d'autres paramètres rentrent en ligne de compte dans le taux de molécules effectivement détectées. Des travaux récents⁴⁷ montrent en effet qu'il faut prendre en compte un autre aspect souvent négligé : le transport des analytes vers la zone de détection, appelé transport de masse. Sheehan et al. y étudient ainsi l'effet du transport de masse sur une nanodétection : leurs calculs mettent en évidence que les limites de détection enregistrées dans la littérature sont bien dues au transport d'analytes, et non pas au transducteur en lui-même. De ce fait, un transport directionnel des molécules sur le détecteur est primordial pour lever la barrière de sensibilité. Depuis une dizaine d'années, de nombreuses études ont été conduites sur l'effet d'un flux (ou d'un mélange) sur les interactions biomoléculaires à une surface^{48,49}. Cependant, auparavant, à notre connaissance, aucune n'avait encore examiné ces interactions avec un objet nanométrique.

Il a été confirmé par Nair et al⁵⁰ que l'approche ne prenant en compte que la transduction intrinsèque dans la sensibilité de nanodétecteurs n'était pas complète : la démarche doit prendre en compte un aspect cinétique qui reste masqué par l'engouement pour les performances en transduction brute du signal. Le travail de Nair montre que malgré leurs performances supérieures, l'utilisation des nanostructures peut être problématique du fait des limites de sensibilité, des temps de réponse très longs (parfois des heures ou des jours...) en régime de diffusion, ainsi que des pertes d'analytes à proximité des détecteurs (c'est à dire les analytes qui même pour un temps infini n'arriveraient jamais à portée de détection). Les auteurs montrent ainsi qu'il existe une limite fondamentale à la concentration en biomolécules qui peut être effectivement détectable dans un temps raisonnable par tout type de détecteur en régime de diffusion. Cette limite est donnée par la relation de dimensionnement simple:

$$\rho_0 t_s^{M_D} \approx k_D, \quad (4)$$

avec ρ_0 la concentration seuil détectable, t_s le temps nécessaire pour capter N_s molécules, N_s étant la quantité de molécules correspondant au minimum de changement de signal détectable, et M_D et k_D des constantes dépendant des dimensions du système (système 1D, 2D ou 3D) . L'analyse des

équations de réaction-diffusion qui régissent les captures Ab-Ag amène à une telle relation de dimensionnalité, et explique comment cela affecte l'efficacité de capture ainsi que la sensibilité des nanobiodétecteurs.

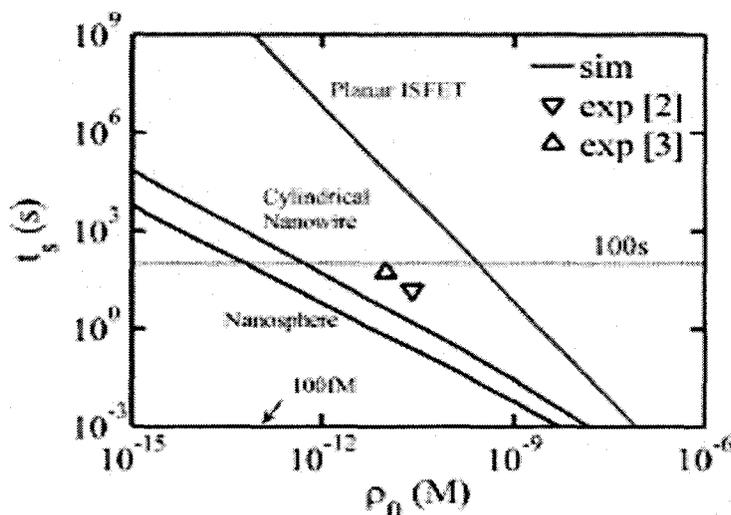


Figure 8 Temps de réponse des systèmes de détection en fonction des concentrations seuil détectables en régime classique de diffusion.⁵⁰

La Figure 8 compare les temps de réponse de trois systèmes (nanobiodétecteurs sphériques 3D, cylindriques 2D et détecteur en volume 1D) en fonction des concentrations seuils détectables.

Une première constatation concerne la sensibilité entre détecteurs 1D, 2D et 3D. Pour un temps de réponse raisonnable, de l'ordre de 100s, on remarque qu'un détecteur de type ISFET peut détecter du nanomolaire, alors qu'un détecteur cylindrique de type nanofil peut détecter jusqu'à 100 femtomolaire ($N_s=10\mu\text{m}^{-2}$ correspondant à l'accroche d'un brin d'ADN de 30 nm de diamètre et 1 μm de long). Ceci illustre qu'un détecteur à base de nanofil est de trois à quatre ordres de grandeur plus sensible qu'un détecteur classique, justifiant ainsi l'enthousiasme pour de telles structures. Par contre, les détecteurs sphériques ne sont que légèrement plus sensibles que leurs homologues 2D, ce qui dans de nombreux cas ne justifiera pas la difficulté technologique supplémentaire.

Une deuxième conclusion très importante découlant de cette relation concerne la sensibilité des systèmes. Pour dépasser les concentrations enregistrées dans la littérature (femtomolaire pour un détecteur 2D), le graphique nous indique qu'il faudrait, dans ces conditions, des temps moyens de réaction de plusieurs heures, voire plusieurs jours. Ceci dit, afin de diminuer ces temps d'interaction, il est possible de jouer sur les paramètres suivants :

- réduire le diamètre des nanodétecteurs à $a_0 < 10\text{nm}$ ou réduire le montant minimum détectable (diminuer N_s) afin d'améliorer le rapport signal sur bruit du détecteur. Cette voie est celle la plus étudiée actuellement dans la littérature

- améliorer l'adressage fluide. Cette voie n'est pas encore très visible dans les travaux de recherche internationaux alors qu'elle est tout aussi importante que l'amélioration du rapport signal sur bruit (transduction du signal).

Afin de bien maîtriser cet adressage fluide, il est nécessaire de s'intéresser à quelques grandeurs caractéristiques, car les lois en vigueur rendent difficile sa mise en œuvre aux dimensions des microsystèmes. Dans le paragraphe suivant, nous voyons quelques nombres caractéristiques qui permettent d'évaluer les phénomènes en jeu à ces échelles, et d'apprécier la nécessité et l'efficacité d'un tel adressage.

5. Contrôler un liquide biologique à l'échelle d'un microsystème

Aux échelles micro et nano, certaines forces et phénomènes deviennent dominants par rapport à ceux observés aux échelles classiques. Le dimensionnement des systèmes microfluidiques implique de tenir compte de ces nouveaux effets propres aux fluides à ces échelles, tels les forces de frottement prédominantes, les flux laminaires, la diffusion, la résistance fluide, la tension de surface.... Mais il est également nécessaire de définir les forces gouvernant les différentes interactions des molécules présentes dans ce fluide. Nous présentons ici quelques grandeurs et nombres caractéristiques qui décrivent ces contraintes.

5.1. Grandeurs caractéristiques

Nous venons de voir que l'environnement microfluidique des nanodétecteurs influençait leur sensibilité. Nous décrivons donc ici les grandeurs fluidiques de base nous permettant d'évaluer cette situation.

5.1.1. Le mouillage

Le mouillage caractérise la géométrie du contact entre un liquide et une surface et résulte de la minimisation de l'énergie à l'interface. Un liquide à forte tension de surface (liens de cohésion interne forts) a tendance à former une goutte. A l'opposé, un liquide à faible tension de surface s'étale plus. De même, un liquide déposé sur une surface à forte tension de surface 'mouille', c'est-à-dire s'étale sur cette surface. Si une surface possède une tension de surface faible, le liquide forme une goutte.

Cette caractéristique peut être déterminée par la mesure de l'angle de contact. En effet, la tension de surface (énergie de surface) et l'angle de contact sont liés par la relation de Young-Dupré :

$$\gamma_{SV} = \gamma_{SL} + \gamma_{LV} \cos \theta , \quad (5)$$

avec γ la tension de surface [N.m^{-1}] entre deux milieux solide (S), gazeux (V), ou liquide (L).

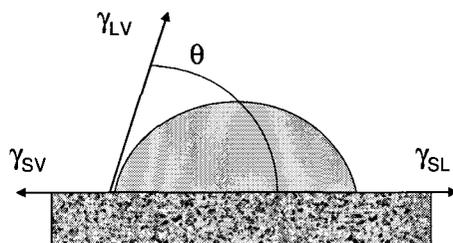


Figure 9 Energies de surface d'un système comprenant une goutte déposée sur un substrat.

Un angle de contact inférieur à 90° caractérise une surface plutôt mouillante, et un angle supérieur à 90° caractérise une surface non mouillante. Dans le cas de l'eau, on peut utiliser les expressions respectivement d'hydrophile et d'hydrophobe. On peut considérer une surface comme superhydrophobe lorsque l'angle de contact est supérieur à 150° .

5.1.2. La longueur capillaire

Les phénomènes de capillarité entrent en jeu à l'échelle d'un système lorsque les forces de gravité appliquées sont du même ordre de grandeur que les forces de tension superficielle. Ceci conduit à définir une longueur capillaire associée au système comme la frontière au-dessus de laquelle les effets liés à la tension de surface deviennent négligeables. La longueur capillaire est le rapport entre les forces de tension superficielle et les forces de gravité :

$$L = \sqrt{\frac{\gamma}{\rho g}} , \quad (6)$$

avec γ la tension superficielle du fluide [N.m^{-1}], ρ la masse volumique du liquide, g l'accélération de la pesanteur. A titre indicatif, L à l'interface eau/air est de l'ordre de 2 mm.

5.1.3. Le nombre de Reynolds

La nature de l'écoulement (turbulent ou laminaire) est directement reliée au rapport entre les forces d'inertie et les forces de frottement, caractérisé par le nombre de Reynolds (Re) :

$$R_e = \frac{UL}{\nu}, \quad (7)$$

avec U la vitesse du fluide [m/s], L la dimension caractéristique du système [m] et ν la viscosité cinématique du fluide [m²/s]. Lorsque les forces de viscosité sont prépondérantes, l'écoulement est dit laminaire. Typiquement, il y a transition d'un régime laminaire à turbulent pour un nombre de Reynolds d'environ 2000⁵¹. Pour des microsystèmes fluidiques où les dimensions caractéristiques sont inférieures au millimètre et où les vitesses ne dépassent pas le centimètre par seconde, ce nombre n'excède pas 10, et on se trouve donc en régime laminaire.

Le flux laminaire correspond à un type de flux où la vitesse des particules dans le fluide en mouvement n'est pas une fonction aléatoire dans le temps. Une conséquence importante pour les microsystèmes fluidiques est que deux flux d'analytes arrivant en contact l'un avec l'autre ne pourront se mélanger que par diffusion.

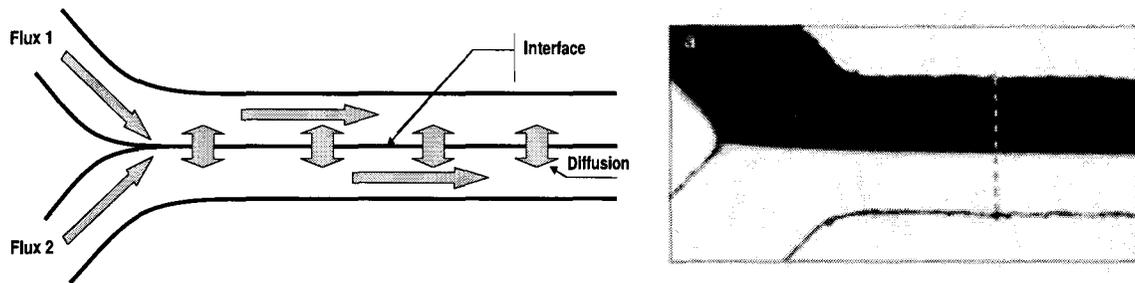


Figure 10 Exemple d'un flux laminaire ayant lieu à la jonction entre deux canaux microfluidiques (gauche) schéma explicatif (droite) image microscope d'un flux laminaire à une jonction en Y⁵².

5.1.4. Le nombre de Peclet et la convection

Un autre nombre sans dimension très important dans les problématiques de convection-diffusion est le nombre de Peclet (Pe). Il est défini comme le rapport des termes de convection sur les termes de diffusion. Pour une vitesse d'écoulement U , l la taille du système, D le coefficient de diffusion et δC une variation typique de la concentration sur la distance l , l'ordre de grandeur de la convection-diffusion est de $U\delta C/l$, et celui de la diffusion est de $D\delta C/l^2$. Le nombre de Peclet, le rapport de ces deux termes, donne :

$$Pe = \frac{Ul}{D} \quad (8)$$

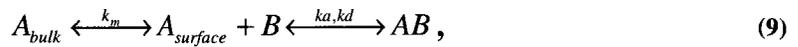
Ce nombre permet d'évaluer l'importance de la convection par rapport à la diffusion : un grand nombre de Peclet montre que l'influence de l'écoulement est importante par rapport à la diffusion moléculaire.

5.1.5. Le nombre de Damköhler et le transport de masse

Au-delà des caractéristiques microfluidiques pures des systèmes, il est nécessaire de prendre en compte les propriétés d'interaction des molécules mises en jeu. Il a été mis en évidence que la formation d'un complexe à la surface d'un biodétecteur entre un analyte A et un ligand immobilisé B à la surface (eg. Ab-Ag) peut ainsi être décrite par deux étapes⁵³ :

- transport de masse de l'analyte jusqu'à la surface du détecteur,
- orientation puis complexation analyte - ligand immobilisé (étape présentée §2.3 et caractérisée par k_a , k_d et K).

Ceci peut se traduire par l'équation suivante ⁵⁴:



avec k_a et k_d les constantes d'association et dissociation et k_m [m/s] la constante liée au transport de masse (diffusion, convection), qui est identique dans les deux sens (vers le capteur, depuis le capteur). Dissocier la contribution du transport de masse de celui de la réaction en elle-même montre bien que plusieurs cas sont envisageables : l'interaction pourra être limitée par l'apport de matériau biologique à la surface, ou bien, par la vitesse de la réaction en elle-même. Suivant le type de réaction mis en jeu, il sera plus ou moins bénéfique d'apporter un moyen de transport de masse supplémentaire. Pour le déterminer, on peut se reporter au nombre de Damköhler (Da)⁵⁵, défini comme le rapport entre le temps caractéristique de réaction sur celui du transport de masse :

$$D_a = \frac{\tau_M}{\tau_c}, \quad (10)$$

avec τ_c le temps caractéristique de la réaction chimique, τ_M le temps caractéristique du transport de masse (qui peut être contrôlé par l'hydrodynamique, ou la diffusion). Suivant la valeur du nombre de Damköhler, on peut donc définir deux cas :

- $D_a \ll 1$: le transport des analytes est beaucoup plus rapide que la réaction en elle-même.

Dans ce cas, l'effet du transport de masse peut être négligé.

- $D_a \gg 1$: la réaction (rapide intrinsèquement) est limitée par le transport de masse diffusif et il n'est pas possible d'étudier directement la cinétique de la réaction.

En microfluidique, on peut approximer le temps de mélange en régime diffusif par $\tau_M \approx l^2/D$ (ou la vitesse de diffusion par D/l), avec l la taille du système, et D le coefficient de

diffusion (ordre de grandeur si plusieurs réactifs). Une expression générale du nombre de Damköhler dans le cas d'une réaction ligand récepteur est définie par Deen comme le rapport de la vitesse de réaction ' $k_a R_T l$ ' (sachant que R_T est la concentration en récepteur en mM) sur la vitesse de diffusion ' D/l '⁵⁶:

$$D_a = \frac{k_a R_T l}{D} \quad (11)$$

Le nombre de Damköhler apporte l'information quant à la prépondérance de l'étape de transport de masse. Par exemple, l'hybridation d'un ss-ADN de 19 bases dans un système microfluidique de 500µm possède un nombre de Damköhler de 0,07, et n'est donc pas significativement influencée par le transport de masse dans le système microfluidique. Il n'est alors pas nécessaire de lui procurer un moyen d'adressage fluïdique spécifique. Par contre, nous avons évalué le nombre de Damköhler du couple 'streptavidine immobilisée/biotine' à environ 10^4 . Un moyen d'adressage fluïdique supplémentaire est donc bénéfique dans ce cas.

5.2. Adressage microfluidique

Comme nous venons de le voir, il est très important, d'autant plus pour des systèmes nanométriques, d'amener les molécules cibles en contact avec la surface active.

Dans les deux cas, la zone de passage de l'analyte est très grande par rapport à la surface de capture. Il est donc nécessaire, d'autant plus pour des molécules diffusant lentement, de mieux contrôler l'adressage fluïdique afin d'augmenter le taux et l'efficacité de contact. Ceci peut être simplifié par l'intermédiaire de concentrateurs ou de micromélangeurs in-situ.

5.2.1. Les concentrateurs

La pré-concentration sur puce peut être effectuée par différents moyens :

- directs⁵⁷ (évaporation, un tri par la charge / le point isoélectrique, utilisation d'une membrane nanoporeuse),
- indirects par l'utilisation de billes permettant la génération d'un flux dynamique vers le capteur (eg. billes concentrées localement par un champ électrique ou magnétique puis déplacées).

La mise en œuvre des méthodes de concentration directes est souvent plus adaptée à la microfluidique continue. Parmi les méthodes indirectes, couplées à une microfluidique discrète, on peut noter la proposition de C.J. Kim concernant une puce utilisant des 'billes traceurs', concentrées dans la goutte par dielectrophorèse, permettant ensuite la création de gouttes concentrées par association avec une scission EWOD⁵⁸.

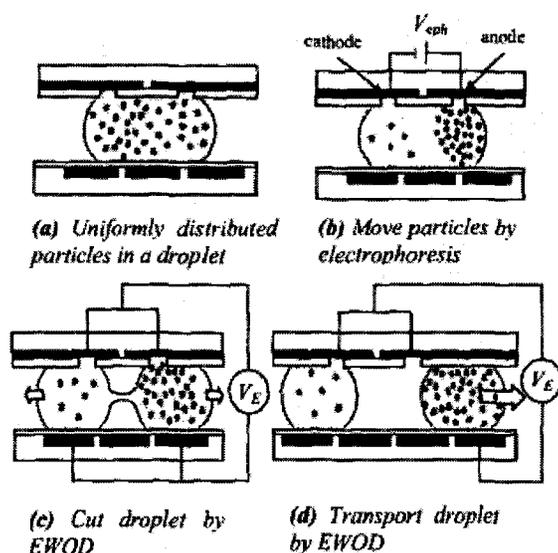


Figure 11 Vue latérale d’une concentration de particules en goutte par dielectrophorèse associée à une microfluidique discrète par EWOD.

Plus récemment encore, une variante avec des traceurs magnétiques a été proposée par Wang et al. Cette fois, les billes sont concentrées dans la goutte par un champ magnétique et ensuite concentrés par scission de goutte en EWOD (cf §6.2.2)⁵⁹.

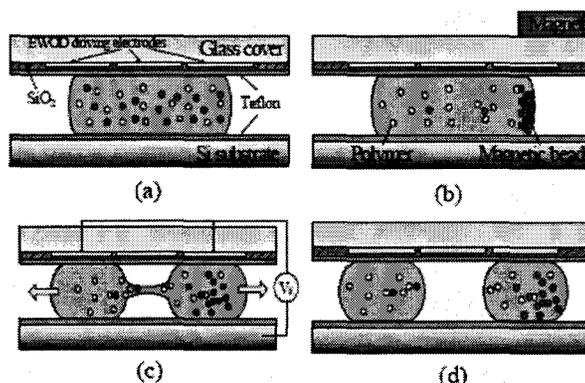


Figure 12 Schéma d’une concentration de particules en goutte par application d’un champ magnétique puis création de goutte par EWOD⁵⁹.

Les techniques exposées nécessitent l’utilisation de traceurs billes sur lesquels on réalise les interactions. Suivant la technique de biodétection utilisée, la présence des billes peut être plus ou moins bienvenue.

5.2.2. Les micromélangeurs

Les micromélanges efficaces sont encore un important défi de la microfluidique^{60,61}. Nous avons vu que pour des microsystèmes fluidiques, pour lesquels les dimensions caractéristiques sont inférieures au millimètre et les vitesses ne dépassent pas le centimètre par seconde, on se situe en régime laminaire. Or, seul un nombre de Reynolds élevé ($Re > 2000$), où l'écoulement est turbulent, est favorable au mélange. Pour un faible nombre de Reynolds comme c'est le cas dans les microsystèmes fluidiques, l'écoulement est laminaire, les échelles de temps de réaction sont limitées par la diffusion, et les mélanges rapides et homogènes deviennent problématiques.

Pour répondre à cette problématique, de nombreuses méthodes de micromélange sont proposées dans la littérature⁶² et partagées en deux grandes familles : les micromélangeurs passifs, et les micromélangeurs actifs. Les premiers ne nécessitent aucun apport extérieur d'énergie, le mélange est réalisé uniquement par des géométries de circulation du fluide élaborées. Les micromélangeurs actifs par contre nécessitent une énergie extérieure, comme une tension électrique, une pompe, des ultrasons... La nécessité d'apporter cette énergie a souvent pour effet de complexifier le dispositif.

La solution la plus pertinente pour effectuer un mélange à faible nombre de Reynolds est la création de mouvements chaotiques dans le fluide^{63,64}. Les premiers dispositifs réalisés utilisaient des motifs gravés sur les parois de microcanaux afin de provoquer des profils périodiques⁶⁵. Bottausci et al réalisent un mélange en canal grâce à des perturbations générées par des flux oscillants perpendiculaires permettant une 'transformation du boulanger'⁶⁶. Meinhart et coauteurs proposent un micromélangeur actif en microcanal par effet électrothermique depuis une électrode sous tension⁶⁷. Alors que depuis quelques années la microfluidique discrète suscite un réel intérêt⁶⁸, des méthodes de micromélange en gouttes voient le jour. Le micromélange en goutte a été mis en évidence aussi bien en microcanal⁶⁹ qu'en goutte libre entre deux plans par électromouillage^{70,71}. Mugele et al⁷² avancent également la possibilité de réaliser un mélange par EWOD en générant une auto-oscillation des gouttes permettant d'accélérer d'un facteur 2 le mélange sur de larges gammes de viscosités. Parmi les systèmes discrets, les ondes acoustiques de surface permettent également des mélanges acoustiques à faibles nombres de Reynolds¹⁰⁴.

6. Microfluidique discrète: intégration et sensibilité

La volonté de diminuer les quantités d'analytes et d'augmenter encore les sensibilités mène à travailler sur des volumes de plus en plus petits et d'autre part à multiplier les tests sur un même échantillon. Cette tendance a donné naissance à la microfluidique discrète (appelée aussi microfluidique digitale ou microfluidique à gouttes), par opposition à la microfluidique continue,

en canaux. De plus en plus de dépôts de matériaux, et de réactions de milieux biologiques sont réalisés à partir de microgouttes. Fréquemment dans le domaine des puces à ADN et à protéines présentant maintenant plusieurs milliers de spots, on a recours au ‘spotting’⁷³. De nouvelles méthodes de patterning permettent de passer à haut débit de flux continus à des gouttes⁷⁴. On peut noter également l’existence d’instruments commerciaux, comme le nanodrop, permettant des analyses spectroscopiques en gouttes (gouttes 10 μ l)⁷⁵. Voyons dans le paragraphe suivant quels sont les avantages de ce travail en gouttes.

6.1. Pourquoi la microfluidique discrète

Dans les laboratoires sur puces, on est amené dans diverses circonstances à souhaiter une interaction rapide et homogène, soit entre deux types de molécules, soit entre une molécule et une surface. Ces interactions sont par exemple un mélange de réactifs, l’accrochage d’une molécule à une surface par l’intermédiaire d’une couche organique ou d’une autre molécule biologique. Dans cette optique, le déplacement de liquide en microcanal est avantageux en termes d’intégration et d’aseptisation, et présente en outre l’avantage d’être bien maîtrisée. Mais, il existe des pendents négatifs à cette compacité⁷⁶: l’encapsulation irréversible empêchant l’accès à la zone sensible, la gestion des moyens d’actionnement parfois lourds nécessitant des pompes, des valves (la pression hydrodynamique est typiquement de plusieurs dizaines de bars en microcanal), les problèmes de bulles... Ces inconvénients deviennent d’autant plus importants que les dimensions des systèmes diminuent.

La microfluidique discrète peut s’affranchir de certaines de ces limitations, et pour des opérations de mélange, de biodétection ou de réactions chimiques, il peut être plus approprié de manipuler des gouttes individuelles. En effet le déplacement de gouttes calibrées sur des zones bioactives permet de réaliser des étapes microfluidiques élémentaires et successives et donc, moyennant un contrôle de l’évaporation, répond aux exigences en termes de diminution des quantités d’analytes et de multiplexage des tests sur un même échantillon. Mais surtout, la microfluidique discrète, par sa propriété intrinsèque qui est le travail en goutte, ou en microréacteur améliore la qualité du contact entre le milieu biologique et la cible, par rapport à un système en flux.

6.2. Les types de microfluidiques discrètes

De nombreuses méthodes sont proposées pour manipuler des gouttes (eg. diélectrophorèse⁷⁷, thermocapillarité⁷⁸, écoulement di-phasique⁸⁰, électromouillage⁸⁷, ondes acoustiques de surface⁷⁹). Les trois dernières méthodes sont décrites plus en détail dans ce paragraphe.

6.2.1. Les écoulements di-phasiques

Les écoulements di-phasiques sont constitués de gouttes englobées dans un milieu non miscible. Classiquement, on utilise des gouttes d'EDI enrobées dans un mélange huile/surfactant. On parle d'écoulement car les gouttes sont créées puis actionnées dans des canaux par pression hydrodynamique. Un exemple d'écoulement diphasique est montré sur la Figure 13.

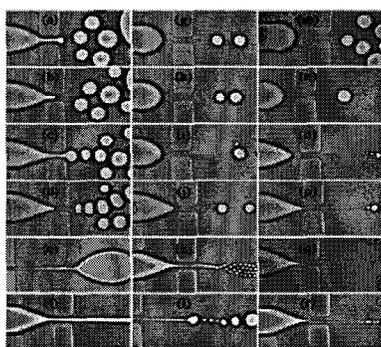


Figure 13 : Ecoulement di-phasique : création de différents régimes de formation de gouttes d'eau dans de l'huile. Une large gamme de tailles calibrées est possible en jouant sur la géométrie et sur la pression hydrodynamique⁸⁰.

Les écoulements diphasiques sont largement étudiés dans la littérature^{81,82}. Plusieurs applications biologiques sont déjà développées : l'isolement, le transport et l'étude de viabilité de cellules en gouttes⁸³, la PCR en émulsion dans l'huile⁸⁴. Cette technique présente les avantages de la microfluidique discrète en évitant l'évaporation grâce à l'encapsulation dans l'huile. Cependant, elle reste inappropriée pour certaines applications telle que l'analyse protéomique, puisqu'une fois les analytes encapsulés dans l'huile, il devient difficile de les récupérer pour une analyse sans pollution par la phase non miscible.

6.2.2. L'électromouillage sur diélectrique

L'électromouillage sur diélectrique (EWOD)⁸⁵ permet la manipulation de très faibles volumes de liquides (de l'ordre du nanolitre). L'effet EWOD est observé pour une goutte de liquide conducteur (eg. eau) placé sur une électrode recouverte d'une couche isolante puis d'un revêtement hydrophobe de type Téflon®. A partir d'une surface non mouillante (revêtement hydrophobe), l'application d'une tension électrique sur l'électrode modifie le comportement de la goutte, la surface devient mouillante et l'angle de contact diminue (Figure 14). Une fois la tension coupée, la goutte reprend sa configuration initiale. La relation de Young Lippman donne l'évolution de l'angle de contact apparent θ en fonction de la tension appliquée V :

$$\cos \theta = \cos \theta_0 + \frac{\epsilon_0 \epsilon_r}{2d\gamma_{LG}} V^2, \quad (12)$$

avec θ l'angle de contact défini par Young, d l'épaisseur de la couche isolante hydrophobe et ϵ_0 et ϵ_r les permittivités respectivement du vide et du revêtement isolant.

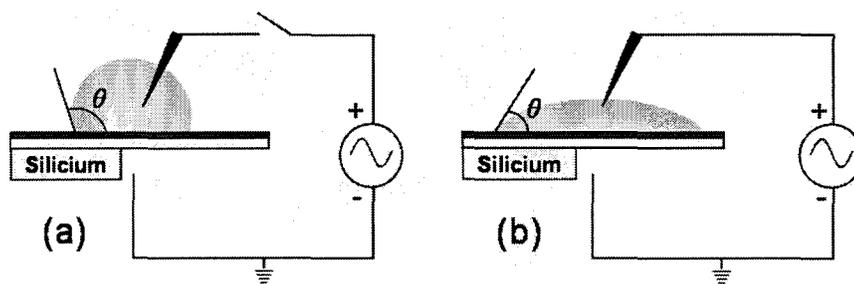


Figure 14 Principe de fonctionnement de l'EWOD.

(a) $V = 0V$ $\theta \sim 115^\circ$ (b) $V \sim 100V$ @ $f = 1kHz$ $\theta \sim 70^\circ$.

L'idée d'actionner des gouttes par électromouillage a ensuite été exploitée^{86,87}. En effet, sur une série d'électrodes, mises séquentiellement sous tension, la goutte se déplace de proche en proche. Les manipulations de gouttes par électromouillage ont été depuis largement testées dans des architectures de laboratoire sur puce^{88,89}. On peut citer l'analyse par spectrométrie de masse^{90,91}, l'utilisation de liquides ioniques⁹², les réactions enzymatiques⁹³ ou les réactions de Polymérase Chain Reaction (PCR)⁹⁴. La thèse de François Caron au sein de l'équipe a permis l'élaboration de dispositifs EWOD pour analyse de protéines par MALDI⁹⁵, qui ont fait l'objet de deux dépôts de brevet (contrat Biochip Lab en collaboration avec Sanofi Aventis et le CEA)^{96,97}. L'équipe travaille actuellement suite au travail de thèse de Nicolas Verplanck⁹⁸ à la réalisation de surfaces superhydrophobes dédiées au déplacement de gouttes par électromouillage⁹⁹.

L'EWOD présente l'avantage de localiser la goutte très précisément sur les électrodes activées. Cependant, les caractéristiques du liquide à déplacer sont importantes dans cette technique (liquides biologiques, viscosités, etc) et d'autre part, le micromélange d'analytes par EWOD n'est pas direct.

6.2.3. Les ondes acoustiques de surface

Grâce à des peignes interdigités réalisés sur substrat piézoélectrique et soumis à une excitation électrique sinusoïdale à la fréquence de résonance, des ondes acoustiques de surface (SAW) peuvent être générées. Les dispositifs SAW à ondes de Rayleigh permettent de déplacer des gouttes de liquide, qu'il soit conducteur ou non, sur une zone de travail délocalisée des électrodes (Figure 15).

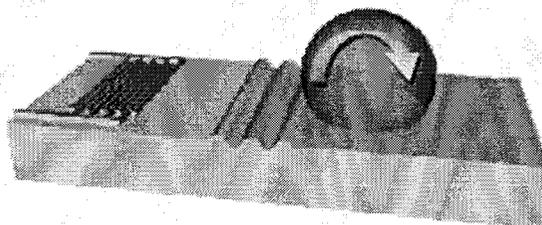


Figure 15 : Principe de l'entraînement d'une goutte par des ondes de Rayleigh générées par des peignes interdigités sur la surface d'un substrat piézoélectrique.

Les électrodes interdigitées permettent de générer des ondes dont l'énergie est suffisante pour permettre un grand nombre d'opérations microfluidiques mises en œuvre dans les laboratoires sur puce: création de manière contrôlée de gouttes de volumes calibrés¹⁰⁰, déplacements¹⁰¹, localisation¹⁰², mélanges^{103,104,105}, expulsions de gouttes¹⁰⁶, atomisation¹⁰⁷, contrôle de l'élévation de température¹⁰⁸.

L'utilisation des ondes acoustiques de surface en chimie et biologie était dédiée aux capteurs¹⁰⁹. Les premiers travaux concernant la réalisation de systèmes SAW comme méthode d'actionnement microfluidique ont été menés par Wixforth et. al.¹¹⁰. Ceci a ouvert de nombreuses possibilités concernant leur utilisation comme plateforme de laboratoire sur puce^{111,112} et a mené à la constitution de la start-up Advalytix¹¹³ en 2000, qui a déposé le brevet relatif au déplacement de gouttes par SAW¹¹⁴. Encore plus récemment, Wixforth a proposé un système pour PCR basé sur une plateforme SAW associée à des résistances chauffantes en gouttes dans l'huile¹¹⁵.

Le déplacement de gouttes par SAW pour des applications microTAS (micro Total Analysis Systems) peut être utilisé dans une configuration un plan, comme dans les travaux de Tan et. al. permettant la récolte de particules (pollen, bactéries) dans des gouttes¹¹⁶, ou en deux plans, permettant l'intégration d'une zone sensible sur le capot¹¹⁷. Ces deux configurations sont montrées sur la Figure 16.

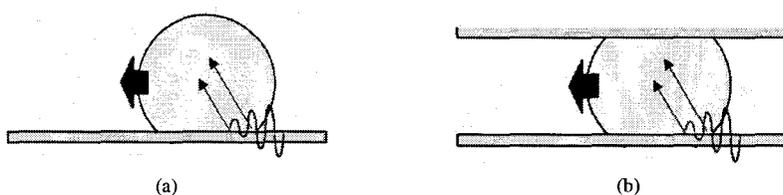


Figure 16 Deux configurations possibles pour l'utilisation des ondes acoustiques de surface dans les laboratoires sur puce (a) un plan (b) deux plans avec utilisation d'un capot (verre, silicium....) permettant l'intégration d'un composant sensible.

L'utilisation des SAW présente les avantages de pouvoir gérer simultanément une ou plusieurs gouttes suivant deux directions perpendiculaires, de déplacer facilement de nombreux liquides (biologiques, de densité différentes, etc...), et de présenter de multiples opérations possibles. Cependant elle nécessite un système de localisation de gouttes afin d'obtenir des déplacements précis, ce qui ne constitue pas une méthode directe de positionnement. Les méthodes envisageables pour effectuer une localisation de gouttes par SAW sont: utiliser un grand nombre de transducteurs¹¹⁸, ou développer une électronique dédiée (positionnement par analyse de l'écho)¹⁰² comme cela a été le cas dans l'équipe microfluidique. En effet, la mise en place et le contrôle de déplacements de gouttes par ondes acoustiques de surface ont fait l'objet de la thèse d'Alan Renaudin. Ces aspects ne sont pas développés dans cette thèse.

7. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons mis en exergue quelques notions essentielles des laboratoires sur puces dédiés à la détection de biomolécules et en particulier de protéines. Ceci en rappelant quelques principes biologiques élémentaires. En particulier, la structure des anticorps et des antigènes, le rôle de leur réaction de spécificité dans la reconnaissance moléculaire, ainsi que les méthodes de fonctionnalisation permettant d'en tirer partie dans un système de biodétection. Nous avons insisté sur la différence entre une analyse et une détection. Quelques systèmes de référence ont été répertoriés dans ce cadre, accompagnés des remarques indispensables concernant leur sensibilité et leur sélectivité vis-à-vis de nos objectifs. Nous exposons les grandeurs caractéristiques importantes pour maîtriser les liquides biologiques aux échelles microfluidiques : en particulier dans une optique de détection sensible sur cellules uniques, de contrôle du transport de masse et d'adressage fluidique. Enfin, nous avons décrit les spécificités des outils microfluidiques permettant d'intégrer de tels outils d'analyse et de détection, et insisté sur les avantages de la microfluidique discrète vis-à-vis de ces systèmes. Alors que la microfluidique discrète commence à s'imposer dans le domaine des laboratoires sur puces, l'utilisation des ondes acoustiques de surface (SAW) permet diverses opérations fluidiques pertinentes.

Nous avons déterminé que parmi les méthodes de microfluidique discrète énumérées, les SAW permettent de répondre efficacement aux importantes problématiques de détection ultrasensible sur cellules uniques, de transport de masse et d'adressage fluidique :

- elles permettent des manipulations variées de microgouttes tout en profitant d'une délocalisation entre les transducteurs acoustiques et la zone de travail et en présentant une simplicité de réalisation technologique,

- les diverses opérations fluidiques possibles sur de petits volumes de liquide permettent d'envisager l'isolement et la culture de cellules en gouttes, l'actionnement de milieux biologiques et l'adressage en 2D vers diverses zones actives,
- les ondes acoustiques de surface permettent d'améliorer l'interaction à l'interface 'liquide/solide' avec un capot fonctionnel en vis à vis. L'intégration d'un système de détection en capot au déplacement et au micromélange par ondes acoustiques de surface constitue donc une solution pertinente aux problématiques citées dans ce chapitre.

En définitive, l'utilisation du micromélange SAW pourrait ouvrir la voie à l'analyse de très petites quantités de fluide provenant des cellules isolées en faible nombre.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE 1.

- ¹ B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, “Molecular Biology of the cell”, 3rd ed. Garland Publishing, New York, N.Y. (1994)
- ² S.P. Gygi, Y. Rochon, B. Franz, R. Abersold, “Correlation between protein and mRNA abundance in yeast”, *Mol. Cell Biol.* (1999), 19, pp. 1720-1730.
- ³ F. Le Naour, L. Hohenkirk, A. Grolleau, D.E. Misek, P. Lescure, J.D. Geiger, S. Hanash, L. Beretta, “Profiling changes in gene expression during differentiation and maturation of monocyte-derived dendritic cells using both oligonucleotide microarrays and proteomics”, *J. Biol. Chem.* (2001), 276, pp. 17920-17931.
- ⁴ L. Anderson, J. Seilhamer, “A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver”, (1997) *Electrophoresis* 18, pp. 533-537.
- ⁵ L. Anderson, J. Seilhamer, “A comparison of selected mRNA and protein abundances in human liver”, *Electrophoresis* (1997) 18, pp. 533-537.
- ⁶ A. Manz, N. Pamme, D. Lossifidis, “Bioanalytical chemistry”, World Scient. Publish. Co (2004)
- ⁷ E.W. Voss, “Kinetic measurements of molecular interactions by spectrofluorometry”, *J. Mol. Recognit.* (1993), 6, 2, pp.51–58.
- ⁸ P. Bongrand, “Ligand-receptor interactions”, *Rep. Prog. Phys.* (1999), 62, 6, pp. 921–968.
- ⁹ Julien Carlier, “Développement technologique de composants microfluidiques intégrés à base de résine SU8 : Application à l’analyse de protéines par Spectrométrie de masse”, Thèse de doctorat de l’université de Lille1, 2004.
- ¹⁰ H. Moon, A. Wheeler, R. Garrell, J. Loo, Chang-Jin, C.J. Kim, “An integrated digital microfluidic chip for multiplexed proteomic sample preparation and analysis by MALDI-MS”, *Lab Chip* (2006), 6, pp. 1213 – 1219.
- ¹¹ H. Zhu, M. Snyder, “Protein chip technology”, *Curr Opin Chem Biol.* (2003), 7, 1, pp. 55-63.
- ¹² H. Zhu, M. Snyder, “Protein arrays and microarrays”, *Curr Opin Chem Biol.* (2001), 5, 1, pp. 40-45.
- ¹³ R.K. Saiki, R.K. Saiki, S. Scharf, F. Faloona, K.B. Mullis, G.T. Horn, H.A. Erlich, N. Arnheim, “Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia”, *Science* (1985), 230, pp. 1350–1354.
- ¹⁴ T. Sano, C.L. Smith, C.R. Cantor, “Immuno-PCR: very sensitive antigen detection by means of specific antibody-DNA conjugates”, *Science* (1992), 258, pp. 120–122.
- ¹⁵ K. Saito, D. Kobayashi, M. Sasaki, H. Araake, T. Kida, A. Yagihashi, T. Yajima, H. Kameshima, N. Watanabe, “Detection of human serum tumor necrosis factor-alpha in healthy donors, using a highly sensitive immuno-PCR assay”, *Clin. Chem.* (1999), 45, pp. 665–669
- ¹⁶ P. Mitchell, “A perspective on protein microarrays”, *Nat. Biotech.* (2002), 20, pp. 225-229.
- ¹⁷ Site commercial de Plexera: <http://www.plexera.com/Products/NanoCapture.php>

- ¹⁸ D. Cahill, "Protein arrays: a high-throughput solution for proteomics research?", *Proteomics: A Trends Guide* (2000), pp. 47-51.
- ¹⁹ A. Talapatra, R. Rouse, G. Hardiman,, "Protein microarrays: challenges and promises", *Pharmacogenomics* (2002), 3, 4, pp. 527-536.
- ²⁰ J. Homola, "Surface Plasmon Resonance Based Sensors", *Springer series on chemical sensors and biosensors*, 04 (2006)
- ²¹ Site commercial de Biacore : www.biacore.com
- ²² P. Royer, "Essor de la plasmonique vers les applications", *synthèse thématique de l'OMNT* (2006)
- ²³ K.S. Phillips, Q. Cheng, "Recent advances in surface plasmon resonance based techniques for bioanalysis", *Anal Bioanal Chem.* (2007), 387,5, pp. 1831-1840.
- ²⁴ R. Bashir, "BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects", *Advanced Drug Delivery Reviews* (2004), pp. 1565– 1586.
- ²⁵ J. Wang, "Carbon-Nanotube Based Electrochemical Biosensors: A Review", *Electroanalysis* (2005), 17, 1, pp. 7-14.
- ²⁶ Y. Cui, Q. Wei, H. Park, C.M. Lieber, "Nanowire Nanosensors for Highly Sensitive and Selective Detection of Biological and Chemical Species", *Science* (2001), 293, 5533, pp. 1289-1292.
- ²⁷ Z. Li, B. Rajendran, T.I. Kamins, X. Li, Y. Chen, R.S. Williams, "Silicon nanowires for sequence-specific DNA sensing: device fabrication and simulation", *App. Phys. A: Materials science and processing* (2005), 80, 6, pp. 1257-1263.
- ²⁸ A. Kim, C. Ah, H. Yu, J.H. Yang, I.B. Baek,C.G. Ahn, C. Park, M. Jun, S. Lee, "Ultrasensitive, label-free, and real-time immunodetection using silicon field-effect transistors", *Applied Physics Letters* (2007), 91, pp. 103901.
- ²⁹ A. Star, E. Tu, J. Niemann, J.C. Gabriel, C.S. Joiner , C. Valcke, "Label-free detection of DNA hybridization using carbon nanotube network field-effect transistors", *Proceedings of the National Academy of Sciences* (2006), 103, 4, pp. 921-926.
- ³⁰ F. Bendriaa, M. Harnois, F. Le Bihan, A.C. Salaün, T. Mohammed-Brahim, O. Bonnaud, "Sensitivity of suspended-gate poly silicon TFTs to charge variation and application to DNA recognition", *ECS Transactions* (2006), 3, 8, pp. 341-347.
- ³¹ U. Schlecht, A. Malavé, T. Gronewold, M. Tewes, M. Lohndorf, "Comparison of antibody and aptamer receptors for the specific detection of thrombin with a nanometer gap-sized impedance biosensor", *Analytica Chimica Acta* (2006), pp.65–68.
- ³² L. Moreno-Hagelsieb, P.E. Lobert, R. Pampin, D. Bourgeois, J. Remacle, D. Flandre, "Sensitive DNA electrical detection based on interdigitated Al/Al₂O₃ microelectrodes", *Sens. & Act. B* (2004), 98, pp. 269–274.

- ³³ B.S. Kang, F. Ren, L. Wang, C. Lofton, W.W. Tan, S. J. Pearton, A. Dabiran, A. Osinsky, P.P. Chow, “Electrical detection of immobilized proteins with ungated AlGaN/GaN high-electron-mobility Transistors”, *Applied Physics Letters* (2005), 87, p. 023508.
- ³⁴ C. Ziegler, “Cantilever-based biosensors”, *Anal Bioanal Chem* (2004), 379, pp. 946-959.
- ³⁵ R. McKendry, J. Zhang, Y. Arntz, T. Strunz, M. Hegner, H.P. Lang, “Multiple label-free biodetection and quantitative DNA-binding assays on a nanomechanical cantilever array”, *Proc Natl Acad Sci* (2002), 99, pp. 9783–9788.
- ³⁶ T. Burg, S. Manalis, “Suspended microchannel resonators for biomolecular detection”, *Applied Physics Letters* (2003), 83, 13, pp. 2698-2700.
- ³⁷ Y. Yang, C. Callegari, X.. Feng, K. Ekinci, M. Roukes, “Zeptogram scale nanomechanical mass sensing”, *Nano letters* (2006), 6, 4, pp. 583-586.
- ³⁸ K. Lange, G. Blaess, A. Voigt, R. Götzen, M. Rapp, “Integration of a surface acoustic wave biosensor in a microfluidic polymer chip”, *Biosensors and Bioelectronics* (2006), 22, 2, pp. 227-232.
- ³⁹ H. Ouyang, C. Striemer, P. Fauchet, “Quantitative analysis of the sensitivity of porous silicon optical biosensors”, *Applied Physics Letters* (2006), 88, 16, pp. 163108.
- ⁴⁰ D.C. Tessier, S. Boughaba, M. Arbour, P. Roos, G. Pan, “Improved surface sensing of DNA on gas-etched porous silicon”, *Sens. & Actuat. B* (2006), 120, 1, pp. 220-230.
- ⁴¹ D. Stuart, A. Haes, C. Yonzon, E. Hicks, R.P. Van Duyne, “Biological applications of localised surface plasmonic phenomena”, *IEE Proc.-Nanobiotechnol.* (2005), 152, 1, pp. 13-32.
- ⁴² D. Maxwell, M.J. Taylor, S. Nie, “Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules”, *J. Am. Chem. Soc.* (2002), 124, pp. 9606–9012.
- ⁴³ I. Block, L. Chan, B. Cunningham, “Photonic crystal optical biosensor incorporating structured low-index porous dielectric”, *Sensors and Actuators B* (2006), 120, pp. 187–193.
- ⁴⁴ J. Jensen, L. Pedersen, P. Hoiby, L. Nielsen, J. Folkenberg, J. Riishede, D. Noordegraaf, K. Nielsen, A. Carlsen, A. Bjarklev, “Photonic crystal fiber based evanescent-wave sensor for detection of biomolecules in aqueous solutions”, *Optics Letters* (2004), 29, 17, pp. 1974-1976.
- ⁴⁵ P. Peluso, D. Wilson, D. Do, H. Tran, M. Venkatasubbaiah, D. Quincy, B. Heidecker, K. Poindexter, N. Tolani, M. Phelan, K. Witte, L. Jung, P. Wagner, S. Nock, “Optimizing antibody immobilization strategies for the construction of protein microarrays”, *Analytical Biochemistry* (2003), 312, pp. 113-124.
- ⁴⁶ M.D. Cima-Cabal, F. Méndez, F. Vázquez, M. García-Suárez, J. De los Toyos, “A specific and ultrasensitive chemiluminescent sandwich ELISA test for the detection and quantitation of pneumolysin”, *J. Immunoassay and Immunochemistry* (2001), 22, 2, pp. 99-112.
- ⁴⁷ P. Sheehan, L. Whitman, “Detection Limits for Nanoscale Biosensors”, *Nanoletters* (2005), 4, pp. 803-807.

- ⁴⁸ M. Model, G. Omann, Ligand-Receptor Interaction Rates in the Presence of Convective Mass Transport, *Biophysical Journal* (1995), 69, pp. 1712-1720.
- ⁴⁹ K. Pappaert, G. Desmet, “A dimensionless number analysis of the hybridization process in diffusion- and convection-driven DNA microarray systems”, *Journal of Biotechnology* (2006), 123, pp. 381–396.
- ⁵⁰ P.R Nair, A. Alam, “Performance limits of nanobiosensors”, *Applied Physics Letters* (2006), 88, pp. 233120.
- ⁵¹ R. Bird, W. Stewart, E. Lightfoot, *Transport phenomena* (2002), Wiley, New York
- ⁵² B. Kuczynski, P. LeDuc, W. Messner, “Pressure-driven spatiotemporal control of the laminar flow interface in a microfluidic network”, *Lab Chip* (2007), 7, pp. 647–649.
- ⁵³ C. Lipschultz, Y. Li, S. Smith-Gill, “Experimental design for analysis of complex kinetics using surface plasmon resonance”, *Methods* (2000), 20, pp. 310-318.
- ⁵⁴ “BIATechnology Handbook”, 1994, Ch 5, Pharmacia Biosensors AB, Uppsala Sweden.
- ⁵⁵ D. Edwards, “Surface reaction near a stagnation point”, *Studies in Applied Mathematics* (2000), 105, pp. 1-29.
- ⁵⁶ W. M. Deen, “Analysis of Transport Phenomena”, Oxford University Press, New York (1998)
- ⁵⁷ S. Song, A. Singh, “On-chip sample preconcentration for integrated microfluidic analysis”, *Anal Bioanal Chem* (2006), 384, pp. 41-43.
- ⁵⁸ S.K. Cho, C.J. Kim, “Particle separation and concentration control for digital microfluidic systems”, *Proc. of IEEE Micro Electro Mechanical Systems* (2003), pp. 686-689.
- ⁵⁹ Y.Z. Wang, Y. Zhao, S.K. Cho, “In-droplet magnetic beads concentration and separation for digital microfluidics”, *IEEE Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems Conference, Transducers 2007*, pp. 711-714.
- ⁶⁰ T. Squires, S. Quake, “Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale”, *Reviews on Modern Physics* (2005), 77, pp. 977-1026.
- ⁶¹ J. M. Ottino, S. Wiggins, “Introduction: mixing in microfluidics”, *Philos. Trans. Royal Society of London* (2004), 362, 1818, pp. 923-935.
- ⁶² V. Hessel, H. Löwe, F. Schönfeld, “Micromixers-a review on passive and active mixing principles”, *Chemical Engineering Science* 60 (2005), pp. 2479 – 2501.
- ⁶³ H. Aref, “The development of chaotic advection”, *Phys. Fluids* (2002), 14, pp. 1315-1325.
- ⁶⁴ J.M. Ottino, S. Wiggins, “Foundations of chaotic mixing”, *Philos. Trans. R. Soc. London* (2004), Ser. A, 362, pp. 937-970.
- ⁶⁵ A.D. Stroock, S. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H. Stone, G.M. Whitesides, “Chaotic mixer for microchannels”, *Science* (2002), 295, pp. 647-651.

- ⁶⁶ F. Bottausci, I. Mezic, C. Meinhardt, C. Cardone, “Mixing in the shear superposition micromixer: three-dimensional analysis”, *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* (2004) A362, pp. 1001–1018.
- ⁶⁷ M. Sigurdson, D. Wang, C. Meinhardt, “Electrothermal stirring for heterogeneous immunoassays”, *Lab Chip* (2005), 5, pp. 1366–1373.
- ⁶⁸ *Lab Chip*, (2004), 4, “Special issue on digital microfluidics”
- ⁶⁹ H. Song, R. F. Ismagilov, “Millisecond Kinetics on a Microfluidic Chip Using Nanoliters of Reagents”, *J. Am. Chem. Soc.* (2003), 125, pp. 14613-14619.
- ⁷⁰ P. Paik, V.K. Pamula, R.B. Fair, “Rapid droplet mixers for digital microfluidic systems”, *Lab Chip* (2003), 3, pp. 253-259.
- ⁷¹ S. Cho, H. Moon, C.J. Kim, “Creating, transporting, cutting, and merging liquid droplets by electrowetting-based actuation for digital microfluidic circuits”, *J. Microelectromech. Syst.* (2003), 12, pp. 70-80.
- ⁷² F. Mugele, J.C. Baret, D. Steinhauser, “Microfluidic mixing through electrowetting-induced droplet oscillations”, *Applied Physics Letters* (2006), 88, pp. 204106.
- ⁷³ R. Blossey, A. Bosio, “Contact line deposits on cDNA microarrays: A ‘twin-spot effect’”, *Langmuir* (2002), 18, 7, pp. 2952-2954.
- ⁷⁴ F. Vandevelde, T. Leïchlé, C. Ayela, C. Bergaud, L. Nicu, K. Haupt, “Direct patterning of molecularly imprinted microdot array for sensors and biochips”, *Langmuir* (2007), 23, pp. 6490-6493.
- ⁷⁵ Site Internet commercial de Nanodrop : <http://www.nanodrop.com/nd-1000-overview.html>
- ⁷⁶ M. Pollack, A. Shendorov, R. Fair, “Electrowetting-based actuation of droplets for integrated microfluidics”, *Lab on Chip* (2002), 2, 1, pp. 96-101.
- ⁷⁷ J. Vykoukal, J. Schwartz, F. Becker, P. Gascoyne, “A programmable dielectrophoretic fluid processor for droplet-based chemistry”, *Proceedings of the MicroTAS’01* (2001), p. 72-74.
- ⁷⁸ T.S. Sammarco, M.A. Burns, “Heat-transfer analysis of microfabricated thermocapillary pumping and reaction devices”, *J. Microeng.* (2000), 10, p. 42-55.
- ⁷⁹ A. Renaudin, P. Tabourier, V. Zhang, J-C. Camart, C. Druon, “SAW nanopump for handling droplets in view of biological applications”, *Sens and Actu B* (2006), 113, pp. 389-397.
- ⁸⁰ C. Baroud, H. Willaime, “Multiphase flows in microfluidics”, *C.R. Phys.* (2004), 5, pp. 547-555.
- ⁸¹ T. Thorsen, R. Roberts, F. Arnold, S. Quake, “Dynamic Pattern Formation in a Vesicle-Generating Microfluidic Device”, *Phys. Rev. Lett.* (2001), 86, 18, pp.4163-4166.
- ⁸² C. Baroud, M. Robert de Saint Vincent, J. Delville “An optical toolbox for total control of droplet microfluidics”, *Lab Chip* (2007), 7, pp. 1029–1033.
- ⁸³ E. Brouzes, J. Branciforte, M. Twardowski, D. Marran, Y. Suo, Y. Charles, L. Boitard, M.P. Weiner, J.M. Rothberg, N. Perrimon, D.R. Link, "Droplet-based high-throughput live/dead cell assay", *Proceedings of μ TAS’06* (2006), pp. 1043-1045.

- ⁸⁴ M. Nakano, J. Komatsu, S. Matsuura, K. Takashima, S. Katsura, A. Mizuno, "Single-molecule PCR using water-in-oil emulsion", *J. Biotechnology* (2003), 102, 2, pp. 117-124.
- ⁸⁵ B. Berge, *C.R. Acad. Sci. Paris* (1993) t317, Série II, pp. 157-163.
- ⁸⁶ J. Lee, H. Moon, J. Fowler, C.J. Kim, T. Schoellerhammer, "Addressable micro liquid handling by electric control of surface tension", *Proc. 14th IEEE Int. Conf. Micro. Electro Mechanical Systems, MEMS* (2001), Interlaken, Suisse, pp. 499-502.
- ⁸⁷ M. Pollack, R. Fair, A. Shenderov, "Electrowetting-based actuation of droplets for microfluidic applications", *App. Phys. Lett.* (2000), 77, 11, pp. 1725-1726.
- ⁸⁸ M. Pollack, R. Fair, A. Shenderov, "Electrowetting-Based actuation of liquid droplets for microfluidic applications", *Appl. Phys. Lett* (2000), 77, pp. 1725-1726.
- ⁸⁹ R. Fair, "Digital microfluidics: is a true lab-on-a-chip possible?", *Microfluidics and nanofluidics* (2007), 3, 3, pp. 245-281.
- ⁹⁰ N. Verplanck, Y. Coffinier, M. Wisztorski, G. Piret, C. Delhayé, V. Thomy, I. Fournier, J.C. Camart, P. Tabourier, R. Boukherroub, Nanostructured surface as EWOD counter electrode for matrix-free mass spectrometry analysis, *Proceed μ TAS 2006*, Tokyo, pp. 771-773.
- ⁹¹ A. Wheeler, H. Moon, C. Bird, R. Ogorzalek Loo, C.J. Kim, J. Loo, R. Garrell, "Digital microfluidics with in-line sample purification for proteomics analyses with MALDI-MS", *Anal. Chem.* (2005), 77, pp. 534-540.
- ⁹² D. Chatterjee, B. Hetayothin, A. Wheeler, D. King, R. Garrell, "Droplet-based microfluidics with nonaqueous solvents and solutions", *Lab Chip*, 2006, 6, pp. 199-206.
- ⁹³ D. Jary, A. Chollat-Namy, Y. Fouillet, J. Boutet, C. Chabrol, G. Castellan, D. Gasparutto, C. Peponnet, "DNA repair enzyme analysis on EWOD fluidic microprocessor", *NSTI Nanotech* (2006)
- ⁹⁴ Y. Chang, G. Lee, F. Huang, Y. Chen, J. Lin, "Integrated polymerase chain reaction chips utilizing digital microfluidics", *Biomedical Microdevices* (2006) 8,3, pp. 215-225.
- ⁹⁵ F. Caron, "Développement de microsystèmes fluidiques à électromouillage pour l'analyse de protéines par spectrométrie de masse MALDI", Thèse de doctorat de l'Université de Lille1, (2007).
- ⁹⁶ J.C. Fourier, F. Caron, C. Druon, P. Tabourier, J.P. Le Pesant, D. Loyaux, C. Rolando, "Dispositif pour désorption par rayonnement laser incorporant une manipulation de l'échantillon liquide sous forme de gouttes individuelles permettant leur traitement chimique et biochimique", brevet FR20040006081 (2004).
- ⁹⁷ J.C. Fourier, F. Caron, C. Druon, P. Tabourier, "Dispositif de manipulation de gouttes destiné à l'analyse chimique, procédé de fabrication du dispositif, et système d'analyse microfluidique", brevet FR20040006080 (2004).
- ⁹⁸ N. Verplanck, "Développement de microsystèmes EWOD sur surface hydrophobe et superhydrophobe : Application à la spectrométrie de masse", Thèse de doctorat de l'université de Lille1 (2007).

- ⁹⁹ N. Verplanck, Y. Coffinier, E. Galopin, J. C. Camart, R. Boukherroub, V. Thomy, “Reversible electrowetting on superhydrophobic silicon nanowires”, *Nano letters* (2007), 7, pp. 813-817.
- ¹⁰⁰ C. Strobl, Z. Guttenbeg, A. Wixforth, “Nano&pico-dispensing of fluids on planar Substrates using SAW”, *IEEE Trans. on Ultras., Ferroelec. and Freq. control* (2004), 51, pp. 1432-1435.
- ¹⁰¹ A. Renaudin, P. Tabourier, V. Zhang, J.C. Camart, C. Druon, “SAW nanopump for handling droplets in view of biological applications”, *Sens&Act B* (2006), 113, p 389-397.
- ¹⁰² A. Renaudin, P. Tabourier, J.C. Camart, C. Druon, “Surface acoustic wave 2D transport and location of microdroplets using echo signal”, *J. Appl. Phys.* (2006), 100, pp. 116101-116103.
- ¹⁰³ A. Toegl, J. Scriba, A. Wixforth, C. Strobl, C. Gauer, Z. Guttenberg, “Acoustic manipulation of small droplets”, *Anal Bioanal Chem* (2004), 379, pp. 982–991.
- ¹⁰⁴ K. Sritharan, C. J. Strobl, M. F. Schneider, A. Wixforth, Z. Guttenberg, “Acoustic mixing at low Reynold’s numbers”, *Applied Physics Letters* (2006), 88, pp. 054102.
- ¹⁰⁵ E. Galopin, A. Renaudin, V. Thomy, J.C. Camart, P. Tabourier, C. Druon, “Enhanced protein capture by ultrafast SAW droplet μ mixing”, *Porocceed. MicroTAS'06* (2006), pp. 651-653.
- ¹⁰⁶ J. Bennès, S. Alzuaga, S. Ballandras, F. Chérioux, F. Bastien, J-F. Manceau, “Droplet ejector using surface acoustic waves”, *2005 IEEE Ultrasonics Symposium*, pp. 823-826.
- ¹⁰⁷ K. Chono, N. Shimizu, Y. Matsui, J. Kondoh, S. Shiokawa, “Development of Novel Atomization System Based on SAW Streaming”, *Japan. Journal of Applied Physics* (2004), 43, B, pp. 2987–2991.
- ¹⁰⁸ J. Kondoh, N. Shimizu, Y. Matsui, M. Sugimoto, S. Shiokawa, “Temperature-control system for small droplet using surface acoustic wave device”, *IEEE Sensors* (2005), pp. 727-730.
- ¹⁰⁹ A. Talbi, F. Sarry, F. Moreira, M. Elhakiki, O. Elmazria, L. Le Brizoual, P. Alnot, “Zero TCF ZnO/Quartz SAW structure for gas sensing applications“, *IEEE Int Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control Joint 50th Anniversary Conf*, (2004), pp. 542-545.
- ¹¹⁰ A. Rathgeber, C. Strobl, H.J. Kutschera, A. Wixforth, “Planar microfluidics - Liquid handling without walls”, *ArXiv : physics/0104079* (2001)
- ¹¹¹ A. Toegl, R. Kirchner, C. Gauer, A. Wixforth, “Enhancing Results of Microarray Hybridizations Through Microagitation”, *J. Biomolecular Techniques* (2003), 14, pp. 197-204.
- ¹¹² Z. Guttenberg, A. Rathgeber, S. Keller, J. Rädler, A. Wixforth, M. Kostur, M. Schindler, P. Talkner, “Flow profiling of a surface-acoustic-wave nanopump”, *Phys. Rev. E* (2004), 70, pp. 056311.
- ¹¹³ Site commercial de la société Advalytix: http://www.advalytix.de/history_361.htm
- ¹¹⁴ J. Scriba, C. Gauer, “Motion element for small quantities of liquid”, *Brevet international WO03018181 A1* (2003).
- ¹¹⁵ Z. Guttenberg, H. Müller, H. Habermüller, A. Geisbauer, J. Pipper, J. Felbel, M. Kielpinski, J. Scriba, A. Wixforth, “Planar chip device for PCR and hybridization with surface acoustic wave pump”, *Lab Chip* (2005), 5, pp. 308 – 317.

¹¹⁶ M. Tan, J. Friend, L. Yeo, “Microparticle collection and concentration via a miniature surface acoustic wave device”, *Lab Chip* (2007), 7, pp. 618–625.

¹¹⁷ A. Renaudin, K. Chuda, V. Zhang, X. Coqueret, J.C. Camart, P. Tabourier, C. Druon, “SAW Lab-on-chip in view of protein affinity purification implemented from nanodroplets transport”, *Proc. of μ TAS’05*, Boston, USA (2005).

¹¹⁸ S. Alzuaga, J.F. Manceau, F. Bastien, “Motion of droplets on solid surface using acoustic radiation pressure”. *J. Sound and Vibration* (2005), 282, pp. 151-162.

Chapitre 2

Micromélange SAW et interaction

liquide surface

1. Introduction

Nous avons exposé dans le chapitre 1 que des interactions biologiques rapides et homogènes étaient souhaitées. Or, le mélange aux échelles considérées n'est pas satisfaisant : aux dimensions des microsystèmes fluidiques, les flux sont principalement laminaires, empêchant la réalisation de mélanges par effet turbulent. Les temps d'interaction et de mélange sont régis par la diffusion¹. C'est ainsi que, par exemple, les performances des nanodétecteurs atteignent des limites dues aux problèmes d'adressage fluide (chap.1 § 3.3).

Alors que la microfluidique discrète commence à s'imposer dans les laboratoires sur puce, l'utilisation des ondes acoustiques de surface (SAW) permet diverses opérations fluidiques pertinentes au regard des besoins biologiques définis au chapitre 1 et résumés ci-dessus. Ce travail s'intéresse plus spécifiquement à la caractérisation du mélange engendré par les SAW, notamment à l'interaction 'liquide/surface' et ainsi qu'à l'utilisation du mélange comme méthode d'adressage fluide pour répondre aux problématiques des nanodétecteurs et du transport de masse.

Dans ce chapitre, nous abordons dans un premier temps le principe des ondes acoustiques de surface et leur génération. Dans ce cadre, nous exposons les caractéristiques électriques puis les propriétés de surface pour l'utilisation des SAW en microfluidique. Dans un deuxième temps, nous montrons les caractérisations de l'interaction 'ondes de surface / liquide' par des méthodes optiques (contraste, fluorescence), et de suivi de particules. Parmi l'ensemble des caractérisations réalisées en collaboration avec la plateforme MEOL (MEtrologie Optique de Lille) du Laboratoire de Mécanique de Lille, nous montrons dans ce chapitre celles justifiant l'adressage fluide. Dans une troisième partie, nous expliquons l'utilisation des ondes acoustiques de surface comme méthode d'adressage fluide. Les simulations par éléments finis, menées afin d'évaluer l'interaction avec un détecteur au sein d'un écoulement, sont enfin présentées.

2. Les ondes acoustiques de surface : principe et réalisation

2.1. Les ondes acoustiques de surface de type Rayleigh

Dans ce travail de thèse, nous nous sommes principalement intéressés aux ondes de surface de type Rayleigh. Les ondes acoustiques de surface (ou ondes élastiques), encore appelées SAW (Surface Acoustic Waves) se propagent à la surface libre de contrainte d'un milieu semi-infini de façon non dispersive (vitesse de propagation indépendante de la fréquence). Il s'agit d'un ébranlement de plan atomique se propageant à la surface du matériau. L'amplitude des ondes de Rayleigh décroît avec la profondeur du solide. Les différents modes de propagation se déduisent

des équations de propagation d'une onde plane dans un milieu infini². Les ondes de Rayleigh possèdent une composante longitudinale (parallèle au déplacement) et une composante transversale (perpendiculaire au déplacement) déphasées de $\pi/2$, contenues dans le plan sagittal défini par le vecteur d'onde et la normale à la surface libre. L'onde de Rayleigh a donc une polarisation elliptique. Les différentes composantes ainsi que la polarisation de l'onde sont représentées sur la Figure 17.

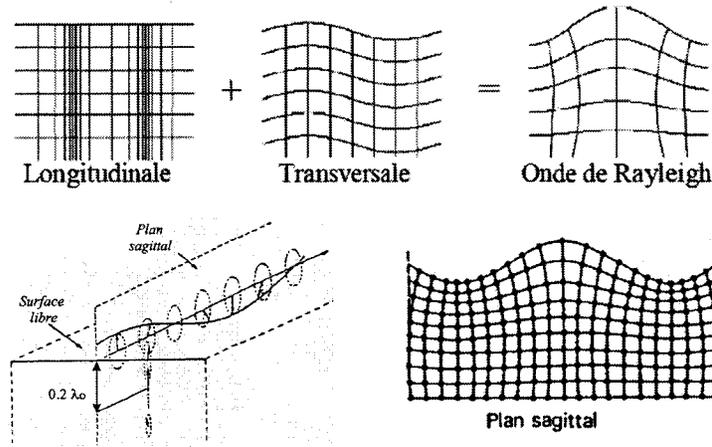


Figure 17 (Gauche) Polarisation elliptique de l'onde de Rayleigh à la surface d'un matériau isotrope³ et (Droite) mouvement des particules au passage de l'onde dans le plan sagittal.

Le vecteur polarisation décrit une ellipse dans le sens rétrograde par rapport à la propagation de l'onde. Les composantes du déplacement s'annulent à une profondeur d'environ deux longueurs d'onde. La génération des SAW dans les matériaux piézoélectriques peut s'effectuer par une excitation par laser de puissance⁴ ou bien à l'aide de transducteurs à peignes interdigités (IDT), comme l'a découvert pour la première fois R. White en 1965⁵. Dans le cadre de cette thèse, nous utilisons des IDTs pour leur structure planaire et pour leur simplicité de mise en œuvre et de réalisation technologique.

Le matériau piézoélectrique dans notre cas pour la propagation des SAW doit, en plus d'être cristallin (pour éviter des pertes aux joints de grains), posséder un coefficient de couplage électromécanique K^2 élevé. Ce coefficient traduit en effet l'aptitude du matériau à transformer une énergie électrique en énergie mécanique et inversement (rapport amplitude de déformation/puissance appliquée à l'IDT important). Il peut être évalué par l'intermédiaire de l'équation suivante:

$$K^2 = 2 \left(\frac{V_0 - V_m}{V_0} \right), \quad (13)$$

où V_m et V_0 sont respectivement les vitesses des ondes acoustiques de surface mesurées sur une surface métallisée et sur une surface libre.

Le niobate de lithium (LiNbO_3) est retenu car il présente un fort coefficient de couplage électromécanique K^2 . De plus, la coupe X est majoritairement utilisée dans ce travail, car elle présente des coefficients de couplage K^2 élevés dans les deux directions Y et Z : 4,9 (Direction Z) et 3,1 (Direction Y), contre une valeur de 0,11 pour le quartz ST-Y par exemple.

Les paragraphes suivants abordent quelques notions sur le fonctionnement d'un transducteur et sur la génération d'ondes de Rayleigh par des transducteurs interdigités (IDTs).

2.2. Génération d'ondes acoustiques de surface

2.2.1. Principe de fonctionnement des IDTs

Les peignes interdigités (IDTs) utilisent l'effet piézoélectrique inverse afin de convertir une énergie électrique en énergie mécanique. Le transducteur est constitué de deux électrodes métalliques interdigitées réalisées sur le substrat piézoélectrique. Chaque électrode est composée de doigts reliés entre eux par un bus (Figure 18).

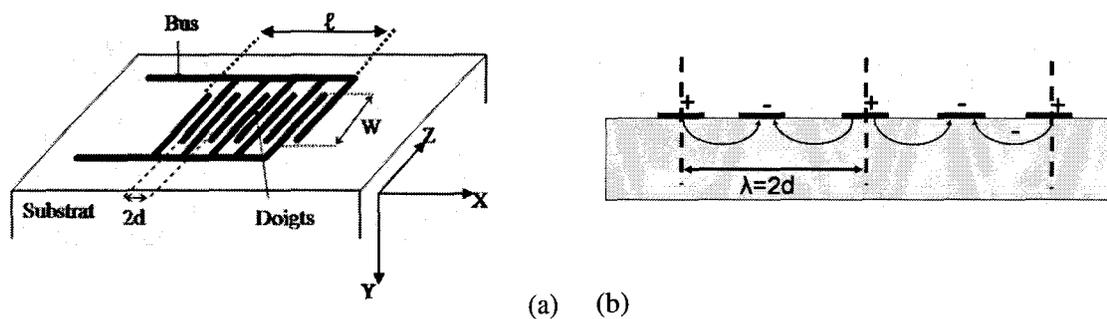


Figure 18 Schéma d'un IDT sur substrat piézoélectrique (a) W l'ouverture du transducteur, d la distance entre deux doigts adjacents et l , la largeur de l'IDT. (b) Lignes de champ électrique entre les doigts.

Lorsqu'une tension électrique alternative est appliquée aux bornes de l'IDT, il se crée un champ électrique périodique qui engendre un champ de déformation composé de compressions et dilatations au niveau de la surface. Ces vibrations s'ajoutent de façon constructive lorsque la distance d entre deux doigts adjacents est égale à la demi-longueur d'onde acoustique. Des ondes de surface sont alors émises avec un front d'onde perpendiculaire aux IDTs. La fréquence de

résonance f_0 (fréquence de synchronisme correspondant à cet effet constructif) est donnée par l'expression suivante:

$$f_0 = \frac{V}{2d}, \quad (14)$$

où V correspond à la vitesse de propagation de l'onde (qui dépend du matériau piézoélectrique utilisé). f_0 ne dépend donc que de la distance d (soit de la périodicité $\lambda=2d$) pour une coupe et une direction de propagation données. Dans le cas du LiNbO_3 coupe X, les vitesses de propagation en Z et Y sont respectivement de 3485m.s^{-1} et de 3714 m.s^{-1} .

2.2.2. Impédance électrique et adaptation des IDTs

Pour être adaptés en impédance, les IDTs doivent présenter une résistance de rayonnement autour de 50Ω . Pour ce faire, intéressons nous au schéma électrique équivalent d'un IDT autour de la résonance. Au voisinage de la résonance, un IDT est équivalent au schéma série montré Figure 19, qui comprend:

- une capacité interdigitale $C(f)$
- une résistance $R(f)$ et une réactance $X(f)$ de rayonnement due à la résonance acoustique.

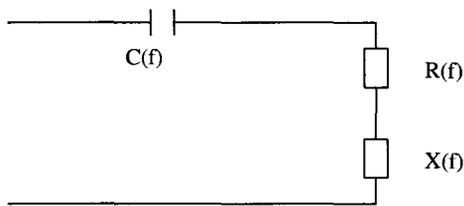


Figure 19: Schéma électrique série équivalent d'un IDT.

Pour un IDT constitué de $N=2n$ doigts ce qui donne $(N-1)$ capacités, avec une distance inter-électrodes d et une ouverture W , il est montré pour un mode de Rayleigh⁶ que l'impédance au voisinage de f_0 vérifie:

$$Z(f) = R(f) + j \left(X(f) - \frac{1}{2\pi f C} \right) \quad (15)$$

$$\text{Où :} \quad R(f) = R_0 \left(\frac{\sin p}{p} \right)^2 \quad (16)$$

$$X(f) = R_0 \left(\frac{\sin 2p - 2p}{2p^2} \right) \quad (17)$$

$$p = \frac{N-1}{2} \pi \frac{f-f_0}{f_0} \quad (18)$$

$$R_0 = \frac{1,4K^2}{2\pi\epsilon W f_0} \quad (19)$$

$$C = (N-1)C_0 \text{ sachant que } C_0 = \frac{1}{2} \epsilon W, \quad (20)$$

avec ϵ la constante diélectrique équivalente, W l'ouverture de l'IDT, f la fréquence de travail, f_0 la fréquence de résonance, R_0 la résistance de rayonnement à f_0 pour un taux de métallisation de 50%, N le nombre de doigts, C_0 la capacité statique entre deux doigts adjacents, K^2 le coefficient de couplage électromécanique.

Au niveau de l'IDT d'entrée, la puissance du signal est répartie entre la résistance R_i du générateur et les éléments du circuit série de l'impédance de l'IDT. Pour qu'il y ait transmission maximale de la puissance, il doit y avoir adaptation, et ceci est réalisé pratiquement si on vérifie $R_0 \# R_i$ et si on annule la partie réactive.

2.2.3. Réalisation des IDTs

Les doigts des IDTs ont une largeur de $\lambda/4$ et sont espacés de cette même distance $\lambda/4$ (conduisant à un rapport de métallisation de 50%) avec $\lambda=2d=175\mu\text{m}$. Le nombre de doigts est fixé à 20 pour tous les transducteurs utilisés, ce qui donne au système une bande passante de l'ordre de 2MHz. Notons qu'un trop petit nombre de doigts réduit la directivité des IDTs. L'épaisseur de métallisation des doigts choisie '1000Å Ti / 4000Å Au' est un compromis : suffisamment faible pour ne pas charger la surface ($0,5\mu\text{m} \ll 180\mu\text{m}$, propagation des ondes non perturbée) et suffisamment grande pour avoir une résistance électrique faible. Les IDTs sont réalisés par lithographie UV classique et lift-off. Le procédé de fabrication utilisé repose sur l'utilisation d'un profil casquette provoqué sur la résine positive AZ1518.

Les différentes étapes technologiques pour la réalisation de peignes interdigités sur LiNbO3 sont résumées dans le tableau 1.

Tableau 1 : étapes technologiques pour la réalisation d'IDTs sur LiNbO₃.

Dépôt Résine AZ1518 ($\approx 1,2\mu\text{m}$) : vit=5000m/s, acc=4500m/s ² , tps=10s
Recuit 110°C 1min
MIF326 30s sans agitation afin de durcir en superficie l'AZ1518
Insolation UV à 13mW/cm ² 6s
Recuit 110°C 1min
Révélation MIF726 pur 40s
Etching à l'Argon puis, métallisation par évaporation thermique de 1000 Å Ti comme couche d'accroche puis de 4000 Å d'Au.
Lift off acétone/IPA.

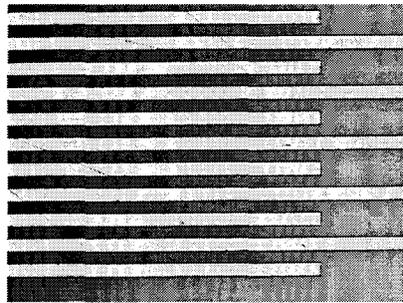


Figure 20 Photographie d'un IDT sur LiNbO₃ avec 2d=175µm.

Un exemple de réalisation d'IDTs est montré Figure 20. Nous effectuons dans le paragraphe suivant l'étude de la réponse fréquentielle d'un IDT.

2.2.4. Réponse fréquentielle des IDTs

Les IDTs sont caractérisés par leurs réponses fréquentielle et temporelle. Une caractérisation fréquentielle avec un analyseur de réseau permet d'obtenir l'impédance des transducteurs. Une caractérisation temporelle permet de déduire la vitesse de l'onde et de servir par exemple à la localisation des gouttes. Dans ce travail, nous nous intéressons donc surtout à la caractérisation fréquentielle des peignes.

Chaque doigt du transducteur interdigité constitue, sur un milieu piézoélectrique, une source discrète d'ondes acoustiques de surface : le champ de contraintes généré dans le matériau par effet piézoélectrique a une distribution spatiale fonction de chaque doigt du transducteur⁷. Une fonction de transfert simple relie la tension V_1 de l'onde continue appliquée à un doigt et le potentiel électrique associé aux ondes irradiées dans chacune des deux directions:

$$\phi^{\pm} = \mu_s V_1, \quad (21)$$

avec μ_s une constante dépendante du substrat (et indépendante de la fréquence), ϕ^+ et ϕ^- respectivement le potentiel associé à l'onde se propageant à droite et à gauche.

Lorsque l'ensemble des peignes est excité, le potentiel ϕ^+ en z associé à l'onde se propageant à droite est la somme des contributions de chaque doigt. C'est-à-dire :

$$\phi^+(z) = \mu_s \sum_{n=0}^{N_f-1} V_n e^{jk(z-z_n)} \quad (22)$$

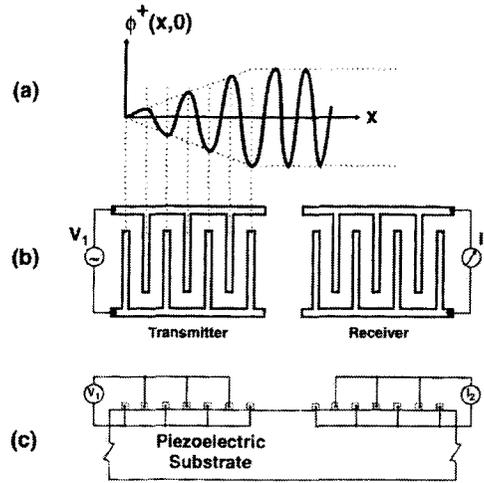


Figure 21 Illustration (a) du potentiel électrique $\phi^+(x,0)$ associé à une vue (b) du dessus (c) de côté⁷.

Avec z_n la position du $n^{\text{ième}}$ doigt excité avec une tension V_n , N_f le nombre total des doigts. L'équation précédente possède la forme d'une transformée de Fourier discrète de la séquence V_n . La réponse fréquentielle du dispositif est donc proportionnelle à la transformée de Fourier de la séquence des contributions des doigts du transducteur. Si l'IDT correspond de plus à N_f doigts identiques, espacés d'une période $\lambda=d$, et excités par une tension alternative $V_n = (-1)^n V_0$, on obtient :

$$\phi^+(0) = \mu_s V_0 \sum_{n=0}^{N_f-1} (-1)^n e^{-jnk \frac{d}{2}} \quad (23)$$

Cette somme correspond à une série géométrique 'd'éléments unités' qui s'ajoutent de façon constructive lorsque $kd/2 = m\pi$, avec m un entier impair.

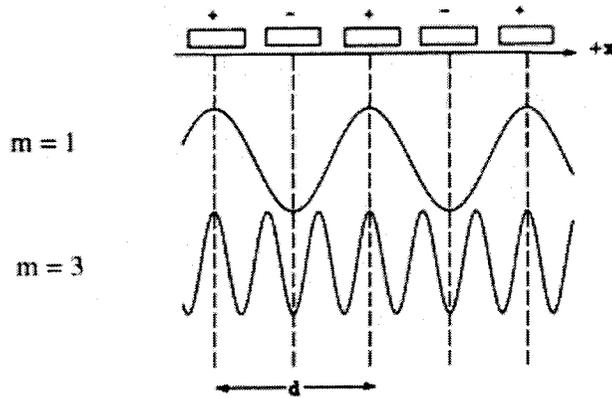


Figure 22 Relation entre la périodicité du transducteur et la longueur d'onde des ondes générées par interférences constructives.

Cette condition définit la relation entre la longueur d'onde λ des ondes et la période d du transducteur pour une condition cohérente (Figure 22). L'IDT excite les harmoniques impairs et les multiples impairs de la fréquence du synchronisme f_0 , soit: $f_m = mf_0$.

Loin de la fréquence de synchronisme, l'addition des composants des doigts individuels devient incohérente. La réponse fréquentielle est donnée par :

$$|\varphi^+(f)| = \left| \frac{\sin(X)}{X} \right| \text{ avec } X = \frac{N\pi(f - f_0)}{f_0}, \quad (24)$$

où f_0 est la fréquence du synchronisme, N est le nombre de paires de doigts ($N = N_f / 2$).

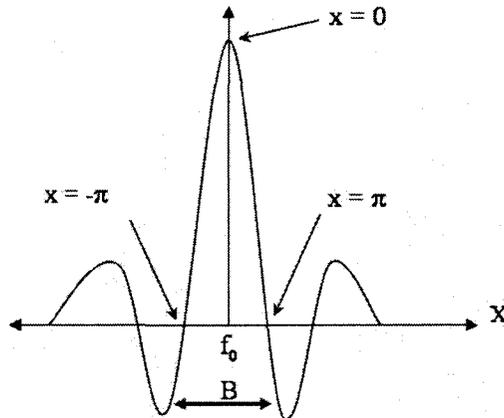


Figure 23 : Réponse impulsionnelle de l'IDT en $\sin X/X$.

Le potentiel de l'onde en fonction du paramètre X est représenté sur la Figure 23. A noter que quand X est un multiple de π , on obtient $\varphi = 0$, résultat de l'annulation totale entre les contributions des doigts. En conséquence, l'intervalle de fréquence B entre les deux premiers

potentiels nuls de chaque côté de f_0 est $B = \frac{2}{N}$. Ainsi, la bande passante B est inversement proportionnelle au nombre de doigts de l'IDT.

Les mesures fréquentielles donnant l'évolution de l'impédance des transducteurs en fonction de la fréquence sont effectuées en utilisant un analyseur de réseau HP 4195A. Une procédure de calibrage de type vectoriel ('one-port') à l'aide d'éléments étalons (résistance 50Ω, circuit ouvert, court-circuit) est réalisée au préalable.

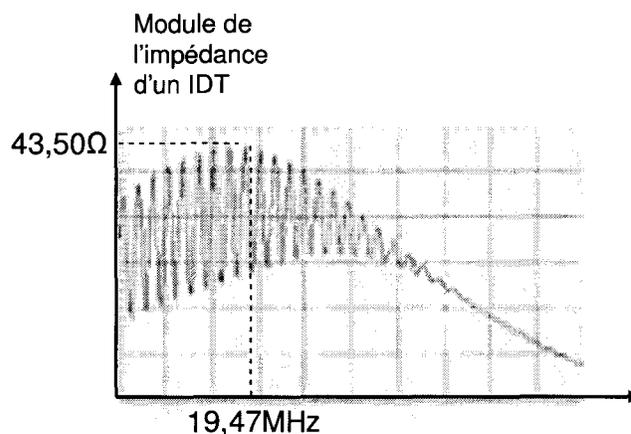


Figure 24 Impédance d'un IDT sur LiNbO₃ en fonction de la fréquence autour de la fréquence de résonance.

Une validation approfondie des prototypes d'un point de vue électrique a été présentée dans la thèse d'Alan Renaudin²⁴.

2.3. Traitement de surface pour la manipulation de gouttes

La surface brute du LiNbO₃ n'est pas appropriée à la manipulation de gouttes. Le paragraphe suivant expose les différents traitements de surface du substrat préalables à son utilisation en microfluidique. En particulier, le contrôle des propriétés de mouillabilité de la surface permet une amélioration des performances de déplacement de gouttes par ondes acoustiques de surface.

2.3.1. Angle de contact statique

Une goutte de liquide placée sur une surface solide non absorbante trouve un équilibre, comme il a été expliqué au chapitre 1 (§5.1.1). L'angle de contact θ mesuré à l'interface entre le liquide et le substrat dans ces conditions est l'angle de contact statique. La surface brute du LiNbO₃ possède des propriétés qui ne sont pas adaptées au déplacement de goutte : un caractère hydrophile ($\theta=30^\circ$) avec une hystérésis de 33° . Il convient donc de diminuer l'interface

substrat/goutte ainsi que l'hystérésis de surface, afin de réduire la force nécessaire au déplacement.

2.3.2. Hystérésis de surface et force de déplacement d'une goutte

L'équation de Furmidge⁸ décrit la force nécessaire à l'actionnement d'une goutte sur une surface (quelques centaines de μN pour nos surfaces):

$$F_s = 2R\gamma_{lv} \sin\left(\frac{\theta_a + \theta_r}{2}\right) (\cos\theta_r - \cos\theta_a), \quad (25)$$

avec R le rayon de la goutte [m], γ_{lv} la tension de surface liquide vapeur [N/m], θ_a et θ_r les angles d'avancée et de reculée. L'équation (25) montre que le paramètre influençant la force nécessaire à l'actionnement par l'intermédiaire des propriétés de glissement n'est pas l'angle de contact d'équilibre mais plutôt l'hystérésis d'angle ' $\Delta\theta = \theta_a - \theta_r$ '. Ce dernier est responsable de la force qu'une goutte adhérant à la paroi oppose à une contrainte tangentielle. Une contrainte implique une déformation de la goutte : les angles avant et arrière tendent respectivement vers l'angle de reculée et d'avancée. Lorsque ces angles sont atteints (la contrainte dépasse la force d'adhésion), la goutte se déplace. Autrement dit, plus l'hystérésis sera faible, moins il faudra de force pour déplacer une goutte. L'hystérésis est donc un paramètre primordial à maîtriser pour nos surfaces.

2.3.3. Caractérisation de la mouillabilité

La mesure de la mouillabilité des surfaces est effectuée au moyen d'un goniomètre Didigrop de la société GBX, associé au logiciel Windrop++. Cet appareil permet, entre autres, la mesure de l'angle de contact statique (mode énergie de surface) et de l'hystérésis d'une surface (mode seringue plongeante).

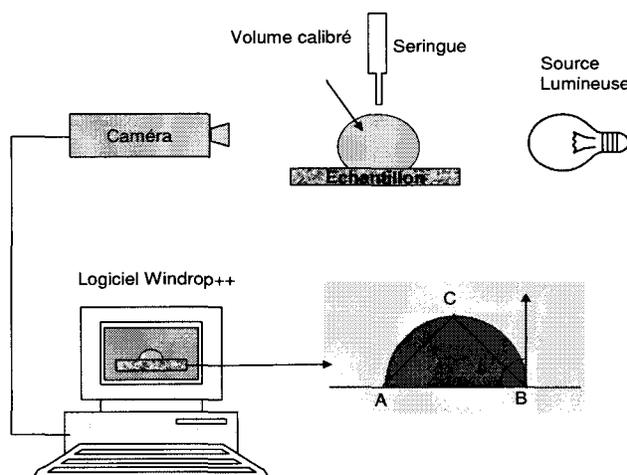


Figure 25 Schéma de fonctionnement du goniomètre Didigrop – GBX.

Un pousse-seringue contrôlé par PC délivre automatiquement des gouttes de volumes calibrés de 0,5 μL à 10 μl sur le substrat posé sur un plateau mobile. Une caméra CCD permet la visualisation de la goutte éclairée en incidence rasante. Le logiciel Windrop⁺⁺ permet de déterminer l'angle de contact manuellement, ou à partir du contour. Le logiciel détecte en fait le triangle inscrit dans la goutte assimilée à une calotte sphérique (Figure 25). Les dimensions des côtés du triangle ABC permettent d'accéder à la valeur de l'angle de contact.

L'utilisation de Windrop⁺⁺ en mode seringue plongeante permet de mesurer l'hystérésis de surface. Un cycle lent de création et d'aspiration d'une goutte calibrée permet de remonter aux angles d'avancée et de reculée.

2.3.4. Traitements de surface

Plusieurs possibilités existent afin de réaliser une surface hydrophobe pour le déplacement de gouttes sur LiNbO_3 . Dans tous les cas, la réalisation de ces surfaces ne doit pas modifier la propagation des ondes et donc ne pas trop charger la surface. La solution que nous utilisons pour sa simplicité, ses bonnes performances et sa stabilité dans le temps est de réaliser une chimie de surface par monocouche autoassemblée SAM (Self Assembled Monolayer) de silanes hydrophobes.

2.3.5. Monocouche hydrophobe

Deux monocouches autoassemblées (SAMs) ont été testées : le perfluorodecyltrichlorosilane $\text{C}_8\text{F}_{17}\text{C}_2\text{H}_4\text{SiCl}_3$ (FDTS) et l'octadecyltrichlorosilane $\text{Cl}_3\text{Si}(\text{CH}_2)_{17}\text{CH}_3$ (OTS). Nous présentons ici les modes opératoires ainsi que les résultats obtenus pour chacune de ces chimies de surface. L'OTS est un organosilane très utilisé : c'est une molécule amphiphile composée d'une longue chaîne alkyl ($\text{C}_{18}\text{H}_{17}$) et d'une tête polaire (SiCl_3) formant des SAMs sur différents types de substrats oxydés. Le FDTS est composé de la même tête polaire, et d'une longue chaîne carbonée associée à des fluors, qui lui donnent son caractère hydrophobe. Les silanisations sur LiNbO_3 sont réalisées par l'intermédiaire de liaisons covalentes sur surface hydroxylée Nb-OH. Le protocole expérimental est exposé dans le Tableau 2

Tableau 2 : protocole de réalisation d'une monocouche auto-assemblée sur LiNbO_3 .

Hydroxylation de la surface de LiNbO_3 : UV Ozone 30min	
Solution de 50 μl d'OTS dans 35ml de n-hexane + 15ml de Tétrachlorure de carbone. (l'hexane permet de solubiliser la chaîne carbonée et le tétrachlorure de carbone le groupement SiCl_3).	Solution de 50 μl de FDTS dans 50ml de n-hexane.

Laisser interagir le substrat hydroxylé >1h dans la solution. On peut tirer parti de la polymérisation des chaînes qui accentue encore le caractère hydrophobe. Il est donc possible de laisser le substrat jusqu'à 48h en bain.

US dans solution de chloroforme 5min.

Nous avons mesuré les hystérésis pour les deux types de SAMs utilisées (Figure 26).

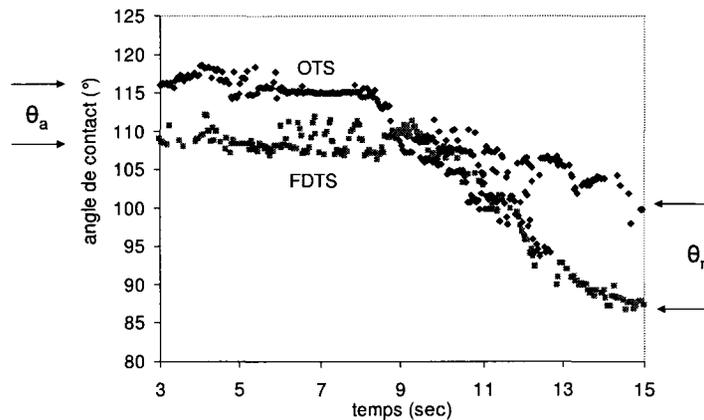


Figure 26 Hystérésis de surface mesurées par GBX sur surface de LiNbO_3 modifié par perfluorodécyltrichlorosilane (FDTS) et octadécyltrichlorosilane (OTS).

Ces tests ont permis de déduire que les SAMs d'OTS sont plus appropriées au déplacement de gouttes sur LiNbO_3 . Même si ces surfaces comportent des angles de contacts comparables (110°), on se rend compte que le FDTS possède une hystérésis beaucoup plus importante que l'OTS ($12^\circ \ll 20^\circ$), nécessitant donc l'apport d'une force plus importante pour le déplacement d'une goutte sur sa surface. De plus la stabilité dans le temps des monocouches d'OTS est meilleure que celle de FDTS. Les monocouches d'OTS sont très robustes et peuvent être utilisées plusieurs mois sans détérioration des performances.

L'utilisation des ondes de surface pour les applications de laboratoires sur puce, peut nécessiter une configuration entre deux plans dans laquelle la goutte se déplace entre le substrat de niobate de lithium comme base pour l'actionnement et un deuxième substrat placé en capot (commodément, du verre) comportant diverses zones d'interactions. On se rend compte intuitivement que la force de déplacement de la goutte dans cette configuration (Equation de Furmidge §2.3.2) est au moins doublée par rapport à une configuration 'un plan'. Ceci, d'autant plus que le rayon d'une goutte écrasée entre deux plans augmente par rapport à son rayon initial.

Il devient ainsi primordial de développer des surfaces avec des hystérésis très faibles. Nous voyons dans le paragraphe suivant quelles sont les possibilités pour développer de telles surfaces.

2.3.6. Revêtements superhydrophobes

Les conséquences d'une forte hystérésis sur les manipulations de gouttes sont néfastes. Cela est d'autant plus critique pour le déplacement de gouttes entre deux plans, la surface de contact étant plus grande. Pour améliorer les performances d'actionnement et de déplacement de gouttes, la tendance est de mettre au point des surfaces superhydrophobes présentant à la fois un angle de contact élevé, et une hystérésis la plus faible possible. Le biomimétisme dans ce contexte est très attractif⁹ et il existe un intérêt croissant pour les surfaces présentant un double niveau de texturation (micrométrique et nanométrique)¹⁰. Pour comprendre le lien entre rugosité de surface et hydrophobicité, et expliquer les différences d'hystérésis pouvant apparaître entre deux surfaces superhydrophobes présentant parfois la même énergie de surface, il existe deux modèles : Wenzel¹¹ et Cassie Baxter¹².

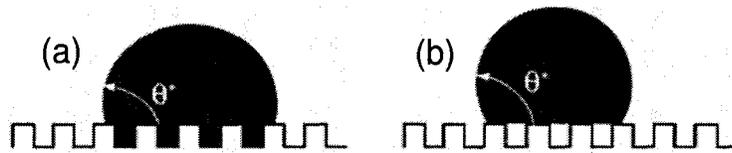


Figure 27 Surfaces superhydrophobes: modèles de a) Wenzel, b) Cassie-Baxter¹³.

Le modèle de Wenzel décrit une surface rugueuse dont le liquide mouille les aspérités. L'angle de contact apparent θ^* sur une telle surface est décrit par l'équation suivante :

$$\cos \theta^* = r \cdot \cos \theta , \quad (26)$$

avec θ l'angle de contact défini par Young sur la surface plane, et r le rapport entre l'aire réelle développée par la surface rugueuse et son aire projetée ou apparente. D'après Wenzel, l'augmentation de l'aire de la surface hydrophobe du solide en augmente le caractère hydrophobe.

Le modèle de Cassie Baxter, quant à lui, considère que le liquide ne mouille pas toutes les aspérités, et qu'il repose sur une surface mixte de solide et d'air. Dans ce cas, si ϕ_s la fraction de solide restant en contact avec la goutte, l'angle de contact apparent est donné par :

$$\cos \theta^* = -1 + \phi_s \cdot (\cos \theta + 1) \quad (27)$$

D'un point de vue pratique, la réalisation de surfaces superhydrophobes sur niobate de lithium par gravure RIE ou humide, est une solution qui paraît attrayante. Cependant, ces gravures présentent des inconvénients majeurs : la gravure RIE est très longue (800min pour 6300Å)¹⁴, et la gravure humide n'est disponible que dans des coupes bien particulières (eg. en coupe Z¹⁵). Une autre voie est de réaliser des dépôts plasma de polymères fluorés¹⁶, et éventuellement de les

structurer afin de réaliser des surfaces superhydrophobes, comme ceci a été réalisé au LPMI à Nancy dans le cadre de la thèse de Denis Beyssen¹⁷.

Une alternative possible, simple, pour la réalisation d'une surface superhydrophobe est le dépôt d'un niveau de texturation nanométrique, ajouté sur la face non polie du substrat de niobate de lithium (qui présente naturellement une rugosité micrométrique). Des nanotubes de carbone multiparois dilués dans l'EDI sont répandus sur la surface de LiNbO_3 préalablement aminée par APTES. Le système est ensuite recouvert d'un film de 30nm de polymère fluoré hydrophobe C_4F_8 l'octafluorobutène (dépôt : 1000W, 220sccm, 10s). Les premières mesures d'hystérésis réalisées sur ces surfaces ont montré de très bonnes performances ($\theta_{\text{moy}} = 120^\circ$, $H = 19^\circ$). Cependant, les propriétés de mouillage du C_4F_8 étant, sur surface polie, inférieures à celles de l'OTS (hystérésis de 22° contre 12° pour l'OTS), nous avons ensuite testé le dépôt de nanofils de silicium pouvant être fonctionnalisés avec de l'OTS. Les nanofils de silicium (réalisés par Y. Coffinier, IRI) sont répartis de la même façon sur LiNbO_3 aminé par APTES. Une SAMs d'OTS est ensuite réalisée sur l'ensemble de la structure (Figure 28).

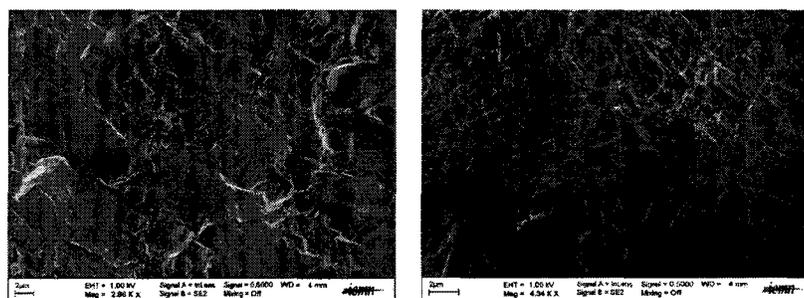


Figure 28 Clichés MEB (Gauche) de la surface rugueuse du LiNbO_3 (Droite) de la surface rugueuse recouverte de nanofils avec traitement OTS.

Les performances sont alors excellentes localement ($\theta_{\text{moy}}=140^\circ$, $H=9^\circ$). Cependant, les tests de déplacements ont été très décevants, les trajectoires de gouttes sont très aléatoires. Ceci s'explique par l'inhomogénéité du dépôt des nanofils entraînant une forte variation d'hystérésis. Ainsi, bien que l'hystérésis soit en lui-même très faible localement, chaque hétérogénéité peut potentiellement déformer la ligne triple et constituer un point d'accroche à la goutte. On ne se situe plus dans l'état d'équilibre caractérisé par l'équation de Young.

Nous avons vu dans cette partie comment les substrats à ondes acoustiques de surface peuvent être optimisés pour des applications microfluidiques et biologiques. En particulier, un contrôle des propriétés de mouillage des surfaces utilisées permet d'améliorer les performances des systèmes dédiés au déplacement de gouttes par le dépôt de monocouches organiques.

3. Interaction ondes de surface/goutte

Nous venons de voir les propriétés de l'onde de Rayleigh ainsi que les propriétés de surface du niobate de lithium. Intéressons nous maintenant aux phénomènes qui sont observés lorsqu'on excite avec les SAW une goutte de liquide posée sur le trajet des ondes et voyons comment cette interaction peut générer des écoulements à l'échelle micro/macrosopique. En excitant à l'aide des SAW une goutte posée sur le substrat de LiNbO_3 , on obtient suivant la puissance véhiculée différents phénomènes fluidiques tels que micromélange, déplacement, expulsion de goutte... Parmi ces phénomènes, nous nous intéressons essentiellement au micromélange. Après une introduction sur le principe physique du transfert d'énergie onde/liquide provoquant ce mélange, nous aborderons la façon dont on peut maîtriser cette énergie transmise aux gouttes pour contrôler leur température. Nous nous intéresserons ensuite à la caractérisation de ce micromélange dans une goutte et à son application originale pour l'adressage fluide.

3.1. Principe de l'interaction ondes de surface / goutte

Nous avons vu que les ondes de Rayleigh se propagent à l'interface substrat/air avec des pertes négligeables. Par contre, à l'interface substrat/goutte, les ondes transfèrent de l'énergie dans le liquide sous forme d'ondes de compression. La composante transverse de l'onde de Rayleigh est alors dissipée dans le liquide sous forme d'onde longitudinale de compression¹⁸. Elle se propage à l'intérieur de la goutte suivant une direction définie par l'angle de Rayleigh θ_R (Figure 29), qui dépend du rapport de la vitesse de propagation de l'onde longitudinale dans le liquide c_L et de la vitesse de propagation dans le substrat c_S ^{19,20} :

$$\sin \theta_R = \frac{c_L}{c_S} \quad (28)$$

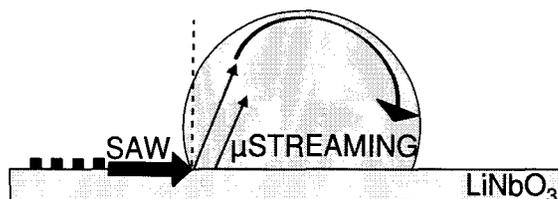


Figure 29 Schéma des ondes de compressions rayonnées dans le liquide suivant l'angle de Rayleigh lors d'un mélange acoustique.

Par exemple, pour une vitesse dans le liquide de $c_L \approx 1500 \text{ m.s}^{-1}$ et dans le LiNbO_3 de $c_S \approx 3900 \text{ m.s}^{-1}$, on obtient un angle de Rayleigh de $22,6^\circ$.

Cependant, l'atténuation de cette composante transverse de l'onde de Rayleigh, convertie en onde longitudinale dans le fluide permet la génération d'un écoulement dans ce dernier. Uchida et al.¹⁸ ont décrit le phénomène de mélange acoustique sous l'effet des ondes de surface en se basant sur la théorie de l' 'acoustic streaming' élaborée par Nyborg et al.²¹ en 1965. Pour des ondes acoustiques de forte intensité, la propagation de l'onde dans un fluide induira sur tout objet une pression nommée pression de radiation acoustique. Il se crée une différence de pression au cours de la propagation de l'onde, liée à l'absorption de l'énergie de l'onde acoustique (due à la viscosité et aux propriétés thermiques du milieu). Ce gradient de pression induit un écoulement dans le sens des hautes pressions vers les basses pressions, c'est à dire dans la direction de propagation de l'onde longitudinale rayonnée. Il s'agit de l' 'acoustic streaming'. On peut noter que la pression de radiation acoustique demeure souvent négligeable par rapport à la force de volume (force exercée sur le milieu par le fluide en mouvement) induite par 'acoustic streaming'²². Même si ce phénomène a été modélisé, expérimentalement, l'interaction onde de surface/liquide est complexe et tous les mécanismes et les facteurs n'en sont pas encore entièrement maîtrisés.

L'influence de la fréquence de l'onde acoustique de surface sur le phénomène de mélange acoustique et de déplacement a été étudiée²³. Strobl et coauteurs montrent qu'à volume de goutte et puissance RF fixés, tripler la fréquence réduit d'un facteur deux la vitesse de déplacement de la goutte. Notre fréquence de fonctionnement à 20MHz est donc intéressante pour mettre en évidence les phénomènes souhaités.

3.2. Contrôle de température des gouttes de milieu biologique

Avant même de manipuler par ondes acoustiques de surface des milieux biologiques, il est nécessaire de maîtriser le paramètre cinétique très important qu'est la température.

3.2.1. Principe

Les phénomènes dissipatifs dans une goutte soumise aux ondes, entraînent un échauffement du liquide pouvant conduire à une accélération de l'évaporation ou à une altération du matériau biologique transporté. Il a été mis en évidence qu'il était cependant possible de limiter cet effet en contrôlant l'apport de puissance acoustique à la goutte grâce à la modulation de l'excitation²⁴. Le principe d'une excitation pulsée repose sur la modulation du signal par une fonction créneau (Figure 30).

On peut ainsi en choisissant la période T_{per} du signal créneau, ainsi que la largeur T_{temp} du créneau, contrôler l'énergie transférée à la goutte. On utilisera par la suite r , le taux de modulation, équivalent à $r=T_{temp}/T_{per}$, et $f=1/T_{per}$ la fréquence de la modulation.

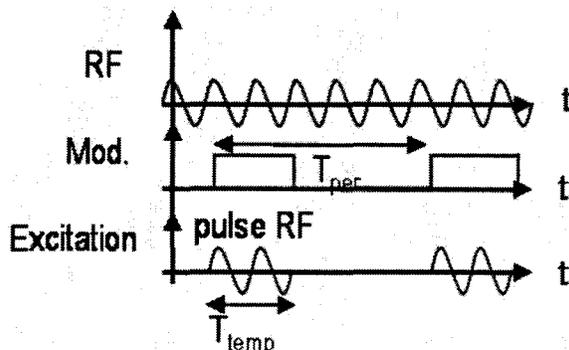


Figure 30 Allure du signal d'excitation modulé.

3.2.2. Contrôle de la température

Il est évident que l'utilisation des ondes en mode pulsé ne peut pas être comparée directement à son utilisation en continu : l'excitation pulsée possède une puissance moyenne plus faible qu'en continu. Cependant, l'objectif est bien de limiter l'énergie transmise à la goutte tout en gardant l'effet désiré, en l'occurrence, dans notre cas, celui d'un brassage interne. Pour un liquide donné et à volume fixé, en choisissant expérimentalement T_{temp} et T_{per} (qui correspondent à la largeur et à la période du signal créneau), il est possible de contrôler l'énergie transférée à la goutte et ainsi de limiter les effets thermiques (Figure 31).

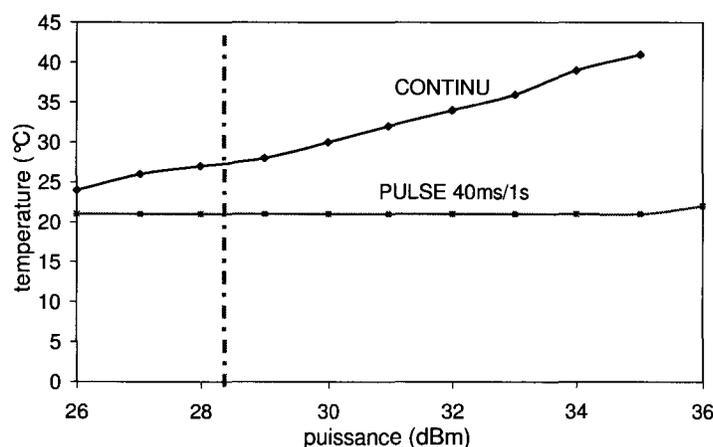


Figure 31: Evolution de la température dans la goutte en fonction de la puissance RF: goutte de $2\mu\text{l}$ de PBS sur OTS pour une excitation en continu, et une excitation pulsée $T_{temp}/T_{per}=40\text{ms}/1\text{s}$.

Nous avons réalisé la comparaison entre le mode d'excitation en continu et le mode pulsé sur une goutte de PBS (Phosphate Buffer Saline), solution tampon fréquemment utilisée dans les applications biologiques. Les mesures de température sont réalisées par thermocouple Chromel Alumel K. D'après la Figure 31, l'utilisation d'un mode pulsé à 1Hz avec un taux de modulation de 4% permet de garder une température stable de 22°C.

3.3. Microbrassage ou micromélange interne

Comme nous l'avons exposé précédemment, lorsque les ondes de Rayleigh atteignent l'interface 'solide/liquide', elles dissipent de l'énergie dans la goutte sous forme d'ondes longitudinales de compression. Ces dernières génèrent un écoulement interne dans la goutte sous l'effet du gradient de pression en résultant. Afin de mieux comprendre le phénomène et pour mieux en tirer profit dans nos applications, plusieurs méthodes d'observation sont employées. Dans un premier temps, nous caractérisons l'interaction liquide/surface par une réaction de fluorescence. Dans un deuxième temps, l'écoulement est observé grâce à deux fluides très contrastés dont on suit le mélange activé par les ondes. Dans un troisième temps, nous décrivons le suivi de l'écoulement par la méthode de Particle Image Velocimetry (PIV).

3.3.1. L'interaction liquide/surface

Dans cette partie, nous nous intéresserons au micromélange SAW et à la caractérisation de l'interaction liquide/surface, principalement en vue d'améliorer les systèmes de biodétection. Afin d'étudier la bio-interaction entre la surface et une microgoutte, une interaction de type 'analyte/ligand' est utilisée : le ligand est immobilisé sur la surface, et une microgoutte d'une solution d'analyte marqué au fluorophore Cy3 est déposée. Des images en fluorescence permettent ensuite de caractériser l'interaction. Le principe est validé à partir d'un couple bien connu : le couple streptavidine/biotine qui possède une spécificité et une affinité très élevées ($K_A=10^{15} \text{ M}^{-1}$)²⁵. La biotine est une petite molécule (244 Da) qui peut être attachée à la majorité des protéines par des liens covalents de type ester. La streptavidine est une protéine globulaire de 70 kDa qui est composée de 4 sites d'accrochage pour la biotine.

L'expérience consiste en l'immobilisation de la biotine sur la surface, puis la streptavidine marquée avec un fluorophore Cy3 est déposée sous forme de microgouttes sur la biotine immobilisée. Une des stratégies d'immobilisation développées pour la biotine est l'utilisation d'une monocouche C₁₈ hydrophobe intermédiaire comme base pour une interaction hydrophobe (chap.1 §4.1.1).

Tout d'abord une monocouche organique auto-assemblée d'octadécyltrichlorosilane (OTS) est formée sur le substrat de niobate de lithium. L'Albumine de Sérum Bovin (BSA) est une protéine du sang qui s'accroche aux terminaisons hydrophobes des acides gras. Du fait des longues chaînes alkyles de l'OTS, les molécules de BSA-biotinylée vont se lier sur la surface d'OTS par l'intermédiaire de liaisons hydrophobes et exposer les sites de fixation de la biotine en surface²⁶. Cette méthode, dont on retrouve l'empilement Figure 32, permet la réalisation de motifs de biotine fonctionnelle sur la surface du LiNbO₃.

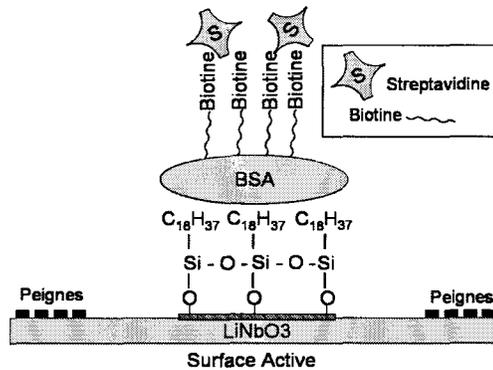


Figure 32 Immobilisation de biotine sur une surface de C₁₈.

Afin de maintenir les mêmes conditions expérimentales, la température au sein de la goutte doit être conservée à environ 25° (dans ce cas la cinétique des interactions streptavidine/biotine est constante). La température est contrôlée en maintenant la puissance de génération des ondes acoustiques de surface à une valeur préalablement fixée grâce à un étalonnage par thermocouple comme décrit précédemment (Figure 31). La streptavidine-Cy3 à 15µmol/ml est ensuite immobilisée par dépôt de gouttes sur la surface de biotine. Dans le but de comparer l'interaction streptavidine/biotine avec ou sans le mélange SAW, des gouttes de 2µl sont immobilisées sur le trajet des ondes en vis-à-vis du transducteur, et d'autres sont immobilisées sur la même surface sans être soumises à l'agitation. Après 5 minutes, les gouttes de streptavidine sont rincées plusieurs fois au PBS, puis séchées sous flux d'azote. Les résultats sont observés par fluorescence à l'IBL (Institut de Biologie de Lille - Plateforme de microscopie de Laurent Héliot). Des images sont réalisées sur les zones d'interaction où les gouttes ont subi ou non une agitation SAW. Afin de mieux visualiser l'interface, des vues en 3D sont artificiellement réalisées grâce au logiciel de microscopie WSxM de Nanotec.

L'homogénéité et l'intensité du signal fluorescent sont observées dans les deux cas, et montrent une amélioration lors de l'utilisation du mélange par ondes acoustiques de surface.

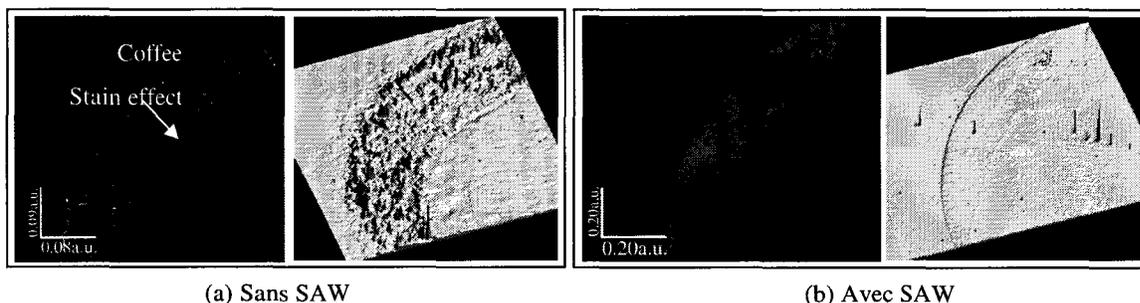


Figure 33: Signal fluorescent de streptavidine-Cy3 immobilisée (1/4 supérieur de la goutte) et vue 3D de l'intensité et homogénéité du signal fluorescent (a) sans, et (b) avec mélange SAW.

On peut noter de plus une nette diminution de l'effet 'tache de café'. On rencontre cet effet lors du spotting d'ADN²⁷, de protéines ou sur les cibles MALDI. Comme cela est décrit par Heim et al²⁸, ces traces circulaires concentriques du matériau biologique, telles celles laissées par le café, sont actuellement contournées par des traitements numériques d'images élaborés, et non en agissant sur la physique du dépôt en lui-même.

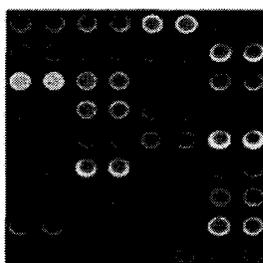


Figure 34 Exemple de l'effet 'tache de café' sur une puce à ADN²⁹.

Les effets d'agitation générés par l'utilisation des SAW à l'interface liquide/solide au sein des gouttes permettent donc d'accélérer et d'homogénéiser l'interaction du liquide avec la surface, et par là l'interaction biologique, en mettant les molécules en contact avec la surface.

3.3.2. Caractérisation de l'écoulement : mélange contrasté

La visualisation du mélange en temps réel au sein des microgouttes (Figure 35) est réalisée par la combinaison d'une vue supérieure et d'une vue latérale prises à différents instants du mélange. Les deux liquides utilisés, de l'eau désionisée et un colorant bleu très concentré, permettent d'assurer un contraste suffisant pour la visualisation du phénomène au sein de la goutte. Le volume total de la goutte est de 10 μ L (correspondant à un diamètre de plusieurs centaines de microns). Les vues latérales (a) et supérieures (b) illustrent directement le mélange entre les deux liquides.

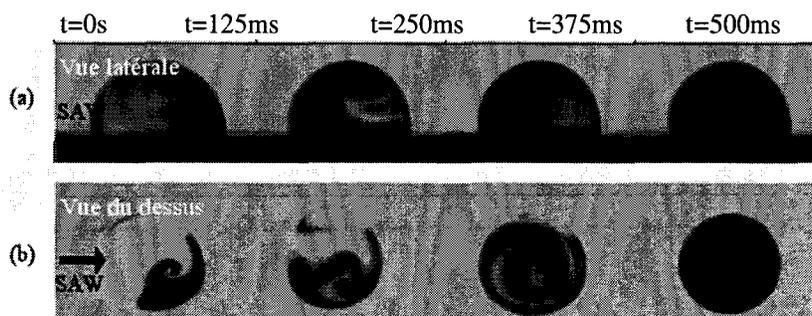


Figure 35: Séquence temporelle d'un micromélange SAW dans une goutte de $10\mu\text{l}$ à une puissance d'excitation de 28 dBm (a) vue latérale du mélange, (b) vue du dessus.

Des temps caractéristiques de mélange sont également mesurés pour évaluer l'efficacité et la rapidité du mélange par rapport à la diffusion. A partir des prises de vue précédentes, nous avons calculé l'écart type normalisé de l'intensité du signal en fonction du temps, ce qui permet d'estimer la vitesse d'homogénéisation du mélange (Figure 36). Les temps caractéristiques de mélange SAW au sein des gouttes sont ainsi divisés par 300 par rapport à une simple diffusion³⁰.

Les mêmes expériences ont été répétées pour les mélanges au sein de gouttes entre deux surfaces : les gouttes sont immobilisées entre le substrat de LiNbO_3 (plan inférieur ou base) permettant le mélange, et une lamelle de verre (plan supérieur ou capot). La différence entre les temps de mélange enregistrés dans ce cas et ceux notés en l'absence de capot est négligeable : ils sont en effet légèrement supérieurs de quelques dizaines de microsecondes.

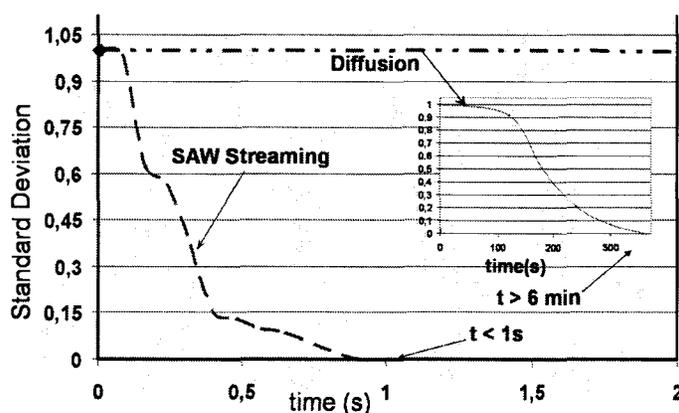


Figure 36: Ecart type à la luminosité moyenne du signal par diffusion et par micromélange SAW.

La méthode de redistribution de fluorescence après photoblanchiment (pour fluorescence recovery after photobleaching, FRAP) permettrait d'affiner encore ce résultat. Cette méthode consiste à éliminer de manière irréversible la fluorescence dans une zone particulière de la goutte

par photoblanchiment à l'aide d'une irradiation laser. On peut ainsi créer, sur une goutte au repos, deux zones bien distinctes (une fluorescente l'autre pas) à un temps t choisi. Il est ainsi possible de suivre la redistribution des deux milieux jusqu'à homogénéisation à partir de conditions initiales très strictes (comme précédemment à partir de l'écart type à la luminosité moyenne). L'avantage de cette technique par rapport au mélange contrasté utilisé, est la grande précision de l'état initial où l'écart type est égal à un, contrairement à la technique de fusion des deux milieux qui engendre des instabilités qui participent à la redistribution.

3.3.3. Caractérisation par suivi de particules en gouttes

La PIV (Particle Image Velocimetry) consiste à enregistrer des images successives et rapides d'un écoulement marqué de particules (traceurs) à l'aide d'une caméra rapide. La corrélation des positions des traceurs pour deux images successives permet de remonter localement au déplacement du fluide et de réaliser une cartographie des vitesses à un instant donné. Une variante de la PIV, très répandue en microfluidique pour la caractérisation d'écoulements dans des microcanaux est la μ PIV³¹. Elle consiste à utiliser des marqueurs, fluorescents cette fois, et à observer les écoulements au microscope à fluorescence. Nous avons mis en place ces deux méthodes en collaboration avec F. Zouhestiagh, au LML (Laboratoire de Mécanique de Lille) sur la plateforme MEOL (MEtrologie Optique de Lille).

μ PIV – Micro Particle Image Velocimetry

Lorsqu'on irradie une goutte entière par ondes acoustiques de surface, on obtient des écoulements internes qui sont peu reproductibles, amenant à des vortex dont la taille et le nombre peuvent être variables. Il est donc difficile de réaliser des champs de vitesse ayant une valeur significative dans ces conditions. Les écoulements internes étant très complexes lorsque les ondes acoustiques excitent toute la surface de la goutte, nous avons cherché dans le cadre de cette étude par μ PIV à rendre l'écoulement plus reproductible. Un absorbant est placé sur le trajet des ondes sur la moitié de la goutte afin d'obtenir un vortex reproductible.

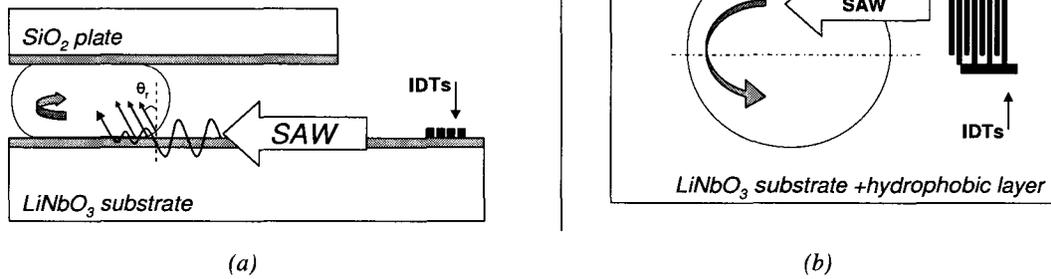


Figure 37 Dispositif permettant d'obtenir un vortex reproductible en attaquant la goutte d'un seul côté grâce à l'ajout d'un absorbant (a) en vue de côté et (b) en vue de dessus.

Des cartographies de vitesses dans la goutte sont réalisées par μ PIV pour différentes puissances de génération des ondes acoustiques de surface. Des images instantanées de l'écoulement sont réalisées grâce à une caméra rapide Imperx IPX-VGA210 (240 images par seconde, 500 μ s d'ouverture, 640x480 pixels) sur des gouttes de 0,25 μ l (Figure 38). Dans cette étude, nous avons utilisé des particules de 1 μ m (excitation 468nm et émission 508nm). Le microscope à fluorescence utilisé est un Olympus BX51, muni d'une lampe au mercure et de filtres Cy3 et fluoresceine. La caméra est précédée d'un photomultiplicateur Hamamatsu. Les études PIV sont réalisées grâce à l'utilisation d'un plug-in de suivi de particules du logiciel ImageJ, suivi de post-traitements manuels sous tableur.

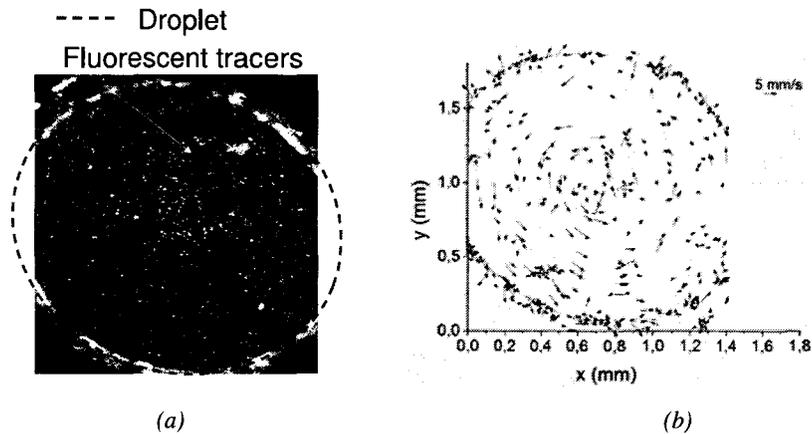


Figure 38 (a) Vue instantanée de l'écoulement à l'intérieur d'une goutte de 0,25 μ l pour une puissance d'entrée de 41 dBm et (b) cartographie de vitesse associée.

Comme précédemment montré par Strobl et al.³², l'augmentation de la puissance RF, c'est-à-dire, l'augmentation de l'amplitude de l'onde de Rayleigh et de la pression de radiation dans la goutte, n'influe pas sur la trajectoire de l'écoulement dans la goutte. On observe par contre un

effet sur la vitesse de l'écoulement. Les cartographies résultantes, comme celle montrée sur la Figure 38 montrent une dépendance très forte des vitesses moyennes de mélange en fonction de la puissance RF.

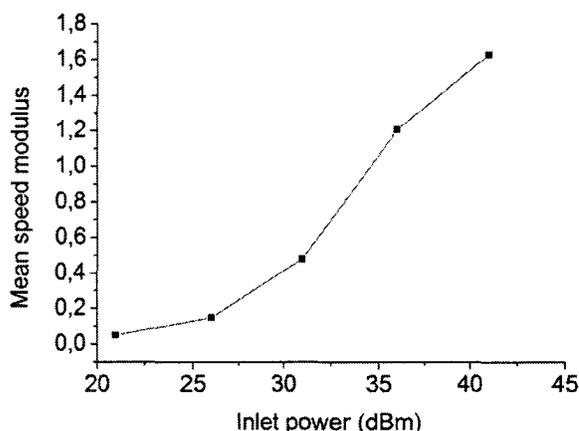


Figure 39 Vitesse des particules en mm/s dans la goutte en fonction de la puissance RF envoyée pour une goutte de 0.25 μ l d'EDI, substrat LiNbO₃ coupe X à 20MHz.

Nous avons donc déterminé la vitesse de l'écoulement dans la goutte en fonction de ce paramètre (Figure 39). A notre connaissance, une cartographie des écoulements internes à une goutte soumise aux ondes acoustiques de surface n'avait pas encore été montrée dans la littérature. Un suivi de particules a été établi par D. Beyssen et al, mais la cartographie résultante n'est pas montrée. La tendance est la même, mais les vitesses déterminées ici sont inférieures à celles suggérées. Ceci peut s'expliquer par le fait que nous utilisons une valeur moyennée de la vitesse grâce aux cartographies réalisées et que nous travaillons sur un écoulement 2D.

Nous avons également cherché, par un système de miroir à 45°, positionné sous l'objectif du microscope et associé à une platine XYZ pour la mise au point, à observer par μ PIV les écoulements d'une tranche perpendiculaire au substrat. Nous avons pu valider cette technique par l'observation des phénomènes d'interaction ondes de surface / liquide lors d'autres expériences (Annexe 2). Par contre, nous n'avons pas observé d'écoulement distinct en μ PIV dans les divers plans de focalisation utilisés. Ces plans ne correspondaient visiblement pas à des plans d'écoulement étant donné la caractéristique tridimensionnelle de la vitesse.

Les difficultés de cette méthode, dans notre cas, ont résidé dans l'obligation d'utiliser de petits volumes de gouttes, étant donné les grossissements du microscope. D'autre part, la volonté d'observer les écoulements dans d'autres configurations (vu la difficulté à focaliser sur le plan d'écoulement), nous a poussés à développer un dispositif de PIV classique.

PIV – Particle Image Velocimetry

Un dispositif à illumination en lumière blanche permet un éclairage diffus pour éviter les réflexions sur la calotte sphérique. Les images instantanées de l'écoulement sont réalisées grâce à une caméra rapide Imperx IPX-VGA210 (240 images par seconde, 500 μ s d'ouverture, 640x480 pixels). Dans cette étude, nous avons utilisé des solutions de particules de 1 et 10 μ m fluorescentes (particules vertes: excitation 468nm et émission 508nm, particules rouge: excitation 542nm et émission 612nm) à 1/10 dans l'EDI. Nous utilisons une bague rallonge de 60mm, un taux d'obturation de 3,5ms.

Les écoulements dans une goutte de 10 μ l sont observés suivant différents angles d'attaque, avec et sans capot pour une excitation à 20MHz. Les enregistrements ont eu une grande valeur informative concernant la disposition des particules sous l'action des ondes. On remarque en effet que les particules sont projetées suivant un angle de Rayleigh d'environ 30° vers le haut de la calotte sphérique (Figure 40). Dans le cas de l'utilisation d'un capot, cela signifie que le matériau contenu dans la goutte est projeté vers le capot suivant l'angle de Rayleigh.

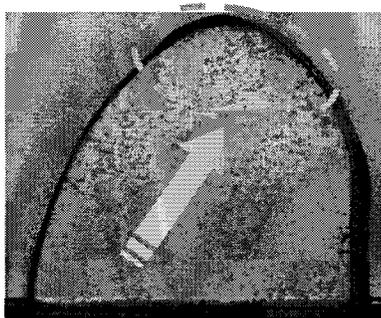


Figure 40 Photographie du mouvement des particules de 10 μ m dans une goutte de 10 μ l soumise aux ondes acoustiques de surface à 41dBm. Les particules sont projetées vers le haut de la goutte suivant l'angle de Rayleigh.

Cette PIV classique ne nous a pas permis de remonter à un champ de vitesse : d'une part, l'éclairage utilisé ne donnait pas une image bi-dimensionnelle de la goutte, la visualisation du mouvement des particules est leurrée par la calotte sphérique. D'autre part, l'ouverture de la caméra associée à la taille des particules utilisées ne permettaient pas d'avoir une correspondance 'taille de pixel/taille de particules' adéquat à un traitement PIV (l'optimum est d'avoir une particule pour 2/3 pixels, or nous avons un pixel pour les particules de 1 μ m). Seul un suivi des particules a été possible avec le logiciel ImageJ, permettant de visualiser les écoulements, mais pas d'en déterminer la vitesse.

Nous avons montré l'utilisation d'une configuration d'écoulement en deux dimensions, volontairement simplifiée afin de déterminer les caractéristiques. Les particules utilisées suivent bien les écoulements générés par le mélange acoustique, ainsi leur trajectoire est assimilée à celles de biomolécule, que sont les protéines. Plusieurs conclusions s'imposent alors :

- qualitativement, on observe un mouvement ascendant du liquide (pour une base au niveau inférieur). On suppose donc que le biomatériau est propulsé vers le haut de la goutte et que le positionnement d'un capot sensible est propice à l'interaction.

- quantitativement, nous avons déterminé le lien entre la puissance injectée et la vitesse de l'écoulement dans notre système. Nous avons mis en évidence une dynamique de vitesses d'écoulements et des temps caractéristiques de mélange très large (jusqu'à $1800\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$).

4. Utilisation comme méthode d'adressage fluïdique

Comme nous l'avons dit dans le Chapitre 1, au-delà de la performance intrinsèque du transducteur, l'adressage fluïdique des détecteurs est en fait un paramètre primordial dans le taux de molécules effectivement détectées et donc dans la sensibilité globale d'un système de détection. Meinhart et al³³ ont été les premiers à proposer une réalisation microfluidique apportant une solution à cette problématique: une technique de mélange électrothermique au sein d'un canal pour améliorer les performances de détection d'un système intégré. La technique de mélange SAW que nous proposons pour l'adressage fluïdique de détecteurs au sein de gouttes est une solution alternative intéressante, car nous avons vu au chapitre précédent que la dynamique des vitesses par mélange SAW est importante (jusqu'à $1800\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$). Le travail en gouttes apporte également certains avantages par rapport à un système en flux (chap.1 §6.1).

Nous décrivons dans une première sous partie les équations qui régissent le transport de masse des molécules en diffusion et dans un flux. Ces équations sont ensuite couplées à une réaction analyte/ligand dans une simulation par éléments finis permettant d'évaluer l'influence d'un écoulement sur la réaction à la surface d'un biocapteur, pour les vitesses caractéristiques dégagées grâce aux mesures μPIV (§3.3.3).

4.1. Transport de masse

La diffusion (mouvement Brownien) décrit le mouvement de particules soumises à des collisions aléatoires. La description mathématique se concentre alors sur des propriétés moyennées sur un ensemble de particules.

4.1.1. Diffusion : les lois de FICK

La première loi de Fick est une loi phénoménologique qui relie le gradient de la densité au courant:

$$J = -D \frac{\partial c}{\partial x} = -D \nabla c, \quad (29)$$

avec J la densité de flux de diffusion [$\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$], et D le coefficient de diffusion des analytes en solution [m^2/s]. Cette première loi de Fick est l'analogie de la loi d'Ohm ($j_E(x,t) = \sigma E = -\sigma \nabla V$), pour le courant de particules au lieu du courant électrique. En appliquant la loi de conservation, on obtient, dans un intervalle $[x, x+dx]$, la variation du nombre de molécules dans l'intervalle :

$$\frac{\partial}{\partial t} \int_x^{x+dx} c(x', t) dx' = j(x, t) - j(x+dx, t) \quad (30)$$

$$\frac{\partial c(x, t)}{\partial t} + \nabla \cdot j(x, t) = 0 \quad (31)$$

En combinant ces deux équations, on obtient la deuxième loi de Fick, qui permet de définir une concentration dans le temps et dans l'espace :

$$\frac{\partial c}{\partial t} = D \nabla^2 c, \quad (32)$$

où ∇^2 est le Laplacien 3D $\partial^2/\partial^2x + \partial^2/\partial^2y + \partial^2/\partial^2z$. En l'absence de dépendance spatiale de la constante de diffusion D, comme on en fait l'hypothèse, l'équation (32) est linéaire et peut donc être résolue. Une solution est la suivante :

$$c(x, t | x_0) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{d/2}} \cdot e^{-\frac{|x-x_0|^2}{4Dt}}, \quad (33)$$

où $d=1,2,3$ est la dimension de l'espace et $|x|^2$ est la norme du vecteur \vec{x} au carré. Il s'agit d'une Gaussienne avec une déviation standard $\sigma = \sqrt{2Dt}$ dans chaque direction spatiale. En effet, le rayon au carré moyen auquel on peut observer une molécule partant de $\vec{x}_0 = 0$ à $t=0$ augmente en fonction du temps comme suit :

$$\langle r^2 \rangle = \int_V |\vec{x}|^2 \cdot \frac{1}{(4\pi Dt)^{d/2}} \cdot e^{-\frac{|\vec{x}|^2}{4Dt}} \cdot dV = 2dDt \quad (34)$$

avec $|\vec{x}|^2 = x^2$ en $d=1$, $|\vec{x}|^2 = x^2 + y^2$ en $d=2$, $|\vec{x}|^2 = x^2 + y^2 + z^2$ en $d=3$.

Or on définit la variance d'une gaussienne par :

$$\int \frac{1}{\sqrt{2\pi\sigma}} e^{-\frac{x^2}{2\sigma^2}} dx = \sigma^2 \quad (35)$$

Il s'ensuit que le rayon d'un cercle dans lequel une molécule a une probabilité de se situer augmente en $\sigma = \sqrt{2Ddt}$. Ce paramètre est également indiqué dans la publication de Sheehan et al³⁴ en fonction de la géométrie d'un détecteur (Figure 41).

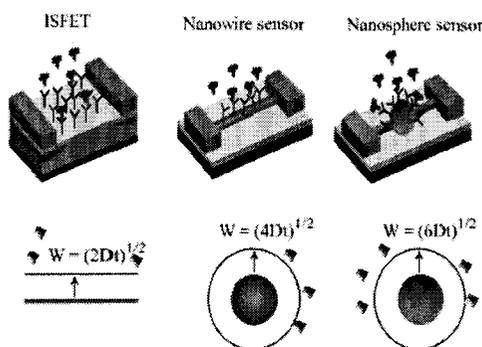


Figure 41 Schéma de trois systèmes de détection immergés dans une solution d'analytes. La diffusion d'analytes vers une surface plane est 1D (d=1), vers un nanofil est 2D (d=2) et vers une nanosphère est 3D (d=3). La concentration 'équilibre' située à une distance W du détecteur est montrée dans ces cas³⁴.

La zone de déplétion correspond à la longueur de diffusion : $W = \sqrt{2Ddt}$. Avec d la dimension du nanodétecteur (d=1,2,3). On retrouve le temps caractéristique que met une protéine pour arriver à proximité d'un détecteur 1D (distance λ) dans un régime de diffusion (chap.1 §5.1.5):

$$t \approx \frac{\lambda^2}{D} \quad (36)$$

A titre indicatif, pour un coefficient de diffusion typique de $D=10^{-11} \text{m}^2.\text{s}^{-1}$, le temps d'interaction dans une goutte de $1\mu\text{l}$ pourra atteindre plusieurs dizaines d'heures en régime de diffusion.

4.1.2. La convection

Voyons maintenant ce qui se passe lorsque les particules sont immergées dans un fluide qui se déplace à la vitesse $V(x)$. La forme classique de l'équation de convection/diffusion est la suivante :

$$\frac{\partial}{\partial t} c(x,t) = D\Delta c(x,t) - V\nabla c(x,t) \quad (37)$$

Pour D et V indépendants de x, une solution particulière gaussienne est :

$$c(x, t | x_0, V) = \frac{1}{(4\pi Dt)^{d/2}} \cdot e^{-\frac{|x-x_0-Vt|^2}{4Dt}} \quad (38)$$

Il s'agit d'une Gaussienne avec déviation standard $\sigma = \sqrt{2Dt}$ dans chaque direction spatiale. La Gaussienne s'étale donc en fonction du temps, alors que sa moyenne dérive en fonction du temps suivant $x_0 + Vt$. Cette solution est normalisée : $C(t) = \int_V \rho(x, t | x_0) dV = 1$

La zone de déplétion est ainsi éloignée de la zone de détection grâce à la convection. Ceci sera de nouveau vérifié dans la partie 4.2 de ce chapitre.

4.1.3. Cinétique de réaction dans un flux

Afin de décrire l'évolution d'une réaction anticorps/antigène dans un écoulement, il convient d'utiliser l'équation de convection-diffusion (Equ.37), et de prendre en compte une cinétique de réaction sur la surface du capteur. La réaction d'association analyte/récepteur est décrite au chapitre 1 (§2.3). A titre de rappel, à un instant t :

$$\frac{dAB}{dt} = k_a \cdot A \cdot B - k_d AB \quad (39)$$

Or, on sait également que pour chaque récepteur nouvellement occupé par une protéine, on a création d'une entité AB, d'où, à tout instant t :

$$\frac{dAB}{dt} = -\frac{dB}{dt} \text{ et } B = r_0 - AB, \quad (40)$$

avec r_0 la concentration surfacique en ligand immobilisé. Ceci qui permet de décrire le problème à la surface du biocapteur avec les variables AB et A uniquement :

$$\frac{dAB}{dt} = k_a \cdot A \cdot (r_0 - AB) - k_d AB \quad (41)$$

Ce problème est transitoire, dans un volume non infini, et il met en jeu et couple de nombreux effets volumiques (diffusion et convection) et surfacique (réaction à la surface du biocapteur). Du point de vue analytique, il est ainsi difficile de le résoudre. On s'intéresse donc à des outils de simulation numérique par éléments finis.

4.2. Modélisation FEM du mélange couplé à un détecteur

Il est également complexe de simuler par éléments finis le phénomène de mélange acoustique généré par des SAW, car l'amplitude des déformations du matériau est nanométrique, et le

phénomène fluide engendré est macroscopique. On est donc en présence d'un phénomène à multiples échelles, ce qui pose entre autres des problèmes de maillage. De plus, la simulation en goutte présente des effets dynamiques, avec une vibration de la surface libre de la goutte et donc une modification des conditions aux limites. Une toute première tentative relatant la simulation par éléments finis du micromélange par ondes acoustiques de surface de type Rayleigh dans un liquide est parue en 2007³⁵. Toutefois, ce ne sont que les prémices d'un modèle complet, les simulations étant réalisées sur 100ns dans un volume restreint de quelques centaines de microns.

Les simulations entreprises sous Comsol ont été réalisées en collaboration avec Olivier Ducloux lors de son séjour post doctoral dans l'équipe Microfluidique. L'effet direct des ondes acoustiques de surface sur le liquide étant complexe, nous avons réalisé les simulations en se basant sur les données de champs de vitesse obtenues à partir des mesures μ PIV (§3.3.3).

4.2.1. Principe général

Le principe de l'étude consiste à montrer l'intérêt du transport convectif des analytes au voisinage de la zone déplétée pour améliorer les temps caractéristiques d'un biocapteur placé sur une tranche du bioréacteur. On tient donc compte dans le modèle des lois d'action de masse, ainsi que des cinétiques de réaction à la surface du capteur (paragraphe précédent). Nous avons cherché à simuler par éléments finis l'interaction entre une goutte d'analytes soumis à un champ de vitesse, et un détecteur situé en périphérie. Pour simplifier le modèle, nous nous intéressons à une goutte dans un réacteur (conditions aux limites invariantes).

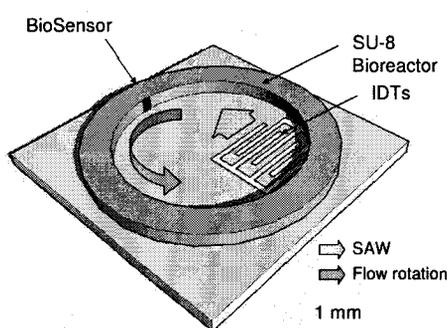


Figure 42 Schéma de principe du système simulé : micromélange généré par un IDT situé dans un microréacteur en SU8. Un biodétecteur est placé sur la tranche et réagit avec les analytes cibles du bioréacteur.

Des simulations numériques par éléments finis sous Comsol sont entreprises pour montrer l'efficacité du mélange par les ondes dans le cas d'un bioréacteur cylindrique d'1mm de diamètre (Figure 42). En supposant que le flux est 2D, le modèle simulé prend en compte le transport de

l'analyte par diffusion et par convection dans l'écoulement, ainsi que la cinétique de réaction à la surface d'un biocapteur situé en périphérie de la goutte.

La position du capteur est peu réaliste technologiquement parlant: la zone sensible est plus vraisemblablement située au centre de la goutte. Cependant, ceci constitue un premier modèle d'étude pour la compréhension du phénomène d'adressage fluide. Vu la difficulté de simuler le mélange généré par des ondes de surface, nous avons mis en place un modèle de champ de vitesses correspondant au mieux aux visualisations par PIV réalisées sur les gouttes. Nous avons considéré pour faciliter le calcul que l'écoulement était 2D dans le plan considéré. Cette hypothèse est limitée sachant que:

- les ondes acoustiques de surface produisent un mouvement dirigé suivant l'angle de réfraction des ondes dans la goutte (30°), les particules ont donc tendance à aller du substrat vers le couvercle (§3.3.3).
- on néglige l'épaisseur de la couche limite à la surface du couvercle et au fond du réacteur.

4.2.2. Implantation dans Comsol

Un volume V contient une concentration homogène c_0 d'analytes à l'instant $t=0$. La surface active est notée S , et la concentration surfacique en récepteur à l'instant $t=0$ est notée r_0 . On note le flux sortant de particules j_{ext} . La capture des analytes par les récepteurs induit la création d'une zone pauvre en analyte (zone déplétée) dont la taille va dépendre en régime diffusif des coefficients suivants :

- coefficient de diffusion D des analytes dans la solution.
- constante de réaction à l'équilibre K .

Au sein de Comsol, le mode choisi est le mode 'convection et diffusion', prenant en compte les équations développées ci-dessus pour le calcul de la distribution spatiale de concentration dans le réacteur au fil du temps. Le mode 'Weak Term Boundary', permet la résolution d'une équation différentielle supplémentaire avec sa variable propre. On l'utilise pour simuler la réaction d'association analyte-ligand (A-B) à la surface du biocapteur. La variable associée appelée c_s correspond à la concentration surfacique de l'entité 'A-B'. Le Tableau 3 décrit les constantes choisies pour décrire une interaction analyte-ligand typique³³.

Tableau 3 : constantes d'interaction analyte-ligand utilisées.

Coefficient de diffusion	D	$D=10^{-11} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$
Concentration initiale	C_0	0.1 nM
Concentration surfacique	R_0	$3.3 \cdot 10^{-3} \text{ nM.m}$

initiale en récepteurs		
Constante d'association	k_a	$10^6 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$
Constante de dissociation	k_d	10^{-3} s^{-1}

Dans le mode 'convection et diffusion', la vitesse de rotation est définie par les coordonnées du vecteur vitesse V dans le repère $O_x O_y$ par V_x et V_y :

$$V_{x,y} = V_r \cdot \frac{x,y}{r} \text{ avec } r = (x^2 + y^2)^{0,5} \quad (42)$$

$$\text{Et } V_r = V_{01} \cdot \left(1 - \left(\frac{r_1 - 0,5 \cdot R_{01}}{0,5 \cdot R_{01}} \right)^2 \right), \quad (43)$$

de manière à intégrer une épaisseur de couche limite sur les bords du domaine de calcul. Néanmoins, des efforts restent encore à faire, notamment sur la description de l'épaisseur de couche limite en fonction de la vitesse de l'écoulement. En ce qui concerne la condition aux limites sur le biocapteur, on définit une variable j_{ext} [mol/m².s], correspondant au flux sortant de particules à calculer sur chaque maille entre t et $t+dt$:

$$J_{\text{ext}} = k_a \cdot c \cdot (r_0 - c_s) - k_d \cdot c_s \quad (44)$$

Les conditions aux limites sont définies dans le mode "Weak Term Boundary". On évalue la variable c_s , qui, en intervenant aussi dans le calcul de J_{ext} , permet le couplage entre les deux modes.

4.2.3. Concentration à la surface du capteur

Les résultats des simulations³⁶ montrent qu'une zone déplétée est créée dans le cas d'une réaction dans une chambre statique (vitesse nulle), mais que cette zone est limitée dans le cas d'une réaction au sein d'un mélange. Les performances du détecteur en mode statique (sans micromélange) sont limitées par la diffusion des analytes dans la zone déplétée. On le voit sur la Figure 43 montrant la distribution spatiale de la concentration dans le bioréacteur avec et sans le mélange.

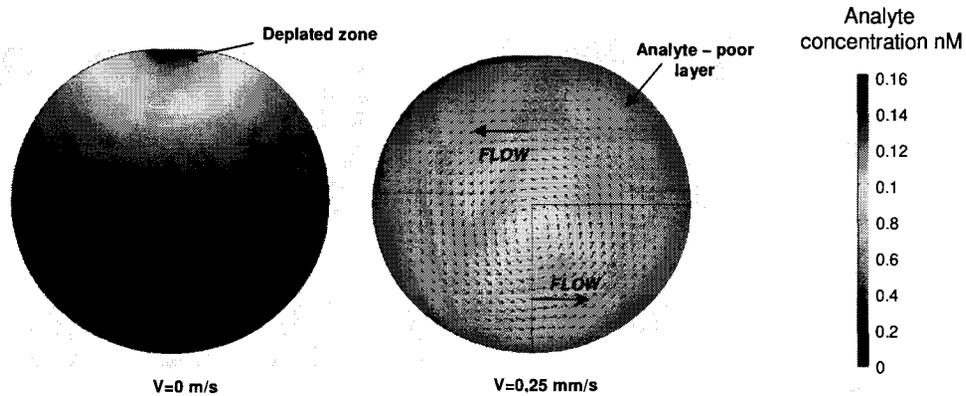


Figure 43 Simulations FEM du microbioréacteur à $t=2000\text{sec}$ comprenant un capteur sur la tranche. Distribution spatiale de la concentration (a) sans micromélange dans la chambre (b) avec micromélange dans la chambre, à une vitesse de $0,025\text{ mm/s}$.

La distribution spatiale de concentration montre qu'on crée au bout d'un tour de réacteur un anneau pauvre en protéines : la zone déplétée se répartit à l'intérieur du réacteur au lieu de rester localisée près du capteur.

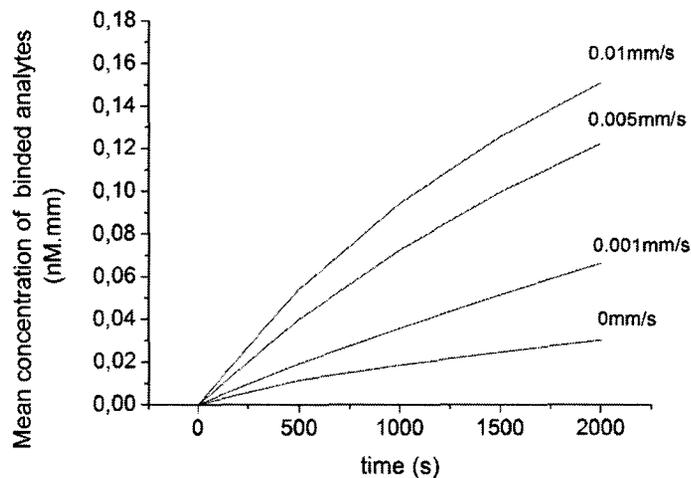


Figure 44 Concentration moyenne d'analytes immobilisés sur la surface du capteur en fonction du temps pour différentes vitesses d'écoulement.

La Figure 44 représente les concentrations immobilisées sur le capteur pour différentes vitesses d'écoulements. La concentration surfacique moyenne en complexe analyte-ligand sur le biocapteur augmente au cours du temps, d'autant plus vite que la vitesse de mélange est importante. Les simulations sont réalisées à plusieurs vitesses de fluide correspondant à une puissance électrique croissante envoyée sur les peignes interdigités.

Une première conclusion est tirée de ces simulations : les avantages du micromélange sont multiples. Simultanément, on déplace la zone déplétée en dehors de la zone correspondant au

biocapteur et on alimente le biocapteur en continu en solution de concentration importante. La concentration surfacique en complexe augmente avec la vitesse de mélange. Nous avons ensuite pu réaliser une étude systématique prenant en compte différents nombres de Damköhler.

4.2.4. Etude sur différentes interactions

Afin d'évaluer le bénéfice apporté par le mélange par ondes acoustiques de surface, les mêmes simulations ont été menées pour différents nombres de Damköhler (pour la définition se reporter au chap.1 §5.1.5). Le rapport des concentrations avec et sans mélange est alors tracé en fonction des différents Da employés (Figure 45). Pour obtenir une gamme de Da réaliste, nous avons fait varier le coefficient de diffusion D de 4.10^{-12} à 4.10^{-9} $m^2.s^{-1}$, et le coefficient d'association k_a de 10^4 à 10^8 $M^{-1}.s^{-1}$ dans l'Equation 11 (Chap.1 §5.1.5). La Figure 45 confirme que les interactions à fort Da (grand volume d'échantillon, grand coefficient d'association, grande densité d'anticorps immobilisés, faible diffusivité) sont beaucoup plus sensibles à un mélange pendant l'interaction.

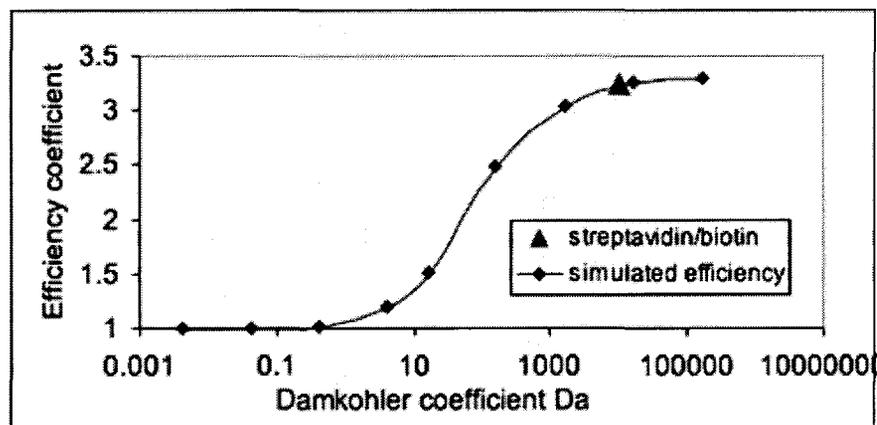


Figure 45 Graphique montrant l'évolution du rapport des concentrations avec et sans mélange, pour différents nombres de Damköhler, déterminés en faisant varier k_a ou D . L'interaction streptavidine biotine est placée à partir de son nombre de Damköhler.

L'amélioration de capture peut aller jusqu'à 3,5 fois la capture normale dans ces conditions. On observe une saturation du facteur d'amélioration pour les grands nombres de Damköhler. Ceci s'explique par le fait que pour les grands rapports k_{on}/D , les analytes qui doivent normalement traverser la couche déplétée par diffusion, n'en ont pas le temps car ils sont emportés trop vite par l'écoulement. L'efficacité est limitée aux grands Da par cet effet.

En plaçant une interaction représentée par son nombre de Damköhler sur la courbe de la Figure 45, on peut évaluer si celle-ci sera ou non améliorée par le mélange apporté par les ondes

dans la configuration utilisée et dans quelle mesure. Par exemple le positionnement du couple 'streptavidine/biotine' dans le cas d'une capture de biotine sur streptavidine immobilisée prévoit un facteur d'amélioration de plus de trois.

D'autres facteurs sont à prendre en compte dans l'optimisation du facteur d'amélioration, tels que la vitesse de l'écoulement, la longueur caractéristique du mélange... On peut intégrer ces effets grâce au nombre de Peclet (§5.1.4). En effet, une augmentation significative du nombre de Peclet provoque une diminution de l'efficacité. Pour chaque nombre de Damköhler, il doit exister un nombre de Peclet optimisant ce facteur.

5. Conclusion

Nous avons donc montré dans cette partie que les systèmes à ondes acoustiques de surface peuvent être utilisés pour un mélange in-situ de gouttes présentant de nombreux intérêts dans les laboratoires sur puce, et qu'il existe une large gamme d'opérations fluidiques possibles. Des applications intéressantes sont possibles dans le domaine de la biologie, notamment pour la diminution des temps de réponse des biopuces dans le cas où le déplacement de l'analyte est insuffisant par simple diffusion.

Malgré les difficultés reconnues pour la compréhension, la caractérisation et la simulation du micromélange par ondes acoustiques de surface, cette partie du travail de thèse a permis d'apporter une meilleure compréhension du mécanisme afin de mieux l'exploiter. Les diverses caractérisations du micromélange à base d'ondes acoustiques de surface au sein de microgouttes ont montré des effets bénéfiques sur les interactions biologiques en volume ou à la surface:

- l'augmentation des cinétiques de mélange liquide/liquide.
- la diminution des constantes d'interactions biologiques liquide/surface avec des surfaces actives fonctionnalisées.
- l'homogénéisation des interactions liquide/surface (de type anticorps/antigène immobilisé), apportée par une recirculation équilibrée du matériau biologique au sein des gouttes.

Les caractérisations des écoulements par PIV ont montré d'une part des aspects qualitatifs importants des écoulements internes (écoulements principaux, vortex), et d'autre part, les mesures μ PIV ont donné accès aux champs de vitesses des écoulements dans les gouttes en fonction des puissances utilisées. A notre connaissance, une telle cartographie des écoulements internes à une goutte soumise aux SAW n'avait pas encore été montrée dans la littérature. Les caractérisations des recirculations d'analytes réalisées ainsi que les vitesses relevées ont également pu être introduites dans le modèle permettant d'obtenir des simulations microfluidiques du mélange. Les

simulations visent à optimiser les conditions expérimentales d'interaction 'liquide biologique/biodétecteur' suivant les paramètres de mélange ainsi que les caractéristiques de l'interaction biologique utilisée (Damköhler).

La technique de mélange SAW proposée pour l'adressage fluide de détecteur au sein de gouttes est un outil puissant car :

- il permet une augmentation de l'interaction liquide/surface à faible nombre de Reynolds
- la dynamique de vitesses d'écoulements et des temps caractéristiques de mélange est plus large qu'avec d'autres techniques. Par exemple, le mélange électrothermique proposé par Meinhart et al³³ mène à des vitesses de quelques centaines de $\mu\text{m/s}$, alors que les ondes acoustiques de surface permettent de mélanger au moins jusqu'à $1800\mu\text{m/s}$, ce qui leur permet de couvrir une plus large gamme d'interactions analytes-ligands.
- le travail en goutte permet de faire recirculer simplement le matériau biologique contrairement au travail en flux qui demande la mise en place d'un système de recirculation.
- le travail en goutte permet de limiter l'apport en analyte (qui dans les canaux est réalisé en continu et cause d'autre part des pertes en raison des volumes morts).
- les systèmes en goutte apportent une souplesse d'utilisation et une accessibilité que ne présentent pas toujours les systèmes encapsulés.

En couplant ce système d'adressage fluide à une zone sensible de détection, un microlaboratoire sur puce intégré peut alors être envisagé, afin d'atteindre de nouvelles performances en termes de sensibilité et de temps de réponse. Un tel système serait bénéfique pour de nombreuses applications biologiques où les quantités de matériau biologique à détecter se font de plus en plus faibles et pour lesquelles des surfaces actives de grande sensibilité sont nécessaires tout en conservant des temps caractéristiques d'analyse rapides (puce à protéines, puce à ADN, biodétecteur classique, nanobiodétecteur...).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE 2

- ¹ P.R Nair, A. Alam, "Performance limits of nanobiosensors", *App. Phys. Lett.* (2006), 88, pp. 233120.
- ² D. Royer, E. Dieulesaint, "Ondes élastiques dans les solides", Application au traitement du signal, Masson (1974), pp.283-287.
- ³ D. Royer, E. Dieulesaint, "Ondes élastiques dans les solides", Application au traitement du signal, Masson (1974), pp.129-130.
- ⁴ Z. Shen, B. Xu, X. Ni, J. Lu, "Numerical simulation of laser-generated ultrasonic waves in layered plates", *J. Phys. D: Appl. Phys.* (2004), 37, pp.2364-2370.
- ⁵ R. White, F. Voltmer, "Direct piezoelectric coupling to surface acoustic waves", *Applied Physics Letters* (1965), 7, 12, pp.314-316.
- ⁶ M. Feldmann, J. Henaff, "Traitement du signal par ondes élastiques de surface", Masson et CENT-ENST, Paris, 1986
- ⁷ D. Ballantine, R. White, R. Martin, A. Ricco, E. Zellers, G. Frye, H. Wohltjen, "Acoustic wave sensors: theory, Design, and Physico-Chemical Applications", Design, and Physico-Chemical Applications, Academic Press (1997).
- ⁸ C. Furmidge, "Studies at phases interfaces I. The sliding of liquid drops on solids surfaces and a theory for spray retention", *J. Colloid Sci.* (1962), 17, pp. 309-324.
- ⁹ C. Neinhuis, W. Barthlott, "Characterization and distribution of water-repellent, self-cleaning plant surfaces", *Ann. Bot.* (1997) 79, pp. 667-677.
- ¹⁰ L. Gao, T.J. McCarthy, "The Lotus Effect Explained: Two Reasons Why Two Length Scales of Topography Are Important", *Langmuir* (2006) 22, pp. 2966-2967.
- ¹¹ R. Wenzel, "Resistance of solid surfaces to wetting by water", *Ind. Eng. Chem.* (1936), 28, pp. 988.
- ¹² A.B. Cassie, S. Baxter, "Wettability of porous surfaces", *Trans. Faraday Soc.* (1944), 40, pp. 546.
- ¹³ M. Callies, D. Quéré, "On water repellency", *Soft Matter* (2005), 1, p. 55-61.
- ¹⁴ S. Winnall, S. Winderbaum, "Lithium Niobate Reactive Ion Etching" (2001), Technical Note DSTO-TN-0291.
- ¹⁵ I. Barry, G. Ross, P. Smith, R. Eason, "Ridge waveguides in Lithium niobate fabricated by differential etching following spatially selective domain inversion", *Appl. Phys. Lett.* (1999), 74, 10, pp. 1487-1488.
- ¹⁶ T. Easwarakhanthan, D. Beyssen, L. Le Brizoual, J. Bougdira, "Spectroellipsometric analysis of CHF₃ plasma-polymerized fluorocarbon films", *J. Vacuum Science & Technology A* (2006), 24, 4, pp. 1036-1043.
- ¹⁷ D. Beyssen, "Conception, Etude et réalisation de micro-capteurs et microactionneurs chimiques et biologiques à base de dispositifs à ondes acoustiques de surface", Thèse de l'Université Nancy-I (2006).
- ¹⁸ T. Uchida, T. Suzuki, S. Shiokawa, "Investigation of Acoustic Streaming excited by Surface Acoustic Waves", *IEEE Ultrasonics Symposium* (1995), p.1081-1084.

- ¹⁹ A. Wixforth, C. Strobl, C. Gauer, A. Toegl, J. Scriba, Z. Guttenberg, "Acoustic manipulation of small droplets", 2004, *Anal. Bioanal. Chem.*, 379, pp. 982-991.
- ²⁰ K. Sritharan, C. J. Strobl, M. F. Schneider, A. Wixforth, Z. Guttenberg, "Acoustic mixing at low Reynold's numbers", *App. Phys. Lett.* (2006), 88, pp. 054102.
- ²¹ W. Nyborg, W.P. Mason, "Acoustic streaming, *Physical Acoustic*" (1965), Part B, Vol. 1, p. 265.
- ²² L. Zarembo, L. Rozenberg, "Acoustic streaming, high-intensity ultrasonic fields" (1971), III, p. 137.
- ²³ C. Strobl, A. Rathgeber, A. Wixforth, C. Gauer, J. Scriba, "Planar microfluidic processors", *IEEE Ultrasonics symposium* (2002), 1, pp. 42-55.
- ²⁴ A. Renaudin, "Réalisation d'une plate-forme à ondes acoustiques de surface pour une microfluidique digitale dédiée à la biologie", Thèse de Doctorat de l'Université de Lille1 (2006).
- ²⁵ N.M. Green, "Thermodynamics of the binding of biotin and some analogues by avidin", *Biochem. J.* (1966), 101, 3, pp.774-780.
- ²⁶ J. Mooney, A. Hunt, J. Mcintosh, C. Liberko, D. Walba, C. Rogers, "Patterning of functional antibodies and other proteins by photolithography of silane monolayers", *PNAS* (1996), 93, pp. 12287-12291.
- ²⁷ R.D. Deegan, O. Bakajin, T. Dupont., F. Huber, S. Nagel, T. Wittel, "Capillary flow as the cause of ring stains from dried liquid drops" , *Nature* (1997), 389, pp. 827-829.
- ²⁸ T. Heim, S. Preuss, B. Gerstmayer, A. Bosio, R. Blossey, "Deposition from a drop: morphologies of unspecifically bound DNA", *Journal of Physics: Condensed Matter* (2005), 17, 9, pp. 703-716.
- ²⁹ R. Blossey, "Self-cleaning surfaces - virtual realities", *Nature Materials* (2003), 2, pp. 301-306.
- ³⁰ E. Galopin, A. Renaudin, J-C Camart, V. Thomy, C. Druon and P. Tabourier, "Enhanced protein capture by ultrafast SAW droplet μ mixing", *Proc. of μ TAS'06*, Tokyo, Japan, pp. 651-653 (2006)
- ³¹ C.D. Meinhart, S. Wereley, J. Santiago, "PIV measurements of a microchannel flow", *Experiments in Fluids* (1999), 27, 5, pp. 414-419.
- ³² C.J. Strobl, A. Rathgeber, A. Wixforth, C. Gauer, J. Scriba, "Planar microfluidic processors", *IEEE Ultrasonics Symposium* (2002), 1, pp. 255-258.
- ³³ M. Sigurdson, D. Wang, C.D. Meinhart, "Electrothermal stirring for heterogeneous immunoassays", *Lab Chip* (2005) 5, pp. 1366-1373.
- ³⁴ P. Sheehan, L. Whitman, "Detection Limits for Nanoscale Biosensors", *Nano letters* (2005), 4, pp. 803-807.
- ³⁵ S. Sankaranarayanan, S. Cular, V. Bhethanabotla, B. Joseph, "Finite Element Modeling of Acoustic Streaming in Surface Acoustic Wave (SAW) Devices", *AICHE Ann. Meet.* (2006), USA, p. 686b.
- ³⁶ O. Ducloux, E. Galopin, J-C. Camart, V. Thomy, F. Zoueshtiagh, "Surface acoustic wave microstreaming to enhance biosensing in a droplet based microTAS plateforme", *Proc. μ TAS'07*, Paris, France (2007), pp. 294-296.

Chapitre 3

SPR et SAW : performances d'un système de plasmon de surface en goutte et microfluidique associée

1. Introduction

Nous avons vu dans le chapitre 2 différents moyens de caractériser le micromélange par ondes acoustiques de surface. Ils ont apporté des informations précieuses sur les temps caractéristiques de mélange et sur les champs de vitesses dans la goutte, et ont permis d'évaluer ses effets bénéfiques sur l'augmentation de l'interaction liquide/surface. Cependant, ces méthodes ont nécessité l'utilisation de traceurs (optiques, fluorescents, particules...) et ne permettent pas de remonter en temps réel aux effets du micromélange en goutte sur une interaction à la surface. Dans la volonté de mieux caractériser ce phénomène, nous nous sommes tournés vers la résonance de plasmon de surface (SPR), pour ses nombreux avantages (caractérisation surfacique, sans marquage, temps réel, sensible, reproductible...).

Dans cette optique, nous avons mis en place, en collaboration avec M. Beaugeois, M. Bouazaoui et B. Pinchemel du laboratoire PhLAM (Laboratoire de Physique des Lasers, Atomes et Molécules), un système original de SPR en goutte permettant un couplage avec une microfluidique digitale par ondes acoustiques de surface. Nous allons voir dans ce chapitre que ce concept s'est révélé plus qu'un simple moyen de caractérisation et offre de nouvelles perspectives pour l'analyse des cinétiques et pour le dosage d'éléments biologiques. Nous avons baptisé cette technique DSPR (Droplet based Surface Plasmon Resonance). La collaboration IEMN-PhLAM s'est, de plus, élargie à la Plateforme d'Interactions Moléculaires et de Nanotechnologie (IFR114) basée au Centre Hospitalier Régional de Lille (CHR). L'expertise de celle-ci en analyses SPR et en biopuces nous a permis de réaliser un travail conjoint d'optimisation des conditions d'expérimentation et de comparaison à un système commercial de SPR en flux.

Dans ce chapitre, nous allons voir dans un premier temps le principe physique de la détection par SPR. Celle-ci permet de suivre la variation de l'indice du milieu environnant la surface sensible, engendrée par la fixation d'un ligand sur son récepteur. Ensuite, nous présentons le banc expérimental mis en place dans le cadre de ce travail de thèse, en particulier les diverses optimisations liées à la détection en goutte, ainsi que le couplage entre la technique SPR et les ondes acoustiques de surface. Dans une dernière partie, ce système est confronté à un système commercial de référence de la société Biacore.

2. Suivi d'interactions par plasmon de surface

Lors du suivi d'interactions biologiques, l'absence de marquage permet, en plus de simplifier le processus de détection, de s'affranchir des complications dues à l'encombrement stérique des marqueurs, au blocage des épitopes actifs par le marqueur... Parmi les méthodes de détection en temps réel des interactions biologiques sans marqueur (microbalance à quartz, micro-calorimétrie, électrochimie,...) les méthodes optiques présentent un grand intérêt : la mesure est réalisée sans contact avec le matériau biologique. En particulier, les techniques SPR présentent de nombreuses possibilités (chap.1 §3.2.4). Elles permettent d'analyser en temps réel de nombreuses interactions (cinétique, dosage...).

2.1. Principe physique

Le plasmon de surface désigne une oscillation collective des électrons de conduction à l'interface diélectrique/métal. Il s'agit d'une onde électromagnétique évanescente, qui se propage le long de l'interface. Il est excité dans des conditions particulières par un faisceau de lumière monochromatique incident. En effet, sous certaines conditions (solutions particulières des équations de Maxwell), en particulier de longueur d'onde, l'énergie des photons est transférée au gaz d'électrons appelé 'plasmon' à la surface du métal. Nous allons voir plus précisément dans cette partie comment le plasmon de surface est généré, et quelles sont ses propriétés.

2.1.1. La réflexion interne totale et l'onde évanescente

En optique géométrique, lorsqu'un rayon incident arrive sur une interface entre deux milieux d'indices optiques différents, une réflexion et une réfraction existent. Le phénomène est décrit par la loi de Snell-Descartes décrivant la réfraction entre deux milieux d'indice n_1 et n_2 . Dans le cas où $n_1 > n_2$, il existe un angle critique θ_c à partir duquel la réfraction disparaît :

$$\sin(\theta_1) = \frac{n_2}{n_1} \quad \Rightarrow \quad \theta_c = \arcsin\left(\frac{n_2}{n_1}\right) \quad (45)$$

Une onde plane incidente sur cette interface depuis le milieu le plus réfringent (n_1 avec $n_1 > n_2$), sera totalement réfléchi au-delà de θ_c . Il subsiste alors une onde évanescente dans le milieu 2 à proximité immédiate de l'interface, parallèlement à la surface (Figure 46). L'amplitude de cette onde évanescente décroît exponentiellement en fonction de la distance à l'interface, et elle est indépendante du temps. Elle disparaît à une profondeur de :

$$l = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{(n \sin \theta)^2 - 1}}, \theta > \theta_c \quad (46)$$

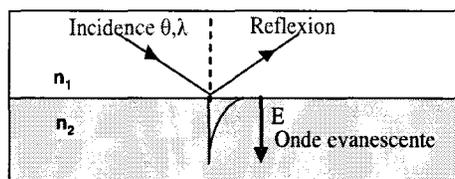


Figure 46: Réflexion totale atténuée avec onde évanescente créée à l'interface entre un diélectrique (n_2) et un prisme (n_1) par un faisceau incident de longueur d'onde λ .

Ce paramètre est important car il conditionne la profondeur de champ sensible de l'onde évanescente. On considère en général en première approximation que la profondeur de champ λ est équivalente à $\lambda/2$.

Nous examinons dans le paragraphe suivant les propriétés de cette onde évanescente à une interface métal noble/diélectrique.

2.1.2. Le plasmon de surface à l'interface métal noble/ diélectrique

La première observation d'un plasmon de surface a été réalisée en 1902 par R.W. Wood sous la forme de bandes sombres dans un spectre de diffraction¹. Le phénomène n'est expliqué qu'en 1941 par Fano². Puis, en 1968, Otto³ et parallèlement Kretschmann et Raether⁴ montrent que ces ondes de surface peuvent être excitées par deux configurations de la réflexion totale atténuée à une interface diélectrique/métal à travers un prisme (Figure 47).

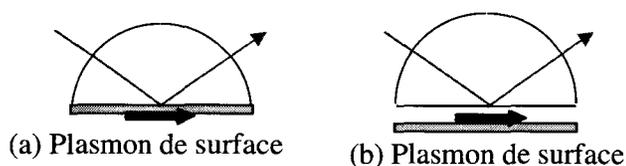


Figure 47 Configuration de Kretschmann (a) d'Otto (b) pour l'excitation de plasmon de surface d'un métal par la méthode de réflexion totale atténuée, à travers un prisme.

Depuis, l'intérêt pour le plasmon de surface n'a cessé d'augmenter, en particulier pour la caractérisation de films minces et pour l'étude de processus aux interfaces métalliques. Les premiers suivis d'interactions biomoléculaires (§2.2) sont réalisés en 1983 par Nylander et Liedberg⁵ à partir de la configuration de Kretschmann.

La surface de réflexion du prisme est recouverte d'un film de métal noble de 50nm environ. Le plasmon de surface à l'interface air/métal est excité par une onde électromagnétique polarisée TM dans le plan d'incidence sous un angle θ_{SP} via un prisme. Ce couplage résonant permet une

exaltation du champ électrique à l'interface : il peut être multiplié par un facteur 10 à 100 suivant le métal (Au, Ag, Al,...)⁶. Cette excitation résonante du plasmon transfère l'énergie au métal, ce qui se traduit par une chute de l'intensité réfléchi à l'angle de résonance θ_{SP} . Ceci est visible sous la forme d'une raie sombre dans le faisceau réfléchi.

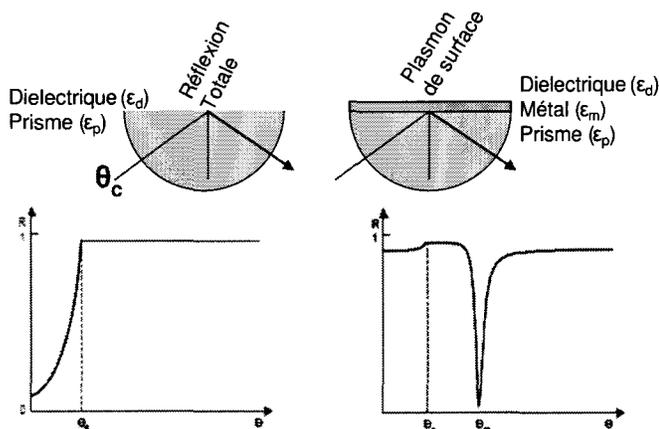


Figure 48 Réflexion totale d'une onde plane (λ) à l'interface entre (Gauche) un prisme d'indice ϵ_p et un diélectrique d'indice ϵ_d ($\epsilon_d < \epsilon_p$). Il y a réflexion totale au-delà de θ_c (Droite) un prisme d'indice ϵ_p recouvert de métal et un diélectrique d'indice ϵ_d avec $\epsilon_d < \epsilon_p$. On observe une chute de réflectivité à l'angle de résonance θ_r .

Cette chute de l'énergie réfléchi (Figure 48) peut être exprimée par l'intermédiaire de la réflectivité R , qui est le rapport entre l'intensité réfléchi et l'intensité incidente⁸.

2.1.3. Les conditions d'excitation

La condition de couplage pour exciter ce plasmon de surface est l'accord de phase entre les vecteurs d'onde de la lumière incidente et du plasmon de surface. Le vecteur d'onde du mode plasmon k_{SP} correspondant à la résonance est déterminé à partir des équations de Maxwell dans un milieu homogène, isotrope et à partir des relations de passage entre interfaces^{7, 8, 9} :

$$k_{SP}(\omega) = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} = \frac{\omega}{c} n_{SP}(\omega), \quad (47)$$

avec ϵ_m et ϵ_d respectivement les constantes diélectriques du métal (dépendant de la longueur d'onde) et du diélectrique, et $k_0 = \omega/c$ le vecteur d'onde de la lumière dans l'air, $n_{SP}(\omega)$ l'indice effectif du mode plasmon. La courbe de dispersion pour l'interface métal/air est montrée Figure 49.

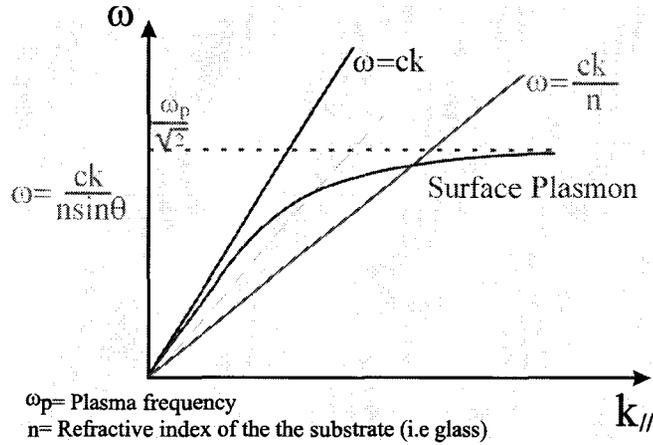


Figure 49 Courbe de dispersion d'un plasmon de surface pour un métal de pulsation ω_p , déposé sur un substrat de verre d'indice n , avec une interface avec l'air.

La composante parallèle à la surface du vecteur d'onde d'une onde EM incidente sous un angle θ_0 est de la forme $k_{//} = n_p k_0 \sin \theta_0$ avec n_p l'indice de prisme, θ l'angle d'incidence, et k_0 le vecteur d'onde de la lumière dans l'air. L'excitation du plasmon de surface n'est possible que si :

$$k_{SP}(\omega) = k_{//}(\omega) \quad (48)$$

Nous pouvons noter (Figure 49), que dans le cas d'une interface métal/air, la tangente à l'origine à la courbe de dispersion correspond à la 'courbe de la lumière' en $\omega = ck$, avec ω la pulsation et k le vecteur d'onde de la lumière incidente. On observe que la courbe de dispersion du plasmon ne coupe pas la courbe $k_{//} = \omega/c$, et qu'il ne peut y avoir couplage (excitation du plasmon) qu'avec un milieu incident d'indice supérieur à celui de l'environnement ($n_p > n_{env}$). En effet, le passage de l'onde incidente dans un milieu d'indice plus élevé ($\omega = \frac{c}{n} k$) augmente la valeur du vecteur d'onde et permet alors l'excitation du plasmon en vérifiant la condition $k_{SP} = k_{//}$.

Ainsi, lorsqu'il y a couplage, on obtient :

$$\sqrt{\frac{\epsilon_d \epsilon_m}{\epsilon_d + \epsilon_m}} = n_{SP}(\omega) = n_p \sin \theta \quad (49)$$

Cette relation montre donc que, pour un angle d'incidence θ particulier qui dépend de :

- l'indice du milieu diélectrique environnant (ϵ_d)
- la longueur d'onde (car la constante diélectrique du métal ϵ_m dépend de la pulsation),

il y a couplage avec le plasmon de surface et la lumière n'est pas réfléchi. Cette méthode permet donc de suivre l'évolution de l'indice du milieu environnant, et donc également, à une longueur d'onde fixée de suivre l'évolution d'une réaction biologique à la surface du film de métal.

2.2. SPR pour le suivi d'interactions biologiques

L'intérêt du plasmon de surface dans l'analyse d'évènements biologiques est de pouvoir sonder en temps réel les variations d'indice de réfraction du diélectrique supérieur, sur une profondeur de $\lambda/2$ soit quelques centaines de nanomètres (chap.1 §3.2.4). En effet, la fixation de molécules biologiques à la surface du capteur modifie en temps réel les propriétés d'indice du milieu diélectrique supérieur et, par là même, les propriétés de résonance du plasmon (décalage de l'angle de résonance). Un suivi d'interaction est schématisé sur la Figure 50 qui représente un cycle d'interaction entre un anticorps fixé sur le capteur SPR et un analyte situé en solution.

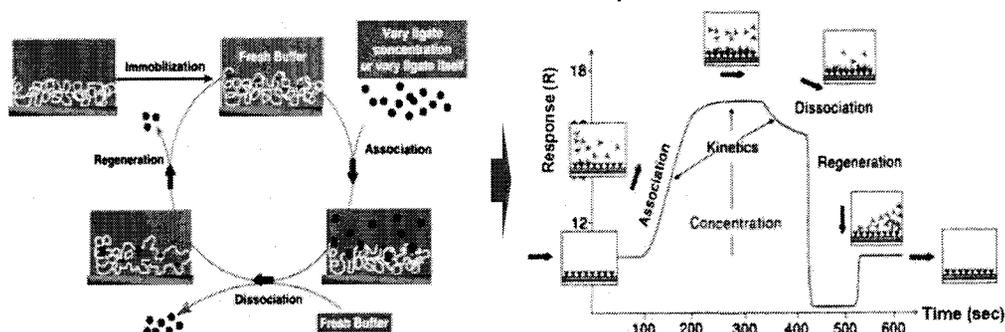


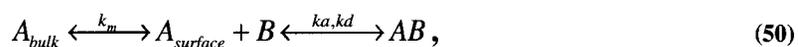
Figure 50: Exemple d'un cycle comprenant l'immobilisation du ligand, la formation du complexe ligand-analyte (association), la dissociation du complexe par passage d'un tampon, et la régénération à l'aide d'une solution acide ou basique¹⁰.

2.2.1. L'interaction Antigène-Anticorps à la surface du capteur

Dans cette partie, nous décrivons comment se réalise l'interaction à la surface du capteur, et quelles informations peuvent être tirées de la réponse SPR obtenue. Comme nous l'avons vu auparavant au chapitre 1 (§5.1.5), la formation d'un complexe à la surface d'un biodétecteur entre un analyte A et un ligand B immobilisé est décomposée en deux étapes :

- transport de masse de l'analyte jusqu'à la surface du détecteur
- orientation puis complexation 'analyte - ligand immobilisé'

Ceci peut se traduire par l'équation suivante :



avec k_m la constante liée au transport de masse [m/s] (diffusion, convection), qui est identique dans les deux sens (vers le capteur, depuis le capteur) et k_a et k_d les constantes d'association et de dissociation (chap.1 §2.3).

Par exemple dans un dispositif commercial en flux de type Biacore (Chap.1 §3.2.4), il est connu que la constante de transport de masse k_m peut être approximée¹¹ :

$$k_m \approx 1,2823 \sqrt{\frac{D^2 \cdot v_{\max}}{hl}} \text{ avec } v_{\max} = \frac{3 \phi}{2 hw}, \quad (51)$$

où D est la constante de diffusion de l'analyte, v_{\max} la vitesse maximum de l'écoulement (située au centre du canal pour un écoulement laminaire), ϕ le débit volumique dans la chambre, h , w et l respectivement la hauteur, la largeur et la longueur du canal microfluidique.

Une difficulté de transport de masse peut se manifester sous la forme d'un transfert des analytes de ligand en ligand à la surface du capteur. Ce phénomène bien connu des biologistes est baptisé 'transfert de masse'. Il s'agit d'une recapture par un autre ligand d'une molécule venant de se libérer de son complexe, faussant ainsi la cinétique. Il a été reconnu que cet effet n'est observé que dans le cas d'un faible transport de masse¹². L'équation de formation du complexe à la surface peut ainsi s'écrire :

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_f [A_{\text{bulk}}][B] - k_r [AB], \quad (52)$$

avec k_f et k_r les constantes effectives de dissociation et d'association exprimées¹³ :

$$k_f = \frac{k_a k_m}{k_a [B] + k_m} \text{ et } k_r = \frac{k_d k_m}{k_a [B] + k_m} \quad (53)$$

La différence entre k_d et k_r (et de même entre k_a et k_f) est due aux effets de transfert de masse, et est matérialisée par la recapture, due à la diffusion, d'analytes ayant déjà réagi¹⁴. Si le transport de masse (diffusion, convection, flux...) est beaucoup plus rapide que la vitesse d'association $k_a[B] \ll k_m$, on n'observe pas ce phénomène, et alors :

$$k_f = \frac{k_a}{\frac{k_a}{k_m} [B] + 1} \approx k_a \text{ et } k_r = \frac{k_d}{\frac{k_a}{k_m} [B] + 1} \approx k_d \quad (54)$$

Ce qui revient à dire que l'espèce à la surface est maintenue à la même concentration que dans la masse ($[A_{\text{surface}}] = [A_{\text{bulk}}]$), grâce à un transport de masse efficace. Les constantes d'association et de dissociation effectives k_f et k_r se rapprochent alors des constantes d'interaction cinétiques k_a et k_d . Dans ce cas, on peut écrire l'équation de la vitesse :

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a [A][B] - k_d [AB] \quad (55)$$

Or sachant que la concentration en ligands B inoccupés [B] équivaut à la concentration totale à la surface $[B]_0$ moins la concentration en complexe [AB] : $[B] = [B]_0 - [AB]$, on obtient :

$$\frac{d[AB]}{dt} = k_a[A]([B]_0 - [AB]) - k_d[AB] \quad (56)$$

Etant donné qu'on ne peut pas fixer plus de molécules qu'il n'y a de ligand à la surface on peut considérer $[B]_0$ comme la concentration maximum de fixation de l'espèce. On peut remplacer tous les termes par un terme R représentant le taux d'interaction à la surface :

$$\frac{dR}{dt} = k_a C(R_{\max} - R) - k_d R, \quad (57)$$

avec C la concentration en espèce en solution, R_{\max} la capacité maximum de fixation, et R le taux de fixation à l'instant t. L'interaction à la surface peut alors être représentée (Figure 51) :

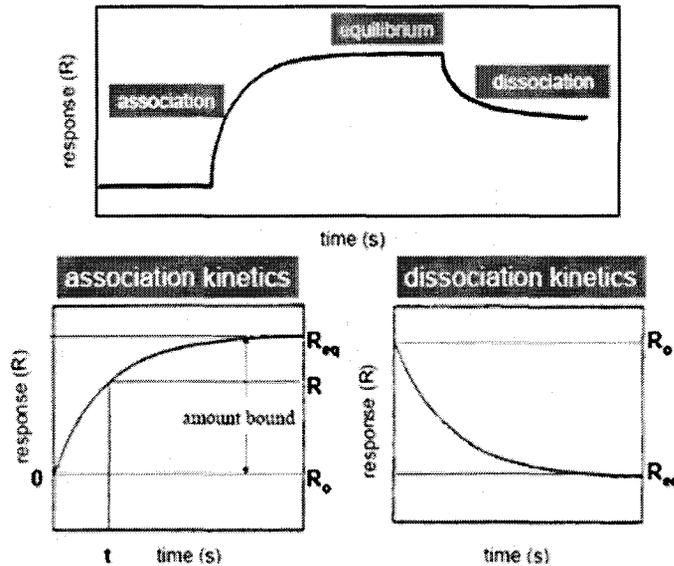


Figure 51 : Exemple d'une cinétique classique : association, dissociation, équilibre.

2.2.2. Dosage et analyse des cinétiques

Un certain nombre d'informations sur l'interaction sont déterminées à partir des courbes de réponse du capteur. D'une part, ces courbes permettent de faire un dosage de l'espèce étudiée : la saturation de la courbe de réponse indique la réponse à l'équilibre et donc la concentration en espèce (Figure 52).

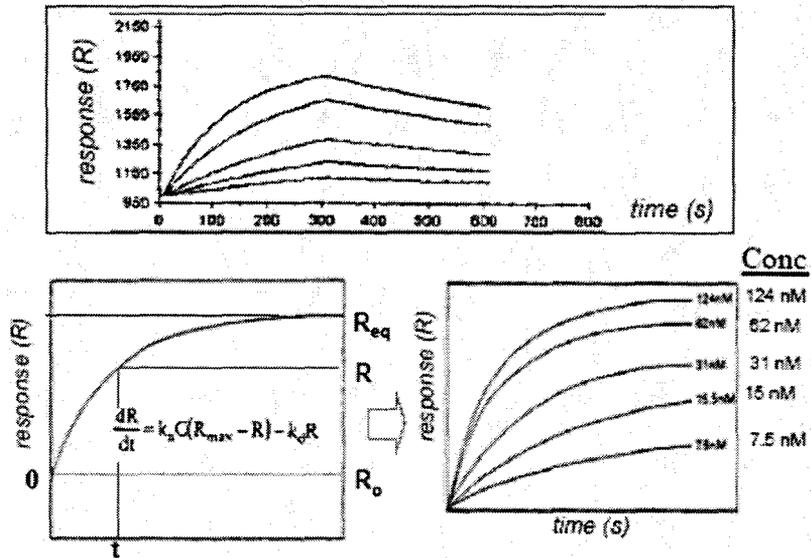


Figure 52: Exemple d'effet de la concentration sur les courbes de réponse SPR. La détermination de R_{eq} permet le dosage.

D'autre part, on recueille des informations cinétiques telles que les constantes d'association et de dissociation. Ceci est important car deux molécules possédant la même constante à l'équilibre, et présentant donc le même signal par test ELISA, peuvent avoir des constantes d'association et de dissociation très différentes. Pour déterminer ces cinétiques, on peut réécrire la relation :

$$\frac{dR}{dt} = k_a C (R_{max} - R) - k_d R = k_a C R_{max} - (k_a C + k_d) R \quad (58)$$

La courbe $\frac{dR}{dt}$ en fonction de R aura donc une pente égale à $(k_a C + k_d)$, comme le montre la Figure 53(a). Si maintenant, on trace S en fonction de la concentration C pour différentes solutions de concentrations connues (Figure 53(b)), il est possible de déterminer les constantes d'association (k_a) et de dissociation (k_d).

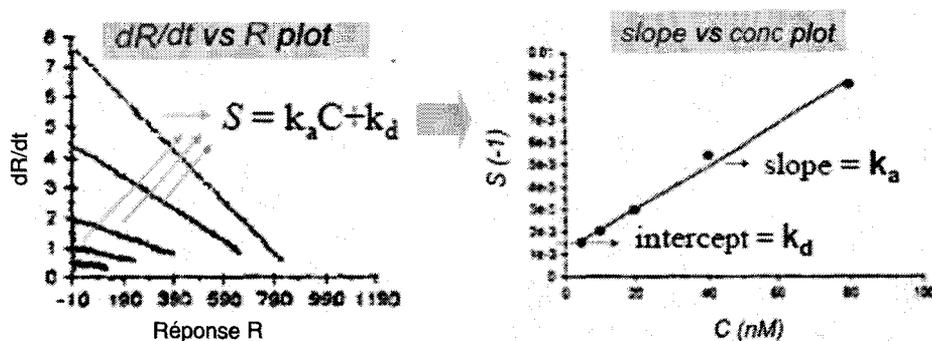


Figure 53: (a) Tracés de dR/dt pour déterminer la pente S (b) tracé de la pente S en fonction de la concentration C pour permettre l'évaluation des paramètres cinétiques k_a et k_d .

Nous avons simplifié volontairement le modèle en considérant que le transport de masse n'influencerait pas la cinétique (hypothèse $k_a[B] \ll k_m$), ceci afin d'expliciter les mécanismes d'analyse des données recueillies. La prise en compte du transport de masse dans ces analyses de cinétiques est plus complexe et demande l'intervention de modèles mathématiques élaborés associés à une résolution numérique, souvent par éléments finis¹⁵. Le travail en goutte, et d'autant plus s'il est associé à un micromélange, peut simplifier l'analyse de ces données en modifiant les conditions expérimentales.

Le paragraphe suivant expose donc les grandes lignes de la technique de plasmon de surface en goutte proposée, ainsi que son couplage avec un élément d'actionnement microfluidique digital par ondes acoustiques de surface.

2.3. SPR en goutte : Droplet based SPR (DSPR)

2.3.1. Equilibre et dosage en goutte

Nous avons vu que la saturation de la courbe cinétique de réponse permettait de déterminer la réponse à l'équilibre et ainsi de remonter à la concentration en espèce (§2.2.2). Lorsqu'on réalise un dosage dans des canaux microfluidiques, comme dans beaucoup de systèmes SPR commerciaux, le flux d'analytes arrivant sur la surface active a une concentration constante dans le temps. La concentration d'analytes arrivant ne tient donc pas compte de la quantité ayant réagi à la surface du capteur. La durée de vie de la liaison, et donc les constantes cinétiques (comme la constante à l'équilibre), pourront être modifiées par rapport au cas où seules les fluctuations browniennes conduisent à la dissociation. Dans cette optique, le dosage au sein d'une goutte bénéficierait d'une meilleure image de l'équilibre qu'un système en flux.

2.3.2. Couplage DSPR/micromélange SAW : solution au transport de masse

Au chapitre 2 (§3.3), nous avons vu que l'application d'un mélange permettait d'améliorer le transport de masse, et ainsi de s'affranchir des traitements de données complexes, utilisés pour résoudre la prise en compte de ce phénomène dans l'analyse des cinétiques.

Même si la technique SPR est largement étudiée en tant que technique de caractérisation des interactions biologiques à la surface et comme système de détection, de nombreuses études sont encore en cours quant à l'amélioration de ses performances (et plus particulièrement la sensibilité) par association avec d'autres techniques (fluorescence¹⁶, électrochimie^{17,18}, microbalance à quartz¹⁹). Dans cette optique, nous proposons un système de détection SPR en goutte couplé à une microfluidique digitale par ondes acoustiques de surface. Une hausse de sensibilité et une

diminution de temps de détection sont, entre autres, attendues grâce aux avantages apportés par le microbrassage SAW exposé au chapitre 2.

La plupart des systèmes de plasmon de surface commerciaux utilisent des chambres microfluidiques comportant des canaux, c'est-à-dire que les interactions sont réalisées au sein de flux continus. Les dimensions typiques de ces cellules sont : longueur et largeur dans la gamme $10^{-0} - 10^{-2}$ cm, et hauteur dans la gamme $10^{-2} - 10^{-3}$ cm. Le nombre de Reynolds pour ces dimensions typiques (Chap.1 §5.1.3) n'excède pas quelques centaines. Or, nous avons vu que l'écoulement est normalement laminaire en dessous de $Re=2100^{20}$. Le profil dans les canaux microfluidiques des dimensions précitées est donc laminaire et le profil de vitesses parabolique (chap.1 §5.1.3). Nous avons vu au chapitre 1 (§5.1.5) que cela provoquait des problèmes de transport de masse pour certaines molécules. Ceci est vérifié en estimant la grandeur du transport de masse (à travers l'expression de k_m) pour différentes géométries de cellules microfluidiques typiques.

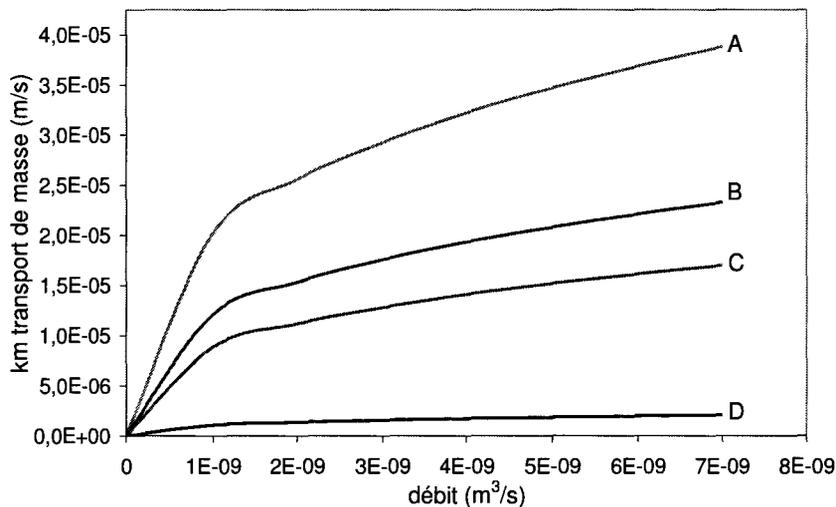


Figure 54 Relation entre le débit de la chambre microfluidique et le coefficient de transport de masse pour des géométries de canaux ($h*1*w$ en mm): A (0,03*3,5*0,3), B (0,05*3,5*0,5), C (0,05*6*0,75), D (0,7*15*1,5) (ordre croissant de dimensions) avec $D=5.10^{-5}$ mm²/s.

D'après la Figure 54, le transport de masse dépend fortement de la géométrie de la cellule, ce qui influence l'amplitude maximale du signal observable. Les petites géométries de cellules microfluidiques (géométrie A) donnent un transport de masse élevé. Dans ce cas, réduire la hauteur du canal est très efficace pour accroître l'efficacité du transport de masse. Cependant, réduire la dimension des canaux engendre des pressions élevées et des pertes de charges dans les canaux. On se limite donc en général à des canaux d'environ 50µm de haut. Devoir tenir compte du transport de masse dans les analyses de cinétiques est alors courant dans ces conditions.

La résolution du modèle complet d'une cinétique influencée par le transport de masse n'est pas possible en routine car trop complexe et trop longue (résolution numérique, éléments finis¹⁵). Une stratégie pour contourner ce verrou est d'utiliser des modèles simplifiés (eg. 'two compartment model'²¹). Toutefois, Edwards, en répertoriant différents modèles d'analyses en 2004²², insiste sur le fait que ces modèles ne sont valides qu'à faibles nombres de Damköhler.

Le premier avantage du système DSPR couplé à une excitation microfluidique (de type micromélange SAW, Chap. 2) que nous proposons a été exposé au paragraphe 2.3.1. Son deuxième avantage est d'améliorer le transport de masse grâce à une meilleure interaction liquide/surface, et ce, même pour des interactions à grand nombre de Damköhler. On pourrait ainsi s'affranchir des traitements de données complexes des cinétiques.

3. Mise en place : optimisation des paramètres

Nous avons abordé les avantages attendus d'un couplage SPR et microfluidique discrète, autant du point de vue du dosage que du point de vue de l'analyse de cinétique. Nous allons maintenant nous pencher sur la mise en place d'un tel système. Afin d'obtenir les meilleures conditions pour le suivi d'interactions, de nombreux facteurs sont à considérer (choix du métal, épaisseur, longueur d'onde, plage angulaire...). En effet, ces paramètres vont influencer sur la sensibilité en modifiant par exemple la largeur des pics de résonance, ou encore la valeur du décalage de résonance à un changement d'indice. Les performances en fonction de ces différents paramètres sont évaluées en traçant les courbes de réflectivité à l'aide du logiciel Winspall2.0 mis au point par Jurgen Worm (Max Planck Institut). La littérature nous a conduits à investiguer plusieurs pistes et à étudier différentes configurations que nous exposons dans ce paragraphe.

3.1. L'indice du prisme

L'indice du prisme est un paramètre important car d'après la relation $n_{sp}(\omega) = n_p \sin \theta$, pour un ensemble diélectrique métal déterminé, la variation de l'indice du prisme modifie la valeur de l'angle de résonance. Un prisme d'indice $n=1,52$ donne un plasmon de l'eau très proche de 90° , ce qui correspond à une incidence rasante et rend son utilisation délicate. Notre choix s'est donc porté le plus souvent vers l'utilisation d'un prisme d'indice plus élevé $n=1,64$.

3.2. La longueur d'onde

Les appareils commerciaux travaillent en majorité avec une excitation par diode laser à environ 690nm. L'utilisation d'un laser He-Ne est également une solution répandue.

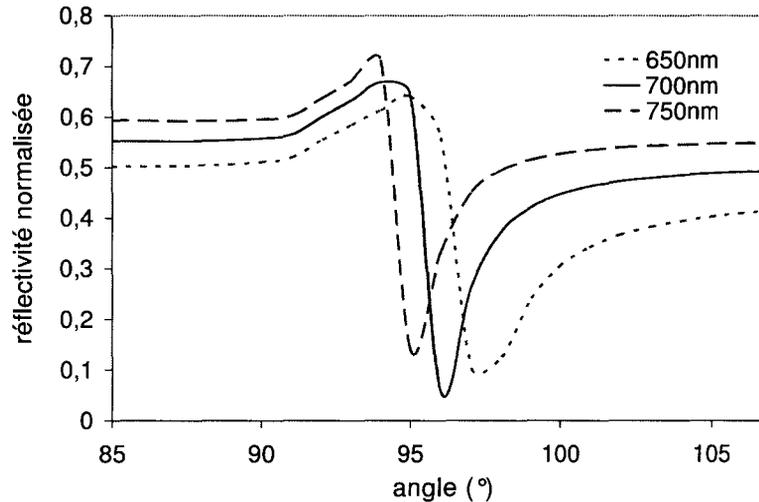


Figure 55 Evolution de la courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence pour des longueurs d'onde d'excitation de 600, 650 et 700nm.

La Figure 55 montre l'évolution de la résonance plasmon à différentes longueurs d'onde pour une épaisseur de métal de 50nm. Lorsque la longueur d'onde augmente, la largeur à mi-hauteur du pic de réflectivité diminue, permettant ainsi de gagner en résolution et en précision (évolution d'un pic fin et profond). Augmenter de 100nm la longueur d'onde en passant de 650nm à 750nm diminue d'un facteur 2 la largeur de pic. L'opportunité d'utiliser un laser à colorants, accordable en longueur d'onde et permettant de travailler dans la gamme de longueurs d'onde 620-750nm, nous autorise à ajuster ce paramètre.

3.3. Le métal

3.3.1. Le choix du métal

Il existe plusieurs métaux dont les électrons de la bande de conduction présentent la possibilité de se coupler avec l'onde incidente pour créer un plasmon : l'or, l'argent, le cuivre, l'aluminium, le sodium et l'indium. L'indium est souvent rejeté à cause de son coût, le sodium à cause de sa forte réactivité. Le cuivre et l'aluminium présentent des résonances très larges. Les films d'or présentent plusieurs avantages tels qu'une bonne stabilité chimique (très faible oxydation), une chimie de surface bien maîtrisée et un grand déplacement de l'angle de résonance associé aux changements d'indice du milieu. Ces différentes caractéristiques lui valent d'être utilisé dans la plupart des appareils commerciaux. De nombreux travaux^{23,24} sont basés sur l'utilisation de l'argent car son pic de résonance est nettement plus fin que celui de l'or (Figure 56), ce qui implique un très bon rapport signal sur bruit dans la détection.

Cependant l'argent s'oxyde rapidement et ses propriétés évoluent alors dans le temps. De plus, si la résonance de l'argent est plus fine que l'or, son décalage à un changement d'indice donné est plus faible que celui de l'or. L'or semble donc être, dans un premier temps un bon candidat pour notre système.

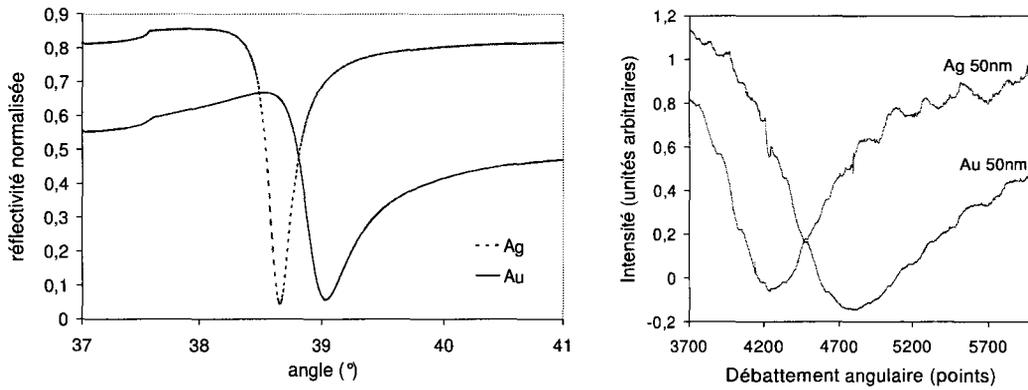


Figure 56 Courbe de réflectivité en fonction de l'angle d'incidence pour un film d'Au et d'Ag de 50nm à 720nm (gauche) théorique à l'interface prisme/métal/air (droite) expérimentale à l'interface prisme/métal/EDI.

Nous pouvons dégager une valeur théorique de l'angle de résonance pour l'interface air/or en se basant sur les relations définies au paragraphe 2.1.3. Sachant que l'indice de l'or est $n_{or}=0,1726 + i3,4218$ pour une longueur d'onde de 632,8nm, l'indice du mode effectif plasmon à l'interface air/or se définit ainsi :

$$n_{SP} = \sqrt{\frac{\epsilon_{or}(\omega) \cdot \epsilon_{air}}{\epsilon_{or}(\omega) + \epsilon_{air}}} = 1,045 \quad (59)$$

En appliquant la condition de couplage $n_{sp}(\omega) = n_p \sin \theta$, nous obtenons l'angle théorique de $\theta=398^\circ$ en accord avec la valeur expérimentale : une raie sombre est observée à cet angle (Figure 57).

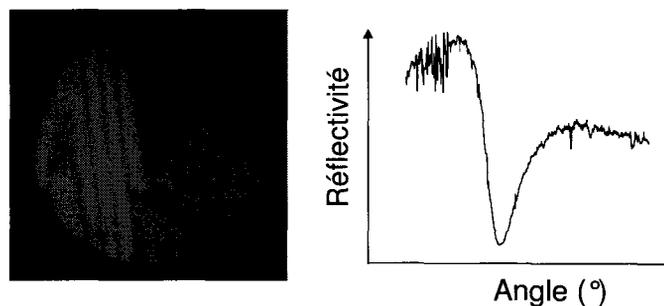


Figure 57 (Gauche) Photographie de la raie sombre caractérisant l'angle de résonance pour l'interface air/or et (Droite) mesure d'intensité à l'aide du capteur CCD.

3.3.2. L'épaisseur de métal

Pour des paramètres λ , ϵ_m et ϵ_d fixés, il existe une épaisseur d du film métallique qui optimise la résonance. Des études ont montré que cette résonance optimale, pour une longueur d'onde avoisinant les 600-700nm, est obtenue pour une épaisseur d d'environ 50nm²⁵. La Figure 58 illustre les résonances plasmon à 670nm dans l'air pour différentes épaisseurs de métal.

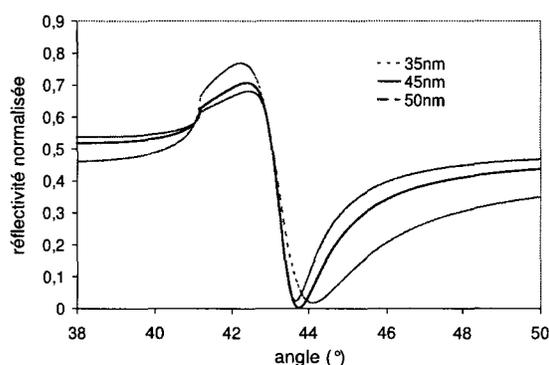


Figure 58 Réflectivité à l'interface or/air en fonction de l'angle d'incidence pour différentes épaisseurs d'or à 670nm, prisme $n=1,52$.

On remarque en réalisant la simulation à plusieurs longueurs d'ondes que l'épaisseur optimum d'or y est différente: par exemple, à 670nm, avec un prisme $n=1,52$, on préférera une épaisseur de 50nm, alors qu'à 720nm, avec un prisme $n=1,64$, on privilégiera un dépôt de 35nm. Différentes valeurs des paramètres cités (longueur d'onde, indice de prisme...) ont été utilisées dans le cadre des manipulations. L'épaisseur de métal a donc été adaptée en fonction des évolutions du banc.

3.4. Les surfaces SPR et SiO_x

Nous avons également réalisé des surfaces SPR présentant une couche de SiO_x de 10nm déposée en PECVD (Plasma Lab 800Plus, Oxford Instrument) sur l'empilement verre/Ti/Au. Ces surfaces sont brevetées par R. Boukherroub et S. Szunerits pour des applications de SPR couplées à l'électrochimie²⁶. Le procédé de dépôt de SiO_x par PECVD est indiqué ci-dessous.

Tableau 4 : procédé de dépôt de 10nm de SiO_x sur Au par PECVD

Dégraissage de l'échantillon : acétone/isopropanol -US - T _{amb}
Rinçage abondant à l'EDI puis séchage azote
Préchauffage de l'échantillon dans la chambre de plasma : 300°C - 0,005Torr - 1h
Dépôt du SiO _x :
300° - SiH ₄ 3% dans N ₂ 260sccm + N ₂ O 700sccm – 1Torr – 10W – 13,56MHz
Vitesse de dépôt : 414Å/min - Indice du SiO ₂ : $n=1,48$

Nous testons également dans cette même optique des surfaces de Ag/Si₃N₄ (argent/nitride de silicium), afin de bénéficier de l'étroitesse du pic de l'argent, tout en évitant les problèmes liés à l'oxydation, et en bénéficiant des facilités de fonctionnalisation du Si₃N₄ (présence de groupements amines naturels sur le nitride de silicium réalisé en PECVD). Le dépôt de Si₃N₄ est réalisé directement après le dépôt par pulvérisation d'une couche d'argent de 50nm. La simulation réalisée (Figure 59) en tenant compte de cet empilement a montré un pic plasmon vers 40°.

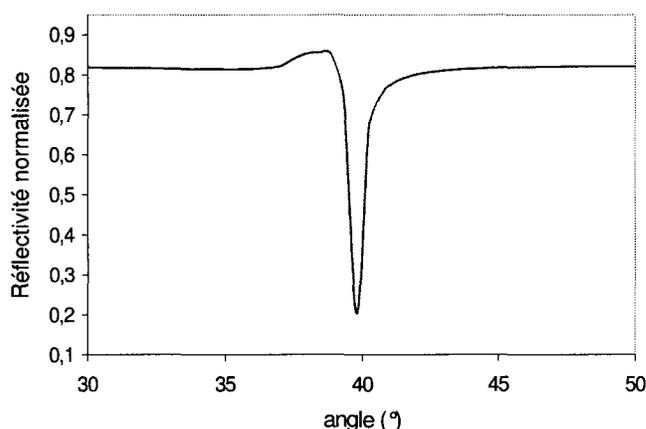


Figure 59 Réflectivité théorique de l'empilement prisme (n=1,64)/argent/Si₃N₄ (n=2,05) à λ=670nm.

Des tests de stabilité de ces surfaces devraient bientôt confirmer leur utilisation pour le suivi d'interactions biologiques par SPR. Toutefois, les différents résultats que nous présentons dans ce manuscrit ont été réalisés sur or, pour permettre une comparaison avec un système SPR commercial classique.

4. Montages

Après avoir participé à la mise en place d'un banc plasmon de surface avec M. Beaugeois, M. Bouzaoui (équipe Photonique du PhLAM) et B. Pinchemel (équipe Spectroscopie Moléculaire du PhLAM), nous avons adapté le banc et opéré de nombreuses améliorations en vue de réaliser un suivi d'interactions en goutte associé à des outils microfluidiques. Ce travail a été réalisé dans le cadre de cette thèse ainsi que de celle de Maxime Beaugeois²⁷. Le paragraphe suivant expose les différents éléments composant ce système.

4.1. Banc expérimental

Le banc expérimental DSPR que nous avons mis en place au PhLAM est repris schématiquement sur la Figure 60.

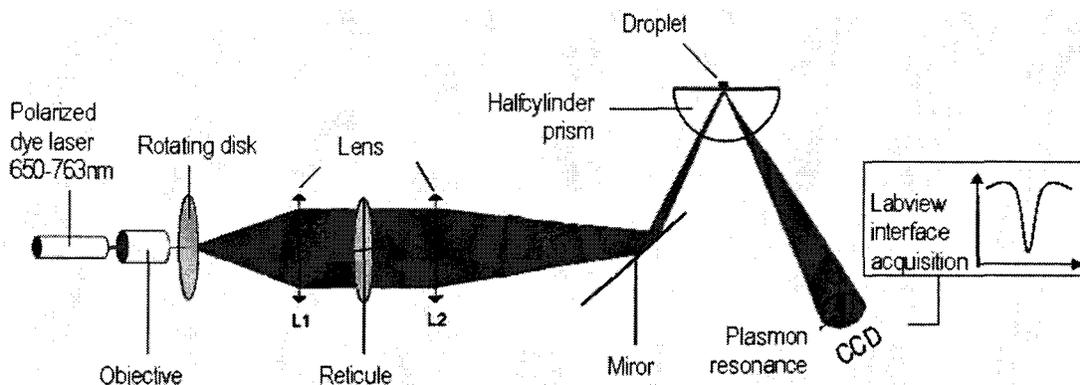


Figure 60 Banc expérimental de résonance de plasmon de surface en goutte (DSPR).

Le banc comprend un laser à colorants polarisé TM permettant de couvrir la gamme 620-750nm (la largeur de raie est de 0,1nm). La puissance lumineuse (typiquement 200 mW) permet une amélioration du contraste. Un objectif, associé à un disque tournant diffusant pour obtenir une tache sans speckle, permet d'élargir le faisceau. Une première lentille permet d'obtenir un faisceau parallèle. Une deuxième lentille placée en amont du prisme fait converger le faisceau incident au niveau de l'interface prisme/métal, ce qui génère plusieurs orientations de faisceaux (et donc plusieurs angles), sur une plage de 10° autour de l'angle moyen. L'orientation horizontale du prisme adaptée au banc microfluidique est conservée grâce à un jeu de miroirs.

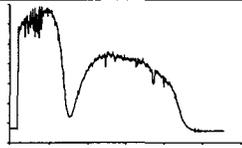
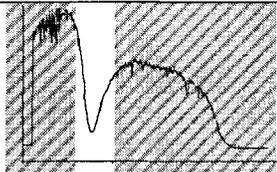
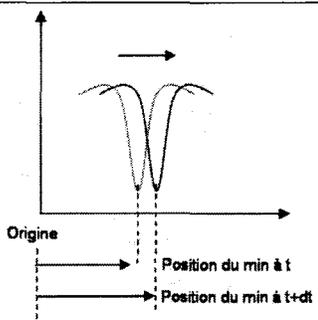
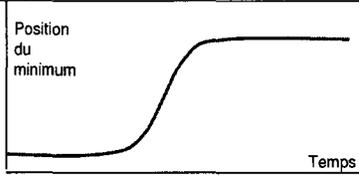
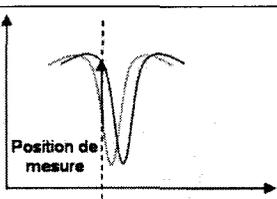
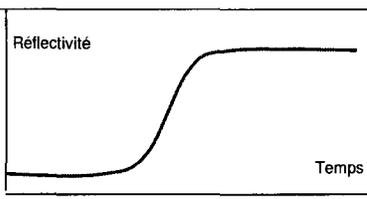
Un prisme hémicylindrique d'indice n (1,52 ou 1,64) tronqué est complété par une lame métallisée. Ces deux éléments sont couplés au moyen d'un liquide d'indice adapté. Le faisceau incident converge au centre de ce système 'prisme+lame'. Ce système est supporté par une platine de couplage à microdéplacements en X, Y, Z, θ (variation de l'incidence du prisme). La platine rotative est commandée par ordinateur.

Un capteur CCD relié à un oscilloscope numérique fait la liaison avec l'interface Labview qui suit l'évolution du pic de résonance en fonction du temps.

4.2. Acquisition Labview

La raie sombre présente au sein de la tache lumineuse se déplace lorsque l'indice du milieu supérieur varie. Cette variation angulaire nous renseigne alors sur l'évolution d'une réaction à la surface. Le décalage de la résonance plasmon est capté par une barrette CCD puis est envoyé sur un

oscilloscope communicant avec un ordinateur équipé d'un programme Labview dédié, développé dans le cadre de ce travail. Le programme permet d'acquérir et de traiter les informations brutes : l'intensité de la réflectivité en fonction de l'angle. Son principe est détaillé ci-dessous.

<p>Résonance plasmon sous sa forme brute vue par le capteur CCD et transmise à Labview</p>	
<p>Fenêtrage effectué afin de ne conserver que le pic de résonance</p>	
<p>Deux méthodes sont utilisées pour suivre la résonance et la transposer en cinétique. On peut suivre l'évolution en fonction du temps du minimum de réflectivité ou alors celle de la réflectivité en un point donné de la pente de la résonance. Nous privilégions souvent la première méthode.</p>	
<p><u>1^{re} méthode :</u> Suivi du minimum en nombre de points par rapport à l'origine. Une régression polynomiale de degré 6 est effectuée sur le pic (diminution du niveau de bruit). L'écart type moyen est suffisamment faible pour que les minimums de la courbe 'brute' et de la courbe 'ajustée' coïncident.</p>	
<p>Courbe de la position du minimum en fonction du temps (intervalle minimum = 1s). Permet de décrire la variation de l'indice de réfraction, et donc la cinétique de la réaction.</p>	
<p><u>2^{de} méthode :</u> Suivi de la réflectivité en une position donnée (dans la pente de la résonance) en fonction du temps.</p>	
<p>La courbe exprimant la réflectivité de ce point en fonction du temps donne les mêmes informations que la méthode avec la détection du minimum.</p>	

La Figure 61 représente l'écran de pilotage du banc Labview. La fenêtre 1 décrit les données brutes mesurées par la barrette CCD. La fenêtre 2 montre le fenêtrage des données ainsi que la régression polynomiale de degré 6. Les fenêtres 3 et 4 représentent respectivement l'évolution de la position du minimum de la courbe polynomiale et de la mesure de réflectivité.

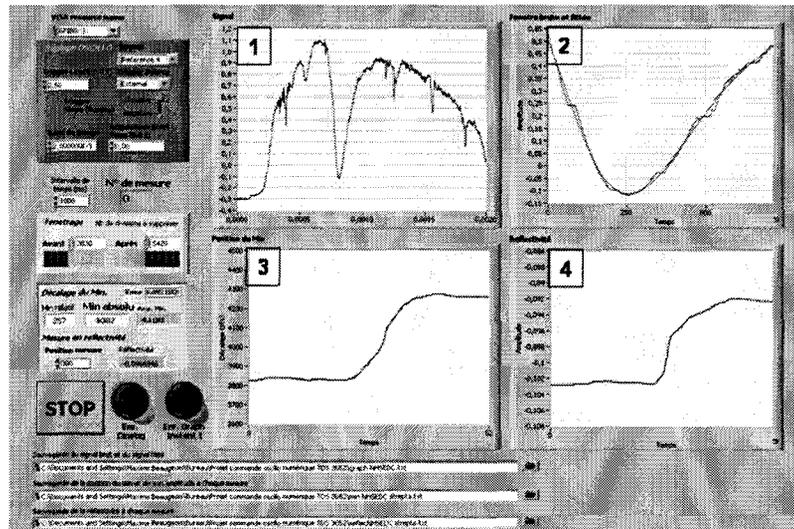


Figure 61 Fenêtre graphique de l'interface Labview permettant le traitement de l'image.

4.3. Détails expérimentaux

- *Correspondance angulaire / unité SPR*

L'unité classiquement utilisée en SPR est le RU (Reflectivity Unit), où 1000RU correspondent pour la plupart des protéines à 1ng/mm². Dans notre cas, le signal recueilli par la barrette CCD est retranscrit sur un oscilloscope de 10000 points avant d'être transmis à Labview. Pour donner un ordre de grandeur, une valeur de 100 points dans notre configuration correspondent à 0,1° et à 1000 RU. La position angulaire absolue importe peu : la cinétique se base sur une évolution relative. Les mesures sont ainsi faites en nombre de points et non en angle. La position du capteur influe sur le signal mesuré (éloignement par rapport au point de focalisation, largeur de la tache lumineuse et donc de la raie du plasmon de surface). On peut néanmoins remonter à la largeur du pic en considérant le rapport de la largeur de la raie plasmon sur la largeur de la tache, qui représente toujours le même débattement angulaire d'environ 11° (lentille de focalisation de focale 10cm et de diamètre 4cm).

- *Position du spot ou de la ligne de focalisation par rapport à la goutte*

Différents essais ont montré que la position du spot lumineux (ou de la ligne de focalisation) par rapport à la goutte influe de quelques points sur la position absolue de la raie plasmon. Afin de

limiter cette variation, il est intéressant de travailler sur un volume de goutte de quelques microlitres (2-3 μ l), ce qui coïncide avec le diamètre du spot.

- ***Etat de surface***

Le plasmon est très sensible à l'état de surface non seulement du métal mais aussi des pièces optiques (prisme et substrat supportant la couche métallique). Il est donc indispensable d'utiliser des surfaces d'une grande qualité optique mais aussi de soigner le nettoyage des surfaces optiques et métalliques. C'est là un facteur déterminant dans l'obtention de la résonance et de son allure.

- ***Épaisseur de la lame et positionnement***

Le dispositif a été réalisé afin de placer le point de focalisation au centre du prisme. Dans cette optique, le prisme a été tronqué afin que la lame métallisée complète la partie manquante pour obtenir un demi-cylindre complet et que le point de focalisation se place au niveau de l'interface substrat/métal exactement sur l'axe du demi-cylindre. Néanmoins, différents tests sur des lames d'épaisseurs différentes (de 1mm à 0.15mm) nous ont permis de constater que le réglage du point de focalisation n'est pas critique. Ceci est d'ailleurs confirmé par la littérature⁸ car cette condition influe sur la valeur absolue de l'angle, alors que nous travaillons en valeurs relatives.

- ***Echauffement dû à la chaîne de mesure SPR***

La cinétique d'une réaction étant fortement influencée par la température, il est important de conserver une bonne stabilité thermique. Les effets de la température sur la résonance de plasmon de surface seront discutés plus en détails au paragraphe 6 ; nous nous intéressons ici à la chaîne de mesure. On réalise donc une mesure de température et de puissance au niveau de la goutte. La mesure de température est effectuée à l'aide d'un thermocouple Ni-Au sur silicium. La puissance du laser est de 200mW. Du fait de l'optique utilisée, la puissance résiduelle à l'entrée du prisme est de 6mW et de 4mW en sortie de prisme. La puissance sur la surface SPR (mesure sans goutte) est de 60 μ W. Ce qui implique que 2mW sont absorbés dans la lame métallisée. Cette absorption peut provoquer un léger échauffement de la lame, mais peu d'énergie est transmise au niveau de la goutte. Cela se vérifie par une mesure de température dans la goutte : le décalage par rapport à la température ambiante est inférieur à 0.01°C, de l'ordre de l'incertitude de mesure. On considère donc que la chaîne de mesure n'influe pas sur la température du milieu biologique.

4.4. Premiers résultats de suivi d'interactions biologiques en goutte

Dans un premier temps, nous avons réalisé un suivi en goutte d'interactions simples (sans microbrassage) afin de valider le banc expérimental et le principe de la détection en goutte. La Figure 62 illustre un cycle d'activation (NHS/EDC) puis de fixation de streptavidine. Une étape de passivation par l'intermédiaire de BSA inhibe les sites inoccupés. Une goutte d'eau de 10 μ L permet de repérer la raie plasmon. Les étapes sont suivies d'un rinçage au tampon PBS.

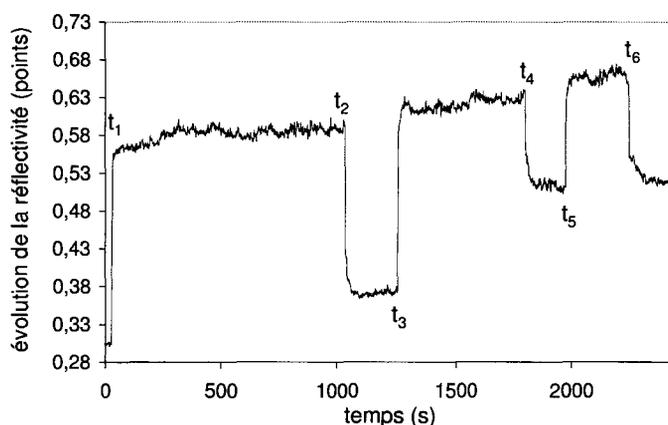


Figure 62 Suivi de la fonctionnalisation de streptavidine en goutte de 10 μ l sur surface carboxylée, suivie d'une étape de passivation. t₁= activation de la surface carboxylée par agents couplants NHS/EDC, t₂, t₄, t₆= rinçages PBS, t₃= streptavidine 15 μ mol/ml, t₅= passivation par BSA.

La Figure 63 montre une gamme de concentrations de streptavidine en goutte de 3 μ l sur surface activée. La réaction est réalisée pour différentes dilutions avec C₀= 15 μ mol/ml.

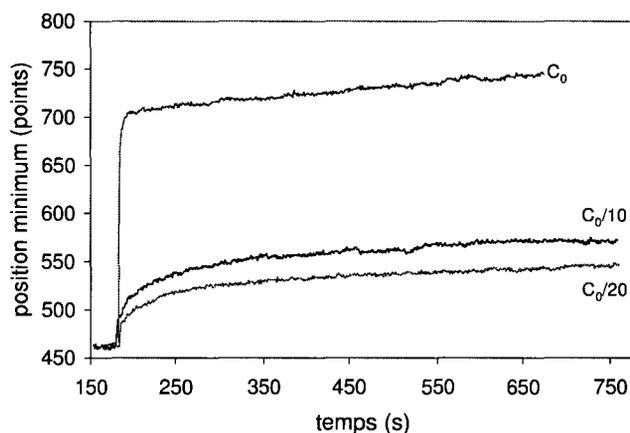


Figure 63 Evolution de la position de la résonance SPR en fonction du temps pour une interaction de streptavidine en goutte 3 μ l sur surface activée NHS/EDC. La réaction est suivie pour différentes dilutions avec C₀=15 μ mol/ml.

Nous avons donc montré dans cette partie la faisabilité, sur une interaction simple, d'un suivi d'interaction en goutte par plasmon de surface. Afin de pouvoir évaluer l'apport de l'agitation par ondes acoustiques de surface sur le transport de masse, l'interaction streptavidine/biotine n'est toutefois pas la plus appropriée, car l'affinité du complexe est très élevée²⁸ ($K_A=10^{15}M^{-1}$), et constitue une des liaisons non covalentes les plus fortes de la nature. Ainsi l'effet des ondes sur la dissociation ne serait pas visible. Nous avons donc choisi d'autres couples Ab-Ag, énumérés au paragraphe 6.2. Nous présentons maintenant les adaptations expérimentales nécessaires opérées afin de coupler le suivi d'interaction en goutte et le microbrassage par ondes acoustiques de surface.

5. Principe du DSPR couplé aux ondes acoustiques

Les tests réalisés ont montré la faisabilité d'une réaction en goutte et de la détection du minimum de la résonance en fonction du temps pour un suivi en temps réel en goutte. Pour permettre maintenant l'excitation de cette goutte par ondes acoustiques de surface en parallèle à la mesure, il nous a fallu mettre en place un support adapté. De ce fait, nous avons installé un support du substrat $LiNbO_3$ sur notre plateforme de mesure contenant le prisme. Une vis micrométrique permet de descendre le substrat SAW vers le prisme. Dans un premier temps, les gouttes sont déposées manuellement sur le spot. Dans un deuxième temps, les gouttes pourront être déplacées par ondes acoustiques de surface entre la surface du prisme et le substrat piézoélectrique.

5.1. Couplage entre microfluidique discrète et SPR

5.1.1. Micromélange

Le couplage est possible en utilisant le substrat de $LiNbO_3$ en capot amovible grâce un système de déplacement en z. La goutte dans laquelle sont contenus les analytes (Figure 64) est donc prise en sandwich entre la lame métallisée fonctionnalisée (dessous) et le substrat permettant l'excitation du mélange (capot).

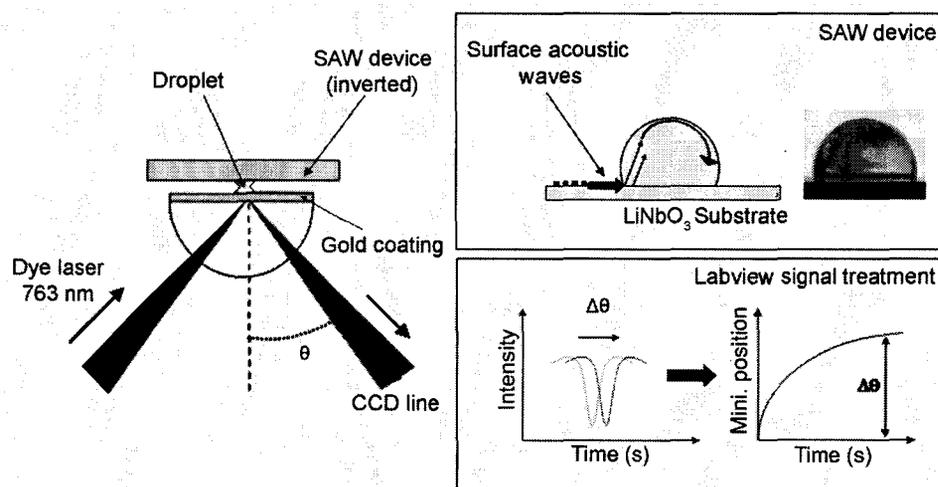


Figure 64 Dispositif expérimental DSPR couplé à une microfluidique digitale par ondes acoustiques de surface. Le substrat de LiNbO_3 , utilisé en capot, permet un actionnement microfluidique en même temps que le suivi en temps réel de l'interaction en goutte.

Dans un système comme le Biacore, les courbes cinétiques sont normalisées par rapport à une référence, constituée par un canal microfluidique où la surface n'a pas été activée. Cette référence permet de supprimer les 'effets tampons' et d'observer les cinétiques. Nous avons transposé cette référence de mesure dans notre système DSPR en utilisant un système de deux gouttes, une excitation par lentille cylindrique et un capteur dédié (CCD à 2 barrettes). Une interface Labview spécifique à cette configuration a également été réalisée. Dans ce cas, une lentille cylindrique permet d'obtenir une ligne de focalisation (Figure 65). Deux barrettes indépendantes permettent de suivre les raies plasmon issues de chaque goutte.

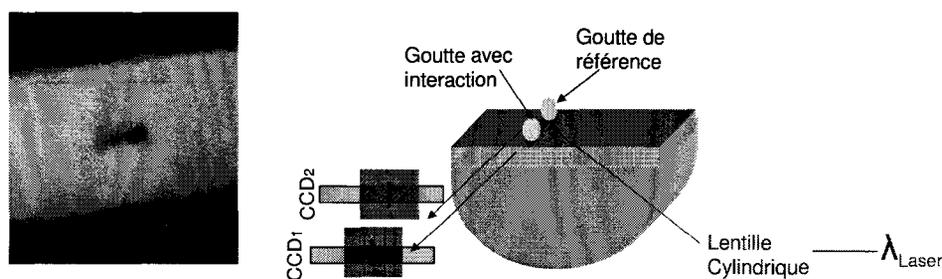


Figure 65 (Droite) Photo d'un plasmon de surface réalisé à travers une lentille cylindrique pour une goutte d'eau sur une lame dorée d'indice 1.45 à 614nm. (Gauche) Principe du suivi du plasmon de 2 gouttes. Une goutte de référence, et une goutte où a lieu l'interaction.

On observe bien la localisation de la goutte : au niveau de la goutte, il y a couplage pour le plasmon or/eau, par contre, sur les deux côtés de la goutte, on ne visualise pas le couplage car l'angle d'incidence n'est pas adapté pour l'interface or/air.

5.1.2. Déplacement

Un déplacement par ondes acoustiques (pour amener et enlever les gouttes d'analytes) est également intégré dans le système DSPR. Afin de rendre possible le déplacement, il est nécessaire de réaliser des plots fonctionnalisés, entourés d'une surface hydrophobe, permettant de réduire la force nécessaire au déplacement. Le principe est schématisé Figure 66.

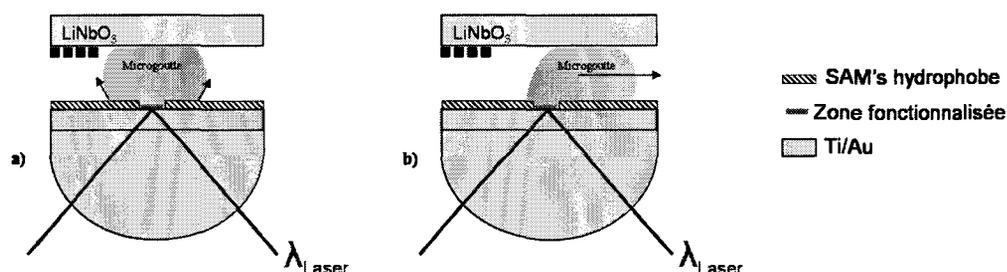


Figure 66 Schéma montrant l'aspect dynamique avec déplacement par ondes acoustiques de surfaces sur plots fonctionnalisés (a) au repos (b) pendant un déplacement.

On utilise une monocouche de thiols octadecylmercaptan $\text{HS}-(\text{CH}_2)_{17}-\text{CH}_3$ dans laquelle sont réalisées des ouvertures fonctionnalisées. La procédure de réalisation des lames pour déplacement sur plots fonctionnalisés est la suivante. Les lames d'or sont dégraissées à l'acétone/IPA, passées aux ultrasons pendant 5 minutes, puis rincées abondamment à l'EDI. Les lames ainsi nettoyées sont placées dans un bain de $10 \mu\text{g/ml}$ d'octadecylmercaptan dans du chloroforme durant 16h au minimum. Les lames sont ensuite rincées au chloroforme frais et à l'EDI, puis séchées sous flux d'azote. Des ouvertures sont réalisées dans la monocouche par UV-Ozone à travers un masque en quartz comportant des ouvertures circulaires espacées (entre 800 et $1600 \mu\text{m}$ de diamètre). L'échantillon est placé pendant 45 minutes dans l'enceinte comportant un flux d'oxygène et un rayonnement UV (185nm - 254nm). Par photodissociation, il y a création de radicaux O^* et d' O_3 , permettant l'élimination des composants organiques exposés. Cette étape donne accès localement à l'or, où les groupements acides sont greffés. Au niveau des plots, la surface possède un angle de contact statique de 108° et une hystérésis de 20° .

La Figure 67 montre des séquences d'un déplacement par ondes acoustiques de surface dans un système DSPR, pour une puissance de $40,4\text{dBm}$ et pour une modulation à 2Hz et de rapport cyclique 30% .

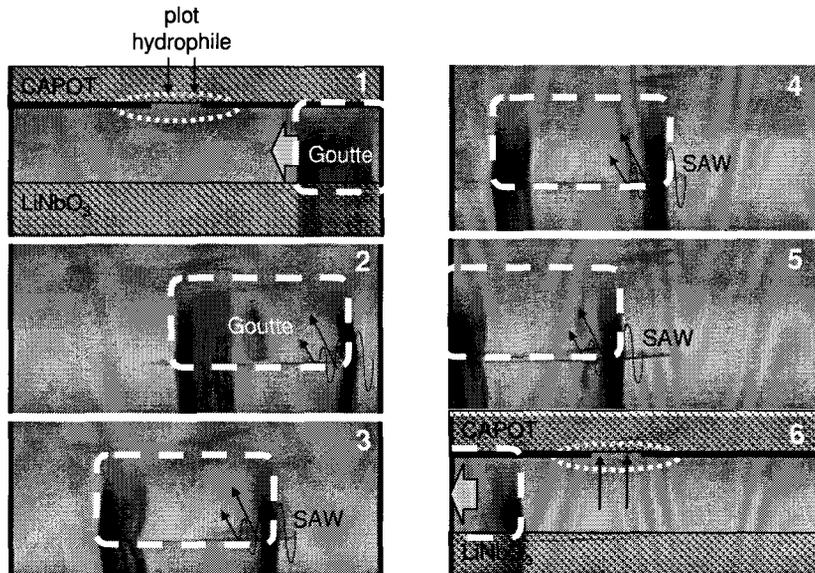


Figure 67 Séquence d'un déplacement par ondes acoustiques de surface couplé à un système DSPR. A 40,4dBm, f=2Hz, r=30%.

5.2. Influence de la température

Comme il a été mentionné précédemment, la technique SPR est très sensible aux variations d'indice de réfraction du milieu diélectrique environnant. Par exemple, la formation d'une couche mince, ou une interaction moléculaire se produisant à la surface, induisent des variations significatives dans le spectre SPR. Cependant, il faut noter que les indices optiques varient en général avec la température et que les variations de température risquent d'avoir des effets néfastes sur le spectre SPR²⁹. Ces problèmes dans les systèmes commerciaux du type Biacore sont écartés principalement grâce à l'étanchéité du système de canaux microfluidiques et à l'existence d'un boîtier thermostaté. Toutefois, des dérives sont également remarquées dans le système Biacore, mais sont éliminées en forçant la circulation de tampon HBS dans le système microfluidique (réalisation de plusieurs injections successives appelées 'primes' de 30min chacune avec des débits de 100 μ l/min à 4000 μ l/min). Le système Biacore est considéré comme stable pour une dérive inférieure à 1RU/min.

Dans un système en goutte, les variations de température sont d'autant plus ressenties (évaporation de la goutte, courant d'air, ...) qu'il ne possède pas de boîtier isolé thermiquement. Le couplage de la technique DSPR à une microfluidique discrète à base d'ondes acoustiques de surface, qui de plus, peut être source d'élévation de température, nécessite une grande vigilance. Lors de ce couplage, l'absorption des ondes de Rayleigh dans la goutte génère une élévation de température au sein du liquide qui se répercute sur la mesure du pic plasmon, par l'intermédiaire

d'une variation d'indice du milieu et du métal. En excitation continue, la température typique mesurée par thermocouple Chromel Alumel K dans un goutte peut atteindre 35/40°C (Chap.2 §3.2), dans les plages de puissance utilisées (10-41dBm).

L'élévation de température due à l'excitation par LiNbO₃ en capot sur la position du minimum de résonance SPR est donc étudiée dans le paragraphe suivant.

5.3. Contrôle par effet Peltier

Dans un premier temps, nous avons observé l'influence d'un refroidissement du système goutte+substrat par effet Peltier. L'effet Peltier (ou effet thermoélectrique) est largement utilisé pour refroidir des systèmes tels les microprocesseurs. Il s'agit d'un transport de quantité de chaleur par les porteurs de charge dans des matériaux conducteurs de natures différentes, liés par des contacts sous courant électrique (refroidissement d'un des deux contacts, échauffement de l'autre contact). En plaçant la face froide de l'élément Peltier sur le substrat de LiNbO₃ (associé à un flux d'air sec sur le radiateur de la face chaude), on refroidit ainsi la goutte d'eau de volume 10µL placée entre la lame dorée et le substrat.

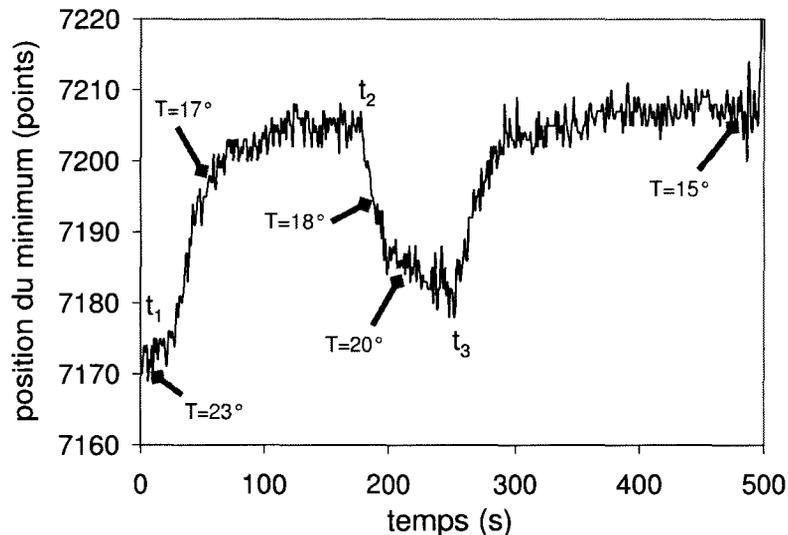


Figure 68 Variation de la position du minimum en fonction des variations de température provoquées par un effet Peltier. t_1 , t_3 = mise en route de l'effet Peltier à 0,6A, t_2 = arrêt de l'effet Peltier.

La Figure 68 illustre l'influence de la température sur la position de la résonance avec un décalage de 26 points pour une variation de température de 5°C, mesurée par thermocouple. Pour palier au problème d'échauffement dans le couplage SPR/SAW, nous avons cherché à établir un équilibre thermique à l'aide du Peltier en utilisant le système décrit précédemment, c'est-à-dire en

plaçant la face froide sur le substrat SAW. La combinaison entre l'échauffement dû aux ondes et le refroidissement par Peltier est illustré Figure 69.

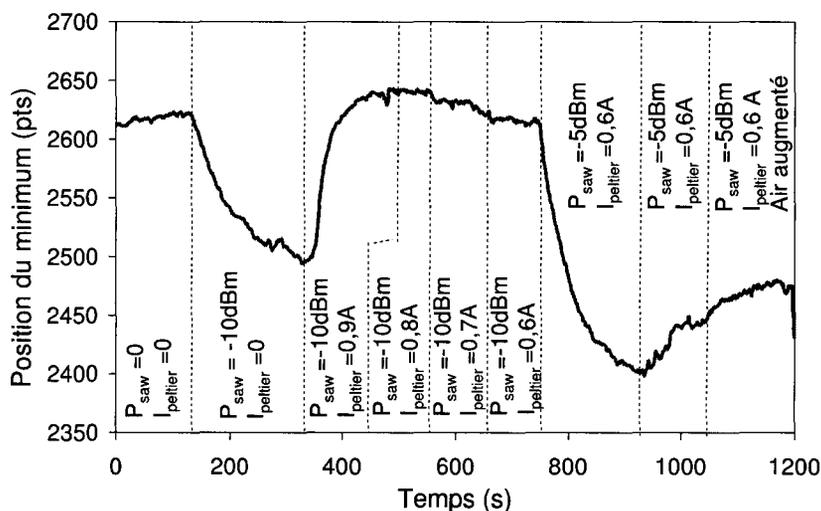


Figure 69 Evolution de la résonance plasmon en fonction de l'association SAW et Peltier.

Cette expérience prouve qu'il est difficile de contrôler la température avec une grande fiabilité tout au long de la réaction. De plus, cette association amène des difficultés de manipulation au cours de l'expérience (contrôle simultané du Peltier et des SAW).

Nous avons parlé dans le chapitre 2 du contrôle de température en utilisant un mode pulsé (3.2.2). Nous présentons ici l'utilisation de ce mode pour éviter l'échauffement dû aux ondes acoustiques, et éviter ainsi la dérive du pic plasmon pendant l'excitation.

5.4. Contrôle par excitation pulsée

Le travail a donc consisté à moduler l'alimentation des peignes interdigités afin d'avoir un fonctionnement en mode pulsé et ainsi de limiter l'énergie transmise à la goutte. L'évolution du minimum est enregistrée pour plusieurs excitations effectuées en mode continu et en mode pulsé. Des excitations de 4min en continu (31dBm à 36dBm), suivies d'arrêts pour permettre le retour du système à sa température d'origine ont été utilisées (Figure 70). On note une perturbation du minimum SPR au sein d'une goutte soumise à une excitation par ondes acoustiques de surface.

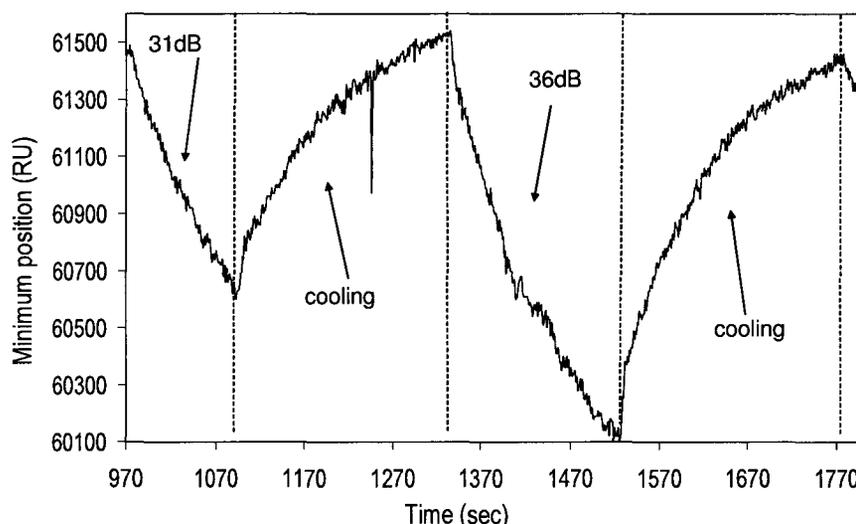


Figure 70 Evolution pour une goutte (3µl d'EDI) du min SPR en fonction de la puissance d'entrée pour des excitations en continu à 31dBm et 36 dBm, suivie d'un refroidissement.

La littérature permet de trouver la dépendance en température respectivement de l'indice de réfraction du métal et du minimum de réflectivité²⁹:

$$\frac{dn_{r1}}{dT} = 3.408 \times 10^{-4} K^{-1}, \quad \frac{dn_{i1}}{dT} = -1.381 \times 10^{-4} K^{-1}, \quad (60)$$

avec $n = n_{r1} + jn_{i1}$ l'indice de réfraction de l'or. Cela mène à la variation de la position du minimum de résonance:

$$\frac{d\theta_{\min}}{dT} = 1.098 \times 10^{-4} K^{-1} \quad (61)$$

Ainsi, une chute moyenne de θ_{\min} de 100 points, équivalent dans notre système à $1,7 \times 10^{-3}$ radians, implique une augmentation de température de 17° , amenant ainsi la température à 42° environ. Les variations de température citées sont en bon accord avec les variations ainsi calculées, ce qui confirme l'origine du phénomène.

Pour cette raison, les ondes acoustiques de surface ne peuvent pas être utilisées en excitation continue. L'excitation est alors réalisée en mode pulsé, dans lequel le signal est modulé par un signal rectangulaire ajustable en période et en rapport cyclique (Chap.2 §3.2.2). L'utilisation du mode pulsé permet de diminuer considérablement l'échauffement et d'atteindre un équilibre thermique relativement stable, tout en gardant l'effet d'agitation. Différents rapports cycliques et fréquences de modulations ont été testés. Une modulation à 500Hz avec un rapport cyclique de 10% (Figure 71) s'est montrée efficace : ces paramètres permettent d'obtenir une stabilité de la position du minimum, en conservant le mélange en goutte.

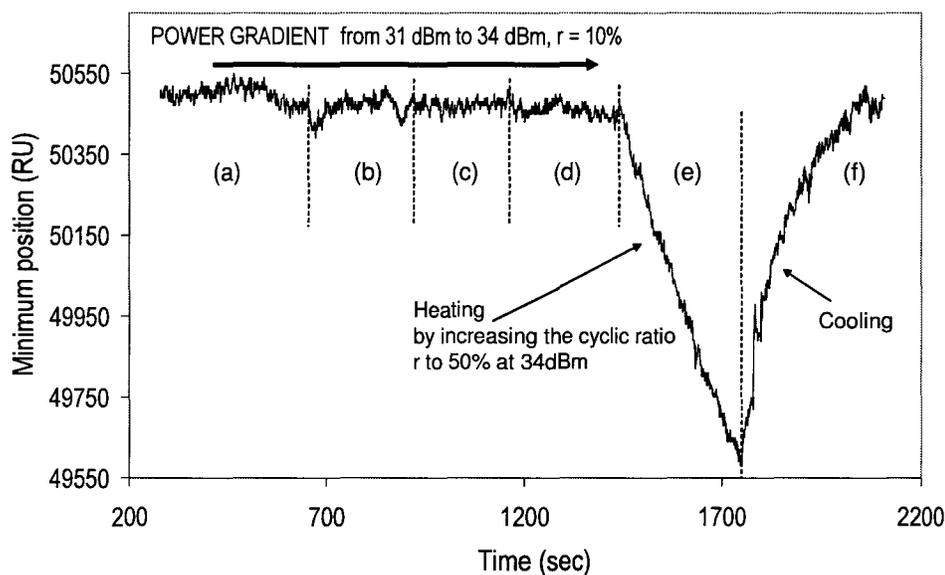


Figure 71 Evolution pour une goutte (3 μ l EDI) du min SPR en fonction de la puissance d'entrée en excitation pulsée : a) test de stabilité sans ondes (b) P=31dBm, r=10% (c) P=31,5dBm, r=10% (d) P=34dBm, r = 10% (e) P=34dBm, r=50% La montée brusque du rapport cyclique à 50% provoque une chute du minimum plasmon de 90 points (f) refroidissement.

Dans ces conditions, un gradient de puissance de 31 dBm à 34 dBm est possible, sans affecter la position du minimum. Le suivi d'interactions est donc envisageable en utilisant ces paramètres³⁰. Les manipulations suivantes seront effectuées en utilisant une excitation pulsée.

6. Interactions en goutte

Nous avons vu l'intérêt de la méthode SPR sous forme de goutte, couplée à une plateforme microfluidique, et nous avons déterminé des conditions expérimentales permettant de bénéficier de l'utilisation des ondes acoustiques de surface sans perturber la stabilité du signal SPR. Nous allons voir maintenant les résultats préliminaires d'interactions biologiques obtenues dans ces conditions³¹.

6.1. Résultats préliminaires

Le système a été testé par l'intermédiaire d'une interaction simple: l'immobilisation covalente de streptavidine par couplage amine sur une surface activée (chimie de surface définie en Annexe1). La réaction est initiée par l'apport d'une goutte de 3 μ l de streptavidine à 15 μ mol/ml sur la surface d'or activée. Nous avons réalisé cette interaction dans des conditions statiques, et

dans les conditions de micromélange déterminées précédemment : excitation à 31 dBm modulée à 500Hz, de rapport cyclique 10% (Figure 72).

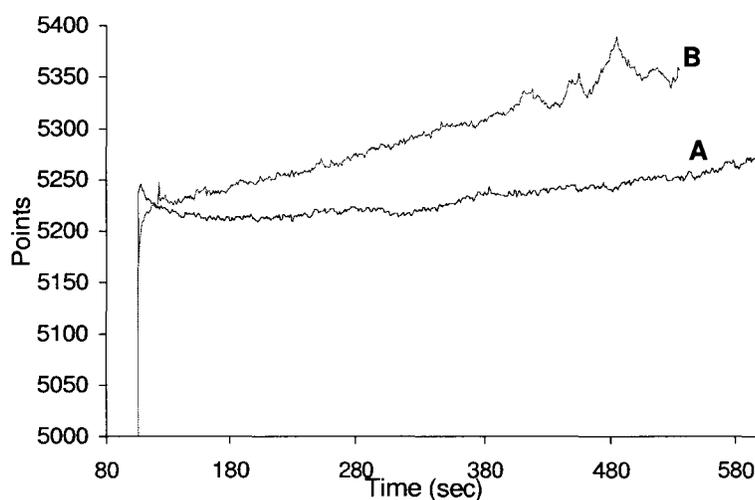


Figure 72 Interaction de la streptavidine avec une surface carboxylée active par NHS/EDC (A) en réaction statique (B) sous l'influence du micromélange acoustique.

Une régression linéaire permet de déterminer que la réaction de la streptavidine dans des conditions de micromélange, permet d'améliorer d'un facteur deux la cinétique de réaction (les pentes sont de 0,164 contre 0,353 respectivement sans et avec le mélange). La réaction après 6min en conditions statiques a gagné 50 points, alors que grâce au micromélange, on observe une augmentation de 100 points. La comparaison de ces réactions permet de dire qu'il existe un effet positif du micromélange sur le transport de masse lors d'une réaction d'immobilisation covalente sur surface activée.

6.2. Systèmes Anticorps/Antigène retenus

Un effet des ondes a donc été validé sur une réaction simple d'immobilisation, et il convient de choisir des couples appropriés afin de tester cet effet sur une interaction anticorps-antigène. Nous avons vu dans le chapitre 2 que les vitesses mesurées dans une goutte excitée par des ondes acoustiques de surface pouvaient aller au-delà du mm/s. Comparées aux autres méthodes de mélanges évoquées au chapitre 2, les SAW possèdent une grande dynamique de vitesses, ce qui permet d'adapter la vitesse de mélange à une large gamme d'interactions analyte/ligand, grâce à l'évaluation des nombres de Damköhler et Peclet. Des couples anticorps/antigène présentant des paramètres cinétiques différents (constante de dissociation k_d , d'association k_a , constante d'affinité $K_A = k_a/k_d$, Damköhler...) sont donc étudiés pour tester le système DSPR et évaluer les avantages du mélange sur différents types d'interactions.

Les couples antigènes/anticorps suivants, provenant de chez AbD Serotec, ont été choisis en concertation avec les biologistes de la plate forme de l'IFR-114 (CHR de Lille) :

- Le couple $\beta 2$ microglobuline / anti- $\beta 2$ microglobuline : molécule de taille moyenne, dont les propriétés sont connues par la plateforme. Les paramètres cinétiques pour le couple utilisé, évalués par ajustement sur un modèle de Langmuir, sont les suivants : $k_a=6,96.10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$, $k_d=7,31.10^{-6} \text{ s}^{-1}$, $K_A=9,53.10^{10}\text{M}^{-1}$.
- Le couple transferrine (humaine) / anti-transferrine : molécules de taille importante (77000kDa et 150000kDa). Les paramètres sont à déterminer.

6.3. Protocole d'immobilisation et d'interaction

Nous avons évoqué au chapitre 1 les types de chimie de surface les plus couramment utilisés, dans le cas de surfaces de type oxyde, et dans le cas de surfaces métalliques. Le principe général d'immobilisation dans ces deux cas est répertorié en Annexe 1. Nous avons été amenés à utiliser ces deux chimies de surface dans le cas de nos capteurs SPR : la première sur les lames d'or classiques, et la deuxième sur les lames d'or recouvertes de 10nm de SiO_x (§3.4). Les principes d'immobilisation dans ces deux cas sont exposés ci-dessous ; les protocoles détaillés sont répertoriés en Annexe 1.

6.3.1. Sur surface Au

Nous immobilisons la molécule 11-MUA (11-Mercapto-undecanoic-acid), dont la chaîne carbonée présente à une extrémité un groupement thiol (-SH) et à l'autre un groupement acide (-COOH) (Figure 73). Une monocouche dense de 11-MUA est adsorbée sur la surface d'or (Annexe 1).

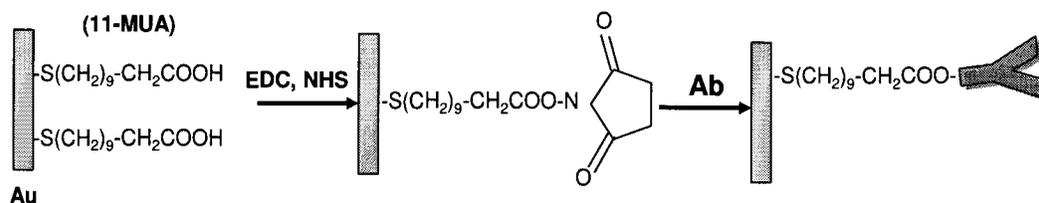


Figure 73 Principe de l'immobilisation d'un anticorps sur Au.

On fait ensuite réagir les groupements carboxyliques du 11-MUA avec une solution d'agents couplants comprenant EDC (1-Ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride)/

NHS (N-hydroxysuccinimide). L'ester qui en résulte va pouvoir réagir avec les résidus amines des molécules à immobiliser.

6.3.2. Sur surface Au/SiO_x

Les différentes étapes d'une immobilisation covalente sur substrat de verre par l'intermédiaire d'un silane APTES (Aminopropyltriéthoxysilane) sont représentées sur la Figure 74. Après hydroxylation de la surface (Etat 2), une monocouche d'APTES est autoassemblée sur la surface. L'APTES est lié de façon covalente à la surface et expose des terminaisons NH₂ (Etat 3) qui pourront réagir avec les molécules activées par NHS/EDC (Etat 4).

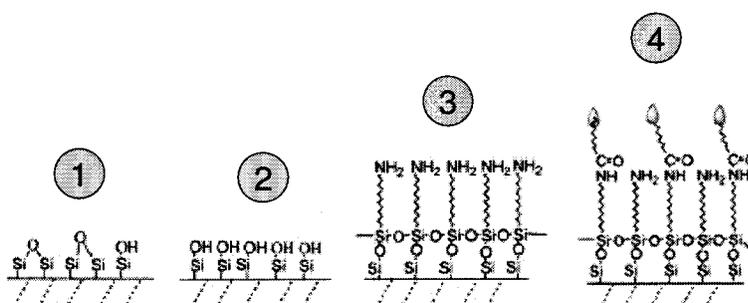


Figure 74 Étapes pour l'immobilisation d'une biomolécule sur surface d'oxyde.

L'immobilisation covalente sur SiO_x pour utilisation en SPR nécessite d'immobiliser l'anticorps préalablement. En effet, la réaction d'immobilisation dure dans ce cas environ 24h (Annexe 1).

6.4. Comparaison Biacore/DSPR dans le cas de la transferrine

Le travail de comparaison entre un système commercial Biacore et notre système DSPR a été effectué à partir de la transferrine. Cette étude a nécessité l'utilisation de divers supports :

- pour l'utilisation dans le Biacore, des lames CM5 (CarboxymethylDextran) commerciales ainsi que des lames d'or commerciales fonctionnalisées par nos propres moyens à l'IEMN que nous appelons ici 'lame IEMN'.
- pour l'utilisation sur le banc DSPR des lames de verre dorées, fonctionnalisées (acide ou amine).

L'étude a comporté trois étapes successives : dans un premier temps, la détermination à l'IFR114 (CHRU de Lille) des conditions expérimentales standard avec un Biacore sur lame CM5. Dans un deuxième temps, l'application, sur une lame IEMN fonctionnalisée, des conditions précédemment déterminées. Enfin, le protocole déterminé est utilisé sur le banc DSPR.

6.4.1. Détermination des conditions d'expérimentation sur Biacore

Sont présentés ci-dessous les tests réalisés sur le Biacore dans le cadre de notre collaboration avec l'IFR114. Ces premiers essais visent à déterminer les meilleures conditions d'immobilisation et de régénération. Dans un premier temps, comme nous travaillons sur un complexe anticorps-antigène (transferrine) encore inutilisé à la plateforme de l'IFR114, une lame CM5 Biacore est utilisée pour déterminer ces conditions.

Afin de déterminer le pH permettant l'immobilisation maximale, une étape de pH scouting est réalisée : injection successive de la solution d'anticorps à différents pH dans l'acétate de sodium (Figure 75).

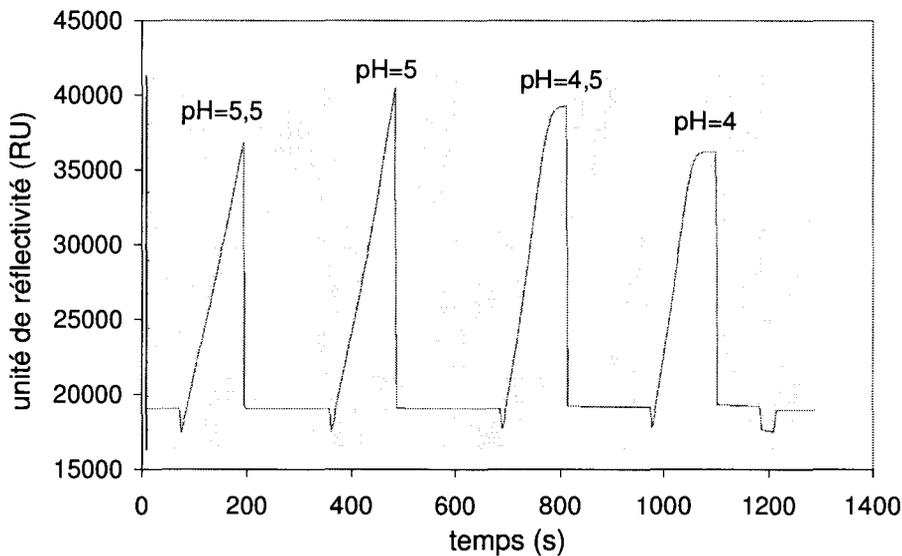


Figure 75 pH Scouting réalisé à partir du Biacore pour l'IgG anti-transferrine.

Pour l'immobilisation de l'anticorps anti-transferrine, le pH=5 est le plus approprié, car la saturation est obtenue aussi vite qu'à pH plus faible, et la vitesse d'accroche est légèrement plus rapide qu'à pH=5,5.

Ensuite, la solution de régénération la plus adaptée est testée en réalisant un 'régénération scouting'. Nous choisissons le mélange 10mM Gly pH=2 et NaCl 0,5M pendant 1min.

On dispose alors de tous les paramètres pour réaliser l'immobilisation. La Figure 76 illustre le cycle d'immobilisation de l'IgG anti-transferrine sur lame CM5 et comprend les étapes énumérées dans le Tableau 5.

Tableau 5 : cycle d'immobilisation de l'IgG anti-transferrine sur lame CM5.

<i>Injection préliminaire</i>	
(a) Tampon HBS	Ligne de base
(b) Injection d'IgG anti-transferrine 30µg/mL	Relevé du maximum atteint. Sert d'étalonnage à l'automate pour caler l'injection en boucle jusqu'à obtention de la quantité relevée (2500RU).
(c) Lavage NaOH	Retour à l'état initial de la surface du capteur
(d) Circulation du tampon HBS	Retour à la ligne de base
<i>Activation de la surface</i>	
(e) NHS-EDC	Mélange 1/1 – Activation de la surface carboxyméthylée CM5
(f) Tampon HBS	Rinçage
<i>Immobilisation de l'anticorps</i>	
(g) Injections successives d'IgG 30µg/mL	Lavages HBS, évaluation de la quantité immobilisée et réinjection d'IgG. Arrêt lorsque la quantité consigne est atteinte. (définie à 2500RU).
(h) Tampon HBS	Rinçage
(i) Ethanolamine	Désactivation par blocage de la surface
(j) Tampon HBS.	Rinçage permettant de déterminer la quantité réellement immobilisée

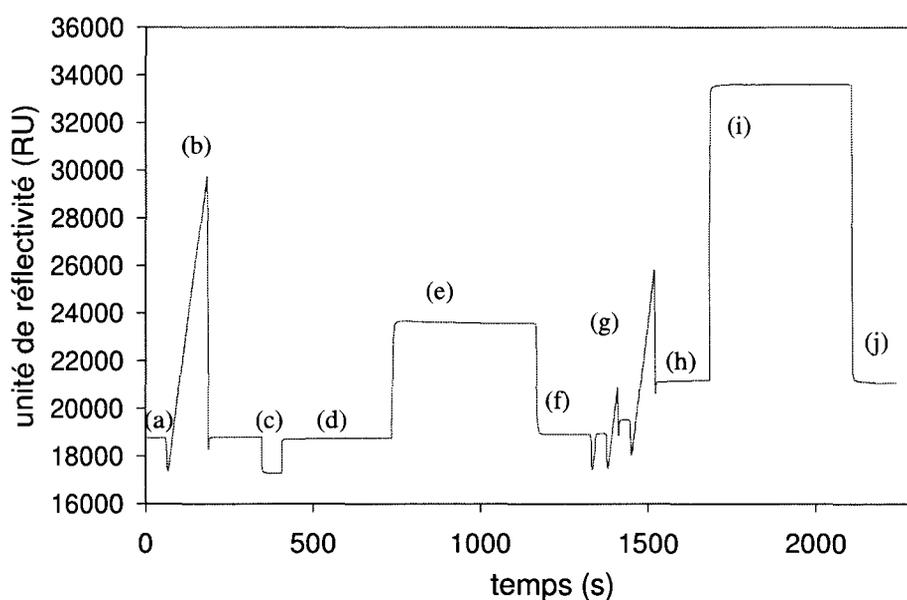


Figure 76 Cycle d'immobilisation de l'IgG anti-transferrine : étapes d'activation, d'injection, et de lavage.

Il est alors possible de déterminer la quantité d'anticorps immobilisée. La quantité obtenue est de 2590,89RU. La réaction transferrine - IgG a ensuite lieu. La Figure 77 présente cette interaction pour une gamme de concentrations de transferrine provenant d'une solution mère à 5mg/ml.

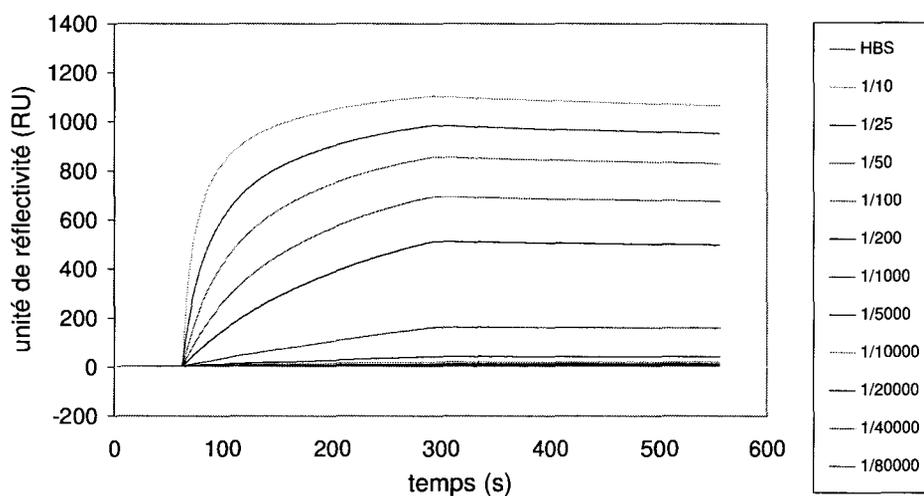


Figure 77 Interaction IgG anti-transferrine/transferrine pour une gamme de concentrations de transferrine. La solution mère est de 5mg/ml.

La phase d'association a lieu pendant l'injection de la transferrine. Au bout de 4min, l'injection est stoppée et le tampon HBS permet de déclencher la dissociation. Ceci permet alors de remonter aux constantes cinétiques définies plus haut (§2.2.1).

6.4.2. Lame IEMN sur Biacore

Une fois que les conditions d'immobilisation et de régénération sont bien établies, nous pouvons les appliquer à notre propre chimie de surface afin de comparer les quantités d'immobilisation sur les deux lames. Nous avons utilisé une lame d'or Biacore 'nue' au lieu d'une lame CarboxyMethylDextran CM5 et nous avons opéré la même chimie de surface que pour nos lames DSPR. L'étape de pH Scouting est reproduite comme précédemment (Figure 78).

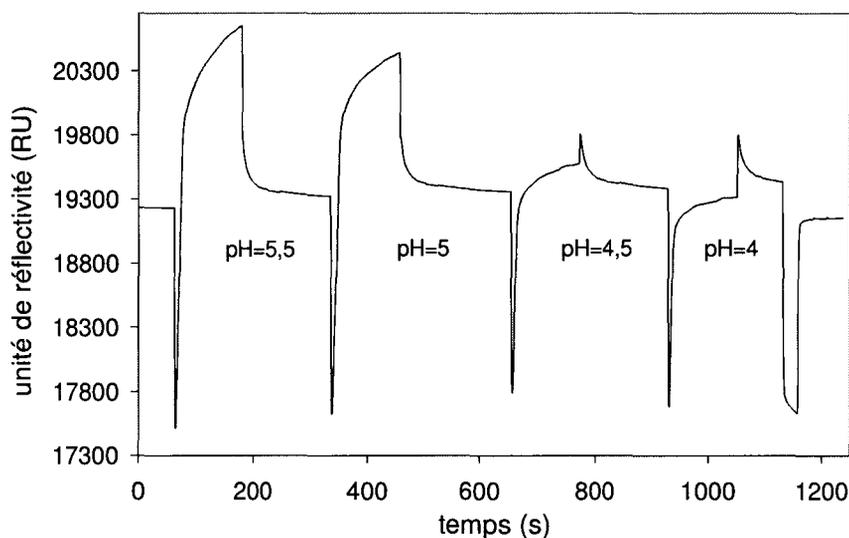


Figure 78 pH scouting sur une lame d'or Biacore fonctionnalisée acide à l'IEMN.

Un comportement différent du pH scouting est observé sur notre chimie de surface : le pH 5,5 serait optimum. Les pH=5 et pH=5,5 donnant des réponses proches et dans un souci d'uniformisation des conditions expérimentales, nous gardons le pH=5 comme précédemment pour la solution d'immobilisation. Le cycle d'immobilisation est réalisé sur cette lame dans les mêmes conditions que celles précédemment définies pour la lame CM5 (Figure 79).

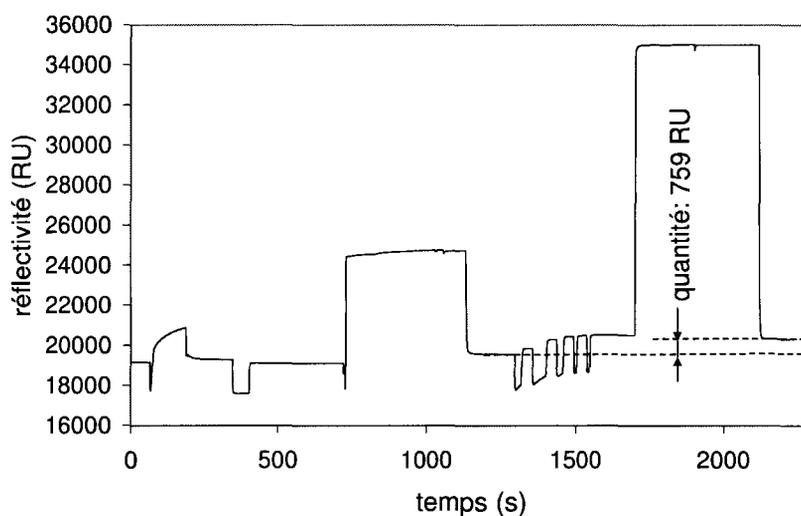


Figure 79 Cycle d'immobilisation de l'IgG sur la 'lame IEMN'.

Les quantités d'anticorps immobilisées sont plus faibles que dans le cas de la lame CM5 : 759RU contre 2590RU. La Figure 80 représente les phases d'association et de dissociation de la transferrine avec l'IgG. Nous pouvons alors mesurer la quantité de transferrine ayant réagi pour la concentration utilisée à 500µg/ml (1/10 de la solution mère) : elle est de 55 RU.

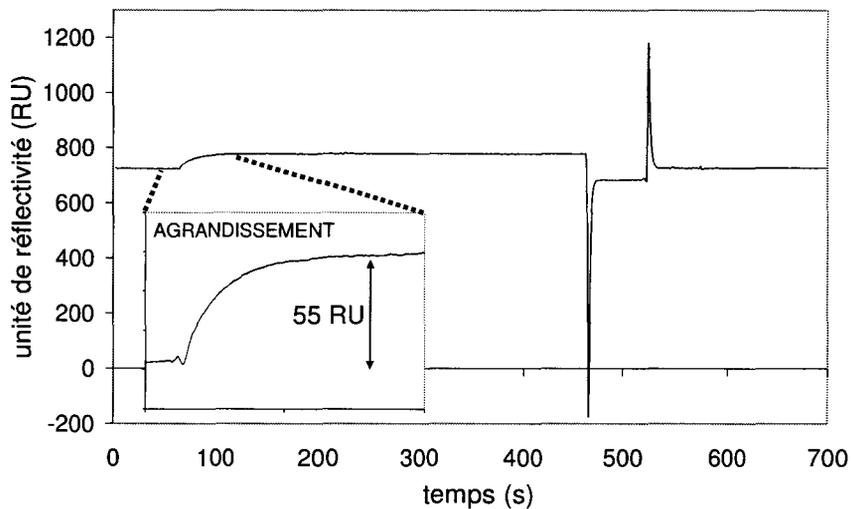


Figure 80 Cycle d'association/dissociation de la transferrine sur l'IgG, normalisé par rapport à la cellule de référence.

La faible quantité d'anticorps immobilisée nous donne à penser que la densité de surface des terminaisons acides n'est pas importante. Ceci est cohérent car la chimie de surface utilisée est considérée comme en 'deux dimensions' (2D) par rapport à la couche de Dextran des lames CM5. Le caractère poreux de ce polymère, fonctionnalisé par un acide, permet une meilleure interaction des anticorps avec les groupements d'immobilisation et assure un meilleur taux de fixation que notre chimie 2D.

Les analyses par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) présentées en Annexe 1 confirment les faibles quantités immobilisées.

La deuxième conclusion de cette comparaison lame CM5/lame IEMN concerne le faible pourcentage de liaison entre l'anticorps et l'antigène (10% d'antigène par rapport à la quantité d'anticorps immobilisée). Expérimentalement, les taux typiques d'interaction sont en général compris entre 50% et 80% du R_{\max} théorique, taux de réaction maximum pour une certaine quantité de ligand immobilisé. Le R_{\max} théorique est donné par⁸ :

$$R_{\max} = \left(\frac{MW_A}{MW_L} \right) \cdot R_L \cdot S_m, \quad (62)$$

avec MW_A et MW_L les poids moléculaires de l'analyte et du ligand respectivement, R_L est le montant de ligand immobilisé, et S_m est la stœchiométrie de la réaction (considérée comme 1 étant donnée l'encombrement stérique de l'antigène). Dans notre cas, nous avons un R_{\max} théorique de 389,62RU. Donc, nous avons un taux d'immobilisation à 14% du R_{\max} théorique, ce qui est en dessous de la norme.

Cette observation implique que malgré l'immobilisation réalisée, la fixation de la transferrine n'est pas optimisée. Il est probable que les anticorps immobilisés soient mal orientés (sites de fixation inaccessibles), ou que leur activité ait été altérée pour une autre raison, limitant ainsi de façon conséquente l'association anticorps-antigène. Etant données les faibles quantités d'anticorps immobilisées et leur faible activité, nous développons actuellement une chimie plus adaptée qui nous permettra d'immobiliser des quantités plus élevées en gardant une meilleure activité. En effet, il est difficile de comparer l'effet des ondes acoustiques et du mélange sur des quantités aussi faibles. L'utilisation d'une association de deux thiols (11MUA-3MPA) pourrait permettre de remédier à ces problèmes en augmentant l'accessibilité des terminaisons du 11-MUA³² et limiter les effets néfastes de l'encombrement stérique. D'autre part, l'utilisation de surfaces d'or recouvertes d'une couche de 10nm de SiO_x est étudiée. Ces surfaces permettent d'utiliser une chimie de surface encore mieux maîtrisée.

6.4.3. Interaction en goutte

Nous avons maintenant une idée des quantités que nous pouvons immobiliser sur cette chimie de surface carboxylée. Malgré la faible activité des IgG, nous avons souhaité valider le mode opératoire total sur le banc DSPR. L'interaction est donc réalisée en goutte, toujours dans les mêmes conditions d'immobilisation et de régénération.

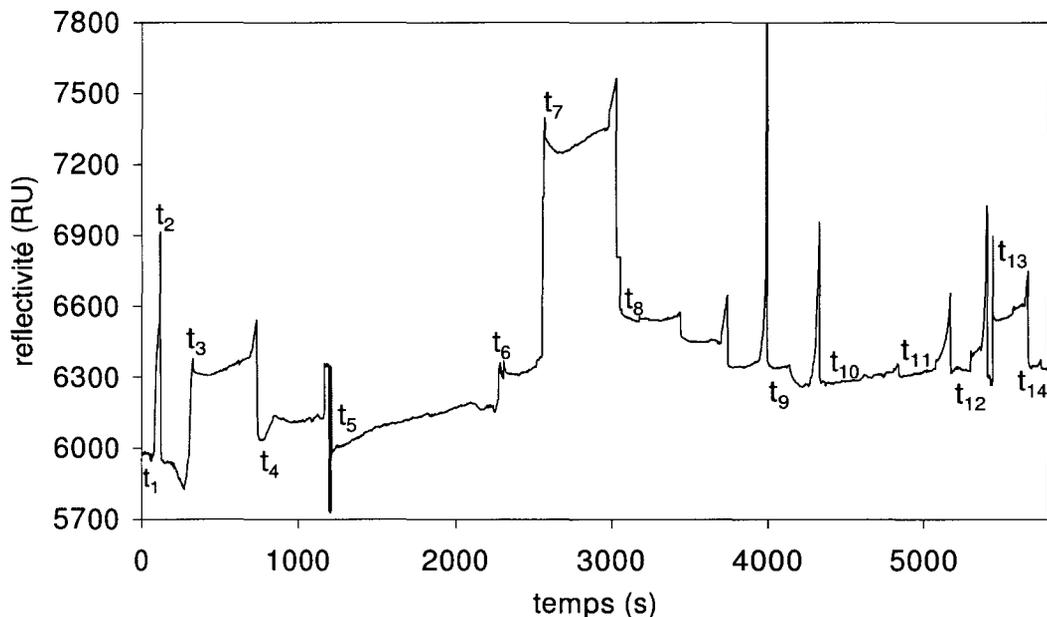


Figure 81 Opérations d'immobilisation de l'anticorps et d'interaction avec la transferrine, en goutte sur banc DSPR.

Le volume de goutte est fixé à 3 μ L tout au long de l'expérience. Les pics observés comme en (t₂) sur la Figure 81 correspondent à la transition entre gouttes où la raie plasmon disparaît. Cet effet existe aussi dans les systèmes en flux de type Biacore, sachant que les solutions sont séparées dans les canaux par une bulle d'air pour éviter la diffusion à l'interface entre les milieux. Le logiciel qui accompagne le système Biacore corrige automatiquement ces artefacts... Le protocole utilisé Figure 81 sur la lame IEMN est repris dans le tableau suivant.

Tableau 6 Opérations d'immobilisation de l'anticorps et d'interaction avec la transferrine.

(t ₁) 3 μ L de tampon HBS 2min
(t ₂) transition de gouttes.
(t ₃) activation NHS-EDC 5min
(t ₄) tampon HBS 1min.
(t ₅) IgG anti-transferrine à 30 μ g/ml+acétate de sodium (NaOH). D'indice plus faible que le HBS, la solution implique le décalage de la courbe vers le bas.
(t ₆) tampon HBS (après équilibre) 1min.
(t ₇) désactivation par éthanolamine 5min.
(t ₈) 4 rinçages successifs tampon HBS.
(t ₉) un réajustement du banc a déplacé le minimum (à prendre en compte dans la mesure des quantités immobilisées).
(t ₁₀) injection de transferrine 300 μ g/ml.
(t ₁₁) réinjection de transferrine 500 μ g/ml (quantité immobilisée précédemment trop faible).
(t ₁₂) concentration plus élevée de transferrine.
(t ₁₃) solution de régénération pH=2.
(t ₁₄) tampon HBS.

On peut conclure de ces tests que les quantités immobilisées en goutte sont cohérentes avec celles immobilisées dans le système Biacore. Nous avons également mis au point les adaptations expérimentales, comme les étapes de lavage, nécessaires à la réussite d'une réaction en goutte. Moyennant une optimisation de la chimie pour un meilleur taux d'immobilisation, le système est opérationnel pour réaliser une réelle comparaison des systèmes en goutte avec et sans les ondes acoustiques.

7. Conclusion

Ce travail porte sur la mise en place, en collaboration avec le laboratoire PhLAM, d'un concept original de plasmon de surface en goutte (DSPR pour 'droplet based SPR') couplé à une plateforme microfluidique digitale à base d'ondes acoustiques de surface. Le développement de ce système, dont la perspective initiale était de pouvoir accéder en temps réel aux interactions d'une goutte avec une surface, a permis plus qu'une simple caractérisation du mélange. Elle s'est révélée être un outil à fort potentiel pour l'analyse des cinétiques et pour le dosage d'éléments biologiques.

D'abord, plusieurs adaptations du banc et des conditions expérimentales ont été nécessaires pour, d'une part, adapter le suivi d'interaction à un système discret en goutte et d'autre part, coupler l'excitation par ondes acoustiques de surface au suivi en temps réel grâce à un actionnement par capot. Nous avons ensuite pu valider le suivi d'interactions biologiques en goutte par plasmon de surface à l'aide d'interactions simples.

Les deux principaux intérêts de ce système sont, d'une part, une nouvelle méthode de dosage présentant une meilleure sensibilité et une image de l'équilibre plus réaliste que les systèmes en flux continu, et d'autre part, une solution pour lutter contre le mauvais transport de masse, présent dans les microsystèmes microfluidiques en flux continu. Du fait des faibles nombres de Reynolds dans ces derniers, l'écoulement est laminaire et les effets de diffusion dominants limitent la vitesse des réactions. Le système proposé vise donc à aider à la régénération des analytes à proximité de la zone sensible grâce au micromélange acoustique. On souhaite alors obtenir des cinétiques plus réalistes et à éviter les traitements de données lors des analyses. En effet, ceux-ci sont basés sur des modèles complexes, dont les hypothèses sont souvent limitées à certaines interactions (faibles Da) et dont les résolutions sont coûteuses en temps (résolutions numériques, éléments finis). Ces résultats préliminaires nous permettent de valider un effet positif du mélange dans l'amélioration du transport de masse lors de réactions simples.

Pour vérifier l'effet des ondes sur une interaction de type anticorps/antigène, nous avons commencé, à l'aide de l'IFR114, la mise au point d'un protocole expérimental rigoureux adapté, déterminé à partir d'un système Biacore sur chimie de surface CM5 commerciale de même que sur chimie de surface thiolée réalisée à l'IEMN. Des premiers résultats d'interaction en goutte ont été obtenus. Cependant, les quantités d'anticorps immobilisées étant faibles, il est encore difficile de réaliser une étude comparative avec les ondes acoustiques de surface. Nous testons actuellement des solutions encore plus adaptées qui permettront bientôt une réelle comparaison des deux systèmes.

En combinant l'ensemble des opérations fluidiques et de détection en temps réel sur goutte intégrées sur le système DSPR, validées, à savoir :

- le déplacement de gouttes par ondes acoustiques de surface au sein du système DSPR,
- la prise en compte d'une goutte de référence grâce à l'utilisation d'une lentille cylindrique et d'une double barrette CCD,

nous pouvons nous rapprocher, en termes de souplesse d'utilisation, des outils commerciaux, avec une approche différente de dosage et d'analyse de cinétique.

Les autres perspectives associées à ce travail et au banc DPSR sont par ailleurs nombreuses :

- Le banc nous ouvre la voie vers de nouvelles applications ; par exemples pour le suivi de la croissance de polymères en temps réel en milieu confiné (Collaboration A. Olivier, Université de Mons) ou la structuration de la surface par un réseau de plots d'or fonctionnalisés dans un polymère superhydrophobe (Collaboration P. Damman, Université de Mons). Cette dernière réalisation permettra une plus grande souplesse de déplacement en diminuant l'hystérésis.

- De façon plus prospective, la modification de la longueur d'onde (laser à colorants, infrarouge...) permettra d'ajuster la profondeur de champ et ainsi d'étudier en temps réel une large gamme d'événements biologiques (phénomènes cellulaires jusqu'à présent difficiles à appréhender).

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE 3

- ¹ R.W. Wood, "On a Remarkable Case of Uneven Distribution of Light in a Diffraction Grating Spectrum", Proceeding of the Physical Society of London, 1902, pp. 269-275.
- ² U. Fano, "The theory of anomalous diffraction gratings and of quasi-stationary waves on metallic surfaces (Sommerfeld's waves)", J. Opt. Soc. Am. (1941), 31, pp. 213.
- ³ A. Otto, "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection", Z. Phys.A (1968) 216, 4, pp. 398-410.
- ⁴ E. Kretschmann, H. Raether, "Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light", Zeitschrift fur Naturforschung A (1968) A23, pp. 2135.
- ⁵ B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstroem, "Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing", Sensors Actuators (1983), 4, 22, pp. 299-304.
- ⁶ W. Knoll, "Interfaces and thin films as seen by bound electromagnetic waves", Annu. Rev. Phys. Chem. (1998), 49, pp. 569-638.
- ⁷ J. Homola, S.S. Yee, G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors: a review", Sensors and Actuators B, 1999, 54, pp. 3-15.
- ⁸ O.S. Wolfbeis, J. Homola, "Chemical Sensors and Biosensors: Surface plasmon resonance based sensors", Springer Verlag, Berlin (2006), vol. 4.
- ⁹ B. Liedberg, C. Nylander, I. Lundstrom, "Biosensing with surface plasmon resonance: how it all started", Biosens. Bioelectron. (1995), 10, pp. 1-4.
- ¹⁰ Biacore AB, Biacore Instrument Handbook, 1998
- ¹¹ S. Sjolander, C. Urbaniczky, "Integrated fluid handling system for biomolecular interaction analysis", Anal Chem (1991), 63, 2338, pp. 2338-2345.
- ¹² B.J Geurts, "Diffusion-limited immunochemical sensing", Bull. Math. Biol. (1989), 51, pp. 359-379.
- ¹³ R.W. Glaser, "Antigen-antibody binding and mass transport by convection and diffusion to a surface: a two-dimensional computer model of binding and dissociation kinetics", Analyt Biochem (1993) 213, pp. 152-161.
- ¹⁴ B. Goldstein, M. Dembo, "Approximating the effects of diffusion on reversible reactions at the cell surface: ligand-receptor kinetics", Biophys. J. (1995), 68, pp. 1222-1230.
- ¹⁵ D. Myszka, X. He, M. Dembo, T. Morton, B. Goldstein, Biophys Journal (1998), 71, pp. 3430
- ¹⁶ M. Culha, D.L. Stokes, G.D. Griffin, T. Vo-Dinh, "Application of a miniature biochip using the molecular beacon probe in breast cancer gene *BRCA1* detection", Biosensors and Bioelectronics (2004), 19, pp. 1007-1012.
- ¹⁷ S. Szunerits, R. Boukherroub, "Electrochemical investigation of gold/silica thin film interfaces for electrochemical surface plasmon resonance studies", Electrochemistry communications (2006), 8, 3, pp. 439-444.

- ¹⁸ Y. Iwasaki, T. Horiuchi, M. Morita, O. Niwa, "Time differential surface plasmon resonance measurements applied for electrochemical analysis", *Electroanalysis* (1997), 9, pp. 1239-1241.
- ¹⁹ L. Bailey, D. Kambhampati, K. Kanazawa, W. Knoll, C. Franck, "Using Surface Plasmon Resonance and the Quartz Crystal Microbalance to Monitor in Situ the Interfacial Behavior of Thin Organic Films", *Langmuir* (2002), 18, pp. 479-489.
- ²⁰ R. Bird, W. Stewart, E. Lightfoot, *Transport phenomena* (2002), Wiley, New York
- ²¹ D. Myszka, "Kinetic analysis of macromolecular interactions using surface plasmon resonance biosensors", *Curr. Opin. Biotechnol* (1997), 8, 1, pp. 50-57.
- ²² D.A. Edwards, "Refining the measurement of rate constants in the BIAcore", *J Math Biol* (2004), 49, 3, pp. 272-292.
- ²³ W.B. Lin, M. Lacroix, J.M. Chovelon, N. Jaffrezic-Renault, H. Gagnaire, "Development of a fiber-optic sensor based on surface plasmon resonance on silver film for monitoring aqueous media", *Sensors and Actuators B* (2001), 75, 3, pp. 203-209.
- ²⁴ S. Brantzen, F. Völklein, W. Knoll, B. Menges, "A new sensor for the thermo-optical detection of surface plasmon resonance", *Sensors and Actuators A* (2007), 135, pp. 492-501.
- ²⁵ S. Ekgasit, C. Thammacharoen, F. Yu, W. Knoll, "Influence of the metal film thickness on the sensitivity of surface plasmon resonance biosensors", *Appl. Spectrosc.* (2005), 59, pp. 661-667.
- ²⁶ S. Szunerits, R. Boukherroub, "Novel chips for surface plasmon (SPR) detection", brevet WO/2007/036, 544 (2007)
- ²⁷ Maxime Beaugeois, "Modélisation et caractérisation de composants optiques submicroniques pour le démultiplexage en longueur d'onde : application de la résonance de plasmon de surface à la détection d'espèces biologiques en goutte", Thèse de l'Université de Lille1 (2007)
- ²⁸ N.M. Green, "Thermodynamics of the binding of biotin and some analogues by avidin", *Biochem. Journal* (1966), 101, 3, pp. 774-780.
- ²⁹ S. Kaya Özdemir, G. Turhan-Sayan, "Temperature Effects on Surface Plasmon Resonance: Design Considerations for an Optical Temperature Sensor", *J. of Lightwave Technol.* (1995), 21, pp. 805-814.
- ³⁰ E. Galopin, M. beaugeois, B. Pinchemel, J.C. Camart, M. Bouazaoui, V. Thomy, "SPR biosensing coupled to a digital microfluidic microstreaming system", *Biosensors and Bioelectronics* (2007), à paraître.
- ³¹ E. Galopin, M. Beaugeois, F. Lapierre, J.C. Camart, M. Bouazaoui, B. Pinchemel, V. Thomy, "SPR biosensing coupled to a digital microfluidic surface acoustic wave system", μ TAS 2007 Paris, France
- ³² J.W. Lee, S.J. Sim, S.M. Cho, J. Lee, "Characterization of a self-assembled monolayer of thiol on a gold surface and the fabrication of a biosensor chip based on surface plasmon resonance for detecting anti-GAD antibody", *Biosensors and Bioelectronics* (2005), 20, pp. 1422-1427.

Chapitre 4

NanoIDTs pour biodétection intégrée

1. Introduction

La volonté d'intégrer un système de détection in-situ à notre plateforme microfluidique discrète à base d'ondes acoustiques de surface (SAW) nous a menés à nous intéresser à la réalisation d'un nanodispositif de détection de protéines. En effet, malgré les performances du système de détection optique DSPR, il n'était pas envisageable, dans le seul cadre de cette thèse, d'effectuer une intégration du dispositif. Parmi les nombreux objets nanométriques susceptibles de servir de détecteur d'entités biologiques, nous nous sommes intéressés aux biocapteurs SAW. En effet, les ondes de surface ont déjà fait leurs preuves pour des détections de gaz¹ ou de molécules biologiques² car elles présentent une bonne sensibilité à de faibles changements (eg. de masse) à la surface du piézoélectrique. L'onde de Rayleigh, que nous utilisons pour l'actionnement des liquides, est peu appropriée pour le suivi en temps réel d'une interaction : elle est fortement absorbée par le milieu liquide. Néanmoins, au cours de ce travail de thèse, nous avons souhaité dans un premier temps démontrer la faisabilité d'un nanodétecteur à base d'ondes acoustiques de surface, ainsi que le potentiel d'interaction dans un système 'tout SAW'. Ceci permet d'envisager à partir d'un même dispositif, à la fois un déplacement de milieux à analyser, une détection d'interaction biologique et un micromélange intégré pour améliorer les temps et la qualité de détection (voir chap.2).

Dans ce chapitre, nous allons voir tout d'abord le principe de cette biodétection basée sur les ondes acoustiques de surface et l'intérêt d'une montée en fréquence. Un système de biodétection est ensuite présenté : nous détaillons le procédé de fabrication de nanofiltres à ondes acoustiques de surface sur LiNbO₃ et sur AlN/Si par lithographie électronique ; leur fonctionnement à des fréquences au-delà du GHz en fait des dispositifs innovants par rapport à l'état de l'art. Enfin leur caractérisation suite à une fonctionnalisation et une interaction IgG - transferrin nous amènera à étudier leur sensibilité en termes de biodétection.

2. Principe de la détection

2.1. Biodétection par ondes acoustiques de surface

L'architecture de notre dispositif de détection intégrée repose sur l'utilisation d'un deuxième couple de transducteurs (entre lesquels se situe la surface active) au sein de la plateforme SAW fluidique. La seconde paire de transducteur (sur le capot ou sur le trajet de la goutte) permet une biodétection par SAW, alors que la première paire de transducteurs (la base ou les peignes extérieurs) est responsable de l'actionnement microfluidique. Nous rappelons que le choix des

ondes de Rayleigh a été réalisé pour montrer la faisabilité d'intégration dans un système tout SAW avec déplacement de gouttes, micromélange et détection. Le coefficient d'absorption α_L^3 d'une onde Rayleigh (atténuation de la composante transversale, normale) pour une coupe $128^\circ Y$ direction de propagation X, à $\lambda = 100 \mu\text{m}$, vaut $\alpha_L = 820 \text{ m}^{-1}$. Ce qui signifie que 95% de l'énergie est cédée au liquide après une distance de propagation à l'interface Eau/LiNbO₃ de 3,6 mm. Des ondes de type transverses seraient plus appropriées que les ondes de Rayleigh à ce type de détection, car elles permettraient un suivi en temps réel de la cinétique d'interaction.

La biodétection à partir d'ondes acoustiques de surface est basée sur plusieurs sources de perturbation dans les caractéristiques de propagation de l'onde suite à l'interaction à la surface. Un certain nombre de ces phénomènes, conduisant à des modifications de vitesse et des atténuations, ont déjà été mis en évidence. On peut citer par exemple les modifications de masse, les interactions électroacoustiques ou viscoélastiques...⁴ Parmi ces différents phénomènes, les changements dans la vitesse de l'onde (équivalents à un changement de fréquence d'oscillation) par un changement de masse à la surface est le phénomène le plus facile à interpréter et donc le plus utilisé pour évaluer les sensibilités de détection. Un simple changement de masse à la surface perturbe la vitesse de l'onde sans l'atténuer. En réalité, d'autres phénomènes, tels que les propriétés mécaniques ou électriques de la couche ajoutée, participent au changement de fréquence. Cependant, se baser sur une modification de masse à la surface constitue une bonne approximation en premier lieu de l'effet de biodétection⁴. Nous nous intéressons donc ici à cet effet.

Ces changements de masse à la surface sont générés par des phénomènes d'interactions biomoléculaires avec la surface active, à savoir, la modification apportée par la masse d'une protéine s'accrochant à un anticorps spécifique préalablement immobilisé à la surface du piézoélectrique.

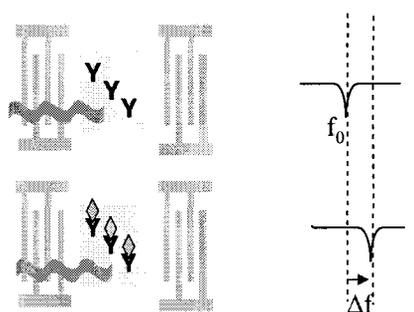


Figure 82 Principe d'une biodétection basée sur la modification de fréquence générée par l'interaction entre une molécule et son anticorps spécifique immobilisé sur la surface du capteur.

Bien que la sensibilité absolue du détecteur soit fonction de la nature du substrat piézoélectrique, des dimensions du dispositif, de la fréquence de fonctionnement, et du mode d'excitation acoustique utilisé, dans tous les cas, une dépendance linéaire est attendue. La description générale de la relation entre les variations de masse à la surface Δm_a et de fréquence Δf_m est la suivante⁴:

$$\Delta f_m = -k S_m \Delta m_a \quad , \quad (63)$$

avec S_m une constante caractéristique du dispositif tenant compte des différents paramètres évoqués ci-dessus, k un paramètre géométrique de la surface active, et Δm_a la variation de masse sur la surface du détecteur. La constante S_m définit la sensibilité de détection, puisqu'elle relie le décalage en fréquence à la variation de masse sur la surface active. Cette constante est exprimée par : $S_m = \frac{-K(\sigma)}{\rho \lambda}$ avec ρ la densité et $K(\sigma)$ une constante du matériau.

Dans le cas des systèmes utilisés nous allons évaluer la sensibilité théorique par la détermination de cette constante S_m .

2.2. Mesures préliminaires à 48 MHz sur LiNbO₃

Des premières mesures qualitatives ont été réalisées avec des transducteurs sur LiNbO₃ autour de 48MHz à partir d'une solution de streptavidine à 15µM. Un analyseur de réseau HP 4195A est utilisé pour les mesures en transmission (paramètres S_{21}) de l'amplitude et de la phase. Des mesures sont menées avant dépôt, puis après dépôt et évaporation de la streptavidine (Figure 83). L'ajout de streptavidine génère une diminution de l'amplitude ainsi qu'une variation de phase⁵.

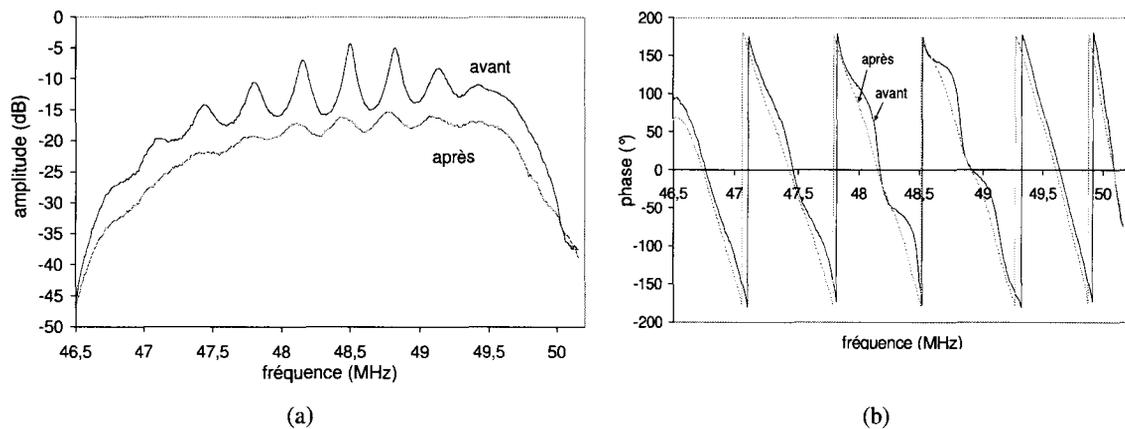


Figure 83 Evolution fréquentielle de la fonction de transfert (paramètres S_{21}) des IDTs : amplitude (a) et phase (b) avant puis après dépôt de streptavidine.

Le nettoyage de l'échantillon (rinçages et UV-Ozone), a montré un retour à la position initiale enregistrée avant le dépôt, attestant que les modifications observées sont bien dues à l'effet des protéines. Les mesures de l'amplitude et de la phase de la fonction de transfert des IDTs autour de 48 MHz ont permis d'évaluer une diminution d'amplitude de 40% et une variation de phase de l'ordre de 20°. Ces premiers tests réalisés à partir des filtres à ondes acoustiques de surface sur LiNbO₃ à 48MHz ont permis de fournir des résultats encourageants qui nous ont menés à poursuivre dans l'optimisation de tels dispositifs.

2.3. Montée en fréquence

Ballentine et al exposent dans leur ouvrage sur les capteurs à ondes acoustiques de surface la relation qui lie le décalage en fréquence à la fréquence de résonance du système⁴:

$$\Delta f_m \propto f^2 \quad (64)$$

La sensibilité du capteur, représentée par le décalage en fréquence, a une évolution proportionnelle à la fréquence au carré. Des fréquences de fonctionnement plus importantes engendrent un meilleur confinement de l'énergie de l'onde à la surface, permettant une meilleure sensibilité aux biomolécules captées sur la surface active. Il est donc très intéressant d'augmenter la fréquence de fonctionnement des capteurs à ondes acoustiques de surface pour améliorer leur sensibilité.

Les biocapteurs SAW sont amplement traités dans la littérature^{6,7,8}. Toutefois, les fréquences classiques de fonctionnement des systèmes enregistrées pour ces applications restent encore en dessous du gigahertz (généralement dans une gamme de quelques dizaines à quelques centaines de MHz). Ceci est lié aux limites de résolution spatiale de la photolithographie (UV). Or, la sensibilité des systèmes de détection (par exemple basée sur le coefficient liant une variation de masse à la surface d'un capteur) augmente considérablement avec la fréquence. Comme nous allons le voir, un système de biodétection basé sur des nanofiltres à ondes acoustiques de surface réalisés par lithographie électronique et fonctionnant à des fréquences au-delà du GHz est une thématique innovante par rapport à l'état de l'art.

3. NanoIDTs sur LiNbO₃ et AlN

3.1. Adaptation d'impédance et design

Dans un premier temps, il a fallu dimensionner les IDTs en tenant compte de l'adaptation d'impédance. Le recouvrement W des peignes doit satisfaire à la relation suivante afin que ces derniers soient adaptés à 50 Ohms (chap.2 §2.2.2) :

$$W = 1.4 \frac{Kr^2}{2\pi\epsilon_s R_0 f_0} \quad (65)$$

avec R_0 l'impédance réelle que l'on impose à 50Ω , Kr le coefficient de couplage égal à 17 % dans le cas de l'AlN et 4,9% dans le cas du X-LiNbO₃ (direction Y), ϵ_s la permittivité égale à $7,5 \cdot 10^{-11}$ F/m pour l'AlN et à $40,7 \cdot 10^{-11}$ F/m pour le LiNbO₃, et $f_0 = V/\lambda$ (pour λ la périodicité) la fréquence de résonance avec $V_{\text{AlN}}=6000$ m/s et $V_{\text{LiNbO}_3}=3200$ m/s.

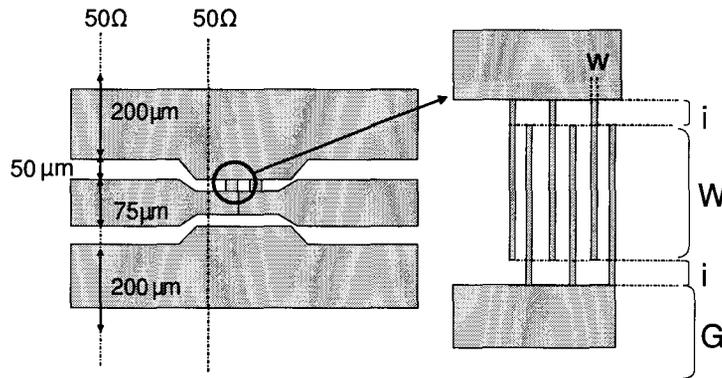


Figure 84 Schéma présentant les différentes grandeurs dimensionnées du système.

Une fois la valeur du recouvrement des peignes déterminée, il est nécessaire d'optimiser la géométrie de la ligne coplanaire pour l'adapter en impédance en tenant compte du recouvrement et de l'espacement des pointes hyperfréquences utilisées pour les mesures. Les pointes les plus appropriées sont espacées de 120µm. Le logiciel APPCAD est utilisé afin de dimensionner les lignes (Figure 84).

Tableau 7 : Dimension de ligne coplanaire pour AlN 3µm sur silicium.

w (nm)	λ (µm)	f_0 (GHz)	W (µm)	i (µm)	G (µm)	Z_0 (Ω)
500	2	3	33,7	3	65,5	50
300	1,2	5	19,8	2	40	50
200	0,8	7,5	12,5	1,25	24,5	50

Tableau 8 : Dimension des IDTs pour LiNbO₃.

w (nm)	λ (µm)	f_0 (GHz)	W (µm)	i (µm)
500	2	1,70	360	24
300	1,2	2,80	219	11
200	0,8	4,25	144	6

Différentes structures ont été testées, en faisant varier des paramètres tels que l'espacement entre deux IDTs pour une détection en transmission et le nombre de peignes (d'un côté ou des deux côtés de la ligne coplanaire...). Ces structures sont répertoriées Figure 85. Nous avons également testé des structures à résonateurs.

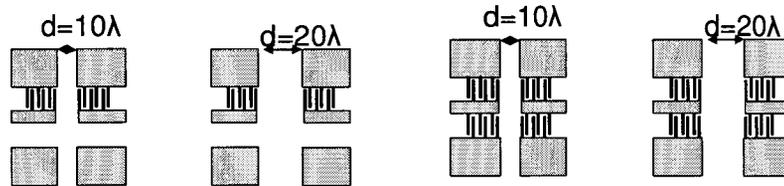


Figure 85 Schéma montrant les différentes structures réalisées.

3.2. Réalisation par lithographie électronique

Etant donné la dimension des peignes souhaités, les IDTs sont réalisés par lithographie électronique. L'écriture directe est réalisée grâce à un nanomasqueur LEICA EBPG 5000plus 100kV. La solution la plus simple consiste en une insolation sur résine positive pour réaliser un lift off des peignes. Le procédé utilisé pour la lithographie électronique (Figure 86) est réalisable sur différents substrats. Dans ce cas, les dimensionnements, les corrections de proximité ainsi que les doses sont à modifier suivant le matériau utilisé.

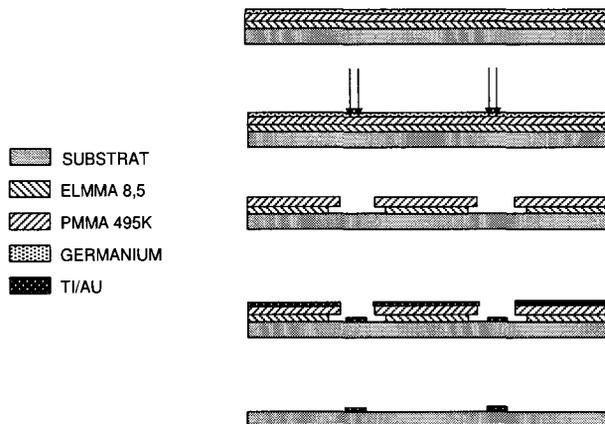


Figure 86 Réalisation de peignes interdigités par écriture directe sur une bicouche PMMA/MAA.

L'utilisation d'un bicouche PMMA/PMMA-MAA (PolyMethylMethAcrylate/PolyMethyl MethAcrylate-MethAcrylic Acid) permet d'obtenir un bon 'profil casquette' grâce à la différence de sensibilité des deux couches. Tous les dépôts de résine électronique ont été réalisés avec un système d'enduction équipé d'une tournette de type GYRSET. De plus, afin de limiter les

phénomènes de charge de surface pendant l'exposition électronique, une couche de 30Å de germanium est évaporée sur la bicouche.

Du fait de la dimension, et de la grande densité des peignes (peignes de 300/500 nm espacés de 300/500nm, sur 20/30µm de longueur) ainsi que de la proximité des zones de contacts macroscopiques, une correction de proximité fine des coefficients d'exposition est réalisée. Le logiciel de correction de proximité PROXECO AISS couplé à un logiciel de Simulation SKELETON AISS permet une correction sur 128 coefficients.

L'exposition est réalisée avec une tension d'accélération de 50 kV, un courant de 1100 pA et des doses variant de 150 à 300 µC/cm², suivant la taille des motifs et le type de substrat. La couche de germanium est ensuite retirée en 30s dans un mélange H₂O/H₂O₂ (1/1 en volume) et l'échantillon est rincé 20s dans l'EDI. La révélation est obtenue dans un mélange méthyl-isobuthyl-ketone/Isopropanol (MIBK/IPA : 1/2 en volume) pour 30s, suivi d'un rinçage dans l'IPA pour 50s. On effectue ensuite une évaporation thermique de 5nm de titane comme couche d'accroche, et de 100 nm d'or sur les motifs précédemment définis. L'opération de lift-off réalisée dans l'acétone est extrêmement délicate étant données la dimension et la densité des motifs et doit être réalisée avec le plus grand soin.

3.2.1. Essais sur LiNbO₃

Dans un premier temps, notre volonté était de réaliser un système intégré tout SAW. Le choix s'est donc porté sur la réalisation des nanoIDTs directement sur LiNbO₃. Nous présentons à titre d'information les essais réalisés, bien que les résultats obtenus sur ce matériau n'aient pas été à la hauteur de nos espérances. Plusieurs types de résines ont été testés (PMMA, ZEP520, FOX12). Nous présentons les essais réalisés sur PMMA.

Compte tenu de l'épaisseur de métal désirée (100nm) une bicouche de type PMMA950K/(MAA17,5)4% est réalisée. Nous avons alors rencontré une première difficulté : un recouvrement de la casquette inférieure après révélation vraisemblablement associé à un problème d'adhérence de la résine. La surface polie du LiNbO₃, n'offre pas une bonne adhérence, et la partie inférieure (plus sensible) de la bicouche est entièrement révélée avant que les motifs définis par la couche supérieure ne soient bien dimensionnés. L'association de ces deux phénomènes génère un soulèvement des peignes (Figure 87).

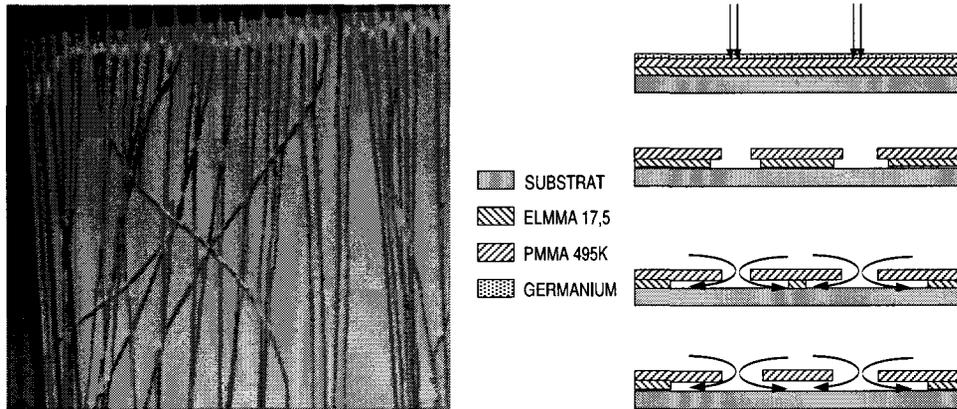


Figure 87 Schéma et photographie des IDTs d'interdigit 500nm montrant les problèmes d'adhérence et de recouvrement de casquette de la bicouche PMMA/MAA sur LiNbO₃.

Le substrat étant piézoélectrique, il est délicat de réaliser une déshydratation à 200° sur plaque permettant d'améliorer l'adhérence. On utilise de préférence un recuit à 170° en four suivi d'un retour à température ambiante contrôlé sous flux d'azote juste avant le dépôt. De plus, sachant que la couche sensible en MAA adhère moins bien que la PMMA, nous avons testé une bicouche PMMA/PMMA avec deux sensibilités différentes.

Tableau 9 : étapes de la réalisation d'une bicouche PMMA.

<i>PMMA 495K capot ouvert (2000A)</i>
v=1000 a=1000 t=12s
Evaporation solvants puis recuit 170° 30min
<i>PMMA ARP 679-03 950K capot fermé</i>
V=2100 a=1000 t=8s
Evaporation solvants puis Recuit 170° 30min
<i>Développement</i>
½ MIBK / ½ IPA dans 100ml
Laisser à agitation 100 2min
Plonger l'échantillon 1min sans agiter
Rinçage IPA 30s

Comme on peut le voir sur le cliché MEB de la Figure 88, la casquette obtenue n'est pas satisfaisante avec cette bicouche.

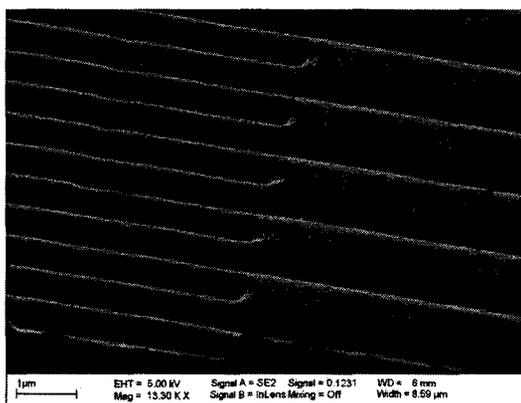


Figure 88 Cliché MEB d'une bicouche PMMA/PMMA métallisée.

Il s'est donc révélé nécessaire d'employer une bicouche avec la résine MMA la moins sensible possible (MMA 8,5) associé à une PMMA très sensible 495K 3%. Des doses ont pu être déterminées pour l'empilement exposé ci-dessus. Le tableau suivant résume les étapes technologiques permettant la réalisation de nanoIDTs sur LiNbO_3 .

Tableau 10 : étapes technologiques pour la réalisation de nano-IDTs sur LiNbO_3 .

Déshydratation Substrat	Four 170° 15min
Dépôt COPO13% (MMA8,5) = 4500A	v=4500 a=1000 t=12 capot fermé v=500 a=1000 t=10 capot ouvert
Recuit	Laisser évaporer les solvants Recuit 170° étuve 30min
Dépôt PMMA 495K 3% = 600A	v=3500 a=1000 t=12 capot fermé v=1000 a=1000 t=10 capot ouvert
Recuit	Laisser évaporer les solvants Recuit 170° étuve 30min
Dépôt Germanium = 30A	Evaporation thermique
Insolation	Peignes : dose 155 μC , contacts : dose 250 μC
Attaque de la couche de germanium	$\text{H}_2\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O} : 1/1, 20\text{s}$
Révélation	MIBK/IPA (20ml/30ml) – Laisser stabiliser en température pendant 2min à agitation 100 tours/min (mélange endothermique) révélation 30s - rinçage IPA 50s

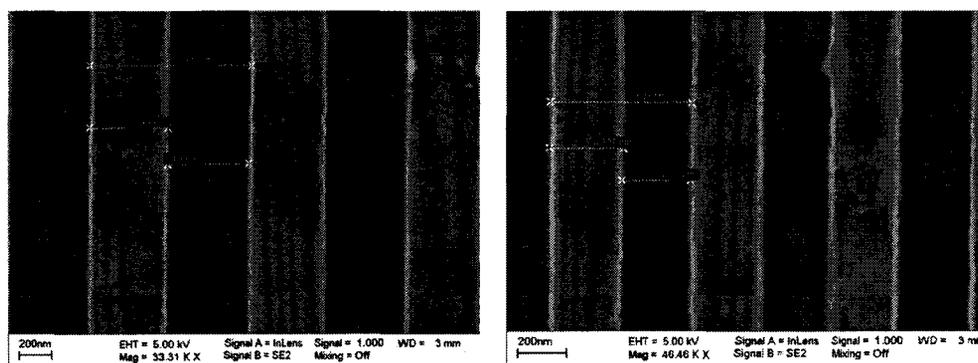


Figure 89 Clichés MEB des peignes sur LiNbO_3 (gauche) peignes de 500nm d'interdigit (droite) peignes de 300nm d'interdigit.

Même en ayant déterminé les doses correspondant aux motifs souhaités, nous n'avons pas réussi à obtenir un système pouvant être testé électriquement. En effet, en plus des problèmes d'adhérence et de casquette précités, s'ajoutent :

- des difficultés d'évacuation des charges malgré la couche de Ge (substrat isolant épais de 1mm, dont les dimensions latérales empêchent le positionnement optimum des pinces pour l'évacuation des charges au porte substrat)
- des difficultés de mise au point automatique en z du masqueur électronique (découvert postérieurement aux réalisations technologiques). En effet, le masqueur s'assure que l'échantillon est dans le bon plan grâce à une diode laser (785nm) et une photodiode à cadrans. Or le LiNbO_3 est transparent à la longueur d'onde laser (gamme 420-5200nm⁹), la photodiode ne reçoit pas assez de lumière et la mesure de hauteur ne se fait pas.

Ces problèmes de mise au point et de mauvaise évacuation des charges se manifestent par des décalages de motifs, comme on peut le voir sur la Figure 90. La présence de courts-circuits rend inutilisable les motifs réalisés. Pour palier aux difficultés de mise au point du nanomasqueur, il serait alors nécessaire de réaliser une écriture sans mesure de hauteur. Par contre, nous n'avons pas encore déterminé de solution systématique pour une meilleure évacuation des charges.

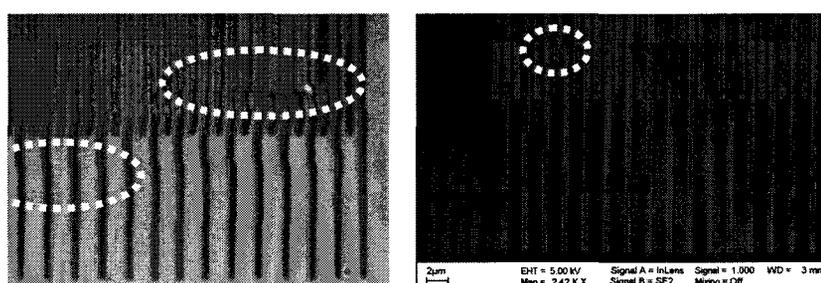


Figure 90 (Gauche) Photographie d'une mauvaise évacuation des charges (Droite) Cliché MEB d'un problème de mise au point automatique en z du nanomasqueur.

Suite à ces nombreuses difficultés pour la réalisation de peignes en lithographie électronique sur LiNbO_3 , vraisemblablement dus à l'association matériau/masqueur, nous avons eu l'opportunité de tester le procédé sur des couches de nitrure d'aluminium (AlN) déposées sur silicium.

3.2.2. Réalisation sur AlN/Si

Dans le cas de la réalisation des biocapteurs sur le substrat d'AlN la configuration finale du dispositif est entre deux plans (2D) : la première paire de transducteurs permettant l'actionnement du liquide est réalisée sur la base, la seconde paire de transducteurs dédiée à la détection est située sur le capot d'AlN. En effet, les dépôts d'AlN ($2\mu\text{m}$ sur silicium) autorisent également la génération d'ondes de Rayleigh. L'AlN présente une vitesse de propagation de 6000 m/s et un coefficient de couplage de 17% . Les substrats sont réalisés par V. Mortet à l'IMEC et ont déjà faits leur preuve dans la réalisation de composants SAW¹¹. Les couches d'AlN sont optimisées à l'IEMN par A. Talbi et A. Soltani.

Résumé des étapes technologiques pour la réalisation de nano-IDTs sur AlN.

Déshydratation substrat	15min sur four à 170°
Dépôt COPO13% (MMA8.5) = 4500Å	$v=4500\text{ a}=1000\text{ t}=12$ fermé $v=500\text{ a}=1000\text{ t}=10$ ouvert
Recuit	Laisser évaporer les solvants Recuit 170° étuve 30min
Dépôt PMMA 495K 3% = 600 Å	$v=3500\text{ a}=1000\text{ t}=12$ fermé $v=1000\text{ a}=1000\text{ t}=10$ ouvert
Recuit	Laisser évaporer les solvants Recuit 170° étuve 30min
Dépôt germanium = 30 Å	Evaporation thermique
Ecriture	$210\text{ }\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (peignes 500 nm) $190\text{ }\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (peignes 300 nm) $260\text{ }\mu\text{C}/\text{cm}^2$ (contacts)
Attaque de la couche de germanium	$\text{H}_2\text{O}_2 / \text{H}_2\text{O} : 1/1$, 20 secondes
Révélation	MIBK/IPA (20ml/30ml) Stabiliser 2min - Agitation 100ours/min Révélation 30s- Rinçage IPA 50s

Nous avons donc reproduit les étapes technologiques réalisées sur le niobate de lithium avec le dimensionnement et les doses adaptés à l'AlN. Il a ainsi été possible d'obtenir des peignes d'interdigit 500 nm et 300 nm (Figure 91). La réalisation des peignes d'interdigit 200 nm nécessitent d'affiner encore la correction de proximité.

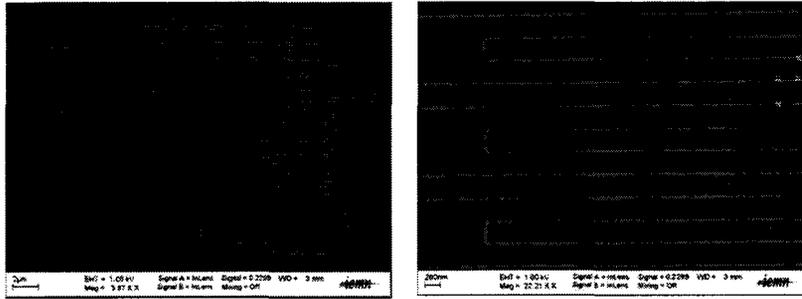


Figure 91 Clichés MEB des IDTs de largeur 300nm réalisés par lithographie électronique.

3.3. Caractérisation (paramètres S_{ij})

Les caractérisations électriques hyperfréquences sont réalisées à partir d'un analyseur de réseaux Agilent 8753 sur la plateforme de caractérisation de l'IEMN. L'environnement est contrôlé en température. Les IDTs présentant un interdigit de 500nm possèdent une fréquence de résonance de 3,8 GHz, et les IDTs d'interdigit 300nm présentent une fréquence de résonance de 5,5 GHz. La différence des fréquences observées avec les fréquences calculées au paragraphe 3.1 serait due à l'observation du mode 1 de Rayleigh au lieu du mode 0 classique calculé, en raison du fort coefficient électromécanique associé au mode¹⁰.

Les résonances aux fréquences attendues ne présentent toutefois pas un bon facteur de qualité (Figure 92). Par contre, on observe un mode légèrement supérieur à $f/2$ qui présente une bonne sélectivité en fréquence et se situe tout de même aux alentours de 2,1 à 2,8 GHz suivant les systèmes. Nous choisissons donc de nous intéresser à ce mode.

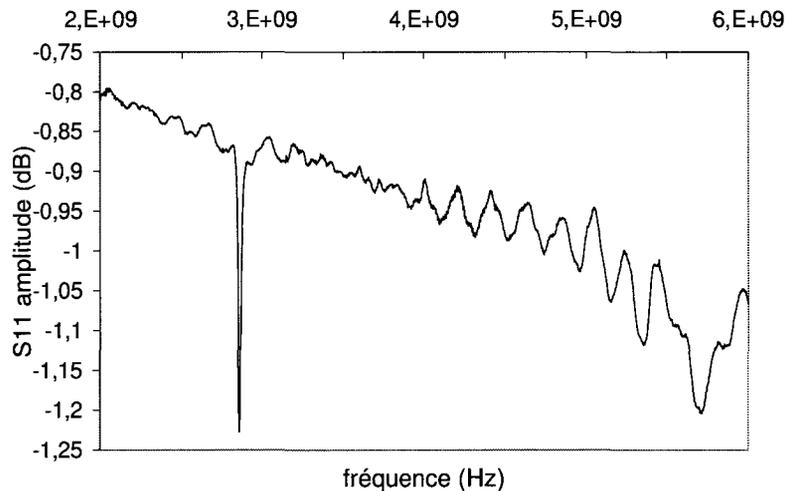


Figure 92 Amplitude (dB) du S_{11} d'un transducteur d'interdigit 300nm en large bande entre 2 et 6 GHz.

4. Détection d'interactions biologiques

La réalisation de dispositifs à ondes acoustiques de surface fonctionnant au-delà du gigahertz sur AlN a été présentée par Kirsch et al¹¹ en 2006. Cependant, de tels dispositifs, même si les applications biologiques y sont évoquées, n'ont pas encore été testés en tant que biodétecteur. Nous présentons ici la fonctionnalisation d'une surface active associée aux peignes préalablement réalisés, et une première détection d'interactions anticorps/antigènes à partir de ces nanosystèmes.

4.1. Fonctionnalisation de l'AlN

L'immobilisation des IgG humain anti-transferrine a été réalisée par le couplage ester NHS exposé ci-dessous. Les réactifs utilisés pour la préparation et la fonctionnalisation des surfaces AlN sont des produits Sigma-Aldrich. Les réactifs chimiques et biologiques comprennent du toluène, de l'aminopropyltriéthoxysilane (APTES), et de agents de couplage 1-ethyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC), N-hydroxysuccinimide (NHS). La transferrine et les IgG Anti-transferrine proviennent de chez AbD Serotec.

L'immobilisation covalente de biomolécules sur l'AlN a été montrée en 2005 par Baur et al¹². La surface d'AlN est facilement hydroxylable, et peut donc, moyennant un traitement par plasma ou UV-Ozone, présenter suffisamment de liaisons -OH afin de réaliser une silanisation. En effet, la création des groupements hydroxyles à la surface de l'AlN est une étape essentielle dans la procédure de greffage des anticorps. Les étapes de réalisation sont résumées ci-dessous.

Hydroxylation	UV-Ozone (création sur l'AlN d'un film d'oxyde fin présentant des groupements -OH) 30min
Silanisation : SAMs APTES	Solution d'APTES dans toluène (1/10 v/v) 1,5h. Rinçage toluène frais US 5min Rinçage IPA, séchage azote
Activation et greffage	Mélange NHS/EDC (EDC: 750mg/10mL, NHS: 115mg/10mL, 1:1 v/v) 15min. Ajout IgG Anti-transferrine humaine 30µg/ml. Sous agitation légère 24h.

4.2. Mesure électrique de l'interaction Ab-Ag

Il a été mentionné (§3.1, Figure 85) que plusieurs types de structures ont été réalisés et plusieurs configurations testées (interdigits, transmission, réflexion, nanorésonateurs...). Nous présentons ici la détection réalisée à partir des résonateurs d'interdigit 300nm (Figure 93) dont la

fréquence de résonance se situe au-delà de 5 GHz, cependant, nous nous intéressons pour les raisons citées (§3.3) au mode en $f/2$.

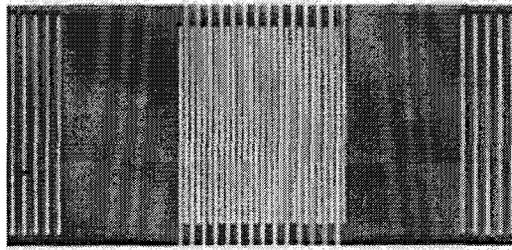


Figure 93 Photographie du dispositif comprenant les nanoIDTs de digit 300 nm, et des réflecteurs situés de part et d'autre des peignes.

Le transducteur présenté Figure 93 est constitué de peignes interdigités en Ti/Au de 15 paires de doigts, présentant un recouvrement de $19,8 \mu\text{m}$. Les réflecteurs sont placés à 10λ sur chaque côté des IDTs et présentent une périodicité de λ .

4.2.1. Mesure des paramètres S_{ij}

Les paramètres S_{ij} sont mesurés avant la fonctionnalisation, puis après l'interaction IgG anti-transferrine/transferrine¹³. Ces étapes sont suivies de rinçages nécessaires à l'EDI étant donné l'utilisation d'ondes de Rayleigh. L'étape de rinçage peut être automatisée au sein du système microfluidique, permettant également de profiter d'une augmentation de sensibilité par l'utilisation du micromélange in-situ. Les mesures sont ensuite réalisées en milieu sec.

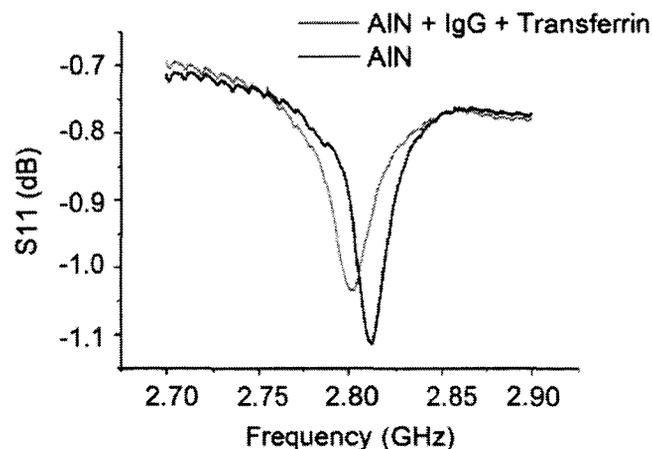


Figure 94 Evolution de l'amplitude du paramètre S_{11} d'un résonateur autour de 2,8 GHz avant fonctionnalisation, et après l'interaction IgG / transferrine.

La Figure 94 montre l'évolution de l'amplitude du paramètre S_{11} pour un système de longueur d'onde $1,2 \mu\text{m}$ autour du mode étudié. On remarque (Figure 94) que la biointeraction provoque une absorption du signal, et un décalage de la résonance vers les basses fréquences. Les réponses

de 21 systèmes d'interdigit 300 nm et de 14 systèmes d'interdigit 500 nm ont été comparées pour ce même mode. Les premiers présentent une résonance autour de 2,81 GHz, avec un écart type de $8,9 \cdot 10^{-3}$, alors que les seconds présentent une résonance autour de 2,10 GHz, avec un écart type de $4,9 \cdot 10^{-3}$. Les résultats des mesures sont répertoriés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 11: résultats de la fonctionnalisation pour les deux types de peignes interdigités (mesures S_{11} pour le mode résonant vers $f/2$).

Longueur d'onde	f_0 (GHz) Mesurée	Ecart type	Δf (1gG, MHz)	Ecart type	Nombre de systèmes testés
2 μm	2,10	$4,9 \cdot 10^{-3}$	8,5	$1,4 \cdot 10^{-3}$	14
1,2 μm	2,81	$8,9 \cdot 10^{-3}$	16,1	$1,5 \cdot 10^{-3}$	21

Le tableau ci-dessus illustre le gain expérimental en sensibilité obtenu grâce à la montée en fréquence sur les mesures S_{11} pour le mode résonant vers $f/2$. On remarque bien que le décalage en fréquence obtenu à partir des peignes fonctionnant à 2,1 GHz est bien inférieur à celui obtenu pour les peignes plus petits fonctionnant à 2,81 GHz, et ceci pour la même variation de masse.

Nous avons vu (§2.1) le principe des biocapteurs à base d'ondes acoustiques de surface, et nous avons pu exprimer le coefficient de sensibilité S_m dans le cas d'un effet de masse. Si on s'intéresse au cas particulier de l'AlN, sa densité ρ est égale à $3,26 \text{ g/cm}^3$, et $K(\sigma)^{14,15}$ vaut 1,45 en prenant $\sigma = 0,27$. Le coefficient de sensibilité S_m pour des ondes de Rayleigh sur AlN pour des longueurs d'onde de 1,2 μm et 2 μm est alors respectivement de $3706,5 \text{ Hz.cm}^2/\text{g}$ et de $2239,2 \text{ Hz.cm}^2/\text{g}$. La surface active fonctionnalisée correspond à l'aire située entre les deux réflecteurs (10 μm par 20 μm). En considérant que le facteur géométrique k est égal à 1 (zone sensible correspondant à la zone entre les peignes et les réflecteurs), la relation directe entre le décalage en fréquence et la variation de masse est respectivement de $\Delta f_m = -3706,5 \Delta m_a$ et de $\Delta f_m = -2239,2 \Delta m_a$.

Ceci nous permet d'estimer que la quantité de biomatériau effectivement immobilisé sur la surface active est d'environ 8mg dans les deux cas. En prenant en compte le poids moléculaire du complexe, la quantité de biomatériau immobilisé est d'environ 53nmol. Cependant, le faible niveau de bruit du système de caractérisation permet en réalité de détecter (dans les conditions utilisées qui ne sont par ailleurs pas ultimes : mesure réalisée sur 1600 points, entre 2,7 et 2,9 GHz) un décalage de 125kHz. Cela correspond à une sensibilité envisageable de 400pmol.

5. Conclusion

Ce chapitre a présenté la réalisation de dispositifs à ondes acoustiques de surface par lithographie électronique sur AlN/Si permettant la génération d'ondes acoustiques de surface à plusieurs GHz et leur utilisation comme nanobiodétecteur. Des fréquences fondamentales de 5,5 GHz et de 3,8 GHz ont été obtenues. Le premier avantage de notre système par rapport aux nombreux dispositifs à ondes acoustiques de surface déjà développés réside dans la réalisation accomplie de hautes fréquences de fonctionnement, qui, grâce à un meilleur confinement de l'énergie de l'onde à la surface, offrent une meilleure sensibilité aux biomolécules captées sur la surface active.

Nous avons estimé la sensibilité du système sur une interaction de type 'IgG anti-transferrine humaine/transferrine' pour le mode de résonance en $f/2$, choisi pour son bon facteur de qualité. L'immobilisation moyenne sur le système est évaluée à 50nmol. La sensibilité basée sur le système de mesure avec les paramètres utilisés est de 400pmol.

Les essais technologiques sur niobate de lithium, bien que n'ayant pas donné lieu ici à une concrétisation du dispositif de détection, sont montrés à titre informatif dans la perspective du transfert de la lithographie sur quartz. En effet, les procédés lithographiques et les effets observés sur LiNbO_3 sont similaires à ceux attendus sur le quartz. Les difficultés technologiques ayant maintenant été identifiées et des solutions ayant été évoquées, la poursuite de ces essais pourra mener à la constitution d'un système tout intégré et au transfert du procédé élaboré au quartz permettant le suivi en temps réel d'une interaction biologique. Même si les ondes de Rayleigh ne permettent pas un suivi en temps réel, les systèmes réalisés présentent la possibilité d'une intégration dans un système entièrement piloté par SAW. L'utilisation de tels nanodétecteurs bénéficie de la facilité d'intégration avec un système microfluidique digital par ondes acoustiques de surface, permettant non seulement des déplacements d'analytes sous forme de gouttes, des étapes de rinçages automatisées, mais surtout un adressage fluidique intégré du biodétecteur, paramètre essentiel dans la réalisation de nanodétecteurs, comme nous l'avons vu à de multiples reprises.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE 4

- ¹ A. Talbi, F. Sarry, F. Moreira, M. Elhakiki, O. Elmazria, L. Le Brizoual, P. Alnot, “Zero TCF ZnO/Quartz SAW structure for gas sensing applications”, IEEE Intern. Ultrasonics, Ferroelectrics and Frequency Control Joint 50th Anniversary Conference (2004), pp. 542-545.
- ² K. Länge, F. Bender, A. Voigt, H. Gao, M. Rapp, “A Surface Acoustic Wave Biosensor Concept with Low Flow Cell Volumes for Label-Free Detection”, Anal. Chem. 75 (2003), pp. 5561-5566.
- ³ K. Dransfeld, E. Salzmann, “Excitation, detection and attenuation of high-frequency elastic surface waves”, Physical Acoustics, vol. 7, Academic Press (1970).
- ⁴ D. Ballantine, R. White, R. Martin, A. Ricco, E. Zellers, G. Frye, H. Wohltjen, “Acoustic wave sensors: theory, Design, and Physico-Chemical Applications”, 1997, (Academic Press).
- ⁵ E. Galopin, J.C. Camart, V. Thomy, “Filtres à ondes acoustiques de surface pour biodétection spécifique de protéines exprimées par cellules immobilisées”, JNRDM'06 (2006).
- ⁶ K. Länge, G. Blaessa, A. Voigt, R. Götzenb, M. Rapp “Integration of a surface acoustic wave biosensor in a microfluidic polymer chip”, Biosensors and Bioelectronics (2006), 22, 2, pp. 227-232.
- ⁷ T.M. Gronewold, U. Schlecht, E. Quandt, “Analysis of proteolytic degradation of a crude protein mixture using a surface acoustic wave sensor”, Biosens. and Bioelec. (2007), 22, pp. 2360-2365.
- ⁸ M. Schlenso, T. Gronewold, M. Tewes, M. Famulok, E. Quandt, “Surface acoustic biosensors using aptamers as ligands”, Functional Micro&Nanosystems, Ed. Hoffmann, Springer (2004), pp. 105-114.
- ⁹ R. Weis, T. Gaylord, “Lithium niobate: Summary of physical properties and crystal structure”, Applied Physics A (1985), 37, 4, pp. 191-203.
- ¹⁰ V. Yantchev, J. Enlund, J. Biurström, I. Katardjiev, “Design of high frequency piezoelectric resonators utilizing laterally propagating fast modes in thin aluminium nitride (AlN) films”, Ultrasonics (2006), 45, pp. 208-212.
- ¹¹ P. Kirsch, M. B. Assouar, O. Elmazria, V. Mortet, P. Alnot, “5 GHz surface acoustic wave devices based on aluminum nitride/diamond layered structure realized using electron beam lithography“, App. Phys. Lett. (2006), 88, pp. 223504-01.
- ¹² B. Baur, G. Steinhoff, J. Hernando, O. Purrucker, M. Tanaka, B. Nickel, M. Stutzman, M. Eickhoff, “Chemical functionalization of GaN and AlN surfaces”, App. Phys. Lett. (2005), 87, pp. 263901.
- ¹³ E. Galopin, O. Ducloux, Y. Deblock, A. Talbi, A. Soltani, J-C. Camart, V. Thomy, V. Mortet, “Gigahertz surface acoustic wave nanoresonators as a sensitive biosensing technique”, Article en soumission dans App. Phys. Lett. Octobre 2007.
- ¹⁴ S. Wenzel, R. White, “Analytic comparison of the sensitivities of bulk-wave, surface-wave, and flexural plate-wave ultrasonic gravimetric sensors”, App. Phys. Lett. (1989), 54, pp. 1976–1978.
- ¹⁵ J.F. Shackelford, W. Alexander, “The CRC materials science and engineering handbook”, CRC Press, Boca Raton, FL, (2001)

Chapitre 5

**Culture de cellules en goutte et
microfluidique discrète**

1. Introduction

Nous l'avons évoqué, les protéines sont les acteurs majeurs de l'activité cellulaire. Mais les cellules étant des entités biologiques à dynamique complexe, des hétérogénéités dans leur expression protéique apparaissent sous l'action de divers phénomènes (eg. dommage localisé, mutation, différence d'exposition à un stimulus extérieur, gradient chimique, stade dans la vie de la cellule^{1,2}). La découverte des causes menant à ces différenciations est cruciale, que ce soit pour la compréhension des mécanismes moléculaires ou pour permettre de détecter des maladies à un stade précoce.

Toutefois l'observation de cette production protéique est difficile sur un ensemble de cellules avec les techniques de mesure classiques, dû au manque de synchronisation des cellules dans leur phase d'expression. Il faut donc développer de nouveaux outils dédiés à l'étude sur cellules isolées pour avancer dans la compréhension de ces phénomènes. L'analyse protéomique sur cellule unique isolée est considérée comme un des outils intéressants à exploiter pour s'affranchir des effets de proximité cellulaire. Actuellement les études biologiques standard ne le permettent pas : les mesures réalisées sur cellules uniques sont confrontées à un manque de sensibilité des outils pour la compréhension des phénomènes impliqués dans des cellules individuelles. Certes, la réalisation de laboratoires sur puce dédiés à des applications biologiques n'est plus un objectif mais une réalité et la technologie microfluidique est également arrivée à maturité pour la réalisation d'outils dédiés à la biologie ; pourtant, l'étude protéomique de cellules isolées physiquement les unes des autres est encore un enjeu majeur. Dans ce contexte, la microfluidique associée aux outils des micro et nanotechnologies, possèdent des atouts spécifiques pour la manipulation de très petites quantités d'analytes dans un environnement contrôlé à l'échelle micronique et représentent donc un outil puissant pour l'étude de cellules sur puce.

Pour permettre un isolement effectif et un contrôle unidirectionnel des cellules, nous proposons de mener la culture de cellules directement dans des gouttes, qu'on peut alors considérer comme des micro-boîtes de Pétri. Notre but est donc de réaliser une culture de cellules en gouttes puis un actionnement microfluidique des gouttes vers une zone sensible permettant l'analyse ou la détection des marqueurs sécrétés dans le milieu. Il est également envisagé de mettre en contact deux populations de cellules cultivées en goutte par cette technique afin de réaliser des études de communication intercellulaire.

Dans ce chapitre, nous abordons dans un premier temps un état de l'art succinct sur la manipulation et l'isolement de cellules uniques sur puce. Nous présentons ensuite le système proposé, ainsi que les différentes étapes de réalisation. Le but ultime du système étant l'isolement d'un nombre limité de cellules en gouttes, puis leur déplacement par ondes acoustiques de surface vers une zone d'analyse de protéines sécrétées. Enfin, nous montrons quelques résultats préliminaires, ainsi que les perspectives de ce système.

2. Culture de cellules en gouttes

2.1. La manipulation de cellules en microfluidique

Typiquement, les cultures de cellules sont réalisées en boîtes de Pétri, ou en plaques multipuits contenant des milliers de cellules par puits. Ces cultures classiques atteignent leurs limites pour certaines applications : d'une part les cellules baignent dans un microenvironnement spatio-temporel complexe et difficile à contrôler. Le fait de moyenner des analyses sur un ensemble de cellules empêche la visibilité de cellules malades dans un stade précoce de développement d'une maladie. D'autre part, considérant les diverses manipulations et transferts manuels, la parallélisation des études et le criblage à haut débit deviennent inadaptés (durée, complexité...).

L'isolement et l'analyse sur cellules uniques offrent la possibilité d'étudier ces phénomènes, ce qui n'est pas envisageable avec les méthodes conventionnelles, et qui plus est sur un grand nombre de cellules. Pour ce faire, la microfluidique dispose de nombreuses ressources pour la manipulation, l'isolement, et diverses opérations sur cellules. Le nombre de dispositifs permettant des opérations sur cellules isolées ne cesse de croître³. La cytométrie en flux permet par exemple d'analyser les propriétés physiques ou chimiques de cellules uniques dans un flux avec un débit de quelques centaines de cellules à la seconde pour les dispositifs modernes. Alors que l'on constate une multiplication des techniques de manipulation de cellules uniques dans la littérature (techniques optiques, mécaniques, électriques...), isoler effectivement puis analyser une cellule unique n'est encore que rarement présenté⁴. Actuellement il existe encore peu de microsystèmes fluidiques pour l'analyse chimique directe de cellules uniques isolées⁵.

Les techniques de manipulation de cellules uniques comprennent entre autres : les systèmes classiques de pompes et valves^{6,7} ou de microchambres⁸, la vectorisation par l'écoulement⁹, les pièges optiques¹⁰ ou optoelectroniques¹¹, les forces diélectrophorétiques¹². Les systèmes à base de PDMS sont particulièrement étudiés pour isoler des cellules uniques^{13,14,15}. Malgré la gamme étendue de ces techniques de manipulations de cellules uniques, dans la plupart de ces systèmes,

il y a communication par l'intermédiaire du milieu de culture. Ceci est illustré Figure 95 dans ce système de pièges à cellules uniques, basé sur un principe de vectorisation par l'écoulement¹³.

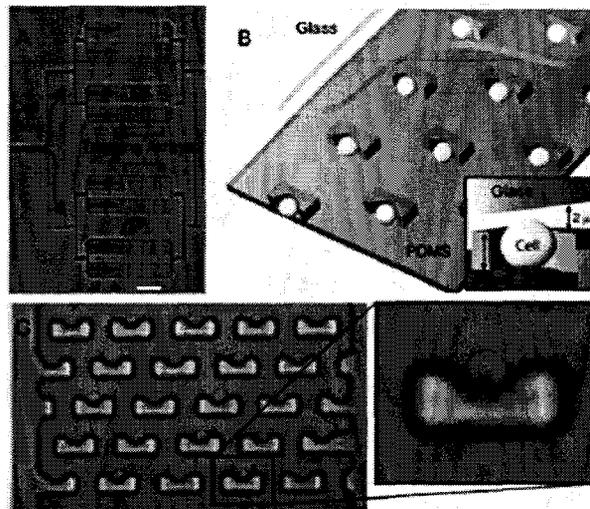


Figure 95 Réseau de pièges de cellules uniques dans un écoulement microfluidique (A) Architecture en branches et chambres contenant les pièges (B) Schéma du système: pièges en PDMS sur verre (C) photographie du dispositif et agrandissement d'un piège contenant une cellule unique¹³.

Toutefois, depuis peu, la littérature recense quelques systèmes permettant l'isolement puis le déclenchement de la mise en contact de deux populations de cellules. C'est le cas par exemple dans les travaux de Hui et Bhatia où deux types cellulaires sont d'abord cultivés à proximité via deux armatures initialement séparées, puis mis en contact (Figure 96)¹⁶. Ce système permet l'étude de la communication entre les deux types cellulaires utilisés.

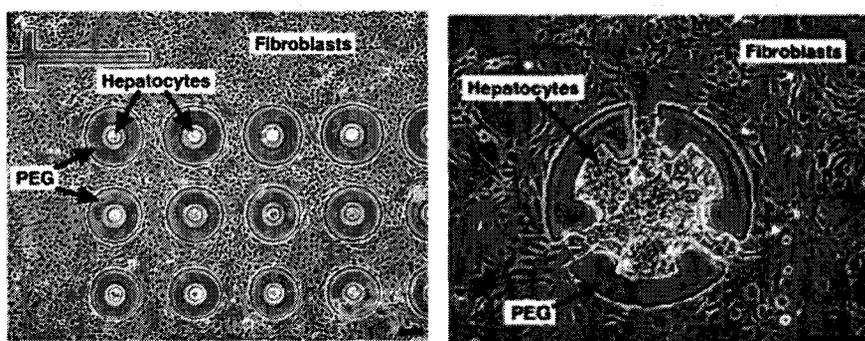


Figure 96 (gauche) Image montrant l'architecture de séparation hépatocyte-fibroblastes. (droite) Mise en contact localisée des hépatocytes et fibroblastes¹⁶.

Dans la plupart des techniques de manipulation et d'isolement de cellules précitées, l'analyse protéomique est étudiée mais reste encore problématique²⁰.

2.2. La culture de cellules en gouttes

La culture de cellules en gouttes a déjà été introduite dans les études sur cellules uniques. Il s'agit dans le premier cas pour He et al¹⁷ d'une observation par fluorescence d'un résidu de lysat encapsulé dans un écoulement di-phasique (goutte dans milieu immiscible). Dans l'autre cas, il s'agit du projet 'Dropchip' du CEA¹⁸ visant à réaliser une transfection directe puis une analyse par fluorescence de gouttes de cellules sur puce. Le CEA réalise en effet, sur des lames de microscope de 15cm², des biopuces accueillant jusqu'à 1000 gouttes de culture cellulaire ne contenant chacune qu'une centaine de cellules (Figure 97).

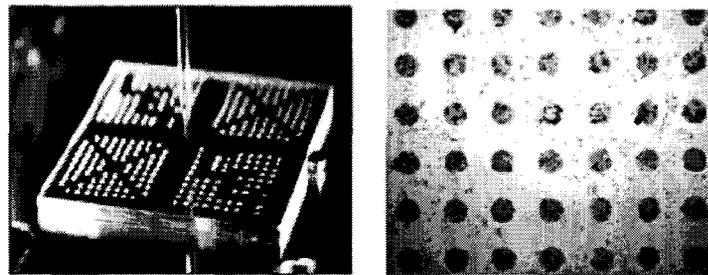


Figure 97 'Dropchip' (Gauche) gouttes de 100 nL sur des spots de 500 µm réalisés par spotteur piézoélectrique¹⁸ (Droite) cellules HeLa concentrés sur les spots.

Ces deux systèmes de culture de cellules ne permettent cependant pas d'étude protéomique. En effet, dans le cas du système de He et al, l'écoulement est diphasique. La cellule étant encapsulée dans une goutte entourée par une phase non miscible, une analyse protéomique est proscrite. Dans le cas du Dropchip, il s'agit d'une culture statique, c'est-à-dire qu'aucun actionnement des gouttes de culture cellulaire n'est réalisé. Cette technique permet donc l'observation de certains phénomènes cellulaires visibles par fluorescence, mais, pas encore une étude protéomique.

2.3. Proposition de système de culture de cellules en goutte

Le système proposé vise à cultiver des gouttes de cellules sur puce et ensuite à déplacer par ondes acoustiques de surface, les gouttes contenant les protéines sécrétées vers une zone sensible (analyse protéomique ou détection spécifique). L'analyse est associée à un micromélange pour améliorer l'interaction liquide/surface. Après le déplacement du milieu sécrété, les cellules cultivées restent sur leur plot initial et se lysent du fait de la disparition du liquide.

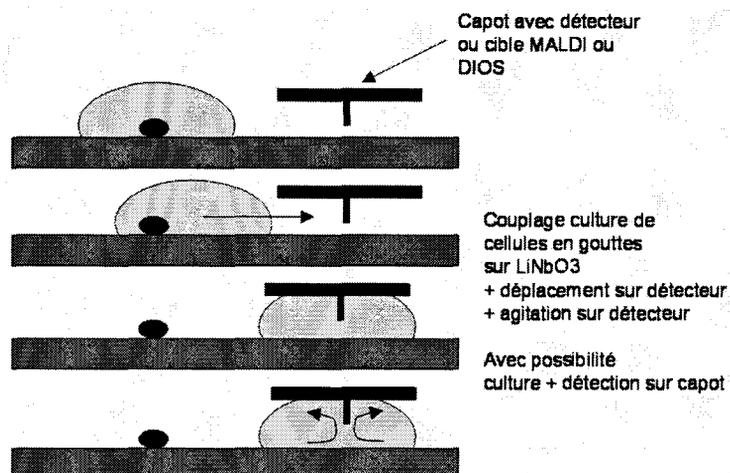


Figure 98 Principe du système de culture de cellules en goutte et actionnement consécutif par ondes acoustiques de surface vers une zone sensible.

Une goutte est un excellent bioréacteur ; en effet, son contenu subit une circonvolution perpétuelle du matériau tout en permettant un bon échange gazeux avec l'environnement. D'autre part, elle contient assez de réactif pour nourrir les cellules plusieurs jours, ce qui est amplement suffisant puisque nous allons observer les cellules après 20h de culture.

2.4. Préparation du substrat (chimie)

On réalise sur le substrat une surface d'OTS (octadecyltrichlorosilane) composée de motifs d'APTES (Aminopropytriéthoxysilane). Une monocouche autoassemblée (SAMs) d'OTS est tout d'abord réalisée sur la surface du substrat, comme explicité dans le chapitre 2 (§2.3). Des ouvertures sont réalisées dans la monocouche d'OTS en utilisant une exposition à l'UV-Ozone pendant 45 minutes à travers un masque en quartz. Le masque utilisé est composé d'ouvertures circulaires de $140 \mu\text{m}$ espacés de $400 \mu\text{m}$.

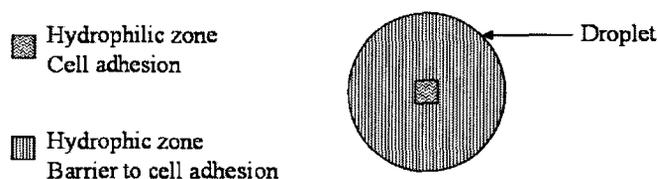


Figure 99 Principe de la zone hydrophile fonctionnalisée entourée d'OTS.

Une SAMs d'APTES est ensuite réalisée en phase vapeur dans les ouvertures d'OTS fraîchement effectuées. La surface est donc hydroxylée.

2.5. Culture de cellules

Les différents essais réalisés en culture de cellules sont effectués dans le cadre d'une collaboration avec Ikram El-Yazidi Belkoura et le Laboratoire de Biologie du Développement, SN3 de Lille. Les divers réactifs pour la culture de cellules ont été fournis par Bio-Whittaker (Belgique) ainsi que par Sigma (France). Les lignées de cellules cancéreuses utilisées (MCF-7 et MDA-MB-231) ont été fournies par l' 'American Type Culture Collection'.

Pour des études sur l'effet de facteurs de croissance, il est nécessaire d'utiliser un milieu de sevrage, car le milieu complet contient lui-même des facteurs de croissance (ainsi que de la fibronectine et de la transferrine qui risqueraient d'alourdir le milieu). Pour obtenir une population limitée de cellules par goutte, nous avons réalisé diverses dilutions, qui nous ont permis de déterminer la plus appropriée au système. Le protocole de culture utilisé est le suivant :

Tableau 12 : protocole de culture de cellules MCF-7 et MDA 231 en milieu de sevrage.

Trypsiniser les cellules (1ml de trypsine pour 5ml de milieu de culture)
Remettre les cellules dans le milieu de culture complet : ce dernier comprend les éléments inhibiteurs de la trypsine, contrairement au milieu de sevrage.
Centrifuger et aspirer le milieu de culture
Ajout de 10ml de milieu de sevrage au culot de cellules
Réaliser une dilution au $\frac{1}{4}$, (1ml de ce mélange dans 3 ml de milieu de sevrage)

Les gouttes de cellules sont cultivées dans une étuve à vapeur saturante, comprenant 30% de CO₂, pendant 20h pour permettre une bonne adhérence et prévenir la division cellulaire (qui s'effectue au bout de 24h environ). Nous avons réalisé plusieurs cultures à partir de MDA-231 et de MCF7, afin de tester la plus appropriée. Les MCF7 se sont montrées plus sensibles à l'effet de confluence, mais s'étalent mieux que les MDA 231.

Le système est constitué d'un microréseau de gouttes de cellules cultivées sur un substrat qui pourra être soit directement le LiNbO₃, soit un substrat de silicium, qui servira de substrat couplé à une utilisation de LiNbO₃ en capot. Le substrat de niobate de lithium situé en capot sert à l'actionnement des gouttes après la période de culture. Les gouttes sont réalisées manuellement dans un premier temps. Les zones fonctionnalisées sont visibles sur les substrats en verre par l'intermédiaire de repères déposés conformément au masque.

Le système de culture que nous avons utilisé prévient l'évaporation des gouttes. Il comprend (Figure 100):

- Une boîte de Pétri (100mm) et un capot de boîte de Pétri (60mm) retourné dans la première boîte de Pétri isolant le substrat du PBS
- Un fond de PBS Isotonique
- Le substrat déposé sur le couvercle de la boîte de Pétri 60mm.

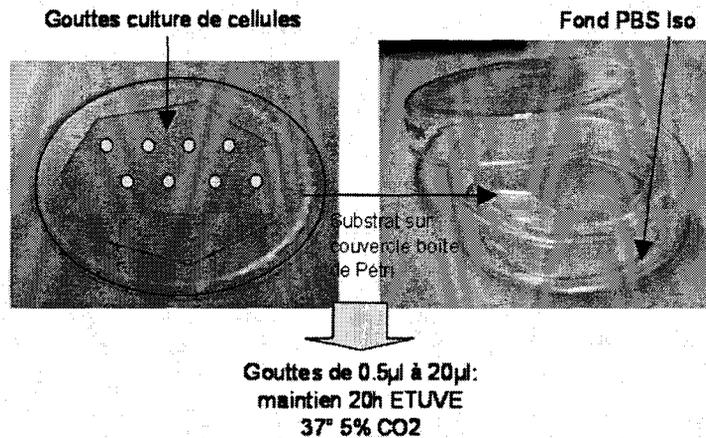


Figure 100 Principe du système de culture de cellules en goutte utilisé.

2.6. Tests préliminaires : culture en gouttes statiques

Dans un premier temps, nous avons validé la culture de cellules en gouttes statiques, c'est-à-dire que nous avons réalisé des gouttes de culture de tailles différentes, puis nous avons observé les cellules cultivées dans les gouttes, et validé la culture en goutte.

Des gouttes allant de 10µl à 500nl ont été réalisées pour appréhender la culture de cellule en gouttes suivant le volume utilisé. Après 20h d'incubation, on observe que le système de double boîte de Pétri a bien empêché l'évaporation de toutes les gouttes. L'adhérence des cellules dans les gouttes est bien validée, même si l'on observe que dans les gouttes de volume inférieur à 5µl, les cellules s'étalent moins, on observe moins de clones (Figure 101).



Figure 101 Observation de l'adhérence des cellules MCF-7 dans des gouttes de milieu de culture, pour une goutte de volume (gauche) supérieur et (droite) inférieur à 5µl.

Le principe de la culture en microréacteur sous forme de goutte ainsi que le dispositif à double boîte de Pétri sont ainsi validés. Comme les gouttes sont amenées à être déplacées par un système d'ondes acoustiques de surface, par commodité et pour limiter l'évaporation pendant l'actionnement, nous travaillons sur des volumes de gouttes de quelques microlitres (2 μ l, 5 μ l).

3. Actionnement des gouttes par SAW

3.1. Opérations fluidiques en gouttes

Pour rappel (chap.2 §3), lorsque les ondes acoustiques de surface se propagent à la surface du piézoélectrique et rencontrent une goutte d'eau sur la trajectoire, la composante transverse de l'onde de Rayleigh est absorbée et une onde longitudinale est rayonnée dans la goutte suivant l'angle de Rayleigh. Le gradient de pression impliqué crée un écoulement dans la goutte. La surface libre de la goutte est soumise à déformation, et suivant la puissance utilisée, plusieurs phénomènes sont obtenus, du micromélange à l'éjection totale de la goutte. Suivant certaines conditions, on peut également créer des gouttes filles, éjectées d'une goutte mère plus volumineuse. Nous allons voir dans ce paragraphe les différentes possibilités d'actionnement envisagées pour les cultures en goutte (Figure 102).

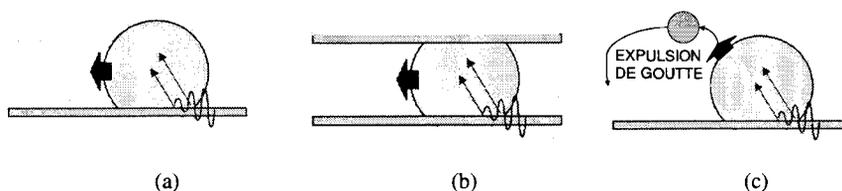


Figure 102 Différentes configurations et opérations possibles avec les ondes acoustiques de surface : (a) sur un plan (b) entre deux plans (c) expulsion d'une goutte.

Nous proposons un système basé sur une microfluidique digitale à base d'ondes acoustiques de surface pour permettre diverses opérations sur les cellules grâce à sa souplesse d'actionnement de microgouttes. Nous avons évalué l'hystérésis du milieu de sevrage dans lequel les cellules sont cultivées sur le niobate de lithium (Figure 103). L'hystérésis est d'environ 30°. Nous nous attendons à devoir appliquer de fortes puissances pour le déplacement.

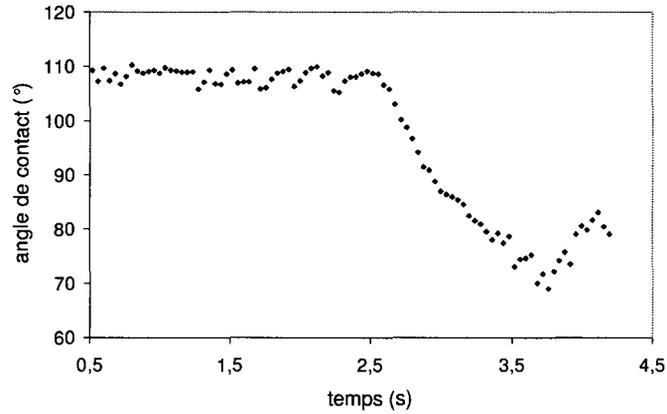


Figure 103 Angle de contact en fonction du temps du milieu de sevrage sur LiNbO₃.
On observe une hystérésis de 30° environ pour le milieu de sevrage sur LiNbO₃.

3.2. Test préliminaire : effet des ondes

L'action des ondes acoustiques de surface sur des cellules immobilisées sur le substrat de niobate de lithium a été évaluée. Une culture de cellules MCF-7 est réalisée sur la surface du LiNbO₃ dans les conditions précédemment évoquées. Puis, on observe l'effet de l'application des ondes acoustiques de surface sur les cellules.

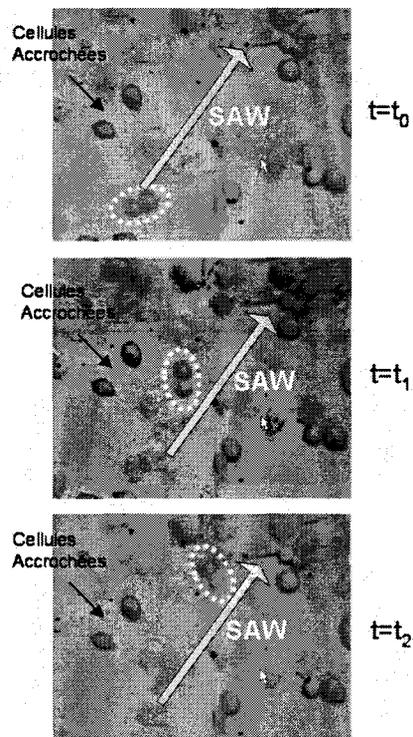


Figure 104 Séquence d'images de cellules cultivées sur LiNbO₃ et soumise à une excitation SAW (36dBm). Les cellules immobilisées restent viables et les cellules en suspension se dirigent dans la direction des ondes.

On remarque sur la Figure 104 que les cellules immobilisées restent valides et que les cellules en suspension se dirigent dans la direction des ondes, sous l'action de la pression acoustique générée (36dBm, 20s). On peut donc conclure que l'application des ondes acoustiques de surface sur les cellules n'entraîne ni lyse ni déplacement.

Le même test a été reproduit au sein de gouttes de 2 μ l. Des images des cellules immobilisées dans la goutte sont réalisées avant, puis après une excitation par ondes acoustiques de surface. La puissance utilisée est juste en dessous du seuil permettant le déplacement (36dBm). L'excitation est maintenue pendant 20 secondes.

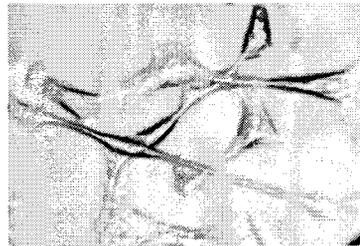


Figure 105 Cellules MCF7 dans une goutte de 2 μ l ayant subi une excitation SAW à 20MHz (36dBm), pendant 20 secondes.

D'après les tests réalisés, les cellules ne souffrent pas d'une excitation par ondes acoustiques de surface (20MHz, 36dBm, 20s). Elles adhèrent à la surface, et ne sont pas lysées.

3.3. Culture et actionnement sur le substrat

Les gouttes de cellules immobilisées sur le substrat de niobate de lithium X-LiNbO₃ comme expliqué précédemment au paragraphe 2.5 sont maintenant déplacées à la suite de la période d'incubation. Une excitation par ondes acoustiques de surface (20MHz, 40dBm) est menée. Les séquences du déplacement sont montrées Figure 106.

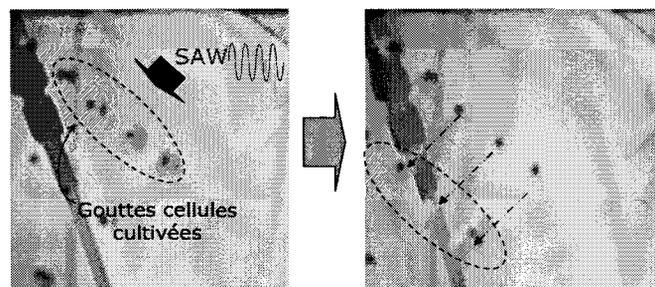


Figure 106 Déplacement par SAW à 40dBm de gouttes : 5 μ l de cellules cultivées 20h à l'étuve dans le milieu de sevrage (Gauche) avant l'excitation SAW (Droite) après le déplacement.

Comme attendu du fait de la forte hystérésis (§3.1), le déplacement des gouttes est alors difficile et engendre une forte adsorption sur le substrat et un étalement du matériau biologique.

3.4. Culture sur le substrat et actionnement par le capot

Le dispositif est légèrement modifiée afin d'essayer de remédier à l'adsorption engendrant une difficulté de déplacement : la culture est réalisée en capot, et le substrat de niobate de lithium n'est utilisé qu'après la culture pour déplacer les gouttes. Ainsi, il n'y a pas d'adsorption sur la surface du niobate de lithium pendant la culture, et l'hystérésis est réduite du côté de l'actionnement. La force de frottement étant au moins doublée dans une configuration à deux plans (Chap.2 §2.3.2), l'énergie transmise à la goutte n'a toutefois pas été suffisante pour permettre le déplacement.

3.5. Expulsion de goutte

Pour s'affranchir du problème d'hystérésis et d'adsorption pendant le déplacement, une autre méthode consiste à utiliser une configuration en 'un plan' permettant l'expulsion de gouttes filles. Pour permettre l'expulsion de gouttes filles, nous utilisons une excitation par pulse RF. Différentes largeurs de pulses T_0 et de puissances d'entrée ont été testées pour permettre une expulsion depuis une goutte mère de $3\mu\text{l}$ de milieu de sevrage (Figure 107).

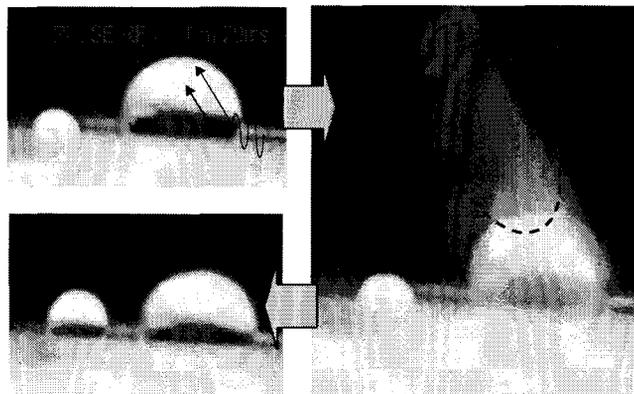


Figure 107 Expulsion d'une goutte fille depuis une goutte mère de $3\mu\text{l}$ de milieu de sevrage vers une deuxième goutte de milieu de sevrage située à 1mm, avec un pulse RF de 20ms générant un train d'ondes à 41dBm¹⁹.

L'expulsion d'une goutte fille de milieu de sevrage depuis une goutte mère de $3\mu\text{l}$ vers une deuxième goutte de milieu de sevrage située à 1mm, avec un pulse RF de 20ms générant un train d'ondes à 41dBm est donc possible. Cette manipulation de goutte permet la mise en communication du milieu exprimé par des cellules à d'autres cellules dans un microréacteur

‘goutte’, de façon unidirectionnelle et ponctuelle. Une telle manipulation permet donc la maîtrise des évènements spatio-temporels. Toutefois, à cause de la complexité des paramètres en jeux, le manque de reproductibilité de l’expulsion ne permet pas de prédire de façon systématique le volume de la goutte fille, ce qui pose pour l’instant des problèmes de quantification du transfert.

4. Perspectives

4.1. La communication intercellulaire

Depuis peu, l’étude sur la cellule unique est devenue une méthode très attractive pour comprendre les effets des communications entre groupes de cellules²⁰. La communication intercellulaire est un phénomène crucial pour le développement et la régulation des tissus et de l’organisme : la communication entre deux cellules voisines peut engendrer des changements majeurs dans leur morphologie, leur croissance, ou l’expression des gènes²¹. Une altération de cette communication peut ainsi conduire à diverses maladies, telles que le cancer^{22,23,24}. Même si la littérature est abondante sur les observations des mécanismes de communication, les processus exacts régulant la cancérisation n’ont pas encore été élucidés sur le plan moléculaire²⁵. Actuellement, le transfert de marqueurs fluorescents entre deux cellules (taggées et non taggées) en contact membranaire est la méthode la plus utilisée²⁶. Mais ces méthodes amènent une perte d’information importante : il est difficile, voire impossible, de contrôler spatio-temporellement le contact entre les deux cellules, et alors, la cinétique de transfert est perdue. On observe également récemment des dispositifs permettant la communication entre deux types cellulaires (cellules épithéliales adhérentes et globules rouges sanguins en circulation) par l’intermédiaire d’une membrane en polycarbonate²⁷.

Mettre en place des outils complets d’étude des mécanismes de communication intercellulaire n’est pas aisé. Une période préalable de séparation et d’isolement des deux cellules, où les cellules ne communiquent pas entre elles par l’intermédiaire du milieu de culture est préférable pour permettre de réaliser une référence spatio-temporelle. La mise en communication par l’intermédiaire de voies biochimiques (les protéines exprimées par exemple) peut ensuite être réalisée. Alors que la microfabrication apporte des solutions pertinentes pour le développement d’outils d’analyse de cellules sur puce²⁸, on remarque récemment la réalisation d’un dispositif microfluidique pour l’isolement de paires de cellules et leur caractérisation en vue du suivi de la communication intercellulaire²⁹. Le dispositif permet à deux cellules de populations différentes d’être mises en contact par l’intermédiaire de canaux microfluidiques en 3D. Cette architecture permet de vérifier qu’une cellule n’est en contact membranaire qu’avec une seule autre cellule, créant ainsi un contact sélectif entre deux populations de cellules.

Le système proposé, permettant la culture de cellules en gouttes avec la possibilité de les actionner par ondes acoustiques de surface, se positionne comme une solution simple pour étudier ces phénomènes. Elle permet le contrôle précis de l'environnement cellulaire (réelle isolement des cellules voisines, apport de supports biologiques par l'intermédiaire de la microfluidique discrète...) et aussi la mise en contact (unidirectionnelle ou bidirectionnelle) de milieux sécrétés permettant de déclencher une communication chimique entre les populations de cellules.

4.2. Vers une analyse ou une détection intégrée en capot

Dans la poursuite de cette recherche, un système intégré peut être envisagé en couplant une zone d'analyse fonctionnalisée ou un détecteur spécifique sur le capot du système. Notamment, un couplage entre la culture de cellules en gouttes et le suivi par plasmon de surface en goutte (DSPR) des événements cellulaires (cf. profondeur de champ du plasmon chap.3 p.89) est une possibilité envisagée.

D'autre part, étant donné la taille 'réduite' du NGF (environ 50kDa), il est possible d'analyser les surfaces spécifiques anticorps/NGF directement en MALDI, sans avoir besoin d'un prétraitement de type trypsinisation. Ainsi, le couplage entre la culture de cellules en goutte et l'analyse par MALDI du NGF sécrété peut être réalisé comme il est montré sur la Figure 108. La séquence comprend la culture de cellules, l'ajout d'une goutte de matrice (chap.1 §3.1), puis le passage sur zone spécifique anti-NGF permettant ensuite l'analyse par spectrométrie de masse.

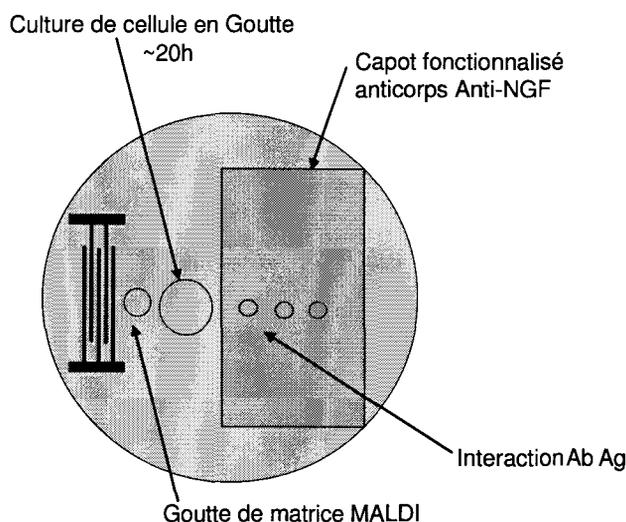


Figure 108 Principe du système proposé pour analyse MALDI du NGF sécrété par les cellules cultivées en gouttes.

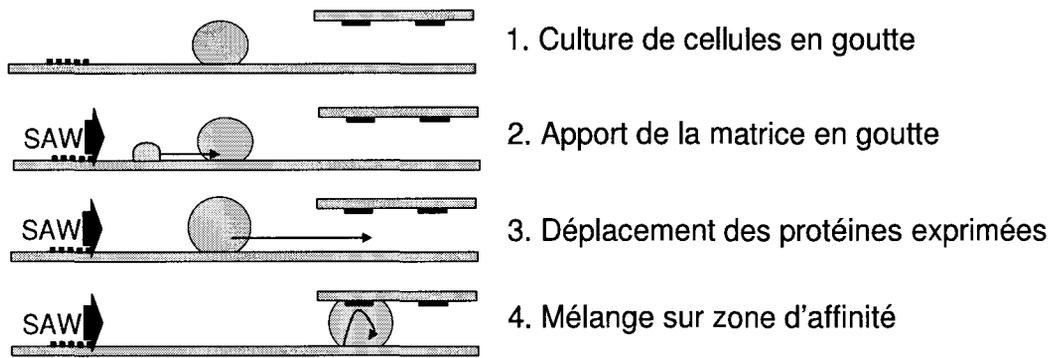


Figure 109 Détail des différentes étapes. La même paire d'IDTs permet le déplacement des gouttes, et le mélange sur zone d'affinité.

Cette étape simplifiera le déplacement, puisque l'ajout d'une goutte de matrice MALDI amènera à une hystérésis plus faible en élargissant la base de la goutte.

5. Conclusion

Les travaux présentés dans ce chapitre montrent que la microfluidique discrète à base d'ondes acoustiques de surface se positionne comme une solution technologiquement simple et efficace pour les différentes opérations nécessaires à l'analyse sur cellules isolées dans les laboratoires sur puce. Elle permet en effet grâce à une culture de cellules en goutte, d'étudier la sécrétion de protéines de populations limitées de cellules, et offre un outil puissant pour la compréhension de la communication intercellulaire et des effets de groupe.

La détection de très petites quantités de marqueurs provenant d'une population limitée de cellules est encore un défi en raison des limites de sensibilités des systèmes de détection fonctionnant sans adressage fluide. Le système proposé ouvre une voie sur l'amélioration de ces performances en utilisant un mélange acoustique du milieu sécrété et déplacé au niveau de la zone sensible. Le système présente aussi l'avantage d'une bonne adaptabilité, étant donné qu'un nettoyage soigneux de la plateforme de niobate de lithium est suffisant avant sa réutilisation, et que les capots comprenant les zones sensibles peuvent être changés à volonté. Cette culture de cellules isolées dans des gouttes ainsi que le déplacement consécutif des protéines sécrétées présente, de plus, de nombreuses possibilités dans l'étude de la communication intercellulaire.

Nous avons validé dans une première phase la viabilité de la culture de cellules en gouttes. Nous avons réussi à maintenir en conditions de culture pendant la période d'incubation nécessaire (une vingtaine d'heures) des volumes de gouttes de 0,5µl à quelques microlitres, et à valider l'adhérence des cellules.

Ensuite, une excitation de ces gouttes de cellules cultivées a été menée dans l'optique de déplacer le milieu sécrété par les cellules vers une zone de détection intégrée. Même si le déplacement des gouttes a effectivement été obtenu, nous avons observé une forte adsorption du milieu sur le substrat avec une difficulté importante de déplacement. Les développements futurs de ce travail concernent l'intégration d'un système de détection en capot ou d'une zone d'affinité. Nous espérons que l'aboutissement du système, couplé à une biodétection classique ou émergente, apportera un outil novateur d'étude de cellules isolées, de compréhension des phénomènes intercellulaires et de découverte de marqueurs précoces.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES DU CHAPITRE 5

- ¹ W. Xiong, J.E. Ferrell, “A positive-feedback-based bistable ‘memory module’ that governs a cell fate decision”, *Nature* (2003), 426, pp. 460–465.
- ² O. Brandman, J.E. Ferrell, R. Li, T. Meyer, “Interlinked Fast and Slow Positive Feedback Loops Drive Reliable Cell Decisions”, *Science* (2005), 310, pp. 496–498.
- ³ G. Roman, Y. Chen, P. Viberg, A. Culbertson, C. Culbertson, “Single cell manipulation and analysis using microfluidic devices”, *Anal Bioanal Chem* (2007) 387, pp. 9–12.
- ⁴ H. Yu, B. Li, A. Sharon, X. Zhang, “Parallel analysis and sorting chip for single cell study”, *Proceed. microTAS’05* (2005) Boston, pp. 862-864.
- ⁵ L. Cai, N. Friedman, X.S. Xie, “Stochastic protein expression in individual cells at the single molecule level”, *Nature* (2006), 440, pp. 358-362.
- ⁶ F. Balagadde, L. You, C. Hansen, F. Arnold, S. Quake, *Science* (2005), 309, pp. 137–140.
- ⁷ A. Wheeler, W. Throdsset, R. Whelan, A. Leach, R. Zare, Y. Liao, K. Farrell, I. Manger, A. Daridon, “Microfluidic device for single cell analysis”, *Anal. Chem.* (2003), 75,14, pp. 3581-3586.
- ⁸ W.H. Huang., W. Cheng, Z. Zhang, D.W. Pang, Z.L. Wang, J.K. Cheng, D.F. Cui, “Transport, location, and quantal release monitoring of single cells on a microfluidic device”, *Analytical Chemistry* (2004), 76, 2, pp. 483-488.
- ⁹ C. Poulsen, C. Culbertson, S. Jacobson, J. Ramsey, “Static and Dynamic Acute Cytotoxicity Assays on Microfluidic Devices”, *Anal Chem* (2005), 77, pp. 667–672.
- ¹⁰ W. Hellmich, C. Pelargus, K. Leffhalm, A. Ros, D. Anselmetti, “Single cell manipulation, analytics, and label-free protein detection in microfluidic devices for systems nanobiology”, *Electrophoresis* (2005), 26, pp. 3689–3696.
- ¹¹ P. Chiou, A. Ohta, M. Wu, “Massively parallel manipulation of single cells and microparticles using optical images”, *Nature* (2005), 436, pp. 370–372.
- ¹² A. Rosenthal, B. Taff, J. Voldman, “Quantitative modelling of dielectrophoretic traps”, *Lab Chip* (2006), 6, pp. 508-515.
- ¹³ D. Di Carlo, L. Wu, L. Lee, “Dynamic single cell culture array”, *Lab Chip* (2006), 6, pp. 1445-1449.
- ¹⁴ J. Marcus, W. Anderson, S. Quake, “Microfluidic single-cell mRNA isolation and analysis”, *Anal Chem* (2006), 78, pp 956-958.
- ¹⁵ H. Wu, A. Wheeler, R. Zare, “Chemical cytometry on a picoliter-scale integrated microfluidic chip”, *Proc Natl Acad Sci* (2004), 101, pp. 12809–12813.
- ¹⁶ E. Hui, S. Bhatia, “Microscale Control of Cell Contact and Spacing via Three-Component Surface Patterning”, *Langmuir* (2007), 23, 8, pp. 4103-4107.
- ¹⁷ M. He, J. Edgar, G. Jeffries, R. Lorenz, J. Shelby, D. Chiu, “Selective Encapsulation of Single Cells and Subcellular Organelles into Picoliter- and Femtoliter-Volume Droplets”, *Anal. Chem.* (2005), 77, 6, pp. 1539–1544.

- ¹⁸ B. Schaack, J. Reboud, S. Combe, B. Fouqué, F. Berger, S. Boccard, O. Filhol-Cochet, F. Chatelain, “A DropChip Cell Array for DNA and siRNA Transfection Combined with Drug Screening”, *NanoBiotechnology* (2005), 1, pp. 185-189.
- ¹⁹ E. Galopin, F. Lapierre, J-C Camart, V. Thomy, I. Belkoura El-Yazidi, “Cancerous cells culture in μ droplets and consecutive SAW microfluidic actuation for cell-cell communication study”, Article en preparation.
- ²⁰ J. Irish, N. Kotecha, G. Nolan, “Mapping normal and cancer cell signalling networks: towards single-cell “proteomics””, *Nature Reviews Cancer* (2006), 3, 6, pp. 146-155.
- ²¹ M. Abercrombie, “Contact inhibition: the phenomenon and its biological implications”, *Natl. Cancer Inst. Monogr.* (1967), 26, pp. 249-277.
- ²² C. Borek, S. Higashino, W.R. Loewenstein, “Intercellular communication and tissue growth: conductance of membrane junctions of normal and cancerous cells in culture”, *Journal of Membrane Biology* (1969), 1, 1, pp. 274-293.
- ²³ M. Mesnil, “Connexins and cancer”, *Biology of the Cell* (2002), 94, pp. 493-500.
- ²⁴ S. Bhatia, U. Balis, M. Yarmush, M. Toner, “Effect of cell-cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells”, *FASEB J.* (1999), 13, pp. 1883–1900.
- ²⁵ R Kleppe, E. Kjarland, F. Selheim, “Proteomic and Computational Methods in Systems Modeling of Cellular Signaling”, *Current Pharmac. Biotech.* (2006), 7, 3 , pp. 135-145.
- ²⁶ G. Goldberg, P. Lampe, B. Nicholson, “Selective transfer of endogenous metabolites through gap junctions composed of different connexins”, *Nat. Cell Biol.* (1999), 1, pp.457-459.
- ²⁷ L. Genes, N. Tolan, M. Hulvey, R. Martin, D. Spence, “Addressing a vascular endothelium array with blood components using underlying microfluidic channels”, *Lab Chip* (2007), 7, pp. 1256–1259.
- ²⁸ J. Ali, P. Sorger, K. Jensen, “Cells on chips”, *Nature* (2006), 442, pp. 403-411.
- ²⁹ P. Lee, P. Shaw, L. Luke, “Microfluidic application-specific integrated device for monitoring direct cell-cell communication via gap junctions between individual cell pairs”, *Applied Physics Letters* (2005), 86, pp. 223902.

Conclusion générale

Ce travail visait la conception, la réalisation et la caractérisation de briques élémentaires d'un laboratoire sur puce pour l'analyse sensible de protéines sécrétées par un nombre restreint de cellules. Il a nécessité la mise en place de collaborations en raison de son caractère interdisciplinaire. Le travail de thèse a consisté en :

- l'étude des systèmes de détection puis la fabrication et caractérisation du système retenu
- l'intégration dans un système microfluidique visant une exaltation de sa sensibilité
- la culture de cellules in-situ en gouttes et l'adressage du milieu vers le biocapteur.

Il a fallu appréhender les spécificités liées aux laboratoires sur puce dédiés à la détection de protéines et mettre à profit les grandeurs caractéristiques essentielles en microfluidique permettant la maîtrise des liquides biologiques. Dans une optique de travail sur concentration très faible, avec contrôle du transport de masse et adressage fluidique, nous avons décrit les atouts représentés par la microfluidique discrète. En particulier, les ondes acoustiques de surface (SAW) sont apparues comme présentant de nombreux avantages :

- opérations fluidiques diverse et contrôlées sur petits volumes de liquide variés,
- amélioration de l'interaction liquide/solide,
- possibilités d'intégration de systèmes de détection variés en capot fonctionnel.

En définitive, l'utilisation du micromélange SAW ouvre bien la voie à l'analyse de très petites quantités de fluide provenant des cellules isolées en faible nombre : isolement de cellules en gouttes, actionnement du milieu et adressage vers diverses zones actives.

L'intégration de mélanges efficaces dans les laboratoires sur puce est un thème récurrent de la microfluidique. Les interactions sont difficiles du fait des flux laminaires. Les performances des nanodétecteurs atteignent ainsi des limites dues aux problèmes d'adressage fluidique. Nous avons étudié le micromélange par SAW et en particulier l'interaction 'ondes de surface/liquide/solide'. Nous avons mis au point différents moyens de caractérisation (fluorescence, dilution, suivi de particules). Malgré les difficultés reconnues pour la caractérisation et la simulation de ce phénomène, le travail a permis d'apporter une meilleure compréhension du mécanisme afin de mieux l'exploiter. Des effets bénéfiques sur les interactions biologiques en volume et en surface ont été mis en évidence. Les différentes caractérisations justifient l'utilisation des SAW comme méthode d'adressage fluidique.

Plus spécifiquement, les caractérisations PIV sur goutte ont apporté des informations importantes sur les écoulements internes (recirculations d'analytes) et nous ont donné accès à une cartographie interne de vitesses, qui, à notre connaissance, n'est pas encore exposée dans la littérature. Ces éléments ont ensuite pu être introduits dans un modèle de simulation

microfluidique du mélange. Les simulations montrent que le micromélange régénère les analytes à proximité de la zone sensible. Elles permettent également d'optimiser les conditions expérimentales d'interaction 'liquide/biodétecteur' suivant les paramètres de mélange ainsi que les caractéristiques de l'interaction biologique étudiée.

La technique de mélange SAW dans l'adressage fluide de détecteur au sein de gouttes présente les points forts suivants :

- grande dynamique de temps de mélange dégagée, ce qui leur permet de couvrir une large variété d'interactions analytes-ligands,
- recirculation homogène du matériau biologique contrairement au travail en flux qui demande la mise en place d'un système de recirculation,
- quantité d'analytes restreinte, souplesse d'utilisation et accessibilité à la zone sensible.

Ces différentes caractérisations ont apporté des informations précieuses sur l'interaction liquide/surface, toutefois, pour remonter en temps réel aux effets du micromélange en goutte sur une interaction à la surface, nous nous sommes tournés vers la résonance de plasmon de surface (SPR). Nous avons mis en place un concept original de plasmon de surface en goutte (DSPR : 'droplet based SPR'). Plusieurs optimisations et adaptations ont été nécessaires pour le suivi d'interaction dans un système discret et pour le couplage de l'excitation SAW au suivi en temps réel grâce à un actionnement par capot. Nous avons pu valider le suivi d'interactions biologiques par DSPR sur interactions simples. Nous exposons également l'intégration à ce système d'un actionnement (déplacement et mélange) par SAW, qui ajoute au potentiel de la technique DSPR la souplesse d'utilisation d'une microfluidique discrète. Le développement de ce système a dépassé sa perspective initiale qui était de pouvoir accéder en temps réel aux interactions d'une goutte avec une surface. Elle s'est révélée être un outil à fort potentiel pour l'analyse des cinétiques et pour le dosage d'éléments biologiques. Les deux principaux intérêts de ce système sont :

- Générer une nouvelle approche du dosage
- Lutter contre le mauvais transport de masse présent dans les flux laminaires (cinétiques plus réalistes afin d'éviter les traitements de données subséquents complexes et limités)

Nous avons réalisé un travail d'optimisation des conditions d'expérimentation et de comparaison à un système SPR en flux. Des premiers résultats d'interaction en goutte ont été obtenus. Nos résultats préliminaires nous permettent de valider un effet positif des ondes acoustiques dans l'amélioration du transport de masse lors de réactions simples. Nous optimisons actuellement la chimie pour réaliser une réelle étude comparative des deux configurations. En combinant l'ensemble des opérations fluidiques et de détection en temps

réel sur goutte (déplacement et mélanges de gouttes par SAW au sein du DSPR, prise en compte d'une goutte de référence), nous nous rapprochons, en termes de souplesse d'utilisation et de puissance d'analyse, des outils commerciaux en flux, avec un potentiel supplémentaire de précision de dosage et d'analyse de cinétique.

Cet aspect du travail (banc DSPR) ouvre par ailleurs de nombreuses possibilités. Outre les nouvelles applications envisagées à court terme comme la suivi en temps réel de la polymérisation ainsi que l'étude du comportement cellulaire, un projet concernant la réalisation d'outils de détection optiques (optique dure, optique intégrée) adressés par microfluidique digitale est à l'étude. Il s'agit entre autres d'associer :

- des surfaces exaltant les propriétés plasmoniques, tant au niveau matériau (assemblage de nanoparticules) qu'au niveau géométrique (réseaux nanostructurés)
- des propriétés de surfaces en terme de biochimie qui permettent à la fois de limiter les forces de friction de la goutte et de favoriser le piégeage sélectif des protéines d'intérêt
- d'intégrer enfin des composants optiques ouvrant la voie à un système ultra sensible et rapide aux dimensions de la microfluidique.

La volonté d'intégrer un système de détection in-situ dans la plateforme microfluidique nous a de plus menés à nous intéresser à la réalisation d'un nanodispositif de détection. En effet, malgré les performances de notre système DSPR, il n'était pas envisageable, dans le simple cadre de cette thèse, d'effectuer une intégration du dispositif. Parmi la multiplicité des dispositifs de nanobiodétection, le choix s'est porté sur un dispositif de biodétection 'piézoélectrique'. Nous avons présenté la réalisation de dispositifs sur AlN/Si permettant la génération de SAW à plusieurs GHz et leur utilisation comme nanobiodétecteur. Leur fonctionnement à ces fréquences pour notre application en fait des dispositifs innovants par rapport à l'état de l'art : la montée en fréquence génère, grâce à un meilleur confinement de l'énergie de l'onde à la surface, une meilleure sensibilité aux biomolécules. Nous avons estimé la sensibilité du système à 400pmol sur une interaction Ab-Ag pour le mode de résonance en $f/2$, choisi pour son bon facteur de qualité.

L'onde de Rayleigh, utilisée pour l'actionnement des liquides, est peu appropriée pour un suivi en temps réel. Néanmoins, l'utilisation de tels nanodétecteur bénéficie de la facilité d'intégration avec un système microfluidique digital 'tout SAW', permettant les déplacements d'analytes, les étapes de rinçages automatisées, et surtout l'adressage fluide intégré du détecteur. Nous avons donc montré la faisabilité d'un nanodétecteur SAW, ainsi que son potentiel d'intégration. En couplant le système d'adressage fluide développé au détecteur, un microlaboratoire sur puce intégré peut alors être envisagé, afin d'atteindre de nouvelles

performances en termes de sensibilité et de temps de réponse. Le transfert du procédé élaboré à un autre matériau de type Quartz (ondes transverses) pour le suivi en temps réel d'une interaction biologique est en cours. Il est également envisagé d'étudier le dépôt local de matériau piézoélectrique.

L'étude protéomique de cellules isolées est encore un enjeu majeur. Pour permettre une isolement effective et un contrôle unidirectionnel des cellules, nous proposons de cultiver les cellules au sein de gouttes, alors considérées comme des micro-boîtes de Pétri. Le système comprend un actionnement microfluidique des gouttes vers une zone sensible permettant la détection des marqueurs sécrétés dans le milieu. Nous avons validé dans une première phase la viabilité de la culture en gouttes. Nous présentons ensuite les différents moyens possibles d'actionnement par ondes acoustiques de surface et démontrons les avantages de l'utilisation d'un tel système dans l'étude des mécanismes de communication intercellulaire. Nous avons réussi à déplacer le milieu sécrété, même si ce fût avec difficulté, dû à une forte adsorption, mais proposons d'autres opérations fluidiques moins limitantes. Les développements futurs de ce travail concernent l'intégration d'un système de détection en capot. A plus long terme, son intégration au sein d'un dispositif d'analyse de type SPR dans lequel la modulation de la longueur d'onde permettrait d'atteindre les modifications cellulaires.

La détection de faibles quantités de marqueurs provenant d'une population limitée de cellules est encore un défi en raison des limites de sensibilité des systèmes de détection fonctionnant sans adressage fluidique. Les travaux présentés montrent que la microfluidique discrète à base d'ondes acoustiques de surface se positionne comme une solution technologiquement simple et efficace pour les différentes opérations nécessaires à l'analyse protéomique de faibles quantités d'analytes provenant de cellules. Il s'en suit que nous proposons un système complet comprenant la culture de cellules en goutte, l'actionnement microfluidique, ainsi qu'une zone de détection intégrée. Le système proposé amène la possibilité d'améliorer ces performances en utilisant un micromélange acoustique du milieu sécrété une fois déplacé au niveau de la zone sensible.

Nous espérons que l'aboutissement d'un système d'adressage fluidique couplé à une biodétection, classique ou émergente, apportera un outil novateur d'étude de cellules isolées, de compréhension des phénomènes intercellulaires et de découverte de marqueurs précoces.

Annexe 1

Fonctionnalisation de surface: protocoles et éléments de caractérisation

Partie 1 - Protocole d'immobilisation

Nous avons évoqué au chapitre 1 les types de chimie de surface les plus couramment utilisés, dans le cas de surfaces de type oxyde et dans le cas de surfaces métalliques. Les protocoles d'immobilisation dans ces deux cas sont exposés ci-dessous.

Sur surface d'or

Une solution très répandue pour la fonctionnalisation de l'or est l'utilisation de groupements thiols ($-SH$) présentant une grande affinité avec les molécules Au:



La direction cristalline Au (111) est préférable pour la préparation de monocouches autoassemblées (SAMs) de thiols¹. Nous réalisons le dépôt d'une fine couche d'or par évaporation thermique. Le principe de l'immobilisation est illustré Figure 110.

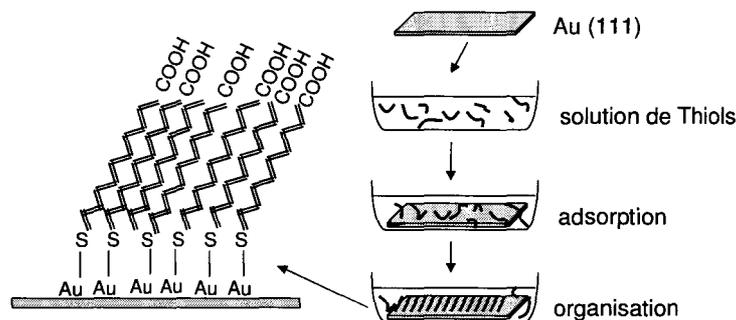


Figure 110 Principe de l'adsorption d'une monocouche autoassemblée de thiols sur surface Au.

Nous immobilisons la molécule 11-MUA (11-Mercapto-Undecanoic-Acid), dont la chaîne alkyl-thiol présente à l'autre extrémité un groupement fonctionnel acide ($-COOH$) (Figure 111).

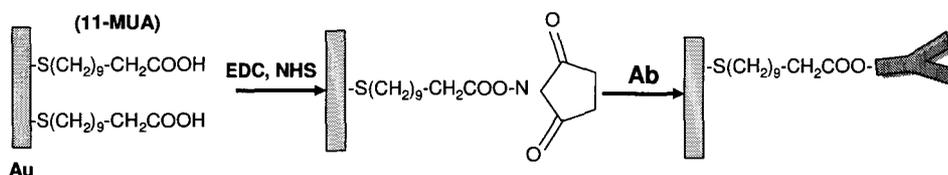


Figure 111 Principe de l'immobilisation d'un anticorps sur Au par l'intermédiaire d'un couplage amine.

Une monocouche dense de 11-MUA est adsorbée sur la surface d'or. La réaction d'adsorption des thiols sur l'or est très rapide, cependant, afin d'obtenir une monocouche bien

organisée et sans défaut, il est nécessaire de laisser interagir le milieu au moins 16h. Etant donné que la formation de multicouches n'est pas possible (contrairement à certaines autres SAMs), il n'est pas exclu de laisser la réaction pendant deux à trois jours. On fait ensuite réagir les groupements carboxyles du 11-MUA avec une solution d'agents couplants comprenant EDC (1-Ethyl-3-[3-diméthylaminopropyl]carbodiimide Hydrochloride) / NHS (N-hydroxysuccinimide). L'ester qui en résulte réagit avec les résidus amines des molécules à immobiliser. Le tableau suivant rappelle le protocole d'immobilisation sur surface d'or.

Tableau : Protocole d'immobilisation sur surface d'or

Etape préalable avant suivi SPR : greffage acide sur Au	11-MUA : 50mg dans 20ml éthanol - 16h minimum pour former la monocouche – rinçage éthanol frais
Activation surface	Injection 35µL NHS/EDC 7min. (EDC: 750mg/10mL et NHS: 115mg/10mL dans l'EDI). Le mélange des deux réactifs est réalisé volume à volume au dernier moment. rinçage tampon de course (HBS) 2,5min
Immobilisation du ligand	Injection de l'anticorps à 10µL/min 7min. (anticorps dilué dans tampon d'acétate de sodium 10mM pH=5 à la concentration de 30µg/mL) rinçage tampon de course (HBS) 2min
Désactivation de la surface	35µL d'éthanolamine 1M 7min – rinçage tampon de course (HBS)

Sur surface de verre

La chimie la plus couramment associée à ce type de surface est à base de silanes². Une silanisation peut être réalisée sur toute surface disposant de groupements -OH en surface (mica, verre, oxydes de métaux ou de semiconducteurs). Elle est réalisée grâce à une liaison covalente entre une molécule silane (un chlorosilane ou un alkyloxysilane) et la surface ou un autre silane par l'intermédiaire d'un lien siloxane. Les silanes se déposent en monocouches auto-assemblées (SAMs - self assembled monolayers), qui sont un assemblage ordonné de molécules sur une surface, formé par l'adsorption de molécules amphiphiles de type surfactant. Une SAM peut être déposée en phase vapeur ou en bain. Le substrat est en général immergé dans une solution de ces molécules dans un solvant, et un film monomoléculaire se forme spontanément en un temps variant de quelques minutes à quelques heures, suivant la longueur de la chaîne.

La propreté de la surface est primordiale. L'utilisation d'un nettoyage oxydant au piranha (H₂O₂/H₂SO₄, 1/3 en volume) permet à la fois d'éliminer les contaminations organiques, mais aussi d'augmenter le nombre de liaisons -OH réactives en cassant les liaisons siloxanes. Dans le

cas particulier de l'oxyde de silicium, si cela est possible, on effectue une gravure de l'oxyde natif par acide fluorhydrique, puis on réalise une croissance thermique sèche de SiO_2 . L'oxyde est alors de meilleure qualité et permet par ailleurs d'observer en fluorescence. Un nettoyage à l'UV Ozone est ensuite conseillé, permettant d'augmenter encore le nombre de liaisons $-\text{OH}$ disponibles.

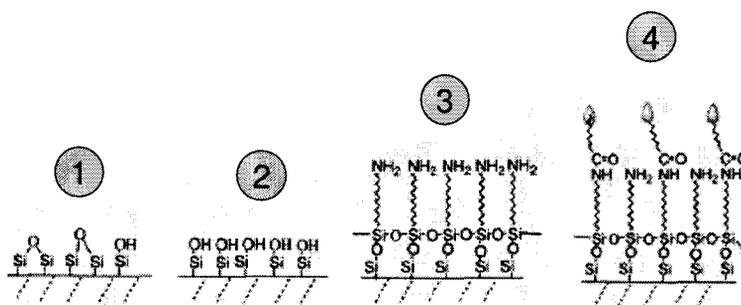


Figure 112 Etapes pour l'immobilisation d'une biomolécule sur surface d'oxyde.

Les différentes étapes d'une immobilisation covalente sur substrat de verre par l'intermédiaire d'un silane APTES (Aminopropyltriéthoxysilane) sont représentées sur la Figure 111. Après hydroxylation de la surface (Etat 2), une monocouche d'APTES est autoassemblée sur la surface. L'APTES est lié de façon covalente à la surface et expose des terminaisons NH_2 (Etat 3) qui pourront réagir avec les molécules activées par NHS/EDC (Etat 4).

Tableau : protocole d'immobilisation sur surface de verre.

Hydroxylation surface	UV-Ozone 30min
Monocouche auto-assemblée APTES	1/10 APTES/toluène 2h
Rinçage	Toluène frais
Activation de la surface	NHS/EDC (EDC 750mg/10mL - NHS 115mg/10mL dans l'EDI). Réactifs mis en suspension et mélangés volume à volume au dernier moment. Laisser agir dans 5 ml de solution 15min.
Immobilisation Ab	Ajouter 1ml d'une solution de 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ d'anticorps. Laisser interagir 24h en remuant doucement
Rinçage	Rinçage abondant à l'EDI.

Nous avons également utilisé dans certains cas un bis-aldehyde, le glutaraldehyde, qui pourra réagir d'un part avec les amines de la surface d'APTES et d'autre part avec les amines des molécules à immobiliser.

Partie 2 – Eléments de caractérisation des surfaces

Lors des étapes d'immobilisation des biomolécules, nous testons différents paramètres qui permettent de valider les étapes successives et de confirmer le greffage.

Surfaces Au

Nous réalisons des mesures d'angles de contact statiques, par évaluation de l'énergie de surface, pour valider les étapes d'immobilisation réalisées (Figure 113). La couche d'or fraîchement déposée et nettoyée possède un angle de contact d'environ 85°. Nos couches de thiols 11-MUA présentent un caractère hydrophile ($\theta=37^\circ$): en effet, le groupement acide carboxylique est fortement polaire. Néanmoins, cette valeur est supérieure de quelques degrés à la valeur théorique de l'angle statique. Ceci peut s'expliquer par une exposition des groupements méthylènes (hydrophobes) de la chaîne alkyl (dû à des hétérogénéités de surface par exemple). Cet effet est d'autant plus marqué pour de longues chaînes comme le 11-MUA.

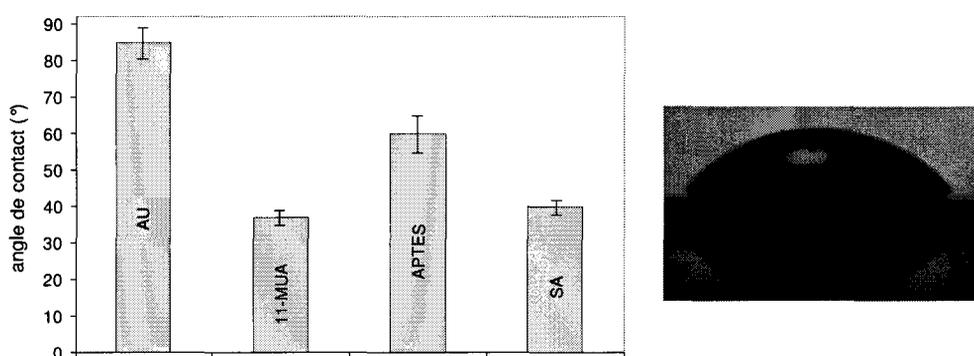


Figure 113 (gauche) Angles de contact après les étapes d'immobilisation: Au nu, 11-MUA, APTES, puis Streptavidine (droite) Photographie du 11-MUA sur Au montrant un caractère hydrophile.

En utilisant ces surfaces en résonance de plasmon de surface (chap.3 §6.4.2), nous avons observé des faibles taux d'immobilisation. Les analyses par Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) confirment les faibles quantités immobilisées (Figure 114). En effet, on distingue les pics des liaisons =CO à 1740cm^{-1} et 1720cm^{-1} et un pic large pour le groupement OH vers 3300cm^{-1} , qui confirment une immobilisation de l'acide³. On peut également attribuer la bande à 2900cm^{-1} à la chaîne alkyl-thiol, ainsi que celle entre 600cm^{-1} et 750cm^{-1} à la bande caractéristique de la liaison or/sulfure.

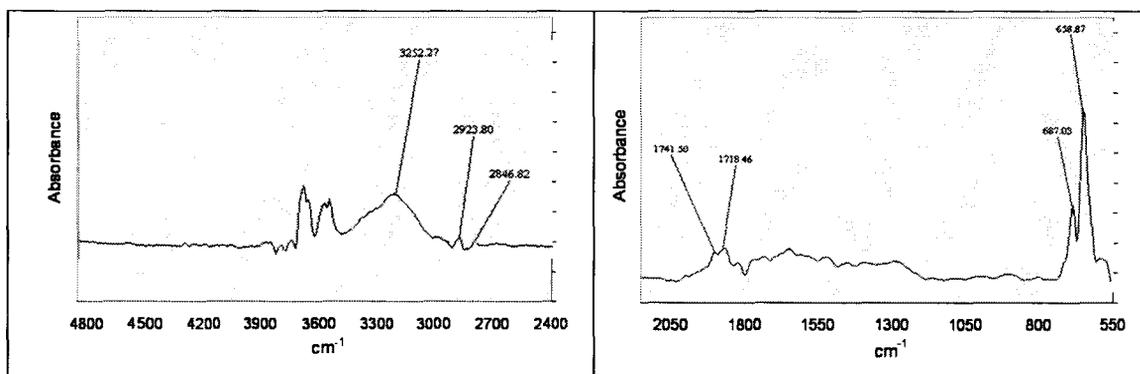


Figure 114 Spectres FTIR dans les bandes spectrales (gauche) 2400-4800 cm^{-1} (droite) 550-2200 cm^{-1} montrant un faible taux de fixation du 11MUA.

Nous avons donc bien immobilisé les ligands sur la surface d'or, néanmoins, les quantités immobilisées sont faibles. Nous nous orientons actuellement vers l'utilisation d'une association de deux thiols : 11-MUA et 3-MPA, pour améliorer l'immobilisation.

Surface de SiO_x sur Au

La Figure 114 montre le résultat de l'ajustement réalisé avec la mesure ellipsométrique d'une couche de 10nm de SiO_x sur Au.

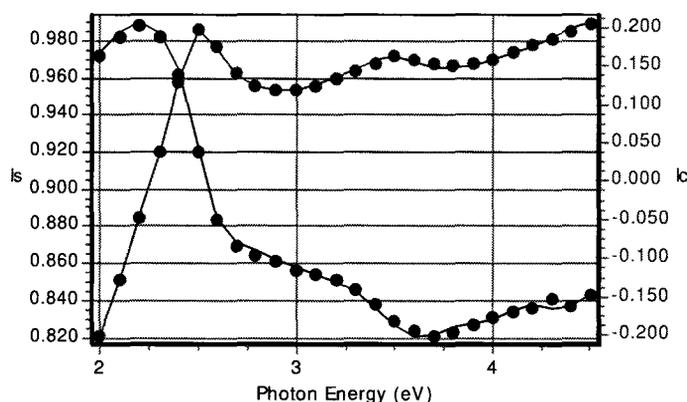


Figure 115 Résultat de l'ajustement des intensités réalisé avec logiciel deltapsi2 pour la mesure en ellipsométrie d'une couche de 10nm de SiO_x sur Au.

La Figure 116 illustre les mesures d'angles de contact statique réalisées lors des étapes d'immobilisation sur ces surfaces. La surface de SiO_x après hydroxylation de 30min par UV-Ozone présente un caractère très hydrophile, attestant de la formation de terminaisons $-\text{OH}$. Ceci est confirmé par les analyses FTIR présentant un large pic à 3250 cm^{-1} . L'étape de silanisation par APTES permet ensuite d'obtenir un caractère faiblement hydrophile (autour de 50°) dû à l'exposition

de groupements $-NH_2$. L'immobilisation de streptavidine par l'intermédiaire du glutaraldehyde montre un angle de contact de 52° .

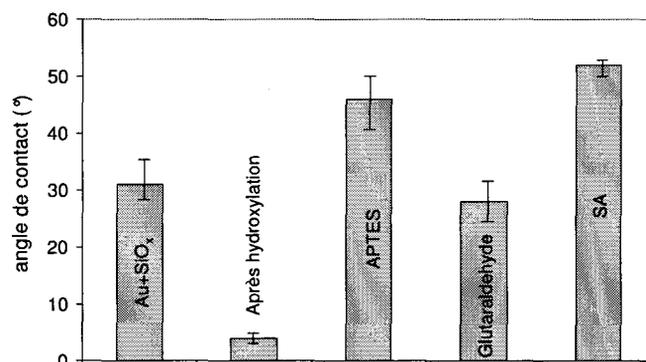


Figure 116 Mesure des angles de contact après les différentes étapes d'immobilisation sur Au/SiO_x.

On distingue sur le spectre FTIR de la Figure 117, deux pics caractéristiques de NH à 1234cm^{-1} et 1156cm^{-1} et deux pics plus faibles à 1630cm^{-1} et 1538cm^{-1} qui confirment une immobilisation d'APTES sur la surface du SiO_x.

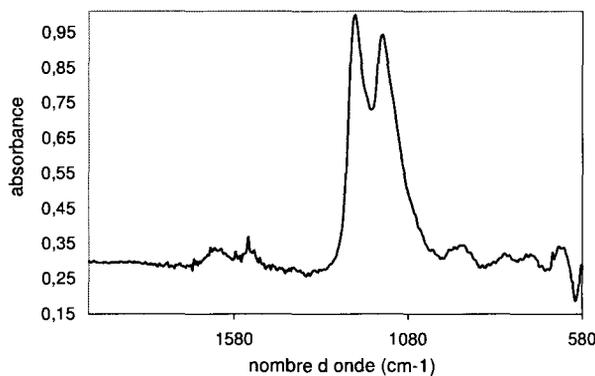


Figure 117 Spectres FTIR dans la bande spectrale $2000\text{-}580\text{ cm}^{-1}$ d'une surface de SiO_x avec immobilisation d'APTES

CONCLUSION

En associant des mesures d'énergie de surface, des mesures ellipsométriques ainsi que des éléments d'information sur les groupements greffés grâce à la spectroscopie infrarouge, nous pouvons suivre et valider les étapes successives dans le processus d'immobilisation sur nos surfaces actives.

Le FT-IR (Fourier Transformed InfraRed spectroscopy)

La Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FTIR) permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes sur une surface. Lorsque la longueur d'onde du faisceau est voisine de l'énergie de vibration des molécules, ces dernières absorbent le rayonnement et on enregistre une diminution de l'intensité réfléchie ou transmise. Le FTIR utilise un interféromètre de Michelson afin d'établir un interférogramme en modifiant la différence de marche. On travaille dans le domaine infrarouge 4000cm^{-1} et 400cm^{-1} ($2,5\text{-}25\mu\text{m}$) correspondant au domaine d'énergie de vibration des molécules. L'ensemble des bandes d'absorption caractéristiques permet alors d'identifier les molécules à la surface, et de valider l'accroche de nos molécules fonctionnelles. Des tables permettent d'attribuer les absorptions aux différents groupes chimiques présents. Les mesures FTIR sont effectuées sur un ensemble de 1000 scans. Les mesures sont réalisées à température ambiante dans une chambre sous azote. On réalise tout d'abord une référence sur lame d'or nue, ou sur lame d'Au/SiO_x. On réalise ensuite le spectre de l'échantillon.

L'ellipsométrie (Spectroscopic ellipsometry)

Des mesures ellipsométriques ont été utilisées afin de déterminer les épaisseurs des couches déposées. L'ellipsométrie est une technique optique d'analyse de surface fondée sur la mesure du changement de l'état de polarisation de la lumière après réflexion sur une surface plane, et tire son nom de la polarisation elliptique acquise. Les paramètres de l'ellipse obtenue (rapport des deux axes, inclinaison du grand axe) permettent la caractérisation de l'épaisseur optique (produit de l'épaisseur par l'indice optique complexe) du matériau constitutif de l'échantillon. Les informations dont est porteur le faisceau réfléchi dépendent également du domaine spectral d'étude. Ainsi, dans le domaine visible-proche ultraviolet, qui correspond à l'absorption électronique, l'ellipsométrie permet de caractériser la composition, la structure et la morphologie des matériaux. L'appareil est un UVISEL Jobin Yvon équipé du logiciel DeltaPsi2. La gamme spectrale balayée est de 2 à 4,5 eV (300–750 nm) avec un pas de 0,05eV (7,5nm). L'angle d'incidence est fixé à 70°. Les données sont ajustées par régression sur des modèles prenant en considération les indices optiques complexes ainsi que les épaisseurs. Nous avons considéré que l'indice des monocouches organiques était de 1,45.

¹ A. Ulman, "Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers", Chem Rev (1996), 96, pp. 1533-1554

² B.J. Ravoo, D.N. Reinhoudt, S. Onclin, "Review: Engineering Silicon Oxide Surfaces Using Self-Assembled Monolayers", Angew. Chem. Int. Ed. (2005), 44, pp. 6282-6304.

³ B. Frey, R. Corn, "Covalent Attachment and Derivatization of Poly(L-lysine) Monolayers on Gold Surfaces As Characterized by Polarization-Modulation FT-IR Spectroscopy", Anal. Chem. (1996), 68, pp. 3187-3193.

Annexe 2

Organisation de micro-particules par ondes acoustiques de surface : observation

Dans les microsystèmes fluidiques étudiés, deux phénomènes acoustiques importants coexistent :

- D'une part, la force de radiation acoustique positionne des particules en les attirant ou en les repoussant des nœuds de pression selon l'établissement d'un champ stationnaire^{1,2}.

- D'autre part, le mélange acoustique induit un mouvement à l'ensemble du fluide³. En PIV (Particle Image Velocimetry), on suppose que les traceurs utilisés suivent l'écoulement que l'on souhaite caractériser. Cependant, nous avons observé que deux phénomènes acoustiques importants pouvaient coexister (la force de radiation acoustique et le mélange acoustique). La taille et les propriétés des particules sont des paramètres déterminants dans la prédominance de l'un ou de l'autre des phénomènes. La direction de la force va dépendre de la compressibilité des traceurs. Par exemple, les lipides du lait possèdent une compressibilité plus grande que celle de l'EDI⁴, elles sont donc piégées dans les puits de pression, alors que les particules de polystyrène possèdent une compressibilité plus faible et sont donc dirigées sous l'effet de la pression acoustique vers les nœuds de pression. Les parties 1 et 2 de l'annexe présentent les effets observés respectivement avec des particules en polystyrène de 1 μ m ou 10 μ m et avec des traceurs fluorescents.

PARTIE 1

Pour étudier les gouttes soumises aux ondes acoustiques de surface (SAW) par PIV (Particle Image Velocimetry), nous avons donc utilisé plusieurs configurations. Rappelons que la PIV consiste à enregistrer des images successives et rapprochées de l'écoulement d'un fluide marqué de particules (traceurs) à l'aide d'une caméra rapide. Des images instantanées de l'écoulement sont réalisées grâce à une caméra Imperx IPX-VGA210 (240 images par seconde, 500 μ s d'ouverture, 640x480 pixels). Nous avons vu dans le Chapitre 2 les observations relatives à la projection du matériau intra-goutte vers le haut de la calotte sphérique. D'autres configurations ont été utilisées, et ont mené à des observations inattendues sur la distribution surfacique et spatiale des nanoparticules. Nous les présentons ici.

Nous avons donc réalisé des observations sur des gouttes de 10 μ l en imposant à la goutte une interface supplémentaire en verre traité hydrophobe, afin de visualiser les écoulements sous différents angles d'attaque des ondes. On utilise une source lumineuse homogène pour éclairer la goutte en incidence rasante, la caméra suit l'évolution des particules (1 et 10 μ m, dilution 1/5000) au sein de l'écoulement.

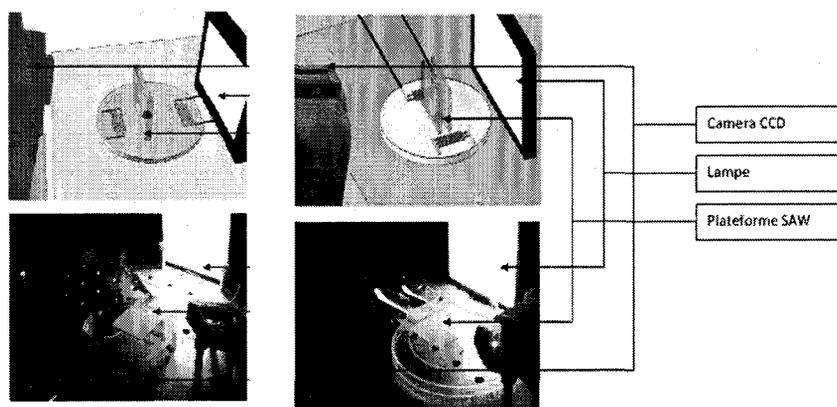


Figure 118 Banc expérimental pour la visualisation (gauche) d'une attaque de front (droite) d'une attaque parallèle de la goutte

Pour une "attaque" de la goutte parallèle aux ondes, nous avons placé celle-ci entre deux lames de verre ayant subi un traitement de surface hydrophobe par OTS. Pour une "attaque" de la goutte perpendiculairement aux ondes, nous avons placé celle-ci devant la lame de verre.

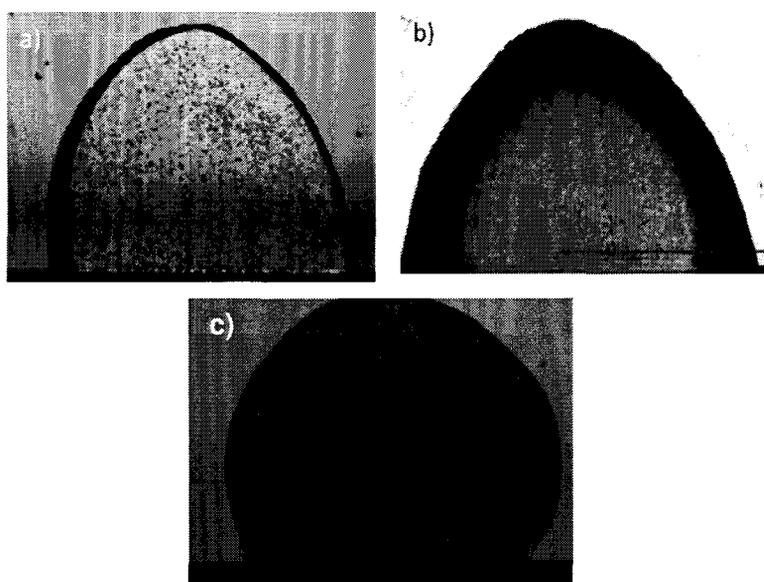


Figure 119 Photographies instantanées des gouttes sous excitation SAW à 20MHz
 (a) alignement vertical de particules de $10\mu\text{m}$ (actionnement parallèle) à 26 dBm
 (b) alignement horizontal de particules de $10\mu\text{m}$ (actionnement de front) à 38 dBm
 (c) alignement vertical de particules de $1\mu\text{m}$ (actionnement parallèle) à 41 dBm.

Des photographies instantanées de gouttes de $10\mu\text{l}$ excitées par des ondes acoustiques de surface à $20,5\text{MHz}$ (LiNbO_3 coupe X direction Z ou Y), et contenant des particules de $10\mu\text{m}$ ont été réalisées. La Figure 2 illustre des alignements significatifs des particules. On remarque notamment un alignement vertical de particules pour un actionnement parallèle à 26 dBm et un alignement horizontal de particules pour un actionnement de front à 38 dBm .

Matériau	Vitesse	λ
LiNbO_3	3400 m/s	$178\ \mu\text{m}$
H_2O	1435 m/s	$75\ \mu\text{m}$

L'espacement des lignes de particules correspond approximativement à la longueur d'onde dans l'EDI, soit $70\mu\text{m}$ pour une excitation à $20,5\text{MHz}$, ou $75,36$ pour une excitation à $19,04\text{MHz}$. Ceci s'explique par l'établissement d'ondes stationnaires dans le système substrat/goutte/capot dû aux réflexions sur le capot et sur la surface de la goutte.

PARTIE 2

L'expérience a été reproduite avec un milieu fluorescent par μPIV (Micro-Particle Image Velocimetry). La goutte contient cette fois des particules fluorescentes (type STABLO, densité et taille des particules non connues mais de taille plus réduite que les particules précédemment utilisées). Elle est placée entre le substrat de niobate de lithium et le capot (pour une distance 'capot-substrat' de $300\mu\text{m}$). On observe par le dessus et sur la tranche la concentration des particules au microscope à fluorescence (objectif x5, sans intensificateur). Le diamètre de la goutte ainsi que son angle de contact varient au cours du temps, du fait de l'évaporation.

Principe de la mesure :

La goutte est piégée entre deux surfaces hydrophobes.

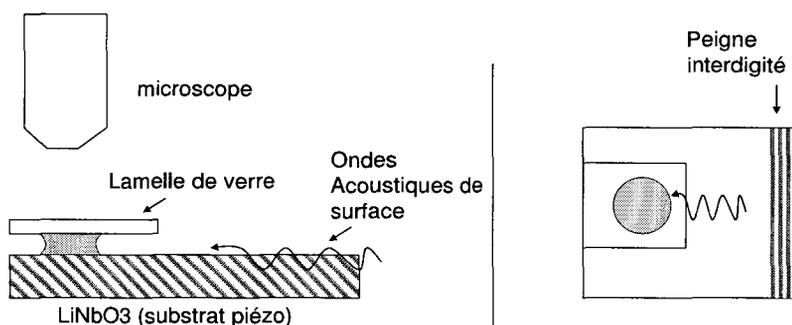


Figure 120 Schéma expérimental

Des visualisations sont d'abord réalisées depuis le haut de la goutte (Figure 121). Les particules fluorescentes se concentrent au niveau des motifs de répartition de pression (puits ou nœuds). Les structures apparaissent pour une taille de goutte relativement grande (diamètre > 2 mm) de manière dissymétrique du côté où les ondes de surface arrivent. Les structures sont toujours apparentes, cependant le motif observé change. Les structures pour des diamètres de goutte de 777 μm et 485 μm sont présentées Figure 4. Quand les structures disparaissent, elles laissent place à l'effet typique de mélange acoustique (apparition de vortex dans la goutte).

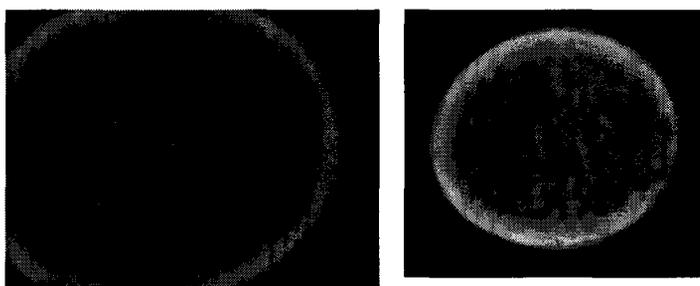


Figure 121 Structures observées par observation depuis le dessus de la goutte (Capot verre). Fréquence de fonctionnement : 20,5 MHz. (Gauche) Pour un diamètre de goutte de 777 μm (Droite) Pour un diamètre de goutte de 485 μm .

Nous observons ensuite les structures dans les gouttes depuis la tranche à l'aide d'un système de miroir à 45° (Figure 5). Cette configuration est possible grâce à la grande distance focale du microscope Olympus BX51 utilisé en objectif x5. Les conditions (puissance, etc...) sont identiques à la configuration précédente.

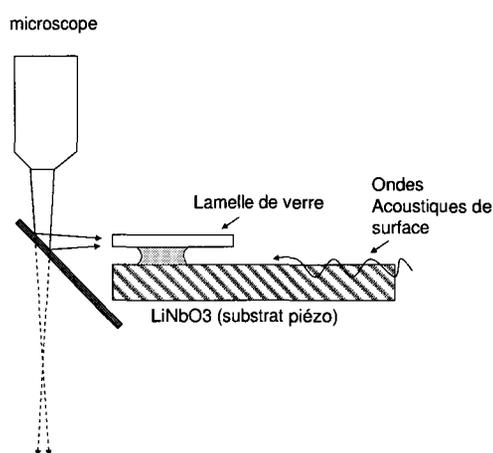
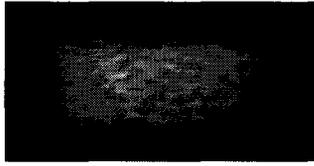
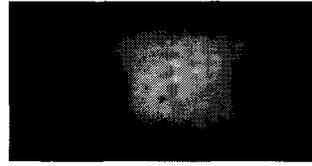


Figure 122 Principe de l'observation au microscope à fluorescence d'une tranche de goutte grâce à l'utilisation d'un miroir à 45°.



Diamètre au centre : 653 μ m

Diamètres haut et bas : 838 μ m



Diamètre au centre : 336 μ m

Diamètres haut et bas : 465 μ m

Figure 123 Structures observées par observation depuis le dessus de la goutte (Capot verre). Fréquence de fonctionnement : 20,5 MHz.

CONCLUSION

Les présentes observations, basées sur l'établissement d'ondes stationnaires dans le système substrat/goutte/capot dû aux réflexions sur le capot et sur la surface de la goutte, ont conduit à la mise en place d'un travail en collaboration avec O. Boumatar (IEMN-DOAE) pour la simulation de ces effets par éléments finis sous Comsol⁵, ainsi qu'avec A. Merlen (LML) pour la mise en place d'un modèle analytique. La compréhension des phénomènes, dus à l'une ou l'autre des forces, est un atout pour les applications de laboratoire sur puce : l'utilisation de ces forces acoustiques permet diverses opérations sur fluides biologiques : piégeage de micro-organismes⁶, séparation et nettoyage sanguin⁷, mélanges⁸.

¹ L.V. King, "On the radiation pressure on spheres", Proc. R. Soc. London, Ser. A (1934), 147, pp. 212.

² K. Yosioka, Y. Kawasima, "Acoustic radiation pressure on a compressible sphere", Acustica (1955), 5, pp. 167-173.

³ N. Riley, "Steady streaming", Annual Review of Fluid Mechanics (2001), 33, pp. 43-65.

⁴ S.M. Hagsäter, T. Glasdam Jensen, H. Bruus, J. P. Kutter, "Acoustic resonances in microfluidic chips: full-image micro-PIV experiments and numerical simulations", Lab Chip (2007), 7, pp. 1336-1344.

⁵ O. Bou Matar, E. Galopin, Y. Li, O. Ducloux, "An Optimized Convolution-Perfectly Matched Layer (C-PML) Absorbing Boundary Condition for the Second-Order Elastic Wave Equation – Application to Surface and Lamb Waves Propagation", Proceedings of Comsol conference, Grenoble, France (2007).

⁶ M. Saito, N. Kitamura, M. Terauchi, "Ultrasonic manipulation of locomotive microorganisms and evaluation of their activity", J. Appl. Phys. (2002), 92, pp. 7581-7586.

⁷ A. Nilsson, F. Petersson, H. Jonsson, T. Laurell, "Acoustic control of suspended particles in microfluidic chips", Lab Chip (2004), 4, pp. 131-135.

⁸ R.H. Liu, R. Lenigk, R.L. Druyor-Sanchez, J. Yang, P. Grodzinski, "Hybridization Enhancement Using Cavitation Microstreaming", Anal. Chem. (2003), 75, pp. 1911-1917.

INDEX DES SIGLES ET ABREVIATIONS

- μ PIV: Micro- Particle Image Velocimetry, 65
- μ TAS: micro Total Analysis Systems, 33
- μ TAS: Micro Total Analysis Systems, 40
- 11-MUA: 11-Mercaptoundecanoic acid, 114
- 3MPA: 3 MercaptoPropionic Acid, 120
- AA: Acides Aminés, 9
- Ab: Antibody - Anticorps, 10
- ADN: Acide DésoxyriboNucléique, 3
- Ag: Antigène, 10
- AlN: Nitrure d'aluminium, 128
- APTES: AminoProxylTriethoxySilane, 57
- ARN: Acide RiboNucléique, 8
- ARNm: Acide RiboNucléique messenger, 3
- BSA: Bovine Serum Albumin - Albumine de sérum Bovin, 18
- C₄F₈: Octafluorobutène, 57
- CM5: Carboxy Metyl dextran, 115
- CNT: Carbon Nanotube - Nanotube de carbone, 17
- Cy3: Cyanine 3, 61
- Da: Dalton, 10; Nombre de Damköhler, 27
- DSPR: Droplet Based SPR, 84
- EDI: Eau Déionisée, 30
- ELISA: Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay, 13
- EM: Electromagnétique, 88
- ESI: ElectroSpray Ionisation, 13
- EWOD: ElectroWetting On Dielectric – Electromouillage sur Diélectrique, 2
- FDTS: PerfluoroDecylTrichloroSilane, 54
- FET: Field Effect Transistor - Transistor à Effet de Champ, 17
- FTIR: Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier, 120, 173
- HBS: HEPES Buffer Saline, 108
- IDT: transducteurs à peignes interdigités, 45
- Ig(G): Immunoglobuline(G), 18
- IPA: Isopropanol, 48
- IPR: Immuno -Polymerase Chain Reaction, 14

ISFET: Ion Sensitive Field Effect Transistor, 22
LiNbO₃: Niobate de Lithium, 47
LSPR: Localized SPR, 18
MALDI: Désorption-Ionisation Laser Assistée par Matrice, 13
MW: Molecular Weight, 120
NEMS: Nano-Electromechanical Systems, 18
NGF: Nerve Growth Factor, 3
NHS: N-hydroxysuccinimide, 20
OTS: Octadecyltrichlorosilane, 54
P(MMA-MAA): Poly Methyl MethAcrylate-MethAcrylic Acid, 133
PBS: Phosphate Buffer Saline – Tampon Phosphate, 61
PCR: Polymerase Chain Reaction, 14
PDMS: PolyDiMethylSiloxane, 14
Pe: Nombre de Peclet., 26
PECVD: Plasma Enhanced Chemical Vapor Deposition, 98
pI: point isoélectrique, 9
PIV: Particle Image Velocimetry, 65
PMMA: PolyMethyl MethAcrylate, 133
PSA: Prostate Specific Antigen - antigène prostatique spécifique, 17
Re: Nombre de Reynolds, 26
RIE: Reactive Ion Etching, 80
RU: Reflectivity Unit, 102
SAM: Monocouche Autoassemblée - Self Assembled Monolayer, 54
SAW: Surface Acoustic Waves, 2
SiNW: Silicon Nanowire – Nanofil de Silicium, 17
SPR: Surface Plasmon Resonance, 4

Production scientifique

Publications

E. Galopin, M. Beaugeois, B. Pinchemel, J-C Camart, M. Bouazaoui and V. Thomy, "SPR biosensing coupled to a digital microfluidic microstreaming system", *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 5, pp. 746-750 (2007)

A. Renaudin, **E. Galopin**, V. Thomy, C. Druon, and F. Zoueshtiagh, "Creeping, walking and jumping drop", *Physics of Fluids* 19, 1, (2007)

N. Verplanck, Y. Coffinier, **E. Galopin**, J-C Camart, V. Thomy, and R. Boukherroub, "Reversible Electrowetting on Superhydrophobic Silicon Nanowires", *Nano Letters*, pp. 813 – 817 (2007)

Communications internationales

E. Galopin, M. Beaugeois, F. Lapierre, M. Bouazaoui, J-C. Camart, V. Thomy, and B. Pinchemel, "SPR Biosensing coupled to a digital microfluidic surface acoustic wave system", *Proceedings of μ TAS'07*, Paris, France, pp. 1670-1672 (2007)

O. Ducloux, **E. Galopin**, J-C. Camart, V. Thomy, and F. Zoueshtiagh, "Surface acoustic wave microstreaming to enhance biosensing in a droplet based microTAS platform", *Proceedings of μ TAS'07*, Paris, France, pp. 294-296 (2007)

E. Galopin, A. Renaudin, J-C Camart, V. Thomy, C. Druon and P. Tabourier, "Enhanced protein capture by ultrafast SAW droplet μ mixing", *Proceedings of μ TAS'06*, Tokyo, Japan, pp. 651-653 (2006)

A. Renaudin, **E. Galopin**, V. Thomy, C. Druon and F. Zoueshtiagh, "Creeping, walking and jumping drop...", 58th Ann. Meet. of the American Physical Society, Division of Fluid Dynamics, Chicago, Illinois (2006)

Communications nationales

E. Galopin, M. Beaugeois, M. Bouazaoui, J-C. Camart, V. Thomy, and B. Pinchemel, "Biodétecteur à plasmon de surface couplé à une plateforme microfluidique d'ondes acoustiques de surface", présentation orale Congrès de la Société Française de Physique, Grenoble, France (juil. 2007)

E. Galopin, Mélange acoustique ultra-rapide : effets sur les interactions biomoléculaires en goutte", poster JNRDM'07

E. Galopin, A. Renaudin, A. Talbi, Y. Deblock, R. Boukherroub, J-C. Camart, V. Thomy, C. Druon and P. Tabourier, "Characterization of enhanced protein binding by ultrafast acoustical streaming within μ droplets", *Proceedings of μ Flu'06 3rd Congress in Microfluidics*, Toulouse, France, p 81 (2006)

E. Galopin, Filtres à ondes acoustiques de surface pour biodétection spécifique de protéines exprimées par cellules immobilisées, poster JNRDM'06

N. Verplanck, **E. Galopin**, V. Thomy, R. Boukherroub, J. Carlier, I. El Yazidi-Belkoura, J.C. Camart, C. Druon, H. Hondermarck and P. Tabourier, "Microfluidics and Nanotechnology : Detection of proteins expressed by isolated cancerous cells on a chip", *Nanobiotechnology III*, Acropolis Congress Center, Nice, France (2005)

E. Galopin and N. Verplanck, "Lab-on-Chip intégrant un microréseau de cellules isolées et un nanodispositif fluide de détection de protéines", *Présentation orale JNRDM'05*, pp. 75-77 (2005)

N. Verplanck, **E. Galopin**, V. Thomy, R. Boukherroub, H. Hondermarck, J.C. Camart, C. Druon and P. Tabourier, "Microfluidique pour l'analyse des protéines exprimées par des cellules cancéreuses isolées sur un microréseau d'immobilisation", *μ Flu'04 2nd Congress in Microfluidics*, Toulouse, France (2004).

Séminaires

E. Galopin, Microfluidique en goutte et méthode SPR : applications à la biologie, Workshop MOPAB, 10 et 11 Mai 2007.

E. Galopin, Microfluidique en goutte et méthode SPR, application à la biologie, Groupe BIOMEMS, septembre 2007.

Résumé

Ce travail porte sur la conception d'éléments d'un laboratoire sur puce pour la détection sensible de protéines. Pour travailler sur de petits volumes d'échantillons et à concentrations faibles, la microfluidique discrète et en particulier, les ondes acoustiques de surface (SAW) ont été choisies. Nous mettons en évidence les effets bénéfiques d'un mélange SAW sur les interactions biologiques: diminution des constantes d'interactions avec des surfaces actives, et l'amélioration d'un facteur 300 des temps de mélange en goutte. Les caractérisations et les simulations réalisées justifient l'utilisation des SAW comme méthode d'adressage fluidique pour améliorer l'interaction entre le liquide à analyser et les surfaces actives de détection. Des simulations par éléments finis (FEM) permettent d'évaluer les facteurs d'amélioration du mélange SAW pour une gamme d'interactions. Nous avons également mis en place un concept original de plasmon de surface en goutte couplé à la plateforme microfluidique digitale. Ceci permet d'allier une détection temps réel et sans marquage à l'adressage fluidique par SAW. La volonté d'intégrer un système de détection au sein de la plateforme microfluidique a aussi mené à la réalisation de dispositifs SAW fonctionnant jusqu'à 5GHz. Leur utilisation comme nanobiodétecteur est validée pour des sensibilités picomolaires. Un système complet comprenant une culture de cellules en goutte, l'actionnement microfluidique, ainsi qu'une zone de détection intégrée est enfin proposé.

Mots clés : Ondes Acoustiques de Surface, Biocapteurs, Résonance de Plasmon de Surface, Laboratoire sur puce, Microfluidique, Adressage fluidique, Goutte, Culture de cellules

Abstract

This work reports on the conception of lab-on-chip elements aiming at protein sensitive sensing. To work on small volumes of samples and low concentrations, digital microfluidics and in particular, surface acoustic wave (SAW) are chosen. We highlight the beneficial effects of SAW microstreaming on biological interactions: increase in the reaction rates during interaction with active surfaces, and improvement by a factor 300 of characteristic mixing times in droplets. We justify by characterizations and simulations the use of SAW as a fluidic addressing method to improve the interaction between the biological liquid and the active surfaces. Finite element simulations (FEM) can be used to assess the improvement factor for a variety of interactions. We have also established an original concept of surface plasmon resonance coupled with digital microfluidics platform for detection of biological interactions in a drop. This combines a real-time and non labelled monitoring of interactions to the microfluidic addressing by SAW. The desire to integrate an in-situ detection to the microfluidic platform also resulted in the achievement of SAW devices running up to 5GHz and their use as nanobiosensors displaying picomolaires sensitivities. A complete system including a cell culture in droplet, consecutive microfluidic actuation, as well as an integrated sensing area is eventually proposed.

Keywords : Surface Acoustic Waves, Biosensors, Surface Plasmon Resonance, Lab on a Chip, Microfluidics, Fluidic Addressing, Droplet, Cell Culture