

N° d'ordre : 4101



Université des sciences et technologies de Lille

École Doctorale Sciences pour l'ingénieur

Thèse

pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université des Sciences et Technologies de Lille

Spécialité Microondes et Microtechnologies

Présentée et soutenue publiquement par

TREIZEBRE Anthony

Le 6 Décembre 2007

**BioMEMS Terahertz pour l'étude du trafic informationnel
de cellules biologiques**

Directeur de thèse:

Monsieur Bertrand BOCQUET Professeur des Universités – IEMN - Lille

Membres du jury :

Monsieur Didier LIPPENS - Professeur des Universités – IEMN - Lille

Madame Rosaria FERRIGNO - Professeur des Universités – INL - Lyon

Monsieur Dominique REBIERE - Professeur des Universités – IMS - Bordeaux

Monsieur Pierre BLONDY – Professeur des Universités - XLIM - Limoges

Monsieur Vincent SENEZ - Chargé de Recherche CNRS – IEMN - Lille

Monsieur Eric LECLERC - Chargé de Recherche CNRS – BMGBM – Compiègne

Remerciements

Je remercie Monsieur Alain CAPPY, Professeur à l'Université des Sciences et Technologies de Lille et directeur de l'Institut d'Electronique, de Microélectronique et de Nanotechnologie, de m'avoir accueilli dans son laboratoire de recherche.

Je remercie Monsieur Paul Alain ROLLAND, responsable du Département Hyperfréquences et Semi-conducteurs (DHS), de m'avoir accueilli au sein du laboratoire

Je remercie Monsieur Bertrand BOCQUET, Professeur des Universités, de m'avoir accueilli au sein de l'équipe Microsystème Microfluidique et TéraHertz, qu'il dirige avec efficacité. Il est à l'origine de mon intérêt pour les microtechnologies et les microsystèmes dans le domaine de la biologie. Je le remercie également pour avoir accepté de diriger ce travail novateur et de m'avoir apporté un soutien permanent ainsi qu'un enthousiasme qui ont été une grande source de motivation.

Je remercie Monsieur Didier LIPPENS, Professeur à l'Université de Lille, de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse.

Je remercie sincèrement Madame Rosaria FERRIGNO, Professeur à l'Université de Lyon, et Monsieur Dominique REBIERE, Professeur de l'Université de Bordeaux, pour l'honneur qu'ils m'ont fait en acceptant d'être rapporteurs de ce travail.

Je remercie Monsieur Pierre BLONDY, Professeur à la Faculté des Sciences et Technique de Limoges, Monsieur Vincent SENEZ, Chargé de Recherche CNRS à l'IEMN, et Monsieur Eric LECLERC, Chargé de Recherche CNRS au Laboratoire de biomécanique et génie biomédical de L'UTC de Compiègne pour leur rigueur et leur expertise scientifique en tant que membres du jury et examinateurs de ce mémoire.

Ce travail à pu être mené à son terme grâce également à l'amitié et la bonne humeur que m'ont témoigné tous les membres du groupe BioMEMS. Je remercie tout particulièrement Monsieur Nour-Eddine BOURZGUI, Madame Carine

VANOVERSCHELDE, Monsieur Vianney MILLE, Monsieur Michael BOCQUET, Monsieur Loic LECLOIREC, Monsieur Thomas DARGENT, Monsieur Abdennour ABBAS.

Je tiens à remercier l'ensemble des biologistes qui m'ont aidé pour l'ensemble des tests, en particulier, Monsieur Joël MAZURIER, Monsieur Dominique LEGRAND, Monsieur Didier GUILLOCHON, Madame Dominique VERCAIGNE et Monsieur Christian SLOMIANNY.

Je remercie également l'équipe du Laboratoire de biomécanique et de génie biomédical de l'UTC de Compiègne, et tout particulièrement Monsieur Eric LECLERC pour ses connaissances et son aide précieuse dans l'élaboration de la partie microfluidique du BioMEMS.

Je tiens à remercier tout particulièrement l'ensemble des personnes du groupe de recherche PolyGram de l'école Polytechnique de Montréal, et tout particulièrement Monsieur Renato BOSISIO et Monsieur Feng XU de m'avoir accueilli si chaleureusement au sein de leur équipe durant mon stage.

Merci également à Monsieur Tahsin AKALIN pour le suivi de ce travail pendant la première année de ma thèse.

Je remercie chaleureusement l'ensemble des membres de la centrale de Technologie : Christophe BOYAVAL, Annie FATTORINI, André LEROY, Marc FRANCOIS, Michel MULLER, Christiane LEGRAND, Thomas GEHIN, Pascal TILMANT, Patricia LEFEBVRE, Bernard VERBEKE, Jérôme DELVA, Roger RINGOT, Bertrand GRIMBERT et Didier VANDERMOERE.

Un grand merci également aux membres de la centrale de caractérisation, Sylvie LEPILLET, Elisabeth DELOS, Damien DUCATEAU.

Que l'ensemble des personnels administratifs et techniques soit assuré de mes sincères remerciements pour leur disponibilité et leur aide précieuse, en particulier Mesdames Marie-Bénédicte DERNONCOURT et Sophie VAUTHIER, pour la gestion des déplacements,

Mesdames Michèle MIENS, Anne CALLEWAERT et Sylvie LABY et Monsieur Guillaume DEFOORT du service de DAO.

Un merci tout particulier aux mécaniciens du bâtiment P3, Monsieur Jean-Claude ANDRIES et Monsieur Christophe THIMONIER, pour leur sympathie ainsi que pour les réalisations mécaniques.

Je remercie Madame Jocelyne LOUCHARD pour avoir assuré la reproduction de ce manuscrit. Ainsi que Monsieur Daniel DEGARDIN, Monsieur Pierre LALY, Monsieur Bruno DESWASIERE.

Je tiens à remercier tout particulièrement Monsieur Pierre ARMANT pour sa bonne humeur et son aide précieuse dans la vie de l'IEMN.

Enfin un grand merci à tous ceux qui par leur amitié m'ont permis de mener à bien ce travail.

Résumé

Les développements actuels des BioMEMS (Biological MicroElectroMechanical System) permettent des investigations originales sur le vivant, et en particulier sur des cellules biologiques uniques. L'amélioration des moyens d'analyses est nécessaire pour la compréhension plus fine des mécanismes de «communication» intra ou inter cellulaires. La spectroscopie THz peut apporter des informations complémentaires sur des interactions moléculaires, y compris au cours d'une internalisation, compte tenu de son caractère dynamique. La redécouverte d'un mode de propagation filaire, appelé mode de Goubau, nous permet d'atteindre une résolution spatiale micronique. Nous sommes les premiers à montrer que la propagation s'effectue dans de bonnes conditions sur des fils métalliques nanométriques réalisés en technologie planaire. Cette thèse expose la conception, la fabrication et le test d'un BioMEMS dédié à la microspectroscopie THz de cellules biologiques. Nous démontrons la faisabilité de cette investigation dans un environnement le plus naturel possible. Nous avons caractérisé des solutions biologiques bien connues dans les sciences de la vie dont certaines n'ont jamais été observées à ces fréquences. Les mesures obtenues sur différentes souches cellulaires créeront la première base de données de spectroscopie THz dans ce domaine. Ce sujet fortement interdisciplinaire a été rendu possible par la collaboration entre un laboratoire de nanotechnologie et un laboratoire de biologie.

Résumé en anglais

Current developments in the BioMEMS research domain allow original investigations in life science, especially on single biological cells. The improvement of analysis means is needed for a better understanding of the intra and extra cellular informative molecular transfer. THz spectroscopy can bring new further complementary information on molecular interactions, during internalization. The use of a wire propagation mode, called goubau mode, allows us reaching a micrometer spatial resolution. We have been the first to show that we obtain good propagation conditions on nanometer metallic wires realized in planar technology. This thesis sets out the design, the fabrication and the test of a BioMEMS dedicated to the THz microspectroscopy of biological cells. We demonstrate the feasibility of this investigation inside a natural environment. We have characterized some well known biological solutions in the living science; some of them have never been characterized at these frequencies. Future measurements on different cellular (strains lines) will create the first THz spectroscopy database in this field. This highly interdisciplinary subject has been made possible through collaboration between a nanotechnology laboratory and a biology laboratory.

Table des matières

Introduction 25

Première partie: Moyens d'analyses actuels en signalisation cellulaire 29

I.	Généralités sur les cellules biologiques	31
I.1.	Généralités sur les cellules biologiques	31
I.2.	Cellules couramment étudiées.....	33
I.3.	Les messages biologiques	36
I.4.	Les CHO et ses mutantes	39
II.	Analyse par l'instrumentation macroscopique	42
II.1.	Microscopie confocale	42
II.2.	FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer).....	44
II.3.	SPR (Résonance à Plasmon de Surface)	48
III.	Instruments microscopiques pour la microscopie	52
III.1.	Généralités sur les MEMS.....	52
III.2.	Des Biocapteurs aux BioMEMS	54
III.3.	Les BioMEMS cellulaires	56
III.3.1.	Transduction cellulaire.....	59
III.3.2.	Immobilisation cellulaire.....	63
IV.	Conclusion.....	67
V.	Bibliographie.....	69

Deuxième partie: Ondes THz et caractérisation biologique 75

I.	Généralités sur le spectre THz	77
----	--------------------------------------	----

I.1.	THz « Gap »	77
I.2.	Instrumentation THz	79
I.3.	Vers l'intégration.....	83
II.	Intérêt en biologie.....	86
II.1.	Niveau d'énergie et interaction	87
II.2.	Investigation en biologie moléculaire	89
II.3.	Investigation en phase liquide et limitation.....	92
II.4.	Imagerie médicale THz	95
III.	Mode de Goubau pour l'investigation cellulaire.....	98
III.1.	Les ondes de surfaces	98
III.2.	Propagation filaire	99
III.3.	Excitation THz du mode de propagation filaire	101
III.4.	Excitation du mode filaire planaire	108
III.4.1.	Les lignes coplanaires	109
III.4.2.	Excitation planaire linéaire.....	113
III.4.3.	Excitation planaire elliptique	118
III.4.4.	Nouvelle topologie	121
III.4.5.	Réalisations et mesures	124
III.5.	Mode de Goubau en topologie planaire	128
III.5.1.	Influence de la forme de la section.....	128
III.5.2.	Influence du substrat diélectrique	131
III.6.	Propagation sur fils nanométriques	136
III.6.1.	Influence de la section et résolution spatiale.....	136
III.6.2.	Propagation avec des tailles nanométriques.....	140
III.7.	Coudes et résonateurs en topologie Goubau	148
III.7.1.	Les coudes	148
III.7.2.	Les résonateurs	151
	Conclusion.....	157
IV.	Bibliographie.....	159

Troisième partie: BioMEMS THz pour l'étude de la signalisation cellulaire

..... 167

I.	BioMEMS pour l'investigation sur cellule vivante.....	169
II.	Aspect microfluidique	170
III.	Aspect THz.....	180
IV.	Fabrication du BioMEMS THz	186
IV.1.	Matériau et procédés technologiques utilisés.....	188
IV.1.1.	Le BCB.....	188
IV.1.2.	Dépôt par LPCVD	190
IV.1.3.	La gravure du silicium.....	191
IV.1.4.	La métallisation	197
IV.2.	Réalisation des microcanaux	200
IV.3.	Réalisation de la partie hyperfréquence	203
IV.4.	Assemblage des deux étages du dispositif	207
V.	Biocompatibilité et tests biologiques	212
VI.	Résultats	215
VI.1.	Mesures sur solutions de base	216
VI.2.	Influence de la lactoferrine.....	219
VI.3.	Etude de l'albumine	223
VII.	Bibliographie.....	225

Conclusion générale **227**

Résumé..... **233**

Liste des figures

Première partie :

Figure 1. 1 : Illustration simplifiée d'une cellule vivante et des différents éléments qui la composent [1. 2].....	31
Figure 1. 2: Schématisation de la membrane cellulaire	33
Figure 1. 3: Interaction Ligand - Récepteur : Lactoferrine - Nucléoline	38
Figure 1. 4: Les protéoglycanes membranaires.....	39
Figure 1. 5 : Cellules CHO.....	40
Figure 1. 6 : CHO 677 déficiente en Héparane sulfate	41
Figure 1. 7 : CHO 618 déficiente en Héparane sulfate et Chondroïtane sulfate.....	41
Figure 1. 8 : Principe de la microscopie confocale	43
Figure 1. 9: Exemple d'utilisation de la microscopie confocale montrant la colocalisation de la lactoferrine avec la nucléoline [1. 5].....	44
Figure 1. 10: Principe du FRET, illustrant les phénomènes mis en jeu pour l'émission de FRET [1. 6].	45
Figure 1. 11: Spectre d'émission et d'extinction de la GFP et de la BFP [1. 10]	47
Figure 1. 12: Image FRET au sein d'une cellule, A: Accepteur, B: Donneur, C: Interaction donneur/accepteur montrant la localisation de l'ADN au sein du noyau [1. 12].	47
Figure 1. 13: Principe de la résonance à plasmon de surface [1. 13].....	49
Figure 1. 14: SPR (surface plasmon résonance) pour l'étude d'accroche d'une cellule vivante sur une surface [1. 14].....	51
Figure 1. 15: Schéma de principe d'un BioMEMS [1. 16]	55
Figure 1. 16: Exemple d'un procédé de fabrication pour la réalisation de microcanaux en polyester Erreur ! Source du renvoi introuvable.].....	57
Figure 1. 17: Exemple d'un BioMEMS destiné à des mesures ampérométriques montrant l'intégration hétérogène électronique et MEMS [1. 29].	59
Figure 1. 18: Mesure ampérométrique sur cellules vivantes, A : illustration du dispositif, B : résultats de mesure obtenus sur une population de cellules [1. 30].....	60
Figure 1. 19: Mesure en impédancemétrie sur cellule unique, A : Photographie des électrodes et des cellules immobilisées, B: Réponse du système [1. 31]......	61

Figure 1. 20: Caractérisation d'une cellule par la mesure de son indice de réfraction optique, A: Schéma du dispositif, B: Réponse du système [1. 33].	62
Figure 1. 21: Transduction mécanique d'une cellule pour étudier les forces mise en jeu lors de leur prolifération A : Schéma de principe, B : Micropiliers en PDMS [1. 34].	63
Figure 1. 22: Immobilisation de cellules au sein d'un microsystème par voie chimique à l'aide d'un traitement de surface, A : Principe du traitement de surface, B : Cellules immobilisées sur la surface traitée [1. 35].	64
Figure 1. 23: Exemple de réalisation d'immobilisation cellulaire par voie mécanique en utilisant l'aspiration [1. 36].	65
Figure 1. 24: Exemple de réalisation d'un BioMEMS pour étudier les échanges cellule-cellule en utilisant une immobilisation par aspiration. A : Dispositif utilisé, B : Principe de l'étude [1. 37].	66

Deuxième partie :

Figure 2. 1: Spectre électromagnétique	77
Figure 2. 2: Schéma de principe de la spectroscopie THz dans le domaine temporel (THz-TDS).	79
Figure 2. 3: Principe de production de porteurs de charges par illumination optique à l'aide d'un laser femtoseconde [2. 3].	80
Figure 2. 4: Correspondance entre le domaine temporel d'une impulsion THz et le domaine fréquentiel à la suite d'une transformée de Fourier [2. 3].	81
Figure 2. 5: Principe d'un banc électro-optique pour la caractérisation de composants en topologie planaire [2. 4].	82
Figure 2. 6: Principe de la mesure par déposition d'un patch d'excitation et de deux patches de sonde pour la caractérisation de la transmission et de la réflexion [2. 4].	83
Figure 2. 7 : Puissance d'émission en fonction de la fréquence pour les différentes sources THz [2. 5].	85
Figure 2. 8: Interactions onde-matière, présentant les mécanismes mis en jeu en fonction de la fréquence.	88

Figure 2. 9 : Schéma de principe du circuit résonateur pour l'étude de l'ADN par spectroscopie THz [2. 32].	90
Figure 2. 10 : Paramètre de transmission du résonateur chargé par l'ADN. Le décalage en fréquence du pic de résonance est une fonction de l'état de la molécule d'ADN [2. 32].	91
Figure 2. 11 : Décalage en fréquence relatif à un brin d'ADN muté et non-muté [2. 33].	91
Figure 2. 12: Spectre d'absorption de l'eau [2. 34].	92
Figure 2. 13 : Investigation de solutions biologiques en phase liquide, A : Schéma de principe du dispositif, B : photo de la réalisation [2. 38].	93
Figure 2. 14 : Dépendance fréquentielle du rapport du signal solution biologique/ eau pour de la GF-BSA/W et L-Arg/W pour chaque concentrations [2. 39].	94
Figure 2. 15: Spectre d'absorption d'un tissu normal et d'un tissu cancéreux [2. 41].	96
Figure 2. 16: Coefficients d'absorption moyen pour tous les échantillons prélevés sains et malades, et pour l'eau. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95% [2. 41].	97
Figure 2. 17: Excitation du mode de Goubau réalisée à l'aide de deux antennes cornets	101
Figure 2. 18: Schéma d'excitation d'un guide d'onde THz dans la configuration de deux lignes couplées [2. 57].	102
Figure 2. 19: Champ électrique illustrant le couplage dans la configuration de deux lignes placées perpendiculairement [2. 57].	103
Figure 2. 20: Excitation du mode de propagation filaire à l'aide d'une antenne photoconductrice, A : antenne idéale, B : antenne réalisée, C : carte de puissance émise par l'antenne idéale, D : Confrontation simulation par éléments finis et calcul analytique du diagramme de rayonnement de l'antenne idéale [2. 58].	104
Figure 2. 21: Simulation électromagnétique de l'antenne idéale et de l'antenne réelle.	105
Figure 2. 22: Propagation de l'onde le long du guide d'onde filaire pour l'antenne idéale et l'antenne réelle [2. 59].	106
Figure 2. 23: A : Illustration du banc expérimental pour l'excitation du mode de propagation filaire, B : Antenne réelle réalisée [2. 59].	107
Figure 2. 24 : Amplitude du champ électrique autour du fil, (A) avec et (B) sans guide	108
Figure 2. 25: Dimensions caractéristique du guide d'onde coplanaire	109

Figure 2. 26: Champ électrique et magnétique du guide coplanaire, a : mode coplanaire b : mode fente.	109
Figure 2. 27: Courbe de variation de l'impédance caractéristique en fonction des paramètres géométriques de la ligne.....	111
Figure 2. 28: A : Excitation linéaire, B : Excitation elliptique.....	112
Figure 2. 29: Grandeurs caractéristiques de la transition linéaire	113
Figure 2. 30: Champ électromagnétique de l'accès coplanaire de la transition.....	114
Figure 2. 31: Paramètre de transmission pour différentes longueur d'accès CPW.....	115
Figure 2. 32: A : Structure simulée, B=Champ électrique le long de la transition et sur le fil.	116
Figure 2. 33: Champ électrique (A) et magnétique (B) autour du fil de Goubau	116
Figure 2. 34: Courbe temporelle du signal d'entrée et de sortie de la transition	117
Figure 2. 35: Paramètre de transmission et de réflexion de la transition linéaire	118
Figure 2. 36: Grandeurs caractéristiques de la transition elliptique.....	118
Figure 2. 37: A : Structure simulée, B champ électrique le long de l'excitation	120
Figure 2. 38: Signal d'excitation et issu de la transition	120
Figure 2. 39 : Paramètre de transmission et de réflexion de la transition elliptique	121
Figure 2. 40: paramètres dimensionnels de la transition.....	122
Figure 2. 41: (A) Structure simulée et (B) carte de champ électrique de la transition.....	123
Figure 2. 42: Courbe temporelle du signal d'entrée et de sortie de la transition	123
Figure 2. 43: Paramètres de transmission et de réflexion en fonction de la fréquence	124
Figure 2. 44 : Illustration des structures réalisées sur substrat de quartz avec les diverses types d'excitation, A : Excitation linéaire, B : Excitation elliptique, C : Nouvelle topologie.	125
Figure 2. 45: Paramètres de transmission et de réflexion de la transition linéaire.....	126
Figure 2. 46: Paramètres de transmission et de réflexion de la transition elliptique.....	126
Figure 2. 47: Paramètres de transmission et de réflexion de la nouvelle transition.....	127
Figure 2. 48 : Illustration des différentes topologies possibles de propagation filaire, A : Ligne de Goubau de section cylindrique, B : ligne de Goubau de section carré, C : ligne de Goubau en topologie planaire.	128
Figure 2. 49: Illustration des cartes de champ électrique pour les différentes conformations du ruban.....	129

Figure 2. 50: Paramètres de transmission pour les différentes conformations du ruban.	130
Figure 2. 51: Paramètre de transmission pour différentes permittivité du substrat.....	131
Figure 2. 52: Carte de champ électrique pour différentes permittivités du substrat diélectrique sous la ligne pour un substrat de 500 μm de hauteur.	132
Figure 2. 53 : Extension du champ électrique autour d'un ruban de 5 μm de large pour différentes permittivités du substrat diélectrique.	133
Figure 2. 54 : Paramètre de transmission mettant en évidence l'apparition de mode de substrat en fonction de l'épaisseur de celui-ci.	134
Figure 2. 55 : Illustration du mode de substrat à une fréquence de 500GHz pour un diélectrique $\epsilon_R=2,65$ de 500 μm d'épaisseur.	135
Figure 2. 56 : Extension du champ électrique autour d'un ruban de 5 μm de large pour différentes fréquences	135
Figure 2. 57: Paramètre de transmission pour différentes largeur de ruban.	136
Figure 2. 58: Extension du champ électrique en fonction de la distance autour du fil pour différentes largeurs de ruban.	137
Figure 2. 59 : Evolution de l'extension spatiale du champ électrique autour du fil en fonction de la taille de celui-ci.	138
Figure 2. 60 : Illustration de réalisations de lignes de Goubau de différentes largeurs allant de 5 μm à 60 μm de largeur.	138
Figure 2. 61 : Paramètre de transmission d'une structure constituée de deux excitations tête bêche avec différentes largeur de ruban.	139
Figure 2. 62: Champ électrique autour du ruban pour différentes largeurs de fil de 1 μm à 100nm.....	140
Figure 2. 63: Extension du champ électrique pour différentes largeurs de ruban nanométriques	141
Figure 2. 64 : Paramètre de transmission pour différentes largeurs de fil nanométrique	142
Figure 2. 65: Evolution de l'épaisseur de peau en fonction de la fréquence.....	143
Figure 2. 66 : Topologie de ligne pour adapter l'excitation aux lignes de taille nanométrique.	144
Figure 2. 67: Illustration d'une réalisation avec ligne centrale de résolution nanométrique.	144

Figure 2. 68 : Paramètres de transmission et de réflexion pour un ruban de 500nm de large sur 100µm de longueur avec confrontation simulation mesure.	145
Figure 2. 69 : Paramètres de transmission et de réflexion pour un ruban de 250nm de large sur 100µm de longueur avec confrontation simulation mesure	146
Figure 2. 70 : Problème d'écriture électronique causant des gaps dans le ruban central.....	147
Figure 2. 71 : Paramètre de transmission et de réflexion pour un ruban avec un gap de 100nm.	147
Figure 2. 72: Structure simulée avec deux coudes	148
Figure 2. 73 : Paramètre de transmission pour des coudes de différents rayons de courbure.	149
Figure 2. 74: Champ électrique le long d'un coude de 250µm de rayon de courbure	150
Figure 2. 75: Exemple de réalisation de coude : A : coude de 250µm de rayon de courbure, B : coude de 500µm de rayon de courbure.	150
Figure 2. 76: Paramètre de transmission et de réflexion pour des coudes de différents rayons de courbure.....	151
Figure 2. 77: A : Principe des filtres à lignes couplées, B structure simulée en topologie Goubau	152
Figure 2. 78: Paramètres de transmission et de réflexion simulés pour deux lignes couplées avec un gap de 500nm à une fréquence de 180GHz.	153
Figure 2. 79: Influence du gap sur le paramètre de transmission du filtre réjecteur pour une fréquence de 180GHz.....	153
Figure 2. 80: Structure simulée d'un filtre à Stub, constituée de deux stub pour réalisation d'un filtre réjecteur de bande.	154
Figure 2. 81: Paramètres de transmission et de réflexion simulés pour une structure à deux stubs pour une fréquence respective de 140 et 180GHz.	155
Figure 2. 82: Structure simulée d'un filtre avec stub enroulé.	155
Figure 2. 83: Paramètre de transmission et de réflexion simulé pour une structure à stub enroulé à une fréquence de 140GHz	156

Troisième partie :

Figure 3. 1: Vue schématique du BioMEMS	169
---	-----

Figure 3. 2 : Effet du cisaillement sur l'adhésion et le détachement de cellules endothéliales.	171
Figure 3. 3: Ecoulement dans un canal de section carré 50µm x 50µm pour un débit de 15nl/min.	173
Figure 3. 4 : Structure microfluidique retenue pour le BioMEMS, constituée d'un canal principal et d'un canal de mesure.....	174
Figure 3. 5: Simulation de la répartition des flux dans la structure	175
Figure 3. 6: Simulation de l'écoulement dans un microcanal de 50µm x 50µm avec une cellule allongée au centre.	176
Figure 3. 7: Illustration du dispositif relié par des capillaires aux poussettes seringues.....	177
Figure 3. 8: Schéma de la connectique microfluidique pour injection des solutions biologiques.	177
Figure 3. 9 : Propagation du fluide dans le canal principal et le canal de mesure	178
Figure 3. 10: Cellules en sortie du canal de mesure.....	179
Figure 3. 11: Structure électromagnétique sur membrane de BCB.....	180
Figure 3. 12 : Modèle de Debye du second ordre pour différentes solutions, A : Eau, B : Méthanol, C : 1-Propanol, D : Ethanol.....	182
Figure 3. 13: Structure simulée avec variation du liquide au sein du canal microfluidique ..	182
Figure 3. 14: Paramètre de transmission pour les différents liquides investigués	183
Figure 3. 15 : Structure microonde choisie pour être réalisée sur le BioMEMS	184
Figure 3. 16 : Paramètre de transmission et de réflexion de la partie hyperfréquence du BioMEMS.	184
Figure 3. 17: Vue éclatée du BioMEMS montrant les différents matériaux utilisés pour sa réalisation.	187
Figure 3. 18 : Etat du BCB en fonction de la température et du temps de recuit [3. 4].....	189
Figure 3. 19 : Courbe de température pour recuit thermique du BCB.	190
Figure 3. 20: Schéma de principe d'un four LPCVD.....	191
Figure 3. 21: Profil de gravure du silicium par voie humide ou sèche.	192
Figure 3. 22: profil de gravure humide du silicium par KOH.....	193
Figure 3. 23: Principe d'un bâti de gravure RIE	194
Figure 3. 24: Principe d'un bâti de gravure ICP	195

Figure 3. 25: Etape de gravure et de passivation pour obtenir un profil anisotrope du silicium.	196
Figure 3. 26: Schéma de principe d'un bâti de dépôt par pulvérisation cathodique	197
Figure 3. 27: Principe d'un bâti de dépôt par évaporation	198
Figure 3. 28 : Etape technologique de réalisation de ligne métallique par lift-off.....	199
Figure 3. 29 : Illustration d'un profil en casquette	200
Figure 3. 30: Etape de réalisation des microcanaux.....	201
Figure 3. 31 : Photos de réalisation de l'étage composant les microcanaux, A : Microcanaux face avant réalisés par gravure sèche, B : Libération des microcanaux par gravure humide.....	202
Figure 3. 32: Etape de réalisation de la partie hyperfréquence et de la membrane de polymère.	204
Figure 3. 33: Problème de lift-off réalisé sur BCB après Remover PG.....	205
Figure 3. 34: Profil de la ligne après lift-off illustrant l'enterrement de celle-ci a cause du Remover.	205
Figure 3. 35: Gravure du BCB à l'acétone.....	206
Figure 3. 36: Assemblage des deux niveaux réalisés	207
Figure 3. 37: Photo MEB de la zone de collage par polymère des deux niveaux.....	209
Figure 3. 38: Courbe d'évolution de la température et de la pression pour effectuer un collage par thermo compression.	209
Figure 3. 39 : Illustration de zones de collage des deux wafers.....	210
Figure 3. 40 : A : Wafer constitué de 4 structures, B : Zoom sur une structure montrant la partie microfluidique et la partie hyperfréquence.	210
Figure 3. 41 : Zoom sur la zone sensible du BioMEMS avec vu du fil dans le fond du canal de mesure.	211
Figure 3. 42 : Cellules sur substrat de quartz et sur plots de BCB.....	212
Figure 3. 43 : Photos des cellules dans le canal de mesure après 24h.	213
Figure 3. 44 : Positionnement du BioMEMS et du pousse seringue sur le banc de mesure 140- 220GHz.	215
Figure 3. 45 : Paramètres de transmission et de réflexion pour les différents liquides investigués.....	216

Figure 3. 46 : Phase du paramètre de réflexion pour les liquides investigués.	217
Figure 3. 47 : Phase du paramètre de transmission.	218
Figure 3. 48 : Evolution du paramètre de transmission pour différentes concentrations de lactoferrine dans du PBS.	219
Figure 3. 49 : Amplitude du paramètre de transmission en fonction de la concentration dans la bande 180-190 GHz.	220
Figure 3. 50: Phase du paramètre de transmission en degrés pour les différentes concentrations.....	221
Figure 3. 51 : (a) Amplitude et (b) phase du paramètre de réflexion.....	222
Figure 3. 52: Paramètre de transmission pour différentes concentrations de lactoferrine dans du milieu de culture.....	223
Figure 3. 53 : Paramètre de transmission pour différents solutions.....	224

Liste des tableaux

Tableau 1. 1: Composition d'une cellule vivante.....	32
Tableau 2. 1 : Dimensions de la transition linéaire	113
Tableau 2. 2: Dimensions de la transition elliptique.....	119
Tableau 2. 3: Dimensions caractéristique de la transition.....	122
Tableau 3. 1 : Conditions d'écoulement dans plusieurs géométries testées.....	172
Tableau 3. 2 : Paramètres de permittivité et de relaxation pour diverses solutions	181

Introduction

La connaissance des phénomènes informationnels en biologie représente une activité de recherche de premier plan. Elle a commencé par une approche moléculaire par le séquençement du génome et plus récemment par l'étude du protéome. Une évolution parallèle à cette approche descriptive est définie pour un aspect plus fonctionnel. Elle se traduit par des études sur les interactions entre ces différentes biomolécules. Une des grandes réussites technologiques pour observer ces interactions est l'analyse massivement parallèle opérée par des composants intégrés tel que les puces à ADN. Le schéma suivi est celui couramment développé dans les biocapteurs, à savoir un biorécepteur couplé à un moyen de transduction. A la différence d'un biocapteur classique, couplant généralement une réaction biochimique avec une transduction électrochimique, la puce à ADN utilise une technique d'hybridation d'une séquence d'ADN marquée par une étiquette fluorescente. La transduction est alors située dans le domaine électromagnétique de l'optique. Cette méthodologie n'est peut être pas la plus intéressante dans le cas d'investigation fonctionnelle. C'est peut être une des raisons qui pousse l'instrumentation vers des analyses sans marqueurs, et de façon la plus non invasive possible. De plus, l'utilisation de marqueurs interfère avec la fonction biologique elle-même. Une clé intéressante pour y parvenir réside dans une intégration plus sophistiquée à l'aide de fonctions microfluidiques. Ce couplage entre biocapteurs et microfluidique définit les BioMEMS (Biological Micro Electro Mechanical System).

Un grand nombre de principes physiques sont mobilisés pour réaliser la fonction de transduction. Dans le champ de l'électromagnétisme non-ionisant, la partie basse du spectre, avec des mesures d'impédance, et la partie haute du spectre avec l'optique infrarouge, visible ou UV, apportent leur contribution. Néanmoins, les fréquences intermédiaires sont encore peu utilisées. C'est encore plus vrai pour les fréquences THz à cause de la difficulté technologique de réalisation de moyens d'émission et de détection de ces ondes. Ce véritable « trou » électromagnétique se comble progressivement, surtout depuis l'apparition des bancs impulsionsnels à détection électro-optique. Les premières analyses effectuées sur des échantillons généralement lyophilisés montrent des résultats intéressants, surtout en terme d'analyse conformationnelle. En effet, le spectre THz adresse surtout, en terme d'énergie, des liaisons faibles au sein de la matière. Dans le vivant, les faibles énergies de liaison sont les plus nombreuses et les plus primordiales pour les fonctions biologiques. Par exemple, la

conformation des protéines dépend d'un grand nombre de ponts hydrogénés dont l'énergie se situe dans le spectre THz. C'est la raison pour laquelle ce domaine spectral est particulièrement étudié actuellement dans les plus grands laboratoires internationaux.

La difficulté majeure de l'utilisation des THz en biologie « réelle », c'est-à-dire en milieu fortement aqueux, est liée à une absorption extrêmement élevée. Par contre, la possibilité d'une analyse sur de faibles volumes est particulièrement attrayante. Nous avons alors de nouveau une convergence entre ce nouveau moyen de transduction et la microfluidique. C'est donc cette orientation que nous prendrons tout au long de ce mémoire.

Les discussions que nous avons pu avoir avec les biologistes ont montrées que, au delà de l'aspect descriptif, la fonction en biologie est primordiale. C'est vrai au niveau moléculaire, mais encore plus vrai au niveau cellulaire où se concentrent actuellement beaucoup de recherches en biologie. L'objet principal de ce travail est donc de démontrer la faisabilité d'une investigation THz sur cellules vivantes au sein d'un environnement le plus naturel possible. La première partie de ce mémoire met l'accent sur les avantages d'une technologie intégrée dans un paysage instrumental souvent très lourd. En particulier, nous montrons que l'émergence des BioMEMS cellulaires, comportant des circuits microfluidiques et d'immobilisation est un atout majeur pour l'investigation THz. Dans une seconde partie, après avoir explicité l'intérêt de la spectroscopie THz en biologie moléculaire, nous montrons dans quelles conditions nous atteignons des résolutions spatiales microniques compatibles avec une investigation sur cellules biologiques. La redécouverte des lignes de Goubau est ici appliquée dans un mode de propagation planaire. Nous sommes les premiers à montrer que la propagation est conservée dans de bonnes conditions sur des fils de tailles nanométriques. Nous obtenons alors un confinement de champs électromagnétiques où l'extension spatiale est micronique. La dernière partie de ce mémoire est consacrée à l'intégration de ces sondes THz au sein d'un BioMEMS réalisé en technologie mixte. Elle garantit la compatibilité entre propagation électromagnétique et circulation microfluidique. Nous montrons les premiers résultats obtenus sur des solutions biologiques bien connues, mais dont certaines n'ont jamais été mesurées à ces fréquences. Enfin, nous avons également montré que le transport et la survie de cellules vivantes est possible au sein de ce BioMEMS.

Première partie:

Moyens d'analyses actuels en signalisation
cellulaire

I. Généralités sur les cellules biologiques

I.1. Généralités sur les cellules biologiques

Tous les organismes sont constitués d'une ou plusieurs cellules, unités élémentaires dont la taille est de quelques dizaines de micromètres (Figure 1. 1). Quel que soit l'organisme auquel elles appartiennent, les cellules sont formées de parties appelées organites cellulaires qui remplissent des fonctions spécialisées comme les organes d'un être complexe. Chaque cellule est une entité vivante qui, dans le cas d'organismes multicellulaires, fonctionne de manière autonome mais coordonnée avec les autres. Les cellules de même type sont réunies en tissus, eux même réunis en organe [1. 1].

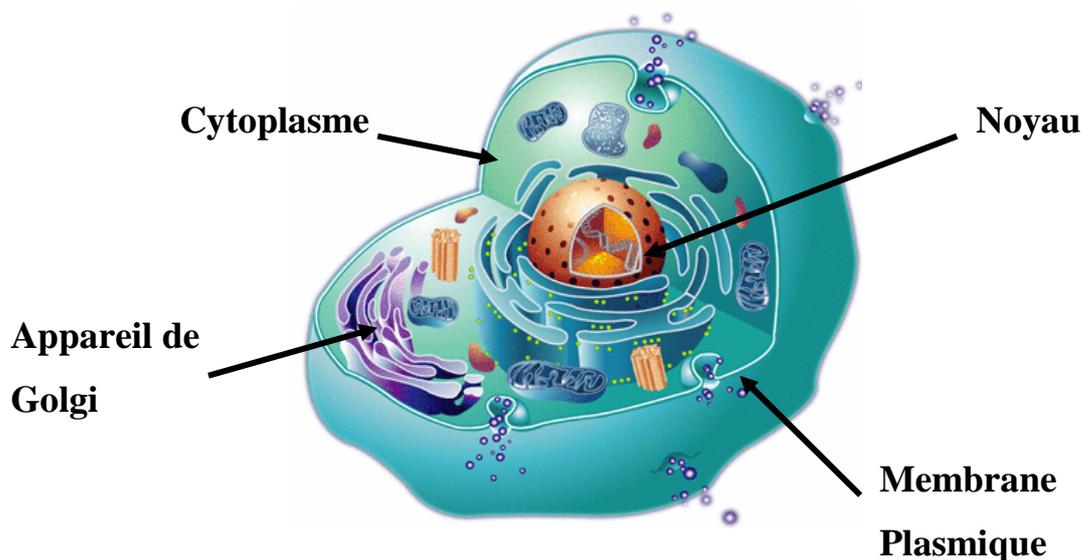


Figure 1. 1 : Illustration simplifiée d'une cellule vivante et des différents éléments qui la composent [1. 2]

Première Partie : Moyens d'analyses actuels en signalisation cellulaire

L'étude anatomique des cellules faite à l'échelle plus fine, grâce en particulier au microscope électronique, révèle que les organites ont une structure caractéristique qui est en quelque sorte leur carte d'identité. Les analyses biochimiques et biophysiques révèlent la nature des molécules qui composent les organites et, pour nombre d'entre eux, leur architecture moléculaire. Au centre de la cellule existe le noyau où est rassemblé la majorité des informations qu'elle utilise au cours de son existence. La cellule vivante est un élément semi perméable délimité par la membrane plasmique. Cette membrane est un isolant séparant deux milieux conducteurs, le milieu intracellulaire (cytoplasme) et le milieu extracellulaire. A l'échelle moléculaire, il existe également une unité architecturale. On peut en effet classer les édifices moléculaires qui constituent les organites en trois ensembles caractérisés entre eux qui sont la membrane cellulaire, les structures fibreuses du cytosquelette intracellulaire et les complexes nucléoprotéiques des chromosomes et des ribosomes. La membrane cellulaire est constituée de lipides et de protéines. La composition chimique d'une cellule est donnée dans le tableau suivant (Tableau 1. 1):

Composants	Pourcentage de la masse totale
Eau	70%
Protéines	18%
Lipides	5%
ADN	0,25%
ARN	1,1%
Polyosides	2%
Molécules simples (acides aminés, acide gras, glucose)	3%
Ions minéraux	1%

Tableau 1. 1: Composition d'une cellule vivante

Les cellules composant les organismes vivants sont, comme nous l'avons dit précédemment, limitées par une membrane plasmique constituée, selon le modèle de Singer et Nicholson, d'une double couche lipidique (essentiellement de phospholipide, de cholestérol et de glycolipides) qui porte ancrée en elle de nombreuses protéines. L'épaisseur de la membrane cellulaire est de l'ordre de 7 à 9 nm (Figure 1. 2).

La membrane plasmique est asymétrique par suite de la localisation préférentielle de certains lipides dans un des deux feuillets. La phase lipidique de la membrane est fluide, ce qui permet un renouvellement continu des membranes par déplacement latéral des protéines et introduction de nouvelles protéines.

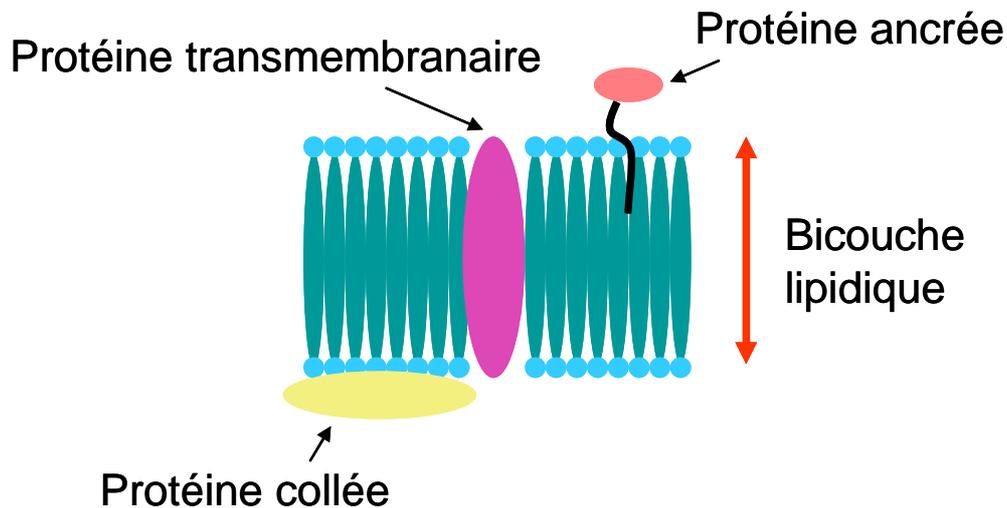


Figure 1. 2: Schématisation de la membrane cellulaire

I.2. Cellules couramment étudiées

Les types de cellules les plus utilisées dans le domaine de la biologie cellulaire sont les cellules endothéliales de mammifères, comme par exemple les cellules souches, les cellules cancéreuses ou les cellules nerveuses qui jouent toutes un rôle important dans notre machinerie biologique.

Première Partie : Moyens d'analyses actuels en signalisation cellulaire

Les cellules souches sont un centre d'intérêt spectaculaire en raison de leur capacité à se transformer en n'importe quel type cellulaire dans les organismes supérieurs. Cette transformation pourrait même peut-être s'effectuer à la demande. Cela provoquerait une évolution profonde de certains domaines de la médecine et de la biologie cellulaire. Sans entrer dans les détails, elles désignent des cellules non spécialisées, capables de se multiplier à l'identique, c'est à dire indifférenciées, ou de se transformer en un ou plusieurs types cellulaires spécialisés de l'organisme : foie, peau, etc. Les cellules souches sont ainsi définies par leur potentialité de développement. Le type même de cellule souche est la cellule embryonnaire initiale, le zygote, qui est à l'origine de toutes les cellules de l'organisme ; au fur et à mesure du développement embryonnaire, les cellules sont canalisées vers des voies de différenciation spécifiques et leur potentiel de développement se modifie ; les cellules souches de ces différentes voies se différencient seulement en quelques types de cellules : par exemple, les cellules souches dans le cerveau donnent les différentes sortes de neurones et les autres cellules du système nerveux central. Si l'existence de cellules souches pendant le développement était prévisible, leur existence dans les tissus adultes est plus surprenante : il existe par exemple dans le muscle et le système sanguin des cellules capables, en cas de besoin, de donner du muscle ou des cellules sanguines, mais aussi d'autres lignées. Il apparaît donc important de mieux comprendre ces mécanismes de différenciation. L'observation quantitative par des mesures sur différents paramètres physiques est donc une nécessité. Les ondes électromagnétiques, et en particulier TéraHertz, peuvent apporter une contribution originale dans ce domaine.

Un autre type de cellules couramment étudié en biologie sont les cellules cancéreuses. Ces cellules sont le siège d'un développement anarchique, suite généralement à une agression ou un dommage. L'agression peut être violente et courte, ou bien, dans la majeure partie des cas, de faible intensité, mais étendue sur une longue période. Cette altération de la cellule constitue la base même de tous les cancers. La cellule n'arrête plus de se multiplier, et reste en vie dans un organe où habituellement les cellules meurent et se renouvellent rapidement. Cette prolifération va aboutir à la formation de la tumeur, qui, en se développant arrive à détruire les cellules normales avoisinantes. La capacité de se diviser, de se spécialiser, mais aussi de mourir est inscrite dans le génome de chaque cellule saine. Sous l'influence de

Première Partie : Moyens d'analyses actuels en signalisation cellulaire

facteurs environnementaux, (tabac, le soleil...), de certains agents chimiques ou physiques, ou encore de certains virus, le génome humain subit des altérations, appelées mutations génétiques, qu'il est en mesure de réparer. Lorsque ce système de réparation est défectueux ou débordé, la cellule conserve ces mutations et devient anormale. Ne répondant plus aux signaux environnants, elle échappe à toute régulation. De nombreux tests en laboratoire sont réalisés pour pouvoir investiguer ces cellules cancéreuses et beaucoup de recherches en thérapeutique sont effectuées pour pouvoir les traiter. Des progrès considérables ont été accomplis dans l'identification et l'analyse des signaux qui stimulent ou au contraire freinent la division cellulaire. En effet, dans le développement des cancers, deux ensembles de gènes distincts jouent un rôle essentiel. Ils interviennent directement dans le contrôle de la division des cellules. Les gènes qui stimulent la division cellulaire, existent dans le cancer, sous une forme anormale, dite oncogène. Un autre ensemble de gènes, dits suppresseurs de tumeurs, a pour fonction de freiner le déclenchement de la division cellulaire. L'action des oncogènes est dominante, c'est à dire qu'une mutation sur une seule copie du gène suffit à déclencher une division cellulaire anormale. Inversement, il faut que les deux copies du gène suppresseur de tumeurs soient mutées pour qu'il n'y ait plus de fonction régulatrice de la division cellulaire. De façon générale, plusieurs mutations doivent être accumulées pour qu'une cellule risque de se transformer en cellule cancéreuse. Et la plupart des mutations qui peuvent se produire sur les gènes d'une cellule ne représentent aucun risque et sont sans conséquence, ou entraînent directement la mort de la cellule mutée. De nombreuses recherches ont été et restent à accomplir pour mieux comprendre ce phénomène. Elles nécessiteront de nouveaux moyens d'investigation, notamment dans le spectre électromagnétique. Des mesures publiées récemment dans le domaine des fréquences THz donnent des informations en terme de différenciations entre cellules saines et cellules malignes.

Un autre type cellulaire fortement étudié en biologie, est la population des cellules nerveuses, comme les neurones. Les neurones sont des cellules qui constituent l'unité fonctionnelle de notre système nerveux et elles se trouvent principalement dans notre cerveau. On peut estimer que le système nerveux humain comprend environ 100 milliard de neurones. Elles communiquent par transmission d'influx nerveux qui sont des impulsions électriques. De nombreuses études visent à comprendre les mécanismes mis en jeu lors de la communication

au sein du cerveau. La communication entre les cellules du système nerveux fait appel également à des échanges chimiques transférés localement entre les synapses dans un vaste réseau de structures comportant plusieurs branches. La complexité d'organisation de ce réseau a fait de l'étude de ce type de cellule quelque chose de très compliqué et il est très difficile de différencier les différents signaux chimiques impliqués au niveau cellulaire. De nombreuses études visent à immobiliser un petit nombre de neurones pour mieux comprendre les phénomènes de communication et pour pouvoir identifier les différents signaux de communications. Toutes ces études et les résultats qui en découleront pourront aider à mieux comprendre et à soigner des maladies comme la maladie de parkinson qui est une dégénération du système nerveux. Le développement des BioMEMS peut avoir une grande importance dans l'analyse de ce type de cellules.

I.3. Les messages biologiques

Le transfert d'information d'un organe à l'autre ou à l'extérieur des organes fait appel, chez les animaux comme chez les plantes, à des signaux chimiques. Selon l'éloignement de la cellule cible, il peut s'agir de communication autocrine (la cellule s'envoie un message « pense-bête »), paracrine (la cellule adresse celles qui l'entourent) ou endocrine (la cellule communique avec des cellules d'un organe éloigné via le sang). Le grand système paracrine de l'organisme est le système nerveux. Les corps cellulaires des deux partenaires de la communication peuvent être éloignés. Ils émettent des prolongements (axones et dendrite) qui entrent en contact et diminuent la distance effective entre eux. La molécule informative est délivrée au contact de la cellule cible, leurs récepteurs sont moins sensibles que ceux du système endocrine. Toutefois, bien que différent par les modalités de transmission de la molécule, il n'est pas rare que système nerveux et système endocrinien partagent les mêmes transmetteurs. On peut signaler aussi que la reconnaissance mutuelle des cellules fait appel à un système paracrine, en général au moyen de molécules portées par la surface cellulaire mais non libérée dans l'environnement. La caractérisation de ces signaux et l'analyse des règles de leur émission et de leur réception constituent l'objet de la communication cellulaire. Ce domaine est en extension rapide, car des recherches récentes ont révélé que ces molécules sont beaucoup plus nombreuses qu'on ne le pensait jusqu'ici: on en connaît actuellement plus

d'une centaine à la fin des années quatre-vingt. Les signaux chimiques de la communication cellulaire sont reconnus par chaque cellule grâce à des récepteurs; l'interaction d'un signal et d'un récepteur peut être, en première approximation, comparée à la rencontre d'une clé et d'une serrure. La reconnaissance de chaque couple signal récepteur est en effet basée sur des complémentarités de leur structure tridimensionnelle, ainsi que de la distribution de leurs charges électriques. Il existe une spécificité de chaque molécule informationnelle pour son récepteur. On distingue deux grandes catégories de récepteurs: ceux qui sont situés sur la membrane plasmique qui entoure chaque cellule, et ceux qui sont localisés dans le noyau que la cellule renferme.

Le modèle biologique qui a été choisi pour notre étude dans la compréhension des messages biologiques est le couple lactoferrine nucléoline (ligand - récepteur) (Figure 1. 3). La lactoferrine est une glycoprotéine de la famille de transfert d'information. L'expression et la sécrétion de la lactoferrine, en particulier dans le lait et dans les fluides digestifs, sont liées à son implication dans la première ligne de la défense du système immunitaire. La lactoferrine est sécrétée par des cellules épithéliales dans la plupart des fluides à sécrétion externe tels que la salive, la bile, les fluides pancréatiques et gastriques, les larmes et le lait. La lactoferrine joue également un rôle important dans les processus inflammatoires. En plus de ces propriétés antimicrobiennes directes, la lactoferrine peut régler l'immunoréaction et se protéger contre l'infection et le choc septique. Plusieurs mécanismes cellulaires qui expriment la modulation des immunoréactions inflammatoires ont été établis par la lactoferrine. La synthèse et la sécrétion de lactoferrine peuvent être continues (les fluides à sécrétion externe) ou peut être mis dans la voie sécréteuse attendant un signal externe pour être sécrétée. La lactoferrine peut se lier sur la surface de beaucoup de cellules pour jouer un rôle instructif. Récemment, la nucléoline, une protéine nucléaire, a été identifiée comme accepteur de lactoferrine sur la membrane des cellules. La nucléoline circule entre le noyau et la membrane des cellules, réglant l'attache de la lactoferrine à la membrane et de son endocytose vers divers compartiments de la cellule. Ce règlement dépend du type de la cellule et de la présence des protéoglycanes, une protéine de la membrane.

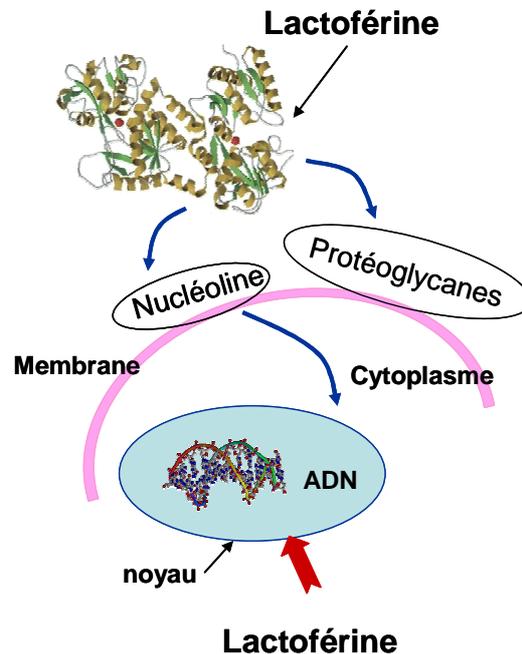


Figure 1. 3: Interaction Ligand - Récepteur : Lactoferrine - Nucléoline

Un protéoglycane est la combinaison d'une protéine et d'un glycosaminoglycane. L'association entre les deux types de chaîne s'effectue essentiellement dans l'appareil de Golgi, mais également au niveau du réticulum endoplasmique d'une cellule. Les protéoglycans peuvent être soit transportés à l'extérieur de la cellule par exocytose (s'intégrant alors à la matrice extracellulaire sous forme de chondroïtine-sulfate, kératane-sulfate, héparane-sulfate etc.), soit entrer dans la constitution de la membrane plasmique, jouant alors un rôle dans les relations cellule milieu extracellulaire. Les protéoglycans sont les composants essentiels de la matrice extracellulaire (Figure 1. 4). Les chaînes de sucres sont très longues mais non ramifiées. Ce sont des pièges à eau. L'absorption importante des fréquences THz dans les milieux aqueux rend ce domaine spectral particulièrement attrayant pour l'étude des protéoglycans que nous détaillerons dans le prochain chapitre.

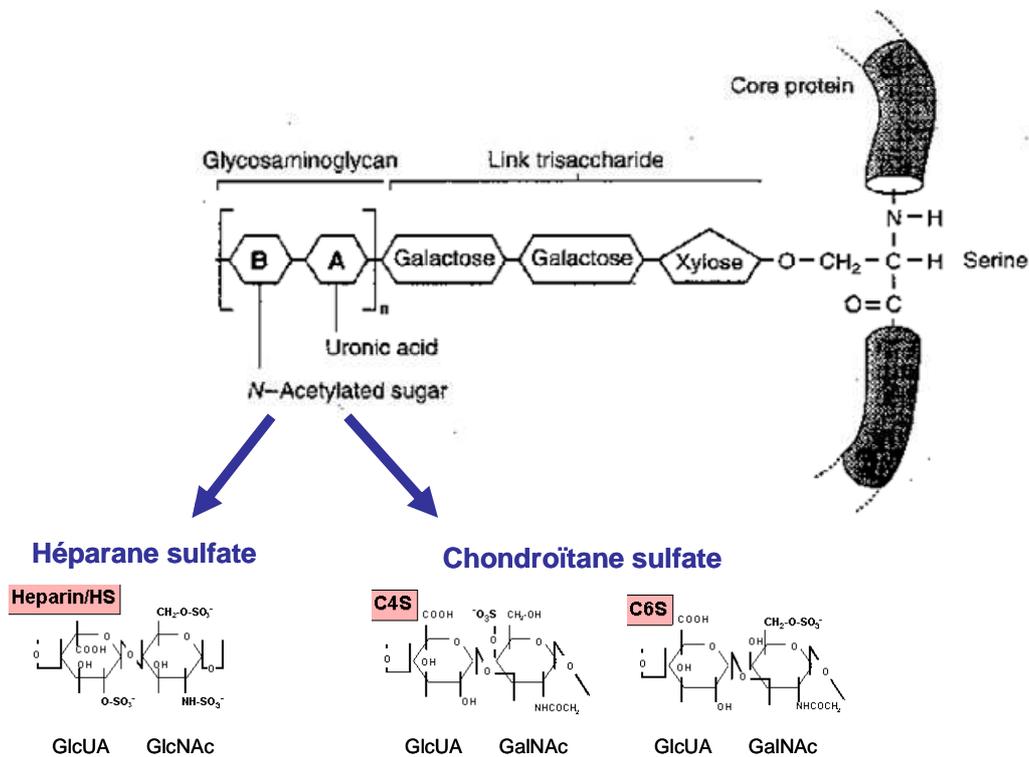


Figure 1. 4: Les protéoglycanes membranaires

I.4. Les CHO et ses mutantes

Pour réaliser nos études, nous avons choisi, comme cellule de travail, des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). Elles ont la particularité de produire des molécules recombinantes, bien connues par les biologistes [1. 3] [1. 4]. Il existe essentiellement quatre systèmes de production de molécules recombinantes : les bactéries, les levures, les cultures de cellules de mammifères, et les animaux. L'activité de certaines molécules nécessite la présence d'un mécanisme de glycosylation similaire à celui retrouvé chez l'être humain pour assurer la fonctionnalité de ces protéines. Les systèmes animaux présentent l'avantage d'utiliser un mécanisme de glycosylation menant à l'obtention de produits identiques à la molécule d'origine. Les cellules de mammifères, et plus particulièrement les cellules CHO, apparaissent comme un système incontournable pour la production de glycoprotéines recombinantes d'intérêt thérapeutique. En effet ces cellules présentent l'avantage de posséder une machinerie cellulaire complexe leur permettant d'assurer une maturation post-traductionnelle quasi-

humaine des protéines, souvent indispensable à une action thérapeutique de la protéine. Toutefois, les cellules de hamster chinois présentent quelques différences par rapport à la cellule humaine comme l'expression de certaines enzymes présente chez l'homme et non synthétisé chez le hamster et inversement, des enzymes synthétisés chez le hamster et pas chez l'homme. C'est pour cela que différents mutants de ce type de cellule animale sont disponibles sur le marché. Les cellules viennent de « American Type Culture Collection (ATCC) » qui dispose d'un large panel de lignée cellulaire (Figure 1. 5).

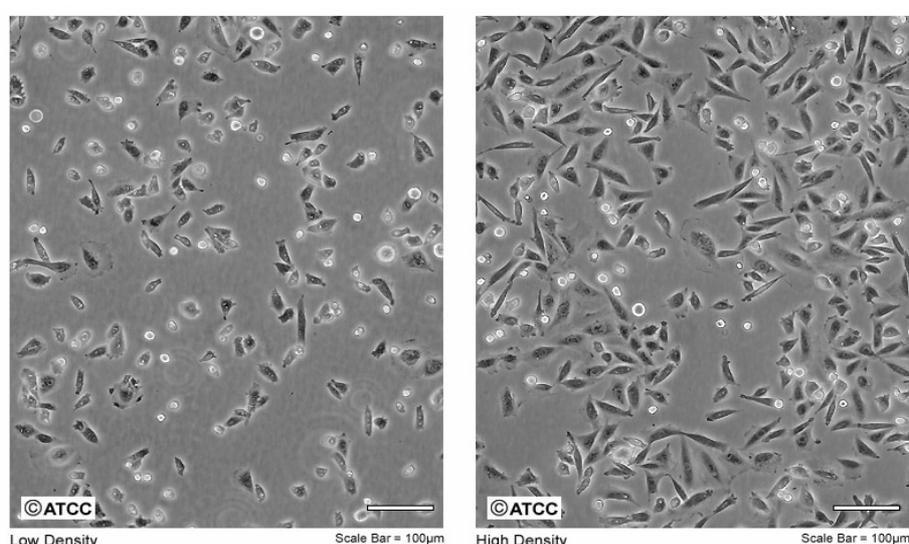


Figure 1. 5 : Cellules CHO

Les différents mutants de cellules CHO que nous allons utiliser dans notre étude sont les cellules CHO-K1, les cellules CHO-677 (Figure 1. 6) et les cellules CHO-618 (Figure 1. 7). Les cellules CHO-677 sont des cellules qui n'expriment pas de protéoglycanes héparane-sulfates. Les cellules CHO-618 n'expriment pas de protéoglycanes héparane-sulfates et chondroïtane-sulfates.

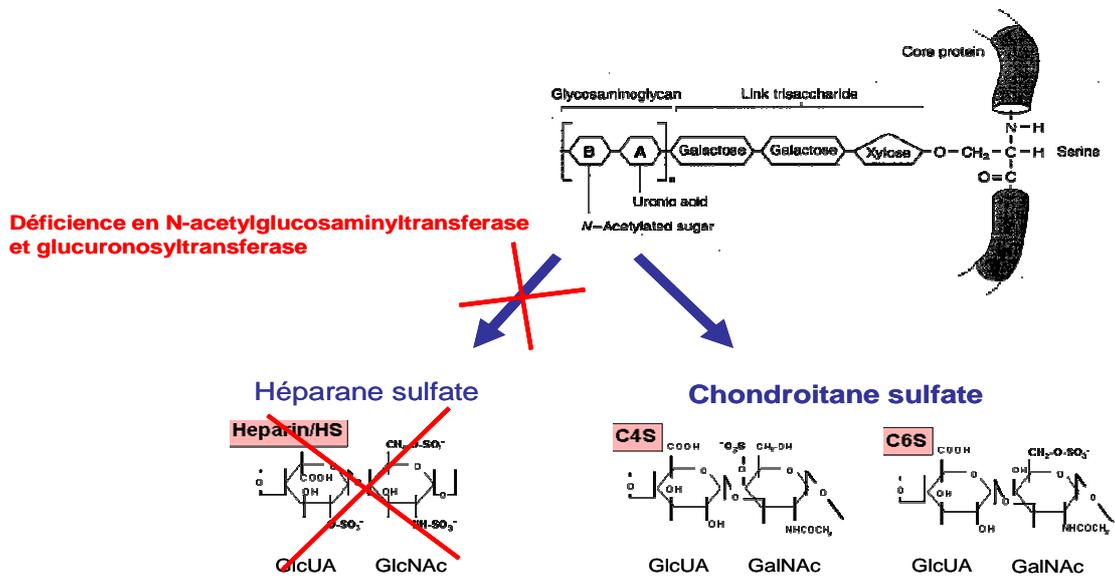


Figure 1. 6 : CHO 677 déficiente en Héparane sulfate

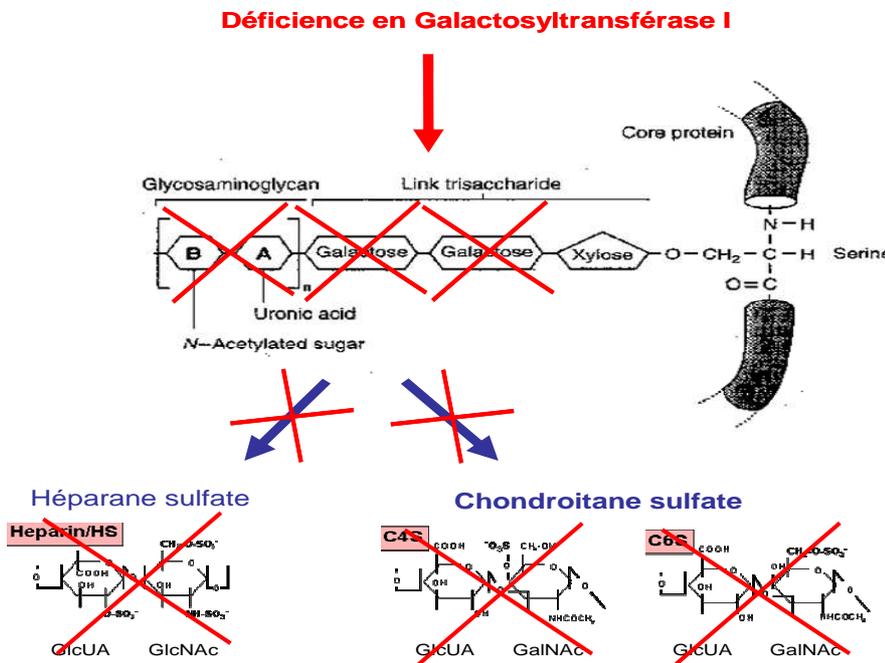


Figure 1. 7 : CHO 618 déficiente en Héparane sulfate et Chondroïtane sulfate

II. Analyse par l'instrumentation macroscopique

II.1. Microscopie confocale

La microscopie confocale est l'une des percées les plus notables de ce siècle en microscopie optique. Elle est aujourd'hui une architecture complexe comprenant des lasers, des éléments optiques, des dispositifs à balayage rapide et des ordinateurs qui traitent numériquement les images. Cette synthèse permet d'analyser l'intérieur d'objets microscopiques et de les visualiser en trois dimensions. L'inconvénient majeur de la microscopie classique à fluorescence est une perte de résolution due à l'émission de fluorescence défocalisée qui se superpose à l'image du plan focal. La microscopie confocale a permis de pallier ces inconvénients puisque son principe est de pratiquer des couches optiques virtuelles dans l'objet et de n'enregistrer que l'image de la fluorescence émise dans un plan. Le principe de la microscopie confocale est le suivant (Figure 1. 8) : un rayon laser exciteur pénètre dans l'échantillon marqué par des fluorochromes. Il y a alors émission de rayons fluorescents provenant de différents plans de pénétration. Grâce à un diaphragme variable ou « pinhole » qui élimine le signal fluorescent provenant d'autres plans, il est possible de sélectionner les rayons émis par un seul plan de pénétration. Ces rayons passent alors à travers un bloc de filtrage de longueurs d'onde, puis arrivent à un système de détection basé sur des photomultiplicateurs. L'imagerie de multi fluorescence en microscopie confocale fournit une solution rapide et quantitative pour visualiser et analyser la distribution spatiale de plusieurs structures cellulaires, à l'échelle submicronique. Une autre possibilité est de pouvoir agrandir certaines zones de l'échantillon, ce qui permet à la microscopie confocale d'améliorer considérablement le pouvoir de résolution des marquages par fluorochromes. On obtient couramment une résolution latérale de $0,3\mu\text{m}$ et une résolution verticale de $0,5\mu\text{m}$. Il devient donc possible d'individualiser de très petites structures marquées.

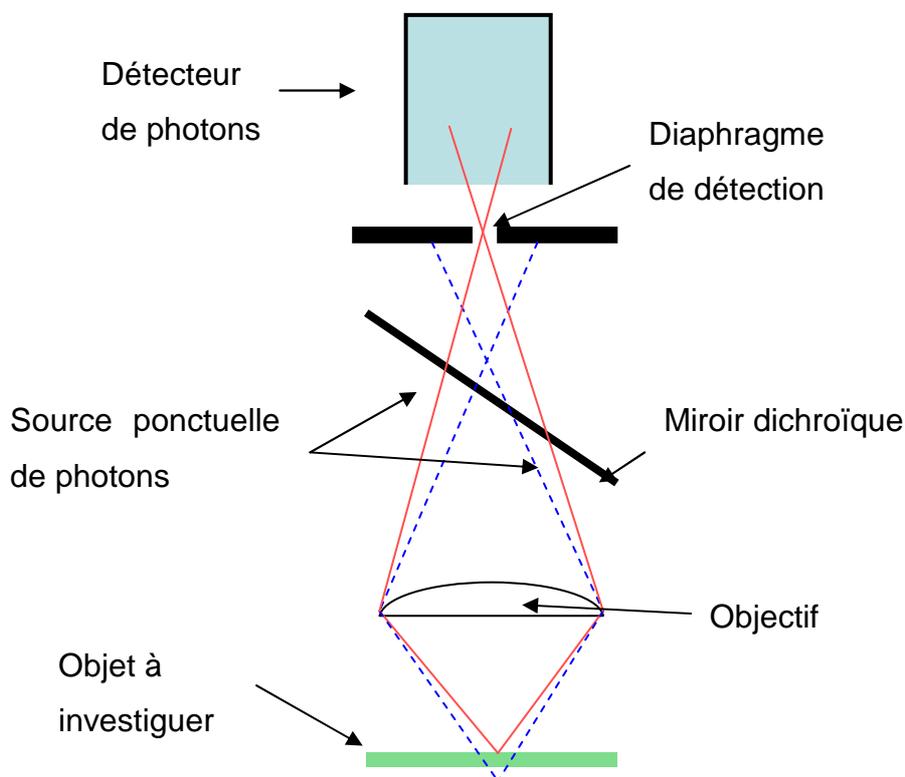


Figure 1. 8 : Principe de la microscopie confocale

La microscopie confocale couplée avec des colorants visibles activés par champ électrique ou avec des sondes fluorescentes lipidiques peut être utilisée pour étudier des changements dans la physiologie cellulaire. La microscopie confocale permet d'étudier la localisation de différentes protéines dans les cellules. Nous pouvons illustrer l'utilisation de la microscopie confocale par un exemple propre à notre étude concernant l'interaction de la lactoferrine avec la nucléoline [1. 5]. Généralement la réticulation d'un ligand mène à grouper ou à couvrir son récepteur. En conséquence, les biologistes ont étudiés la distribution de la nucléoline externe suivant la réticulation de la lactoferrine. Pour ces études ils ont utilisé une variété de cellule humaine de lymphocyte de type MT-4, qui convient aux études couvrant les antigènes extérieurs. L'attache de la lactoferrine sur les MT-4 a été effectuée à 20°C par lavage des cellules et incubation avec de l'anti-lactoferrine pour induire l'agrégation latérale des surfaces de liaison de la lactoferrine. Les cellules partiellement fixées ont été alors incubées avec le

mAb, D3 (spécifique pour la nucléoline humaine), pour montrer la distribution à l'état d'équilibre de la nucléoline sur la membrane de la cellule. Sous ces conditions expérimentales, la nucléoline est fixée sur la cellule pour qu'elle puisse coïncider avec la lactoferrine (Figure 1. 9A). D'autre part, le même traitement appliqué sur la cellule en absence de lactoferrine, on constate que la nucléoline est uniformément distribuée sur la membrane (Figure 1. 9B). Les images en microscopie confocale montre bien qu'il y a une interaction entre ce ligand et ce récepteur. La lactoferrine est marquée par de la « Texas Red (TR) » ici en rouge et la nucléoline est marquée par de la « fluorescéine isothiocyanate (FITC) » ici en vert. Cette étude montre bien que la lactoferrine a bien une interaction avec la nucléoline.

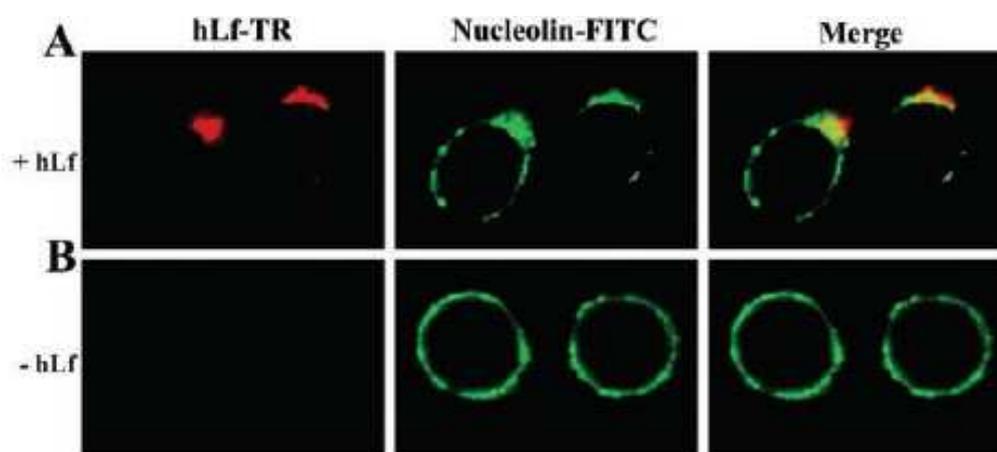


Figure 1. 9: Exemple d'utilisation de la microscopie confocale montrant la colocalisation de la lactoferrine avec la nucléoline [1. 5].

II.2. FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer)

Un autre moyen d'observation d'entités en biologie est le FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) qui est une technique plus récente. Le FRET est un processus par lequel un fluorophore excité, le donneur, peut transférer de manière radiative son énergie à un fluorophore voisin, l'accepteur. Ce phénomène induit une diminution de l'intensité de fluorescence du donneur et une augmentation de la fluorescence de l'accepteur. La probabilité qu'un tel événement ait lieu dépend de la distance entre le donneur et l'accepteur, de l'orientation relative entre les dipôles et du chevauchement du spectre d'émission du donneur

et du spectre d'excitation de l'accepteur. Ce phénomène qui nécessite la proximité du fluorochrome accepteur, est un moyen privilégié pour montrer l'interaction (<10nm) entre deux molécules au-deçà d'une simple colocalisation optique (>200nm). La distance à laquelle le transfert d'énergie est efficace à 50% est appelée distance de Forster R_0 et varie selon les agents fluorescents utilisés [1. 6].

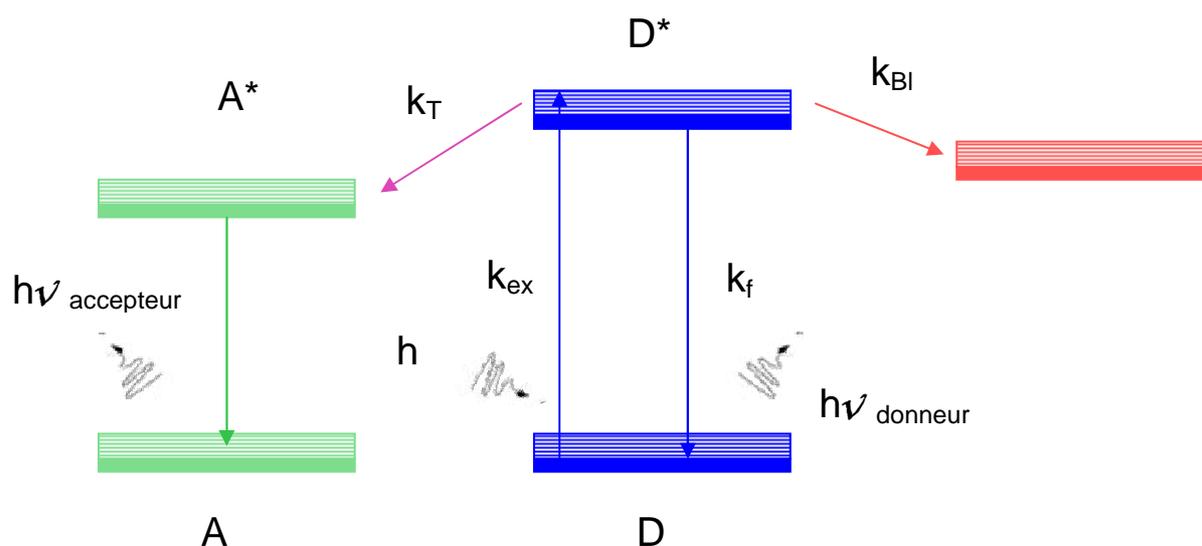


Figure 1. 10: Principe du FRET, illustrant les phénomènes mis en jeu pour l'émission de FRET [1. 6].

Le principe du transfert d'énergie est le suivant (Figure 1. 10): une lumière fluorescente d'intensité $h\nu$ excite le fluorophore donneur, celui-ci passe d'un niveau d'énergie stable D à un niveau excité D^* avec une différence de niveau d'énergie de K_{EX} et retrouve son état de repos D en perdant une énergie K_f par un processus radiatif ou non radiatif produisant ainsi une intensité lumineuse $h\nu_{donneur}$. Ce niveau d'énergie peut être absorbé, en présence d'un autre fluorophore. Le fluorophore donneur transmet donc une énergie K_t au fluorophore accepteur passant d'un état de repos A à un état excité A^* . Le fluorophore A émet donc une intensité lumineuse $h\nu_{accepteur}$ pour évacuer son énergie et revenir à son état de repos. Cependant un phénomène peut se produire, chaque molécule dans son état excité peut être détruite par photo-blanchiment (niveau K_{BI}) de ce fait la molécule ne peut plus contribuer à la fluorescence causant un affaiblissement de celle-ci. [1. 7]. Il est important de noter qu'une

variation de l'intensité du FRET n'est visible que dans la mesure où la distance r , séparant les fluorophores varie entre $0,5R_0$ et $1,5R_0$. En effet le FRET variant en fonction de $1/r^6$, les distances inférieures à $0,5R_0$ ou supérieures à $1,5R_0$ résulteront respectivement en une absence de FRET ou un transfert total. Notons que pour des R_0 supérieurs à $70-80\text{\AA}$, un signal de FRET entre des fluorophores situés de part et d'autre d'une membrane cellulaire est envisageable.

Les applications du FRET sont nombreuses aussi bien dans l'analyse des interactions entre les partenaires d'un complexe moléculaire que dans l'élaboration de tests biologiques permettant de mesurer des second messagers ou dans le criblage de molécules capables d'affecter l'activité d'une molécule donnée. Le FRET est couramment utilisé pour étudier les interactions protéine-protéine *in vivo* dans les cellules biologiques [1. 8] [1. 9]. Un exemple de la technique FRET pour la caractérisation d'interaction au sein d'une cellule vivante est son utilisation conjuguée avec un microscope à fluorescence. Cette technique permet de distinguer les donneurs et les accepteurs et de voir leur interaction. Les molécules les plus utilisées dans cette technique sont les GFP et les BFP [1. 10] [1. 11]. La GFP (Green Fluorescence Protein) est une protéine constituée d'une simple chaîne de 238 acides aminés. Elle possède un spectre d'excitation complexe avec un pic maximum d'absorption à 395nm et un pic minimum d'absorption à 475nm (Figure 1. 11). La GFP émet le maximum d'intensité en lumière verte à 508 nm (Figure 1. 11). Des mutations de cette protéine pour simplifier son spectre d'excitation à un simple pic situé entre 471 et 489nm en remplaçant la sérine, qui est un chromophore, par la cystéine, la leucine, l'alanine ou la thréonine. La BFP (Blue Fluorescence Protein) est obtenue en remplaçant le chromophore tyrosine par de l'histidine, de la phénylalanine ou du tryptophane. Ce changement permet une émission dans le spectre bleu lorsqu'elle est excitée par une lumière ultraviolette. Cette protéine a un pic d'excitation maximum à 382nm et un spectre d'émission à 447nm. Comme les pics d'émission de la BFP et de la GFP sont différents, les deux fluorophores peuvent rapidement être distingués au sein d'une cellule.

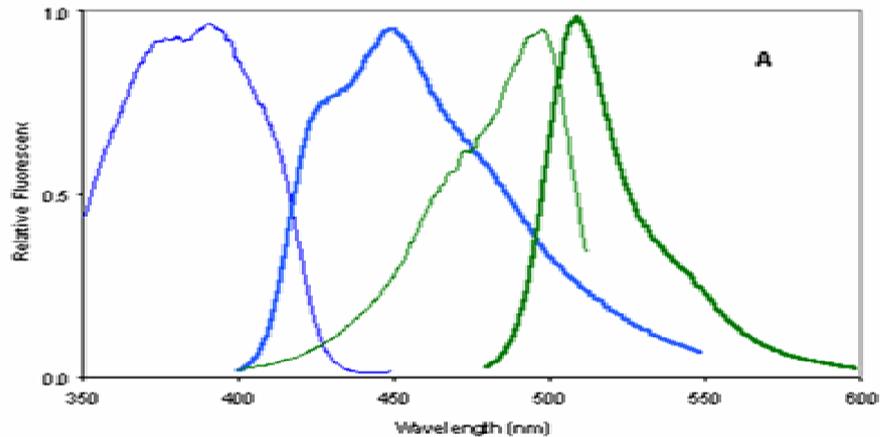


Figure 1. 11: Spectre d'émission et d'extinction de la GFP et de la BFP [1. 10]

Voyons par exemple l'étude de l'interaction protéine-protéine impliquant un facteur de transcription spécifique, la protéine Pit-1. Cette protéine est généralement en interaction avec l'ADN. Dans l'article du professeur Chang et al.

[1. 12], ils veulent étudier cette interaction entre cette molécule et l'ADN. Ils fabriquent de la GFP-Pit-1 et de la BFP-Pit-1 pour caractériser l'effet de cette protéine dans le noyau de la cellule.

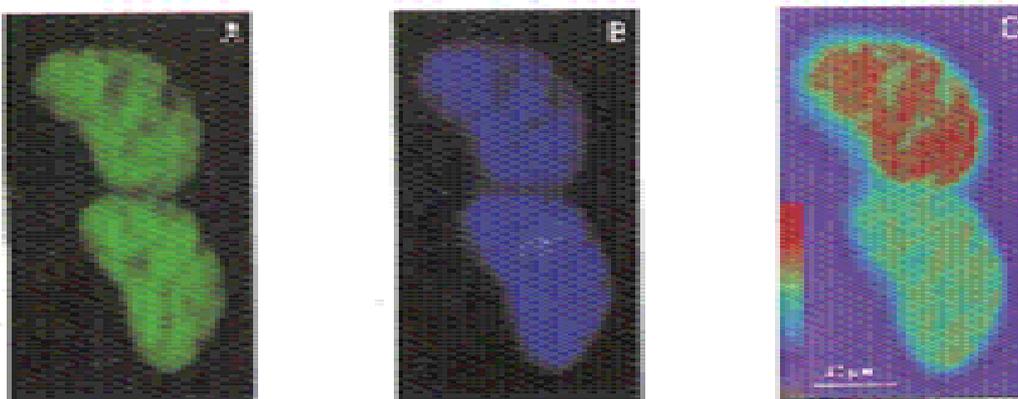


Figure 1. 12: Image FRET au sein d'une cellule, A: Accepteur, B: Donneur, C: Interaction donneur/accepteur montrant la localisation de l'ADN au sein du noyau [1.

12].

On peut voir sur la Figure 1. 12A, l'émission lumineuse d'intensité I_A de l'accepteur, ici le GFP et sur la Figure 1. 12B l'émission lumineuse d'intensité I_D du donneur, la BFP. Le rapport des intensités lumineuses du donneur et de l'accepteur I_A/I_D , donné sur la Figure 1. 12C, est utilisé pour générer le procédé d'image FRET. La couleur rouge est localisée dans le cytoplasme de la cellule indiquant un maximum d'intensité donc une augmentation du rapport I_A/I_D . Ce résultat est conforme avec le transfert d'énergie de résonance entre le donneur et l'accepteur impliquant une association (<100Å) entre la protéine Pit-1 et le noyau de la cellule.

A travers cet exemple, la polyvalence de la technique FRET apparaît adaptée à des mesures *in vivo* aussi bien que *in vitro*. Elle permet des interactions entre partenaires tant au niveau membranaire qu'au sein de la cellule. Elle permet par exemple de mesurer des activités enzymatiques.

II.3. SPR (Résonance à Plasmon de Surface)

En SPR, on travaille au-delà de l'angle limite, donc en réflexion totale. Lorsqu'un faisceau de lumière polarisée monochromatique illumine une interface entre deux milieux d'indice de réfraction différent, une partie de la lumière incidente est réfléchi sur l'interface et l'autre partie de la lumière est réfractée à travers la surface. Selon l'angle d'incidence du faisceau toute la lumière peut être réfléchi. Lorsqu'il n'y a pas de réfraction, une des composantes électromagnétiques de la lumière, l'onde évanescente, se propage perpendiculairement à l'interface sur une distance équivalente à sa longueur d'onde [1. 13]. Si une couche fine de métal, riche en électrons libres est déposée à l'interface, ceux-ci entrent en résonance avec les photons du faisceau incident, ce phénomène est appelé « résonance plasmonique de surface ». Cet angle d'intensité minimum est l'angle de résonance. Il varie en fonction de l'indice de réfraction du milieu présent dans le champ évanescent. Une conséquence énergétique de cette résonance est visible dans le faisceau réfléchi qui, analysé à l'aide d'une barrette de photo détecteurs présente une chute d'intensité et un angle défini. Le plasmon de surface est une

onde à décroissance exponentielle des deux côtés de l'interface séparant un métal (or, argent...) d'un milieu diélectrique (milieu biologique par exemple), parallèlement à laquelle elle se propage (Figure 1. 13).

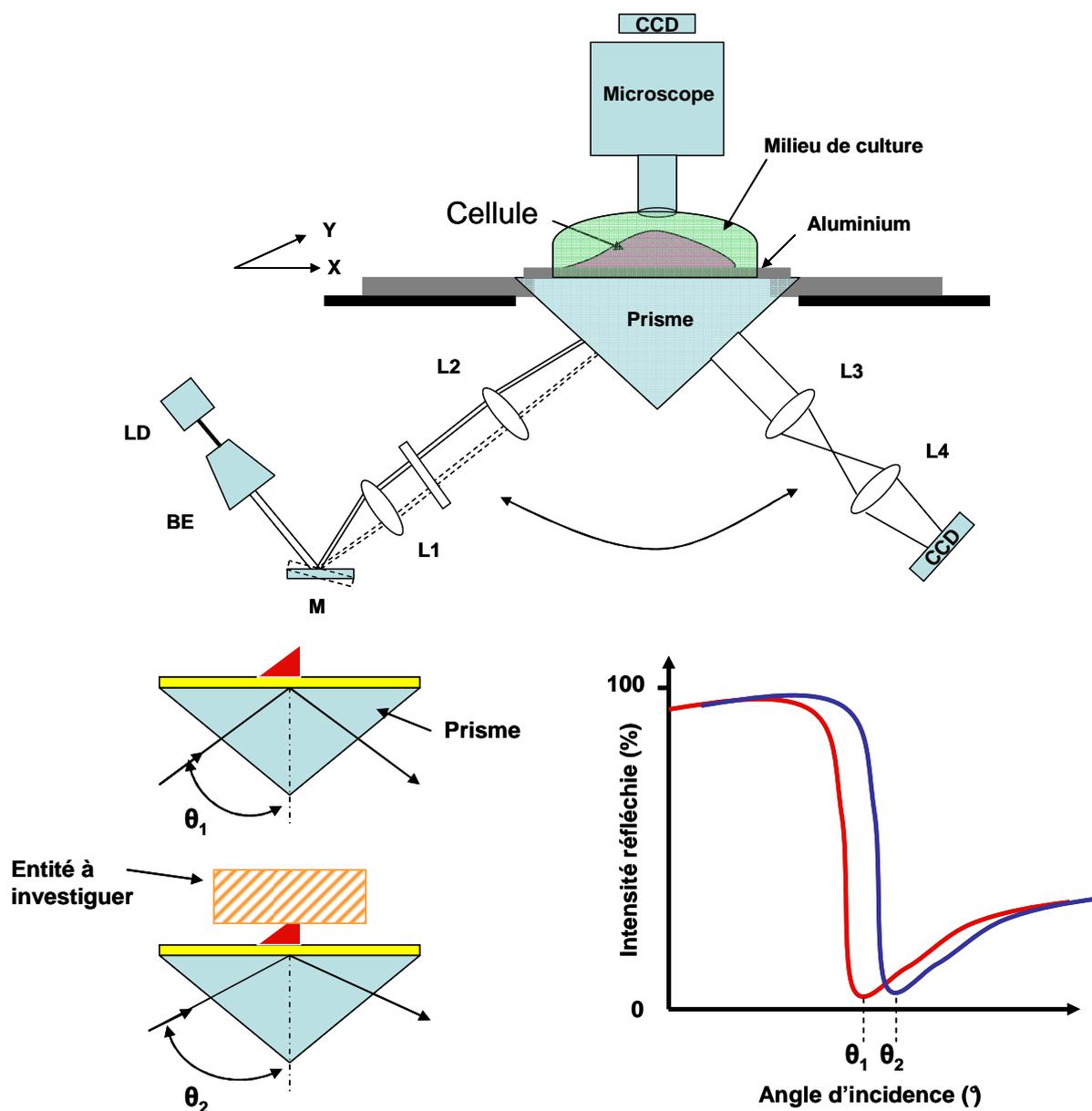


Figure 1. 13: Principe de la résonance à plasmon de surface [1. 13]

Le champ électromagnétique dans le milieu biologique présentant un caractère d'onde évanescente, c'est à dire l'amplitude décroissant exponentiellement avec la distance à

l'interface, la fixation de molécules sur l'interface va modifier l'information contenue dans l'onde tant au niveau de sa phase que de son amplitude. L'onde plasmon joue le rôle de sonde dans le milieu où se situe la réaction biomoléculaire. Généralement, l'onde incidente, polarisée TM, traverse d'abord un prisme de verre d'indice de réfraction élevé (mais on pourrait aussi utiliser un réseau de diffraction) et se réfléchit sur l'interface recouverte de métal sous un angle d'incidence supérieur à l'angle critique défini par rapport au milieu biologique. Ce prisme constitue le dispositif de couplage de l'onde incidente avec l'onde de surface. Le SPR est extrêmement sensible aux variations d'indice de réfraction d'un diélectrique à l'interface (Figure 1. 14). Un faible changement d'indice de réfraction est suffisant pour observer un décalage de résonance caractéristique [1. 13]. Le SPR peut être utilisé pour mesurer une concentration de particules spécifiques. Le film en métal est fonctionnalisé avec des antiparticules caractéristiques des particules à investiguer. Quant ce capteur est exposé au milieu contenant les entités à investiguer, celles-ci interagissent avec leurs antiparticules causant ainsi un changement d'indice à la surface du métal, donc un changement de fréquence de résonance de l'onde plasmon. Ce changement de fréquence est proportionnel au nombre de particules présentes dans l'échantillon.

Le SPR peut être utilisé pour mesurer une concentration de particules spécifiques. Le film en métal est fonctionnalisé avec des antiparticules caractéristiques des particules à investiguer. Quant ce capteur est exposé au milieu contenant les entités à doser, celles-ci interagissent avec leurs antiparticules en les immobilisant et causant ainsi un changement d'indice à la surface du métal, donc un changement de fréquence de résonance de l'onde plasmon. Ce changement de fréquence est proportionnel au nombre de particules présentes dans l'échantillon. Le SPR peut également être utilisé pour étudier la conformation d'une cellule biologique lorsque celle-ci est immobilisée en surface (Figure 1. 14), et ainsi réaliser de l'imagerie [1. 14]. On peut remarquer des changements d'angle d'incidence, donc de fréquence de résonance de l'onde plasmon, suivant que la cellule est adhérente ou non.

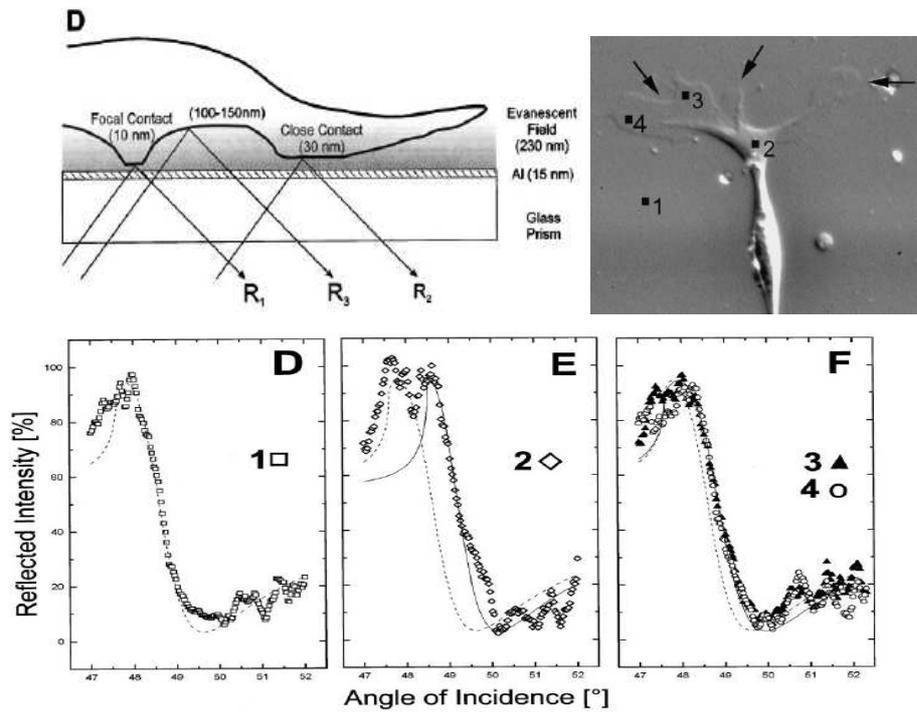


Figure 1. 14: SPR (surface plasmon résonance) pour l'étude d'accroche d'une cellule vivante sur une surface [1. 14]

III. Instruments microscopiques pour la microscopie

III.1. Généralités sur les MEMS

Les MEMS ont été développés au début des années 1970 en tant que dérivé de la micro-électronique et leur première commercialisation remonte aux années 1980 avec des capteurs de pression sur silicium qui remplacèrent rapidement les technologies plus anciennes et constituent encore une part importante du marché des MEMS. Un Microsystème électromécanique est un microsystème comprenant un ou plusieurs éléments mécaniques, utilisant l'électricité comme source d'énergie, en vue de réaliser une fonction de capteur et/ou d'actionneur avec au moins une structure présentant des dimensions micrométriques. On trouve aussi le terme de système micro électromécanique mais le terme le plus souvent employé est l'acronyme anglais MEMS (*Micro Electro Mechanical Systems*). Issus de la technologie de la micro-électronique, les MEMS font appel pour leur fabrication aux microtechnologies, qui permettent une production à grande échelle. C'est un domaine de recherche relativement récent qui combine l'utilisation des techniques électroniques, informatiques, chimiques, mécaniques, optiques et électromagnétiques. Un microsystème est un composant intégré, dont la taille varie de la centaine de nanomètres jusqu'à quelques millimètres. Leur technologie est issue de celle de la micro-électronique, et on peut dire qu'il s'agit d'une discipline dérivée. Là où la micro-électronique tend à réduire la taille de composants capables de traiter un signal électrique, l'enjeu des microsystèmes est de permettre, sur la même échelle, d'intégrer des fonctions de détection, de mesure, mais aussi d'action sur leur environnement.

Les MEMS sont le plus souvent à base de silicium, mais on utilise également d'autres matériaux suivant l'adéquation de leurs propriétés physiques à certaines applications. Il s'agit de métaux, de matériaux piézoélectriques, divers polymères, etc. La technologie silicium est parfaitement maîtrisée pour la réalisation des circuits microélectroniques. Le silicium possède de très bonnes propriétés mécaniques et possède également une facilité de structuration. Les

autres matériaux de plus en plus utilisés sont le verre et le quartz pour leur propriété de transparence, notamment dans la réalisation de structure nécessitant une observation optique au sein du système. Les étapes technologiques pour la réalisation de composants MEMS peuvent se résumer à des étapes de dépôts, de photolithographie et de gravure. De plus en plus dans les réalisations technologiques, on voit apparaître l'utilisation de polymères. Les polymères ont l'avantage de permettre le prototypage rapide de structure 3D et peuvent subir les mêmes étapes technologiques que le silicium ou le quartz. C'est pour cela que l'on voit émerger des technologies mixtes dans la littérature. Ils sont utilisés dans des domaines aussi variés que l'automobile, l'aéronautique, la médecine, la biologie et les télécommunications. Les applications usuelles telles que certains vidéo projecteurs, téléviseurs haute définition ou airbags automobiles utilisant ces composants. Les MEMS connaissent un important développement et sont en plein essor. Face au développement de ce domaine, on a vu apparaître des termes dérivés pour désigner des MEMS spécialisés. Par exemple, dans le domaine optique, on utilise le terme MOEMS (*Micro Opto Electro Mechanical Systems*) ou Optical MEMS, alors que dans le domaine biologique on utilise BioMEMS. L'application phare à avoir émergé dans le milieu industriel et dans la vie courante, le micro accéléromètre est capable de détecter les chocs et de déclencher les coussins gonflables de sécurité pour les automobiles. Son évolution l'amène maintenant à être utilisé comme instrument de navigation pour des applications militaires et bientôt pour les systèmes de navigation destinés au grand public.

Le deuxième domaine dans lequel les microsystèmes ont percé est l'optique. Une matrice de micro miroirs peut servir d'interrupteur pour éclairer ou non un écran. Ainsi, le Digital Light ProcessorTM de Texas Instrument équipe déjà des téléviseurs hauts de gamme et les vidéos projecteurs. Des routeurs optiques peuvent, en un volume restreint, proposer un système d'adressage de fibres optiques (la lumière arrivant dans les fibres optiques d'entrée peut être dirigée vers une des fibres optiques de sortie au choix de l'utilisateur et dynamiquement). Un autre débouché sur lequel l'industrie espère beaucoup des microsystèmes est le domaine des radiofréquences. Des interrupteurs micromécaniques et micros résonateurs pourront, à terme, éviter les coûteux composants électroniques non intégrables encore nécessaires aux

télécommunications. Les filtres microsystèmes pourraient bien devenir incontournables dans les téléphones portables comme sélecteurs de fréquences, ou dans les radars.

Pourtant, le plus vaste sujet d'exploration est encore à venir. De part leur taille, leur aptitude à mesurer et agir sur des objets microscopiques, les applications les plus prometteuses, sont dans le domaine de la biologie. La manipulation de brins d'A.D.N. nécessite des instruments d'une précision extrême, qui commence à devenir possible grâce à des actionneurs de taille microscopique. La biologie cellulaire est une science dans laquelle il reste encore beaucoup à faire pour comprendre les mécanismes internes d'une cellule, et probablement plus encore pour l'interaction entre cellules. Pour répondre à ce nouveau type d'applications, et permettre d'étendre encore les potentialités des microsystèmes à agir sur des objets microscopiques, des outils sont développés pour appréhender, trier, mesurer, voire modifier des micro objets –le plus souvent des cellules biologiques. Ces outils doivent fournir aux biologistes le moyen de récupérer des informations toujours plus précises, dans des conditions très variées, sur les constituants et les mécanismes de fonctionnement des cellules. De plus, une analyse de cellules nécessite beaucoup de mesures pour être pertinente d'un point de vue statistique. L'automatisation et la parallélisation d'un procédé de mesure sont essentielles, puisque aucun opérateur ne peut effectuer des milliers de fois la même expérience dans un délai raisonnable. Aussi, ce sont des paramètres très importants qui poussent la recherche dans le développement de ces microsystèmes [1. 15].

III.2. Des Biocapteurs aux BioMEMS

Le développement des biocapteurs a été engagé depuis plus de trente ans. Le thème « Biocapteur » s'appuie sur un ensemble de disciplines très large. Nous pouvons citer les mathématiques, le traitement du signal, l'informatique, la physique, la chimie et la biologie. Le facteur le plus marquant des biocapteurs est leur bonne spécificité permettant d'investiguer des milieux complexes. Ils permettent de détecter et de caractériser ces entités biologiques dans des domaines très variés comme ceux de la santé, de la biologie, de l'environnement ou de l'agroalimentaire. Mais leurs défauts majeurs sont leur faible sensibilité, un temps de mesure élevé et une faible durée de vie. Un biocapteur peut être décrit par trois niveaux

(Figure 1. 15) [1. 16]. Le premier niveau, appelé biorécepteur est généralement une membrane sur laquelle une sonde biologique comme un enzyme, un anticorps ou un microorganisme, est immobilisé. L'immobilisation du biorécepteur est un problème important dans le développement des biocapteurs. Cette opération est nécessaire pour pouvoir réutiliser le système et doit se faire au plus proche du transducteur afin d'obtenir un couplage maximum entre le biorécepteur et le transducteur. Un second niveau est dédié à la transduction du signal biologique en un signal électrique traduisant les caractéristiques de ce signal biologique [1. 16] [1. 17]. Les fonctions de transductions sont basées essentiellement sur des phénomènes électrochimiques (ampérométrie, potentiométrie, conductimétrie) [1. 18]. Mais d'autres alternatives de mesure sont possibles comme les méthodes optiques où la réaction biologique peut induire la génération de photons, la coloration du milieu réactionnel, l'accumulation ou l'activation de marqueurs fluorescents ou la modification des caractéristiques d'une interface optique comme son indice ou son absorption par exemple [1. 19]. On peut citer également les méthodes mécaniques où la réaction à l'interface d'un matériau perturbe son énergie de surface et entraîne, par exemple, la déflexion d'un micro levier. Mais la grande diversité des milieux à investiguer requiert de nouvelles méthodes d'investigation qui peut se décliner au niveau du biorécepteur ou au niveau du transducteur. De nombreuses méthodes de transduction sont décrites dans la littérature [1. 20].

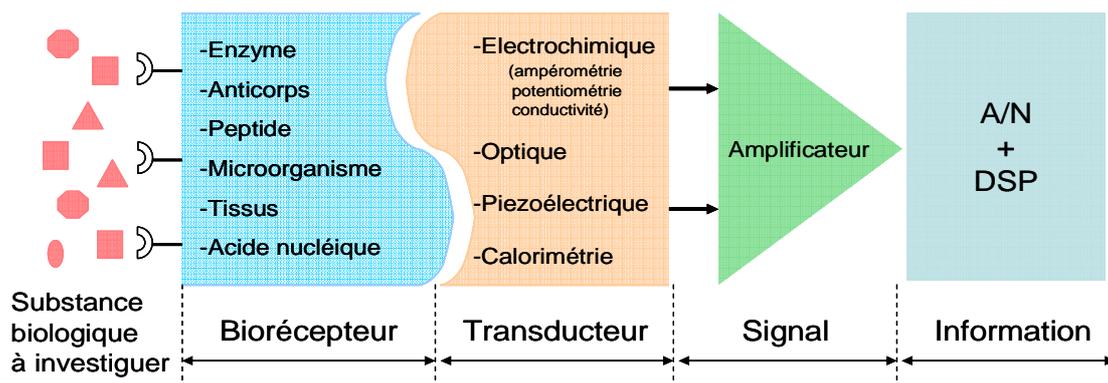


Figure 1. 15: Schéma de principe d'un BioMEMS [1. 16]

Les BioMEMS peuvent être une alternative intéressante pour éliminer les défauts principaux des biocapteurs. Ainsi, ils sont susceptibles d'intégrer de multiples fonctions de manipulation

biologique au sein d'un système miniature. Les méthodes utilisées jusqu'à présent en biologie moléculaire et cellulaire sont fastidieuses. Elles traitent un nombre limité d'échantillons en parallèle et nécessitent de nombreuses manipulations humaines. Les entreprises développant des BioMEMS se sont donc données pour objectif de développer des systèmes massivement parallèles et plus simples d'utilisation, c'est-à-dire intégrés et automatisés. Nous allons nous intéresser principalement à la conception et l'exploitation de BioMEMS cellulaire.

III.3. Les BioMEMS cellulaires

Il y a de nombreuses méthodes de détection employées dans les BioMEMS cellulaires : mécaniques, électriques ou optiques. Le développement des BioMEMS connaît un grand engouement pour la caractérisation de cellule unique. L'élaboration des BioMEMS nécessite des compétences en biotechnologie pour l'intégration de biomatériaux nécessaires à l'élaboration de biorécepteurs spécifiques pour la réalisation des sondes et des microréacteurs, mais aussi en microtechnologies pour la micro structuration de composants microfluidiques et de transducteurs. Les BioMEMS permettent la miniaturisation des éléments de caractérisation afin qu'ils soient de taille comparable aux entités biologiques à investiguer, donc de faciliter leur caractérisation et rendre possible la parallélisation des tâches pour certaines applications.

De nombreux développements ont été réalisés dans l'utilisation de la technologie MEMS dans le domaine des biocapteurs et leur adaptation dans le développement de sondes cellulaires pour un diagnostic *in vivo*. La caractérisation *in vivo* est un point critique dans la réalisation de systèmes fermés, comme le terme de biocompatibilité des matériaux utilisés. Le choix des matériaux et des procédés d'élaboration résultent de l'optimisation d'un critère prenant en compte les fonctions et les performances attendues du dispositif, et le volume de production. Les particularités considérées sont en particulier chimiques, thermiques, éventuellement optiques et électriques des matériaux et également les propriétés d'usinage, d'assemblage, de fonctionnalisation et de conditionnement. Un autre point important est également le coût des matériaux ainsi que leur procédé de fabrication [1. 21]. Le moyen de circulation des cellules vivantes au sein d'un BioMEMS sont généralement des microcanaux

de taille micrométrique. Dans ces conditions, les volumes mis en jeu sont de l'ordre de quelques nano litres. Les faibles volumes utilisés permettent d'augmenter la sensibilité du dispositif. Ces microcanaux peuvent être réalisés de différentes façons. Les matériaux les plus couramment utilisés sont les polymères, le verre et le silicium [1. 22]. La technologie silicium est bien maîtrisée pour la réalisation des circuits microélectronique [1. 23]. Le polymère et le verre ont pour avantage d'être faible coût et possèdent une facilité de mise en œuvre en particulier au niveau de leur mise en forme. Celle-ci peut se faire par emboutissage, par moulage ou par usinage direct, pour des dimensions caractéristiques qui peuvent aller du centimètre jusqu'au micromètre. Les polymères les plus utilisés est le PDMS (Polydimethylsiloxane), la SU8 mais aussi le BCB (benzocyclobuthène) [1. 24]. Quelques méthodes de réalisation de microcanaux en polymère sont reportées dans la Figure 1. 16.

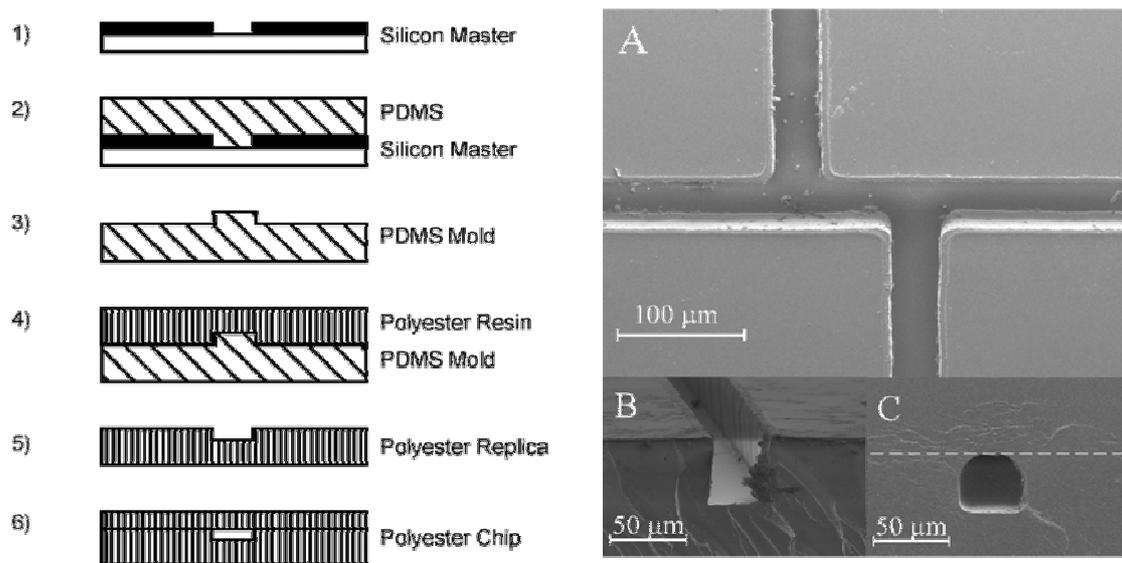


Figure 1. 16: Exemple d'un procédé de fabrication pour la réalisation de microcanaux en polyester [1. 26]

Le PDMS est un élastomère non photosensible. Sa mise en œuvre est généralement faite par moulage à l'aide d'un moule en silicium ce qui permet un prototypage rapide. Il permet d'obtenir de très grand rapport d'aspect. La résine SU8 est une résine époxy photosensible négative qui permet également d'obtenir des rapports d'aspect de l'ordre de 1/50 sur des

hauteurs de plusieurs centaines de micromètre en une seule couche. Le problème majeur de cette résine est qu'elle est très difficile à utiliser sur un substrat assez souple comme le silicium. Des contraintes mécaniques et thermiques assez importantes apparaissent lorsque l'on dépose la résine sur le wafer entier. Néanmoins des méthodes de structuration de la SU8 permettent de limiter ces contraintes au prix d'une complexification de la technologie. Par exemple, l'emploi de piliers permet de réduire fortement ces contraintes [1. 25].

L'une des particularités importantes des polymères est la possibilité de venir fonctionnaliser leur surface comme la possibilité de les rendre hydrophile ou hydrophobe [1. 26]. Le silicium présente plusieurs avantages, notamment la capacité que l'on a d'y implanter des fonctions électroniques (pour la détection), sa très bonne conduction thermique et la possibilité d'usiner des structures de taille de l'ordre du micron avec des procédés bien maîtrisés. Le silicium, tout comme le verre, peut se graver par voie humide ou sèche (plasma) [1. 27]. La gravure humide du silicium s'effectue avec du KOH (hydroxyde de potassium) ou du TMAH (Tetra Methyl Ammanium Hydroxide). Ces techniques permettent d'avoir des flancs de gravure trapézoïdaux ou rectangulaires suivant les plans cristallins du silicium. Ce type de gravure se fait de manière isotrope. La réalisation de gravures anisotropes passe par des méthodes de gravure plasma. La gravure sèche de type RIE (Reactive Ion Etching) est la plus utilisée pour la réalisation de microcanaux rectangulaires. Cette technique consiste à placer l'échantillon sous un plasma réactif obtenu à partir d'un gaz fluoré, cette technique permet d'insérer des cycles de passivation aux cours du process qui permet d'obtenir des canaux à fort rapport d'aspect avec des vitesses des gravures de l'ordre de 5 à 7 μm par minute [1. 28].

Au niveau des matériaux utilisés dans la fabrication des BioMEMS, la tendance qui semble se dégager est une combinaison mixte polymère/verre/silicium. L'intérêt majeur de l'association est de pouvoir intégrer la sonde de mesure et le circuit microfluidique près de l'électronique servant aux futurs traitements des signaux. Ceci permet d'améliorer nettement le rapport signal sur bruit. On voit également apparaître des laboratoires sur puce implantés directement sur des circuits CMOS pour pouvoir effectuer un traitement du signal issue de l'activité biologique directement sur le système.

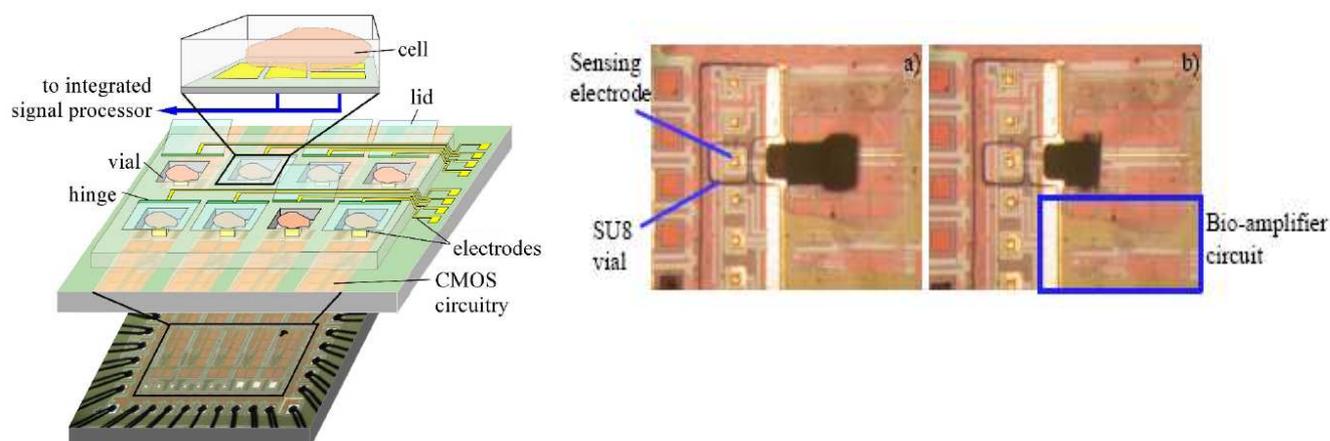


Figure 1. 17: Exemple d'un BioMEMS destiné à des mesures ampérométriques montrant l'intégration hétérogène électronique et MEMS [1. 29].

Le système présenté sur la Figure 1. 17 est constitué d'un système de culture cellulaire fermé à l'aide d'un capot actionné par un procédé MEMS [1. 29]. Le dispositif, effectue une mesure électrique qui est exploitée directement sur le boîtier CMOS par l'intermédiaire d'un circuit composé d'un amplificateur + filtre pour améliorer le rapport signal/bruit. Ce microsysteme montre bien l'intérêt d'allier la partie biologique avec la partie électronique pour la réalisation de laboratoires d'analyses cellulaires.

III.3.1. Transduction cellulaire

Face à la multitude des réactions cellulaires possibles, il existe différentes méthodes de transduction des signaux biologiques émis par les cellules vivantes. Nous pouvons citer dans un premier temps la méthode de transduction électrochimique. Elle est favorable à la portabilité et la miniaturisation du système comparé aux autres méthodes de transduction. Les biocapteurs électrochimiques incluent trois types de transduction de base qui sont : les biocapteurs ampérométriques qui impliquent un courant électrique associé à un déplacement d'électrons, les biocapteurs potentiométriques qui mesurent un changement de potentiel entre deux électrodes dues aux ions ou aux réactions chimiques sur une électrode (telle qu'un FET sensible aux ions), et les biocapteurs conductimétriques, qui mesurent des changements de conductivité liés aux changements du milieu ionique global entre les deux électrodes.

Beaucoup de moyens de transduction utilisent des méthodes de mesure d'impédance pour la montée en fréquence [1. 30]. Cette technique permet de caractériser des cellules vivantes du continu à quelques GHz. Le but est de faire circuler un courant alternatif entre deux électrodes généralement en or. Les cellules endothéliales sont placées entre les deux électrodes comme nous pouvons le voir sur la Figure 1. 18A.

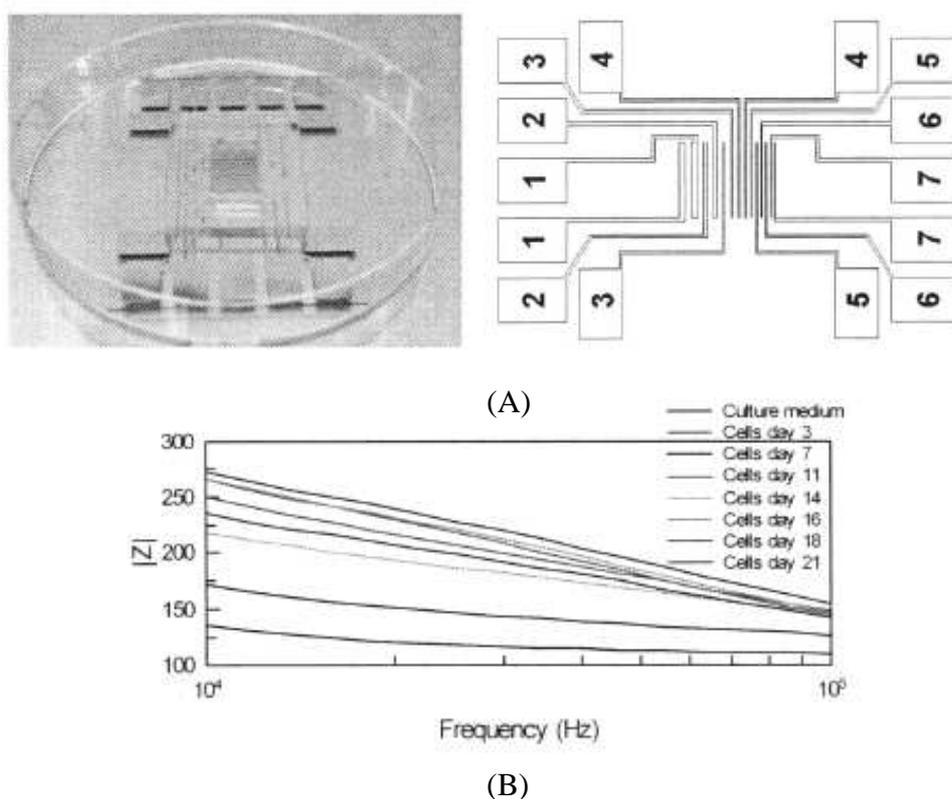


Figure 1. 18: Mesure ampérométrique sur cellules vivantes, A : illustration du dispositif, B : résultats de mesure obtenus sur une population de cellules [1. 30].

Les cellules sont mesurées à différents endroits du milieu de culture placé entre les deux électrodes avec un intervalle de temps allant de un à plusieurs jours. Au cours des jours, les cellules suivent leur cycle normal de transformation. Il y a donc prolifération des cellules entre les deux électrodes ce qui conduit à une augmentation de l'impédance électrique comme nous pouvons le voir sur la Figure 1. 18B. Comme la cellule est constituée principalement d'eau, la prolifération des cellules crée un milieu de moins en moins conducteur car la

membrane cellulaire à des caractéristiques isolantes aux fréquences investiguées. Le problème de cette méthode est qu'elle ne donne qu'une information électrique sur une population de cellule. Des recherches portent actuellement sur la possibilité de mesure sur cellule unique qui permettrait de mieux comprendre les mécanismes moléculaires impliquant des molécules de signalement intracellulaire [1. 31]. Nous pouvons voir sur la Figure 1. 19A l'exemple d'un microsysteme en PDMS constitué d'un microcanal servant à l'apport des cellules sur deux électrodes en silicium pour induire un courant au travers de la cellule. Nous pouvons voir sur la Figure 1. 19B, la réponse du système.

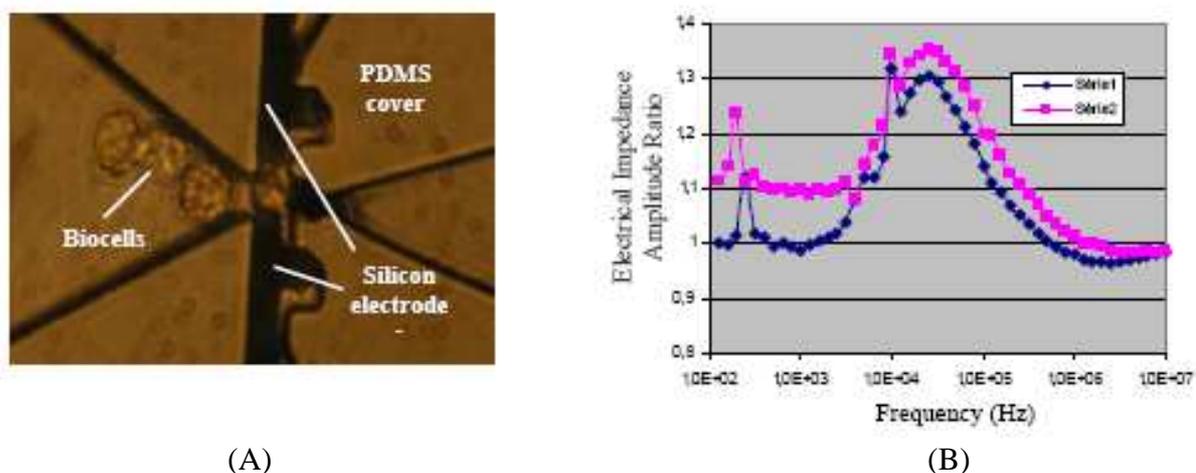
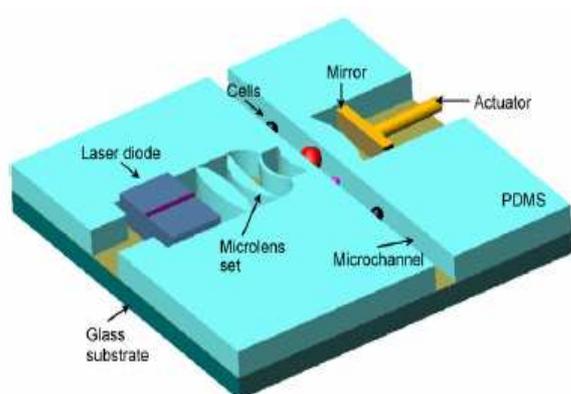


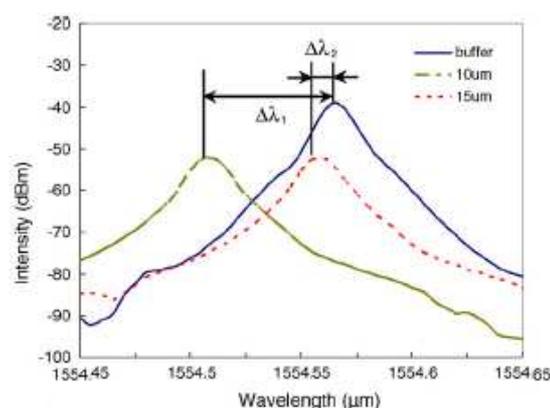
Figure 1. 19: Mesure en impédancemétrie sur cellule unique, A : Photographie des électrodes et des cellules immobilisées, B: Réponse du système [1. 31].

Le domaine optique a toujours été fortement impliqué dans l'analyse des processus biologiques. Les moyens d'intégration liés au développement des fibres optiques rendent ce domaine physique attrayant. Par exemple, il est possible de caractériser une cellule par son indice de réfraction optique [1. 32]. La cellule vivante est constituée de différents organites cellulaires d'indice de réfraction différent. L'indice de réfraction du cytoplasme est de l'ordre de 1,35-1,38 et l'indice du noyau de la cellule se situe autour de 1,39. Cependant, la concentration en protéines dans les composants des cellules détermine principalement l'indice de réfraction efficace des cellules en raison de leur grande quantité et de leur indice de réfraction élevé de l'ordre de 1,50-1,58. Comparées aux cellules normales, les cellules cancéreuses ont une concentration de protéines plus importante dans leur noyau afin de

s'adapter à une division cellulaire plus rapide. Elle signifie que les cellules cancéreuses ont un indice de réfraction relativement plus grand qu'une cellule normale. Par conséquent, quelques cancers peuvent être diagnostiqués grâce à l'indice de réfraction efficace de la cellule. Le système décrit sur la Figure 1. 20A est constitué d'une diode laser qui sert de source de lumière, d'un miroir recouvert d'or qui permet de délimiter une cavité optique est monté sur un actuateur [1. 33]. Un jeu de miroir permet d'améliorer la qualité du faisceau laser pour qu'il soit uniquement focalisé sur la cellule. La cellule est amenée au niveau de la zone de mesure à l'aide d'un canal microfluidique de 100 μm de largeur. Le déplacement de la cellule dans la zone sensible du dispositif va venir changer la longueur effective de la cavité, donc affecter l'émission caractéristique de la diode laser. Le spectre du signal en puissance est détecté et analysé par un spectrophotomètre.



(A)



(B)

Figure 1. 20: Caractérisation d'une cellule par la mesure de son indice de réfraction optique, A: Schéma du dispositif, B: Réponse du système [1. 33].

Le principe de mesure est le suivant, le dispositif mesure l'indice de réfraction d'une solution tampon (Buffer) prise comme référence. Ensuite la cellule est amenée, à l'aide de la circulation du fluide au sein du microcanal, devant le laser. En enregistrant les changements de longueur d'onde et de puissance en sortie de la cavité avec et sans cellule, il est possible de remonter à l'indice de réfraction de la cellule à investiguer comme montré sur la Figure 1. 20B. Les indices de réfraction des cellules cancéreuses sont de l'ordre de 1,40 pour une

cellule maligne du sein, ce qui est plus grand que 1,37, indice typique d'une cellule normale. Ce paramètre indique que le noyau des cellules cancéreuses est plus volumineux, car plus concentré en protéine, ce qui est un point caractéristique de ces cellules. Cette technique peut être intéressante pour le diagnostic préliminaire d'un état cancéreux.

Terminons cette partie sur les moyens de transduction de cellules vivantes par un exemple de transduction mécanique [1. 34]. Cette technique vise à mesurer les interactions mécaniques notamment les forces de traction d'une cellule sur un substrat microstructuré par des piliers en PDMS de taille comprise entre 2 et 10 μm et de diamètre compris entre 5 et 50 μm de hauteur (Figure 1. 21).

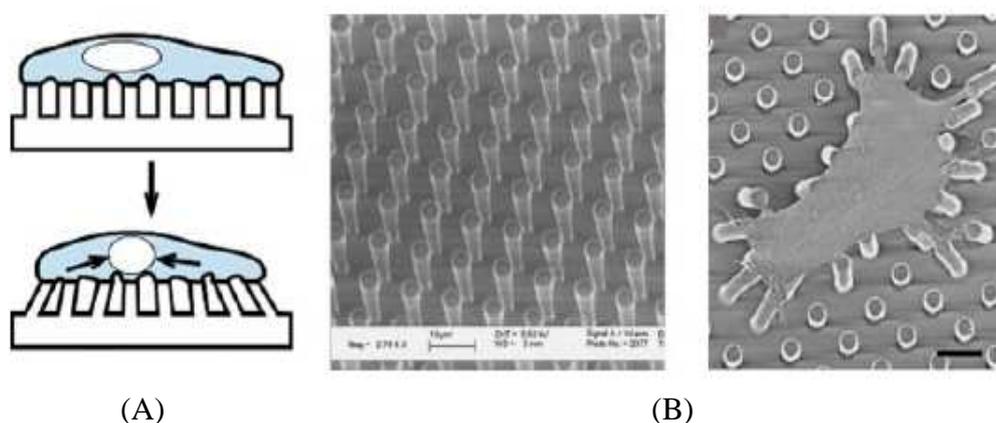


Figure 1. 21: Transduction mécanique d'une cellule pour étudier les forces mise en jeu lors de leur prolifération A : Schéma de principe, B : Micropiliers en PDMS [1. 34].

La force de traction est mesurée à l'aide de marqueur en fibronectine fluorescente positionné sur les piliers. En microscopie confocale, il est possible de visualiser une matrice de point correspondant aux extrémités des piliers. Le mouvement de ces points donne une information sur la traction induite par la cellule au cours de son développement.

III.3.2. Immobilisation cellulaire

L'une des difficultés en microsystème est de pouvoir positionner précisément les cellules biologiques sur les zones de mesures. Pour cela il existe plusieurs méthodes qui sont de type

biochimique ou mécanique. Les grandes familles de positionnement de cellules peuvent être électriques (diélectrophorèse), mécaniques (aspiration), chimiques (traitement de surface hydrophile ou hydrophobes), magnétiques ou optiques (pinces magnétiques ou optiques). Nous allons présenter quelque exemple de fixation cellulaire. La première méthode d'immobilisation est d'utiliser le principe d'attachement cellulaire sur des plots d'or fonctionnalisés [1. 35]. Ce principe est basé sur la notion de liaisons biochimiques entre la membrane cellulaire et des anticorps (Figure 1. 22).

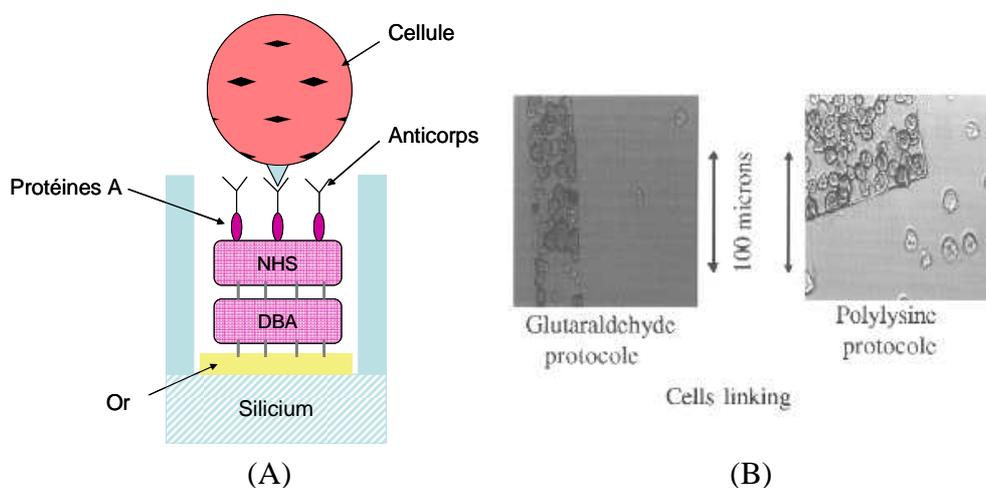


Figure 1. 22: Immobilisation de cellules au sein d'un microsysteme par voie chimique à l'aide d'un traitement de surface, A : Principe du traitement de surface, B : Cellules immobilisées sur la surface traitée [1. 35].

Les anticorps sont spécifiques aux antigènes présents sur la membrane de la cellule, et doivent être orientés dans la bonne direction. Pour cela, on vient traiter les secteurs actifs du microsysteme par une substance chimique : le DBA (Acide dithiodibutyrique) qui réalise une activation des zones d'or visées pour l'adhésion des cellules. On vient ensuite déposer un composé, le NHS (N-hydrosuccinimide) dont la particularité est de coller les protéines de type A. C'est elles qui immobilisent et orientent les anticorps dans la bonne direction.

Un autre moyen d'immobilisation cellulaire de plus en plus utilisé est une immobilisation mécanique. En effet, pour un dispositif disposant déjà de plusieurs électrodes de mesures, il semble difficile de rajouter un autre composant électrique. A la différence des pinces

magnétiques ou optiques qui nécessitent un appareillage extérieur, la technique d'aspiration est très attrayante par la simplicité de sa mise en œuvre. Nous présentons deux techniques d'aspiration utilisées dans un microsystème (Figure 1. 23). Il s'agit de percer un trou à l'endroit où nous souhaitons fixer la cellule, ensuite via une légère aspiration, la cellule est dirigée sur la trou puis maintenue le temps de son adhésion naturelle [1. 36].

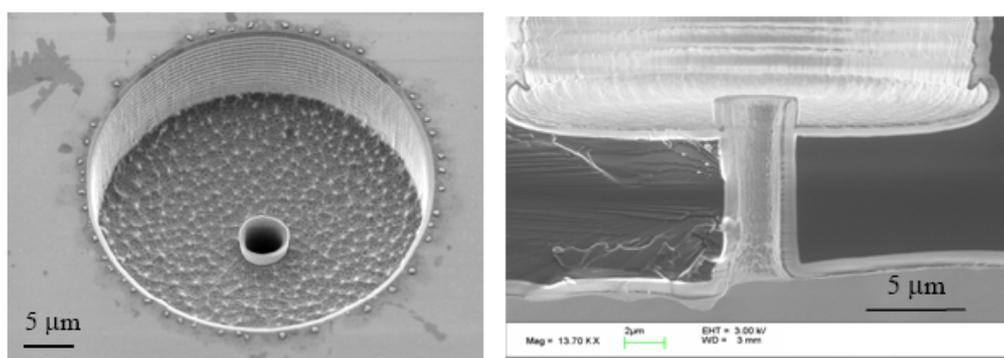


Figure 1. 23: Exemple de réalisation d'immobilisation cellulaire par voie mécanique en utilisant l'aspiration [1. 36].

Une autre technique s'appuie sur l'utilisation de la micro fabrication pour immobiliser les cellules vivantes au sein du dispositif décrit dans l'article de Philip J.Lee et al. [1. 37]. Ils utilisent un système de micro aspiration pour étudier la communication directe entre deux cellules voisines. Le dispositif utilisé est détaillé dans la Figure 1. 24A. Le système consiste en un microcanal dans lequel on peut distinguer deux parcours différents pour le déplacement des cellules. Le premier niveau est constitué par différents pièges et le second niveau permet la circulation des cellules qui n'ont pas été piégé. Les canaux sont moulés dans du PDMS, le canal principal fait une hauteur de 50µm pour une largeur de 20µm.

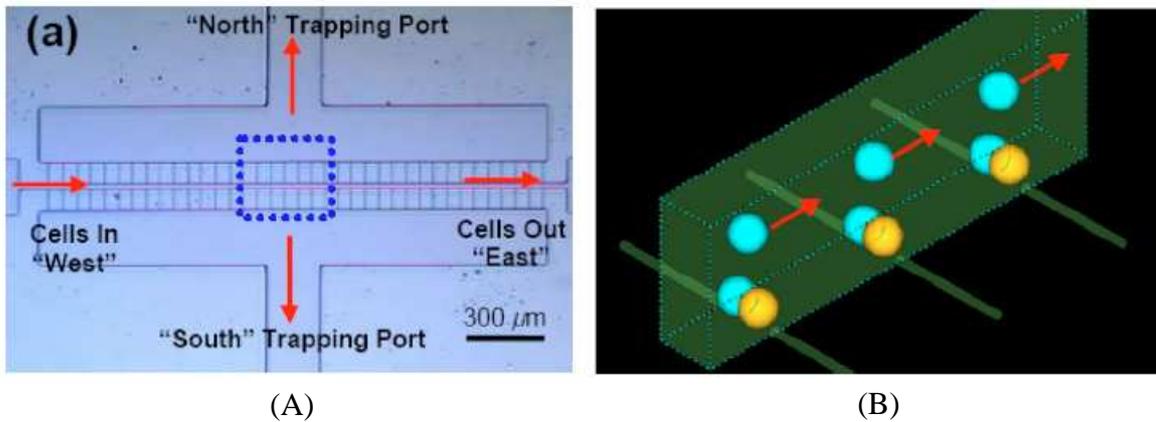


Figure 1. 24: Exemple de réalisation d'un BioMEMS pour étudier les échanges cellule-cellule en utilisant une immobilisation par aspiration. A : Dispositif utilisé, B : Principe de l'étude [1. 37]

Le premier niveau est constitué de 37 paires de pièges. Ces pièges font $2\mu\text{m}$ par $2\mu\text{m}$ et sont situés en bas du canal principal. L'ensemble des ports d'accès des pièges sont reliés à des valves contrôlées. Une fois qu'une cellule est piégée par un trou, elle le bouche et aucune autre cellule ne peut venir s'y placer. La première étape consiste à venir boucher tous les pièges « Nord » avec des cellules de type A (Figure 1. 24B). Ensuite l'injection des cellules de type B est effectuée lors de l'aspiration des pièges « Sud ». Une fois que les cellules de type A et B sont piégées, leur membrane respective sont en vis-à-vis. L'étude de la communication cellulaire entre ces deux cellules peut donc commencer en étudiant le transfert de molécules étiquetées par des marqueurs fluorescents.

IV. Conclusion

La plupart des méthodes actuelles d'investigation de la formation de complexes macromoléculaires membranaires et de leur trafic « in cellulo » sont invasives et/ou nécessitent des marqueurs exogènes (perméabilisation des cellules, utilisation de « tags », anticorps et autres...). Elles sont susceptibles de modifier la physiologie de la cellule et la nature des interactions moléculaires et ne rendent pas toujours compte des phénomènes dynamiques régissant les interactions et le trafic des molécules. Nous proposons de développer une mesure non-invasive à partir d'ondes électromagnétiques. Le spectre THz, dont la technologie est parfaitement accessible aujourd'hui, est un candidat intéressant par ses propriétés de caractérisation des interactions moléculaires de faible énergie. La nécessité d'assurer également une résolution spatiale satisfaisante, dans des ordres de grandeur microniques, nous ont poussé à nous intéresser aux BioMEMS. Il s'agit alors de sonder le nanoscopique avec des outils microscopiques. La fabrication de BioMEMS THz nécessite d'avoir une compatibilité entre la circulation microfluidique et la propagation des ondes THz. Elle ne peut être réalisée qu'au prix de technologies mixtes, déjà pratiquées pour la fabrication des BioMEMS. Le choix est donc d'utiliser une combinaison mixte polymère/verre/silicium. Notre but est de développer un microsystème permettant d'effectuer des mesures sur cellule unique.

V. Bibliographie

[1. 1] J.C Callen, R. Perasso, *Biologie Cellulaire : Des molécules aux organismes*, Edition Dunod, 7 Juillet 2005, 500 p.

[1. 2] Hélène Fournié. [référence du 12 Juillet 2007], <http://hfournie.free.fr>.

[1. 3] E.J. Hayduk, L.H. Choe, K.H.Lee, “A two-dimensional electrophoresis map of Chinese hamster ovary cell proteins based on fluorescence staining”, *Electrophoresis*, Vol.25, pp. 2545-2556, 2004.

[1. 4] S.N.Naryzhny, H.Lee, “Protein profiles of the Chinese Hamster Ovary cells in the resting and proliferation stages”, *Electrophoresis*, Vol.22, pp. 1764–1775, 2001.

[1. 5] D. Legrand, K. Vigié, E.A. Said, E. Ellass, M. Masson, M.C. Slomianny, M. Carpentier, J.P.Briand, J. Mazurier, A.G. Hovanesian, “Surface nucleolin participates in both the binding and endocytosis of lactoferrin in target cells”, *European Journal of Biochemistry*, 271, pp. 303–317, 2004.

[1. 6] J.R.Lakowicz, “Principles of fluorescence spectroscopy”, 2ème Edition. Science, 2006.

[1. 7] U. Kubitscheck, M. Kirchies, R. Schweitzer-Stenner, W. Dreybrodt, T.M. Jovin, I. Techt, “Fluorescence Resonance Energy Transfer on Living Cells : Application to binding of monovalent haptens to cell-bound immunoglobulin-E”, *Biophysical Journal*, Vol. 60, pp. 307-318, 1991.

[1. 8] H. Wallrabe, M. Elangovan, A. Burchard, A. Periasamy, M. Barroso, “Confocal FRET Microscopy to Measure Clustering of Ligand-Receptor Complexes in endocytic Membranes”, *Biophysical Journal*, Vol. 85, pp. 559-571, 2003.

- [1. 9] R.B. Sekar, A. Periasamy, "Fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy imaging of live cell protein localizations", *The Journal of Cell Biology*, Vol. 160, No 5, pp. 629-633, 2003.
- [1. 10] Y. Chen, J.D. Mills, "Protein Localization in Living Cells and Tissues using FRET and FLIM", *International Society of Differentiation*, Volume 71 Issue 9-10, pp. 528-541, 2003.
- [1. 11] A. Periasamy, R.N. Day, "Visualizing Protein Interactions in Living Cells Using Digitized GFP Imaging and FRET Microscopy", *Methods in cell Biology*, Vol. 58, pp. 293-314, 1999.
- [1. 12] W. Chang, W. Zhou, L.E. Thiell, J.D. Baxter, F. Schaufele, "An activation function in Pit1 required selectively for synergistic transcription". *Journal of Biological. Chemistry*, 271, pp. 17733-17738, 1996.
- [1. 13] H.P. Ho, W.W. Lam, S.Y. Wu, "Surface plasmon resonance sensor based on the measurement of differential phase" *Review of Scientific Instruments*, Vol. 73, No. 10, pp. 3534-3539, 2002.
- [1. 14] K.F. Giebel, C. Bechinger, S. Herminger, S. Herminghaus, M. Riedel, P. Leiderer, U. Weiland, M. Bastmeyer, "Imaging of Cell/Substrate Contact of Living Cells with Surface Plasmon Resonance Microscopy", *Biophysical Journal*, Vol.76, pp. 509-516, 1999.
- [1. 15] T.Owen, "Microfluidic based lab-on-chip", *LabPlus Internationnal*, pp. 12-14, 2002.
- [1. 16] T.M. Canh, "Les Biocapteurs", Edition Masson, Collection Mesure Physique, 1991.
- [1. 17] S.P. Mohanty, E. Kougianos, "Biosensors: A Tutorial review", *IEEE potentials*, 2006.
- [1. 18] O. H. Elibol, D. Morisette, D. Akin, J.P. Denton, R. Bashir, "Integrated nanoscale silicon sensors using top-down fabrication", *Applied Physics Letters*, Vol. 83, No. 22, pp. 4613-4615, 2003.

- [1. 19] B Sepulveda, J Sanchez del Rio, M. Moreno, F. J. Blanco, K. Mayora, C. Dominguez and L. M Lechuga, "Optical biosensor microsystems based on the integration of highly sensitive Mach-Zehnder interferometer devices", *Journal of Optics A: Pure and Applied Optics*, No. 8, pp. S561-S566, 2006.
- [1. 20] R.Bashir, "BioMEMS: State of the art in detection, opportunities and prospects", *Advanced Drug Delivery Reviews*, Vol. 56, No. 11, pp. 1565-1586, 2004.
- [1. 21] A.C.Richards Grayson, R.S. Shawgo, A.M. Jonhson, N.T. Flynn, Y. Li, J. Cima, R. Langer, "A BioMEMS Review: MEMS Technology for Physiologically Integrated Devices", Invited Paper, *Proceeding of the IEEE*, Vol.92, No 1, pp. 6-22, 2004.
- [1. 22] E.Verpoorte, N.F De Rooij, "Microfluidic Meets MEMS", Invited Paper, *Proceeding of the IEEE*, Vol.91, N°6, pp. 930-954, 2003.
- [1. 23] G.T.A Kovacs, N.I. Maluf, K.E. Petersen, "Bulk micromachining of silicon", Invited Paper, *Proceeding of the IEEE*, Vol.86, Issue 8, pp. 1536-1551, 1998.
- [1. 24] B.H. Jo & al, "Three Dimensional Micro channel fabrication in Polydimethylsiloxane (PDMS) elastomer", *Journal of Micro Electro Systems*, Vol.9, n°1, pp. 76-81, 2000.
- [1. 25] J. Carlier, *Développement technologique de composants microfluidiques intégrés à base de résine SU-8, Application à l'analyse de protéines par spectroscopie de masse*, Spécialité Instrumentation et Analyse Avancées, Université des Sciences et Technologies de Lille, Soutenue le 19 Novembre 2004, 192 p.
- [1. 26] H.Becker, C.Gärtner, "Polymer microfabrication methods for microfluidic analytical applications", *Electrophoresis*, Vol.21, pp. 12-26, 2000.
- [1. 27] T. Ichiki, T. Hara, T. Ujiie, Y. Horiike, K. Yasuda, "Development of Bio-MEMS Devices for single cell Expression Analysis", *Microprocesses and Nanotechnology Conference*, Shimane, Japan, pp. 190-191, 31 Octobre-2 Novembre 2001.

[1. 28] H.Jansen, M. De Boer, R. Legtenberg, M.Elwenspoek, "The black silicon method: a universal method for determining the parameter setting of a fluorine-based reactive ion etcher in deep silicon trench etching with profile control", *Journal of Micromechanics and Microengineering*, Vol. 5, pp. 115-120, 1995.

[1. 29] Y.Liu, E.Smela, N.M.Nelson, and P.Abshire, "Cell Lab on a chip: A CMOS based Microsystem for culturing and monitoring cells", *Proceedings of the 26th Annual International Conference of the IEEE EMBS, San Francisco, USA, September 1-5, 2004*.

[1. 30] A.K. Rissanen, S. Ostrovidov, E. Lennon, V. Senez, J.Kim, K. Sakai Furukawa, T. Ushida, Y. Sakai, T. Fujii, "Monitoring capillary endothelial cell culture and capillary formation in a microdevice by impedance spectroscopy measurements", *3rd Annual international IEEE EMBS special topic, Conference on microtechnologies in medicine and biology, Kahaku Oahu, Hawaii, pp. 201-204, 12-15 May 2005*.

[1. 31] V.Senez, T.Akalin, S.Arcott, N.E. Bourzgui, B.Bocquet, T.Fujii, E.Lennon, T.Yamamoto, "Top-Down Approches for the study of single-cell: Microengineering and electrical phenotype", *Advances in Science and Technology*, Vol. 53, pp. 97-106, 2006.

[1. 32] W.Z.Song, X.M. Zhang, A.Q. Liu, C.S. Lim, P.H. Yap, H.M.M. Hosseini, "Refractive index measurement of single cells using on-chip Fabry-Pérot cavity", *Applied Physics Letters*, Vol. 89, pp.203901, 2006.

[1. 33] X.J. Liang, A.Q. Liu, C.S. Lim, T.C. Ayi, P.H. Yap, "Determining refractive index of single living cell using an integrated microchip", *Sensors and Actuators*, vol. 133, n°2, pp. 349-354, 2006.

[1. 34] J.L. Tan, J. Tien, D.M. Pirone, D.S. Gray, K.Bhadriraju, C.S. Chen, "Cell Lying on a bed of microneedles: An approach to isolate mechanical force", *PNAS*, Vol.100, n° 4, pp. 1484-1489, 2003.

- [1. 35] B. Lepioufle, P. Surbled, H. Nagai, Y. Murakami, K.S. Chun, E. Tamiya, H. Fujita, "Living cells captured on a bio-microsystem devoted to DNA injection", *Materials Science and Engineering*, Vol.12, N°1, pp. 77-81, 2000.
- [1. 36] Lehnert T., Gijss M., Netzer R. and Bischoff U., "Realization of hollow SiO₂ micronozzles for electrical measurements on living cells", *Applied Physics Letters*, Vol. 81, pp. 5063-5065, 2002.
- [1. 37] P.J. Lee, P.J. Hung, R. Shaw, L. Jan, L.P. Lee, "Microfluidic application-specific integrated device for monitoring direct cell-cell communication via gap junctions between individual cell pairs", *Applied Physics Letters*, Letter 86, pp.223902, 2005.

Deuxième partie:
Ondes THz et caractérisation biologique

I. Généralités sur le spectre THz

I.1. THz « Gap »

Les ondes électromagnétiques térahertz se situent entre le domaine des micro-ondes et le domaine de l'optique (infrarouge lointain). La bande de fréquence communément admise s'étend de 100GHz à 10THz (Figure 2. 1). La partie térahertz du spectre électromagnétique est très peu exploitée dans le domaine de la transduction. C'est la raison pour laquelle cette bande est souvent appelée « Téraherz gap ».

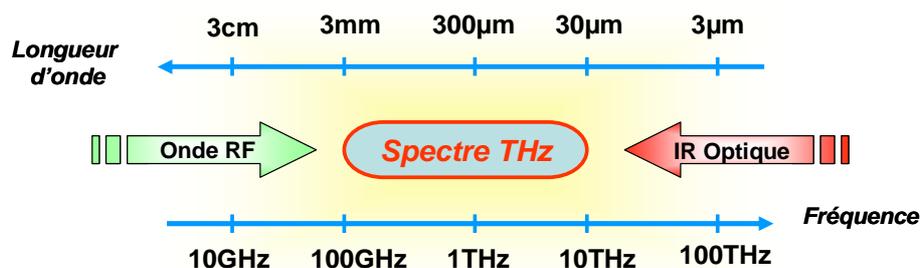


Figure 2. 1: Spectre électromagnétique

L'intérêt des ondes Téraherz dans le domaine de la biologie est très récent, datant d'une trentaine d'années [2. 1]. D'un point de vue micro-onde, les développements technologiques récents, essentiellement basés sur l'électronique et la microélectronique, sont portés par le secteur des télécommunications et les besoins en radar. Les fréquences de travail ne cessent de croître. Elles permettent aujourd'hui d'envisager des systèmes intégrés regroupant les fonctions de génération et de détection d'ondes millimétriques. Néanmoins, au-delà de plusieurs centaines de gigahertz, nous nous plaçons à des fréquences submillimétriques. Nous faisons alors face à des limites technologiques pour les sources et les détecteurs solides. D'un point de vue optique, c'est-à-dire en se plaçant plus haut dans le spectre électromagnétique, la majorité des sources et détecteurs optiques ne descendent que difficilement en dessous de

quelques térahertz. Les mesures sont surtout effectuées à l'aide d'instruments lourds et coûteux, difficile à mettre en œuvre et n'ont pas permis d'investigations larges sur la matière vivante, faute de moyens technologiques viables pour la génération et la détection de ces ondes. Mais ce sont les progrès considérables de l'optoélectronique qui ont permis l'investigation de la bande térahertz en permettant la création de sources et de détecteurs térahertz à partir de plusieurs étages composés de lasers et de conversions de fréquences non linéaires. Les sources térahertz font l'objet d'une importante recherche pour réduire leurs tailles et les rendre plus accessibles. Elles ont été un obstacle significatif au développement des applications. Néanmoins, et moyennant une bonne formation des utilisateurs aux techniques optiques en espace libre pour guider les impulsions THz, les mesures sur des échantillons de matériau sont aujourd'hui beaucoup plus accessibles.

La plupart des matériaux diélectriques sont transparents au rayonnement THz. La capacité à effectuer simultanément la formation d'images et la spectroscopie représente un grand intérêt pour beaucoup d'applications. Beaucoup de solides, liquides et gaz montrent des « empreintes digitales » spectroscopiques uniques aux fréquences THz. Le domaine temporel peut aussi apporter des informations sur l'indice de réfraction d'un matériau et sur son absorption. Ces caractéristiques donnent à la technologie THz un aspect attrayant pour des applications de sécurité et d'inspection de fabrication. Par exemple, la NASA utilise des images THz pour inspecter la croissance de la mousse pulvérisée sur le réservoir externe de leur navette spatiale [2. 2]. À la différence des technologies basées sur l'utilisation des rayons X, l'utilisation des THz est beaucoup plus sûre, compte tenu de sa nature non ionisante. Les THz peuvent être employés pour distinguer des tissus humains bénins et malins. Beaucoup d'explosifs et drogues illégales montrent également des spectres d'identification uniques aux fréquences THz.

La technologie des guides d'ondes aux fréquences THz est difficile. Elle a été un obstacle significatif au développement des applications basées sur les ondes THz. La plupart des systèmes THz sont grands et difficiles à employer parce qu'ils se fondent sur le système optique en espace libre pour guider et manœuvrer les impulsions THz. Ceci exige aux utilisateurs d'être bien formés avec les techniques optiques et de se mettre également en condition au niveau du secteur ou de l'échantillon d'intérêt.

I.2. Instrumentation THz

Aujourd'hui, la spectroscopie térahertz s'appuie principalement sur la génération d'impulsion ultra courte de quelques centaines de femtosecondes. Cette méthodologie de mesure dans le domaine temporel, a permis un plus grand nombre d'investigation de la matière malgré le faible rendement de ces sources. Elles permettent néanmoins de couvrir une bande spectrale de quelques térahertz. La mise en œuvre d'une détection cohérente permet d'obtenir les caractéristiques du matériau sondé en termes d'absorption et de dispersion de l'onde électromagnétique. Il y a un intérêt croissant dans l'utilisation de la spectroscopie térahertz dans le domaine temporel (THz-TDS) pour étudier des systèmes biomédicaux, en particulier dans l'analyse génétique et le diagnostic du cancer. Les applications d'imagerie térahertz dans le diagnostic du cancer basé sur l'utilisation de la spectroscopie dans le domaine temporel permettent de différencier des tissus sains ou malades en fonction de leur l'absorption. En effet, les tissus cancéreux ont une plus grande teneur en eau contribuant à l'augmentation de l'absorption dans la bande de fréquence THz

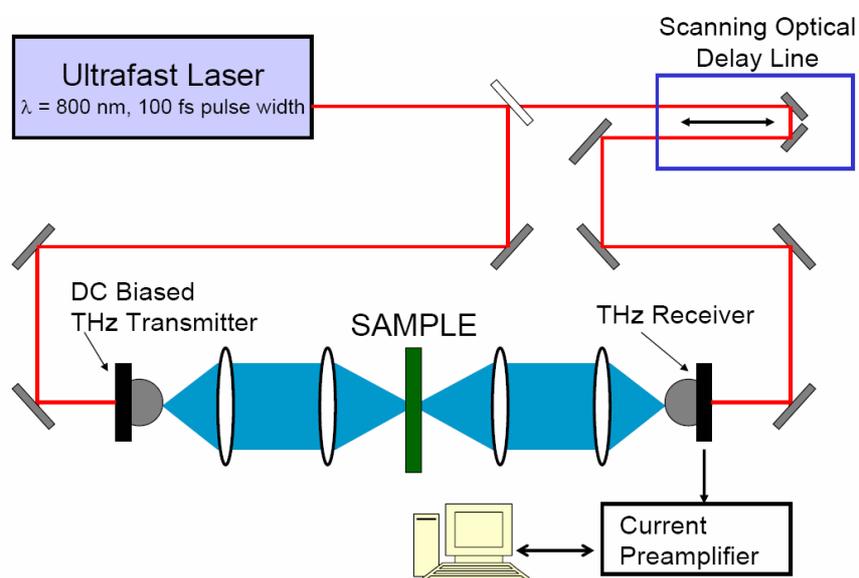


Figure 2. 2: Schéma de principe de la spectroscopie THz dans le domaine temporel (THz-TDS).

Un système standard d'acquisition de spectres THz dans le domaine temporel (THz-TDS) est établi autour d'un système laser ultrarapide et de deux antennes photoconductrices (Figure 2. 2). L'impulsion laser ultrarapide (< 100 fs) est dissociée en un faisceau de pompe et en un faisceau de sonde. L'antenne émettrice se compose d'un substrat de semi-conducteur photoconducteur placé entre les fentes d'une ligne CPS de $100\mu\text{m}$ de gap [2. 3].

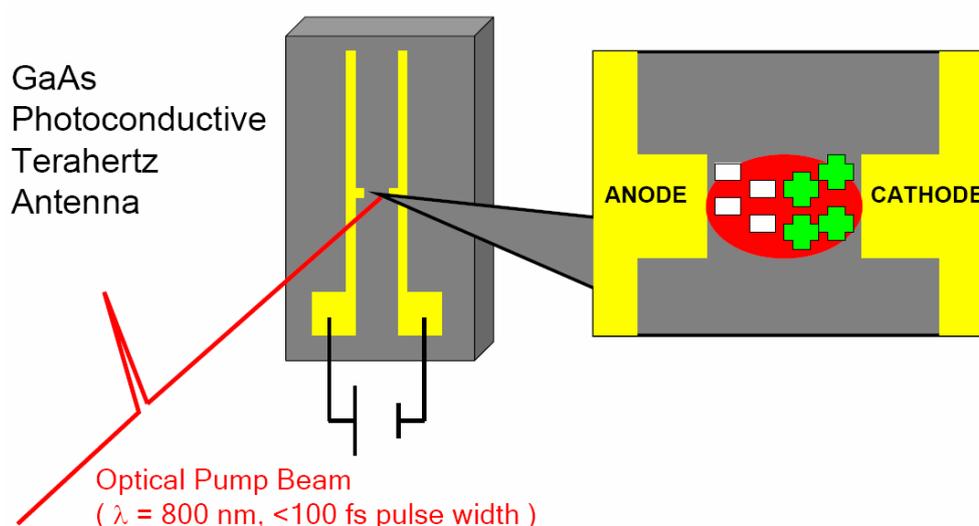


Figure 2. 3: Principe de production de porteurs de charges par illumination optique à l'aide d'un laser femtoseconde [2. 3].

Le rayon laser de pompe est focalisé sur cet espace. La longueur d'onde du laser est choisie par rapport aux gaps des bandes d'énergie du substrat photoconducteur. L'arséniure de gallium (GaAs) épitaxié à basse température (GaAs-BT) est un des matériaux le plus souvent utilisés parce que son band gap est bien adapté pour la lumière à 800 nanomètres produite par un laser Ti:Saphir. Des porteurs de charge (paires d'électron trou) sont créés quand la lumière est incidente sur le substrat de GaAs. Quand une polarisation continue est placée à travers des électrodes en métal, ces porteurs sont accélérés. Dans la configuration de la Figure 2. 3, le système est une antenne linéaire. L'impulsion THz polarisée linéairement est émise en espace libre. La Figure 2. 4 montre l'impulsion émise dans le domaine temporel et fréquentiel. Une lentille de silicium de haute résistivité est placée sur la surface opposée du substrat de GaAs afin de réduire au minimum les pertes de réflexion et focaliser l'impulsion THz (Figure 2. 2).

Le système optique conventionnel en espace libre est alors employé pour guider et manœuvrer le faisceau. Un échantillon peut être placé dans le faisceau THz pour effectuer une spectroscopie et/ou une formation d'image. La détection de l'impulsion de THz est réalisée à l'aide d'une antenne photoconductrice de réception semblable à l'antenne émettrice. Le substrat du récepteur est un matériau qui a un temps rapide de piégeage de porteur afin d'avoir une meilleure résolution temporelle. Le faisceau de sonde est focalisé sur l'espace de l'antenne réceptrice, de ce fait produisant des porteurs de charge (Figure 2. 3). Le champ électrique de l'impulsion THz polarise l'espace en accélérant les porteurs. Une mesure complète du domaine temporel est obtenue en changeant le temps d'arrivée de l'impulsion du faisceau de sonde issu de l'impulsion THz en changeant la longueur du chemin du faisceau de sonde à l'aide d'une ligne à retard, on prélève la valeur instantanée du signal toutes les périodes en incrémentant à chaque période du signal d'un pas temporel pour construire finalement le signal sur une période. Une fois le signal reconstitué dans le domaine temporel, il est possible de reconstituer le signal fréquentiel par une transformée de Fourier (Figure 2. 4). La difficulté associée à la plupart des systèmes THz les réserve aujourd'hui principalement aux laboratoires universitaires et de recherches. Cette difficulté s'amenuise par l'utilisation d'un système optique conventionnel pour la manipulation du rayon laser ultrarapide, mais reste présente parce qu'il n'y a aucune technologie optique équivalente pour les fréquences THz.

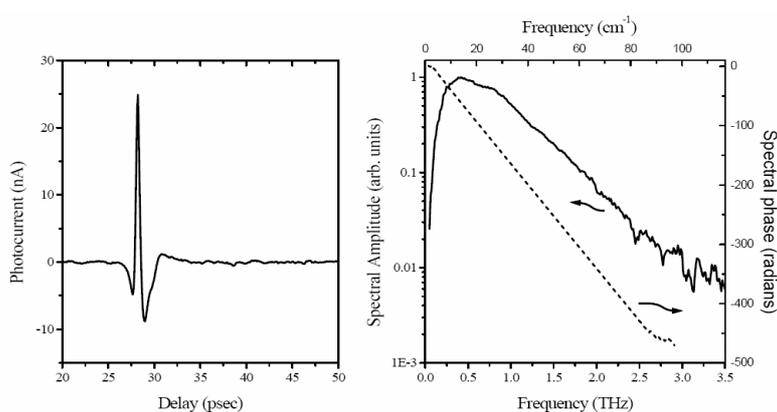


Figure 2. 4: Correspondance entre le domaine temporel d'une impulsion THz et le domaine fréquentiel à la suite d'une transformée de Fourier [2. 3].

matériau est alors compatible pour l'émission et pour la détection. La structure de propagation la mieux adaptée pour la caractérisation par cette méthode est la ligne CPS. Néanmoins elle peut s'adapter également aux lignes coplanaires. La ligne est caractérisée en transmission et en réflexion à l'aide du report de 3 patches, un pour la génération et deux autres pour la détection, comme le montre la Figure 2. 6. Les patches sont de dimensions $500 \times 500 \times 2 \mu\text{m}$.

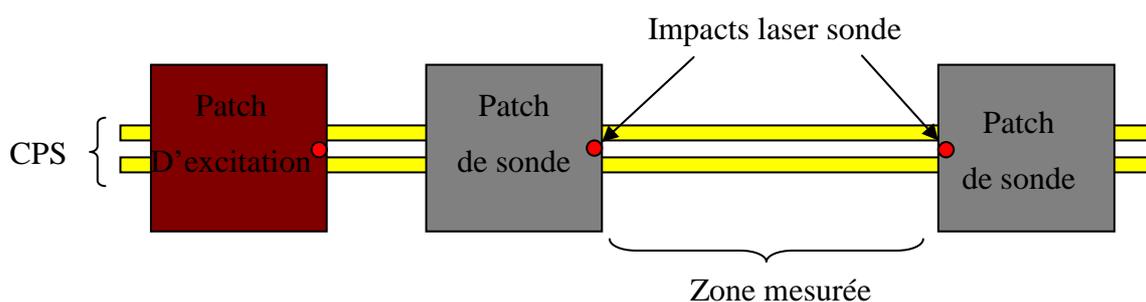


Figure 2. 6: Principe de la mesure par dépôt d'un patch d'excitation et de deux patches de sonde pour la caractérisation de la transmission et de la réflexion [2. 4].

Les lignes ont généralement des largeurs de ruban/fente/ruban respectivement de $10/10/10 \mu\text{m}$, avec une épaisseur de métallisation d'un micromètre. De plus, une disposition adaptée des patches permet d'éviter la présence d'échos dus aux discontinuités de la ligne (les deux extrémités) dans la zone temporelle de mesure. La longueur des lignes doit être assez longue, de l'ordre de plusieurs millimètres. Notons qu'une extrémité de la ligne est équipée de plots de $100 \mu\text{m}$ pour pouvoir y connecter une polarisation afin d'obtenir les effets électro-optiques.

I.3. Vers l'intégration

L'électronique micro-onde a finalement échoué pour des fréquences plus élevées en raison des limites fondamentales, comme la vitesse des électrons, faisant rapidement dégrader l'utilisation de transistors au-dessus de $0,1 \text{ THz}$. À l'inverse, le spectre photonique infrarouge ne peut pas descendre aux fréquences inférieures à 20 THz [2. 5]. L'atténuation atmosphérique du rayonnement THz est beaucoup plus forte que pour les micro-ondes ou

l'infrarouge, menant à des conditions expérimentales bien plus rigoureuses sur le rapport signal/bruit. Il n'existe pas encore de générateurs aux fréquences THz suffisamment compacts et puissants pour la portabilité d'applications comme l'imagerie ou la spectroscopie. Les sources THz relèvent de l'optique (émetteur de photons au delà de l'infrarouge) ou de l'électronique (circuits oscillants au delà des hyperfréquences). Une application générique des THz exige deux composants principaux : une source cohérente et un détecteur. Cette combinaison source/détecteur doit fournir des performances suffisantes en rapport signal/bruit et en vitesse pour détecter le signal « en temps réel ». En conséquence, d'importants travaux de recherche sur les semi-conducteurs visent à augmenter la puissance moyenne de la source et de réduire le bruit au niveau du détecteur. Une idée nouvelle de sources et de détecteurs de radiation THz, basée sur les oscillations de plasma bidimensionnel, a été proposée par M. Dyakonov et M. Shur en 1993 [2. 6]. Ils ont démontrés théoriquement que les électrons bidimensionnels dans les transistors à effet de champ peuvent avoir des modes d'oscillation plasma dans le domaine THz. Dans certaines conditions, les oscillations plasma dans un transistor FET peuvent être excitées par un courant direct, et les transistors peuvent travailler comme un oscillateur dans la gamme de fréquences THz. Un autre exemple de génération THz est l'utilisation de laser à cascade quantique (QCL) [2. 7]. Les lasers à cascade quantique sont des sources de rayonnement térahertz développés par différentes équipes depuis 2002. Le guide de ces lasers est généralement constitué par une structure active (en GaAs/AlGaAs) prise en « sandwich » entre deux plans métalliques conducteurs. Le nombre de couches peut atteindre plusieurs centaines pour augmenter le nombre de puits quantiques, mais ceci crée une difficulté technologique majeure. L'avantage de ce guide est que ses pertes sont relativement faibles et que le facteur de recouvrement avec la zone de gain est élevé. La cavité est réalisée en clivant le guide ou en le gravant. Deux problèmes apparaissent alors : le coefficient de réflexion de la facette clivée est très élevé (la puissance de sortie est donc faible), d'autre part le faisceau obtenu est très divergent (diffraction) ce qui pose des problèmes pour le collecter. A l'heure actuelle, les détecteurs et les émetteurs térahertz à cascade quantique sont très coûteux et ne peuvent fonctionner qu'à des températures basses, ils ne permettent de délivrer que de faible puissance (Figure 2. 7). Ces deux principes de génération THz peuvent être intégrables sur une puce comme un BioMEMS. En ce qui

concerne les détecteurs, on peut citer l'exemple des diodes Schottky. La technologie des diodes planaires a bien progressée ces dernières années en minimisant les éléments parasites extrinsèques (contribuant à limiter les performances des dispositifs) et limitant l'influence des supports (dispersion, pertes) par l'utilisation de circuits sur membranes minces. Ces technologies permettent la réalisation de récepteurs submillimétriques intégrés de type MMIC [2. 5]

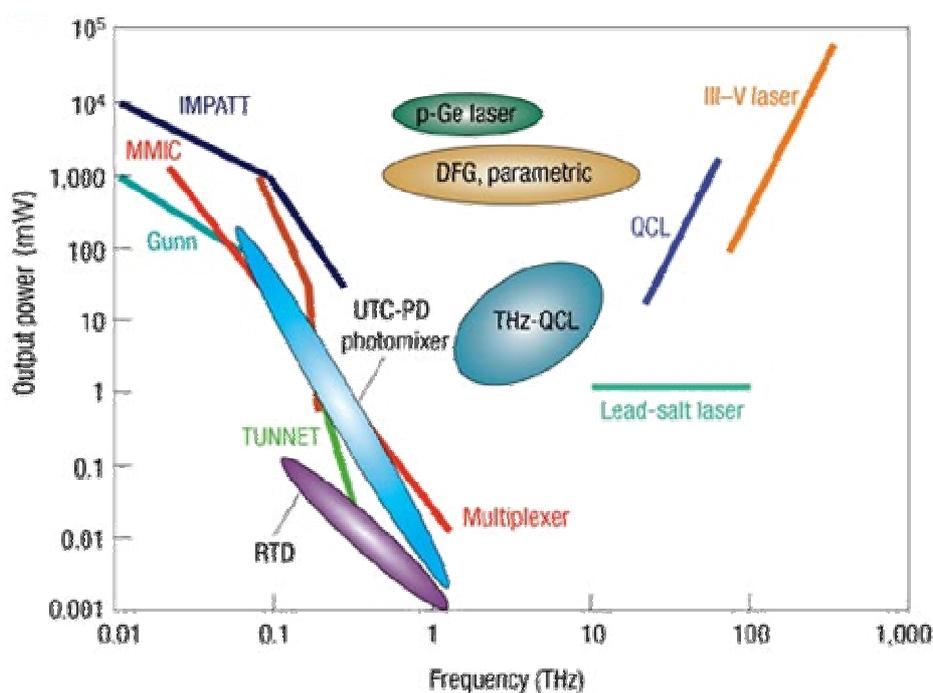


Figure 2. 7 : Puissance d'émission en fonction de la fréquence pour les différentes sources THz [2. 5]

II. Intérêt en biologie

Des analyses courantes sont faites par détection biochimique (ampérométrie) ou optique. Ces techniques présentent certains inconvénients dont le principal est probablement l'influence de la préparation de l'échantillon sur l'activité biologique. Il s'agit soit d'une réaction biochimique, soit d'une réaction avec des marqueurs fluorescents liés aux molécules [2. 8]. La spectroscopie THz peut apporter des solutions intéressantes dans ce domaine par son caractère non invasif. Les propriétés diélectriques des cellules biologiques sont très remarquables. Elles montrent typiquement des constantes diélectriques extrêmement élevés aux basses fréquences, qui décroissent lorsque la fréquence augmente. Leur dépendance à la fréquence permet l'identification et la recherche sur un certain nombre de mécanismes fondamentaux complètement différents, et par conséquent, les études diélectriques des matières biologiques ont été pendant longtemps utilisées en électrophysiologie et biophysique. Par exemple, Il est possible de déduire par des études diélectriques que les érythrocytes se composent d'enveloppes isolantes enfermant un électrolyte conducteur [2. 9]. Dans les années 1930, Fricke [2. 10], a étendu la base de la dispersion. Cole et Curtis ont prolongé le travail sur la bio impédance au niveau non linéaire [2. 11]. Ils ont observé que la conductibilité de la membrane de l'axone de calmar change fortement avec la fréquence d'excitation. Ceci a donné naissance à une nouvelle branche en biologie : la biophysique de la membrane cellulaire. Hodgkin et Huxley ont étudié plus en détail la réponse non linéaire. Ils ont établi l'existence des canaux ioniques Na et K. Leur circuit équivalent et leur système d'équations non linéaires sont devenus célèbres dans le monde entier. Schwann a découvert la dispersion α [2. 12]. Il était le premier à étendre les mesures à 1 GHz, montrant l'existence de la dispersion γ . Beaucoup de contributions additionnelles ont été également apportées [2. 13] [2. 14] [2. 15] [2. 16] [2. 17] [2. 18]. Ils ont étudié les effets et les applications dans les examens médicaux comme la polarisation d'électrode, la thérapie ultra haute fréquence, comptant et classant des populations de cellules, et surveillant des événements physiologiques dans le corps humain. La polarisation électrique peut être définie comme une perturbation induite au champ électrique de la distribution des charges dans une région. Cette polarisation ne se produit pas instantanément, et la constante de temps associée s'appelle le temps de

relaxation τ . Le moment de relaxation pour un système peut être mesuré en appliquant un signal créneau comme excitation et en surveillant le processus de relaxation vers un nouvel état d'équilibre dans le domaine temporel. La relaxation des électrons et des petites molécules dipolaires est un processus relativement rapide, avec des temps de relaxation dans la gamme des pico- et nanosecondes. La dispersion diélectrique est la dépendance correspondante à la fréquence de la constante diélectrique. À première vue, les propriétés électriques des tissus et des suspensions de cellules ont pu être exprimées par la dépendance logarithmique de la fréquence sur une large bande de fréquence de quelque Hertz à plusieurs gigahertz. Ces propriétés sont caractérisées par trois dispersions principales, qui se nomment α - β - γ et les différents mécanismes sont issus des basses fréquences (α), des radiofréquences (β), et des données des fréquences micro-ondes (γ).

II.1. Niveau d'énergie et interaction

D'un point de vue théorique, le spectre TéraHertz occupe une position intermédiaire entre les disciplines de l'électronique hyperfréquence et de l'optique. En conséquence, les interactions de ces ondes avec la matière sont frontières à des phénomènes de relaxation moléculaire (notion de permittivité diélectrique) et des phénomènes d'absorption d'énergie de rotation ou de vibration (niveau d'énergie moléculaire). L'originalité de ce spectre électromagnétique réside dans les énergies des photons de 10^{-20} à 10^{-22} J (0.4 à 40meV, longueur d'onde $30\mu\text{m}$ à 3mm) qui correspondent à des niveaux d'énergie de liaison intramoléculaire. Ces spectres peuvent apporter des informations sur la conformation de biomolécules (Figure 2. 8). Comme ces énergies sont très basses, les dommages sur les cellules ou les tissus devraient être limités.

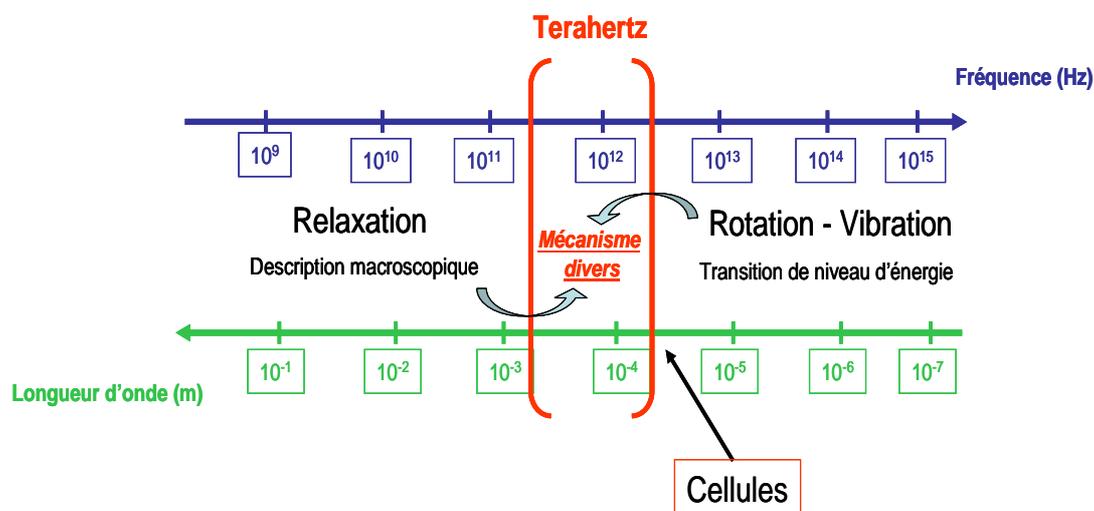


Figure 2. 8: Interactions onde-matière, présentant les mécanismes mis en jeu en fonction de la fréquence.

La spectroscopie de vibration dans l'infrarouge est très utilisée pour étudier les mouvements individuels d'atomes ou de petites molécules de quelques atomes. Les biomolécules qui sont de tailles beaucoup plus importantes sont susceptibles de comporter dans leurs spectres, des modes de résonances intramoléculaires (structure et conformation) ou intermoléculaires (vibrations et torsions autour des liaisons hydrogènes) collectives. Plus les forces mises en jeu sont faibles et plus les masses sont importantes, plus les fréquences de résonance sont faibles, ce qui amène les phénomènes dans l'infrarouge lointain. La nature collective des modes observés dans la bande térahertz est sensible à la structure, à la conformation des biomolécules ainsi qu'à leur environnement. Bien que les demandes en spectroscopie térahertz semblent tenir la plupart des promesses dans le secteur du biomédical, le principal intérêt est de permettre l'investigation des tissus ou cellules pour l'identification in vivo et in vitro des anomalies ou de l'hydratation. Il n'existe à ce jour, qu'un nombre restreint de mesures. Un gros travail d'investigations systématiques pour cataloguer le coefficient d'absorption, les différents mécanismes, et l'indice de réfraction sont à fournir. Les premières mesures sur l'absorption et l'index de réfraction sur matériaux biologiques dans la région des térahertz datent de 1976 [2. 19]. Plusieurs groupes de recherche ont étudiés des échantillons

biologiques en suspension ou fixés [2. 20], [2. 21], [2. 22], [2. 23] [2. 24] recherchant le contraste inhérent pour définir un comportement unique. Une des premières applications in vitro sur les tissus humains en milieu humide a été la formation d'images de cellules basales de carcinome [2. 25], [2. 26]. Le travail in vivo s'est concentré sur la peau et sur les surfaces externes accessibles du corps pour des mesures d'hydratation [2. 27] et d'infiltration de tumeur [2. 28]. Un catalogue des propriétés des tissus a été compilé par des groupes de l'Université de Leeds au Royaume-Uni pour des fréquences entre 0,5 et 1,5THz en utilisant un système pulsé dans le domaine temporel. Cependant les difficultés d'extrapolation des mesures sur les tissus extraits ou in vivo sont nombreuses. Ils incluent la prise de solution saline (ou autre milieu) de l'environnement de stockage de l'échantillon, des changements dans le niveau d'hydratation pendant la mesure, des changements de températures, des interactions avec la chambre de mesure, et des effets de dispersion. De nombreux groupes de recherche ont étudiés la formation d'images en réflexion ou en transmission sur différents types de tissu [2. 22], [2. 24], [2. 29], pour identifier des maladies ou des tumeurs [2. 23], [2. 28]. La pénétration sous la peau ou dans des organes a aussi été menée [2. 27], [2. 30], mais beaucoup de recherches doivent encore être faites.

A cause de la résolution des térahertz, les images sont généralement de qualités médiocres comparées à l'infra rouge (IR), ou l'optique visible, ainsi que la formation image par résonance magnétique nucléaire (IRM). Les facteurs permettant de rendre les images directes térahertz valables sont d'augmenter spécifiquement les contrastes comme dans la distinction de la teneur en eau. Bien qu'elle n'ait pas été montrée jusqu'ici, la sensibilité élevée à la composition liquide et à la conductivité variable dans les tissus [2. 28] [2. 31] sont susceptibles de conduire à des différences statistiquement significatives entre des échantillons identiques prélevés à différents endroits du corps et à différentes périodes ou sur différents sujets.

II.2. Investigation en biologie moléculaire

L'identification rapide des ordres génétiques représente un enjeu considérable en terme médical et économique. La plupart des techniques courantes sont basées sur l'utilisation et le

suivi de marqueurs fluorescents de molécules. Le marquage présente une étape additionnelle de préparation. Il limite non seulement la vitesse de traitement de l'échantillon mais pourrait également affecter la conformation des biomolécules abaissant le rendement et la fiabilité de la méthode. Par conséquent, une détection directe est fortement souhaitée par les biologistes. Récemment Brucherseifer et coll. ont démontré une approche en utilisant les impulsions électromagnétiques THz se propageant le long de lignes de propagation microruban [2. 32]. Ces structures incorporent une structure résonnante dont les caractéristiques varient, lorsqu'elle est chargée avec le matériel génétique. L'ADN est déposé simplement en plaçant une goutte de soluté à la pipette sur la structure résonnante. Après évaporation de l'eau, l'ADN forme une couche mince avec une épaisseur de seulement quelques dizaines de nanomètres. Nagel et coll. ont démontré qu'ils peuvent déterminer l'état d'hybridation de petits échantillons d'acides nucléiques avec des volumes de l'ordre du femtomol [2. 33]. La structure est décrite sur la Figure 2. 9.

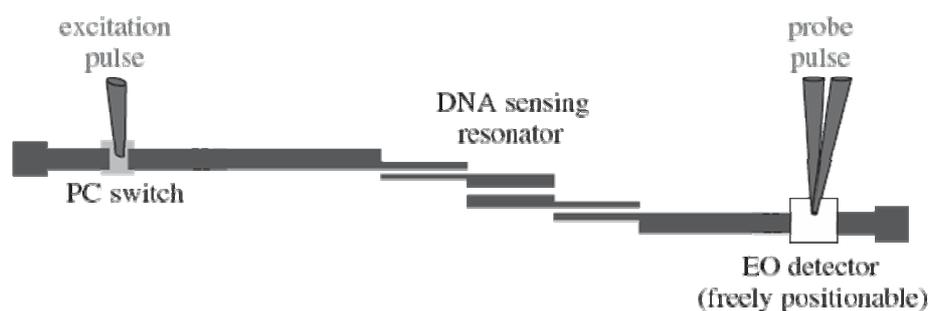


Figure 2. 9 : Schéma de principe du circuit résonateur pour l'étude de l'ADN par spectroscopie THz [2. 32].

En effet, il a été montré que le seuil de sensibilité d'une mesure d'ADN lyophilisé à partir d'une mesure à l'aide d'un résonateur est mille fois plus sensible qu'une mesure en espace libre. Le seuil de sensibilité est de l'ordre de 1,1 femtomol d'ADN pour un film de $265 \times 50 \mu\text{m}^2$. Le résultat obtenu est du même ordre de grandeur que les systèmes d'investigation présent sur le marché utilisant des techniques de fluorescence. Ce système possède un potentiel élevé de développement pour des instruments diagnostiques génétiques directs. Nous présentons, en Figure 2. 10, les résultats obtenus pour différents états d'ADN. Les courbes représentent le coefficient de transmission de la cellule de mesure chargée par de

l'ADN dénaturé (DDNA) et hybridé (HDNA). Nous constatons un décalage non négligeable de la fréquence de résonance, ainsi qu'un pic de résonance plus élevé pour HDNA que pour DDNA. Dans les deux cas, le décalage de fréquence sature au-dessus d'une épaisseur de couche d'ADN de 20 à 25 μm .

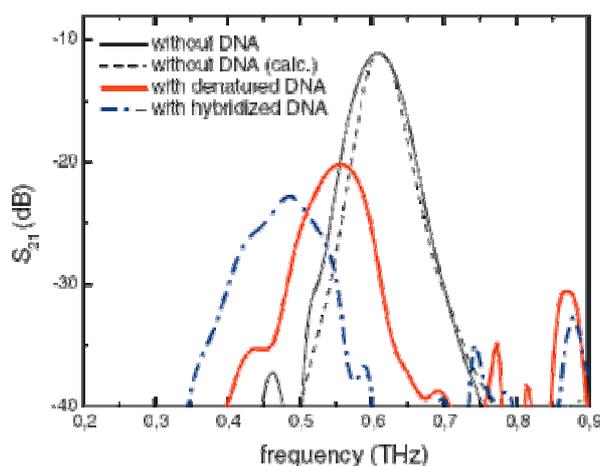


Figure 2. 10 : Paramètre de transmission du résonateur chargé par l'ADN. Le décalage en fréquence du pic de résonance est une fonction de l'état de la molécule d'ADN [2. 32].

L'auteur a également effectué des mesures sur des mutations possibles de l'ADN au cours de maladies génétiques. Les échantillons consistent en une réhydratation de l'ADN après dénaturation (oligo_wt) et des fragments d'ADN dont l'une des bases a été modifiée (oligo_mut) [2. 33].

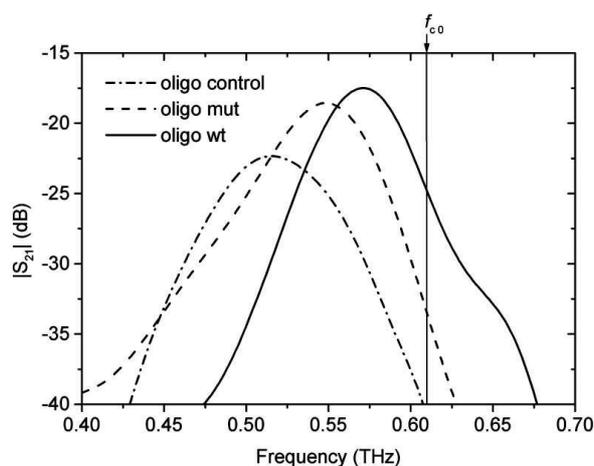


Figure 2. 11 : Décalage en fréquence relatif à un brin d'ADN muté et non-muté [2. 33].

La réponse du système montre que la lecture du décalage de la fréquence est susceptible de transcrire différents états d'ADN, mais également de détecter des défauts dans son organisation (Figure 2. 11).

II.3. Investigation en phase liquide et limitation

La plupart des mesures effectuées dans le domaine THz concernent des phases solides ou gazeuses. La raison principale est le manque de sensibilité d'une mesure en espace libre nécessitant des qualités d'échantillons en plus grands nombres. L'eau montre une absorption forte aux fréquences THz ($\alpha = 200 \text{ cm}^{-1}$ à 1.0 THz) (Figure 2. 12). Il a été démontré que la réponse de l'eau aux fréquences TéraHertz allant de 0,2 à 2THz peut être modélisée par un modèle de Debye du second ordre [2. 34] de la constante diélectrique complexe. La constante de temps du premier ordre résulte de la réorientation collective de la structure tétraédrique de l'eau, tandis que celle du second ordre est attribuée à l'arrangement de la molécule elle-même [2. 35]. Pickwell a démontré que la réponse térahertz de la peau humaine saine peut être modélisée dans beaucoup de cas de la même manière que l'eau en utilisant un modèle de Debye du second ordre [2. 36] [2. 37].

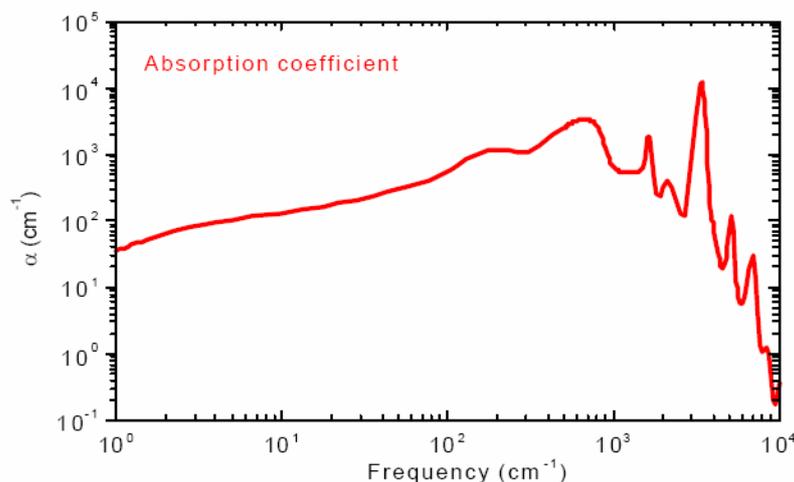


Figure 2. 12: Spectre d'absorption de l'eau [2. 34]

Quelques mesures ont été effectuées montrant des résultats intéressants sur des milieux liquides. Il a été mis en évidence des signatures particulières selon l'état plié ou déplié d'une protéine, ces mesures sont faites en réflexion et manquent de sensibilité. Un point important est d'augmenter le seuil de sensibilité de ces mesures par des méthodes dites intégrées, à l'aide de structures guidées comme nous avons pu le voir précédemment. Cette voie d'investigation est particulièrement intéressante pour l'investigation en phase liquide. Plusieurs exemples de la littérature montrent la caractérisation de substances biologiques en micro volumes ou par circulation sur des lignes de propagation coplanaire ou microruban. Les caractéristiques intrinsèques de la ligne de propagation sont modifiées en présence des différents produits déposés. Nous pouvons citer des travaux sur un microsystème THz [2. 38] qui visent à caractériser des solutions de biomolécules à l'aide d'une ligne microruban. Un réservoir en polyéthylène est placé sur la ligne de propagation permettant d'investiguer un volume précis de liquide composé d'eau et de biomolécules. L'illustration du dispositif est montrée sur la Figure 2. 13A. Ce dispositif est réalisé sur un substrat de verre transparent à une impulsion THz. Des patches de GaAsBT sont déposés sur la structure pour permettre la génération du signal.

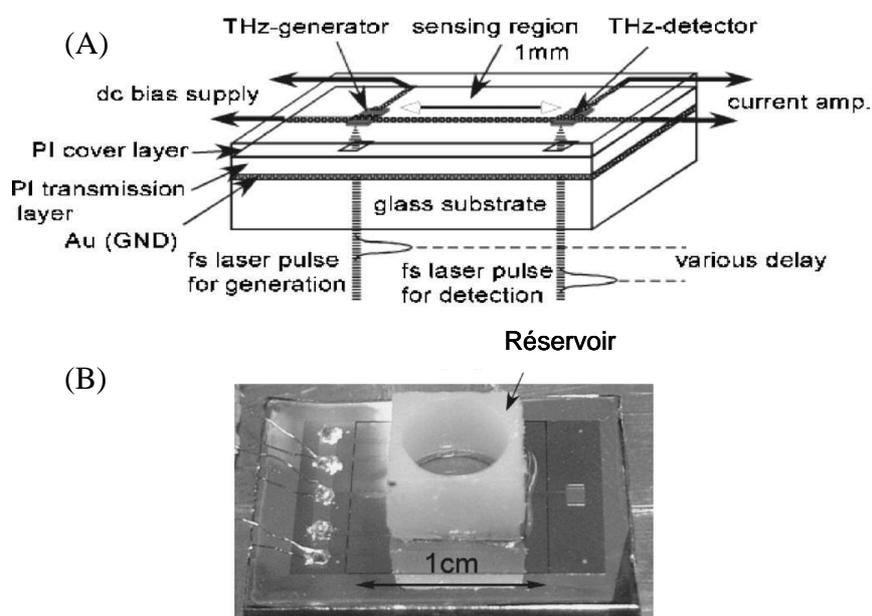


Figure 2. 13 : Investigation de solutions biologiques en phase liquide, A : Schéma de principe du dispositif, B : photo de la réalisation [2. 38].

Les mesures sont faites dans la bande de fréquence de 50GHz à 1THz pour une solution d'albumine (BSA/W) et d'acide aminé L-Arginine (L-Arg/W) dans l'eau. Les mesures ont été effectuées sur ces deux solutions avec des concentrations différentes. L'évolution fréquentielle du rapport entre l'absorption de l'eau et de la solution à investiguer est montrée sur la Figure 2. 14 [2. 39].

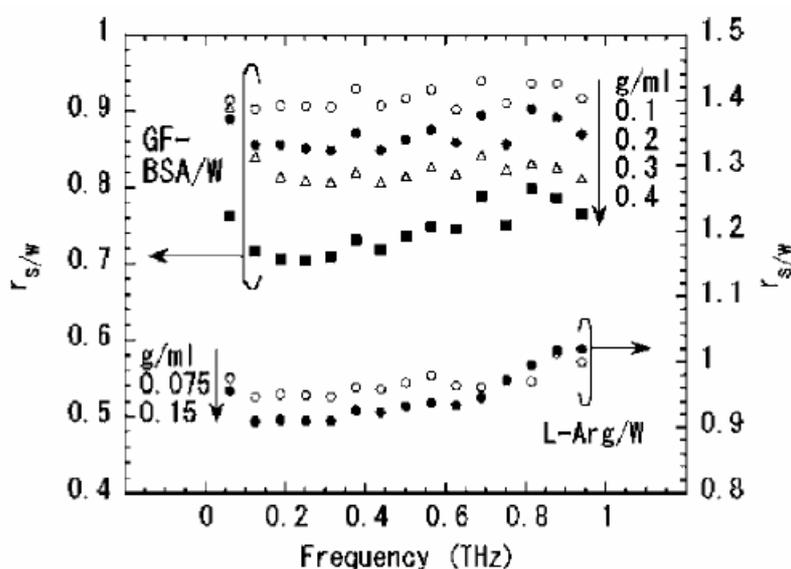


Figure 2. 14 : Dépendance fréquentielle du rapport du signal solution biologique/ eau pour de la GF-BSA/W et L-Arg/W pour chaque concentrations [2. 39].

Le point important lorsque l'on regarde ces résultats est que l'absorption en fonction de la concentration ne semble pas suivre une loi de Beer-Lambert. Ces résultats semblent être en accord avec les travaux de Khurgin et coll. [2. 40] montrant la violation de cette loi fondamentale par des phénomènes d'hydratation des molécules avec les molécules d'eau. Ce phénomène ne peut être observé que dans cette gamme de fréquence qui montre encore l'intérêt majeur du spectre THz pour l'investigation de biomolécules.

II.4. Imagerie médicale THz

Récemment, diverses techniques de formation d'images THz ont été développées pour le diagnostic des tumeurs humaines et animales [2. 41]. La formation d'images par impulsion TéraHertz (TPIs) a été appliquée pour identifier in vitro ou in vivo le carcinome basocellulaire. C'est le cancer de la peau le plus fréquent et le moins grave. Puisque le tissu cancéreux a une hydratation plus élevée comparée au tissu sain, il montre une absorption plus grande dans la région spectrale des térahertz. Les simulations théoriques ont également confirmés que l'eau joue un rôle important dans la distinction entre les tissus malades et normaux. Nous pouvons citer un exemple issu de la littérature sur la différenciation entre une cellule cancéreuse et une cellule saine. Il a été extrait 13 échantillons contenant des cellules infectées BCC (Basal Cell Carcinoma) et 10 échantillons de cellules normales de 10 patients. L'évaluation des échantillons malades a montré que la tumeur nodulaire est composée de BCC à 90%, alors que les 10% restant sont des cellules saines. La courbe présentée Figure 2. 15 montre les données liées à la fréquence ramenées à la moyenne de l'absorption pour les 13 échantillons contenant la BCC et les 10 échantillons normaux. Nous pouvons remarquer que la réponse est uniforme. Notons que les échantillons contiennent un très grand nombre de cellules élémentaire. Les augmentations de l'absorption de la tumeur et de la cellule normale sont linéaires sur toute la gamme de fréquence, avec une petite dérive de la courbe aux fréquences en dessous de 0.3 THz. Les échantillons infectés ont un niveau d'absorption plus élevé que la cellule saine sur toute la gamme de fréquence.

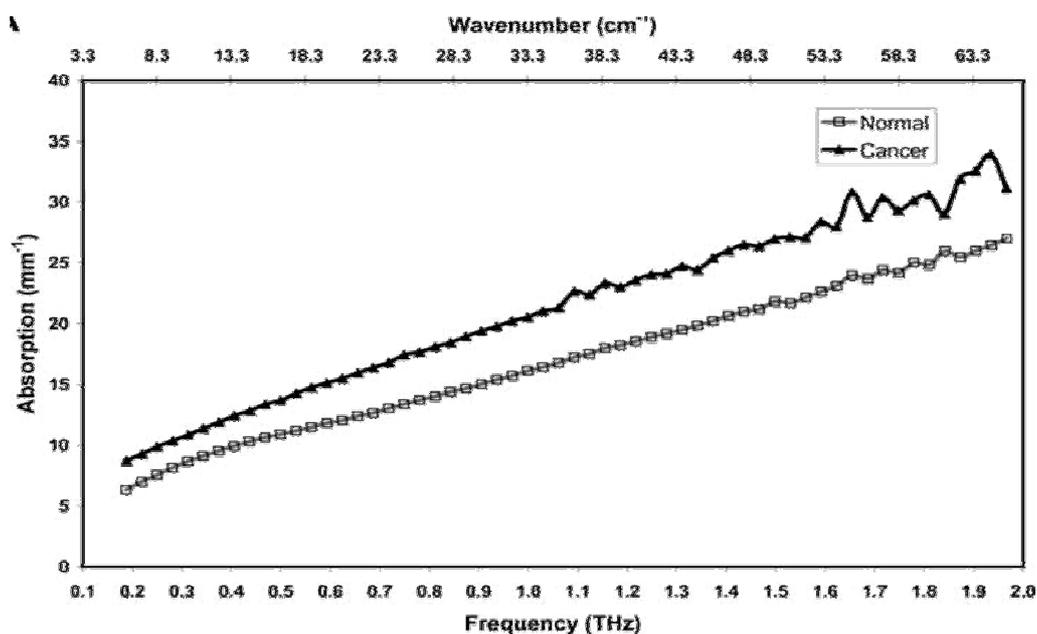


Figure 2. 15: Spectre d'absorption d'un tissu normal et d'un tissu cancéreux [2. 41].

L'absorption est un peu moins élevée en basse fréquence. Par exemple à 0.2 THz, l'absorption est de $6.63 \pm 0.16 \text{ mm}^{-1}$ pour une cellule normale et de $7.79 \pm 0.17 \text{ mm}^{-1}$ pour une cellule maligne. L'absorption pour la tumeur et la cellule saine augmente de façon monotone jusqu'à 2.0 THz, où les valeurs sont respectivement de $28.19 \pm 0.37 \text{ mm}^{-1}$ et $30.86 \pm 0.63 \text{ mm}^{-1}$. Elles sont approximativement trois fois plus grandes qu'à 0.2 THz. La différence à 1 THz est de 4.4 mm^{-1} et l'augmentation de la fréquence accroît cet écart. Bien que le système de TPS utilisé dans cette manipulation puisse mesurer jusqu'à 4 THz, les spectres sont tronqués à 2 THz. C'est en raison de l'absorption élevée du rayonnement mesurable de la cellule malade transmis par l'échantillon au-dessus de 2 THz rendant la mesure fortement bruitée.

Si l'on compare également le spectre d'absorption de l'eau et des tissus sains et malades, on peut remarquer que les tissus malades sont plus proche de l'eau que les tissus sains (Figure 2. 16).

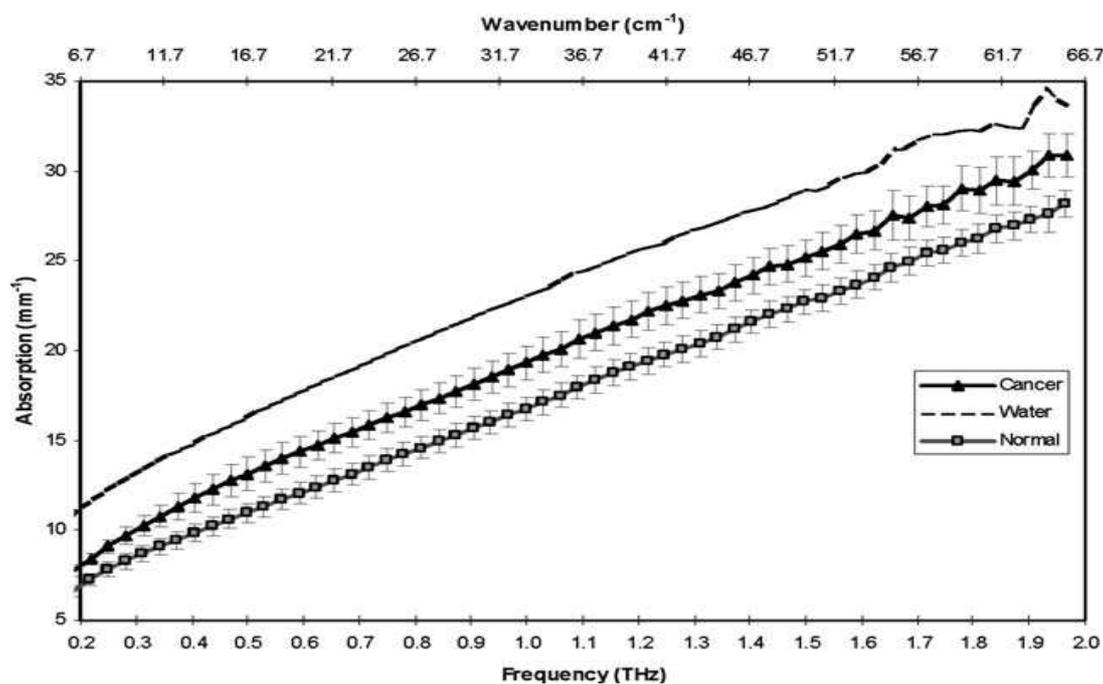


Figure 2. 16: Coefficients d'absorption moyen pour tous les échantillons prélevés sains et malades, et pour l'eau. Les barres d'erreur représentent l'intervalle de confiance à 95% [2. 41].

L'absence de pics de résonance est un résultat montrant que les éléments biologiques sont liés à l'eau, présente en plus grande quantité. Ceci est conforme aux études menées en utilisant d'autres techniques qui prouvent que les tumeurs ont en général une plus grande teneur en eau [2. 41]. Wong et al [2. 42] ont publié des données spectroscopiques mid-infrarouges de la BCC qui a prouvé qu'il y a également une augmentation des sites d'accrochage de molécules d'hydrogène sur lesquelles la spectroscopie térahertz est également sensible. Ce travail contribue à montrer que les études sur l'interaction du rayonnement THz avec les cellules composant les tissus tumoraux sont susceptibles d'éclaircir les mécanismes différenciant tissus cancéreux t tissus normaux.

III. Mode de Goubau pour l'investigation cellulaire

La spectroscopie THz en structure planaire nécessite une activité de recherche accrue dans les guides d'ondes THz et les circuits passifs. Récemment, il a été montré que la propagation d'ondes térahertz le long des fils nus en métal est possible avec une très faible absorption et dispersion [2. 43]. La propagation de ces ondes se fait par plasmon de surface. Quelques techniques de formation d'image térahertz en champ proche sont réalisées par des fils nus en métal, qui fonctionnent comme des antennes, pour augmenter localement le champ électrique térahertz [2. 44] [2. 45]. Dans de telles techniques de formation d'image, la propagation sur des fils finis en métal des ondes térahertz pourrait jouer un rôle important. Cependant, beaucoup de fils en métal, ne sont pas réellement nus. Des couches diélectriques minces sont souvent trouvées sur la surface des fils, appliquées intentionnellement ou même involontairement par l'oxydation ou la contamination. Dans ce dernier cas, l'épaisseur du diélectrique est très faible, de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres, mais influence sur la propagation. Les effets de ces couches sur la propagation des impulsions de térahertz le long de ces fils ne sont pas encore bien connus.

III.1. Les ondes de surfaces

Afin de mieux comprendre les modes de propagation dans une topologie Goubau, il faut d'abord bien comprendre quel est le type d'onde qui s'y propage [2. 46] [2. 47]. La séparation du champ électromagnétique sur une interface entre une onde de surface et une onde rayonnée peut sembler arbitraire car nous n'avons aucune méthode pour séparer ces deux composantes de champ. Même s'il est très difficile d'effectuer une séparation expérimentale, il est possible d'avoir une relation mathématique nous permettant de déterminer l'amplitude de l'onde de surface lorsque le champ total est connu. Nous ne pouvons pas compter sur le comportement asymptotique du champ puisque chaque structure physique a des pertes. De plus, il se peut que toute la gamme de l'onde de surface ne soit pas déterminée par le champ. La distinction entre mode rayonné et mode de surface peut être obtenue à partir de la considération

suivante : nous postulons qu'une antenne utilisée en réception ne doit pas répondre à une onde rayonnée et réciproquement [2. 48]. La formulation mathématique de cette condition mène aux relations d'orthogonalité entre les ondes de surface et les ondes rayonnées :

$$\int_S (E_s \wedge H_r) ndS = \int_S (E_r \wedge H_s) ndS = 0 \quad \text{Équation 2.1}$$

Où E_s et H_s sont les vecteurs des champs électrique et magnétique de l'onde de surface et E_r et H_r sont les vecteurs des champs de l'onde rayonnée. Ces relations sont une conséquence du théorème de réciprocité et sont valides pour les ondes sur les interfaces cylindriques aussi bien que pour les interfaces planes. Ces relations d'orthogonalité sont aussi démontrées pour les guides d'ondes fermés entre les divers modes de propagation. Dans le cas de guides d'ondes avec des pertes, l'orthogonalité en ce qui concerne la puissance n'est généralement plus valable.

III.2. Propagation filaire

Une idée ancienne, le guide d'ondes à simple fil, est actuellement redécouverte en tant qu'une des solutions de propagation guidée avec des caractéristiques extrêmement prometteuses pour le spectre THz, c'est-à-dire une faible atténuation et une faible dispersion. L'histoire de la propagation d'une onde le long de fils métalliques uniques remonte au 19^{ème} siècle. En 1888, Hertz a fait les premières investigations sur la propagation d'une onde sur un fil conducteur [2. 49]. Onze ans après, Sommerfeld a trouvé une première solution rigoureuse des équations de Maxwell's pour le problème de conditions aux limites pour la propagation d'une onde sur un simple fil. En conséquence, ce type de guide d'ondes s'appelle souvent « fil de Sommerfeld » [2. 50]. Cinquante ans ont été nécessaires pour obtenir les premières mesures, démontrant qu'une excitation est possible et que la détection d'onde de propagation sur des interfaces plates ou cylindriques est faisable prouvant l'existence de telles ondes. En 1962, King et Wiltse ont théoriquement analysé les ondes de surfaces sur des simples fils dans la gamme de fréquence entre 100 MHz et 1GHz [2. 51]. Un an après, les premières mesures ont

été publiées dans la gamme d'onde millimétrique à 140 GHz par Sobel [2. 52]. Le guide de propagation filaire n'a pas trouvé la même gamme d'applications que d'autres structures métalliques basées sur des concepts de guide d'ondes comme par exemple les cavités, les topologies planaires comme les microrubans ou les guides coplanaires. Le champ électrique se propageant le long d'un fil métallique s'étend largement dans l'air environnant. Une limitation pratique apparaît particulièrement aux fréquences radio et microondes. Par exemple, un fil de 1 centimètre de diamètre transporte 75% de la puissance d'une onde à 10 gigahertz autour d'un secteur circulaire de 40 centimètres de rayon [2. 53]. Afin de confiner le champ électromagnétique plus près de la surface, le fil peut être recouvert d'un diélectrique. Cette nouvelle topologie de ligne à été étudié en particulier par Goubau. Le mode de propagation de Goubau présente des caractéristiques très intéressantes, à savoir : un mode de propagation TM (Transverse Magnétique), de faibles pertes et une extension spatiale d'autant plus faible que la fréquence de l'onde est élevée. C'est la dernière raison qui peut expliquer le fait que ces lignes n'aient pas connues un grand développement. En effet elles étaient destinées à être utilisées à des fréquences basses (radio à quelques centaines de MHz). Le couplage important avec l'environnement crée alors une forte dispersion. Bien entendu, l'épaisseur et les propriétés diélectriques du matériau entourant la ligne créent aussi des pertes diélectriques additionnelles et participent à la dispersion du mode de Goubau [2. 54].

L'extension du champ dans l'air diminue avec la fréquence, rendant attrayant ces guides d'ondes aux fréquences THz. Le rayon de puissance à 75% d'un fil de diamètre de 100 μm peut être réduit à moins de 1 millimètre à 1 THz. Très récemment l'équipe du Professeur Mittleman a mis en évidence la propagation d'ondes térahertz sur un simple conducteur métallique (fil de 0.9mm de diamètre) [2. 57]. Les performances démontrées sont très intéressantes. Il s'agit notamment d'une vitesse de groupe proche de celle de la lumière et un coefficient d'atténuation inférieur à 0.03cm^{-1} , ce qui constitue un record pour des guides en gamme THz. Il est donc intéressant d'évaluer le potentiel des fils en métal comme guides d'ondes pour le rayonnement térahertz. Ce chapitre étudie l'applicabilité des ondes électromagnétiques se propageant sur fils finis en métal avec des fréquences dans la gamme des térahertz. Beaucoup de travaux de recherche sur la propagation des ondes THz sur des fils

se font à l'aide d'une excitation en espace libre et sur des fils de section cylindrique [2. 55]. La difficulté principale a été le manque de matériaux bien adaptés pour la propagation guidée aux fréquences THz. Les matériaux plus adaptés, transparents et avec peu de dispersion dans le régime THz sont cristallins. Leur utilisation pratique est exclue pour les guides d'ondes pratiques. Les matériaux tels que les verres et les polymères qui fonctionnent bien aux fréquences optiques montrent des pertes d'absorptions plus élevées aux fréquences THz. Les applications des ondes continues THz utilisent souvent une géométrie confinée dans laquelle le rayonnement THz se propage par l'air à l'intérieur d'un tube en métal. Ce n'est pas pratique pour une impulsion THz parce qu'elle subit la dispersion de la vitesse de groupe ce qui cause une déformation ou un élargissement de l'impulsion. Il a été montré récemment qu'un simple fil cylindrique en métal est un guide d'onde THz avec les mêmes caractéristiques [2. 57]. Le rayonnement THz se propage le long de la surface du fil en mode guidé qui est en grande partie radialement polarisé. Les pertes sont finalement définies par la conductivité finie du métal. Pendant que l'énergie de l'impulsion THz se déplace le long du fil, elle fait osciller les électrons de conduction, créant un effet connu sous le nom de plasmon de surface.

III.3. Excitation THz du mode de propagation filaire

Dans les années 50, l'excitation du mode de Goubau était réalisée à l'aide de deux antennes cornets (Figure 2. 17). La réalisation de ce type de transition en gamme millimétrique et submillimétrique est néanmoins très difficile. De plus, cette approche ne permet pas une caractérisation par un analyseur de réseaux vectoriel sous pointes.

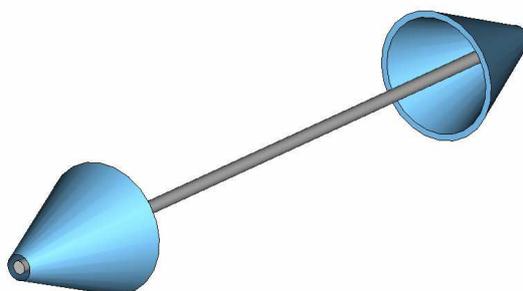


Figure 2. 17: Excitation du mode de Goubau réalisée à l'aide de deux antennes cornets

Le point clé pour ces modes de propagation filaire reste leur excitation et particulièrement l'efficacité de celle-ci. L'étape la plus difficile est le moyen technologique pour coupler le rayonnement THz au guide d'onde. Les impulsions THz linéairement polarisées produites par une antenne photoconductrice sont mal adaptées dans l'espace au mode radial d'un guide d'onde [2. 57]. La première configuration d'accouplement utilisée est décrite dans la Figure 2. 18.

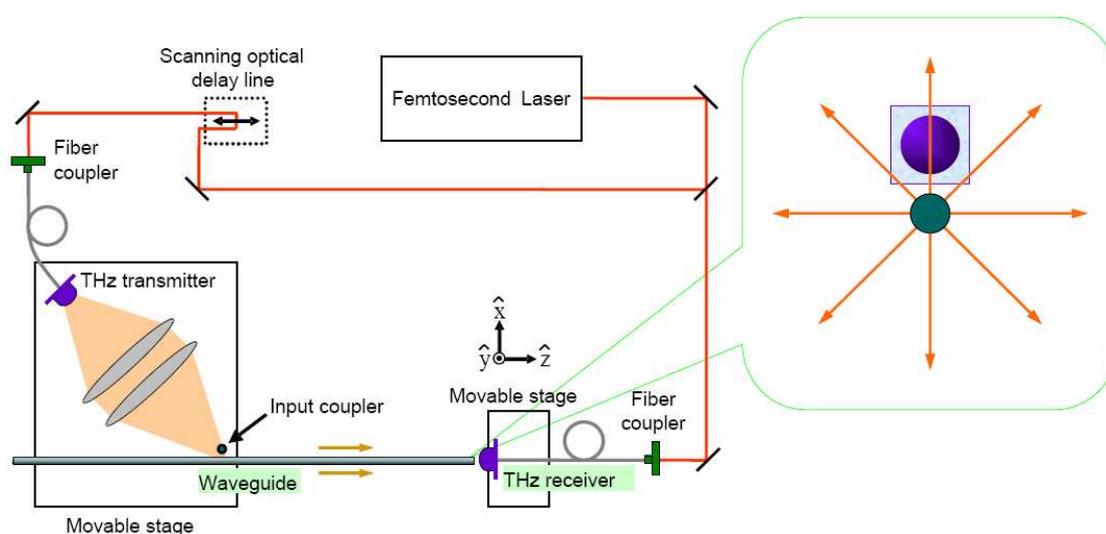


Figure 2. 18: Schéma d'excitation d'un guide d'onde THz dans la configuration de deux lignes couplées [2. 57].

Un deuxième fil, le coupleur, est placé à approximativement 500 microns du guide d'ondes perpendiculairement à sa direction. Le rayonnement THz est focalisé sur l'espace entre les deux conducteurs en diffractant une partie du rayonnement. Tandis que la quantité de rayonnement diffracté est très petite, il y en a assez pour exciter l'onde de Sommerfeld. Des simulations par la méthode des éléments finis (FEM) montrant la configuration de cet accouplement entre les deux conducteurs ont été faites pour déterminer exactement l'efficacité de ce couplage. Les cartes de champs de la Figure 2. 19 montre le champ électrique simulé à une fréquence de 100 GHz dans le plan du fil. Ces simulations ont été accomplies en utilisant le logiciel commercial COMSOL Multiphysics. On peut voir dans les résultats de simulation que presque tout le rayonnement incident continue de se propager dans l'espace et seul une

faible partie du champ est couplé au guide filaire. Les calculs ont prouvés que moins de 0.5% de la puissance incidente est couplée au guide.

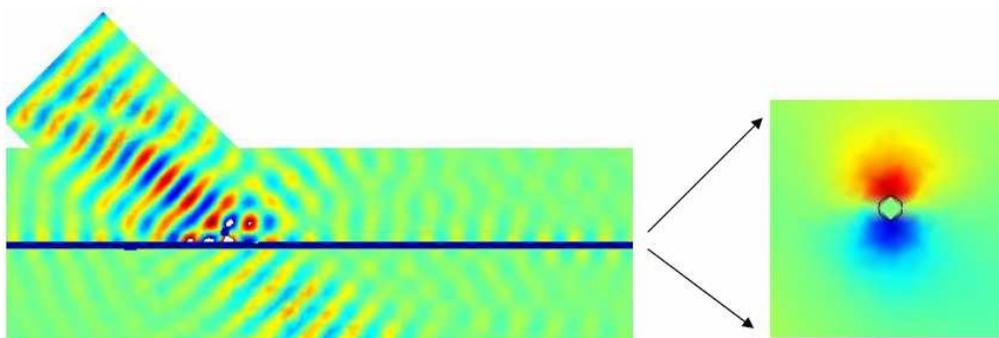


Figure 2. 19: Champ électrique illustrant le couplage dans la configuration de deux lignes placées perpendiculairement [2. 57].

Une méthode plus efficace est donc nécessaire. Le problème crucial était la disparité de polarisation entre le rayonnement THz produit et le mode fondamental du guide d'ondes. Des antennes photoconductrices standards qui produisent une onde THz linéairement polarisée sont mal appropriées au couplage d'un guide d'ondes filaire. La conception d'une nouvelle antenne photoconductrice a été proposée afin de produire un rayonnement THz radialement polarisé (Figure 2. 20A: antenne idéale) [2. 58]. La structure se compose d'une électrode intérieure circulaire entourée par une deuxième électrode en anneau. Le faisceau du laser est focalisé sur le centre de telle façon qu'une partie de la lumière soit incident sur l'espace entre les deux électrodes polarisées, créant des porteurs de charge dans le semi-conducteur. Les porteurs accélérés créent un dipôle radial. La conception de l'antenne dans la Figure 2. 20A est idéale et n'est pratique qu'à la condition que les électrodes soient décentrées. La Figure 2. 20B est la conception réelle comportant une coupure dans l'électrode externe pour tenir compte de la connexion de l'électrode d'alimentation. La Figure 2. 20C représente le rendement de puissance simulé de l'antenne radiale idéale dans l'espace libre. Le champ produit par l'antenne idéale est radialement polarisé comme démontré par la présence du mode cylindrique symétrique se propageant le long le l'axe z. Une fois comparé à un modèle analytique (dérivé d'une superposition des dipôles linéaires disposés radialement), les résultats de simulation par FEM étaient en complet accord (Figure 2. 20D).

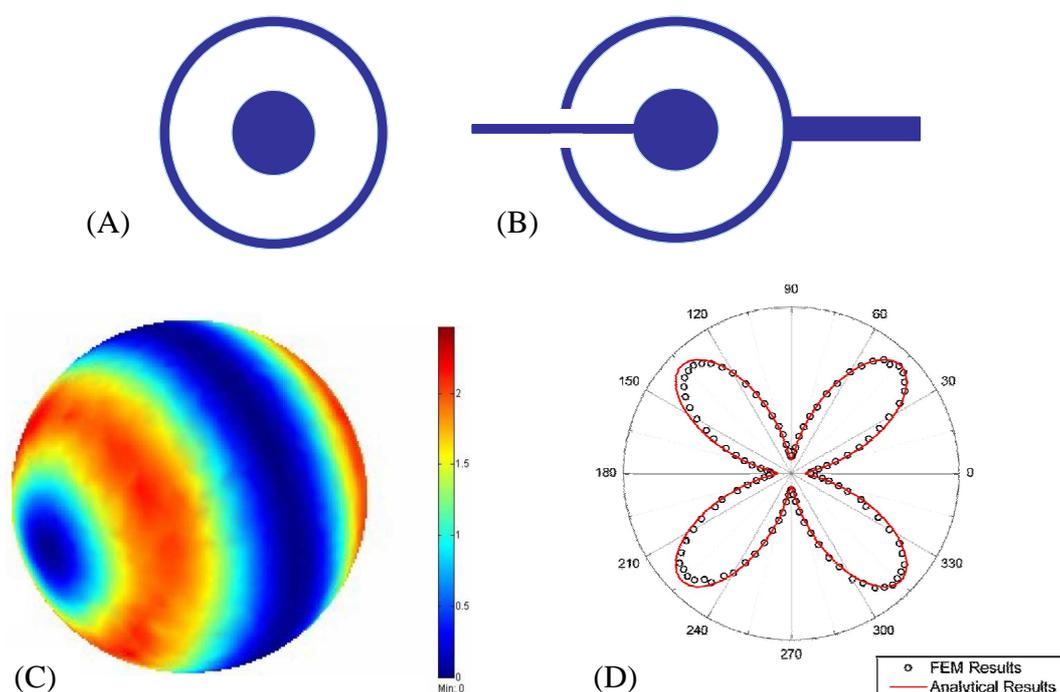


Figure 2. 20: Excitation du mode de propagation filaire à l'aide d'une antenne photoconductrice, A : antenne idéale, B : antenne réalisée, C : carte de puissance émise par l'antenne idéale, D : Confrontation simulation par éléments finis et calcul analytique du diagramme de rayonnement de l'antenne idéale [2. 58].

Les antennes radiales idéales et réelles ont été placées sur les substrats épais de 500 microns de GaAs avec des lentilles de silicium placées sur la surface opposée. Ces modèles ont été simulés en utilisant une approche multi physique en deux étapes. D'abord, une simulation d'électrostatique est opérée dans laquelle une polarisation continue est appliquée entre les deux électrodes. Une densité de charge avec une distribution gaussienne est placée au centre de l'antenne afin d'imiter les porteurs de charge optiquement produits. Le modèle résout les champs électrostatiques et les utilise comme champs temporels d'entrée pour la deuxième étape. La propagation de l'onde électromagnétique est alors résolue dans le domaine fréquentiel. Les cartes de champs présentées sur la Figure 2. 21 montrent les résultats de simulations à 100 GHz. Les Figure 2. 21A et Figure 2. 21B tracent le champ émis de l'antenne idéale, après la lentille de silicium, des composantes de champs électrique x et y. Le champ émis de l'antenne idéalisée est presque parfaitement radialement polarisé comme démontré

par l'inversion de polarité vue dans chaque composant de champ électrique. Les Figure 2. 21C et 2.21D tracent le champ émis par l'antenne réelle. La présence de l'électrode d'alimentation et de la coupure dans l'électrode externe affecte clairement les résultats cassant la symétrie de l'antenne.

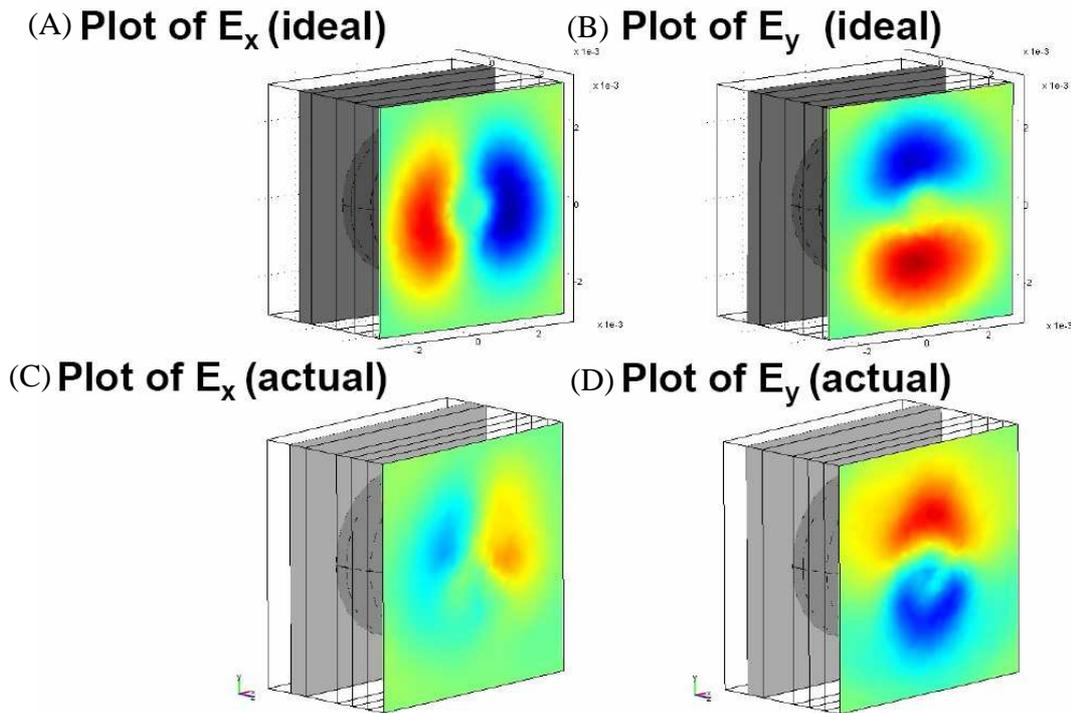


Figure 2. 21: Simulation électromagnétique de l'antenne idéale et de l'antenne réelle [2. 59].

Un guide d'ondes filaire de 0,9 millimètre de diamètre a été directement couplé au centre et à l'extérieur de la lentille de silicium. Le modèle a été résolu en utilisant la même approche constituée des deux étapes précédemment décrites pour des fréquences de 100 GHz. Les résultats (Figure 2. 22) prouvent que le champ émergent du dôme de silicium se couple au guide d'onde et que la propagation guidée a lieu. L'efficacité de couplage s'est avérée être de l'ordre de 50% [2. 59].

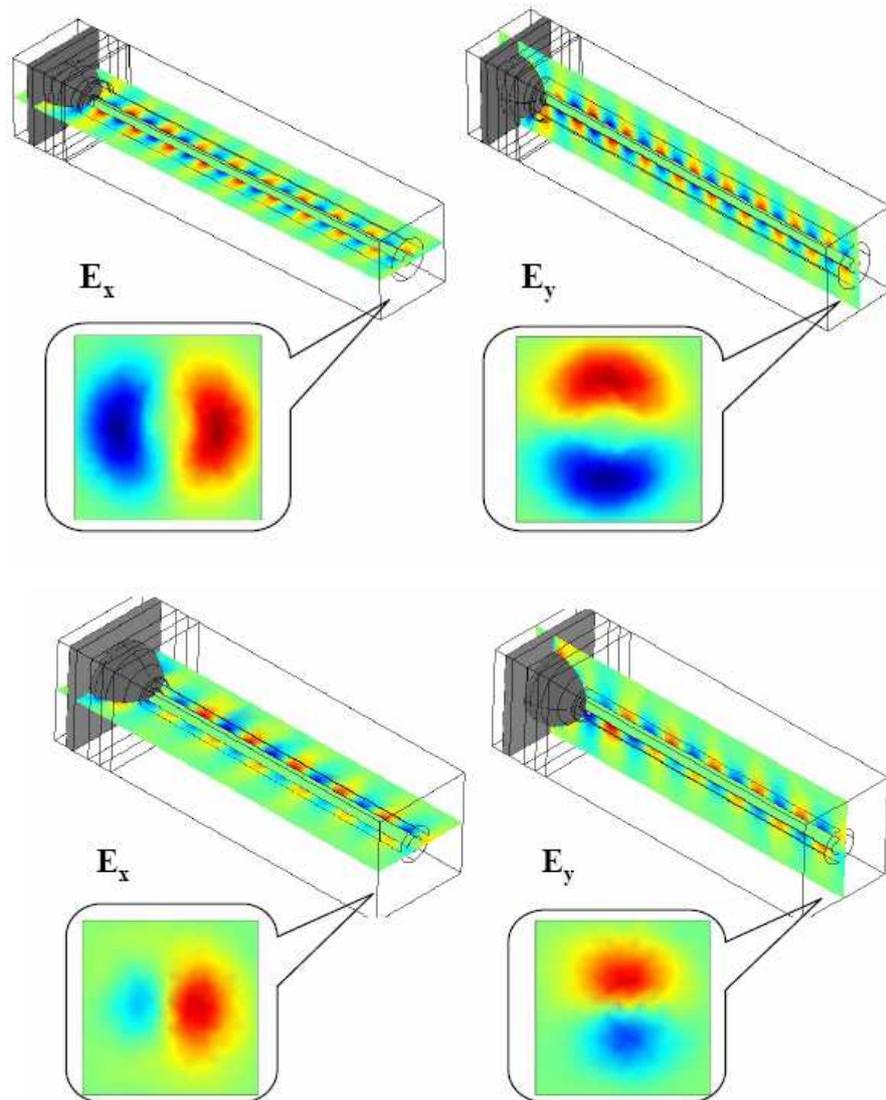


Figure 2. 22: Propagation de l'onde le long du guide d'onde filaire pour l'antenne idéale et l'antenne réelle [2. 59].

Après les résultats concluant de simulation, des antennes photoconductrices symétriques ont été fabriquées sur les substrats de GaAs de 500 μm d'épaisseur [2. 59]. Une lentille hémisphérique de silicium a été montée sur le substrat en vis-à-vis des électrodes de l'antenne. L'antenne radiale possède une électrode intérieure de 8 microns de diamètre séparée par une distance de 75 μm de l'électrode externe. Une polarisation continue a été appliquée aux électrodes, et l'échantillon était excité avec un faisceau de longueur d'onde 800

nanomètres, créant une impulsion laser de 100 fs. Un guide d'onde filaire en acier inoxydable de 27cm de longueur et de 0,9mm de largeur a été couplé à l'extrémité du dôme de silicium. L'impulsion THz est récupérée à l'extrémité du guide d'onde par un récepteur photoconducteur couplé à une fibre optique standard (Figure 2. 23).

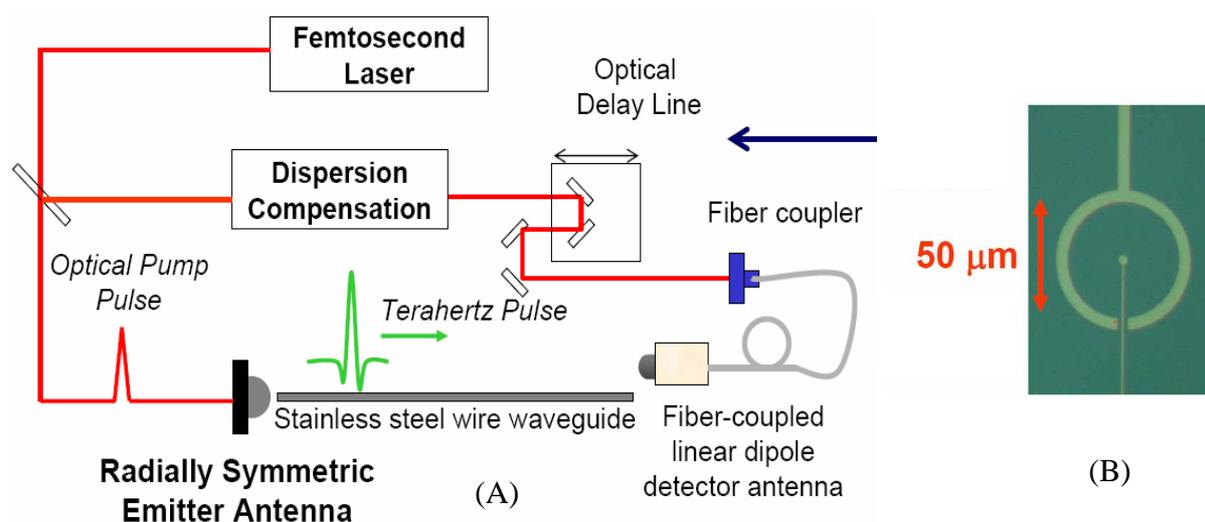


Figure 2. 23: A : Illustration du banc expérimental pour l'excitation du mode de propagation filaire, B : Antenne réelle réalisée [2. 59].

Puisque le mode guidé se propage le long de la surface du guide, des mesures excentrées ont été réalisées perpendiculairement à l'axe du fil. La Figure 2. 24A montre les signaux détectés à l'extrémité du guide d'ondes à +ou- 3mm de chaque coté. Les signaux mesurés sont de forte amplitude et symétrique, mais en opposition de phase, démontrant ainsi la polarisation radiale du mode guidé, comme prévu par les résultats de simulation. Lorsque le guide d'onde est enlevé (Figure 2. 24B), un autre signal THz beaucoup plus petit a été détecté à 27cm. Cette expérience démontre les possibilités de couplage accrues offertes par l'utilisation d'un guide d'onde filaire comme propagateur d'onde THz.

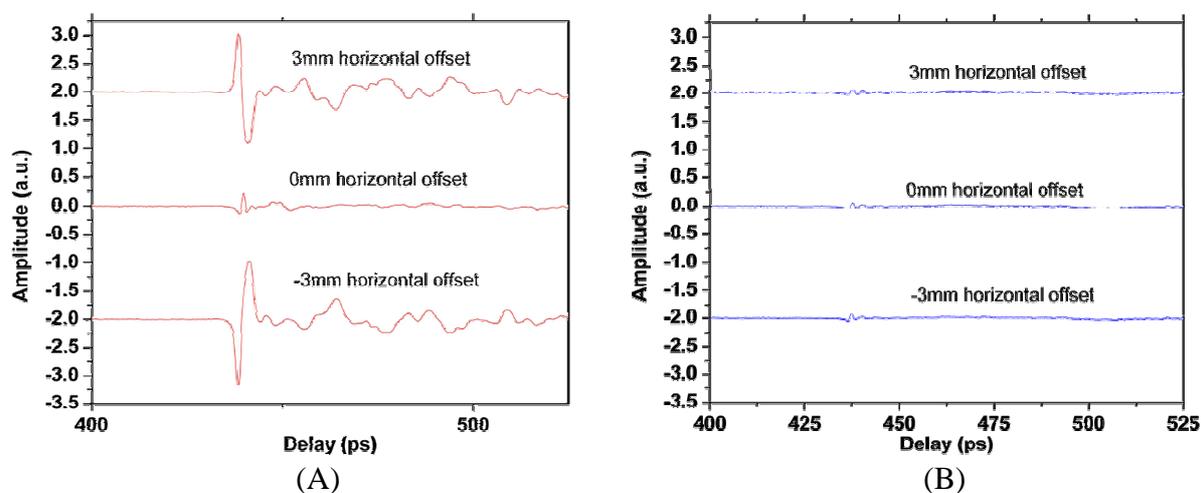


Figure 2. 24 : Amplitude du champ électrique autour du fil, (A) avec et (B) sans guide
[2. 59]

III.4. Excitation du mode filaire planaire

Le seul problème dans les différentes techniques que nous venons de présenter et qu'elle s'effectue en espace libre et qu'elles sont difficilement réalisables en technologie planaire. C'est pour cela que nous allons nous intéresser d'avantage au mode de Goubau qui est équivalent au mode de Sommerfeld à la différence près que le guide d'onde filaire et recouvert d'un diélectrique qui pourrait, dans notre cas, s'assimiler au substrat en topologie planaire. Le mode de propagation le long d'une ligne de Goubau en espace libre est un mode TM (Transverse Magnétique). L'utilisation d'une transition coplanaire-goubau permet au mode de s'établir sur une conformation de champ quasi-TEM. C'est sur ce thème que nous travaillons afin de tirer profit des propriétés du mode de Goubau. Nous développons une solution originale basée sur une approche planaire. Pour réaliser notre transition planaire, nous nous sommes inspirés de l'excitation réalisée par Goubau à laquelle nous avons effectué une coupe pour se ramener dans un plan. A celle-ci nous avons rajouté des accès coplanaires conçus pour travailler aux fréquences qui nous intéressent, c'est-à-dire la bande de fréquences millimétriques. Faisons un bref rappel sur les guides d'onde coplanaires, que nous appliquerons à la conception de notre transition Coplanaire Goubau.

III.4.1. Les lignes coplanaires

Les lignes coplanaires sont très utilisées dans le domaine hyperfréquence du fait de leurs caractéristiques électromagnétiques et leur facilité de réalisation technologique car les rubans qui la composent ainsi que les composants auxquels ils sont reliés sont dans le même plan. Elles supportent un mode de propagation peu dispersif. La structure d'un guide d'onde coplanaire est donnée dans la Figure 2. 25.

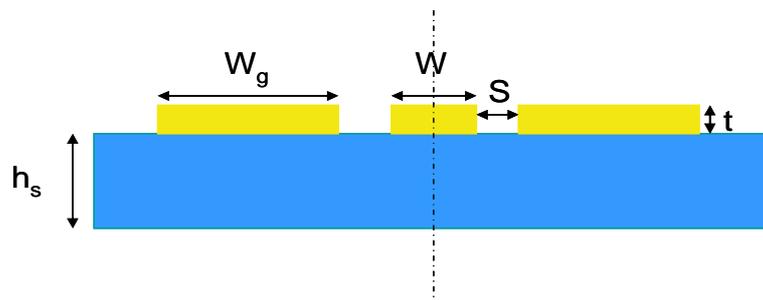


Figure 2. 25: Dimensions caractéristique du guide d'onde coplanaire

Les lignes coplanaires sont composées d'un substrat diélectrique sur lequel sont déposées les trois lignes métalliques de manière symétrique.

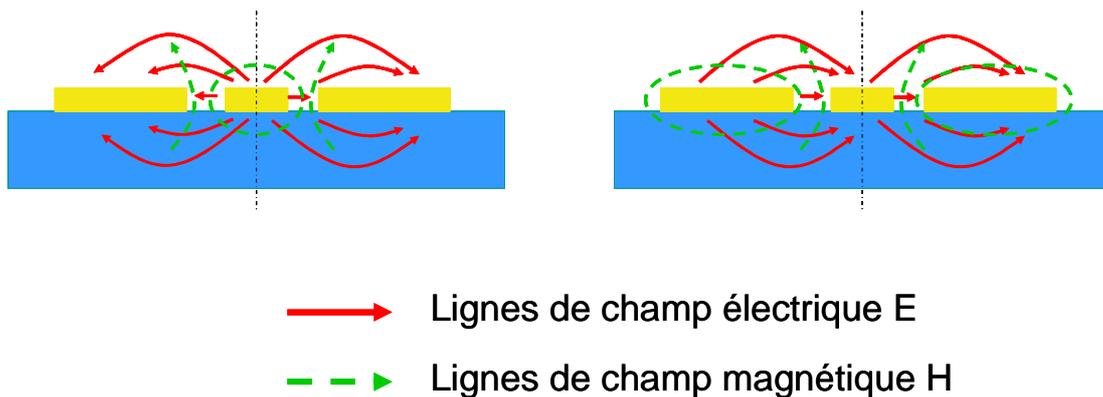


Figure 2. 26: Champ électrique et magnétique du guide coplanaire, a : mode coplanaire
b : mode fente.

D'un point de vue électromagnétique, la ligne coplanaire peut supporter deux modes de propagation fondamentaux : un mode coplanaire (Figure 2. 26A), impaire quasi-TEM, très

peu dispersif et un mode quasi TE appelé mode fente (Figure 2. 26B), fortement dispersif. Ce dernier apparaît lorsque la ligne présente, par exemple, des discontinuités, causant un rayonnement. Pour effectuer notre transition nous allons définir les dimensions de notre structure pour n'exciter que le mode qui nous intéresse, c'est-à-dire le mode coplanaire. Les modes supérieurs non désirés peuvent être atténués si on applique les critères suivants :

$$\begin{aligned} h_s &< 0,12 \times \lambda_d \\ w + 2s &\leq \frac{\lambda_d}{10} \\ w + 2s &\ll h_s \\ w + 2s &\ll w_g \end{aligned} \quad \text{Équation 2.2}$$

Avec h_s la hauteur du substrat, λ_d la longueur d'onde dans le diélectrique, w la largeur du ruban central, s le distance inter-ruban et w_g la largeur des plans de masse.

$$\lambda_d = \frac{c_0}{\sqrt{\epsilon_r} \times f_{\max}} \quad \text{Équation 2.3}$$

Où C_0 est la célérité dans le vide et f_{\max} , la fréquence de travail maximale.

La ligne coplanaire est moins dispersive si la hauteur du substrat est faible. En effet, la ligne coplanaire peut supporter un mode TE dont la fréquence de coupure diminue avec l'augmentation de la hauteur, favorisant l'apparition de ce mode dans notre gamme de fréquences.

$$f_{TE} = \frac{c_0}{4 \times h_s \times \sqrt{\epsilon_r - 1}} \quad \text{Équation 2.4}$$

Où ϵ_R est la permittivité du substrat.

La ligne coplanaire est le siège de plusieurs types de pertes : les pertes conductrices, diélectriques et par rayonnement. Elle présente moins de pertes conductrices si son impédance caractéristique est proche de 50Ω . Cela s'explique par le fait que les rubans étroits des lignes de grandes impédances ont une densité de courant plus importante. De même, les fentes étroites des lignes de basses impédances entraînent une densité de courant plus forte sur les bords des rubans. Les pertes diélectriques dépendent de la nature du substrat utilisé, elles peuvent être supérieures aux pertes conductrices si le matériau du substrat possède un facteur de pertes élevé. D'un point de vue fréquentiel, les pertes conductrices résultent du caractère fini de la conductivité de la métallisation, qui constitue les rubans. Elles deviennent moins importantes en haute fréquence du fait de son évolution en \sqrt{f} contrairement aux pertes diélectriques dont l'évolution fréquentielle est linéaire. Si l'on regarde l'évolution de l'impédance caractéristique de la ligne coplanaire en fonction de ces paramètres géométriques, à savoir la largeur du ruban central W (Figure 2. 27) et le gap entre le ruban et le plan de masse S , on peut remarquer que l'on peut faire varier cette impédance Z_c en jouant sur les valeurs de ces paramètres. Ceci va nous permettre de passer de notre impédance $Z_c=50\Omega$ pour l'accès coplanaire à notre impédance de ligne de Goubau.

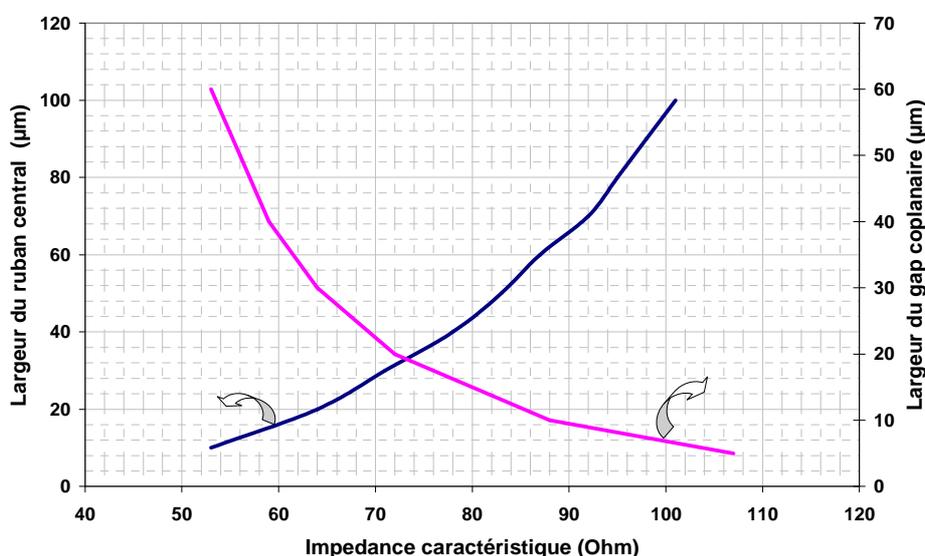


Figure 2. 27: Courbe de variation de l'impédance caractéristique en fonction des paramètres géométriques de la ligne.

Nous avons testé plusieurs types d'excitations planaires du mode de Goubau en changeant la conformation des plans de masse et du ruban pour pouvoir exciter de la meilleure façon le mode qui nous intéresse. Les deux principales excitations que nous avons testé sont présentées sur la Figure 2. 28. On peut distinguer une excitation de type linéaire et une autre de type elliptique [2. 60].

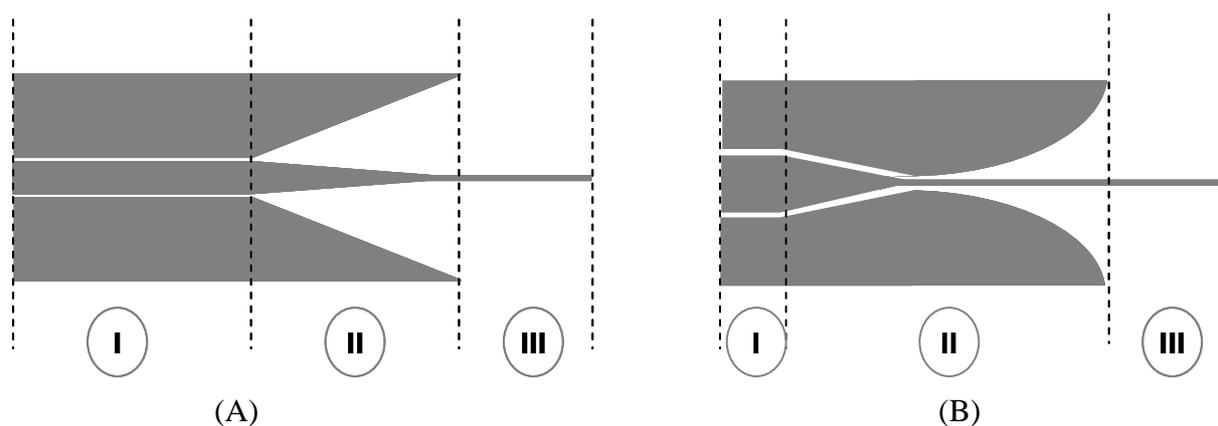


Figure 2. 28: A : Excitation linéaire, B : Excitation elliptique

Les deux types d'excitation se composent de 3 parties : une partie coplanaire (I), une partie transition (II) et une partie ligne de Goubau (III). Les dimensions de la partie coplanaire (I) sont définies pour obtenir une impédance caractéristique de 50Ω , et pour minimiser les pertes d'insertion lors de la mesure. L'efficacité de notre excitation sera donc la partie II car c'est elle qui va jouer le rôle de transformatrice de mode en passant du mode coplanaire au mode de Goubau, mais également, en variant l'impédance caractéristique du mode coplanaire de 50Ω à l'impédance du mode de Goubau beaucoup plus élevée comme nous le verrons.

Les différentes structures et résultats de simulation ont été réalisés à l'aide du logiciel Microwave Studio (MWS) de CST. Ce logiciel, destiné à sa création aux calculs dans les accélérateurs de particules, simule dans le domaine temporel les champs électromagnétiques par la technique des intégrations finies FIT (Finite Integration Technique). A partir des équations de Maxwell en tension et en courant discrétisées sur les bords de deux domaines cubiques imbriqués, cette technique permet l'utilisation du calcul matriciel et de sous programmes pré calculés notamment aux interfaces, afin d'effectuer les calculs plus

rapidement. Il permet de calculer les champs électromagnétiques dans une structure en trois dimensions et d'obtenir les signaux temporels et les paramètres [S] de cette structure.

III.4.2. Excitation planaire linéaire

Détaillons dans un premier temps l'excitation dite linéaire. Les caractéristiques géométriques de cette transition sont données ci-dessous (Figure 2. 29).

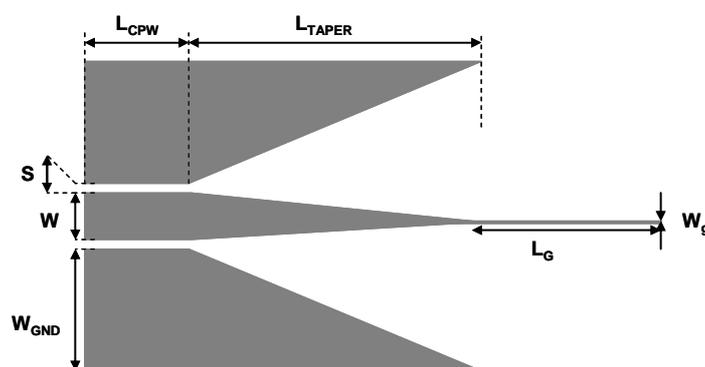


Figure 2. 29: Grandeurs caractéristiques de la transition linéaire

La partie coplanaire est constituée d'un ruban central de largeur $W=60\mu\text{m}$, d'une largeur de plan de masse $W_{\text{GND}}=200\mu\text{m}$ avec une distance inter masse $S=10\mu\text{m}$ et d'une longueur $L_{\text{CPW}}=200\mu\text{m}$. Nous avons indiqué toutes les dimensions de cette transition dans le Tableau 2.

1

Paramètres	Dimensions	Désignations
W	60 μm	<i>Largeur du ruban central</i>
S	10 μm	<i>Gap coplanaire</i>
W_{GND}	200 μm	<i>Largeur des plans de masse</i>
L_{CPW}	200 μm	<i>Longueur accès coplanaire</i>
L_{TAPER}	400 μm	<i>Longueur du taper</i>
L_G	250 μm	<i>Longueur du fil</i>
W_G	5 μm	<i>Largeur du fil</i>

Tableau 2. 1 : Dimensions de la transition linéaire

Les dimensions de l'accès coplanaire ont été définies avec le logiciel TXLine2001 de Applied Wave Research basé sur le modèle quasi-TEM de Heinrich. On peut remarquer sur les cartes de champs présentées sur la Figure 2. 30 que nous avons bien le mode coplanaire.

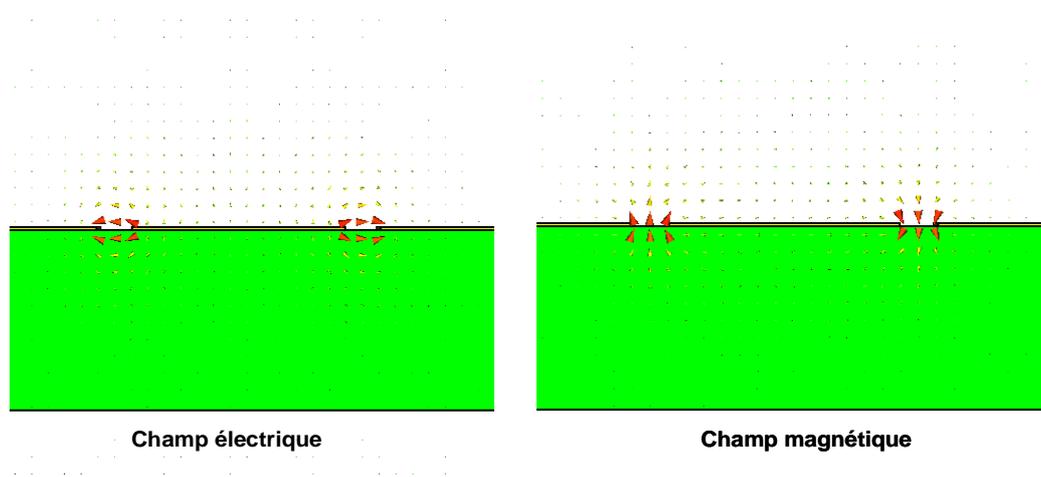


Figure 2. 30: Champ électromagnétique de l'accès coplanaire de la transition

On peut remarquer en simulation que cette longueur L_{CPW} n'influe pas sur l'efficacité de la transition. Il s'agit d'une longueur suffisante pour que le mode coplanaire puisse s'établir (Figure 2. 31). Pour le vérifier, nous avons simulé la transition avec différentes longueurs d'accès CPW avec des dimensions de 100,200 et 500 μm .

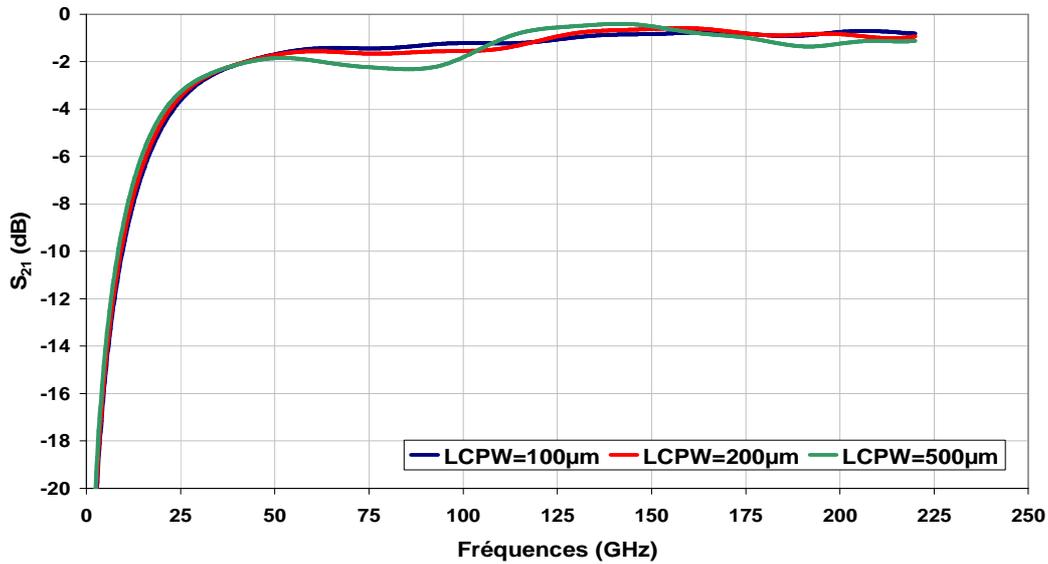


Figure 2. 31: Paramètre de transmission pour différentes longueur d'accès CPW.

La seconde partie de cette transition permet la transformation du mode de propagation. Elle consiste à un éloignement progressif des plans de masse coplanaires qui se traduit par une augmentation de l'impédance caractéristique de la ligne. On se rapproche alors de celle du mode de Goubau. Cette partie de la transition est très importante. Sa longueur permet de faire varier plus ou moins vite l'impédance caractéristique de la ligne. Nous avons optimisé cette longueur par simulation pour obtenir une bonne efficacité de transformation de mode.

Enfin la troisième partie est le fil unique de largeur $W_G=5\mu\text{m}$ et de longueur $L_G= 250\mu\text{m}$ permettant d'obtenir au moins un quart de longueur d'onde guidée λ_G en mode de Goubau.

$$\lambda_G = \frac{\lambda_0}{\sqrt{\epsilon_{r_{eff}}}}$$

avec

$$\epsilon_{r_{eff}} = \frac{\epsilon_r + 1}{2}$$

Équation 2.5

La simulation à été réalisée sur un substrat de permittivité $\epsilon_r=2,65$ à $f=220\text{GHz}$. La longueur d'onde guidée est donc $\lambda_G=1\text{mm}$. Si l'on regarde la carte de champ électrique de cette

transition (Figure 2. 32), on peut remarquer qu'elle transforme bien le mode coplanaire établi dans la partie I (accès coplanaire) de la transition en un mode de propagation filaire dans la partie III (guide filaire).

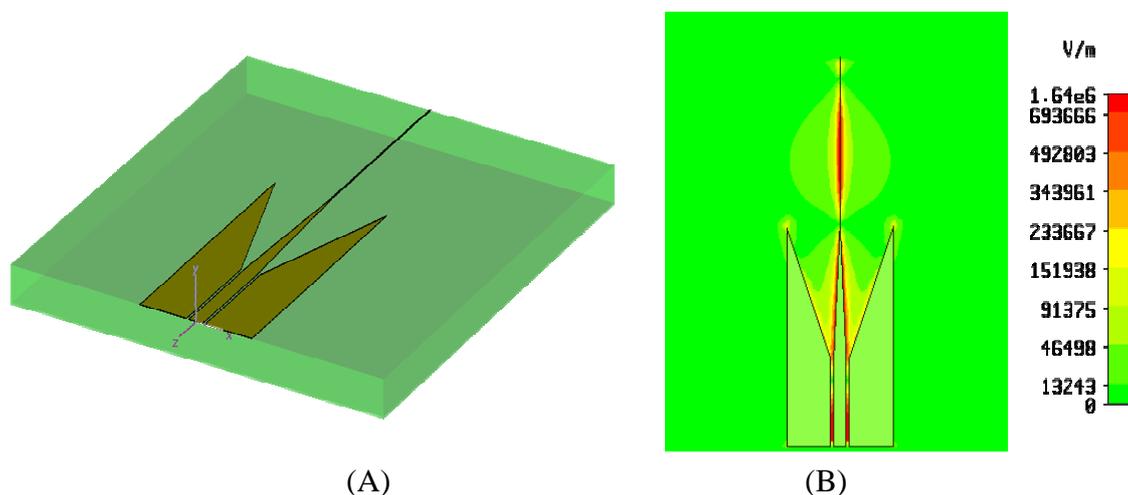


Figure 2. 32: A : Structure simulée, B=Champ électrique le long de la transition et sur le fil.

Nous avons donc simulé notre transition sur un substrat de BCB de 100 μ m d'épaisseur de permittivité $\epsilon_R = 2,65$ et un $\tan\delta = 0,003$ à 220GHz. La métallisation est en or de conductivité $\sigma = 4,1.10^7$ S/m et de 1 μ m d'épaisseur. On représente sur la Figure 2. 33 les champs électrique et magnétique du fil présent en sortie de la transition.

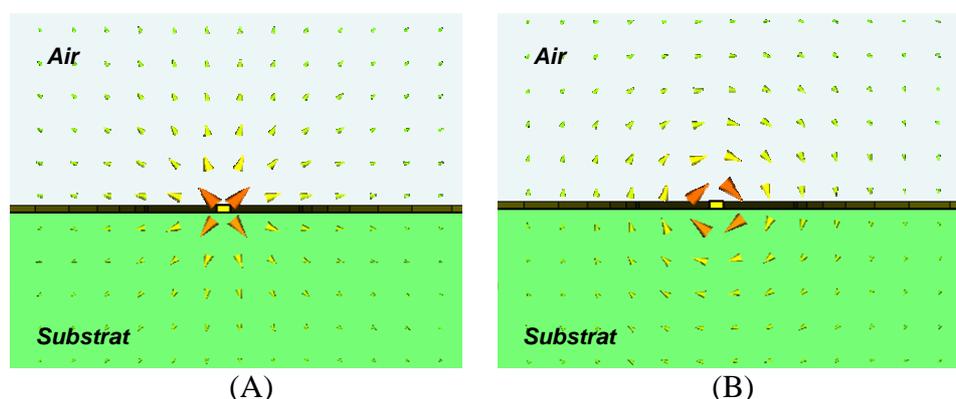


Figure 2. 33: Champ électrique (A) et magnétique (B) autour du fil de Goubau

Si l'on regarde les courbes du signal d'entrée et de sortie de cette transition dans le domaine temporel (Figure 2. 34), on peut remarquer une atténuation assez faible du signal de sortie par rapport au signal d'entrée. Nous avons donc une assez bonne efficacité qui peut être chiffrée à 67%. Nous sommes bien au-delà de ce que nous pouvons trouver dans la littérature, à savoir environ 50% pour l'antenne photoconductrice. A partir de cette transition nous pouvons dire que l'excitation par accès coplanaire est possible.

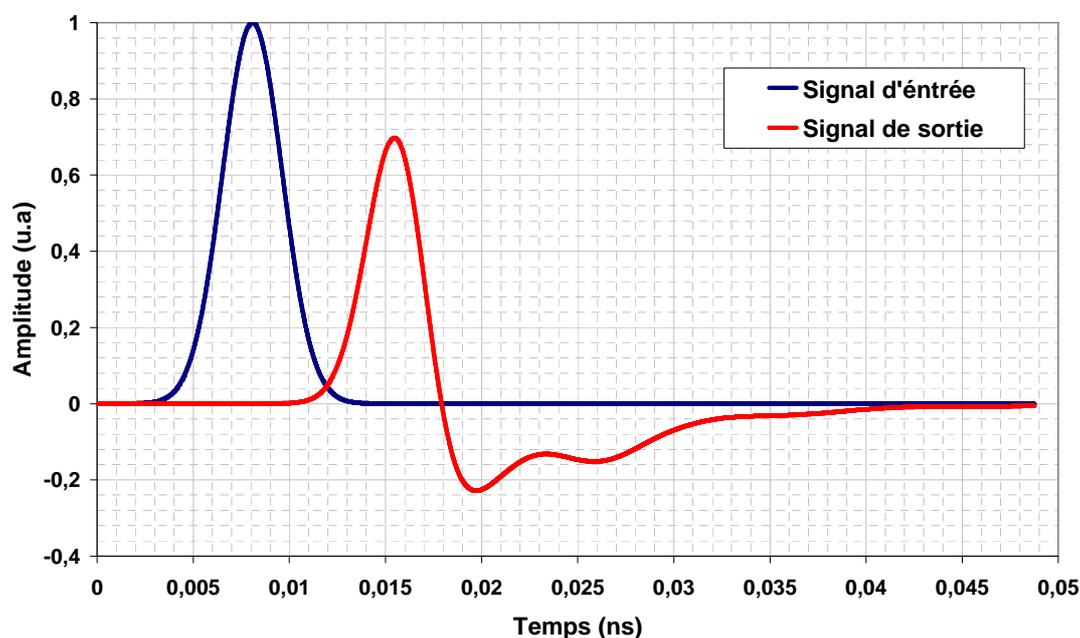


Figure 2. 34: Courbe temporelle du signal d'entrée et de sortie de la transition

Nous allons maintenant nous intéresser à la réponse dans le domaine des fréquences. On peut remarquer que le coefficient de transmission est relativement plat sur une grande bande de fréquence, avec une valeur de $S_{21} = -2,5\text{dB}$ à 180GHz. En revanche, il est difficile de dire que cette transition est bien adaptée car le coefficient de réflexion S_{11} n'est inférieur à -10dB que sur une bande de fréquences allant de 90 à 160GHz. En voyant ces résultats, on peut dire que l'excitation mérite d'être améliorée en termes d'efficacité.

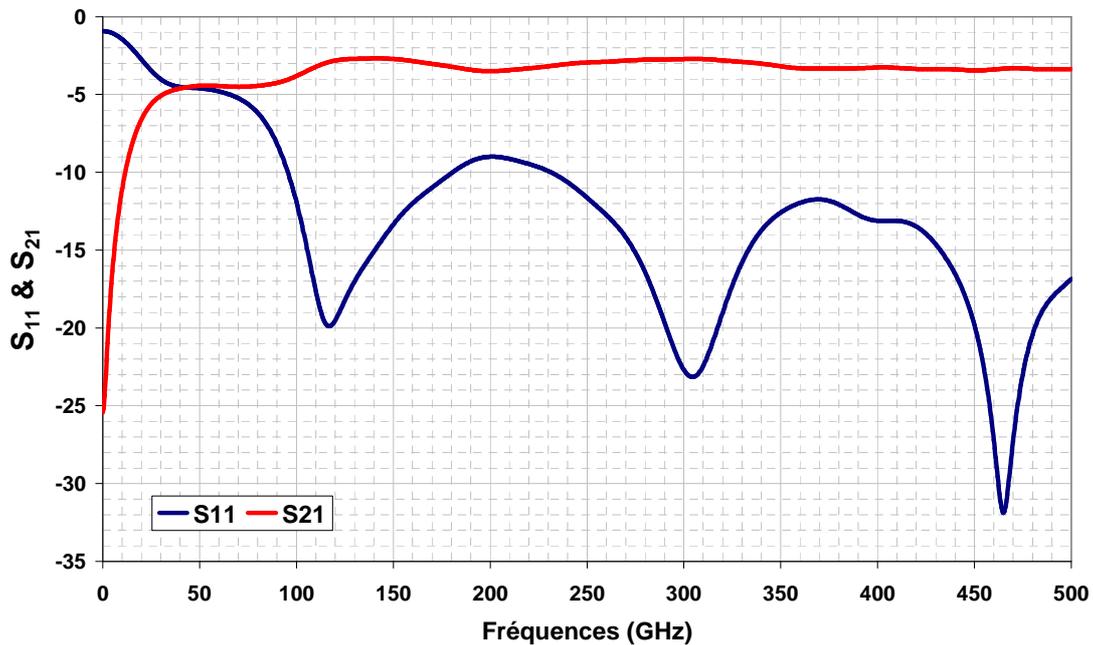


Figure 2. 35: Paramètre de transmission et de réflexion de la transition linéaire

III.4.3. Excitation planaire elliptique

Effectuons à présent la même étude pour l'excitation elliptique dont nous pouvons voir les grandeurs caractéristiques sur la Figure 2. 36 [2. 61]. Nous n'allons pas redétailler la partie coplanaire de cette transition car elle dispose des mêmes caractéristiques que pour l'excitation linéaire. Dans ce type de transition, nous n'allons plus éloigner les plans de masse coplanaire mais plutôt amincir le ruban pour l'amener progressivement à la taille de la ligne de Goubau.

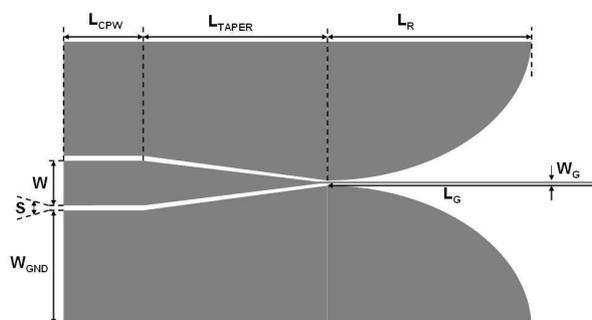


Figure 2. 36: Grandeurs caractéristiques de la transition elliptique

Les dimensions caractéristiques de cette transition sont données dans le Tableau 2. 2. Au niveau de l'accès coplanaire, nous avons aminci le ruban central jusque $W=5\mu\text{m}$ qui correspond à la largeur du fil à l'extrémité de la structure.

Paramètres	Dimensions	Désignations
W	60 μm	<i>Largeur du ruban central</i>
S	10 μm	<i>Gap coplanaire</i>
W_{GND}	200 μm	<i>Largeur des plans de masse</i>
L_{CPW}	200 μm	Longueur accès coplanaire
L_{TAPER}	400 μm	<i>Longueur du taper</i>
L_R	480 μm	<i>Longueur cône de sortie</i>
L_G	250 μm	<i>Longueur du fil</i>
W_G	5 μm	<i>Largeur du fil</i>

Tableau 2. 2: Dimensions de la transition elliptique

Comme dans l'excitation précédente, la longueur du taper L_{TAPER} est très importante. Nous avons défini celle-ci par simulation pour obtenir un bon facteur de transmission. Nous avons fixé cette dimension à $L_{\text{TAPER}}=600\mu\text{m}$. En ce qui concerne la dernière partie de la transition, nous nous sommes inspirés de l'antenne Vivaldi qui nous permet de lancer l'onde sur le fil. Cette longueur L_{R} a également été définie en simulation et nous avons obtenu une distance $L_{\text{R}}=400\mu\text{m}$. Nous avons simulé la structure et nous avons tracé la carte de champ électrique (Figure 2. 37).

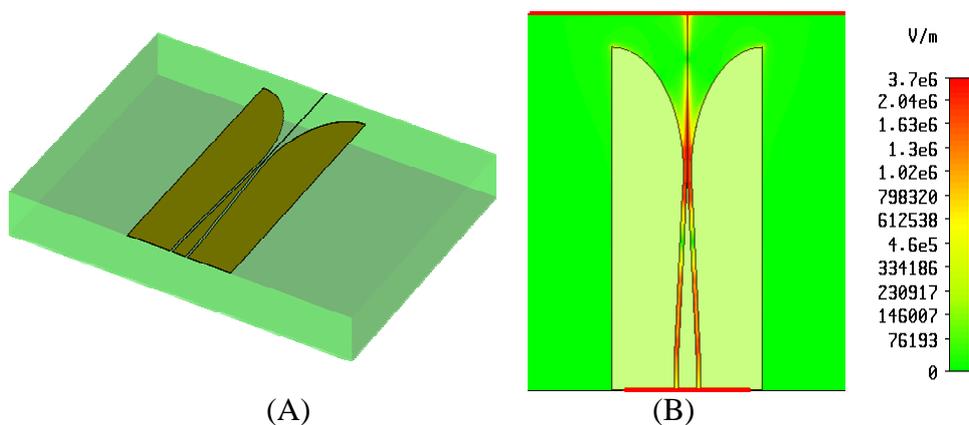


Figure 2. 37: A : Structure simulée, B champ électrique le long de l'excitation

Les courbes du signal d'entrée et de sortie dans le domaine temporel (Figure 2. 38) montrent une faible atténuation du signal de sortie par rapport au signal d'entrée. Nous obtenons une efficacité du même ordre de grandeur que celle de l'excitation linéaire que l'on peut chiffrer à 68%.

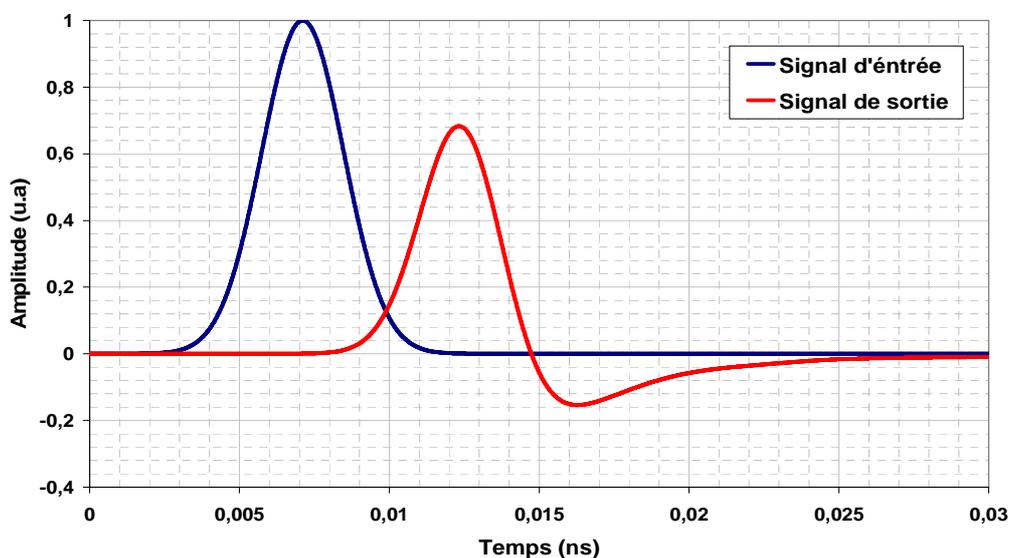


Figure 2. 38: Signal d'excitation et issu de la transition

En ce qui concerne l'aspect fréquentiel, on peut remarquer que cette transition est également large bande mais avec un meilleur niveau d'adaptation (Figure 2. 39).

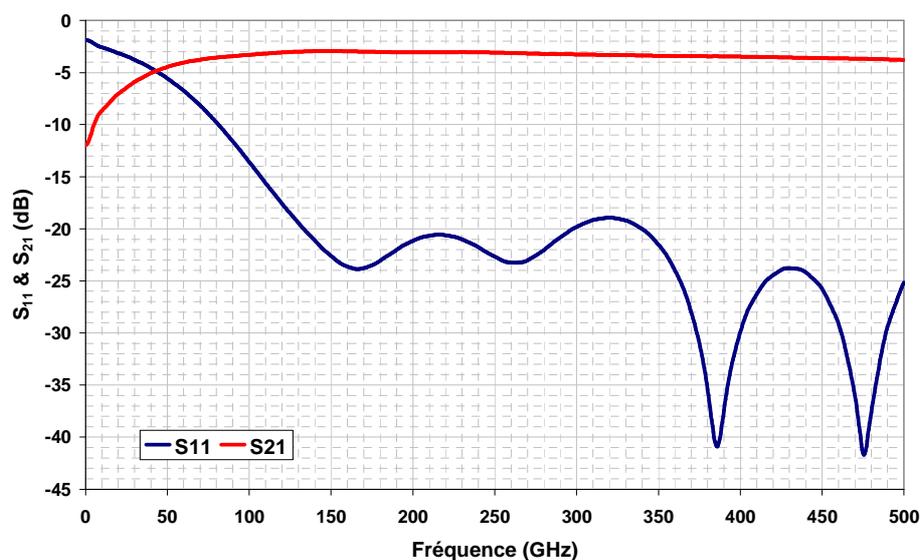


Figure 2.39 : Paramètre de transmission et de réflexion de la transition elliptique

Le coefficient de réflexion est inférieur à -10dB sur toute la bande de fréquence 0-220GHz. Le coefficient de transmission est de -2,5dB à 180GHz. Ce niveau de pertes est encore un peu élevé. Il est principalement dû au fait que nous avons des tapers réalisant une transition résistive. L'adaptation est sans doute de meilleure qualité que la précédente, mais le caractère résistif de cette transition dégrade les performances en transmission. Nous le voyons apparaître par un champ très élevé juste avant l'élargissement des plans de masse. Nous nous sommes donc orientés vers une troisième topologie de transition.

III.4.4. Nouvelle topologie

Comme nous avons pu le constater lors des études sur les deux types d'excitation coplanaire-goubau précédentes, les pertes d'insertion restent relativement élevées. Le niveau de ces pertes, sans être excessif compte tenu de l'application visée, est susceptible de dégrader la sensibilité des mesures THz. Nous nous sommes orientés vers une topologie où l'adaptation d'impédance est plus progressive. Nous avons travaillé en collaboration avec le groupe de recherche PolyGram de l'École Polytechnique de Montréal sur cette transition. Il s'agit d'une

transition qui combine les qualités des deux précédentes. Le schéma de principe de cette excitation est représenté sur la Figure 2. 40 ci-dessous.

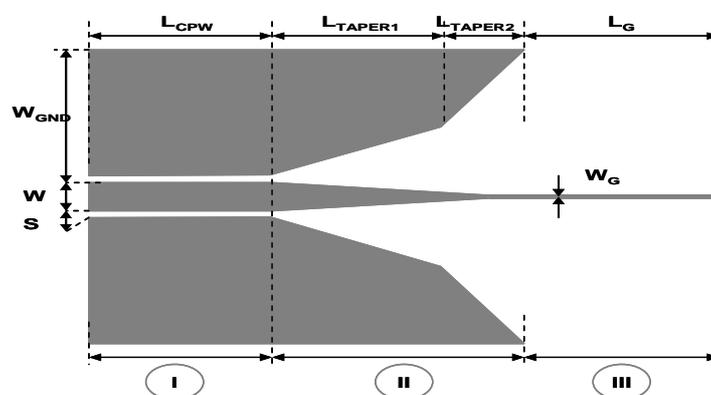


Figure 2. 40: paramètres dimensionnels de la transition

Comme toutes les autres, elle se compose également de trois parties, une partie coplanaire I, une partie transition II, et une partie filaire III. La partie coplanaire est soumise aux mêmes règles définies précédemment. La partie filaire est également identique à savoir un fil de longueur $L_G=250\mu\text{m}$ et une largeur de ruban de $W_G=5\mu\text{m}$. La partie transition II comporte deux taper L_{TAPER1} et L_{TAPER2} de longueur respective 600 et 400 μm . Nous avons reporté les dimensions caractéristiques dans le Tableau 2. 13.

Paramètres	Dimensions	Désignations
W	60 μm	<i>Largeur du ruban central</i>
S	10 μm	<i>Gap coplanaire</i>
W_{GND}	560 μm	<i>Largeur des plans de masse</i>
L_{CPW}	200 μm	Longueur accès coplanaire
L_{TAPER1}	600 μm	<i>Longueur du taper1</i>
L_{TAPER2}	400 μm	<i>Longueur du taper2</i>
L_G	250 μm	<i>Longueur du fil</i>
W_G	5 μm	<i>Largeur du fil</i>

Tableau 2. 3: Dimensions caractéristique de la transition

Nous avons tracé la carte de champs électrique (Figure 2. 41). On peut remarquer, comme pour les autres types d'excitations, que nous avons une bonne transformation du mode coplanaire en mode de propagation filaire.

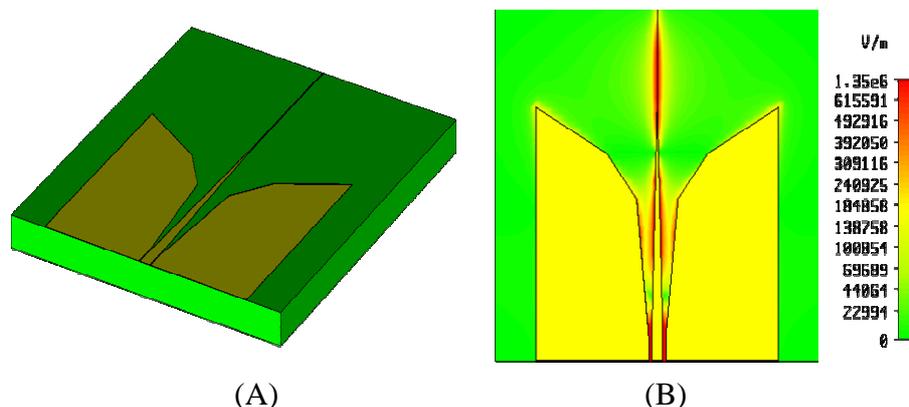


Figure 2. 41: (A) Structure simulée et (B) carte de champ électrique de la transition

Les courbes temporelles du signal d'entrée et de sortie de cette transition (Figure 2. 42) montrent une atténuation nettement moins importante que les précédentes. On peut estimer l'efficacité de cette transition à près de 75% de conversion de mode.

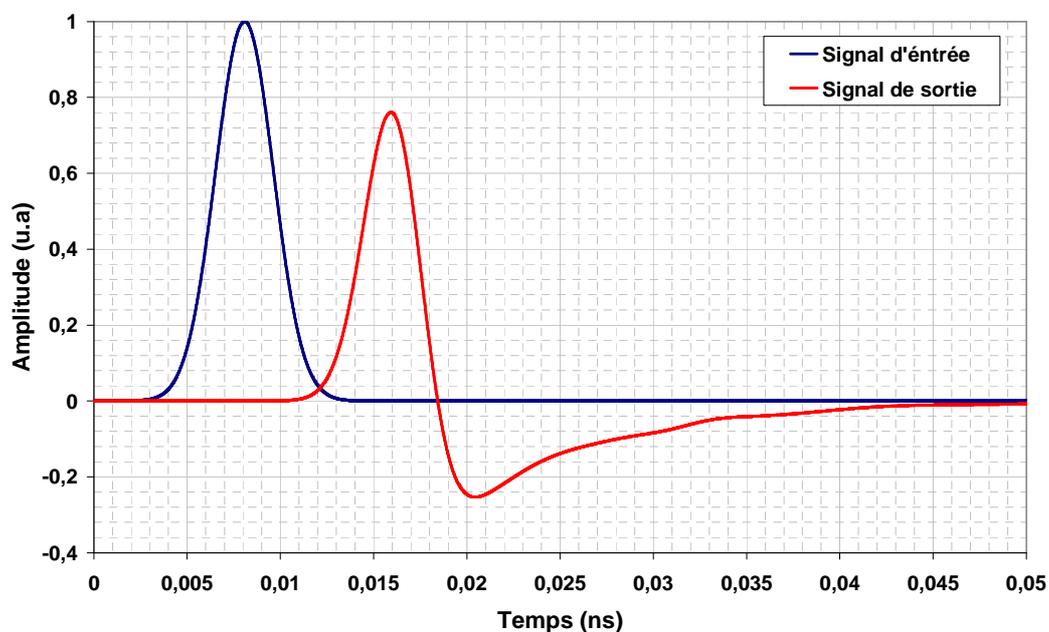


Figure 2. 42: Courbe temporelle du signal d'entrée et de sortie de la transition

On peut maintenant analyser les paramètres de transmission et de réflexion de cette transition (Figure 2. 43). Le coefficient de transmission incluant une transition et le transport de l'onde sur $250\mu\text{m}$ est de l'ordre de 0,5dB à 180GHz. C'est un niveau de pertes très bas compte tenu de la fréquence de travail avec un coefficient de réflexion inférieur à -10dB.

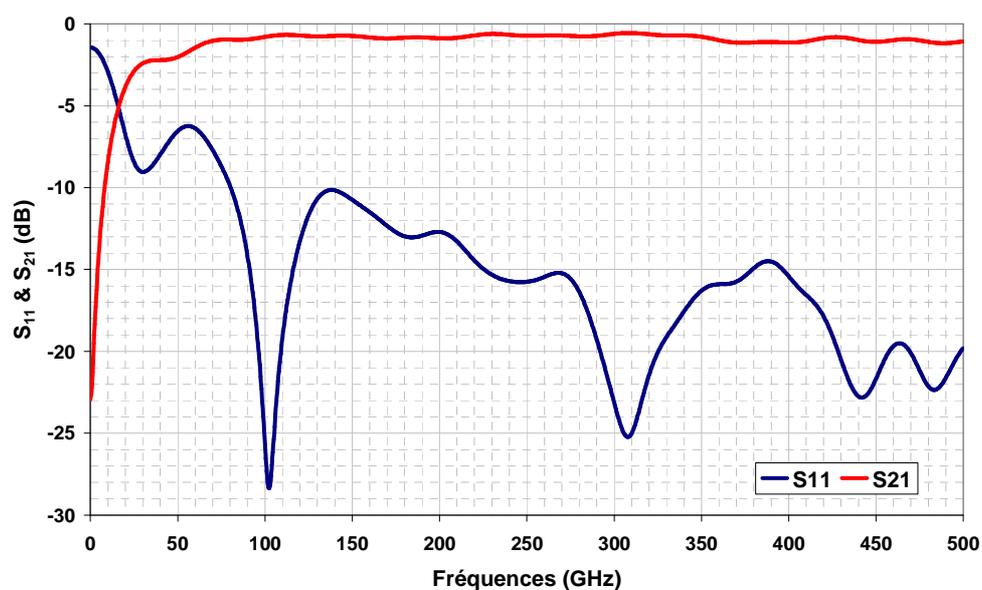


Figure 2. 43: Paramètres de transmission et de réflexion en fonction de la fréquence

III.4.5. Réalisations et mesures

Nous avons réalisé ces trois types de transitions pour vérifier celle qui répond le mieux à nos attentes. Pour vérifier cela nous avons réalisé une structure composée de deux transitions coplanaire-goubau tête bêche, relié par un fil de $5\mu\text{m}$ de largeur sur $1500\mu\text{m}$ de longueur. Les structures de propagation ont été réalisées sur un substrat de quartz avec une métallisation de titane et d'or d'épaisseur respectivement de 500 et 4500\AA . Ces lignes ont été réalisées en évaporation par procédé lift-off (Figure 2. 44).

Les mesures hyperfréquences sont effectuées à l'aide d'un analyseur de réseau vectoriel 8510XF d'Agilent dans la bande 0,45-110GHz et à l'aide d'un Anritsu 37147C associé à des multiplieurs de fréquence, de référence V05VNA2-T/R d'OML (Oleson Microwave

Laboratories), pour travailler dans la bande 140-220 GHz. Les mesures sont effectuées sous pointes coplanaires espacées de 150 μ m pour le XF et 50 μ m pour le banc 140-220GHz. Pour la calibration des mesures, nous utilisons une calibration standard LRM (line-Reflect-Match) à l'aide d'un kit de Cascade Microtech pour le banc XF et CS15 de Picroprobe pour le banc 140-220GHz.

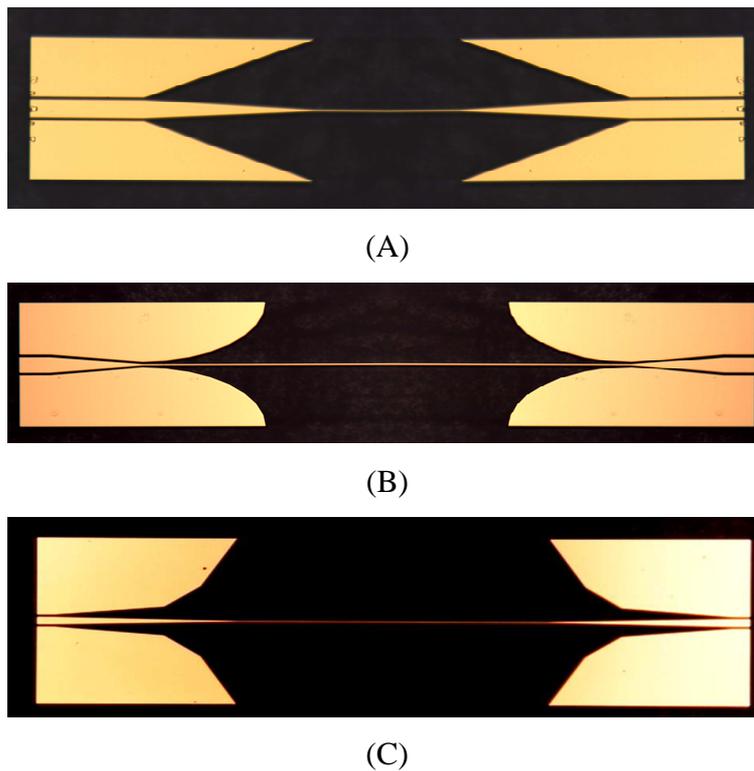


Figure 2. 44 : Illustration des structures réalisées sur substrat de quartz avec les diverses types d'excitation, A : Excitation linéaire, B : Excitation elliptique, C : Nouvelle topologie.

Nous obtenons les résultats suivants :

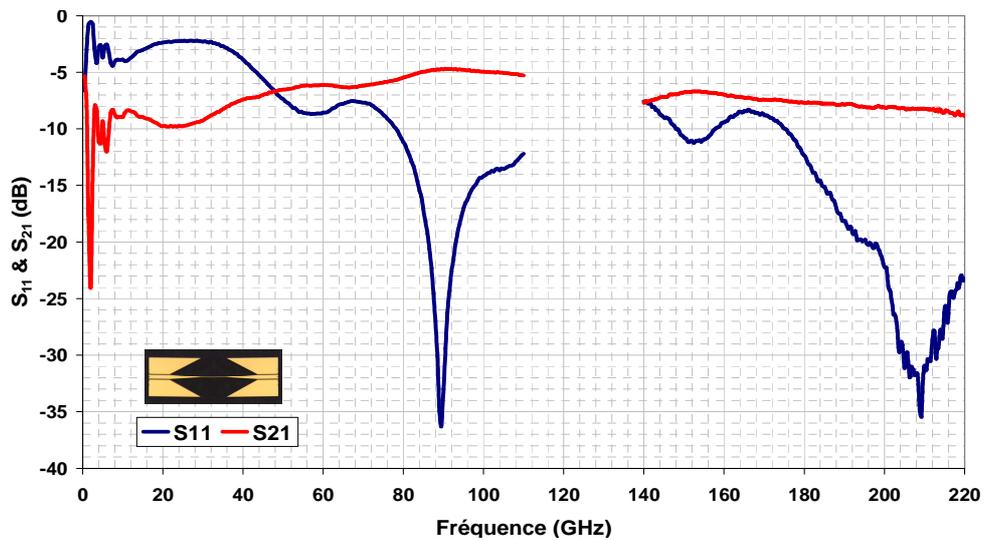


Figure 2. 45: Paramètres de transmission et de réflexion de la transition linéaire

Pour la transition linéaire, nous pouvons remarquer un niveau de pertes relativement correct de l'ordre de -7,5dB à 180GHz. Mais nous avons un coefficient d'adaptation supérieur à -10 dB sur une grande plage de fréquences ce qui signifie qu'une assez grande partie de l'onde est réfléchié et donc ne se propage pas le long du guide d'onde. Ces résultats nous montrent bien que l'excitation linéaire n'est pas suffisante pour obtenir une bonne excitation du mode de Goubau planaire.

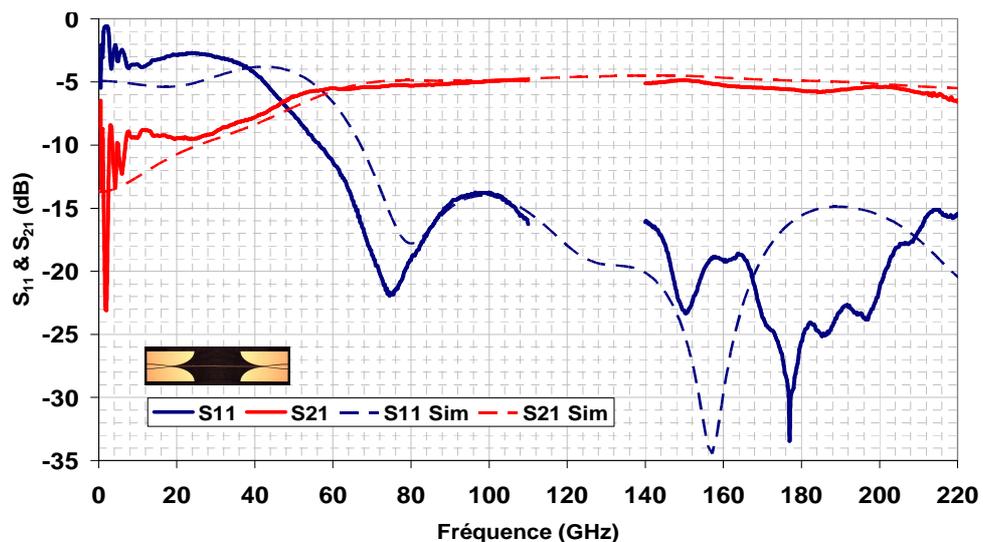


Figure 2. 46: Paramètres de transmission et de réflexion de la transition elliptique

En ce qui concerne l'excitation elliptique, nous avons réalisé le même type de structure et nous obtenons les résultats présentés sur la Figure 2. 46. Nous pouvons remarquer que le niveau de pertes de transmission est relativement identique à celui de l'excitation précédente. Par contre elle est beaucoup plus large bande. En effet nous avons un niveau de pertes de l'ordre de -5,5dB à 180GHz sur une plage de fréquences allant de 60GHz à plus de 220 GHz, ce qui nous donne donc une bande passante de plus de 160GHz avec ce type d'excitation. De plus nous pouvons remarquer que le coefficient de réflexion est nettement amélioré, avec un niveau inférieur à -10dB sur toute la bande passante. Nous pouvons remarquer également un bon accord entre la simulation effectuée sous CST MWS et la mesure. Cette transition est adéquate pour exciter un mode de propagation filaire en topologie Goubau planaire. Néanmoins, le niveau de pertes reste encore relativement élevé.

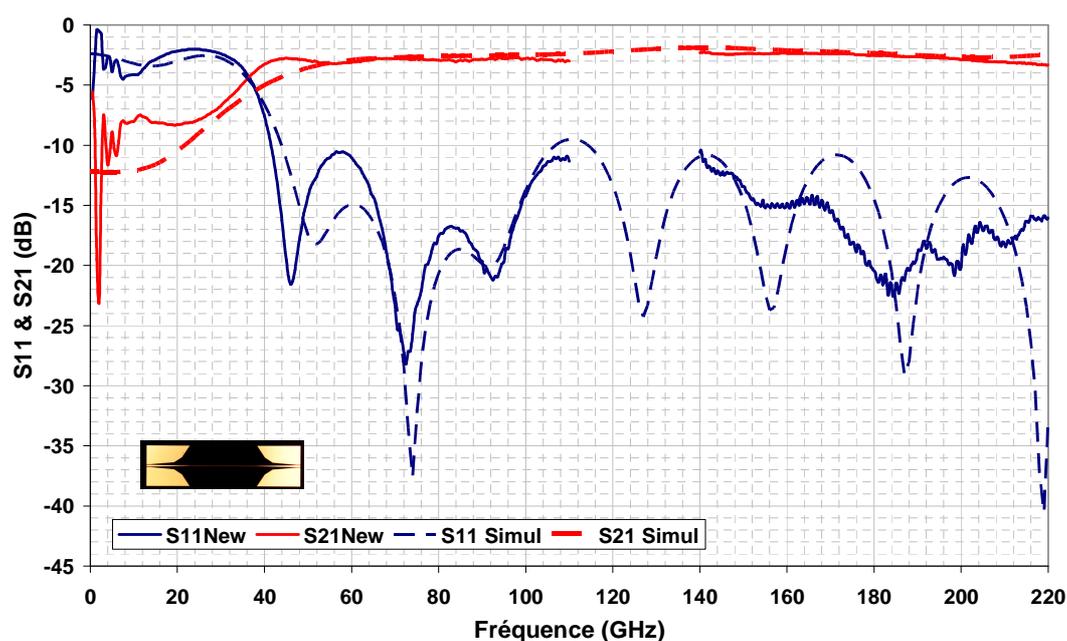


Figure 2. 47: Paramètres de transmission et de réflexion de la nouvelle transition

Regardons à présent les paramètres de transmission et de réflexion pour la nouvelle topologie de transition (Figure 2. 47). En ce qui concerne le paramètre de réflexion, on peut remarquer qu'il est inférieur à -10dB sur une large bande de fréquence. Par contre pour le paramètre de transmission, on peut remarquer que l'on a gagné un facteur deux avec un niveau de pertes de

l'ordre de -2,5dB à 180GHz. Nous pouvons également remarquer un bon accord entre mesure et simulation pour ce type de structure. Nous pouvons conclure au vu de ces résultats que cette dernière transition est la plus efficace pour pouvoir exciter le mode de propagation de Goubau en topologie planaire. C'est donc cette transition que nous utiliserons dans la suite de notre travail.

III.5. Mode de Goubau en topologie planaire

III.5.1. Influence de la forme de la section

Nous avons réalisé des simulations électromagnétiques sous MWS pour voir la conformation des champs autour du fil (Figure 2. 48). Nous avons étudié différentes topologies de guide, pour vérifier au cours des transformations du ruban les effets sur le champ électromagnétique : fils de section cylindrique ou carré avec ou sans diélectrique.

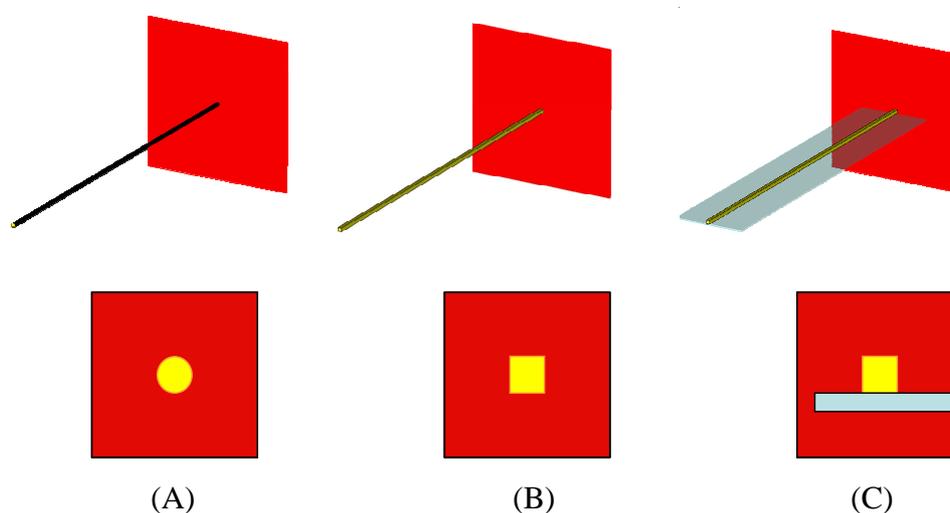


Figure 2. 48 : Illustration des différentes topologies possibles de propagation filaire, A : Ligne de Goubau de section cylindrique, B : ligne de Goubau de section carré, C : ligne de Goubau en topologie planaire.

Cette étude est un préalable à la réduction de la section des fils de Goubau. Nous avons donc simulé un fil cylindrique de diamètre $50\mu\text{m}$, un fil carré de même côté et le même fil sur un substrat de quartz de permittivité $\epsilon_r=4,6$ de $200\mu\text{m}$ d'épaisseur. Nous avons tracé les cartes de champs électriques pour ces différentes topologies de propagation filaire (Figure 2. 49).

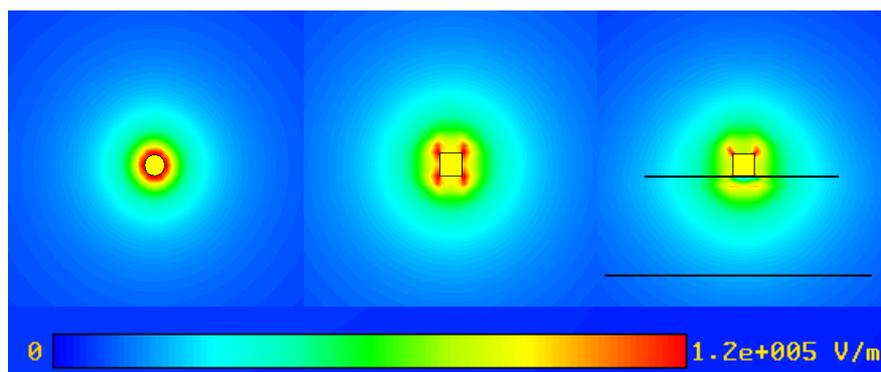


Figure 2. 49: Illustration des cartes de champ électrique pour les différentes conformations du ruban.

Nous pouvons remarquer que sur une configuration de section cylindrique, nous avons une répartition du champ électrique uniforme, ce qui correspond bien à un mode de Sommerfeld comme décrit dans la littérature. Sur la configuration en un ruban carré, on peut remarquer sur la carte de champs des pics d'intensité du champ au niveau des arrêtes du ruban, correspondant à une accumulation de charge. Néanmoins nous gardons toujours une bonne conformation du champ électrique autour du ruban. Enfin si l'on vient disposer notre ruban sur un substrat diélectrique, on peut remarquer qu'une partie du champ entre en interaction avec le substrat, avec une redistribution de son intensité.

Si on compare ces différentes topologies de propagation filaire en termes de coefficient d'atténuation (Figure 2. 50), on peut voir une très faible différence entre le ruban cylindrique et le ruban carré. La différence est due au rayonnement du champ causé par les arrêtes.

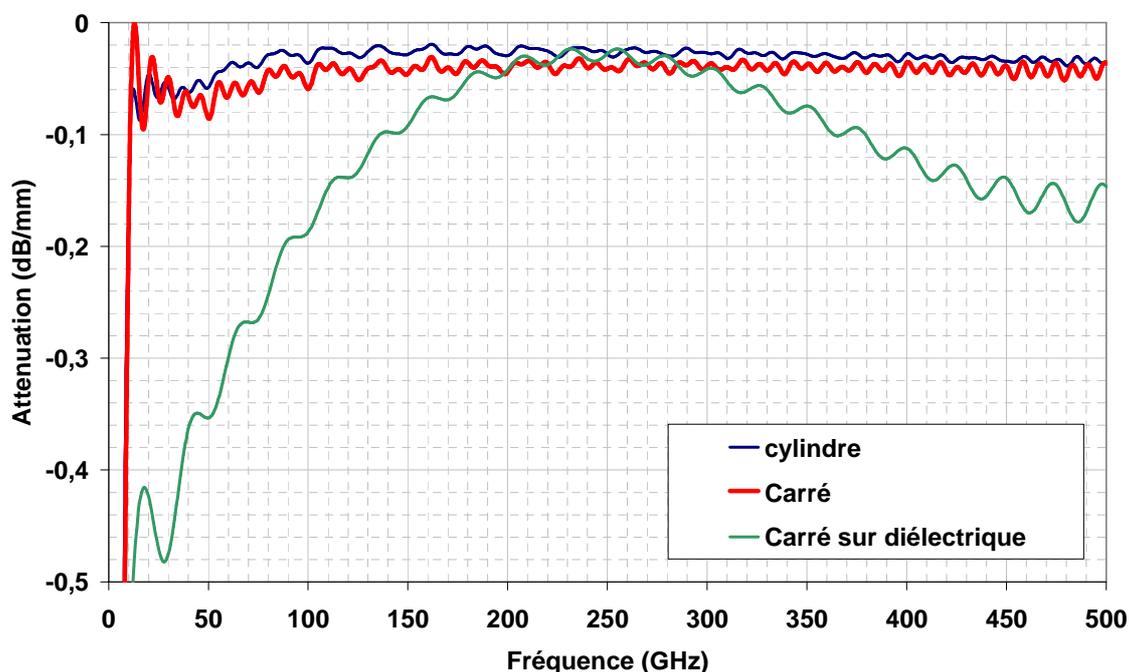


Figure 2. 50: Paramètres de transmission pour les différentes conformations du ruban.

Si l'on chiffre un peu les valeurs, on obtient un coefficient d'atténuation de 0,03dB/mm pour un fil cylindrique, qui correspond à l'étude réalisée par Watcher et al [2. 44]. Nous obtenons un coefficient d'atténuation de 0,05dB/mm pour un ruban carré. Ces valeurs nous permettent de dire que nous avons un niveau de pertes équivalent pour ces deux topologies de ligne, ce qui permet de poursuivre notre étude dans de bonnes conditions. En ce qui concerne la propagation sur substrat diélectrique, on peut voir son influence sur le coefficient d'atténuation due à l'apparition des pertes diélectriques. Nous pouvons voir que dans la bande de fréquence comprise entre 200 et 300GHz, les pertes sont équivalentes aux autres topologies. L'atténuation en plus hautes fréquences sera détaillée dans la suite de ce chapitre ; il s'agit de pertes dues aux modes de substrat. Cette étude de topologie a des dimensions très grandes par rapport à celles que nous allons investiguer par la suite. Ceci nous permet de dire que la propagation filaire sur un substrat diélectrique est possible avec un niveau de pertes équivalent, à la différence près que nous devons tenir compte des pertes diélectriques et de l'épaisseur du substrat.

III.5.2. Influence du substrat diélectrique

III.5.2.1. Etude en permittivité

Intéressons nous maintenant à la propagation électromagnétique d'un fil de Goubau en topologie planaire sur un substrat diélectrique et voyons l'influence de sa permittivité sur la propagation. Nous mettons une ligne de Goubau de $1\mu\text{m}$ de hauteur sur $5\mu\text{m}$ de largeur sur un substrat diélectrique. Comme nous l'avons vu la propagation du mode de Goubau s'effectue en espace libre. Comme nous travaillons sur substrat diélectrique, sa permittivité va jouer un rôle important dans la propagation de l'onde. Nous avons simulé ce fil sur un substrat dont nous avons fait varier la permittivité de $\epsilon_R=2$ à $\epsilon_R=10$ qui correspond à l'ordre de grandeur des permittivités des différents matériaux utilisés en microélectronique (Figure 2. 51). C'est pour cela qu'il est préférable de travailler avec des permittivités basses, c'est-à-dire le plus proche possible de l'air.

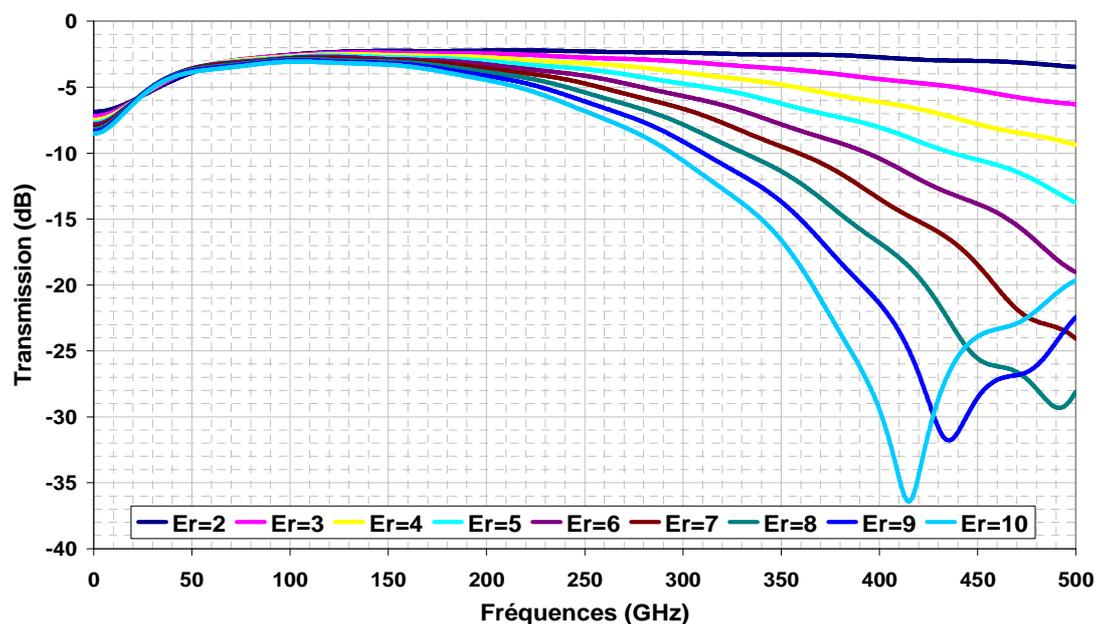


Figure 2. 51: Paramètre de transmission pour différentes permittivité du substrat.

Lorsque l'on regarde l'évolution de la transmission on remarque une augmentation des pertes autour de 150GHz en fonction de la permittivité du substrat. Comme nous l'avons remarqué précédemment, le champ électromagnétique est bien confiné autour du ruban et pénètre autant

dans le substrat que dans l'air. Cette augmentation des pertes découle vraisemblablement des pertes causées par l'apparition de modes de substrat (Figure 2. 52).

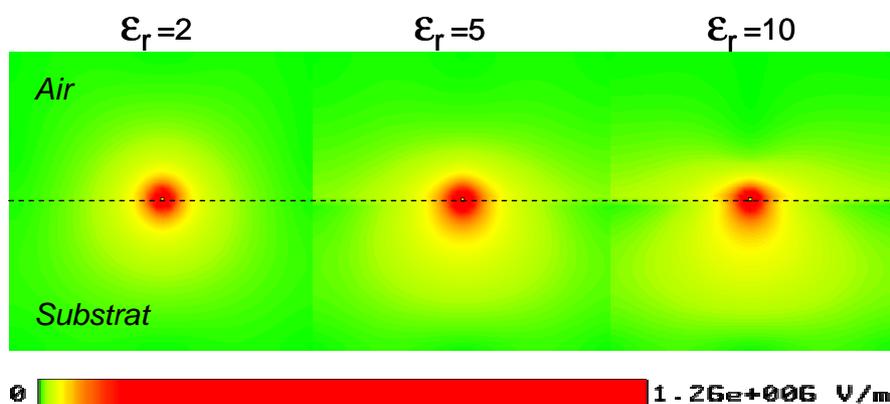


Figure 2. 52: Carte de champ électrique pour différentes permittivités du substrat diélectrique sous la ligne pour un substrat de 500µm de hauteur.

En effet les matériaux à forte permittivité ont la particularité de confiner les lignes de champs électromagnétiques. Elles ont donc plus d'interaction avec le substrat, et la présence des pertes diélectriques devient prédominante par rapport aux pertes conductrices. On remarque bien sur les cartes de champs présentées sur la Figure 2. 52 que pour une ligne sur un substrat de permittivité faible ($\epsilon_r=2$), les lignes de champs sont aussi bien réparties dans l'air que dans le matériau. Au contraire, si l'on regarde la carte de champ pour $\epsilon_r=10$, le champ électrique est plus concentré dans le substrat que dans l'air. Si l'on trace l'évolution du champ électrique en fonction de la distance autour du fil, comme présenté sur la Figure 2. 53, on voit bien cette influence du diélectrique. On peut voir un meilleur confinement du champ pour les basses permittivités.

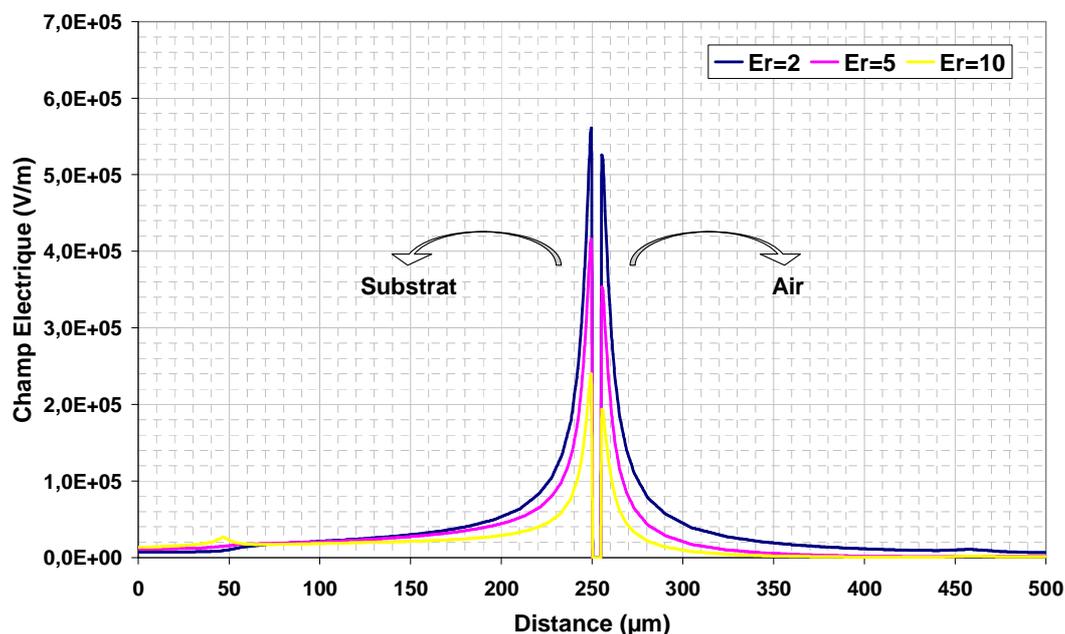


Figure 2. 53 : Extension du champ électrique autour d'un ruban de 5µm de large pour différentes permittivités du substrat diélectrique.

On peut remarquer que pour une permittivité de 2, la longueur de pénétration du champ est de 6,24µm à mi-hauteur également réparti dans l'air et dans le diélectrique. Au contraire, pour la permittivité de 10, le champ pénètre de 5µm dans l'air et de 6,75µm dans le diélectrique.

III.5.2.2. Etude des modes de substrat

Voyons à présent l'évolution en fonction de la fréquence d'un dernier paramètre, qui est la hauteur du substrat sur lequel la ligne métallique est déposée. Pour effectuer cette étude, nous avons pris un substrat diélectrique de permittivité $\epsilon_R=2$ sur lequel est déposé un ruban d'or de 5µm de largeur pour se placer dans de bonnes conditions de propagation. On peut remarquer que les courbes de transmission pour différentes hauteurs de substrat (Figure 2. 54) se dégradent à cause des pertes en plus haute fréquence. Elles sont principalement dues à l'excitation de modes de substrat par notre ligne.

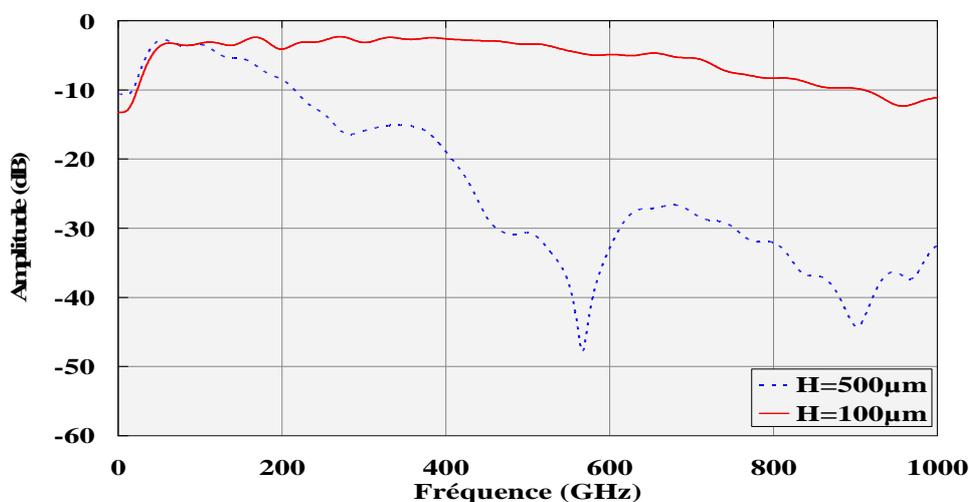


Figure 2. 54 : Paramètre de transmission mettant en évidence l'apparition de mode de substrat en fonction de l'épaisseur de celui-ci.

Les modes de substrat ont la possibilité d'être excités quelle que soit la technologie choisie. La structure microruban est la topologie qui réduit le plus ces effets néfastes. Nous avons vu que la ligne coplanaire excite facilement ces modes par un choix judicieux des largeurs des plans de masse. Pour la topologie Goubau, l'extension du champ autour du fil permet de les exciter sans un réel moyen de les contenir. En effet, la réalisation d'une ligne monomodale impose l'utilisation d'un substrat épais mais favorisant l'apparition des modes de substrat: un compromis doit donc être recherché lors de l'utilisation de ces lignes dans le domaine millimétrique et submillimétrique (Figure 2. 55). En effet, pour un type de substrat choisi, le choix de son épaisseur n'est fonction que de son influence sur la fréquence de coupure des modes de substrat (ainsi que des modes d'ordre supérieur). La réduction de l'épaisseur du substrat permet d'augmenter la fréquence d'apparition de ces modes, et donc de réaliser des lignes de Goubau à très large bande. Nous pouvons le voir sur la figure 2. 54 qu'un substrat de 100µm d'épaisseur présente nettement moins de pertes qu'un substrat de 500µm. On peut remarquer une augmentation importante des pertes à partir de 150GHz parcequ'une partie de l'onde se propage dans le substrat. Nous travaillerons donc par la suite sur membrane diélectrique.

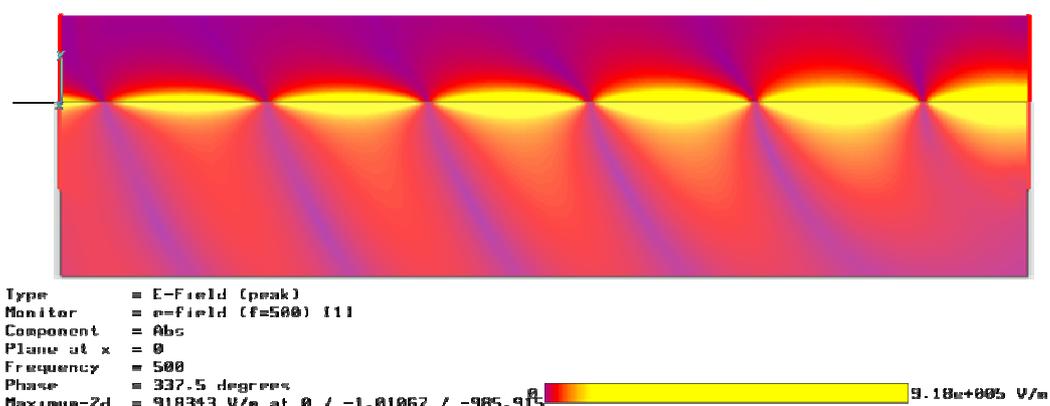


Figure 2. 55 : Illustration du mode de substrat à une fréquence de 500GHz pour un diélectrique $\epsilon_R=2,65$ de 500 μm d'épaisseur.

Un des atouts majeurs de la montée en fréquence dans l'utilisation de la ligne de Goubau est que l'extension spatiale autour du fil diminue avec la montée en fréquence. Le champ électromagnétique est de plus en plus confiné autour du fil comme nous le montre l'évolution du champ électrique en fonction de la fréquence présentées sur la Figure 2. 56.

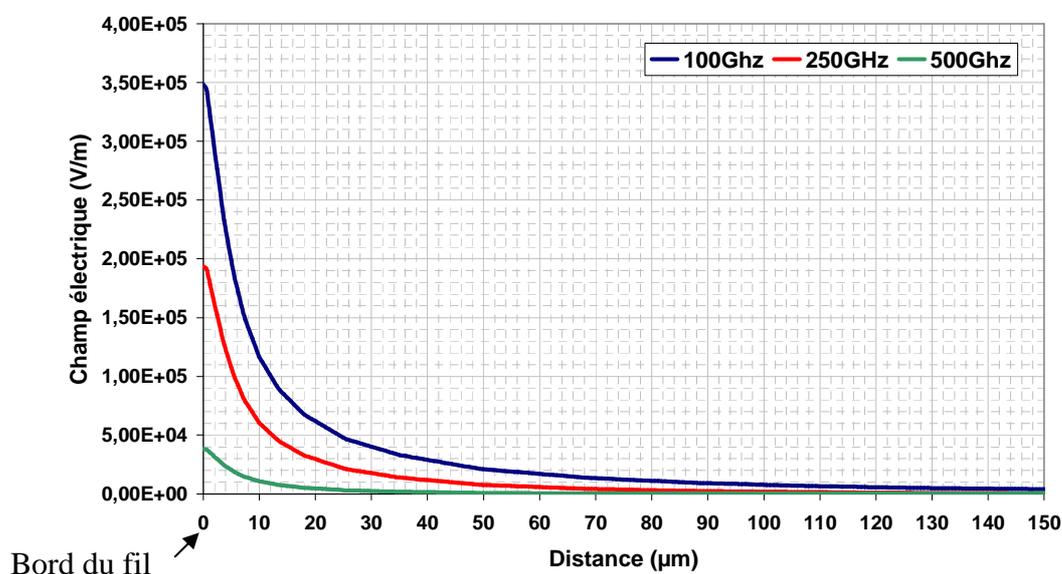


Figure 2. 56 : Extension du champ électrique autour d'un ruban de 5 μm de large pour différentes fréquences

III.6. Propagation sur fils nanométriques

III.6.1. Influence de la section et résolution spatiale

Dans la littérature, les études sur la propagation filaire en topologie planaire se font sur des fils de grande section. Voyons ce qui se passe si l'on réduit fortement la taille du fil sur les paramètres de transmission et sur l'extension du champ électromagnétique. L'évolution fréquentielle de la transmission d'une ligne de différentes largeurs de ruban est présentée Figure 2. 57. Nous avons simulé notre structure sur un substrat de faible permittivité et nous faisons varier la largeur de notre ruban de 5 à 60 μm .

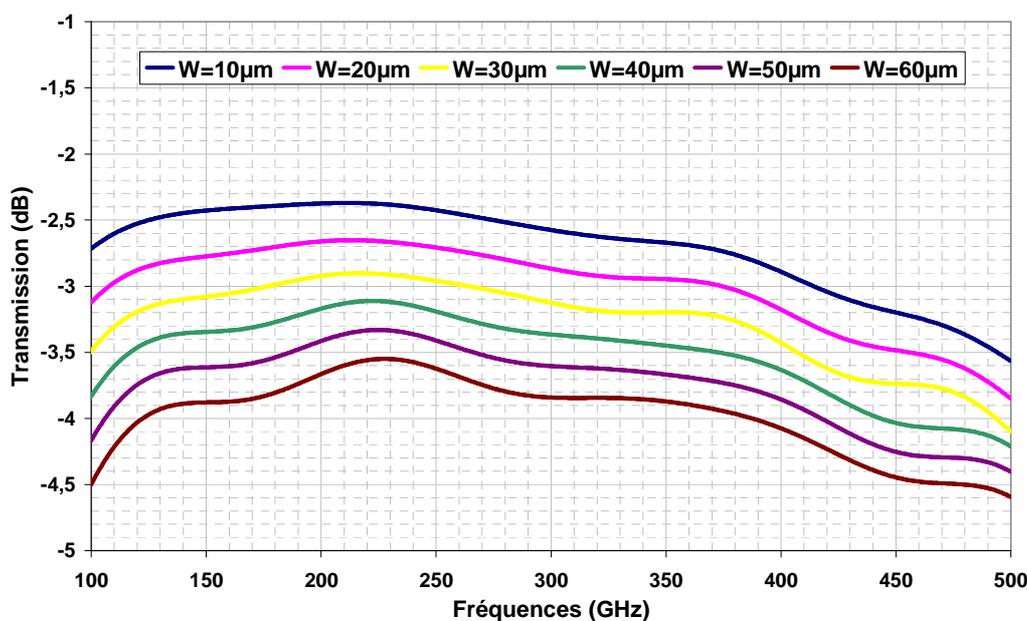


Figure 2. 57: Paramètre de transmission pour différentes largeur de ruban.

Un fait marquant lorsque l'on regarde ces courbes est que plus la largeur du ruban diminue, plus le niveau de transmission augmente. La diminution des pertes peut être expliquée par l'hypothèse suivante. Comme le champ électromagnétique est confiné autour du ruban, l'augmentation de sa taille confine de moins en moins les lignes de champs. Elles tendent alors plutôt à rayonner. De ce fait une partie de l'énergie est perdue par les pertes radiatives.

Nous montrons sur la figure 2. 58, l'évolution du champ électrique en fonction de la distance pour les différentes largeurs du ruban. On remarque que plus le ruban est étroit, plus le champ est confiné.

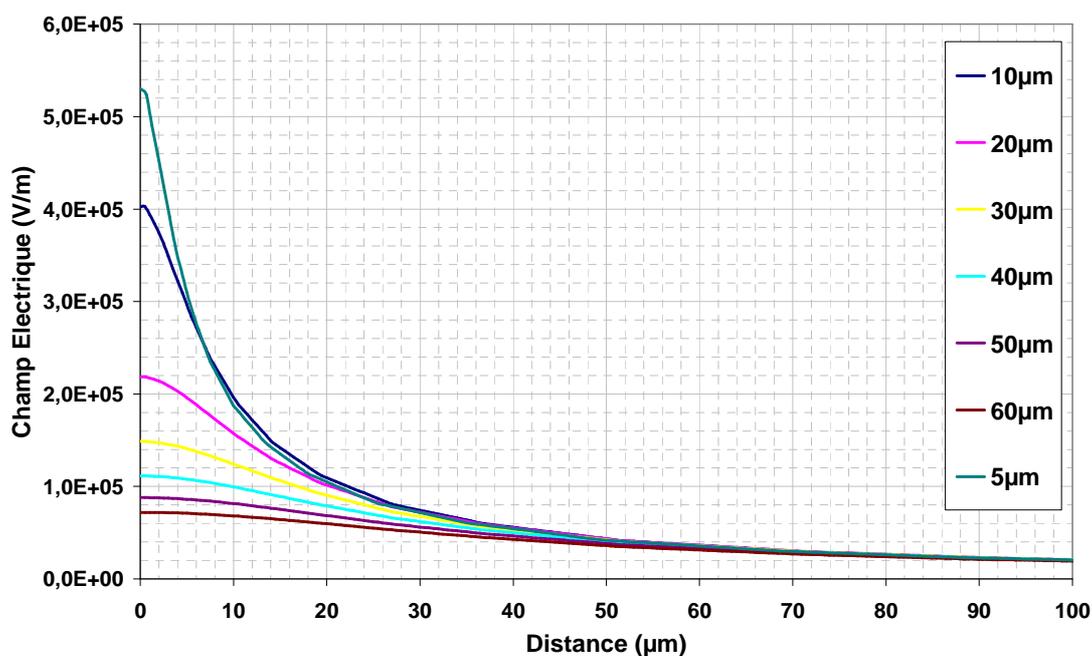


Figure 2. 58: Extension du champ électrique en fonction de la distance autour du fil pour différentes largeurs de ruban.

On peut tracer l'évolution de l'extension du champ électrique à mi-hauteur en fonction de la taille du fil (Figure 2. 59). Pour un ruban de 5 μm, l'extension du champ est de 6,24 μm de part et d'autre du conducteur et pour un ruban de 60 μm l'extension est de 49,5 μm de part et d'autre du conducteur.

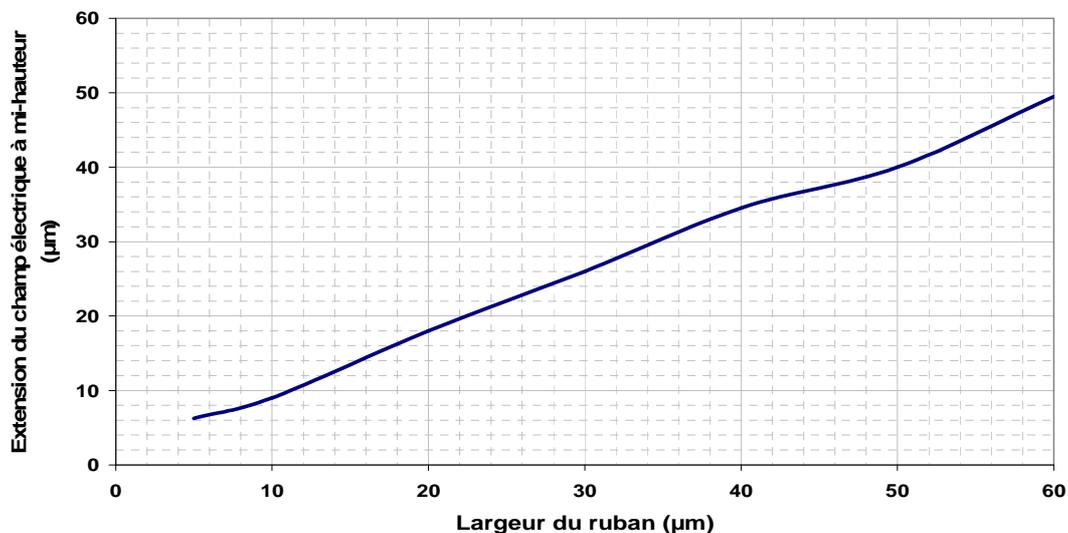


Figure 2. 59 : Evolution de l'extension spatiale du champ électrique autour du fil en fonction de la taille de celui-ci.

Après avoir étudié les différents paramètres en simulation, nous avons voulu les conforter par des mesures. Pour cela nous avons réalisé des lignes avec des rubans centraux de différentes largeurs variant de $5\mu\text{m}$ à $60\mu\text{m}$. Nous pouvons voir une illustration des réalisations sur la Figure 2. 60:

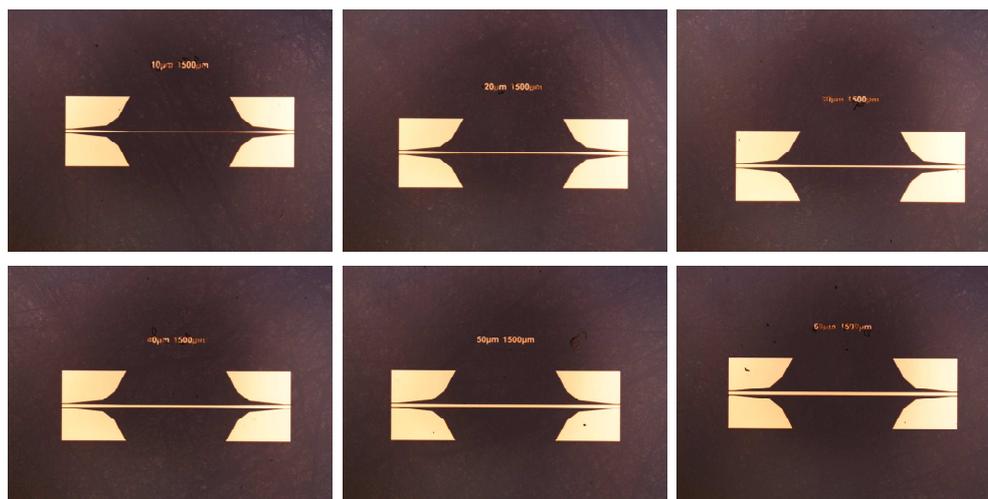


Figure 2. 60 : Illustration de réalisations de lignes de Goubau de différentes largeurs allant de $5\mu\text{m}$ à $60\mu\text{m}$ de largeur.

Les lignes ont été réalisées sur un substrat de quartz de $500\mu\text{m}$ d'épaisseur avec des métallisations titane/or de $500/4500\text{\AA}$ d'épaisseur respectivement. Nous avons mesuré toutes ces structures dans la bande de fréquence 0-220GHz (Figure 2. 61).

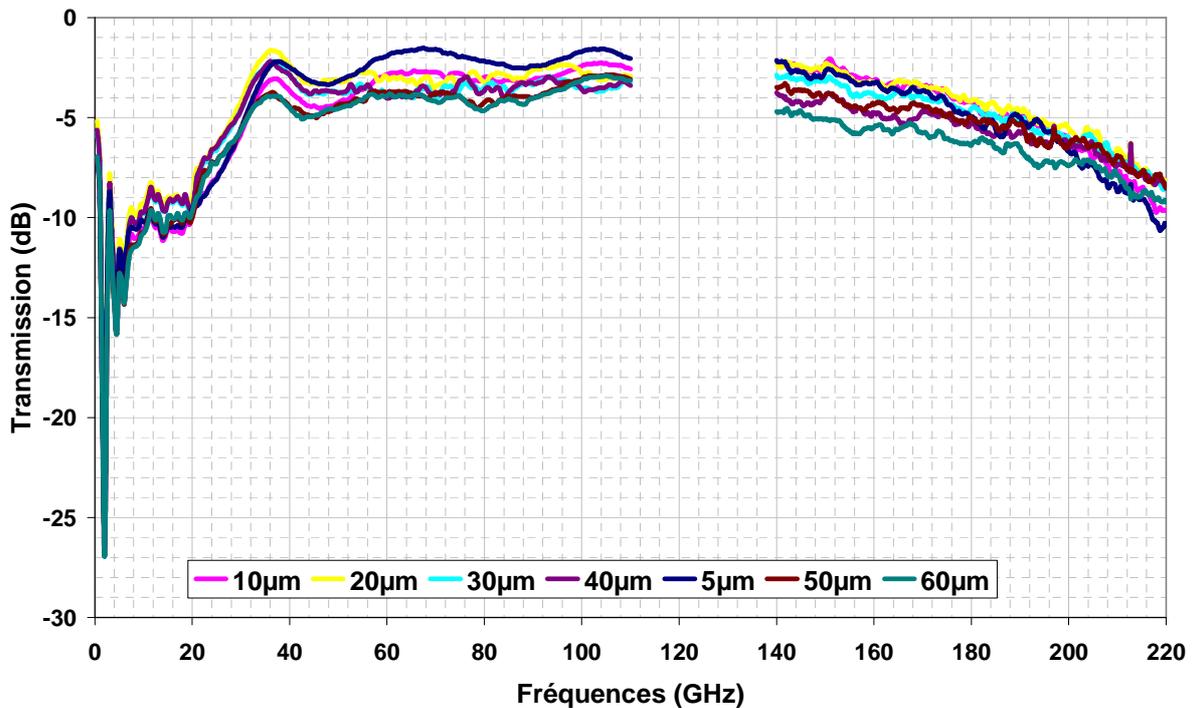


Figure 2. 61 : Paramètre de transmission d'une structure constituée de deux excitations tête bêche avec différentes largeurs de ruban.

Nous pouvons remarquer l'influence des modes de substrat dans la bande 140-220GHz due à l'épaisseur du diélectrique. On peut remarquer que la tendance est confirmée dans la bande 30-200GHz. Ces résultats de mesures nous confortent dans notre approche et nécessitent de nouvelles réalisations.

III.6.2. Propagation avec des tailles nanométriques

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, le mode de Goubau présente des caractéristiques très intéressantes, notamment au niveau de son extension spatiale et également au niveau des pertes de transmission. C'est en raison de toutes ces caractéristiques intéressantes que nous avons poussé notre étude vers des fils de tailles nanométriques. L'objectif principal de notre étude est la réduction de l'extension spatiale autour du fil de Goubau pour accroître sa sensibilité aux variations de permittivité. Nous avons donc suivi la même étude que précédemment avec des résolutions de l'ordre du nanomètre [2. 62].

Comme nous l'avons vu, les paramètres importants pour une bonne propagation électromagnétique sont les caractéristiques du substrat. Nous avons vu qu'il est préférable de travailler avec des matériaux diélectriques de faibles permittivités et de faibles épaisseurs. Nous simulerons dorénavant nos structures sur des membranes de $20\mu\text{m}$ de BCB dont la permittivité réelle est 2,65. L'avantage de travailler avec des fils aussi fins est d'être du même ordre de grandeur que les entités biologiques que l'on souhaite investiguer. Si l'on regarde les cartes de champ électrique en fonction de la largeur du ruban (Figure 2. 62), on peut remarquer que nous avons un comportement similaire avec des fils de taille nanométrique, à savoir le maintien du confinement du champ électrique.

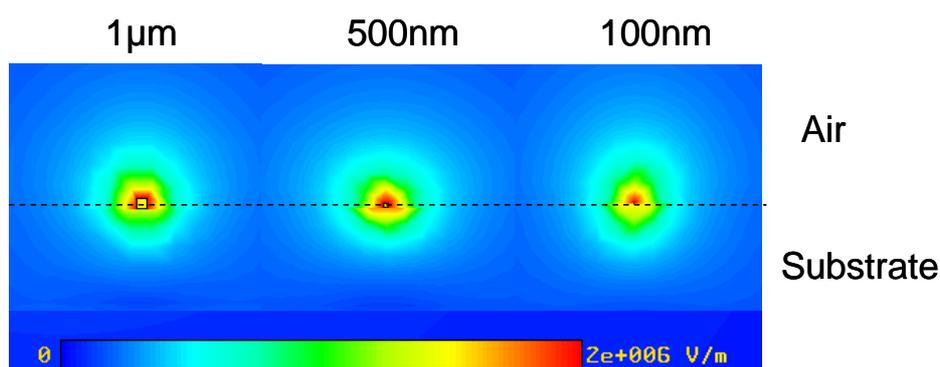


Figure 2. 62: Champ électrique autour du ruban pour différentes largeurs de fil de $1\mu\text{m}$ à 100nm .

Si l'on trace l'évolution du champ électrique en fonction de la distance autour du fil, on peut voir que l'extension est en relation à la taille du fil. Par exemple, on obtient 875nm pour un ruban de 100nm contre 1,79 μ m pour un ruban de 1 μ m pour des amplitudes de champ à mi-hauteur (Figure 2. 63).

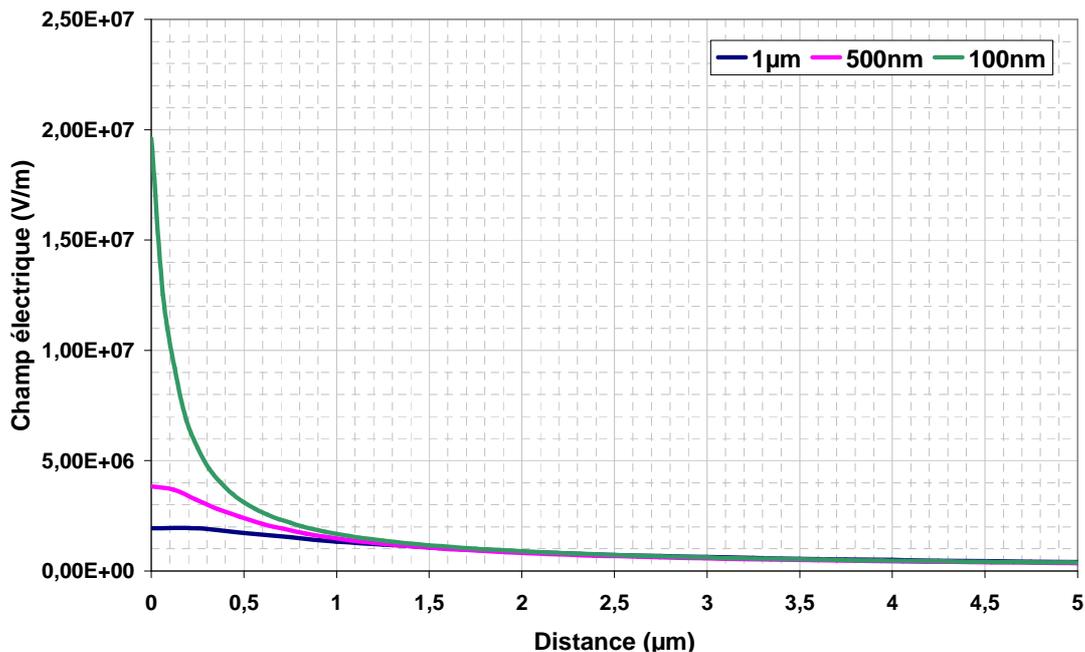


Figure 2. 63: Extension du champ électrique pour différentes largeurs de ruban nanométriques

Nous avons tracé l'évolution fréquentielle de la transmission de lignes de différentes largeurs de ruban allant de 1 μ m à 100nm pour une longueur de 500 μ m, sur un substrat de BCB de 20 μ m d'épaisseur. Nous obtenons les résultats présentés sur la Figure 2. 64. L'observation de ces courbes nous montre que la tendance à l'amélioration de la transmission sur les lignes de tailles micrométriques s'inverse, lorsque la section du fils atteint la centaine de nanomètre.

Traçons l'évolution du paramètre de transmission en fonction de la longueur de la ligne centrale, ici pour une ligne de 500nm de large sur 100, 250 et 500 μ m de longueur.

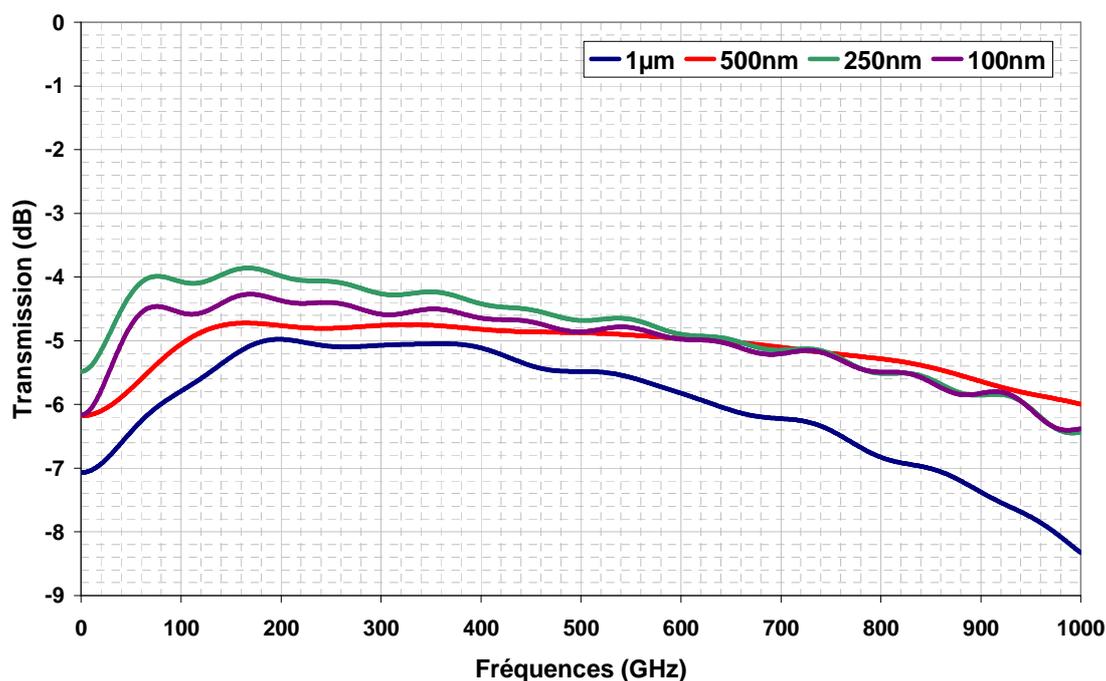


Figure 2. 64 : Paramètre de transmission pour différentes largeurs de fil nanométrique

On montre dans la littérature qu'une épaisseur de métallisation de trois fois l'épaisseur de peau est nécessaire pour minimiser les pertes métalliques [2. 63]. L'épaisseur de peau pour un conducteur est donnée par la relation suivante :

$$\delta = \sqrt{\frac{1}{\pi \cdot \mu_0 \cdot \sigma \cdot f}} \text{ en mètre} \quad \text{Équation 1}$$

L'évolution de l'épaisseur de peau en fonction de la fréquence pour des lignes métalliques en or de conductivité $\sigma = 4,1 \cdot 10^7$ S/m (Figure 2. 65), nous pouvons voir que dans la bande de fréquences 0-220GHz, les lignes de tailles inférieures à 1µm sont en dessous de l'épaisseur de peau. L'augmentation de ces pertes est sans doute liée aux épaisseurs de métallisation plus petites que l'épaisseur de peau. Le passage par un optimum reste donc à expliquer par une étude électromagnétique plus approfondie.

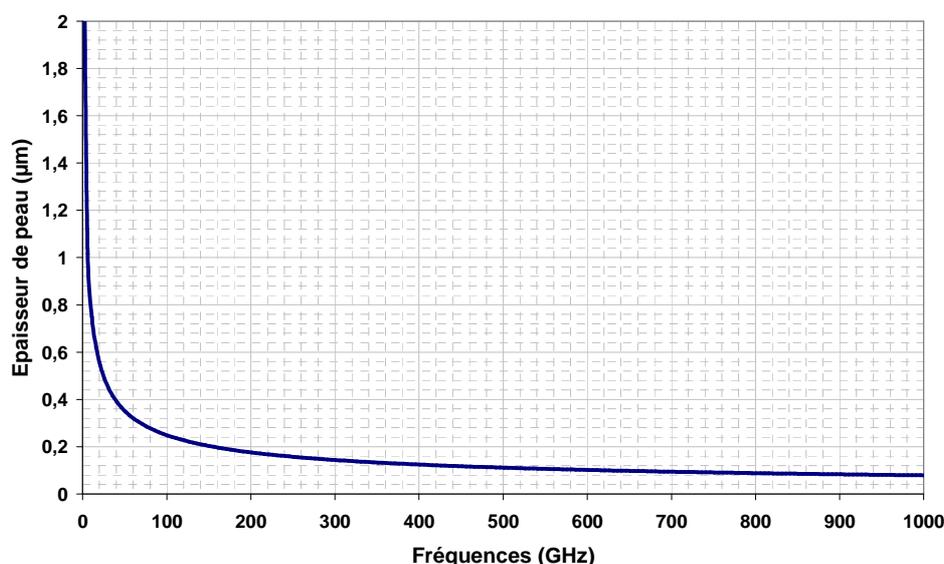


Figure 2. 65: Evolution de l'épaisseur de peau en fonction de la fréquence

La réalisation des lignes nanométriques va conforter ce que nous avons pu simuler. La fabrication de lignes de quelques centaines de nanomètres est assez délicate. Nous utiliserons de la lithographie électronique pour leur conception. L'avantage de cette technique d'écriture est qu'elle permet de repousser les limites de la diffraction de la lumière et de dessiner des motifs avec une résolution pouvant atteindre 10nm. Néanmoins, il est très difficile de réaliser les lignes nanométriques, parce que nous avons des motifs de toutes tailles, comme les excitations qui font plusieurs centaines de micromètres de large. Le faisceau d'électrons réalise les motifs en plusieurs passes successives, c'est-à-dire que le faisceau écrit un champ et décale la plaque pour écrire le champ contigu. On comprend bien que si la ligne fait plusieurs champs, nous ne sommes pas à l'abri de phénomènes de coupure entre ces deux champs, comme nous le verrons à la fin de ce paragraphe. Pour pallier ce problème, nous nous sommes donc arrangés pour que les lignes nanométriques ne soient pas plus grandes qu'un champ d'écriture. Nous avons réalisé des fils nanométriques de 500µm de longueur au maximum afin d'obtenir des lignes sans coupures. Les autres motifs sont nettement plus grands et ils ne posent pas de problèmes majeurs. Pour pouvoir amener progressivement la largeur du ruban central de l'accès coplanaire à la ligne nanométrique, nous avons placé des tapers entre les deux excitations. Nous présentons le schéma de réduction de la taille des fils (Figure 2. 66) :

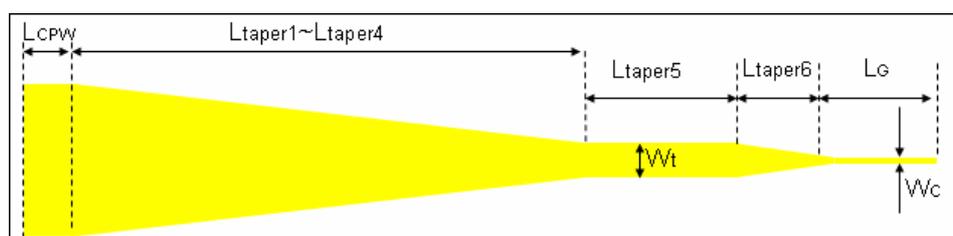


Figure 2. 66 : Topologie de ligne pour adapter l'excitation aux lignes de taille nanométrique.

Nous avons réalisé un certain nombre de simulations pour fixer la longueur des tapers et nous les avons défini à $L_{\text{taper}5}=300\mu\text{m}$ et $L_{\text{taper}6}=150\mu\text{m}$. Sachant que les tapers 1 et 4 sont les mêmes que précédemment. Nous avons réalisé un masque pour une écriture électronique qui comprend des lignes de 500nm, 250nm, 100nm et 50nm sur des longueurs de 100 μm , 200 μm et 500 μm , sur un substrat de quartz. Nous pouvons voir une illustration de la structure réalisée sur la figure suivante (Figure 2. 67):

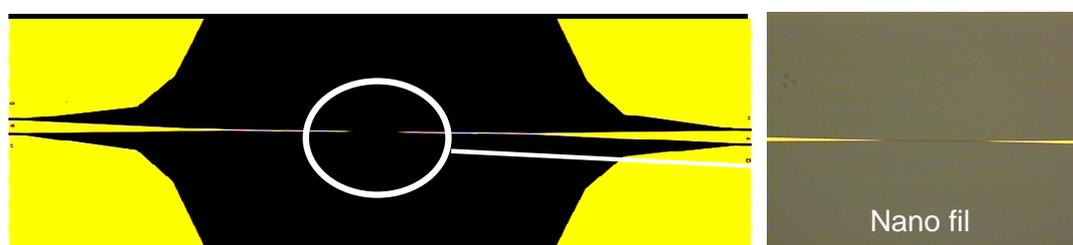


Figure 2. 67: Illustration d'une réalisation avec ligne centrale de résolution nanométrique.

Voici les résultats obtenus pour ces lignes nanométriques, mesurées entre 0 et 220GHz. Nous avons confronté mesure et simulation pour les différentes largeurs de ruban nanométrique. Ce premier résultat est pour une ligne de 500nm de large sur 100 μm de longueur (Figure 2. 68).

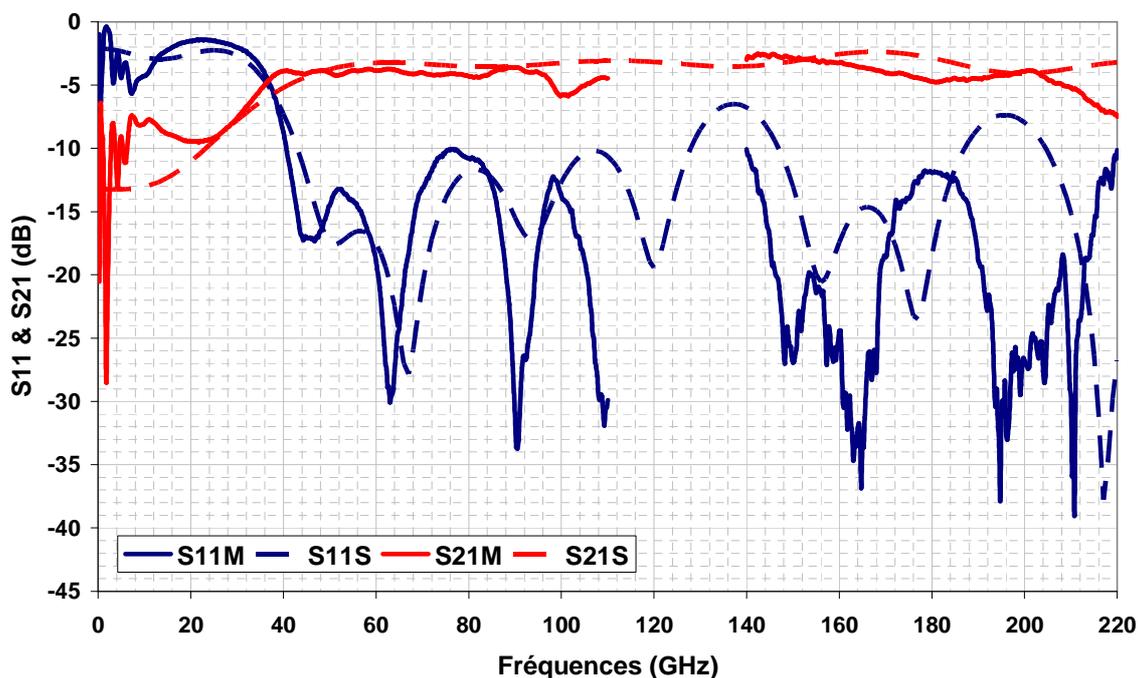


Figure 2. 68 : Paramètres de transmission et de réflexion pour un ruban de 500nm de large sur 100µm de longueur avec confrontation simulation mesure.

Nous pouvons remarquer que nous avons un coefficient de transmission plat sur une large bande de fréquences avec un niveau relativement élevé de l'ordre de -4,5dB à 180GHz, et un niveau de réflexion inférieur à -10dB sur toute la bande passante de la structure. On peut également remarquer un très bon accord entre la mesure et la simulation, ce qui permet de conforter nos simulations des lignes nanométriques.

Nous avons ensuite mesuré une structure avec un nano fil central de 250nm de large sur 100µm de longueur (Figure 2. 69). On peut remarquer une légère diminution du coefficient de transmission ce qui va à l'encontre de nos simulations précédentes mais ceci est du en grande partie à la réalisation de ces lignes. Comme nous avons effectué la même métallisation pour les fils nano que pour les excitations, nous avons un rapport d'aspect inversé entre largeur et hauteur de métallisation. De plus nous avons une rugosité le long des lignes nanométriques ce qui cause un niveau de perte supplémentaire.

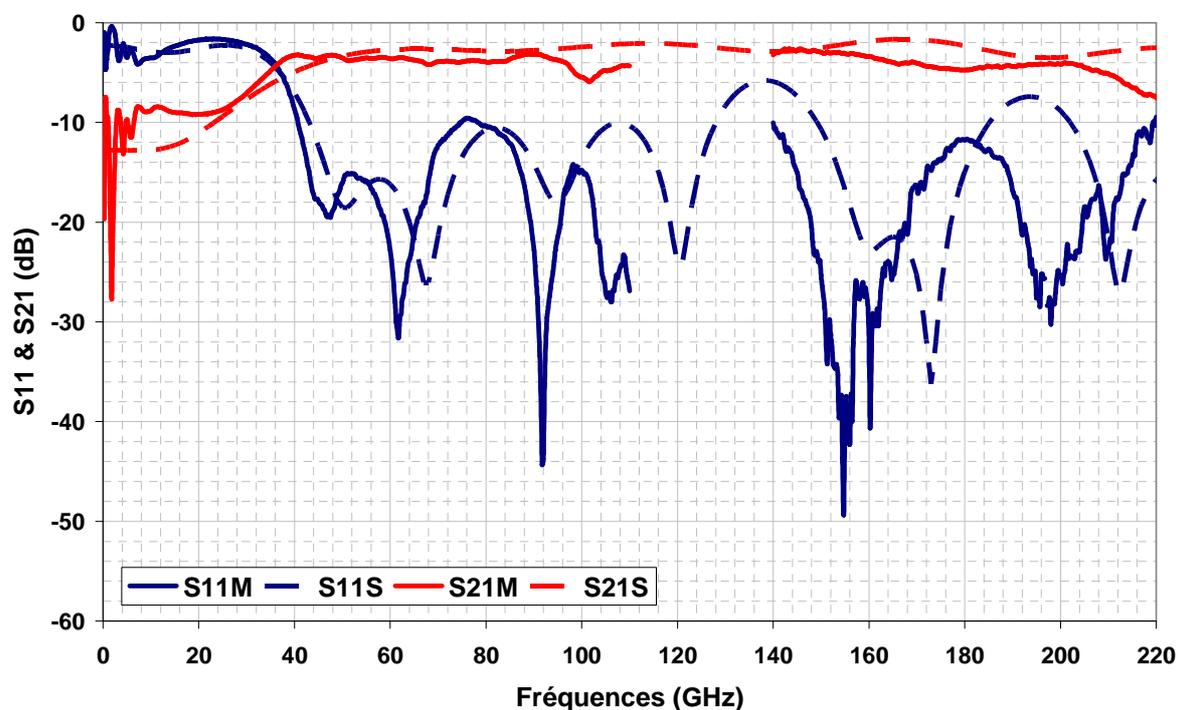
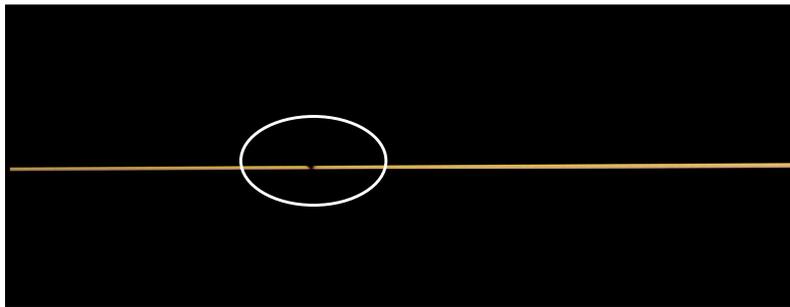


Figure 2. 69 : Paramètres de transmission et de réflexion pour un ruban de 250nm de large sur 100µm de longueur avec confrontation simulation mesure

Nous obtenons un niveau de transmission relativement correct pour des lignes de cette largeur à savoir -4,9 dB à 180GHz avec un niveau de réflexion tout aussi bon.

Pour vérifier que l'onde se propage bien le long de la ligne nanométrique, nous avons mesuré une ligne de 500nm de large coupée par un gap de l'ordre de 100nm comme nous pouvons le voir sur la Figure 2. 70. Le problème d'écriture sur un substrat transparent, ici du quartz, cause des mauvaises mesures de hauteur de résine. En effet, le masqueur mesure la hauteur de résine pour quantifier la bonne dose d'électrons nécessaires à son insolation. Les mauvaises mesures ne permettent pas au masqueur d'appliquer la bonne dose et donc ne vient pas insoler la résine jusqu'au fond. Lors de la révélation, il peut se produire des phénomènes de gap comme nous pouvons le voir sur la Figure 2. 70. Nous avons maintenant résolu ce problème en utilisant un seul champ pour la fabrication du fil nanométrique central comme nous l'avons expliqué précédemment.



Gap de 100nm sur
une ligne de 500nm
de large

Figure 2. 70 : Problème d'écriture électronique causant des gaps dans le ruban central

Nous pouvons remarquer que si la ligne nanométrique est coupée, nous avons une diminution importante du paramètre de transmission qui est de l'ordre de -25dB à 180GHz (Figure 2. 71) au lieu des -4,5dB pour une ligne sans coupure. Ce résultat montre bien que l'onde se propage bien le long de la ligne nanométrique.

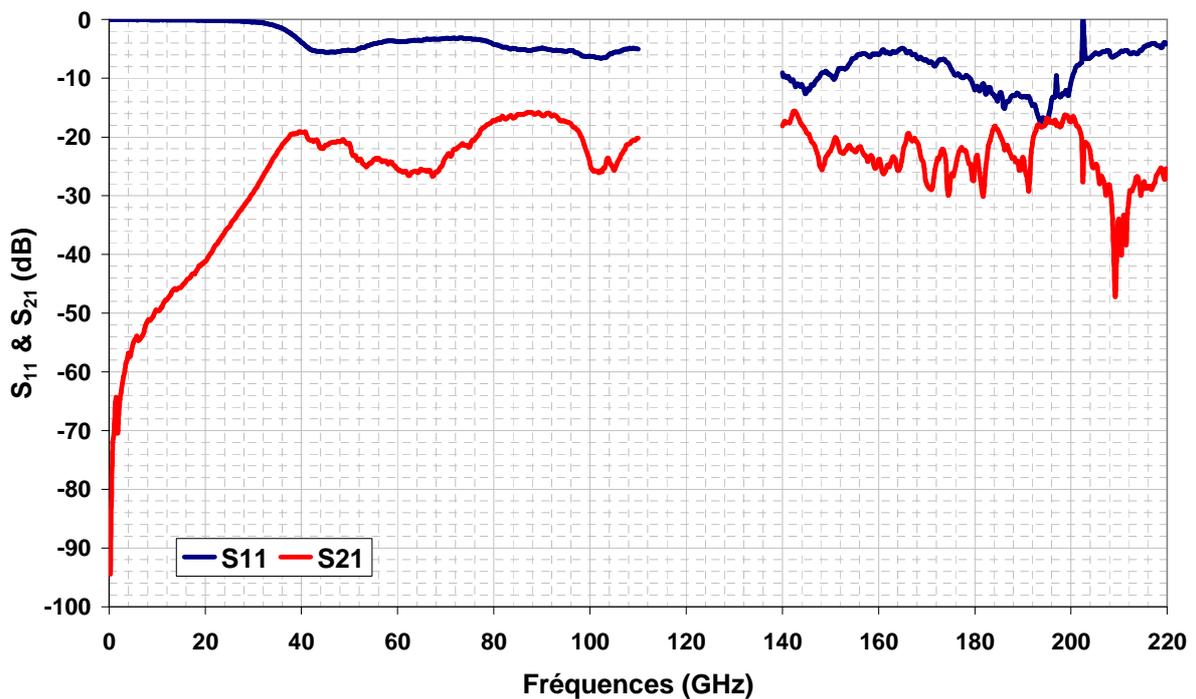


Figure 2. 71 : Paramètre de transmission et de réflexion pour un ruban avec un gap de 100nm.

III.7. Coudes et résonateurs en topologie Goubau

III.7.1. Les coudes

Ce nouveau type de ligne de transmission est susceptible d'être le standard de lignes de propagation pour les bandes de fréquences térahertz. Notre but est de développer une technologie de composants passifs avec les lignes de Goubau planaires. Il est important de voir l'influence de la transformation de la forme du ruban, par exemple des coudes, sur la transmission du signal. Pour que cette ligne soit également comparable avec les autres types de lignes de propagation, nous allons également développer des éléments standard comme des résonateurs qui se font assez facilement avec des guides microruban ou coplanaire par exemple.

Dans la littérature, des études ont été réalisées sur des formes de lignes de Goubau coudées, mais sans résultat à cause du rayonnement de la quasi-totalité du signal [2. 64]. Dans un premier temps, nous allons couder notre ruban planaire et nous verrons son influence sur notre propagation. Nous allons simuler différentes topologies de coude planaire en faisant varier leurs rayons de courbure de 0 à 500 μm . Pour pouvoir comparer, les simulations et les mesures notre structure sera composée de deux coudes en vis-à-vis comme le montre l'illustration de la Figure 2. 72. En effet, il ne nous est pas possible de placer les pointes de mesure perpendiculaires l'une par rapport à l'autre. L'étude des coudes en PGL est très intéressante pour la conception de différents éléments passifs comme des coupleurs.

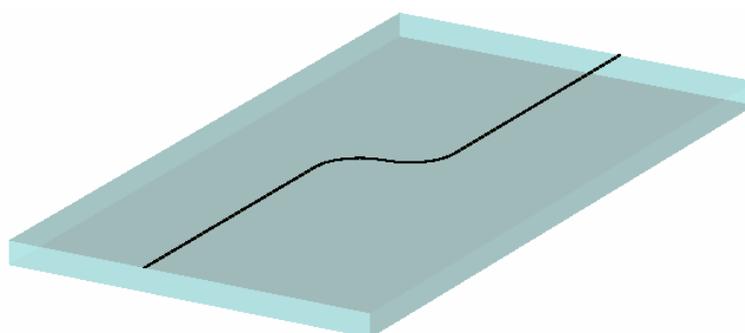


Figure 2. 72: Structure simulée avec deux coudes

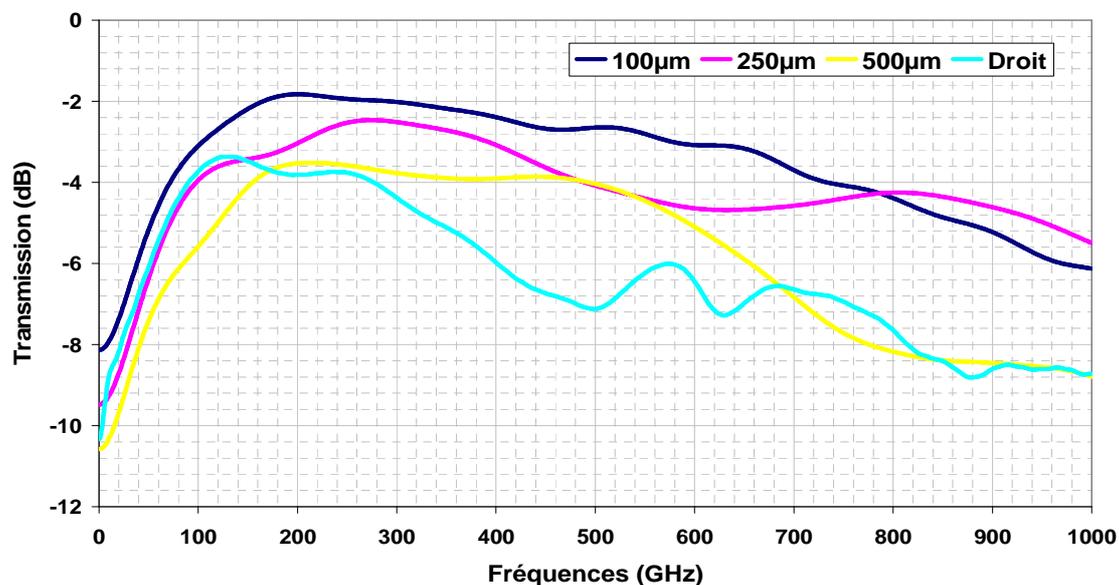


Figure 2. 73 : Paramètre de transmission pour des courbes de différents rayons de courbure.

Nous pouvons remarquer que l'effet de l'angle de courbure des courbes cause un niveau de pertes supplémentaires mais qui reste toutefois correct par rapport à leurs dimensions. On peut remarquer également que le coude causant le plus de pertes est bien évidemment le coude à angle droit, ce qui semble logique. Nous avons tracé les cartes de champs électriques pour un coude de 250µm de courbure. On voit bien que l'onde électromagnétique suit la ligne, comme le montre Figure 2. 74.

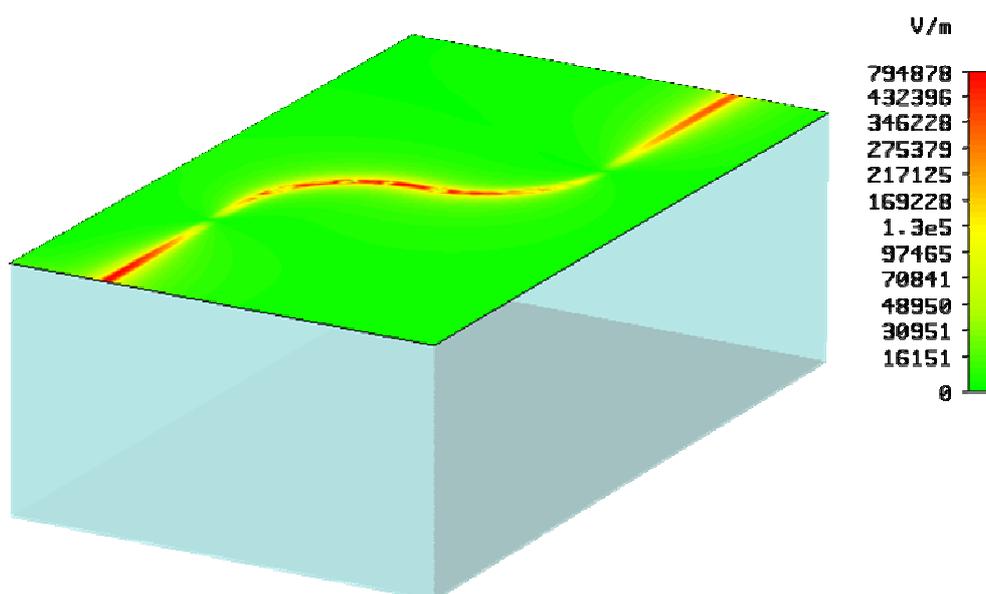


Figure 2. 74: Champ électrique le long d'un coude de 250µm de rayon de courbure

Une fois les simulations réalisées, nous sommes passées à la réalisation de ces coudes. Les structures ont été réalisées sur un substrat de quartz de 500µm d'épaisseur. La métallisation est de l'or de 1µm déposé par pulvérisation cathodique et gravée par voie chimique (Figure 2. 75)

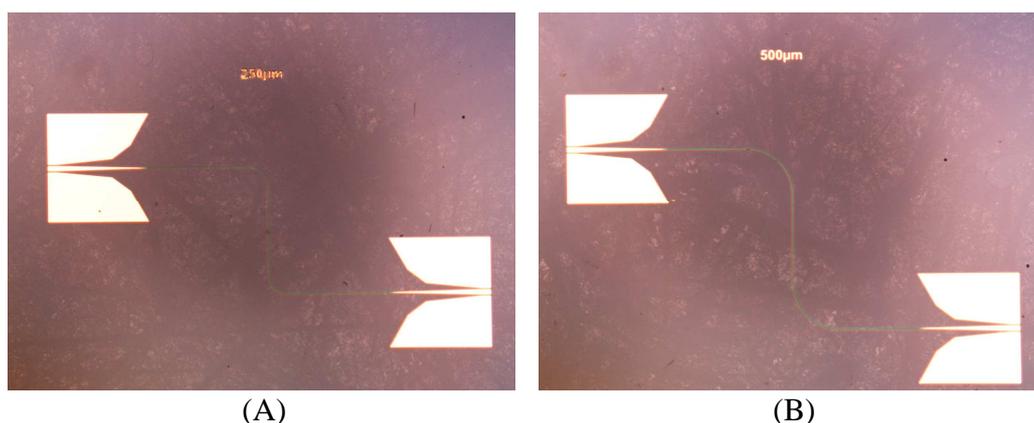


Figure 2. 75: Exemple de réalisation de coude : A : coude de 250µm de rayon de courbure, B : coude de 500µm de rayon de courbure.

Nous les avons caractérisées à l'analyseur de réseau dans la bande de fréquence 0-220GHz. Les résultats sont présentés sur la courbe suivante (Figure 2. 76)

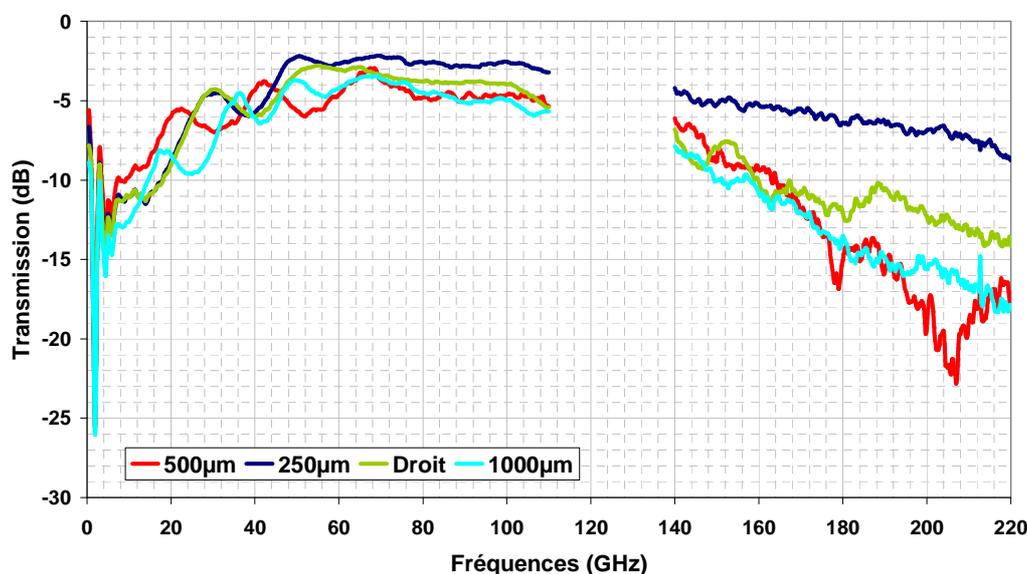


Figure 2. 76: Paramètre de transmission et de réflexion pour des courbes de différents rayons de courbure.

III.7.2. Les résonateurs

Les filtres ou les résonateurs sont des dispositifs passifs qui ont pour but de sélectionner, éliminer ou séparer des signaux situés dans une bande de fréquences d'où les noms de filtres passe-bas, passe-haut, passe-bande et réjecteur. Il existe de nombreux types de filtres utilisant des lignes microbandes : filtres à saut d'impédance, filtres à lignes chargées par des stubs, filtres à lignes couplées... La conception de résonateurs en guides coplanaire ou microruban est assez simple, comme par exemple l'utilisation de lignes couplées. C'est ce type de résonateur que nous allons essayer de faire en topologie Goubau. Décrivons succinctement la conception de résonateurs en ligne couplée en topologie classique microruban. Ces résonateurs sont composés de tronçons de lignes dont la longueur est une fraction de la longueur d'onde guidée du mode de propagation, ici le mode quasi-TEM pour une ligne microruban. Ces résonateurs ont de très grandes tailles en basse fréquence, mais deviennent

très attractifs dans les gammes de fréquences qui nous intéressent. Nous avons simulé les différents types de filtres cités précédemment.

Les filtres à lignes couplées sont basés sur des résonateurs en ligne de longueurs $\lambda_g/2$ ou $\lambda_g/4$ (λ_g = longueur d'onde guidée), chargés à leurs extrémités par des courts-circuits ou des circuits ouverts (Figure 2. 77A). La réponse globale du filtre est déterminée par le nombre de résonateur (nombre de pôle du filtre), par les gaps entre les résonateurs (couplage inter-résonateurs), par les gaps avec les lignes d'entrée / sortie, ainsi que la largeur de ligne de chaque résonateur (qui détermine l'impédance du résonateur)

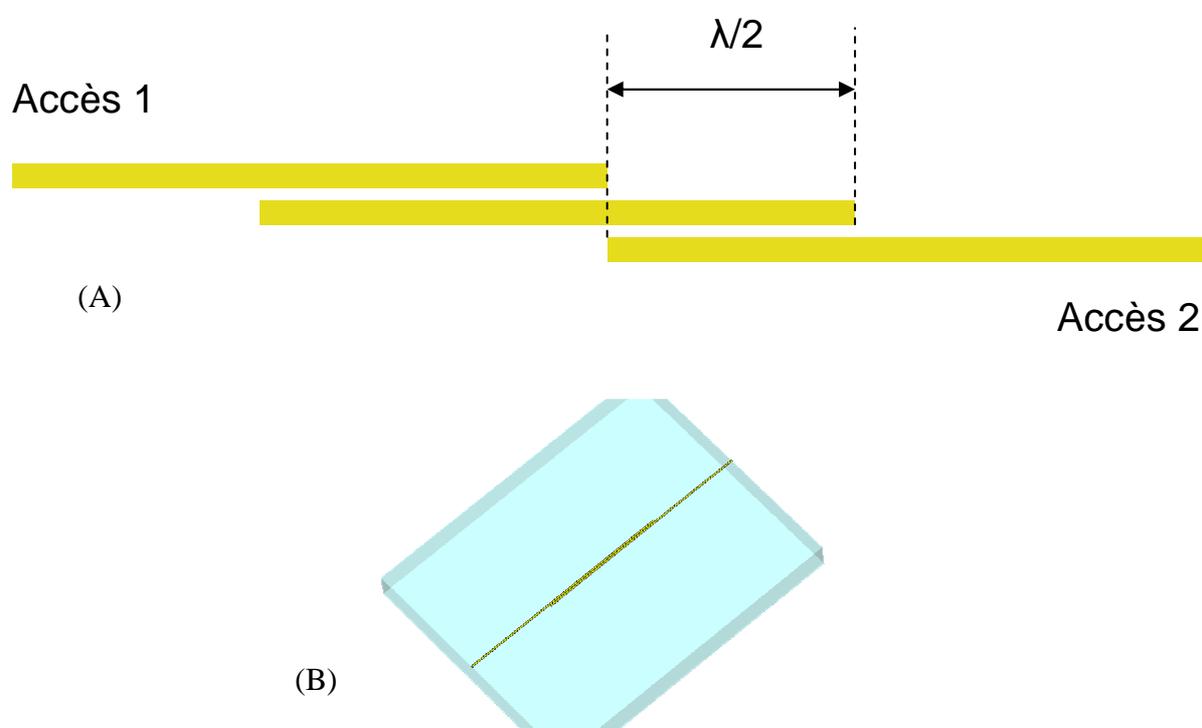


Figure 2. 77: A : Principe des filtres à lignes couplées, B structure simulée en topologie Goubau

Pour montrer la faisabilité de ce type de filtre en topologie Goubau, nous avons donc simulé une structure constituée de deux lignes demi-onde en vis-à-vis comme le montre la Figure 2. 77B définie pour une fréquence de 180 GHz avec un gap entre les lignes de 500nm. Nous pouvons voir la réponse de ce filtre sur la Figure 2. 78.

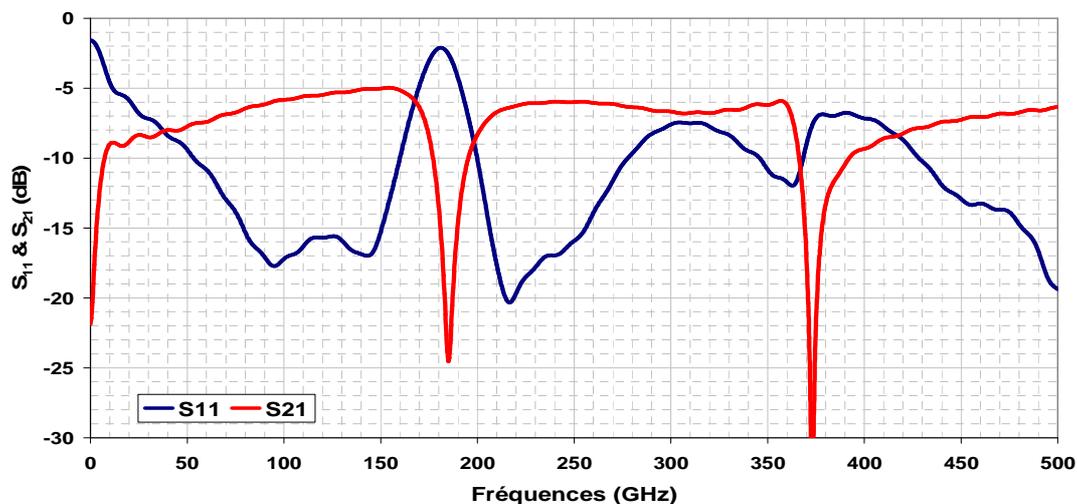


Figure 2. 78: Paramètres de transmission et de réflexion simulés pour deux lignes couplées avec un gap de 500nm à une fréquence de 180GHz.

A la différence de ce même type de filtre en topologie microruban, nous avons un filtre réjecteur de fréquence. Elle s'explique par le fait que la ligne de Goubau est une ligne à pertes. L'onde fait des allers-retours dans la longueur demi-onde et vient créer une réjection à cette fréquence. Nous avons regardé l'évolution du gap entre les lignes sur la transmission du signal (Figure 2. 79).

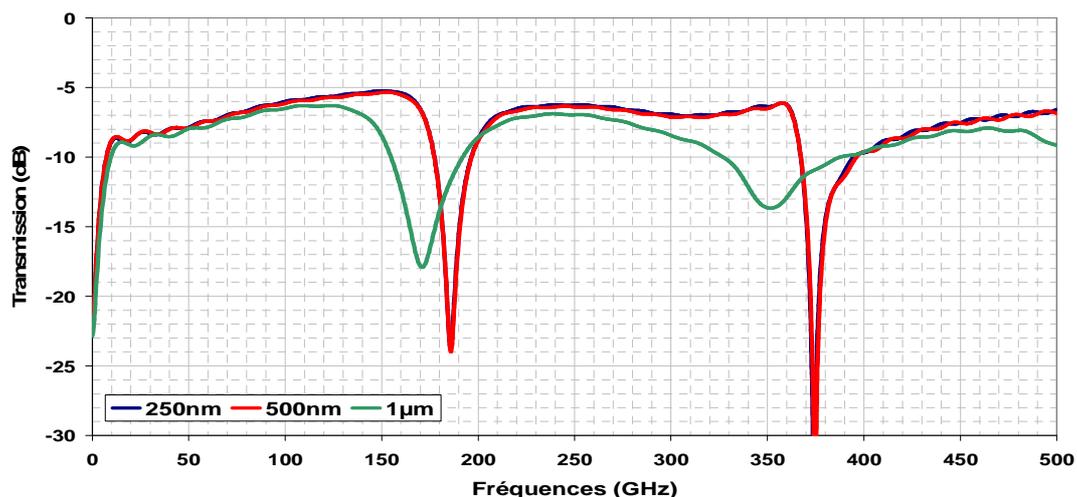


Figure 2. 79: Influence du gap sur le paramètre de transmission du filtre réjecteur pour une fréquence de 180GHz.

Nous pouvons remarquer que le gap entre les lignes demi-onde est très important sur la sélectivité du filtre : plus les lignes sont proches, plus le filtre sera sélectif. Nous avons voulu réaliser une structure comprenant ce type de résonateur mais il est assez difficile à réaliser à cause du gap entre les deux lignes, 500nm, qui nécessite une écriture au masqueur électronique.

Intéressons nous à présent aux filtres chargés par des stubs qui consistent à venir placer un tronçon de ligne perpendiculaire à la ligne principale de longueur d'onde $\lambda_g/2$, comme le montre la Figure 2. 80. Nous avons simulé une structure composée de deux stubs de longueurs respectives 320 μm et 250 μm correspondant à des fréquences de 140GHz et 180GHz.

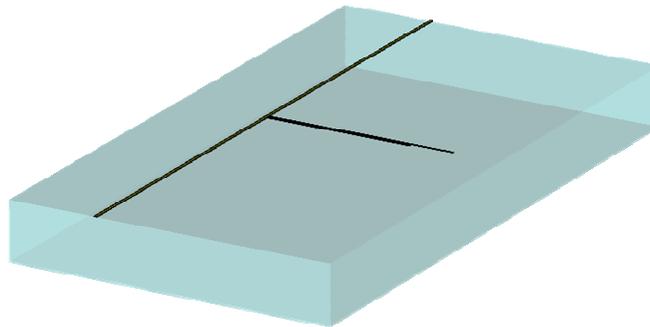


Figure 2. 80: Structure simulée d'un filtre à Stub, constituée de deux stub pour réalisation d'un filtre réjecteur de bande.

Nous avons obtenu les résultats de simulation présentés sur la Figure 2. 81.

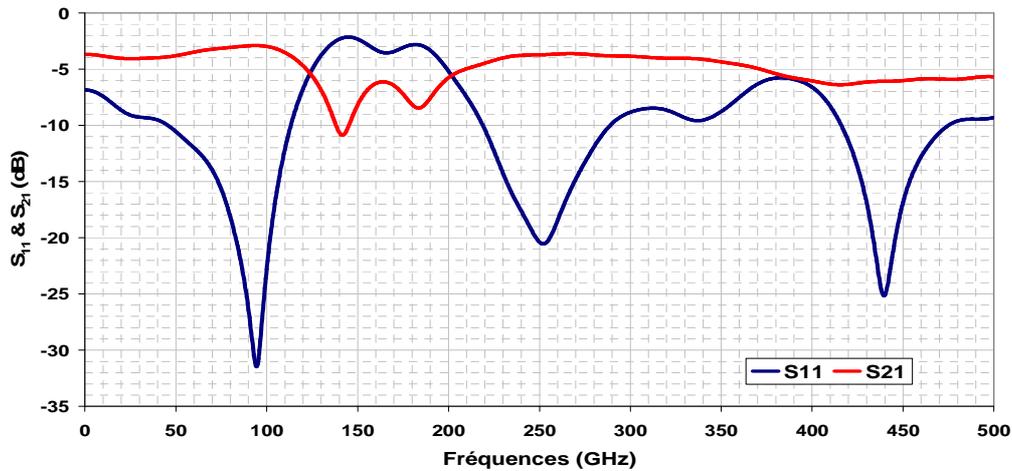


Figure 2. 81: Paramètres de transmission et de réflexion simulés pour une structure à deux stubs pour une fréquence respective de 140 et 180GHz.

Nous pouvons remarquer que nous obtenons bien des pics de réjections aux fréquences souhaitées, créant ainsi un filtre réjecteur de bande. Vu les fréquences d'investigation que nous proposons d'étudier, la longueur des stubs est relativement importante pour être intégrée dans un microsystème pour l'investigation cellulaire. Nous proposons donc, plutôt que d'utiliser un stub droit de venir le conformer en spires comme sur la figure ci-dessous.

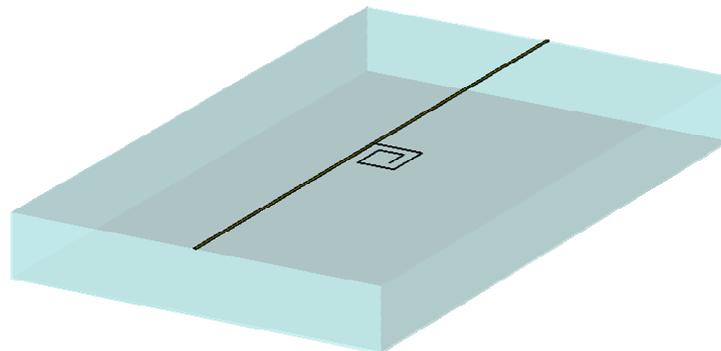


Figure 2. 82: Structure simulée d'un filtre avec stub enroulé.

Les résultats de simulation restent intéressants. On peut remarquer une bonne réjection à la fréquence souhaitée, ici 140GHz (Figure 2. 83). De plus nous avons gagné en occupation

spatiale en enroulant notre résonateur, ce qui permet de plus de le rendre compatible avec les entités biologiques à investiguer et d'être intégrable au sein de notre microsystème.

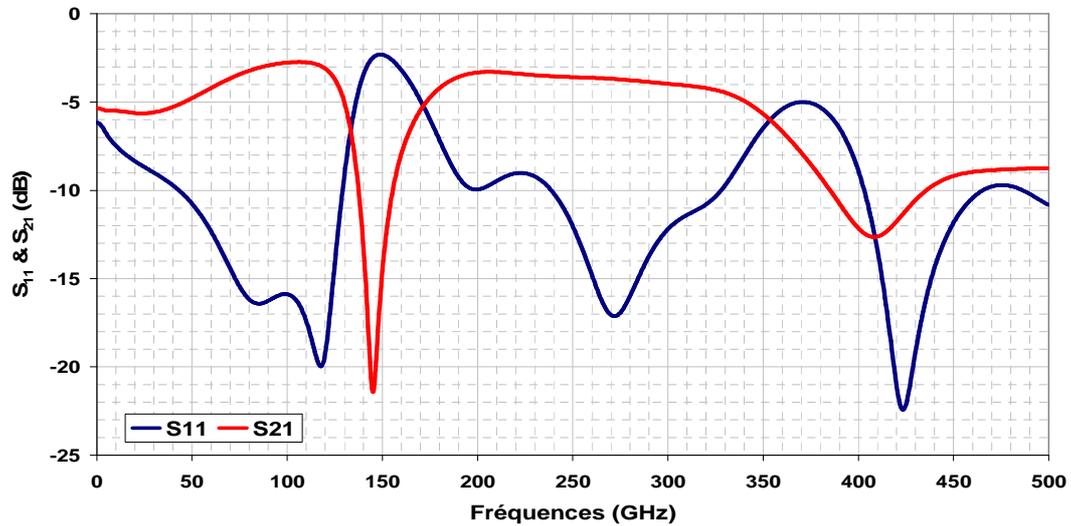


Figure 2. 83: Paramètre de transmission et de réflexion simulé pour une structure à stub enroulé à une fréquence de 140GHz

Conclusion

L'ensemble de ces résultats nous montre qu'il est possible d'exciter un mode de propagation filaire en topologie planaire à l'aide d'une excitation coplanaire. Elle permet de rendre mesurable ce nouveau type de ligne de propagation avec des analyseurs de réseaux vectoriel comportant un module sous pointes. Nous avons défini et étudié 3 types d'excitations avec des améliorations constantes. Les résultats de simulation nous ont permis d'aboutir à une bonne efficacité de l'ordre de 75%, ce qui est remarquable dans cette technologie. Nous avons conforté les simulations par des réalisations de structure constituées des différentes topologies d'excitation. Nous avons détaillé dans la suite les paramètres géométriques ainsi que les caractéristiques importantes du mode de Goubau en topologie planaire. Nous avons vu l'influence des paramètres du substrat, à savoir sa hauteur et sa permittivité. Nous avons vu que l'utilisation de substrat de grande hauteur engendre l'apparition de modes de substrat indésirables. En ce qui concerne la permittivité du substrat, nous avons vu également qu'il est préférable de travailler avec de faibles permittivités pour garder un bon confinement électromagnétique autour du guide filaire. Un autre paramètre important est la taille du fil. Nous avons remarqué et confirmé avec des mesures que plus la taille du fil diminue, moins nous avons de pertes. Nous avons remarqué également que plus la taille du fil diminue, plus le champ électromagnétique est confiné. Enfin nous avons également montré qu'il est possible de propager une onde électromagnétique le long de fils de tailles nanométriques avec des niveaux de pertes plus que raisonnables. L'ensemble de ces résultats nous montre bien la possibilité de réaliser une propagation filaire THz en topologie planaire avec des résolutions nanométriques, tout en gardant un niveau de pertes à l'état de l'art avec ce type de guide. L'ensemble des résultats montre l'énorme potentialité des guides d'ondes filaires THz pour l'investigation d'entités biologiques avec des résolutions spatiales sub-longueur d'onde.

IV. Bibliographie

- [2. 1] P.H.Siegel, "THz Technology in Biology and Medicine", IEEE Trans. Microwave Theory and Techniques, Vol. 52, N° 10, pp. 2438-2448, 2004.
- [2. 2] J.W. Waters, L. Froidevaux, R.S. Harwood, R.F. Jarnot, H.M. Pickett, W.G.Read, P.H.Siegel, "The Earth Observing System Microwave Limb Sounder (EOS MLS) on the Aura satellite", IEEE Trans. Geoscience and Remote Sensing, Vol.44, n° 5, pp. 1075-1092, 2006.
- [2. 3] D. Grischkowsky, Soren Keiding, Martin van Exter and Ch. Fattering, "Far-infrared time-domain spectroscopy with terahertz beams of dielectrics and semiconductors", Journal of the Optical Society of America B, Vol. 7, No. 10, pp. 2006-20015, 1990.
- [2. 4] L. Desplanque, "*Caractérisation électro-optique de composants térahertz par échantillonnage Franz-Keldysh subpicoseconde*", Spécialité Microondes et Microtechnologies, Université des Sciences et Technologies de Lille, Soutenue le 20 Novembre 2003, 225 p.
- [2. 5] M.Tonouchi, "Cutting-edge terahertz technology", Nature Photonics, Vol.1, pp. 97-105, 2007.
- [2. 6] M. Dyakonov, M.Shur, "Shallow water analogy for a ballistic field effect transistor: New mechanism of plasma wave generation by dc current", Physical Review Letter.71, pp. 2465-2468, 1993.
- [2. 7] M. Lee, M.C. Wanke, "Searching for a solid-state terahertz technology", Applied Physics, Vol.316, pp.64-65, 2007.
- [2. 8] G. R. Facer et al, "Dielectric Spectroscopy for Bioanalysis: Form 40 Hz to 26.5 GHz in a Micro fabricated Wave Guide", Applied Physics Letters, Vol. 78, pp. 996-998, 2001.

- [2. 9] G. Martinsen, S.Grimnes, H.P. Schwan, “Interface phenomena and dielectric properties of biological tissue”, Encyclopedia of Surface and Colloid Science, pp. 2643-2652, 2002.
- [2. 10] H. Fricke, “The electric capacity of suspensions with special reference to blood”, Journal of General Physiology, Vol.9, pp. 137-152, 1925.
- [2. 11] K.S. Cole, Membranes, Ions and Impulses, University of California Press, Berkeley/LA, 1968.
- [2. 12] H.P. Schwan, “Electrical properties of tissues and cell suspensions”, Advances in Biological and Medical Physics, Vol. 5, pp. 147-209, 1957.
- [2. 13] E.H. Grant et al, Dielectric behaviour of biological molecules in solution, Oxford University Press, 1978.
- [2. 14] T. Hanai, Kolloid-Z, “Theory of the dielectric dispersion due to the interfacial polarization and its application to emulsions”, Vol.171, pp. 23-31, 1960.
- [2. 15] S. Takashima, “Electrical Properties of Biopolymers and Membranes”, Adam Hilger, Bristol, 1989.
- [2. 16] K.R. Foster et al, “Handbook of biological effects of Electro-magnetic radiation”, CRC press, 25, 1995.
- [2. 17] R. Pethig, “Dielectric and Electronic Properties of Biological Materials”, Wiley, New-York, 1979.
- [2. 18] K. Asami et al, Yonezawa, “Dielectric behavior of wild-type yeast and vacuole-deficient mutant over a frequency range of 10 kHz to 10 GHz”, Journal Biophysics, Vol.71, 1996, pp. 2192-2200, 1996.
- [2. 19] T. S. Hartwick, D. T. Hodges, D. H. Barker, and F. B. Foote, “Far infrared imagery,” Appl. Opt., Vol.15, no. 8, pp. 1919–1922, 1976.

- [2. 20] K. J. Seibert, T. Loffler, H. Quast, M. Thomson, T. Bauer, R. Leonhardt, S. Czasch, and H. G. Roskos, “All-optoelectronic continuous wave THz imaging for biomedical applications,” *Physics in Medicine and Biology*, vol. 47, no. 21, pp. 3743–3748, 2002.
- [2. 21] A. J. Fitzgerald, E. Berry, N. N. Zinov’ev, S. Homer–Vanniasinkam, R.E. Miles, J. M. Chamberlain, and M. A. Smith, “Catalogue of human tissue optical properties at terahertz frequencies,” *Journal Biology Physics*, vol. 29, no. 2/3, 2003, pp. 123–128.
- [2. 22] T. Loffler, K. Siebert, S. Czasch, T. Bauer, and H. G. Roskos, “Visualization and classification in biomedical terahertz pulsed imaging,” *Physics in Medicine and Biology*, vol. 47, no. 21, pp. 3847–3852, 2002.
- [2. 23] T. Loffler, T. Bauer, K. J. Siebert, H. G. Roskos, A. Fitzgerald, and S. Czasch, “Terahertz dark field imaging of biomedical tissue,” *Optical Express*, Vol.9, no.12, pp. 616–621, 2001.
- [2. 24] P. Knobloch, K. Schmalstieg, M. Koch, E. Rehberg, F. Vauti, and K. Donhuijsen, “THz imaging of histo-pathological samples,” *Proc. SPIE–Int. Soc. Opt. Eng.*, vol. 4434, pp. 239–245, 2001.
- [2. 25] R.M. Woodward, V.P. Wallace, R.J. Pye, B.E. Cole, D.D. Amone, E.H. Linfield and M. Pepper, “Terahertz pulse imaging of ex vivo basal cell carcinoma”, *Journal Investigative Dermatol.*, Vol. 120, n°1, pp, 72-78, 2003.
- [2. 26] V. P. Wallace, D. Arnone, R. M. Woodward, and R. J. Pye, “Biomedical applications of terahertz pulsed imaging,” in *Proc. 2nd Joint, EMBS/BMES Conf.*, Houston, TX, Oct. 23–28, pp. 2333–2334, 2002.
- [2. 27] B. E. Cole, R. Woodward, D. Crawley, V. P. Wallace, D. D. Arnone, and M. Pepper, “Terahertz imaging and spectroscopy of human skin, in-vivo,” *Proc. SPIE–Int. Soc. Opt. Eng.*, vol. 4276, pp. 1–10, 2001.

- [2. 28] R. M. Woodward, V. P. Wallace, B. E. Cole, R. J. Pyle, D. D. Arnone, E. H. Linfield, and M. Pepper, “Terahertz pulse imaging in reflection geometry of skin tissue using time domain analysis techniques,” Proc. SPIE–Int. Soc. Opt. Eng., Vol. 4625, pp. 160–169, 2002.
- [2. 29] B. B. Hu and M. C. Nuss, “Imaging with terahertz waves,” Optical Letters, Vol. 20, no. 16, Aug. 15, pp. 1716–1718, 1995.
- [2. 30] B. Ferguson, S. Wang, D. Gray, D. Abbott, and X.-C. Zhang, “Toward functional 3D T-ray imaging”. Physics in Medicine and Biology, Vol. 47, no. 21, pp. 3735–3742, 2002.
- [2. 31] Y. Ulgen and M. Sezdi, “Electrical parameters of human blood,” in Proc.20th Annu. Int. IEEE EMBS Conf., vol. 6, , pp. 2983–2986, Oct. 29–Nov. 1, 1998.
- [2. 32] M.Brucherseifer, M.Nagel, P.Haring Bolivar, H.Kurz, “Label-free probing of the binding state of DNA by time-domain terahertz sensing”, Applied Physics Letters, Vol.77 n°24, pp. 4049-4051, 2000.
- [2. 33] M.Nagel, P.Haring Bolivar, M.Brucherseifer, H.Kurz, A.Bosserhoff, R.Buttner, “Integrated THz technology for label-free genetic diagnostics”, Applied Physics Letters, Vol.80, N°1, pp. 154-156, 2002.
- [2. 34] C. Ronne, L. Thrane, P. Astrand, A. Wallqvist, K. V. Mikkelsen, S. R. Keiding, “Investigation of the temperature dependence of dielectric relaxation in liquid water by THz reflection spectroscopy and molecular dynamics simulation” Journal of Chem. Phys., vol.107, pp. 5319-5330, 1997.
- [2. 35] C. Ronne and S. R. Keiding, “Low frequency spectroscopy of liquid water using THz-time domain spectroscopy”, Journal of Molecular Liquids, Vol.101, n°1, pp. 199-218, 2002.
- [2. 36] E. Pickwell, B. E. Cole, A. J. Fitzgerald, M. Pepper, and V. P. Wallace, “*In vivo* study of human skin using pulsed terahertz radiation”, Physics in Medicine and Biology, Vol.49, pp.1595-1607, 2004.

- [2. 37] E. Pickwell, B. E. Cole, and A. J. Fitzgerald, "Simulation of terahertz pulse propagation in biological systems", *Applied Physics Letter*, 84, n°12, pp.2190-2192, 2004.
- [2. 38] J.Kitagawa, T. Ohkubo, M. Onuma, Y. Kadoya, "THz spectroscopic characterization of biomolecule/water systems by compact sensor chips", *Applied Physics Letters*, Vol.89, Issue 4, pp.041114, 2006.
- [2. 39] T. Ohkubo, M. Onuma, J. Kitagawa, Y. Kadoya, "Micro-strip-line-based sensing chips for characterization of polar liquids in terahertz regime", *Applied Physics Letters*, Vol.88, Issue 21, pp. 212511, 2006.
- [2. 40] Yu. I. Khurgin, V.A. Kudryashova et V.A. Zavizion, "Absorption Millimeter Wave Spectroscopy: Intermolecular Interactions and Hydration", *Journal of communications Technology and Electronics*, Vol. 41, No. 7, pp. 640-645, 1996.
- [2. 41] V.P. Wallace, A.J. Fitzgerald, E. Pickwell, R.J. Pye, P.F. Taday, N. Flanagan, and T. HA, "Terahertz Pulsed Spectroscopy of Human Basal Cell Carcinoma", *Applied Spectroscopy*, Vol.60, n°10, pp. 1127-1133, 2006.
- [2. 42] P. T. T. Wong, S. M. Goldstien, and R. C. Grekin, Thomas A. Godwin, Chris Pivik, and Basil Rigas, "Distinct infrared spectroscopic patterns of human basal cell carcinoma of the skin", *Cancer Research*, Vol.53, pp. 762-765, 1993.
- [2. 43] K. Wang, D.M. Mittleman, "Metal Wires for terahertz waveguiding", *Nature*, 432, pp. 376-379, 2004.
- [2. 44] M. Walther, M.R. Freeman, F.A. Hegmann, "Metal-wire terahertz time-domain spectroscopy", *Applied Physics Letters*, 87, pp. 261107-1 261107-3, 2005.
- [2. 45] Y.S. Xu, R.G. Bosisio, "Application of Goubau lines for millimetre and submillimetre wave gas sensors", *IEE Proc-Microw. Antennas Propag*, Vol.152, n°5, pp. 400-405, 2005.
- [2. 46] T.E. Roberts, "Theory of the Single-Wire Transmission Line", *Journal of Applied Physics*, Vol.24, n°1, pp. 57-67, 1953.

- [2. 47] G.Goubau, “Waves on Interface”, IRE Transactions on Antennas and Propagation, pp. S140-S146, 1959.
- [2. 48] G. Goubau, “Open Wire Lines”, IRE Transactions on Microwave Theory and Techniques”, pp. 197-200, 1956.
- [2. 49] H.Hertz, “Gesammelte Werke”, J.A. Barth, Leipzig, 1894.
- [2. 50] A. Sommerfeld, “Ueber die fortflanzung elektrodynamischer wellen längs eines drahtes”, Ann. Phys. U. Chemie, 67, pp. 233-290, 1899.
- [2. 51] M.J.King, J.C. Wiltse, “Surface-wave propagation on coated or uncoated metal wires at millimetres wavelengths”, IEEE Trans. Antenna and Propagation, Vol.10, pp. 246-254, 1962.
- [2. 52] F.Sobel, F. Wentworth, J.C. Wiltse, “Quasi-optical surface waveguide and other components for the 100 to 300 Gc region”, IEEE Trans. MTT, 9, pp. 512-518, 1961.
- [2. 53] K. Alonso, M.J. Hagmann, “Simulations of tapered Goubau line for coupling microwave signals generated by resonant laser-assisted field emission”, J. Vac. Sci. Technol. B, Vol. 18, pp. 1009-1013, 1999.
- [2. 54] N.C.J.Van der Valk, P.C.M. Planken, “Effect of a dielectric coating on terahertz surface plasmon polaritons on metal wires”, Applied Physics Letters, Vol.87, pp. 071106-1 071106-3, 2005.
- [2. 55] Y.Xu, R.G.Bosisio, “Study of Goubau lines for submillimetre wave and terahertz frequency applications“, IEE Proc-Microwaves Antennas and Propagation, Vol. 151, n°5, pp. 460-464, 2004.
- [2. 56] G. Galot, et al. , “Terahertz Waves guides”, Journal of Optical Society of America B, 17, pp. 851-863, 2000.
- [2. 57] K. Wang, D.M. Mittleman, “Guided Propagation of terahertz pulses on metal wires”, Journal of Optical Society of America, Vol.22 n° 9, pp.2001-2008, 2005.

[2. 58] J.A. Deibel, M.D. Escarra, D.M. Mittelman, “Photoconductive Terahertz antenna with Radial Symmetry”, *Electronic Letters*, Vol.41, n°5, pp. 226-228, 2005.

[2. 59] J.A. Deibel et al., “Enhanced coupling of terahertz radiation to cylindrical wire waveguides”, *Optical Express*, Vol. 14, pp. 279-290, 2006.

[2. 60] A. Treizebre, T.Akalin, B.Bocquet, “Planar excitation og goubau transmission lines for THz BioMEMS”, *IEEE Microwave and Wireless Component Letters*, Vol.15, 12, pp. 886-888, 2005.

[2. 61] T.Akalin, A. Treizebre, B.Bocquet, “Single wire transmission lines at THz frequencies”, *IEEE Microwave Theory and Techniques*, Vol.54, n°6, pp. 2762-2767, 2006.

[2. 62] A.Treizebre, B.Bocquet, “Nanometric metal wire as a guide for THz investigation of living cells”, Special Issue on “Nanotechnology in France”, *International Journal of Nanotechnologies*, Vol.5, n°6/7/8, pp.784-795, 2008.

[2. 63] W.H. Haydl, J. Braunstein, T. kitazawa, M. Schlechtweg, P. Tasker, L.F. Eastman, “Attenuation of millimetre wave coplanar lines on gallium arsenide and indium phosphide over the range 1-60GHz”, *IEEE MTT-S International Microwave Symposium Digest Vol.1*, , pp. 349-352, 1-15 june 1992.

[2. 64] J.Chiba, “Experimental studies of the losses and radiations due to bends in the goubau line”, *IEEE Transactions on microwave theory and techniques*, Vol.25, n° 2, pp. 94-100, 1977.

Troisième partie:
BioMEMS THz pour l'étude de la
signalisation cellulaire

I. BioMEMS pour l'investigation sur cellule vivante

La finalité du dispositif est de montrer la possibilité de réaliser un BioMEMS pour la caractérisation de cellules vivantes uniques et la capacité des ondes térahertz à les caractériser. Une illustration du BioMEMS final est décrite sur la Figure 3. 1. Le dispositif se compose de deux étages ; l'étage inférieur est destiné à la réalisation des fonctions hyperfréquences, notamment la réalisation des lignes de propagation que nous avons définie dans le chapitre précédent, tandis que l'étage supérieur est destiné à la partie microfluidique pour l'intégration des éléments biologiques. Notons que notre étude s'intéresse, dans un premier temps, à des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO). Les microcanaux servent à faire circuler le fluide biologique utile à la survie de la cellule et ils permettent d'amener les différents réactifs.

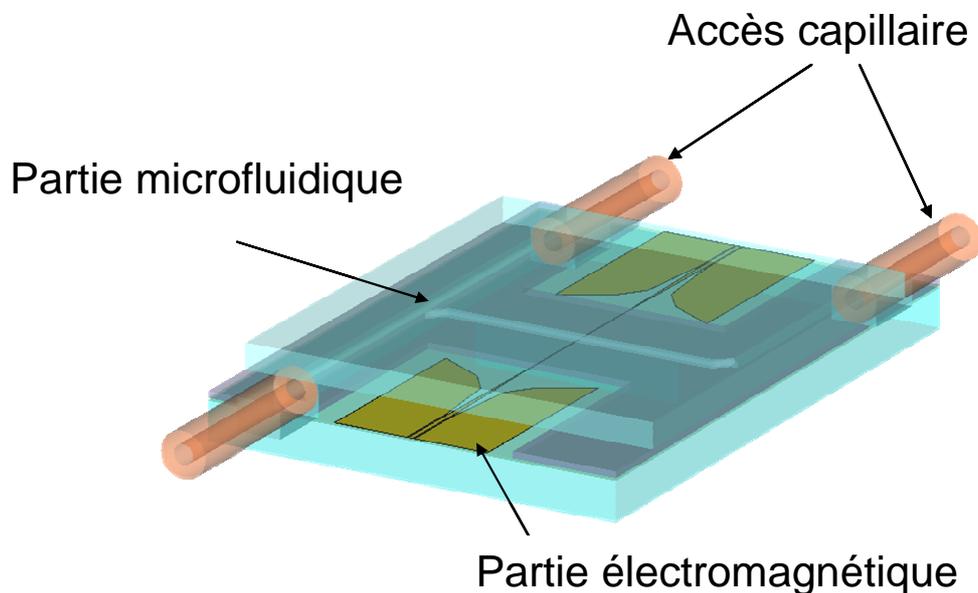


Figure 3. 1: Vue schématique du BioMEMS

II. Aspect microfluidique

Le micro-dispositif sera alimenté par un pompage externe sous forme de pousse seringue à débit variable allant de 1,6nl/min à 2,5 μ l/min. Il convient dans un premier temps de dimensionner la taille des canaux pour accueillir les cellules biologiques dans de bonnes conditions malgré les écoulements, mais aussi sans les obturer. Ce circuit microfluidique a deux fonctions principales. D'une part, il sert à transporter l'entité biologique à investiguer au sein du dispositif et, d'autre part, à faire circuler un fluide biologique nécessaire à la survie de la cellule ou permettant d'injecter les différentes solutions à base de protéines pour voir leur interaction sur la cellule vivante. La première structure envisagée était un canal unique transverse à la ligne de propagation. Ce canal est placé au dessus de la zone de mesure. Les dimensions de ce canal étaient de l'ordre de grandeur des cellules lorsqu'elles sont sphériques, leurs diamètres sont de l'ordre de 20 μ m et passent à des formes fusoidales lors de leurs adhésions avec des tailles de 50 μ m de longueur, 20 μ m de largeur et de 10 μ m de hauteur. Nous avons donc décidé de réaliser des canaux à section carré de 50 μ m de côté.

Deux problèmes majeurs sont apparus rapidement dans cette configuration : la présence de forces importantes à la surface des cellules et l'importance du volume mort. L'utilisation de débits de pompe d'injection standard, crée des forces à la surface de la cellule tellement élevées que la cellule s'arrache. Les cinétiques de détachement de cellules de mammifères, reportées dans la littérature, montrent que les cellules se détachent sur un temps de l'ordre de l'heure pour des cisaillements reportés de l'ordre de 1 à quelques Pascal (Figure 3. 2).

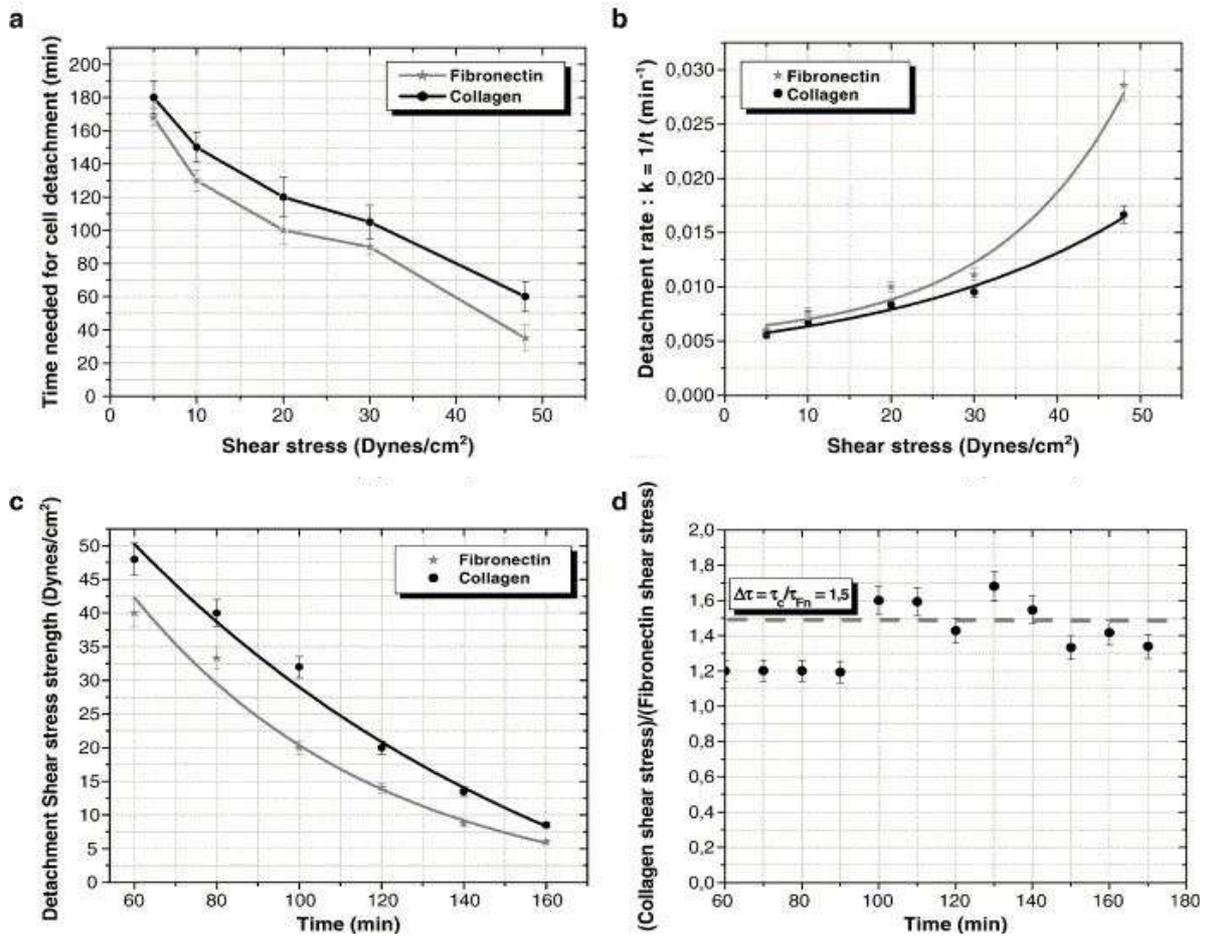


Figure 3. 2 : Effet du cisaillement sur l'adhésion et le détachement de cellules endothéliales.

Nous devons donc limiter le cisaillement dans le canal de mesure. Nous avons estimé que des canaux de 50 μ m \times 50 μ m pouvaient être utilisés si les débits des pompes externes permettaient de travailler à des valeurs de l'ordre de 15 à 1500nl/min. En limite supérieure, nous pensons que le débit devra être inférieur à 1500nl/min pour ce type de canaux, le cisaillement étant alors de l'ordre de 2Pa. On peut estimer le cisaillement sur les parois d'un microcanal très fin par l'expression suivante :

$$C_s = \frac{6 \times v \times D}{h^2 \times l} \quad \text{Équation 3.1}$$

Troisième Partie : BioMEMS THz pour l'étude de la signalisation cellulaire

Avec ν : la viscosité du liquide qui circule dans le canal

D : le débit du liquide injecté

h : la hauteur du canal

l : la largeur du canal

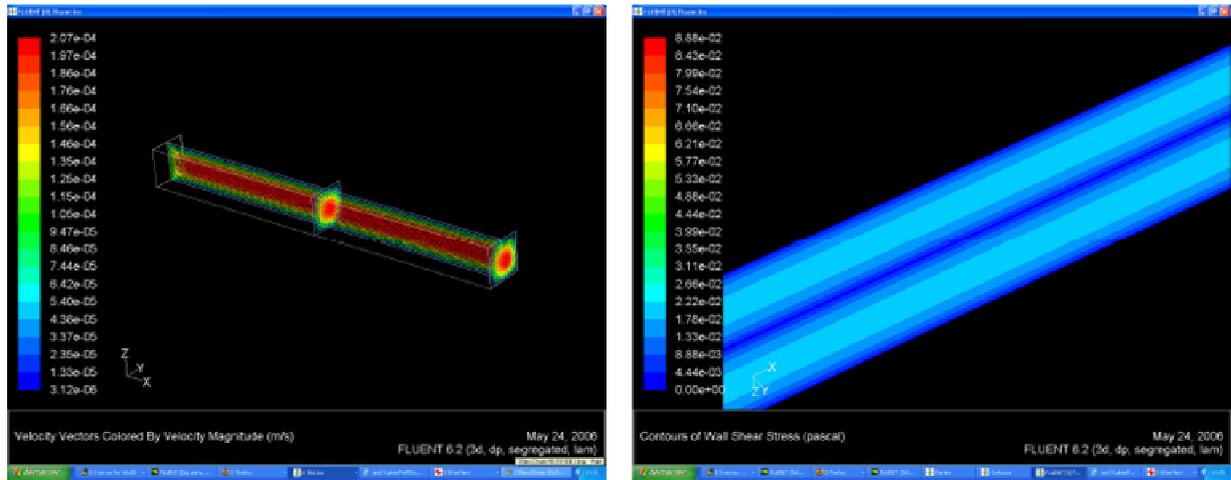
Des canaux de dimension inférieure à $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$, nécessitent des débits très faibles pour éviter l'arrachement des cellules et nous pensons que le contrôle risque de poser problème pour des géométries très petites. De nombreuses simulations numériques ont été réalisées en collaboration avec le laboratoire BMGBM de l'UTC de Compiègne* avec le logiciel FLUENT d'ANSYS^{®1}. Les simulations numériques effectuées sont données dans le tableau 3.1.

Section du canal ($\mu\text{m} \times \mu\text{m}$)	Cisaillement au centre (Pa)	Vitesse maximale (m/s)	Débit (nl/min)
50 x 50	0.02	2.10^{-4}	15
50 x 50	0.2	2.10^{-3}	150
50 x 50	2	0.02	1500
50 x 20	0.03	$1.6.10^{-4}$	5
30 x 30	7	0.04	1000

Tableau 3. 1 : Conditions d'écoulement dans plusieurs géométries testées.

En travaillant à 15-150nl/min, les valeurs de cisaillement sont très faibles de l'ordre de 0,02 à 0,2Pa, soit des valeurs qui devraient permettre d'effectuer des mesures dans des canaux de $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ (temps de mesure de quelques minutes). Cependant le temps de transport des cellules ou des molécules sera très long avec des débits aussi faibles. Le temps de transport à la zone de mesure dépend fortement de la longueur de la connectique.

¹ * Laboratoire de Biomécanique et de Génie Biomédical CNRS UMR 6600



Profil de vitesse dans le microcanal

Contour de cisaillement

Figure 3. 3: Ecoulement dans un canal de section carré $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ pour un débit de $15\text{nl}/\text{min}$.

La simulation de la structure microfluidique montre l'écoulement dans un canal de section carrée de $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ pour un débit de $15\text{nl}/\text{min}$ (Figure 3. 3). La vitesse maximale est de l'ordre de $200\mu\text{m}/\text{seconde}$ et le cisaillement de l'ordre de 0.02Pa . De ce fait, nous avons du prévoir un motif de microcanal adapté d'une part à l'apport des cellules et des molécules et d'autre part, à la tenue mécanique des cellules. Sur de courtes périodes de l'ordre de quelques minutes, les débits pourront atteindre l'ordre de 1 à $2\mu\text{l}/\text{min}$ (le cisaillement étant alors de l'ordre de 2Pa) mais ceci est assez périlleux. Des tests seront à réaliser pour vérifier d'une part la tenue mécanique des cellules au sein du microsystème et d'autre part l'influence que causeront ces forts débits, causant ainsi une déformation de la cellule sur la réponse du BioMEMS. Comme nous venons de le décrire, l'écoulement dans le microcanal doit être fait à faible vitesse pour éviter un détachement des cellules. Par exemple pour un débit de $150\text{nl}/\text{min}$, une molécule à tester dispensée par une seringue localisée à 10cm de la zone de mesure (valeur minimale par rapport au pousse seringue, les appareils de mesure externe ...) avec un tube connecteurs de $1,5\text{mm}$ de diamètre interne (correspondant approximativement à $18\mu\text{l}$) a besoin de 120min pour arriver sur la zone de mesure. Afin de réduire ce temps, nous avons choisi une géométrie en Y (Figure 3. 4).

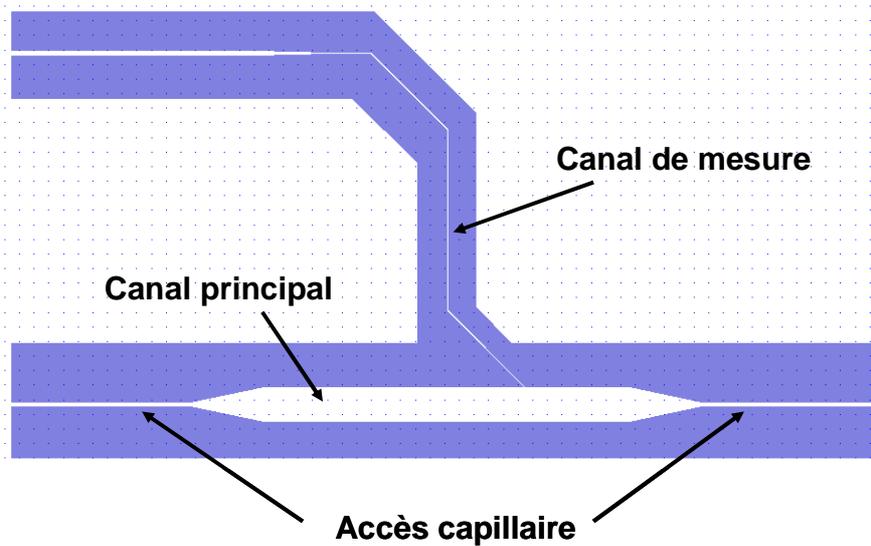


Figure 3. 4 : Structure microfluidique retenue pour le BioMEMS, constituée d'un canal principal et d'un canal de mesure.

Une première branche, à large section, permettra de véhiculer plus rapidement les éléments biologiques à tester alors que la seconde, plus réduite aura pour but de réduire le cisaillement sur la zone de mesure et permettra ainsi de travailler sur une plus longue durée sur les cellules. Le canal principal a pour dimension 1mm de largeur sur 1,5cm de longueur, le canal de mesure quant à lui fait 50 μ m de largeur sur 1cm de longueur. Le flux envisagé au niveau du pousse seringue est de l'ordre de 1 à quelque μ l/min afin de passer de 120min à quelques minutes pour apporter dans le dispositif les molécules à investiguer. Nous avons défini une bifurcation Y avec un angle de 45° et les résultats de simulation nous montrent bien une diminution du cisaillement passant à 0,5Pa dans le canal de bifurcation avec un débit de 1 μ l/min (Figure 3. 5). Par contre, la première analyse ne montre aucun effet de l'angle de la bifurcation sur l'écoulement du fluide. Cependant, celui-ci va jouer un rôle sur l'entraînement des cellules au sein du canal de mesure. L'analyse des rapports de section permet d'observer que, plus la taille du canal principal est importante, plus l'effet de la bifurcation sera bénéfique. En effet, la résistance dans le canal principal étant moindre que dans le canal de mesure, à débit constant, l'écoulement et donc le cisaillement sont fortement réduits.

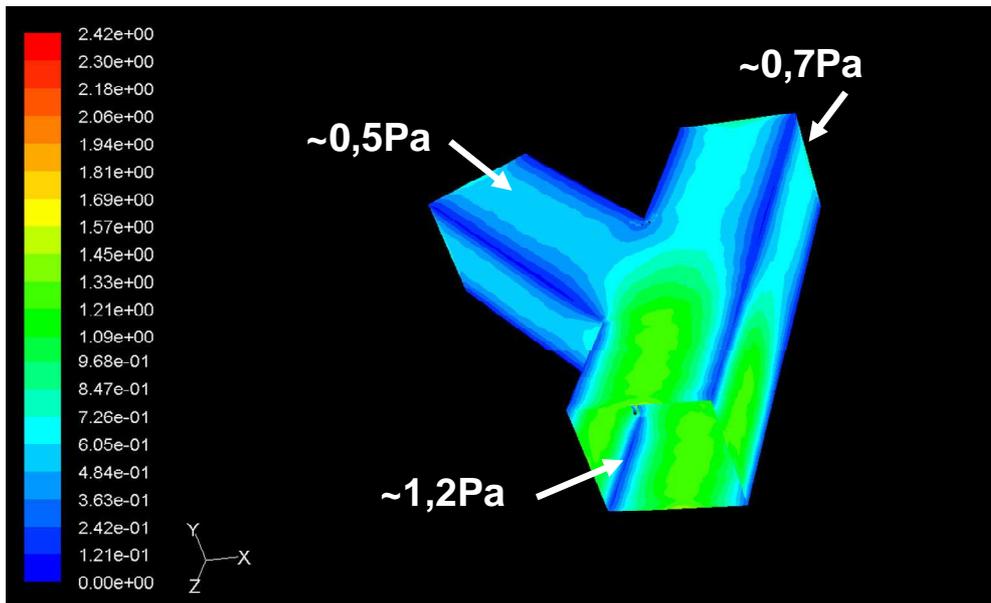


Figure 3. 5: Simulation de la répartition des flux dans la structure

Pour valider cette étude microfluidique, les chercheurs de l'UTC de Compiègne ont réalisé un canal de section $50\mu\text{m} \times 50\mu\text{m}$ et utilisé des capsules modélisant les cellules en écoulement. Dans un canal de section carrée, la déformation des capsules qu'ils ont utilisées est difficile à observer, à cause de la trop grande rigidité de celles-ci.

Des simulations ont donc été réalisées avec une cellule immobilisée au sein du microcanal. Du fait de la réduction de la taille du passage, l'écoulement s'accélère et le cisaillement sur les parois est également augmenté (Figure 3. 6). Au niveau de la cellule, on obtient une valeur de cisaillement de l'ordre de $0,04\text{Pa}$ pour des débits de $9\mu\text{l/h}$. Comme cette valeur est largement inférieure à 1Pa (10 Dynes/cm^2), les cellules ne devraient pas subir trop de dommage (Figure 3.2).

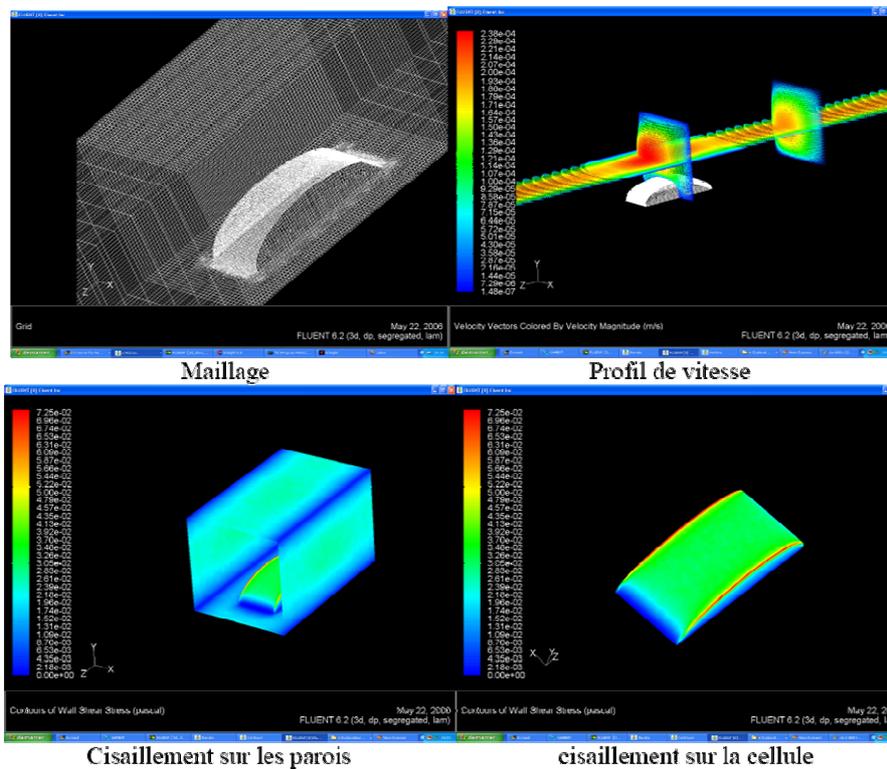


Figure 3. 6: Simulation de l'écoulement dans un microcanal de 50 μ m x 50 μ m avec une cellule allongée au centre.

Une fois l'étude microfluidique terminée, nous sommes passés aux tests pratiques sur la structure définie précédemment. Le dispositif complet est composé du BioMEMS, des sondes de l'analyseur, du système de pompage extérieur, composé d'une micro seringue, et des capillaires d'alimentation en solutions biologiques. La circulation du fluide biologique est réalisée à l'aide de pousses seringues automatisées (Figure 3.7). Ceux ci sont référencés KDS100 de la société KD scientific, et permettent des vitesses de translation du piston de seringue d'environ 2,1 μ m/min à 212 μ m/s. Ils supportent des seringues de 10 μ l à 60ml. Avec une seringue de 10 μ l, nous obtenons des débits compris entre 0,1 à 126 μ l/h. L'aiguille de la micro seringue est en inox et interchangeable avec un diamètre interne de 180 μ m et externe de 520 μ m avec un embout plat. Celle ci est connectée au tube capillaire par un système de raccord par manchon du fabricant Upchurch scientific (Figure 3. 8).

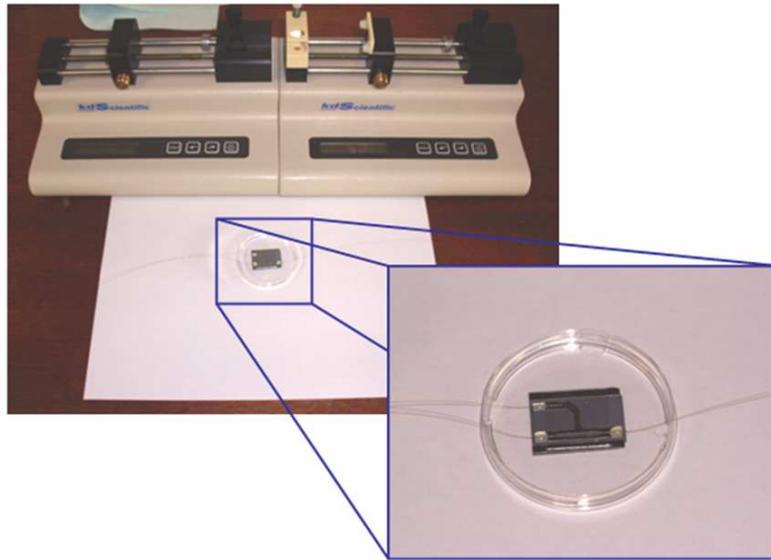


Figure 3. 7: Illustration du dispositif relié par des capillaires aux pousSES seringues

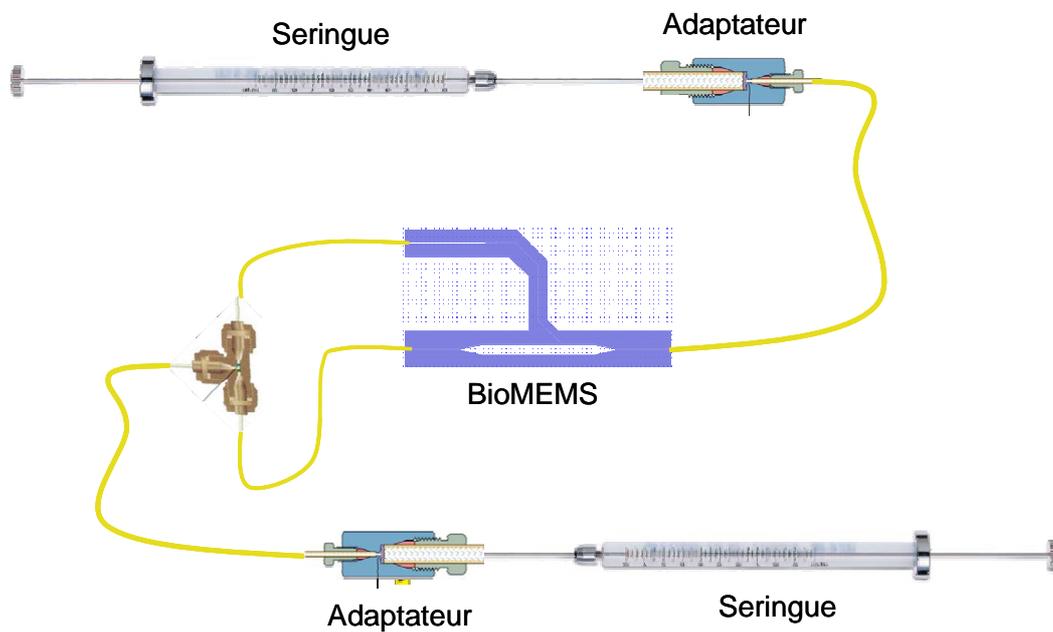


Figure 3. 8: Schéma de la connectique microfluidique pour injection des solutions biologiques.

Une première série de tests a été réalisée avec de l'eau desionisée (viscosité =1mPa.s) à un débit de 100nl/min sur le dispositif pour voir d'éventuelles fuites lors de l'assemblage des

différentes parties du BioMEMS. Les capillaires d'entrée et de sortie sont de longueur 15cm avec un diamètre interne de 70 μ m. Aucune fuite n'est observée pendant la durée des tests (plusieurs heures). Nous avons par la suite augmenté le débit jusque 1 μ l/min sans observer de fuite. Le second point important à vérifier est que le liquide passe bien dans la bifurcation. Nous pouvons voir sur la Figure 3. 9, le fluide dans le canal principal mais également dans le canal de mesure.

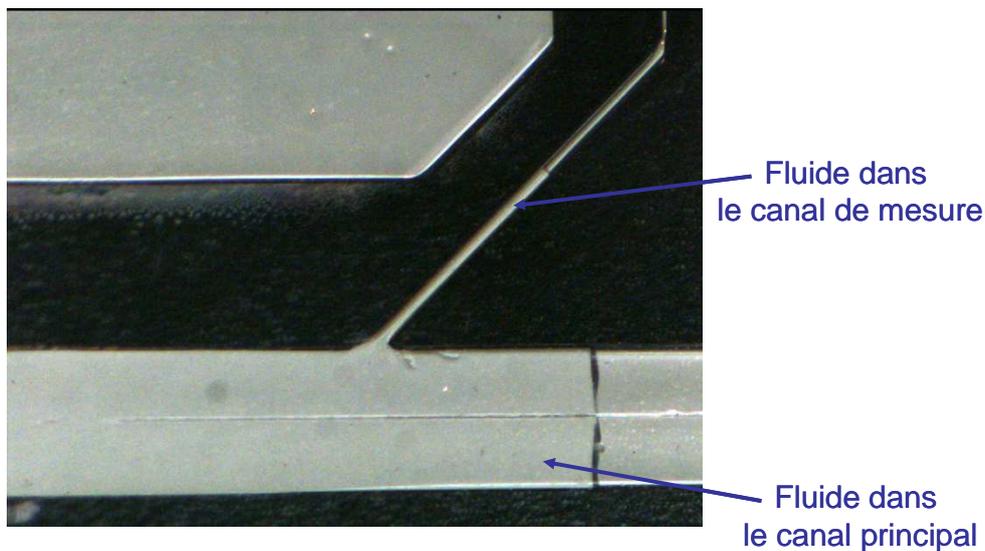


Figure 3. 9 : Propagation du fluide dans le canal principal et le canal de mesure

Une fois les tests microfluidiques terminés, nous sommes passés à l'injection de cellules vivantes. Nous avons injecté une solution de milieu de culture avec des cellules en suspension dont le nombre est important (10 millions par ml). Nous pouvons observer sur la Figure 3. 10 que des cellules circulent dans le canal de mesure.

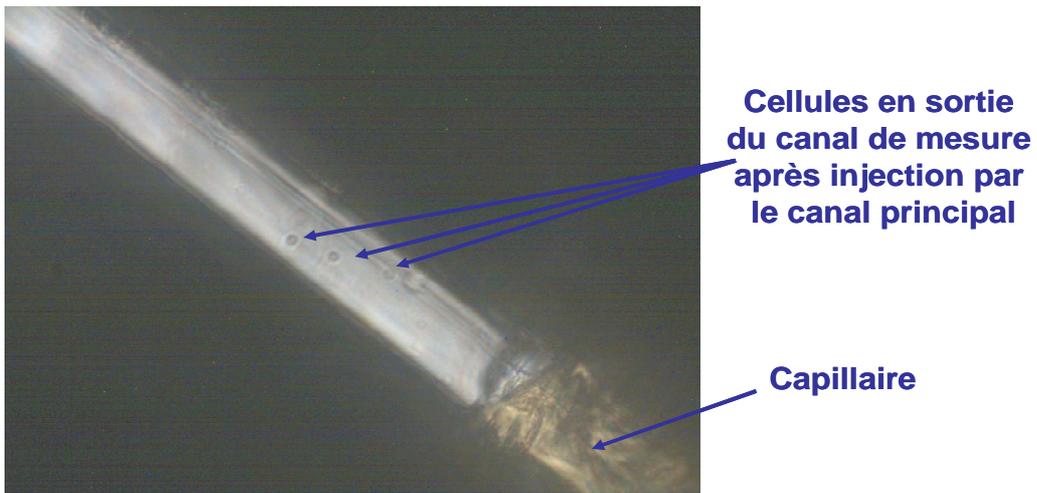


Figure 3. 10: Cellules en sortie du canal de mesure

III. Aspect THz

Le but de cette sonde est de caractériser des entités biologiques, dans notre cas des cellules vivantes, d'un point de vue électromagnétique très haute fréquence. Ce processus de mesure est la spectroscopie diélectrique. Etant donné le peu de données diélectriques sur cellules uniques à ces fréquences (0,45MHz à 1THz), la caractérisation s'effectue sur une très large bande de fréquence. De ce fait, les méthodes de mesure par résonateurs ou par cavités qui ont une réponse sur une bande étroite de fréquence ne sont pas utilisées dans un premier temps, mais seront envisageables dans la suite de ce travail comme décrit dans le chapitre II. La caractérisation à l'aide d'une ligne de propagation électromagnétique, malgré une précision inférieure aux méthodes utilisant les résonateurs, est préférée pour la largeur de bande qu'il est possible d'investiguer. Nous allons utiliser la ligne décrite dans le chapitre précédent. Elle se compose de deux transitions coplanaire-goubau et d'un ruban de $5\mu\text{m}$ de large (Figure 3. 11). Pour obtenir de meilleures performances et une meilleure sensibilité, nous allons travailler sur un substrat de faible épaisseur et de faible permittivité, notamment en réalisant des structures sur membrane. Nous avons choisi d'utiliser le BCB.

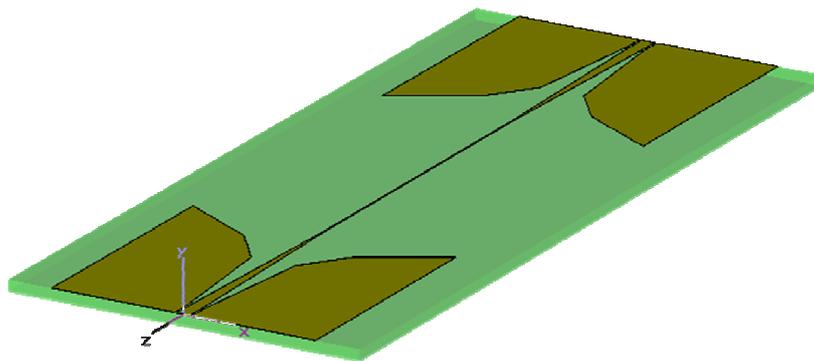


Figure 3. 11: Structure électromagnétique sur membrane de BCB

A ce stade de l'étude, nous avons développé un microsystème pour l'investigation sur cellule vivante, assez simple à réaliser, composé de matériaux compatibles biologiquement comme

nous le montrerons dans la suite de ce chapitre, et possédant également de bonnes qualités électromagnétiques. Nous travaillons en effet avec des milieux aqueux, causant des pertes considérables dans nos gammes de fréquences. Nous devons avoir un niveau de transmission relativement élevé à vide, pour augmenter notre sensibilité au cours des phases de mesure sur substance biologique.

Une première étude de simulation a été effectuée pour voir la sensibilité de notre structure avec différents liquides couramment utilisés et dont nous connaissons le modèle aux fréquences qui nous intéressent [3. 1]. Nous avons simulé notre structure avec de l'eau, du méthanol, de l'éthanol et du 1-Propanol. Nous avons tracé leur évolution de permittivité en fonction de la fréquence en utilisant un modèle de Debye du second ordre (Figure 3. 12).

$$\epsilon_r = \epsilon_\infty + \frac{\epsilon_{statique1} - \epsilon_\infty}{1 + j\omega\tau_1} + \frac{\epsilon_{Statique2} - \epsilon_\infty}{1 + j\omega\tau_2} \quad \text{Équation 3.2}$$

Nous reportons dans le tableau suivant les paramètres pour les différents liquides à investiguer.

Liquide	$\epsilon_{statique1}$	$\epsilon_{statique2}$	$\epsilon_{statique\infty}$	τ_1	τ_2
Eau	77,97	6,18	4,59	8,32ps	1,02ps
Methanol	32,50	5,91	2,79	51,5ps	7,09ps
Ethanol	24,32	4,49	2,69	163ps	8,97ps
1_Propanol	20,43	3,74	2,44	329ps	15,1ps

Tableau 3. 2 : Paramètres de permittivité et de relaxation pour diverses solutions

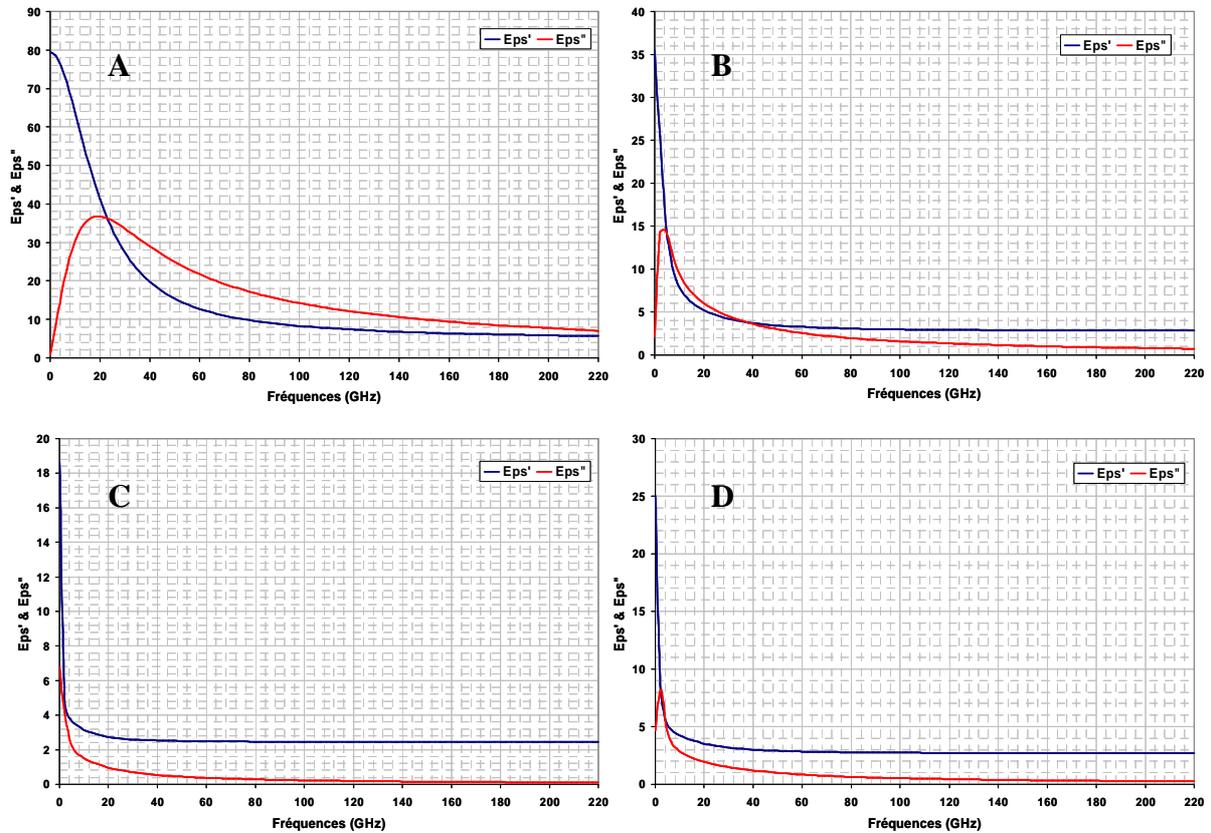


Figure 3. 12 : Modèle de Debye du second ordre pour différentes solutions, A : Eau, B : Méthanol, C : 1_Propanol, D : Ethanol.

Nous avons donc simulé notre structure constituée de la ligne de propagation et des murs en silicium des microcanaux comme le montre la figure suivante (Figure 3. 13).

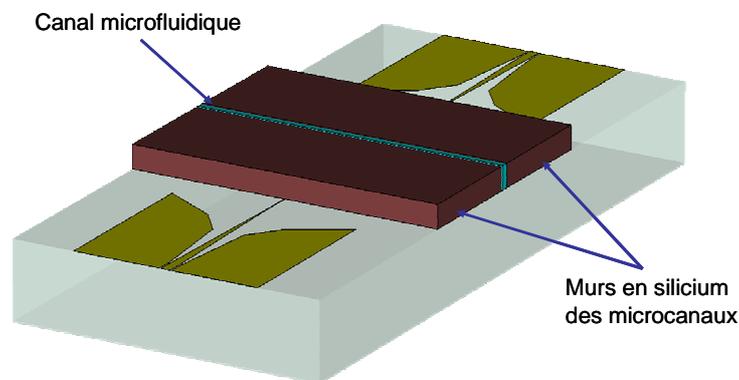


Figure 3. 13: Structure simulée avec variation du liquide au sein du canal microfluidique

Nous avons simulé une structure la plus proche possible du dispositif final. Elle est réalisée sur un substrat de quartz. Nous avons ajouté les murs des microcanaux en silicium et nous avons rempli celui-ci des différents liquides. Nous avons reporté sur la Figure 3. 14, les paramètres de transmission correspondants.

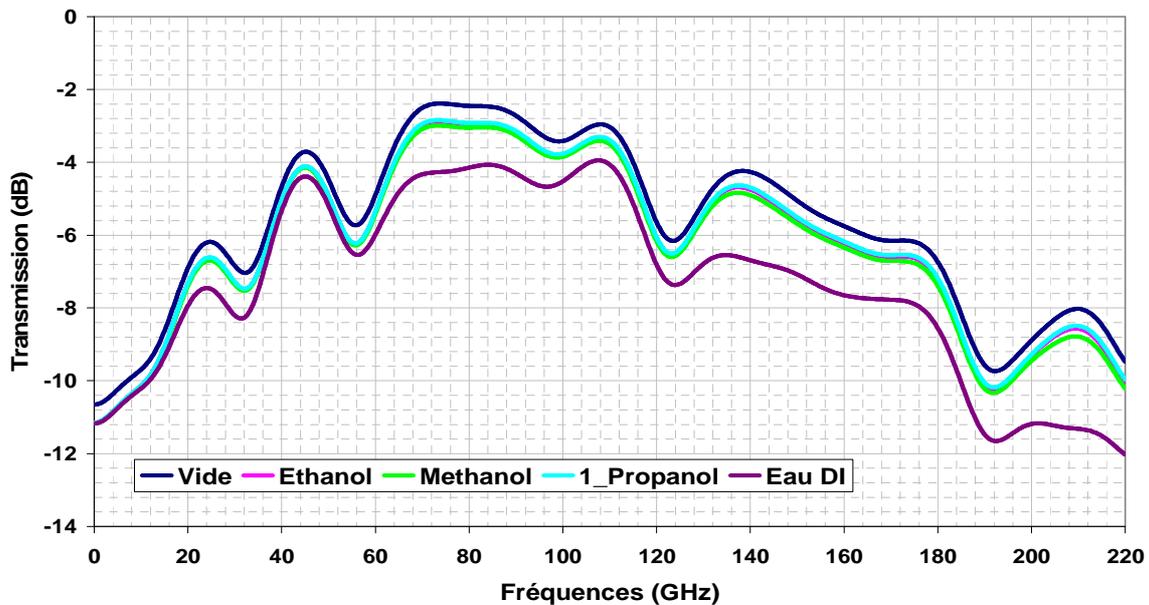


Figure 3. 14: Paramètre de transmission pour les différents liquides investigués

Nous pouvons remarquer une bonne différenciation entre le niveau de transmission à vide et avec un liquide. Le niveau des pertes causé par l'eau par rapport aux autres liquides est dû à son caractère fortement polaire. Il reste assez faible compte tenu des faibles volumes investigués et est tout à fait compatible avec la dynamique de mesure de nos instruments. En effet le canal de mesure ne fait que $50\mu\text{m}$ de large, ce qui est 25 fois plus petit que la longueur d'onde à 220GHz. Pour accroître ce niveau, nous avons la possibilité (comme nous l'avons vu dans le chapitre II) de réaliser des coudes dans le canal de mesure pour augmenter cette interaction onde liquide.

Pour la réalisation des lignes hyperfréquences au sein du BioMEMS, nous allons utiliser dans un premier temps une structure classique. En vu du process technologique que nous détaillerons par la suite, nous allons réaliser une structure avec de longs accès coplanaires pour faciliter le toucher des pointes hyperfréquences (Figure 3. 15).

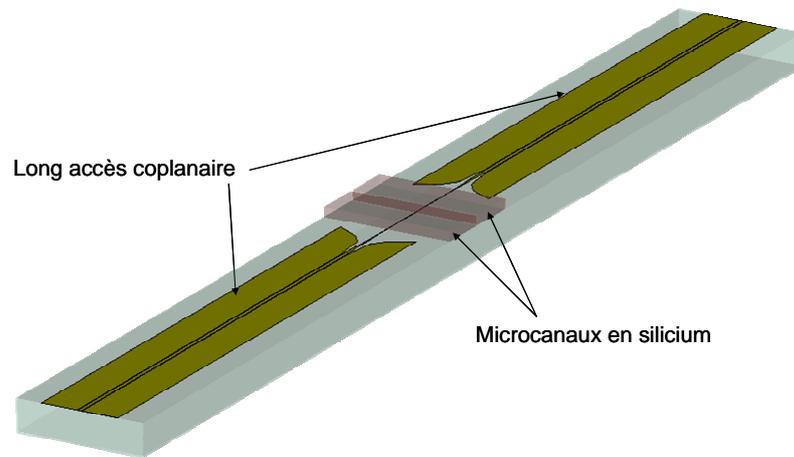


Figure 3. 15 : Structure microonde choisie pour être réalisée sur le BioMEMS

Nous avons mesuré cette structure sans les microcanaux pour connaître le niveau des pertes uniquement de la ligne hyperfréquence. Nous avons obtenu les résultats suivants dans la bande 140-220GHz.

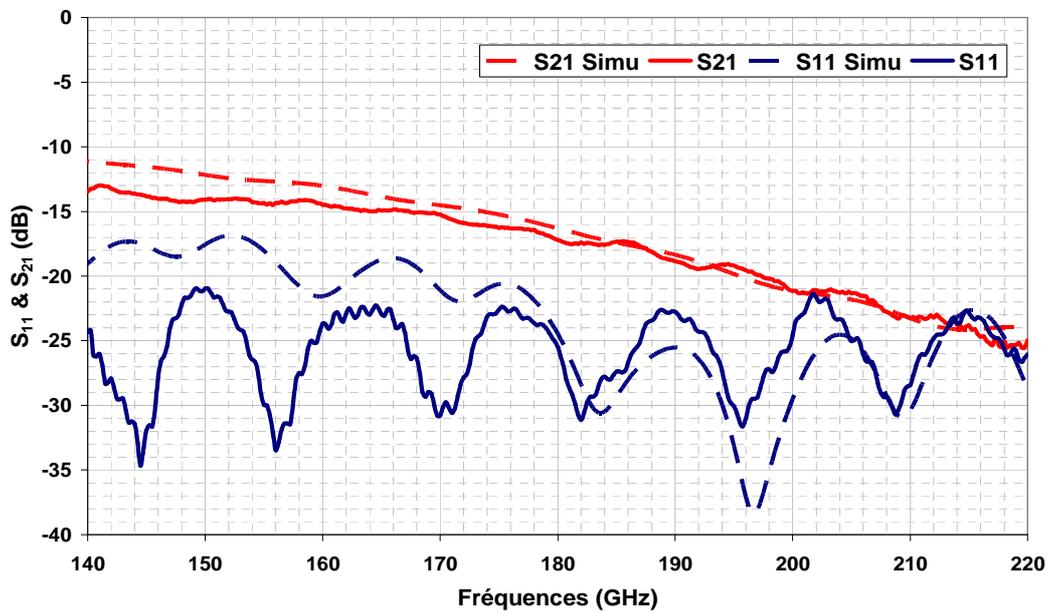


Figure 3. 16 : Paramètre de transmission et de réflexion de la partie hyperfréquence du BioMEMS.

Troisième Partie : BioMEMS THz pour l'étude de la signalisation cellulaire

Si l'on regarde les paramètres de propagation ci-dessus (Figure 3. 16), nous pouvons remarquer un niveau de pertes assez important qui est lié à la taille de la structure. En effet les accès coplanaires font 8mm de longueur de chaque côté de la structure, ce qui nous fait 16mm d'accès coplanaire en plus des deux transitions et de la ligne de Goubau de 2mm de longueur. La structure complète mesure donc environ 20 mm de longueur. Néanmoins, ce niveau de pertes reste compatible avec les dynamiques de mesures puisque l'analyseur de réseaux jusque 110GHz permet des mesures à -90dB et l'analyseur jusque 220GHz à -70dB.

IV. Fabrication du BioMEMS THz

Le choix d'une technologie est déterminé par de multiples contraintes. Dans le cas de notre étude, où l'objectif est la réalisation d'un microsystème dédié à l'analyse de cellules vivantes par spectroscopie électromagnétique, se cumulent les contraintes liées à la biologie, à l'électromagnétisme et à la microtechnologie. Au sein d'un tel microsystème, l'interaction entre les cellules et les parois des microcanaux est accentuée par la miniaturisation de l'architecture qui accroît le rapport surface sur volume. Il est donc essentiel de respecter des conditions de biocompatibilité. De plus, tous les matériaux utilisés lors du procédé de fabrication doivent être neutres vis-à-vis des liquides biologiques transportés. Dans le cas contraire, la détérioration du milieu de culture de la cellule entraîne une détérioration de celle-ci, voire même sa mort.

Le choix des matériaux doit également être effectué en tenant compte des étapes technologiques de fabrication du microsystème. Dans ce cas, il faut non seulement fabriquer l'objet, mais également s'assurer que les cellules peuvent adhérer et proliférer en son sein. Cette double exigence implique la convergence, dans un processus commun, des étapes de fabrication (issues de la microélectronique) et de la chimie de surface pour les éléments biologiques qui entreront dans la conception du BioMEMS. Le choix des matériaux a également son influence sur l'aspect électromagnétique de notre dispositif, car pour garder une bonne sensibilité de mesure, il nous faut utiliser des matériaux possédant de faibles pertes dans les gammes de fréquences investiguées et également compatibles avec un procédé de fabrication facile à mettre en œuvre.

Le choix de la filière technologique repose sur une technologie mixte Silicium/Quartz/Polymère composée de matériaux couramment utilisés en microélectronique qui sont le BCB, le silicium et le quartz. Ces matériaux possèdent de bonnes caractéristiques mécaniques et de bonnes performances hyperfréquences comme nous avons pu le voir dans la partie précédente. De plus ces matériaux, à l'exception du silicium, sont transparents et

permettent donc le suivi des entités biologiques au sein du dispositif. Il est possible également de structurer ces matériaux avec les techniques classiques de la microélectronique.

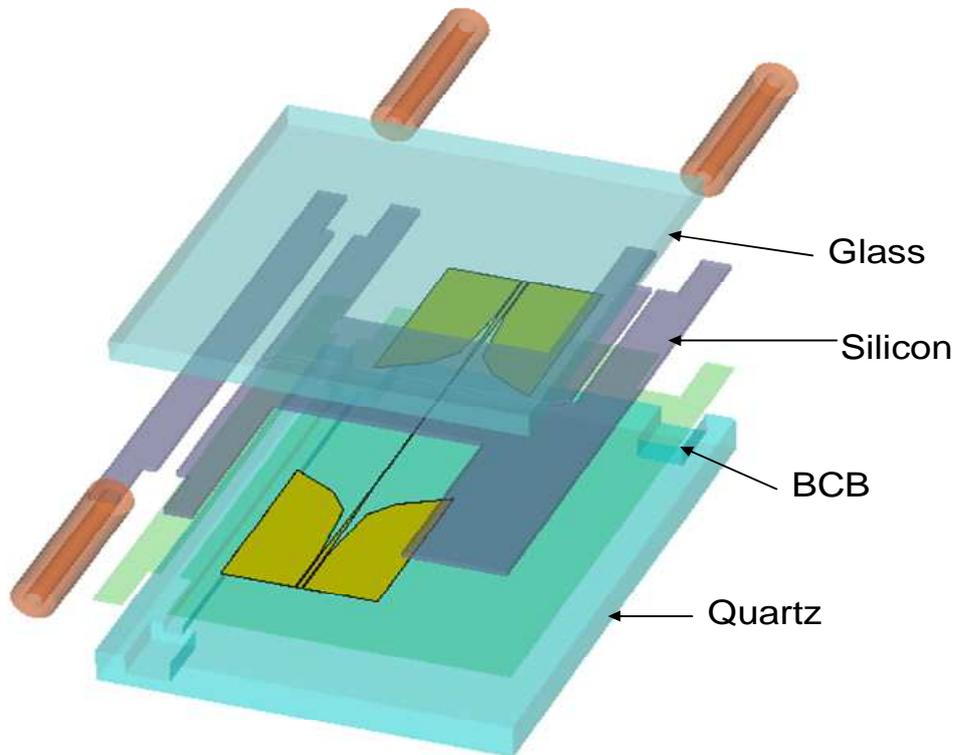


Figure 3. 17: Vue éclatée du BioMEMS montrant les différents matériaux utilisés pour sa réalisation.

Le quartz va nous servir de substrat diélectrique pour la propagation électromagnétique. C'est sur celui-ci que sera déposée notre ligne de propagation. Le silicium va nous servir à créer les microcanaux. Mais comme nous le savons, le silicium n'est pas transparent, contrairement à notre objectif. Ce paramètre est important pour les biologistes afin de suivre les cellules vivantes et vérifier leur état de santé avant et après avoir effectué les mesures hyperfréquences. Nous allons donc graver une fenêtre d'observation dans le silicium. Le BCB nous servira de couche de collage entre le substrat de quartz et le substrat de silicium. Nous allons à présent détailler les différentes étapes technologiques.

IV.1. Matériau et procédés technologiques utilisés

IV.1.1. Le BCB

Le Benzo Cyclo Butene (BCB) est un polymère développé par la société DOW Chemical sous le nom de Cyclotène pour des applications en microélectronique [3. 2]. Ces caractéristiques font du BCB un polymère très intéressant pour des applications en microélectronique, comme par exemple dans des circuits. Il est utilisé pour des interconnexions multicouches. Initialement, le but du BCB était de remplacer la silice en tant que matériau diélectrique, puis son utilisation s'est étendue à la fabrication de guides d'ondes optiques à faibles pertes. Il existe deux types de BCB ; le BCB à gravure sèche (série 3000) et le BCB photosensible (série 4000) [3. 3]. Le BCB série 3000 présente un inconvénient majeur lié à sa gravure sèche par plasma, ce qui induit un niveau de masquage supplémentaire et une pollution importante du bâti de gravure. Le BCB photosensible, série 4000, se traite comme une résine optique négative, mais l'inconvénient est ici d'ordre microtechnologique. En effet, avec cette série, il est très difficile de réaliser des couches importantes tout en gardant son intérêt au niveau révélation. Nous sommes généralement limités à 10 μ m par couche de dépôt et il devient difficile d'en déposer plus de deux successives. Au contraire, avec la série 3000, nous pouvons atteindre des hauteurs de l'ordre de 30 μ m par monocouche en utilisant un BCB à forte viscosité. Pour réaliser des dépôts de hauteur souhaitée, il existe différentes sortes de BCB avec des viscosités différentes [3. 4].

Le principe de dépôt du BCB est le suivant : la première étape consiste à déposer un promoteur d'adhérence après nettoyage du substrat. Ce promoteur a pour but d'assurer une bonne accroche du diélectrique sur le wafer. Le dépôt du BCB, se fait à la tournette. L'épaisseur déposée dépend de sa viscosité. Après le dépôt, un pré recuit est nécessaire pour éliminer les solvants résiduels. La température et la durée de ce recuit dépendent de l'épaisseur de la couche déposée mais également du support utilisé. Ce recuit peut se faire sur une plaque chauffante ou sous étuve. Pour le BCB photosensible, après insolation, la révélation se fait à la tournette en déposant du révélateur sur toute la surface du wafer. Le temps de révélation est déterminé visuellement à l'apparition d'irisation. Une fois cette étape

réalisée, le BCB doit être recuit afin de le polymériser complètement pour qu'il puisse résister aux différentes étapes ultérieures. La courbe ci-dessous montre les différents états du BCB en fonction de la température.

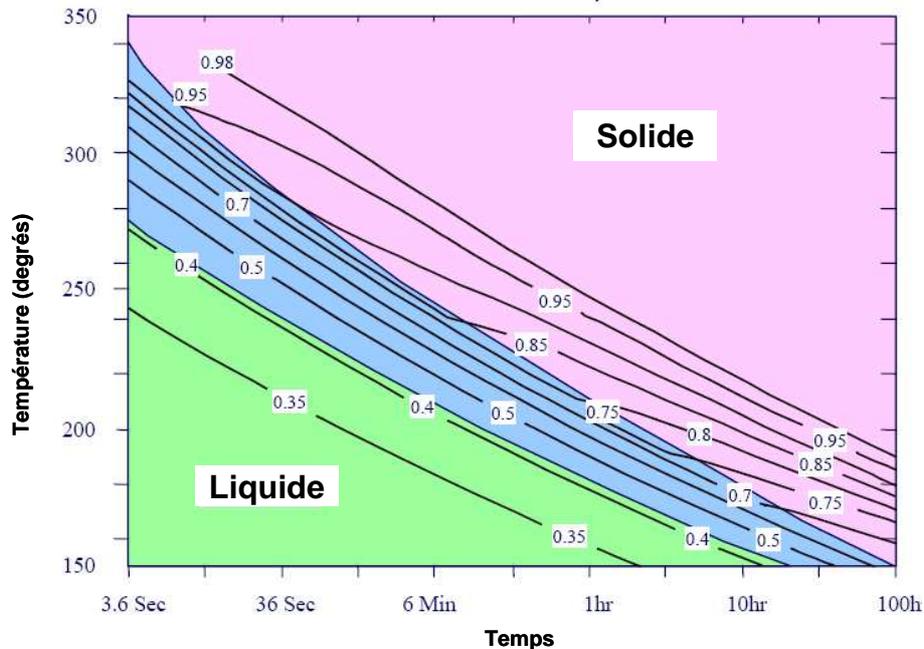


Figure 3. 18 : Etat du BCB en fonction de la température et du temps de recuit [3. 4].

Comme nous pouvons le voir sur la Figure 3. 18, une réticulation pratiquement complète peut être obtenue en quelques minutes à 300°C. Mais généralement, pour éviter les problèmes de contraintes trop fortes, le recuit est effectué à 250°C. Si l'on considère une durée de recuit d'une heure, le taux de conversion est de 98%. Le recuit du BCB se fait sur une plaque SOWATECK qui permet de faire des montées et descentes en température en fonction du temps et d'insérer des paliers de températures. Le recuit du BCB se fait donc suivant la courbe présentée Figure 3. 19.

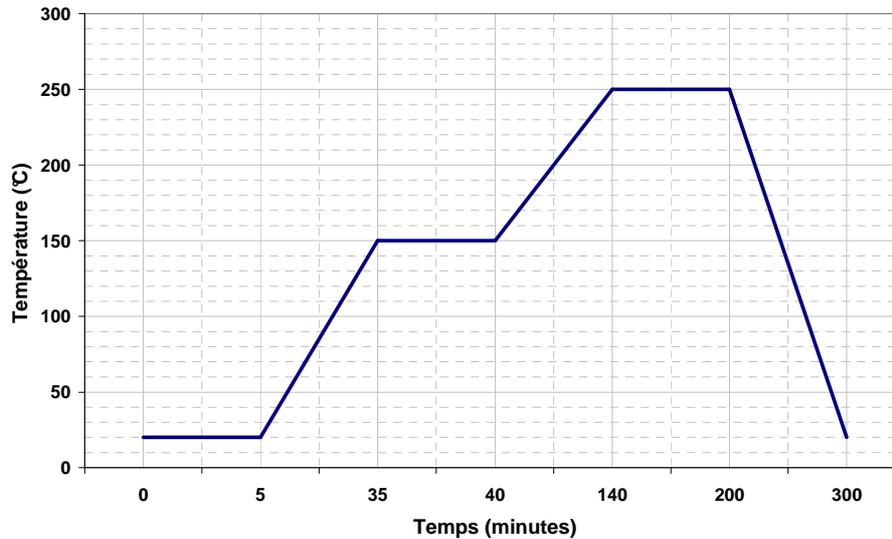


Figure 3. 19 : Courbe de température pour recuit thermique du BCB.

IV.1.2. Dépôt par LPCVD

Comme nous l'avons décrit précédemment le silicium sera gravé pour la réalisation de la fenêtre d'observation. Cette étape sera réalisée par gravure humide dans un bain de KOH. Une couche de nitrure de silicium est réalisée par LPCVD (Low Pressure Chemical Vapor Deposition) pour servir de masque lors de la gravure. Le principe du dépôt par LPCVD est le même qu'un dépôt par CVD. Il s'effectue dans une enceinte sous atmosphère contrôlée, dans laquelle on injecte des précurseurs gazeux comme le SiCl_4 avec de l'hydrogène. Le substrat est chauffé et la réaction chimique de dépôt a lieu en surface après absorption des réactifs gazeux. Les températures du substrat peuvent être très importantes de l'ordre de 1000 à 1500°C. Dans certains cas, les températures de dépôt engendrent des contraintes résiduelles importantes pendant la phase de refroidissement. Ces contraintes dépendent fortement du substrat sur lequel on veut déposer le film et, peut avoir un impact sur la qualité de la couche déposée et sur ses performances. Pour effectuer ce dépôt, nous avons à notre disposition dans la centrale technologique de l'IEMN des fours TEMPRESS composés de trois tubes horizontaux. Le principe de réaction est le suivant :

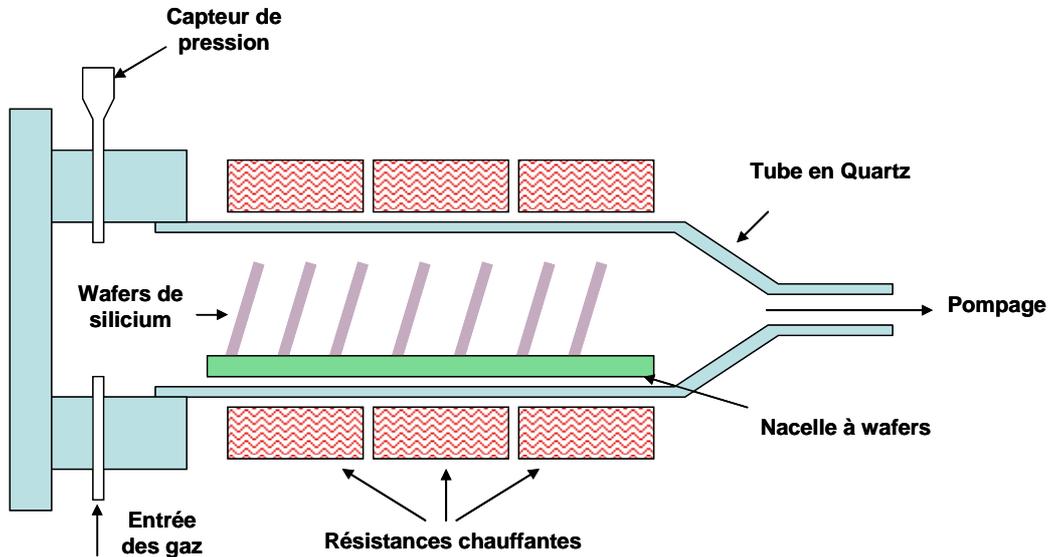
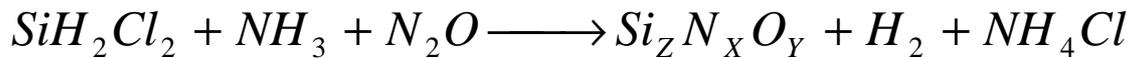


Figure 3. 20: Schéma de principe d'un four LPCVD

Les gaz de process pour déposer de l'oxynitride de silicium sont du SiH_2Cl_2 , NH_3 , N_2O , N_2 , le process est réalisé à 800°C sous une pression de 300mTorr. La vitesse de dépôt est de l'ordre de $50\text{\AA}/\text{min}$. Le fait d'utiliser de faibles pressions permet une diffusion importante des espèces à travers la couche limite (X1000 par rapport à l'APCVD, croissance du film uniquement limité par la réaction de surface). Le LPCVD permet des dépôts de couche extrêmement pure et uniforme sur toute la surface et permet de réaliser des dépôts sur un grand nombre de wafers à la fois. L'inconvénient est sa faible vitesse de croissance par rapport à d'autres techniques.

IV.1.3. La gravure du silicium

Il existe des gravures qualifiées d'humides et des gravures qualifiées de sèches [3. 5]. Cette distinction est liée au procédé d'attaque du matériau. L'attaque humide est un procédé chimique qui retire les atomes à la surface du matériau. Elle se fait donc dans un liquide, d'où

le nom d'attaque humide. Au contraire, l'attaque physique se fait par plasma, comme en RIE (Reactive Ion Etching) ou par ICP (Inductive Coupled Plasma). Elle est engendrée par des chocs de particules sur la surface à traiter. Cette attaque est réalisée sous ultravide d'où le nom d'attaque sèche. L'attaque sèche privilégie des directions particulières de gravure. Elle est anisotrope alors que l'attaque humide est isotrope. Cependant, si le matériau à graver possède des plans cristallins, les résultats d'une attaque humide peuvent être anisotropes.



Figure 3. 21: Profil de gravure du silicium par voie humide ou sèche.

Pour graver le silicium par voie humide, nous allons utiliser le KOH (hydroxyde de potassium) qui est sans doute le produit le plus utilisé pour effectuer des gravures humides rapides du silicium. Il est connu depuis longtemps et on peut trouver des données sur son paramétrage dans la littérature. Sa vitesse de gravure sur une face d'orientation cristalline $\langle 100 \rangle$ peut atteindre $1,4 \mu\text{m}/\text{min}$ dans des conditions optimales de température et de concentration. Cependant, sa sélectivité sur les autres matériaux, mais surtout sur les faces d'orientation cristalline $\langle 111 \rangle$ dépend de sa concentration. On utilise un bain à 80°C et une concentration d'environ 40%, qui correspond à la meilleure sélectivité entre les faces avec un rapport de 1 pour 100. On obtient, avec ces conditions, des vitesses de gravure de $1 \mu\text{m}/\text{min}$ sur des faces d'orientation $\langle 100 \rangle$. Les masques utilisables pour la gravure KOH sont le dioxyde de silicium et le nitrure de silicium, en raison de la haute sélectivité de l'attaque, la gravure de l'oxyde étant déjà 150 fois plus lente que celle d'une face $\langle 100 \rangle$ et celle du nitrure de silicium n'est même pas mesurable sur des gravures d'environ $100 \mu\text{m}$. La gravure humide au KOH a pour caractéristique d'être anisotrope. Un exemple de gravure au KOH est donné

sur la Figure 3. 22. Les flancs de gravure présentent un angle d'inclinaison de $54,7^\circ$ suivant la structure cristalline du silicium.

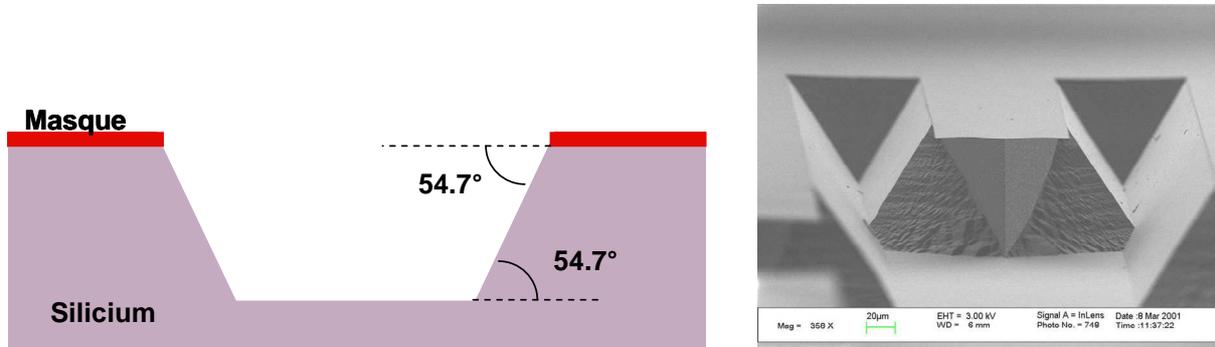


Figure 3. 22: profil de gravure humide du silicium par KOH

Une autre technique pour la gravure du silicium peut être réalisée par RIE ou par ICP [3. 6]. La gravure ionique réactive est une méthode de gravure sèche et d'attaque à partir d'un plasma. Elle se caractérise par une combinaison de deux effets ; une pulvérisation physique et une activité chimique d'espèces réactives. La gravure RIE est basée sur la création d'ions réactifs accélérés par un champ électrique. Cette combinaison permet d'obtenir des gravures anisotropes à flancs droits en fonction des matériaux. En jouant sur les paramètres de pression, de température et de polarisation, il est possible de favoriser l'un ou l'autre des processus. Une polarisation faible, une pression et une température élevées favorisent le processus chimique. Par contre, une tension de polarisation importante et une pression basse favorisent la gravure physique. A basse pression, un champ électrique radiofréquence permet la dissociation des molécules de gaz dans le réacteur. Des ions, des radicaux libres et des électrons sont alors formés. Les électrons sont attirés par le circuit RF situé dans le haut de la chambre plasma où se crée alors une tension d'auto polarisation qui va accélérer les ions vers l'échantillon. L'idée de cette gravure est d'utiliser des gaz ayant une sélectivité de gravure entre certains matériaux de façon à pouvoir masquer les zones à protéger et exposer les zones à graver. Le masque ne sera gravé que mécaniquement contrairement au matériau attaqué chimiquement et mécaniquement par les ions du plasma. On combine ainsi la réactivité chimique des ions avec une action mécanique due au choc de la particule avec le matériau à graver.

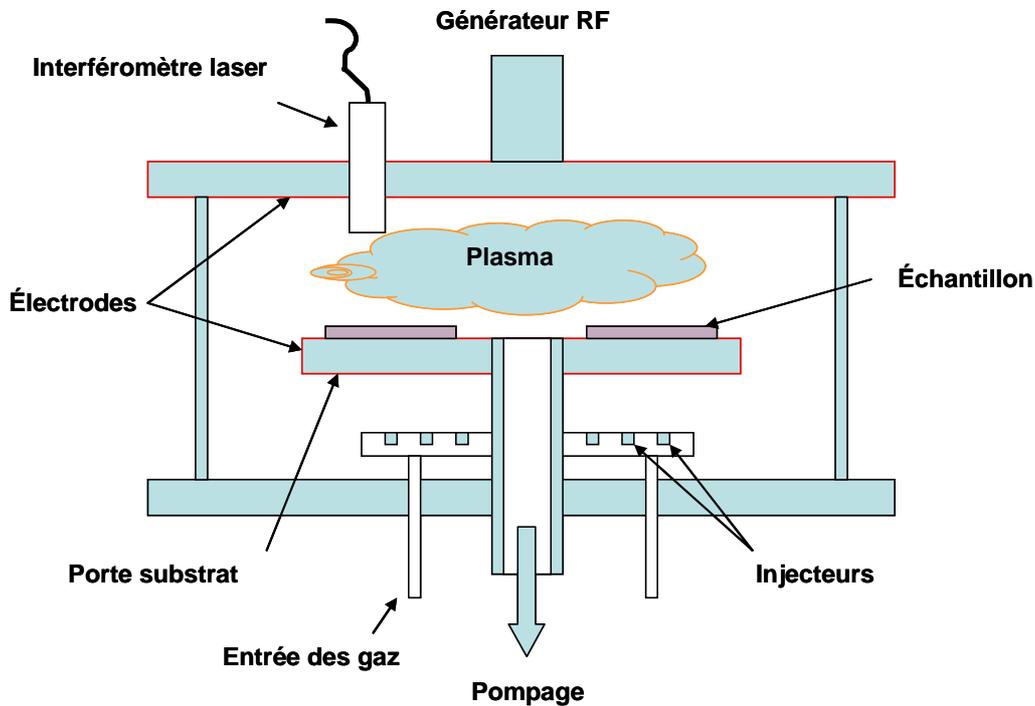


Figure 3. 23: Principe d'un bâti de gravure RIE

L'échantillon est tout d'abord placé dans le bâti de gravure puis l'enceinte est fermée. Un vide poussé est réalisé par un pompage primaire pour obtenir un vide normal, puis l'aide d'une pompe turbo permet un vide poussé. Les gaz entrant dans la composition du plasma sont libérés dans l'enceinte. A la fin du processus de gravure, l'enceinte est ventilée afin d'évacuer les gaz présents et on ouvre ensuite le bâti pour récupérer l'échantillon. Dans les réacteurs qui comprennent des portes substrats horizontaux, les gaz injectés sont destinés à graver la couche de surface. De la même façon, un générateur radiofréquence est utilisé pour générer les espèces réactives dans le réacteur. Sans polarisation particulière des électrodes, l'attaque est en générale isotrope. Cependant, lorsque les matériaux à graver ont des orientations cristallines, la gravure s'effectue suivant les plans cristallins. Le réacteur est dans la plupart des cas équipé d'un système de contrôle de fin de gravure. Il s'agit d'un interféromètre laser dont la période du signal détecté est modifiée lors d'un changement d'espèce à graver.

Troisième Partie : BioMEMS THz pour l'étude de la signalisation cellulaire

Dans le cas d'une gravure profonde, on vient densifier le plasma à l'aide d'inductances stimulées par des signaux à 13,56MHz. Ce procédé est nommé ICP (Inductive Coupled Plasma). Dans ce cas il est possible d'atteindre des vitesses de gravures importantes. De nombreux procédés de micro usinage sont développés, utilisant différents types de gaz, pour créer des gravures extrêmement anisotropes pour des applications MEMS en général.

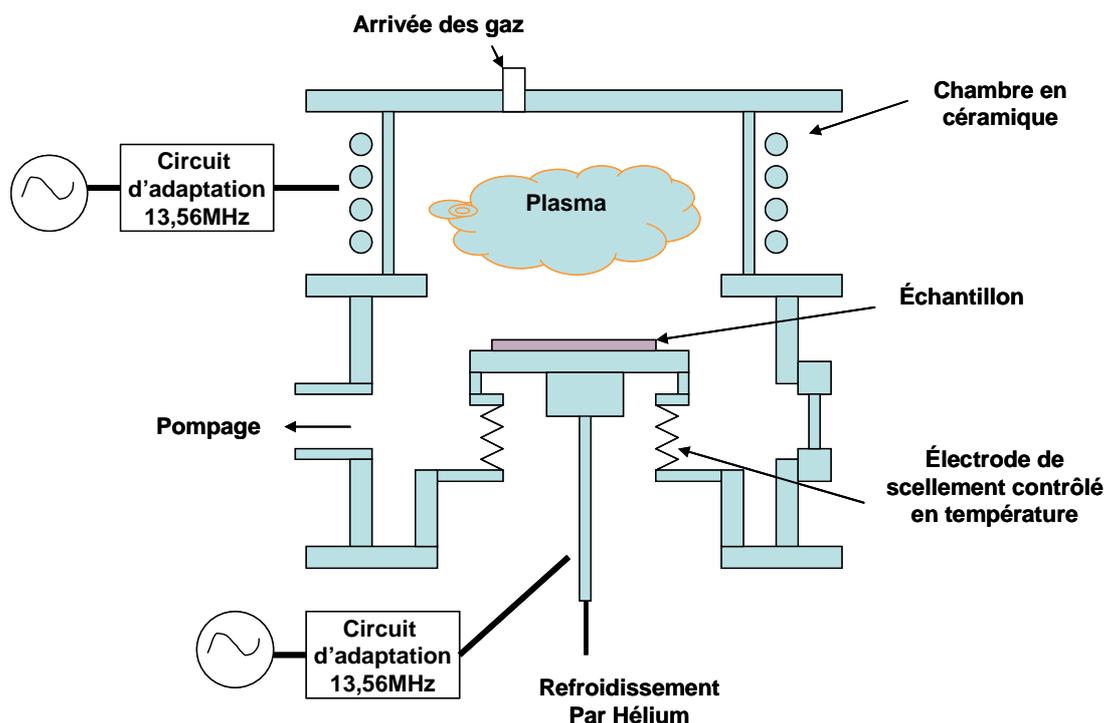


Figure 3. 24: Principe d'un bâti de gravure ICP

Les techniques de gravure par voie sèche RIE ou ICP donnent des gravures anisotropes. Dans certains cas, il est également possible de combiner l'action de différents gaz pour accroître l'efficacité du procédé. En effet, certains gaz provoquent la formation de couches dites de passivation. Il ne s'agit alors plus de gravure mais de dépôts conformes. Il est alors nécessaire de jouer sur l'énergie des ions pour que le fond de gravure soit débarrassé de cette couche mais que les flancs restent protégés. Le procédé de gravure de plus en plus utilisé pour réaliser une gravure anisotrope du silicium par voie sèche est le procédé BOSCH (brevet détenu par Robert Bosch GmbH). Ce procédé utilise un plasma à base de fluor combiné à un plasma de fluorocarbure pour passiver les flancs de gravure et ainsi garantir une bonne anisotropie. Il est

alors nécessaire de passer par des étapes de gravures et de passivations. L'hexafluorure de soufre SF_6 est le gaz utilisé dans ce procédé pour générer les espèces réactives dans un plasma à haute densité. La passivation des flancs ainsi que la protection du masque sont assurées par de l'octofluorocyclobutane (C_4F_8). Cela permet de déposer une couche de polymère à base de fluorocarbone sur les surfaces du substrat. Le profil de gravure est alors réglé par l'ajustement du ratio des temps entre les étapes de gravure et de passivation. L'énergie moyenne des ions unidirectionnels se situe autour de 100eV dans la phase de gravure avec le SF_6 , ce qui permet de retirer uniquement le polymère, déposé durant la phase de passivation, uniquement dans le fond des motifs pour continuer la gravure.

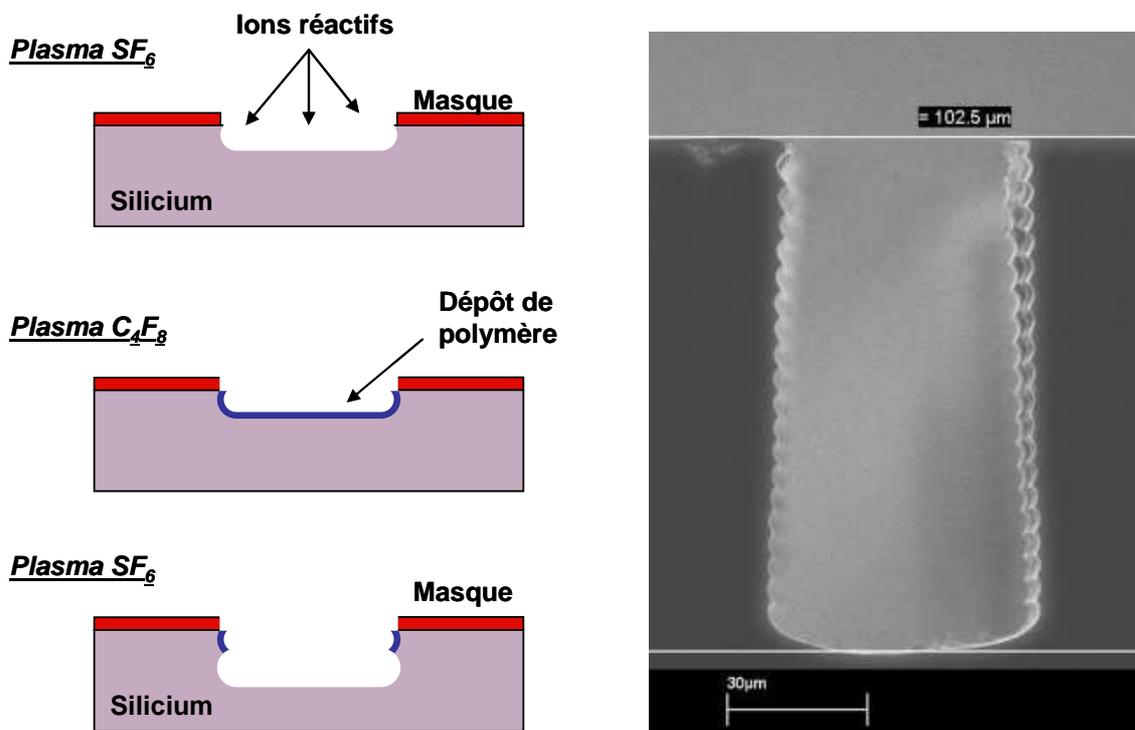


Figure 3. 25: Etape de gravure et de passivation pour obtenir un profil anisotrope du silicium.

Cette technique de gravure sèche ICP en utilisant un procédé Bosch est très intéressante pour la réalisation de microcanaux rectangulaires avec des flancs bien droits. Tandis que la gravure humide avec du KOH permet plutôt d'obtenir des canaux de type trapézoïdaux.

IV.1.4. La métallisation

La métallisation se réalise par évaporation ou par pulvérisation. Le dépôt métallique par évaporation est un dépôt anisotrope car le métal se dépose dans une direction verticale alors que le dépôt par pulvérisation est plutôt isotrope car les atomes sont éjectés d'une cible vers le substrat.

La pulvérisation cathodique est très utilisée. Cette méthode permet de déposer des épaisseurs de métallisation importante (plusieurs microns suivant les métaux), elle permet également une meilleur accroche de ce métal sur la surface du substrat. Le processus de dépôt comporte deux phases et se déroule toujours dans une enceinte sous vide.

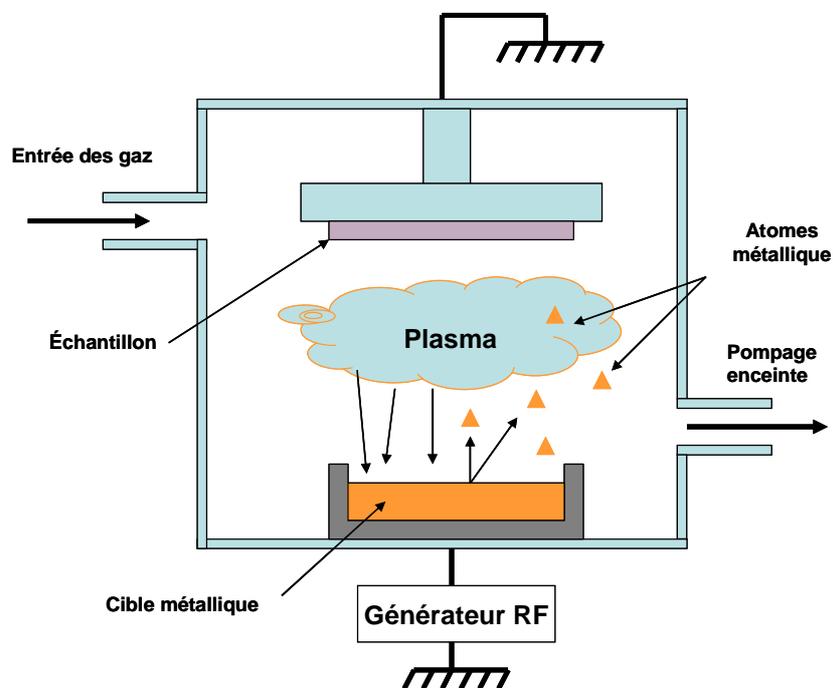


Figure 3. 26: Schéma de principe d'un bâti de dépôt par pulvérisation cathodique

La première étape consiste en l'éjection d'atomes superficiels d'une cible de matériau à déposer par des atomes ionisés d'un gaz. La partie comportant la cible métallique est appelée cathode. La seconde étape est le transfert de ces atomes éjectés sur un substrat que l'on désire métalliser, le porte échantillon est l'anode. Le principe est détaillé sur la Figure 3. 26.

Le dépôt par évaporation, quant à lui, consiste à chauffer un métal de façon à ce que le substrat soit exposé aux vapeurs métalliques (Figure 3. 27). On vient faire chauffer le métal dans une enceinte sous vide jusqu'à l'ébullition. Les atomes du métal se propagent alors en ligne droite et se fixent sur la surface refroidie de l'objet à métalliser. Plusieurs méthodes existent pour faire chauffer le métal (le creuset, le canon à électrons, le filament de tungstène). Le bâti que nous utilisons pour évaporer est chauffé par un canon à électrons. Un échantillon du métal à évaporer est soumis à un intense faisceau d'électron qui le réchauffe jusqu'à l'évaporation.

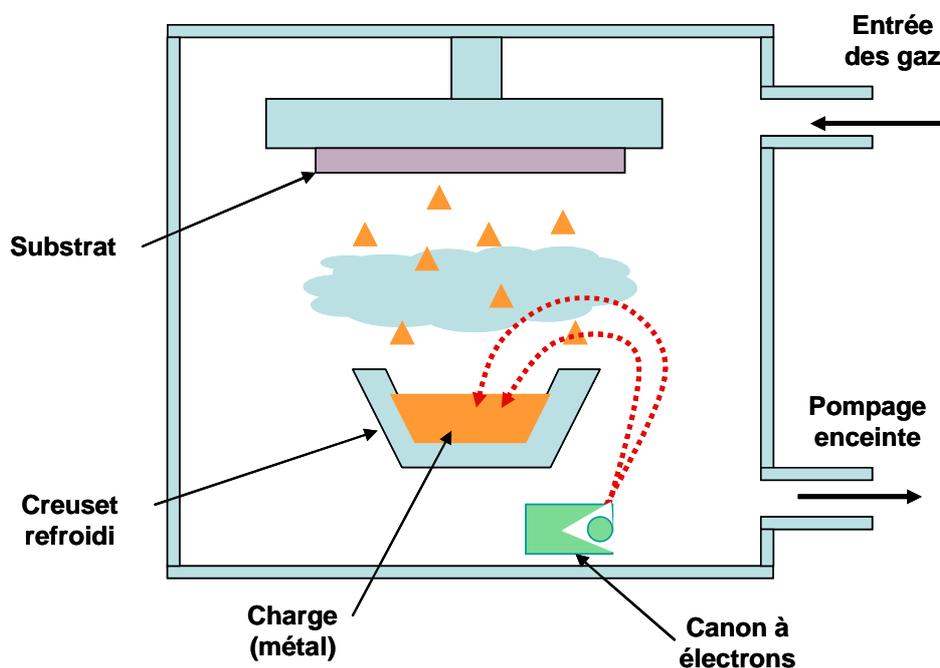


Figure 3. 27: Principe d'un bâti de dépôt par évaporation

Cette technique de dépôt est utilisée en général dans le cas d'un « lift-off ». En effet, grâce à cette technique, le dépôt métallique n'est pas continu autour des motifs, facilitant l'infiltration de l'acétone sous les films métalliques à décoller.

Le lift-off est une alternative à la gravure chimique pour obtenir des lignes métalliques. Ce procédé permet de réaliser des profils de résine sous forme de casquette. Généralement pour utiliser cette technique, on dépose deux types de résines optiques qui vont s'ouvrir plus ou moins vite lors de la révélation. Le principe est détaillé sur la Figure 3. 28.

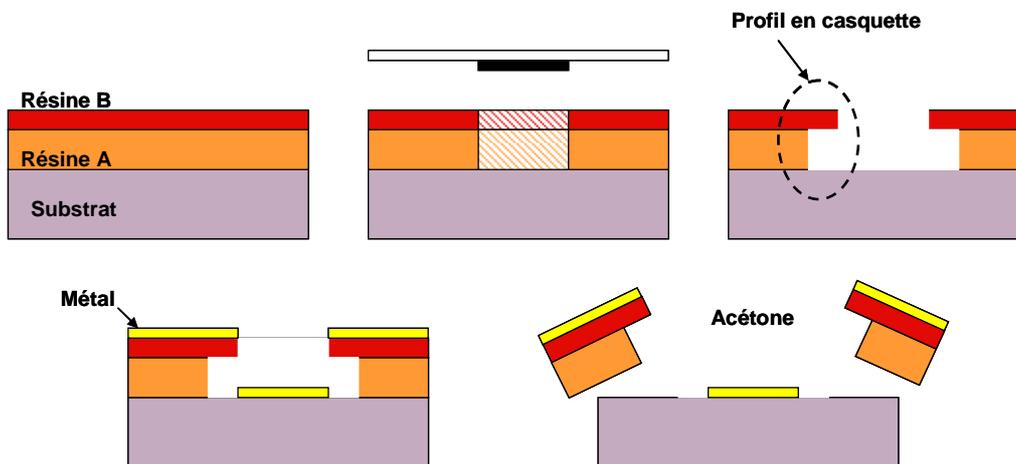


Figure 3. 28 : Etape technologique de réalisation de ligne métallique par lift-off.

Pour obtenir un profil en casquette nous allons utiliser les vitesses de dissolution de la résine dans son développeur. Nous allons déposer une résine A qui à une vitesse de dissolution rapide et une résine B qui à une vitesse de dissolution lente. On vient insoler les deux couches de résine avec une lampe UV et un masque optique. Lorsque l'on plonge l'échantillon dans le développeur approprié, on obtient un profil en casquette. Ensuite on vient métalliser le substrat par évaporation. Pour éliminer le métal non désiré, on plonge le wafer dans l'acétone qui va permettre de dissoudre complètement les deux résines déposées, ainsi que le métal. Seul ne reste que le métal déposé où la résine a été ouverte.

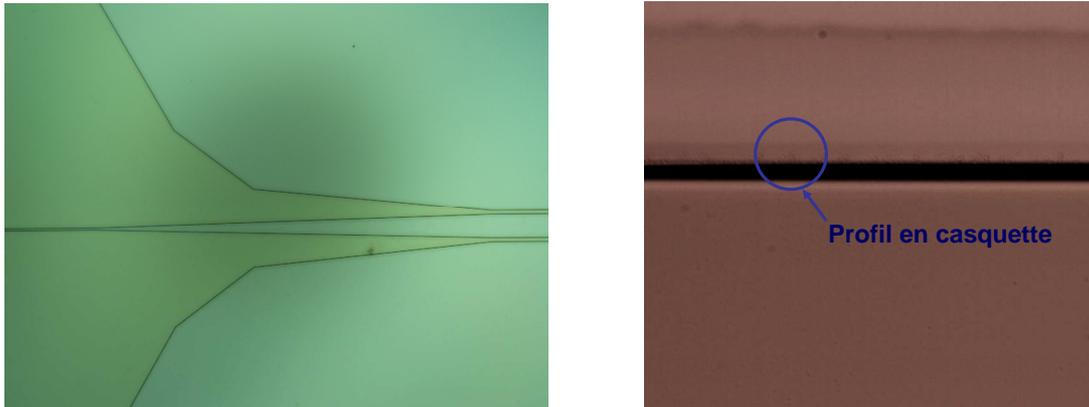


Figure 3. 29 : Illustration d'un profil en casquette

IV.2. Réalisation des microcanaux

Le procédé de fabrication pour la réalisation du niveau comportant les microcanaux commence par un dépôt de nitrure de silicium par LPCVD. Ce dépôt est réalisé sur un substrat de silicium poli deux faces, d'orientation cristalline « 100 » et d'épaisseur 400 μ m. Ce dépôt de nitrure de silicium nous servira de masque pour les différentes étapes de gravure du wafer de silicium qui sera micro-usiné sur les deux faces. Sur une face, les microcanaux seront réalisés par gravure sèche et sur l'autre face le wafer de silicium sera gravé par voie humide jusqu'au microcanaux réalisés précédemment pour les rendre transparent. Les différentes étapes de réalisation de ce niveau sont détaillées ci-dessous :

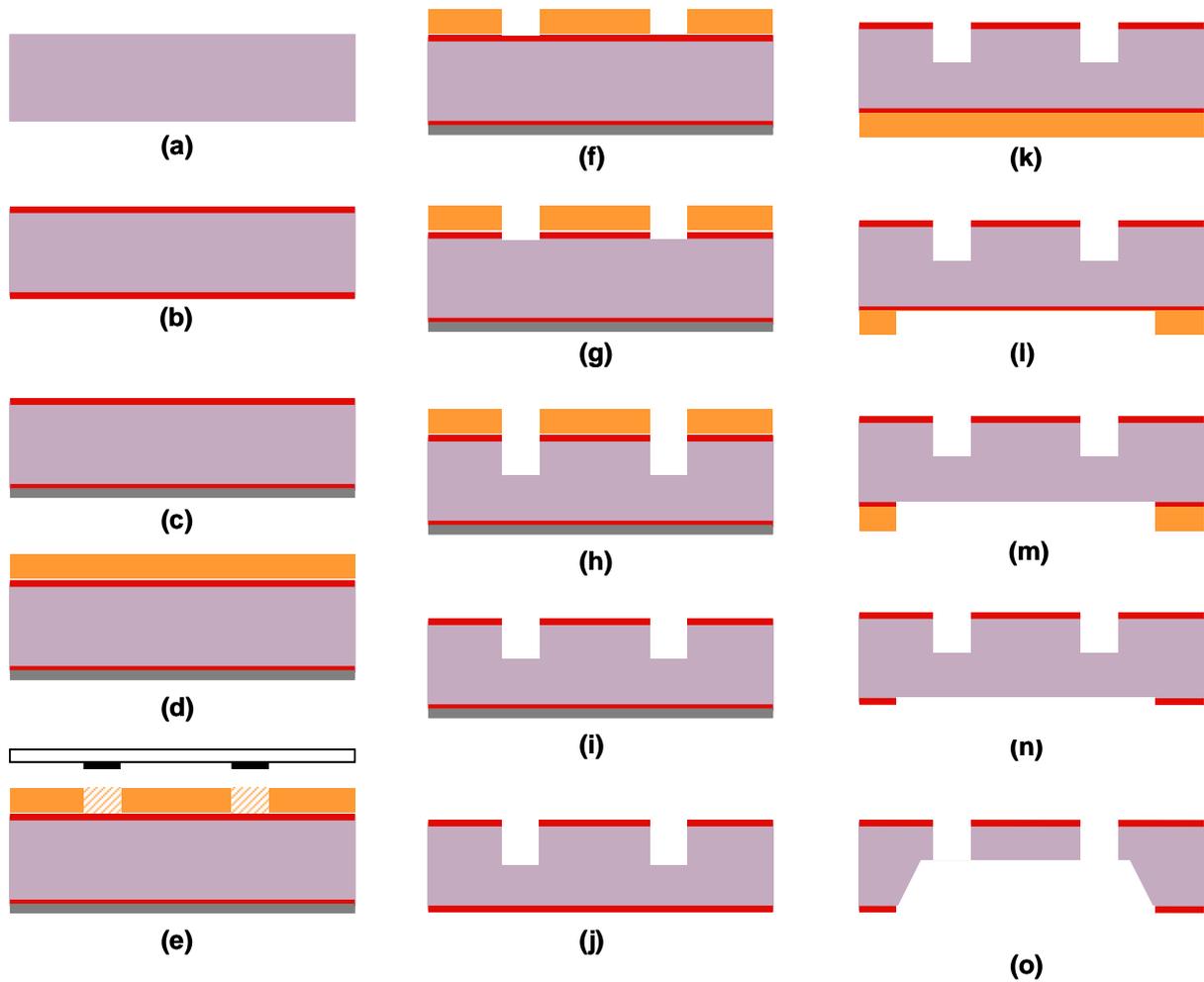


Figure 3. 30: Etape de réalisation des microcanaux.

Nous commençons donc par un dépôt de nitrure de silicium peu contraint Si_xN_y d'épaisseur 200nm déposé par un procédé de LPCVD sur les deux faces du wafers de silicium (Figure 3. 30b). Ensuite nous venons processor la première face. Pour ne pas détériorer la face inférieure, nous allons la protéger par une couche de chrome d'épaisseur 100nm. Ce dépôt de Cr se fait par pulvérisation cathodique sur le bâti Plassys MP450S présent en salle silicium (Figure 3. 30c). Une fois la face arrière protégée, nous allons réaliser l'ouverture du masque de nitrure en face avant pour y graver les microcanaux par voie sèche. Nous allons déposer une couche de résine AZ4562 de $10\mu\text{m}$. Il s'agit d'une résine photosensible positive déposée par enduction (Figure 3. 30d). Cette résine nous servira à la fois de masque pour la gravure du nitrure mais également de masque pour la gravure des microcanaux. Cette couche est exposée

sous une lampe UV de longueur d'onde 400nm à l'aide de l'aligneur MA6/MB6 Suss MicroTec dans lequel nous avons inséré un masque optique représentant les motifs à transférer sur la résine (Figure 3. 30e). Ensuite la couche photosensible est révélée avec de l'AZ351B dilué dans de l'eau DI à 1:3 (Figure 3. 30f). La couche de nitrure est gravée par RIE à l'aide d'un bâti Oxford Plasmalab 80 plus (Figure 3. 30g). Le temps de gravure de cette couche est d'environ 6min (paramètre de temps défini à l'aide de la détection de fin d'attaque présente sur ce bâti). La prochaine étape consiste donc à venir graver le silicium par gravure sèche, qui comme nous l'avons vu précédemment permet d'obtenir des flancs de gravure bien droits pour la réalisation de microcanaux rectangulaires et des accès capillaires. Pour effectuer cette étape nous allons garder le même masque de résine. Pour permettre à celle-ci de résister à l'étape de gravure, nous allons lui faire subir un recuit thermique sous étuve à une température de 110°C pendant 1h, pour venir la durcir. Cette étape permet de graver une grande profondeur avec uniquement un masque de résine. La gravure du silicium est effectuée par gravure profonde par procédé Bosch sur une profondeur d'environ 150µm. Ce procédé est réalisé dans le bâti de la société STS (Surface Technology Systems) de référence Multiplex ICP-ASE. Ce procédé permet d'obtenir des vitesses de gravure de 5µm/min (Figure 3. 30h). Une fois la gravure terminée, il suffit d'enlever la résine à l'acétone et de rincer le wafer processé à l'alcool (Figure 3. 30i). La première face du wafer est terminée. Elle comporte les microcanaux et les accès capillaires. Nous pouvons voir des photos de réalisation de ces structures.

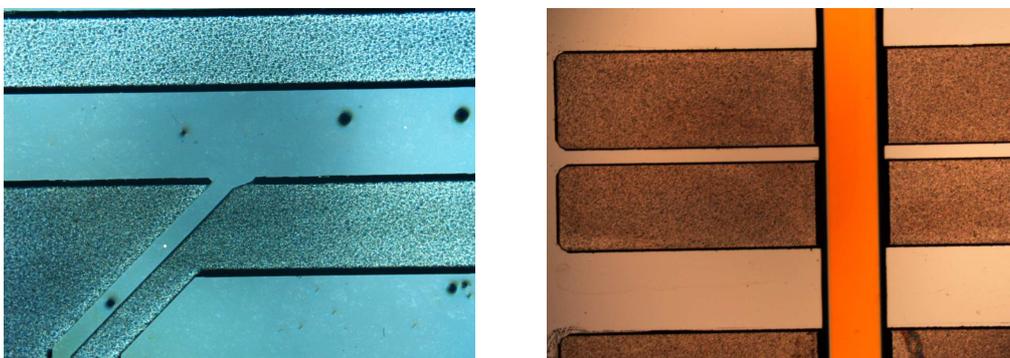


Figure 3. 31 : Photos de réalisation de l'étage composant les microcanaux, A : Microcanaux face avant réalisés par gravure sèche, B : Libération des microcanaux par gravure humide.

Comme nous l'avons défini dans notre cahier des charges, il faut que l'ensemble du dispositif soit transparent et pour cela il nous faut rendre les microcanaux transparents. Nous allons passer à présent la face arrière du substrat. La première étape consiste à venir enlever la couche de protection de Cr à l'aide d'une attaque chimique (Figure 3. 30j). Ensuite un dépôt de résine AZ4562 est réalisé pour venir ouvrir le film de nitrure de silicium (Figure 3. 30k) qui est insolée puis révélée (Figure 3. 30l). Ce film est gravé par plasma RIE comme dans l'étape de réalisation des microcanaux (Figure 3. 30m). La couche de résine servant de masque pour cette gravure est enlevée avec de l'acétone (Figure 3. 30n). La dernière étape consiste à effectuer une gravure humide du silicium. Cette gravure est réalisée dans un bain de KOH chauffé à 80°C (Figure 3. 30o). On vient arrêter la gravure lorsque l'on atteint les microcanaux réalisés précédemment.

IV.3. Réalisation de la partie hyperfréquence

Comme nous l'avons vu dans le chapitre II, la sonde électromagnétique est une ligne de Goubau. Le premier process technologique consiste à réaliser cette ligne sur un substrat de Quartz de 500µm d'épaisseur. Mais il s'est avéré que la propagation de l'onde était influencée par des modes de substrat dues à son épaisseur. Pour assurer une bonne propagation, il nous a fallu réaliser cette ligne sur une membrane de faible permittivité. Pour cela nous avons décidé d'utiliser le BCB.

Nous allons utiliser un substrat de silicium standard deux faces polies d'épaisseur 400µm et d'orientation cristalline <100>. Comme dans l'étape de réalisation des microcanaux, nous allons également déposer du nitrure de silicium peu contraint par LPCVD de 200nm d'épaisseur sur les deux faces.

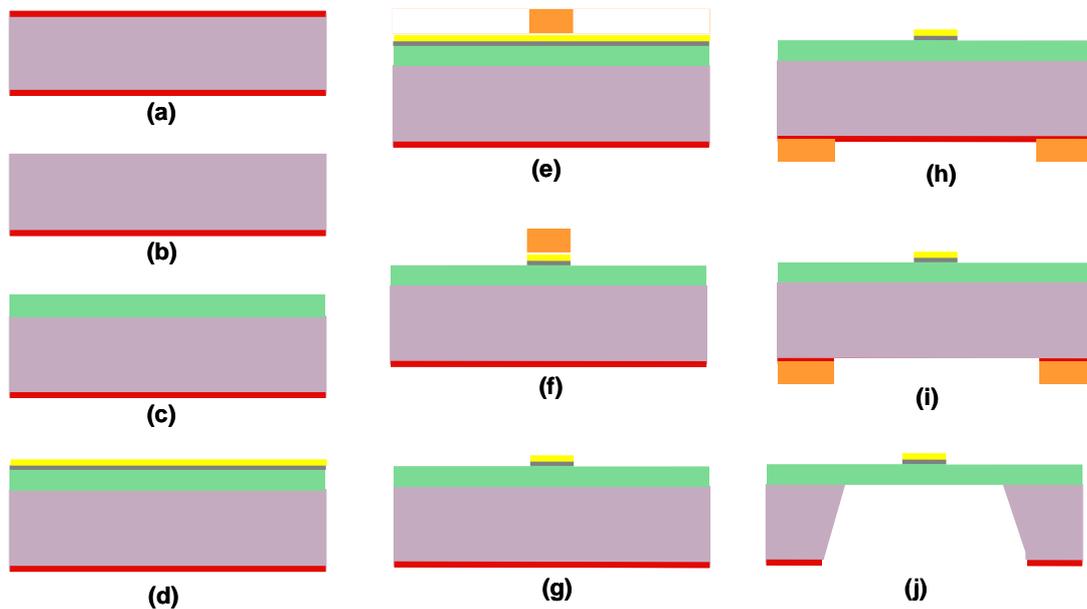


Figure 3. 32: Etape de réalisation de la partie hyperfréquence et de la membrane de polymère.

La première étape consiste à venir enlever le nitrure déposé sur l'une des deux faces du wafer, car c'est sur elle que nous allons venir réaliser les lignes de propagation. La seconde étape est un dépôt de BCB. Nous allons déposer une couche de BCB 3022-63, qui permet de déposer de grandes hauteurs de polymère, par enduction d'une épaisseur de $20\mu\text{m}$ pour la réalisation de la membrane. Cette couche subit un recuit thermique à 250°C pendant plusieurs heures afin de la polymériser complètement. Nous passons ensuite à la réalisation des lignes de propagation. La première solution qui a été prise pour la réalisation de ces lignes était de faire un Lift-off, mais il s'est avéré que cette étape venait modifier la surface du BCB. En fait, pour éliminer la résine lors du lift-off, le substrat est plongé dans l'acétone (ou du Remover PG) chauffé à 60°C pendant plusieurs heures. Le problème est que ces solvants viennent attaquer la surface du BCB rendant les lignes inexploitable. Nous pouvons le voir sur les photos de la Figure 3.33. Le BCB vient s'effondrer sous les rubans métalliques.

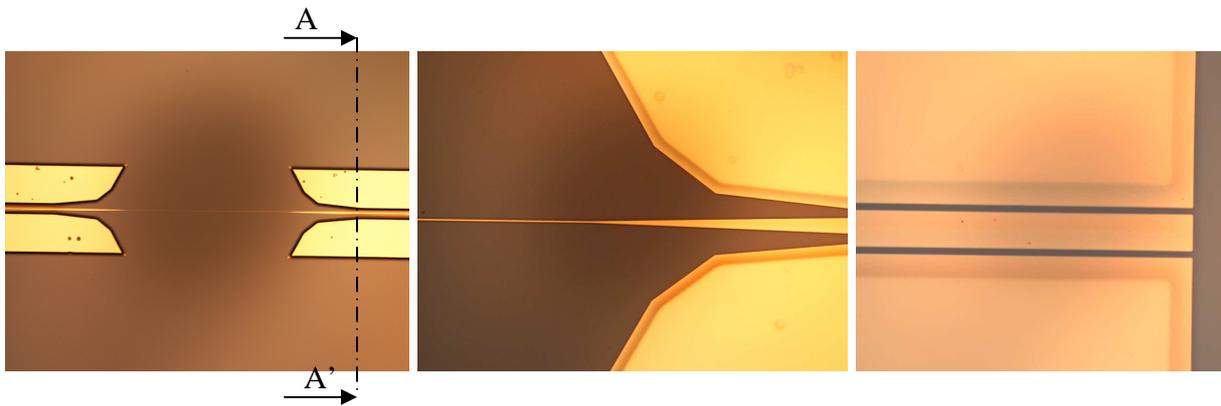


Figure 3. 33: Problème de lift-off réalisé sur BCB après Remove PG

Nous avons mesuré le profil de ces lignes au profilomètre et nous avons obtenu l'allure présentée sur la courbe de la Figure 3. 34.

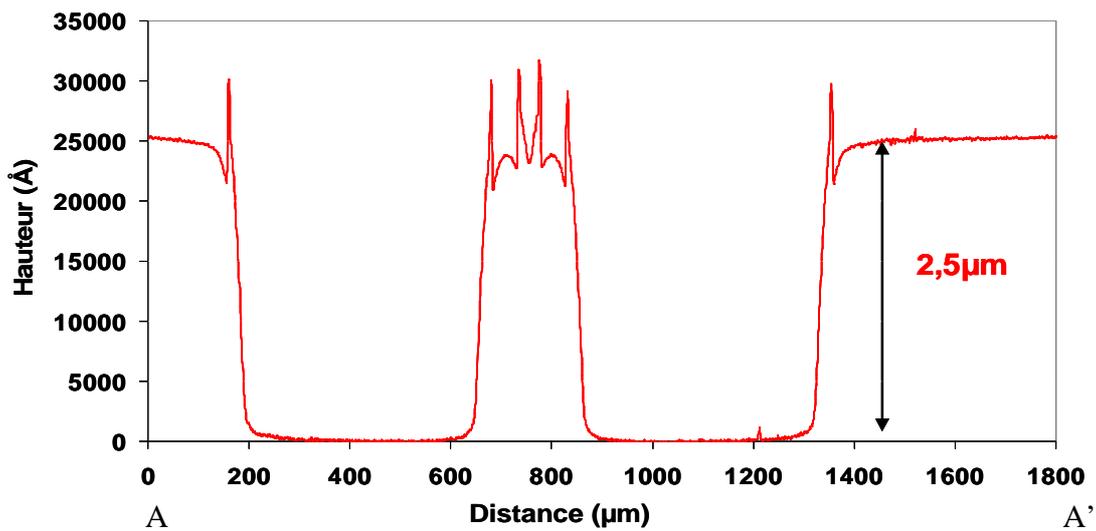


Figure 3. 34: Profil de la ligne après lift-off illustrant l'enterrement de celle-ci a cause du Remove.

Ce profil est obtenu après avoir laissé l'échantillon pendant une nuit dans du Remove PG. On peut remarquer que les plans de masse coplanaire se sont enterrés de $2,5\mu\text{m}$ dans le BCB.

Nous avons voulu voir si ce problème venait réellement de l'immersion du wafer dans le solvant. Nous avons donc réalisé un profil de résine, sans déposer de métal, et nous avons plongé le substrat pendant 1 heure dans le bain de solvant.

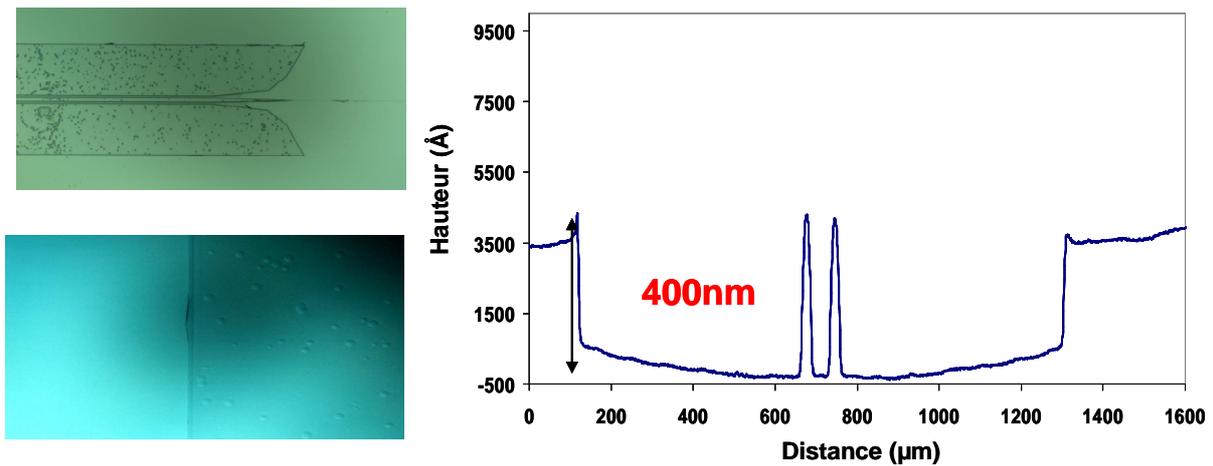


Figure 3. 35: Gravure du BCB à l'acétone

On voit nettement que la surface du BCB en contact avec le solvant a été attaquée. Au bout d'une heure, le BCB a été gravé de 400nm. En voyant le résultat obtenu, nous sommes donc tourné vers une méthode classique de réalisation des lignes par gravure humide.

Nous avons déposé une couche de Chrome de 100nm d'épaisseur, servant de couche d'accroche au dépôt d'Or de 1µm d'épaisseur. Nous avons déposé une couche de résine AZ4562 pour réaliser un masque servant à la gravure du métal. Ensuite une attaque chimique de l'or et du Cr est réalisée pour obtenir les lignes. Pour terminer, on vient enlever la résine à l'acétone. Une fois les lignes de goubau terminées, il faut réaliser la membrane. Celle-ci est obtenue par gravure humide du silicium en face arrière. On vient ouvrir notre masque de nitrure par plasma RIE et on plonge notre échantillon dans le bain de KOH, pour obtenir une gravure jusqu'au BCB. Une fois cette étape terminée, le niveau comportant la partie hyperfréquence du BioMEMS est terminée.

IV.4. Assemblage des deux étages du dispositif

Nous avons donc réalisé l'étage comportant les microcanaux et celui comportant les lignes de mesure. Il nous faut maintenant les assembler. Pour cela nous allons coller les deux parties entre elles à l'aide d'une fine couche de BCB [3. 7] [3. 8].

Différents travaux ont fait état de l'utilisation du BCB en tant que matériau intermédiaire dans le cas d'un collage adhésif avec des semi-conducteurs. Avec cette méthode de collage, tout type de substrat peut être assemblé à des températures plutôt basses. Généralement, le collage demande d'appliquer une pression élevée, pour assurer une jonction uniforme, ainsi qu'une montée en température pour permettre au polymère de réticuler et donc de créer des liaisons entre les deux substrats [3. 9]. La manière la plus simple est d'utiliser une machine permettant d'appliquer les deux paramètres en même temps [3. 10]. Les différentes étapes de collage sont présentées ci-dessous (Figure 3. 36) :

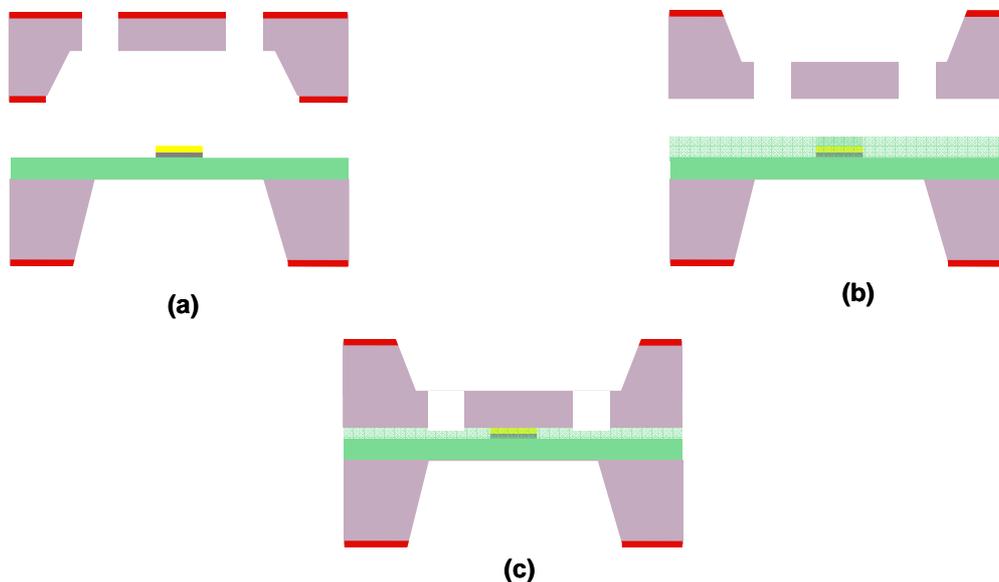


Figure 3. 36: Assemblage des deux niveaux réalisés

Troisième Partie : BioMEMS THz pour l'étude de la signalisation cellulaire

Le BCB utilisé pour réaliser ce collage est le 3022-35, dont la viscosité permet de déposer de fines couches de BCB. En effet, si la couche de polymère est trop épaisse, on risque de venir boucher nos microcanaux. Le point de départ du collage est de venir supprimer la couche de nitrure présente sur les surfaces qui seront en contact (Figure 3. 36a). Un traitement de surface d'AP3000, qui est le promoteur d'adhérence du BCB, est déposé à la tournette sur les deux substrats pour permettre une bonne accroche de la couche de polymère. Le BCB a pour avantage d'avoir un haut degré de planéité lors du dépôt. Il permet de venir combler les reliefs causés par les lignes tout en gardant une surface assez plane. Une couche de BCB de $2\mu\text{m}$ d'épaisseur est déposée (Figure 3. 36b). Si l'on s'attarde un peu sur la courbe de l'état du BCB en fonction de la température (Figure 3. 18), on peut remarquer que celui-ci passe par plusieurs états lors du recuit final. C'est sur ses différents états que nous allons jouer pour réaliser un bon collage. A des températures de l'ordre de 65 à 80°C , le polymère est légèrement pâteux. Au contraire lorsque la température du BCB atteint 130 à 180°C , la viscosité est nettement moins grande et le BCB se comporte comme un liquide. La température de 150°C est donc particulièrement intéressante car elle va permettre de liquéfier le BCB sans le réticuler et sans l'oxyder. Il sera alors possible de faire glisser les substrats l'un sur l'autre pour pouvoir les aligner. Après avoir déposé le BCB sur la face du premier wafers, nous portons les deux substrats à assembler à une température de 150°C pendant 5 min sur plaque. On vient ensuite superposer les deux substrats et on les aligne visuellement. Ensuite le tout est porté à une température de 200°C pour évacuer les solvants [3. 11].

Pour appliquer une pression, nous avons deux moyens disponibles au laboratoire [3. 12]. Pour débiter, nous avons choisi une méthode simple qui consiste à utiliser une colleuse d'échantillon sur des supports de verre en vue de les amincir à l'aide d'une polisseuse. Nous l'avons donc détournée de son utilisation classique pour l'appliquer à notre méthode de collage. Cette machine est une colleuse automatique Logitech qui permet de chauffer à une température maximale de 180°C tout en appliquant une pression de 2 Bar. Il est vrai que la limite de température ne permet pas une réticulation complète du BCB, qui est de l'ordre de 250°C , mais nous placerons notre échantillon dans un four de recuit par la suite. Nous plaçons donc nos deux wafers assemblés dans cette colleuse et nous appliquons une température de 130°C sous une pression de 2 Bar pendant 1 heure. Ensuite une fois le collage terminé nous

plaçons le dispositif, composé des deux wafers assemblés dans un four de recuit (Figure 3.36C) comme présenté dans la partie III.3.1.1.

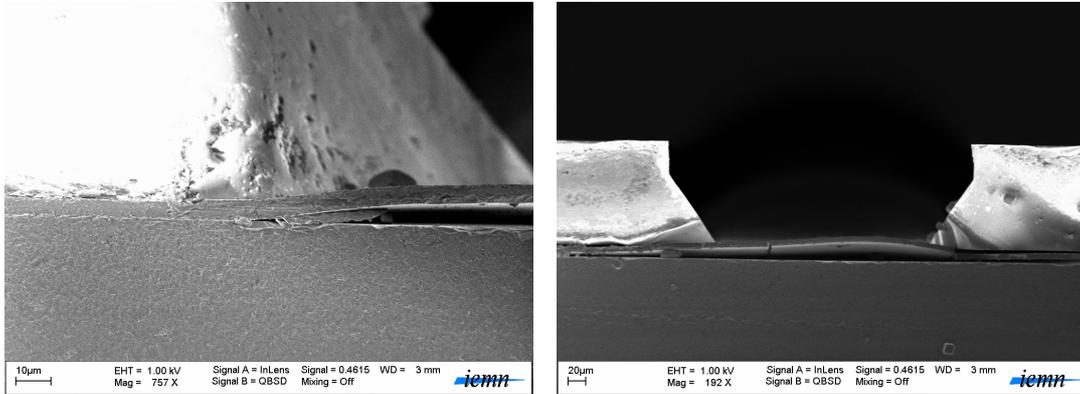


Figure 3. 37: Photo MEB de la zone de collage par polymère des deux niveaux.

L'autre moyen de collage est d'utiliser la SB6 de KarlSuss, qui permet de monter plus haut en température et donc de venir réticuler complètement le BCB tout en appliquant une pression. La courbe des paramètres de température et de pression est présentée sur la Figure 3. 38.

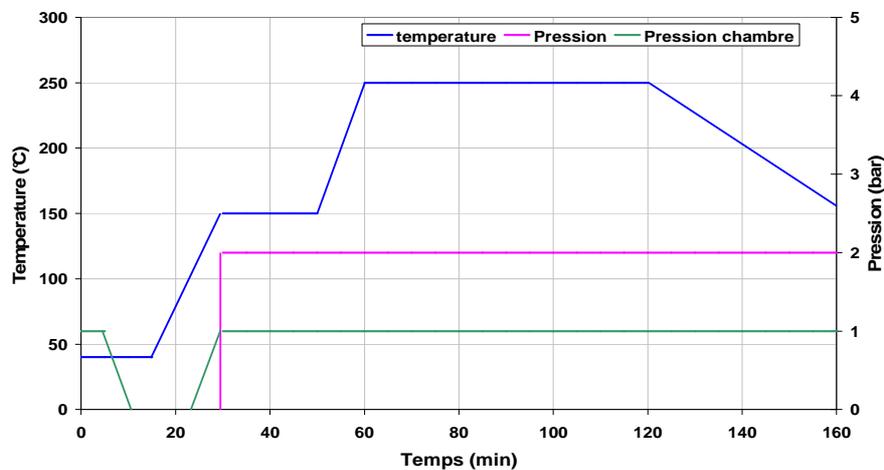


Figure 3. 38: Courbe d'évolution de la température et de la pression pour effectuer un collage par thermo compression.

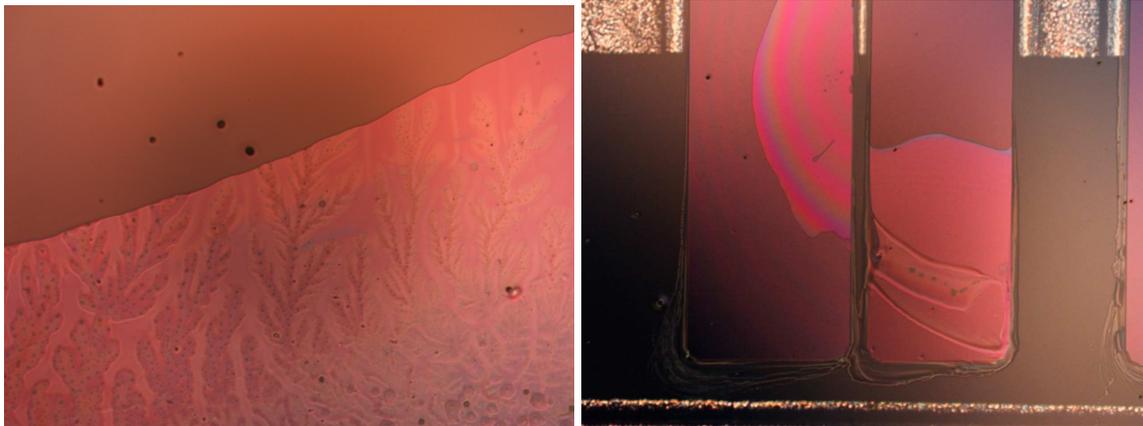


Figure 3. 39 : Illustration de zones de collage des deux wafers

Une fois les deux wafers assemblés, il ne nous reste plus qu'à venir enlever la couche de BCB qui nous a servi au collage au dessus des lignes de propagation pour pouvoir réaliser le contact avec les pointes de mesure hyperfréquence. Pour cela, il nous faut donc venir graver les 2 μ m de BCB par gravure plasma RIE [3. 13] [3. 14]. Nous utilisons le silicium constituant les canaux comme masque de gravure. On peut voir des photos de réalisation du BioMEMS sur la Figure 3. 40.

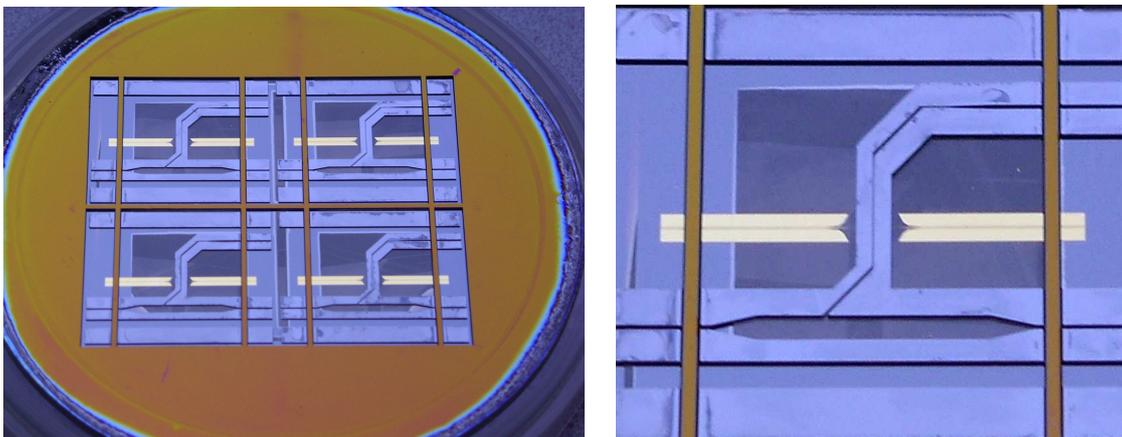


Figure 3. 40 : A : Wafer constitué de 4 structures, B : Zoom sur une structure montrant la partie microfluidique et la partie hyperfréquence.

Nous pouvons également voir sur la Figure 3. 41, un zoom de la zone sensible du BioMEMS, montrant le canal de mesure et la ligne de Goubau au fond.

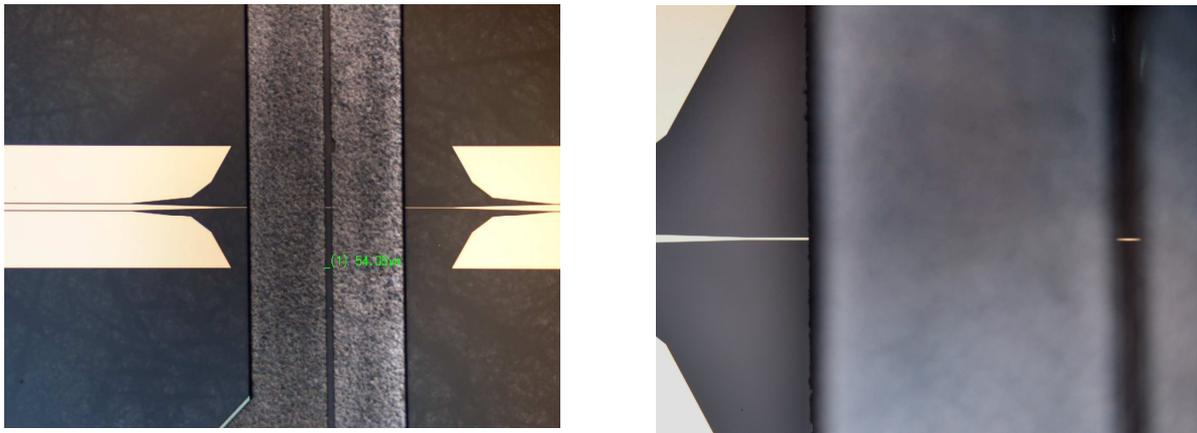


Figure 3. 41 : Zoom sur la zone sensible du BioMEMS avec vu du fil dans le fond du canal de mesure.

V. Biocompatibilité et tests biologiques

Avant la réalisation finale du BioMEMS, nous avons voulu voir dans un premier temps la biocompatibilité des matériaux utilisés, notamment le BCB. Le BCB est un polymère à base de benzène, ce qui peut être néfaste pour la culture cellulaire. Pour le vérifier, nous avons mis en culture les cellules CHO sur un substrat de quartz avec des plots de BCB pour montrer l'accroche et la prolifération de celles-ci sur ce type de support. Nous pouvons voir, sur les figures suivantes, des cellules sur les plots de BCB et sur le Quartz.

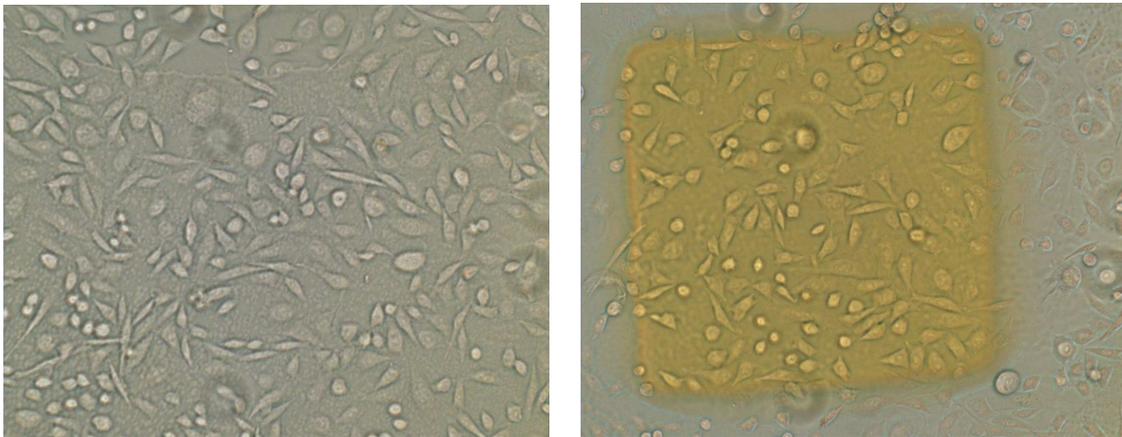


Figure 3. 42 : Cellules sur substrat de quartz et sur plots de BCB

Les tests de culture ont été réalisés dans des conditions empiriques, c'est-à-dire sans traitement de surface particulier, avec uniquement un nettoyage des surfaces à l'alcool. Nous pouvons remarquer une bonne adhérence sur le substrat de quartz mais également sur les plots de BCB. Ces photos montrent qu'il est possible de cultiver des cellules sur ces surfaces sans les endommager. On peut remarquer qu'elles ont une forme normale de cellules adhérentes sur une surface. Vraisemblablement, le fait de recuire complètement le BCB élimine tous les solvants volatils.

Une fois ce test effectué, nous sommes passés à la culture dans le BioMEMS pour tester la circulation de cellules et voir leur survie dans le système fermé. La première étape, très importante, est le nettoyage de l'intérieur du dispositif pour éliminer toute trace de

Troisième Partie : BioMEMS THz pour l'étude de la signalisation cellulaire

contamination chimique. Pour cela nous allons faire circuler un premier volume d'eau, suivi d'une perfusion à l'alcool à 70° pour désinfecter le BioMEMS. Nous allons perfuser un grand volume d'alcool, de plusieurs millilitres, pour s'assurer qu'il soit totalement désinfecté. Ensuite nous faisons circuler plusieurs volumes de milieu de culture pour préparer les surfaces qui seront en contact avec les cellules.

Le premier test d'injection des cellules au sein du dispositif s'est bien passé. Nous avons vérifié au microscope que nous avons un nombre suffisant de cellules à l'intérieur. Ensuite nous avons attendu 1 heure en arrêtant la circulation pour que les cellules se déposent dans le fond et commencent à s'y accrocher. Au bout de ce temps nous avons recommencé la circulation du milieu de culture et nous avons observé que les cellules ne bougeaient plus, indiquant un début d'adhésion. Le dispositif a été placé dans un incubateur pour la nuit. Le lendemain, nous avons pu vérifier que les cellules n'étaient pas étalées, et que la plupart des cellules avaient éclaté. En discutant avec les biologistes nous sommes arrivés à la conclusion qu'il s'agit sûrement d'un manque d'oxygénation des cellules au sein du système clos.



Figure 3. 43 : Photos des cellules dans le canal de mesure après 24h.

Le fait d'avoir arrêté la circulation du fluide pour ne pas perturber l'étalement des cellules n'a pas permis de leur apporter l'oxygène suffisant pour leur survie. Pour l'instant, nous n'avons donc pas pu, à ce stade de notre travail, investiguer des cellules vivantes. Afin de valider la faisabilité de notre BioMEMS, nous avons néanmoins réalisé un ensemble de mesures sur des

Troisième Partie : BioMEMS THz pour l'étude de la signalisation cellulaire

liquides et des solutions de protéines, comme la lactoferrine et l'albumine, couramment utilisées en biologie.

VI. Résultats

Une fois l'étude théorique et les structures des BioMEMS réalisées, nous sommes passés aux mesures dans la bande de fréquence 0-110GHz et 140-220GHz. Les mesures hyperfréquences sont effectuées à l'aide d'un analyseur de réseau vectoriel 8510XF d'Agilent dans la bande 0,45-110GHz et à l'aide d'un analyseur Anritsu 37147C associé à des multiplieurs de fréquence, de référence V05VNA2-T/R d'OML (Oleson Microwave Laboratories), pour travailler dans la bande 140-220 GHz. Les mesures sont effectuées sous pointes coplanaires espacées de 150 μ m pour le XF et 50 μ m pour le banc 140-220GHz. Pour la calibration des mesures, nous utilisons une calibration standard LRM (line-Reflect-Match) à l'aide d'un kit de Cascade Microtech pour le banc XF et CS15 de Picoprobe pour le banc 140-220GHz.

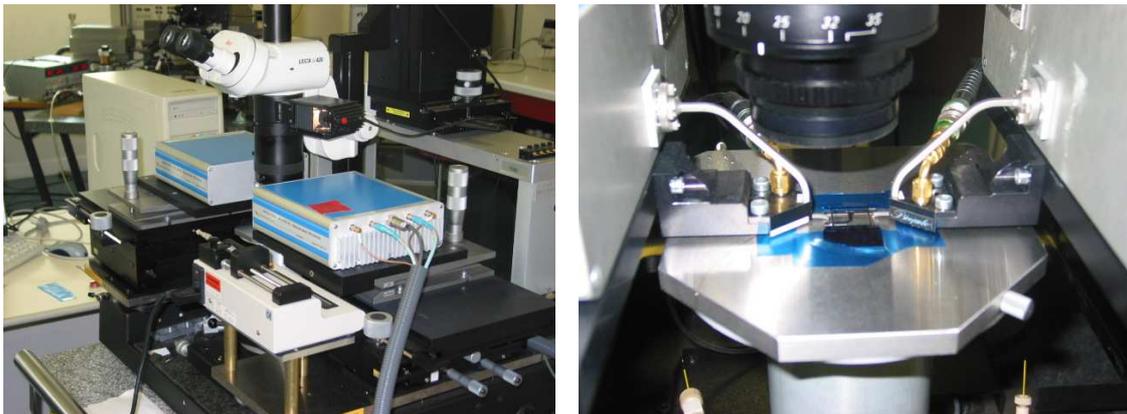


Figure 3. 44 : Positionnement du BioMEMS et du pousse seringue sur le banc de mesure 140-220GHz.

Le système complet, constitué du BioMEMS, des capillaires d'injection et du pousse seringue a été installé sur le banc d'analyse 140-220 GHz comme nous pouvons le voir sur les photos ci-dessus. Pour effectuer les mesures sur liquide, nous avons perfusé pendant tout le temps de mesure afin que le canal soit rempli en continu.

VI.1. Mesures sur solutions de base

Nous avons caractérisé différents liquides biologiques utilisés pour la culture cellulaire, à savoir une solution Tampon (PBS), du milieu de culture avec ajout de 10% de sérum de veau (F-12K+SVF), de l'eau distillée et de l'alcool qui sert à désinfecter le dispositif. Nous avons reporté ci-dessous les résultats obtenus sur l'ensemble de ces produits.

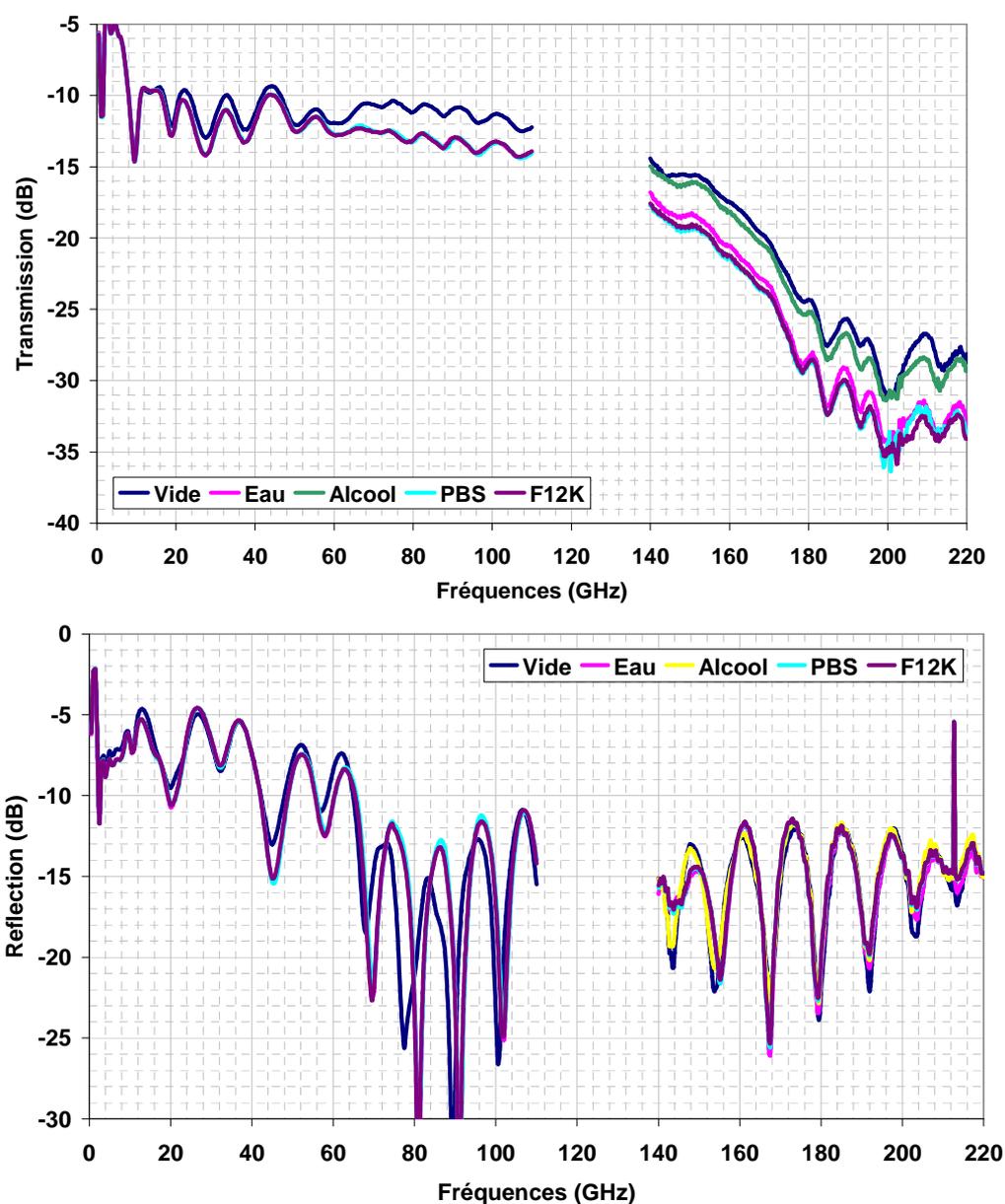


Figure 3. 45 : Paramètres de transmission et de réflexion pour les différents liquides investigués

On peut voir des variations significatives sur l'évolution du paramètre de transmission en fonction des liquides investigués. On peut remarquer une atténuation de plus de 3dB entre le niveau à vide et le canal rempli d'eau malgré la faible longueur du canal (50 μ m). On peut remarquer également que l'alcool cause moins de pertes que l'eau en raison de son caractère non polaire. En ce qui concerne les variations entre la solution tampon et le milieu de culture on ne voit pas de changements significatifs entre 0 et 110GHz. Par contre, lorsque l'on monte en fréquence, une différenciation entre les deux milieux commence à apparaître. Ces niveaux sont du même ordre de grandeur que celui de l'eau. En interprétant ces résultats, il est nécessaire d'augmenter l'amplitude de la mesure en augmentant la longueur de ligne en contact avec le liquide ou bien augmenter la sensibilité par une structure résonnante par exemple.

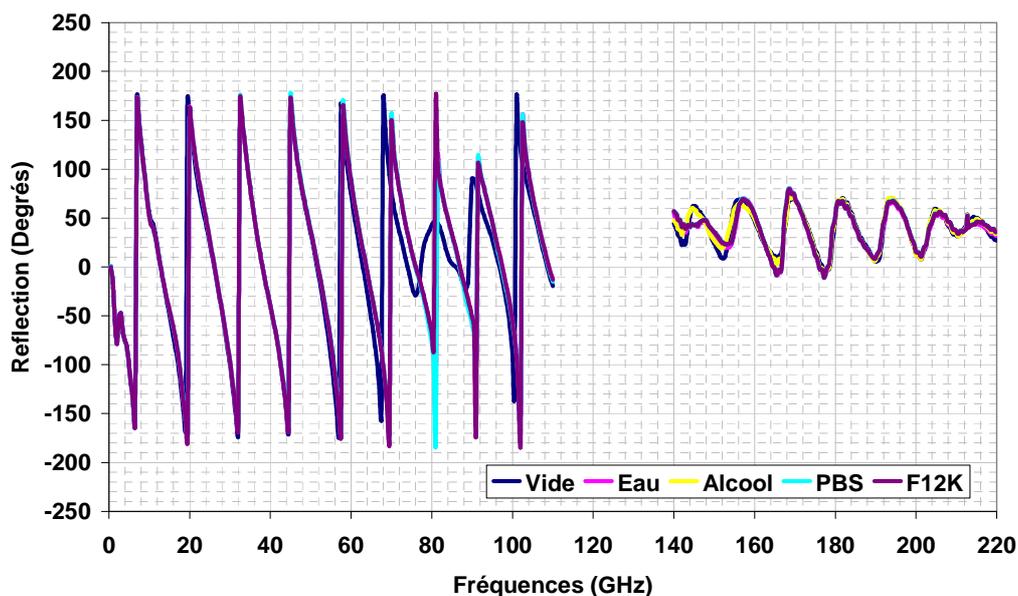


Figure 3. 46 : Phase du paramètre de réflexion pour les liquides investigués.

Nous pouvons remarquer que l'évolution de la phase du paramètre de réflexion reste faible en fonction des différents liquides montrant que l'adaptation du dispositif aux différents milieux reste stable. Regardons par contre la phase du paramètre de transmission (Figure 3. 47).

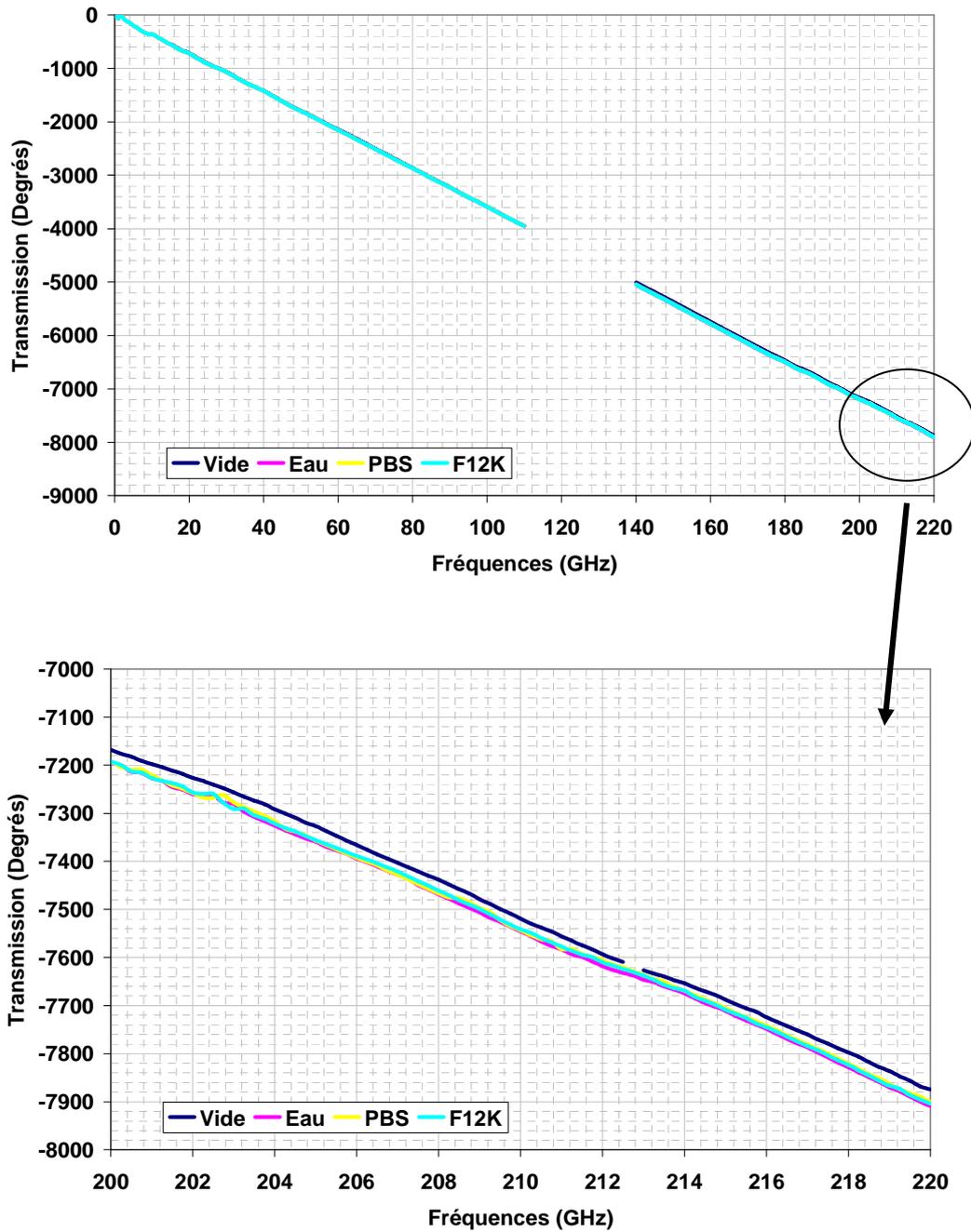


Figure 3. 47 : Phase du paramètre de transmission.

On peut remarquer des changements de l'ordre de quelques degrés. Les faibles volumes mesurés ne sont pas suffisants pour ralentir l'onde se propageant le long de la ligne. Nous

pouvons aussi voir que les changements majeurs se trouvent dans la bande 140-220GHz. Si l'on regarde de plus près, le paramètre de transmission dans cette bande, on peut remarquer des changements relatifs aux différents liquides. C'est pour cela que la suite de notre étude se fera uniquement dans cette bande de fréquences. Néanmoins, ce point est extrêmement intéressant car il montre que la montée en fréquence est une donnée fondamentale pour l'examen des solutions biologiques.

VI.2. Influence de la lactoferrine

L'étape suivante est de voir l'influence de la lactoferrine (protéine décrite dans le chapitre I) sur la transmission du signal. Nous avons mesuré des milieux de PBS et de F-12K avec différentes concentrations de lactoferrine pour étudier la sensibilité du dispositif. Nous avons à notre disposition des solutions concentrées à 1.25 μ M, 2.5 μ M, 5 μ M et 200 μ M dans du PBS (Figure 3. 48). Nous obtenons les résultats de mesures suivant dans la bande 140-220GHz.

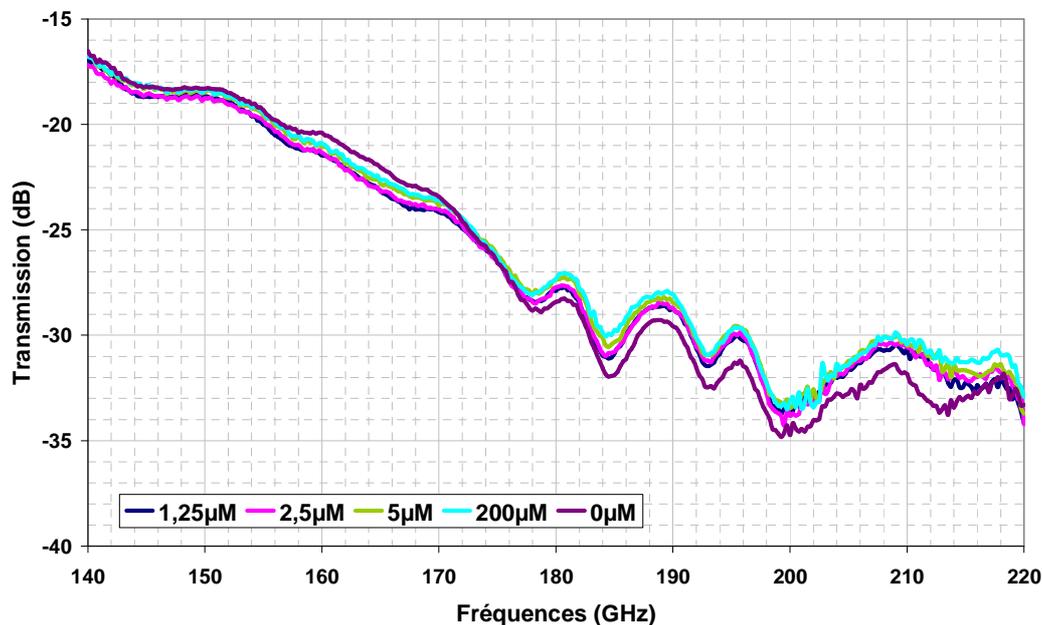


Figure 3. 48 : Evolution du paramètre de transmission pour différentes concentrations de lactoferrine dans du PBS.

Faisons un zoom sur la bande de fréquences 180-190GHz qui montre des changements significatifs (Figure 3. 49).

Si l'on regarde l'évolution du paramètre de transmission en fonction de la concentration de lactoferrine dans la solution tampon, on peut remarquer un phénomène intéressant : plus la concentration est élevée plus le niveau de perte diminue. Ceci peut être expliqué de la façon suivante : plus nous avons de protéine de lactoferrine, moins nous avons de molécule d'eau et donc moins de pertes. Mais ceci n'est qu'une constatation et non une affirmation. Si l'on regarde la phase du paramètre de transmission on ne remarque également que de faibles variations (Figure 3. 50). De même, le paramètre de réflexion en fonction de la concentration (Figure 3. 51)

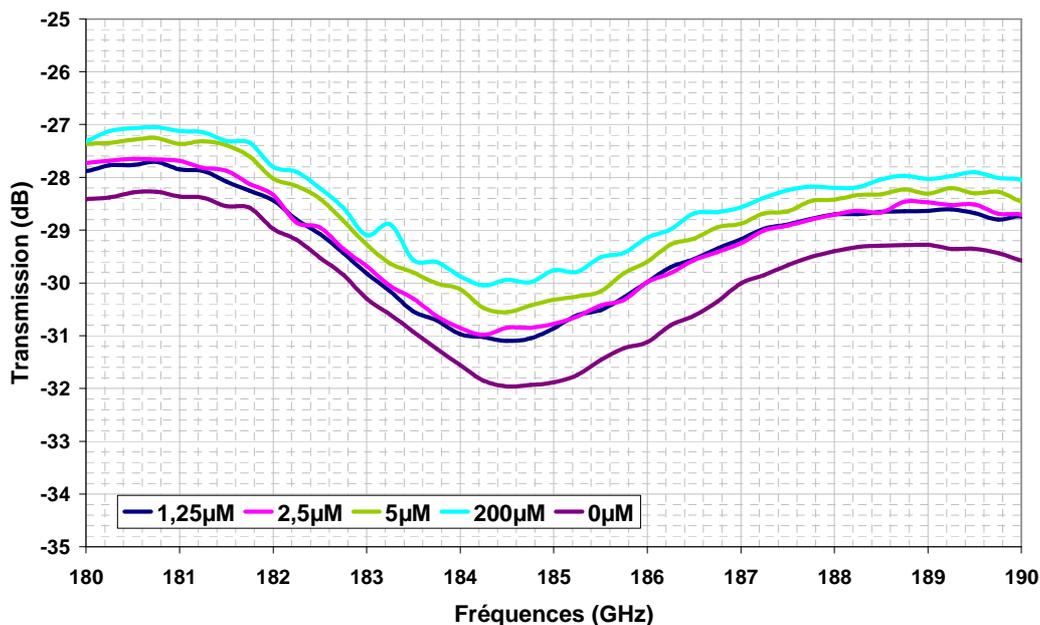


Figure 3. 49 : Amplitude du paramètre de transmission en fonction de la concentration dans la bande 180-190 GHz.

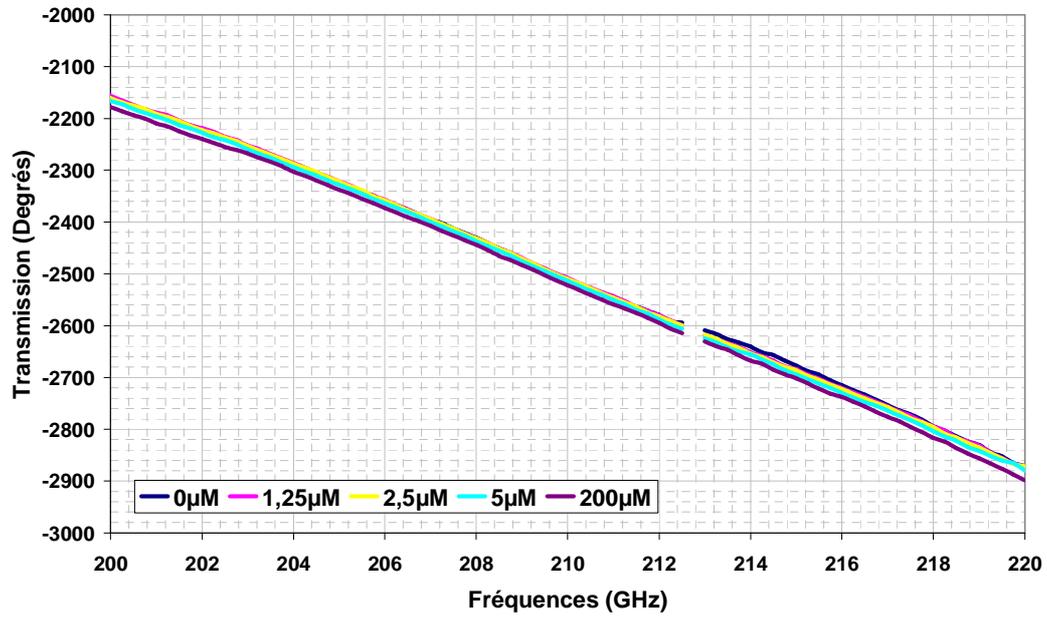
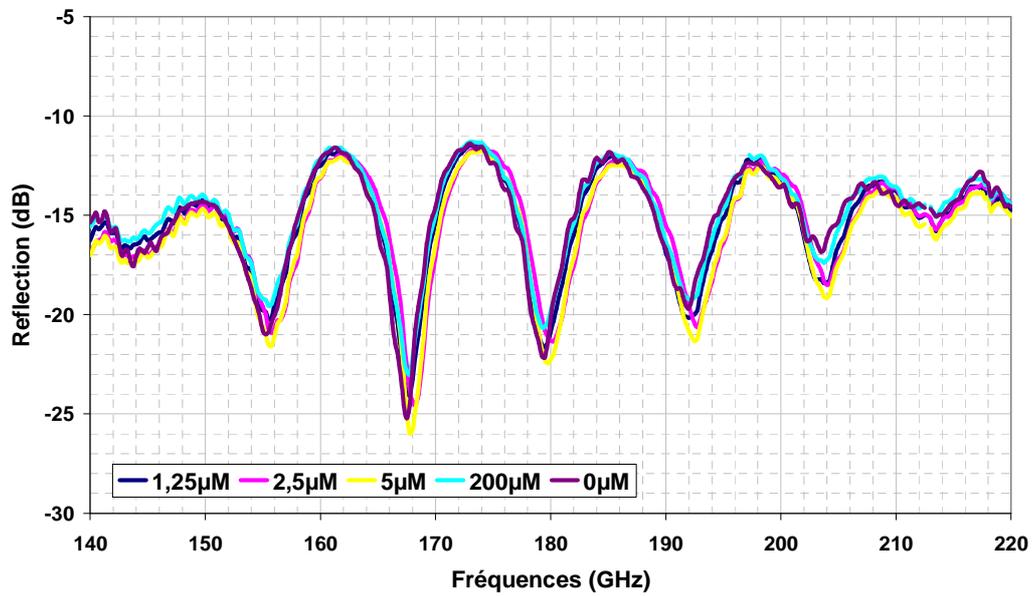
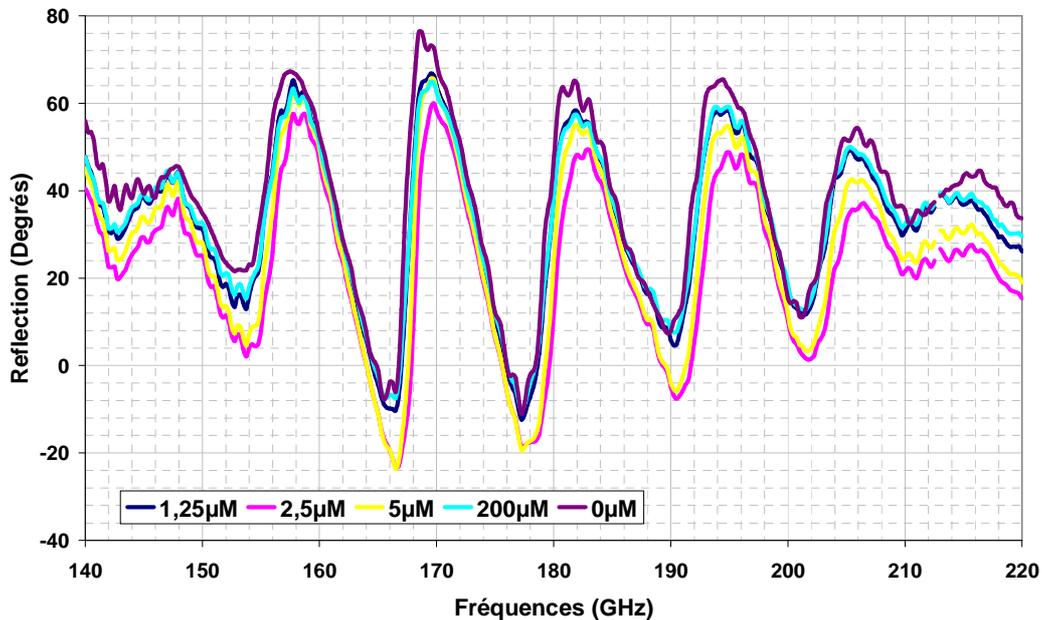


Figure 3. 50: Phase du paramètre de transmission en degrés pour les différentes concentrations.



(a)



(b)

Figure 3. 51 : (a) Amplitude et (b) phase du paramètre de réflexion

Nous pouvons remarquer en regardant les paramètres de transmission et de réflexion en module et en phase une assez bonne sensibilité compte tenu de la zone investiguée. On peut distinguer des variations de la transmission en fonction de la concentration de lactoferrine dans le PBS. En ce qui concerne la phase, on voit des changements de quelques degrés.

Nous avons réalisé la même étude de concentration mais dans le milieu de culture avec des concentrations de 1,25 et 5 μ M. Nous obtenons les résultats de la figure 3.52. Les résultats sont sensiblement les mêmes.

Nous montrons, par ce premier résultat, que la lactoferrine joue un rôle bien plus important que le PBS et le F-12K dans l'eau par le niveau de variation du paramètre de transmission à hautes fréquences, vraisemblablement par des réarrangements plus importants autour de la biomolécule de lactoferrine.

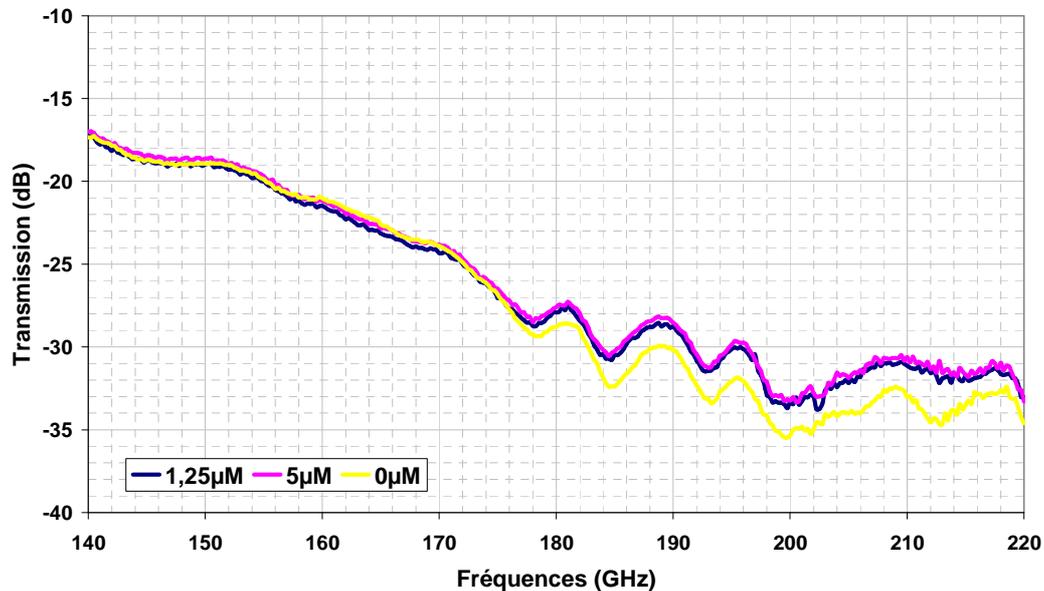


Figure 3. 52: Paramètre de transmission pour différentes concentrations de lactoferrine dans du milieu de culture.

VI.3. Etude de l'albumine

Une fois l'étude sur la lactoferrine réalisée, nous avons eu la possibilité d'investiguer une nouvelle protéine, à savoir l'albumine. Nous avons caractérisé avec notre dispositif du sérum d'albumine bovin (BSA) et de l'alpha lactalbumine. Ces deux protéines sont relativement proches en termes d'architecture mais n'ont pas une masse molaire identique.

Nous avons caractérisé ces deux protéines dans la bande de fréquence 140-220GHz et nous avons obtenu les résultats sur la Figure 3. 53.

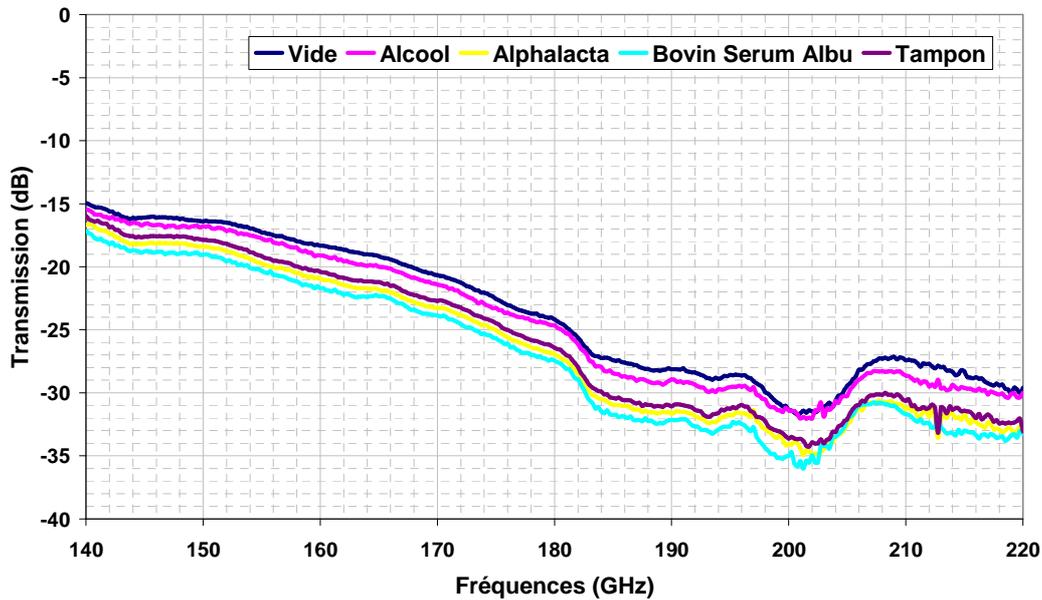


Figure 3. 53 : Paramètre de transmission pour différents solutions

Nous pouvons remarquer en regardant l'évolution du paramètre de transmission en fonction de la fréquence, une bonne distinction entre les différentes solutions. On peut remarquer que l'albumine bovine cause plus de pertes que l'alpha lactalbumine. Ceci est dû à sa masse molaire différente. En effet, la BSA a une masse molaire de 67000Da tandis que celle de l'alpha lactalbumine est de 14400Da, mais également à des arrangements différents de la molécule par des modes collectifs de relaxation ou des polarisations différents. Si l'on regarde de plus près, nous observons la présence de ces protéines par rapport au produit tampon (PBS). Ceci est un résultat supplémentaire qui montre une fois de plus la possibilité d'investiguer des solutions biologiques par ondes THz.

VII. Bibliographie

- [3. 1] J.T. Kindt, C.A. Schumuttenmaer, "Far infrared dielectric properties of polar liquids probed by femtosecond terahertz pulse spectroscopy", *Journal of Physics and Chemicals*, Vol. 100, pp. 10373-10379, 1996.
- [3. 2] Six Gonzague, *Optimisation d'une technologie 3D pour la réalisation de circuits intégrés millimétriques sur substrat de silicium*, Spécialité : Microondes et microtechnologies, Université des sciences et technologies de Lille, le 6 Octobre 2004, 126 p.
- [3. 3] Dow Chemical Company, Processing Procedures for CYCLOTENE 4000 Series Photo BCB Resins, February 2005.
- [3. 4] Dow Chemical Company, Processing Procedures for CYCLOTENE 3000 Series Dry Etch Resins, February 2005.
- [3. 5] Muller Philippe, *Conception, Fabrication et Caractérisation d'un Microcommutateur Radio Fréquences pour des Applications de Puissance*, spécialité : Electronique, Université des sciences et technologies de Lille, le 9 Mai 2005, 248 p.
- [3. 6] A.Hölke, H. Thurmann Henderson, "Ultra-deep anisotropic etching of (100) silicon", *J. Micromech. Microeng*, Vol.9, pp. 51-57, 1999.
- [3. 7] S. Soek, N. Rolland, P.A. Rolland, "Packaging methodology for RF devices using a BCB membrane transfer technique", *J. Micromech. Microeng*, Vol.16, pp. 2384-2388, 2006.
- [3. 8] S. Soek, N. Rolland, P.A. Rolland, "Zero-level packaging using BCB adhesive bonding and glass wet-etching for W-Band applications", *Electronics Letters*, Vol.42, n°13, pp. 2099-2102, 2006.

- [3. 9] F. Niklaus, R.J. Kumar, J.J. McMahon, J. Yu, J.Q. Lu, T.S. Cale, R.J. Gutmann, "Adhesive Wafer Bonding using Partially Cured Benzocyclobutene for Three-Dimensional Integration", *Journal of The Electrochemical Society*, Vol. 153, n°4, pp. G291-G295, 2006.
- [3. 10] F. Niklaus, G. Stemme, J.Q. Lu, R.J. Gutmann, "Adhesive Wafer Bonding", *Journal of Applied Physics*, Vol.99, pp. 031101_1-031101_28, 2006.
- [3. 11] Lauvernier Denis, *Nanofils optiques a base de GaAs insérés dans une matrice polymère*, spécialité : Electronique, Université des sciences et technologies de Lille, le 9 Septembre 2005, 266 p.
- [3. 12] Carlier Julien, *Développement technologique de composants microfluidiques intégrés à base de résine SU8 : Application à l'analyse de protéines par spectrométrie de masse*, spécialité : Instrumentation et Analyses Avancées, Université des sciences et technologies de Lille, le 19 Novembre 2004, 192 p.
- [3. 13] G.S. Kim, C. Steinbrüchel, "Plasma etching of benzocyclobutene in CF₄/O₂ and SF₆/O₂ plasmas", *J. Vac. Sci. Technol. A*, Vol. 24, n°3, pp. 424-430, 2006.
- [3. 14] Percy B. Chinoy, "Reactive Ion Etching of Benzocyclobutene Polymer Films", *IEEE Transductions on Components, Packaging, and Manufacturing Technology, Part C*, Vol.20, n°3, pp. 199-206, 1997.

Conclusion générale

Au cours de ce mémoire nous avons montré, dans un premier temps, que la plupart des méthodes actuelles d'investigation de la formation de complexes macromoléculaires membranaires et de leur trafic « in cellulo » sont invasives et/ou nécessitent des marqueurs exogènes (perméabilisation des cellules, utilisation de « tags », anticorps et autres...). Elles sont susceptibles de modifier la physiologie de la cellule et la nature des interactions moléculaires et ne rendent pas toujours compte des phénomènes dynamiques régissant les interactions et le trafic des molécules. Nous avons proposé de développer une mesure non-invasive à partir d'ondes électromagnétiques. Le spectre THz, dont la technologie est parfaitement accessible aujourd'hui, est un candidat intéressant par ses propriétés de caractérisation des interactions moléculaires de faible énergie. La nécessité d'assurer également une résolution spatiale satisfaisante, dans des ordres de grandeur microniques, nous ont poussé à nous intéresser aux BioMEMS. Il s'agit alors de sonder le nanoscopique avec des outils microscopiques.

La redécouverte d'un mode de propagation filaire oublié depuis les années 1950, à savoir le mode de Goubau, nous a permis d'atteindre des résolutions spatiales microniques compatibles avec une investigation sur cellules vivantes. Nous sommes les premiers à avoir appliqué ce mode de propagation en topologie plane pour pouvoir l'intégrer dans un BioMEMS. L'ensemble des résultats présentés dans ce mémoire nous montre bien qu'il est possible d'exciter un mode de propagation filaire en topologie plane à l'aide d'une excitation coplanaire qui permet à ce nouveau type de ligne de propagation d'être mesurable avec des analyseurs sous pointes. Les résultats de simulation nous ont permis d'aboutir avec une excitation de bonne efficacité, de l'ordre de 75%, pour l'excitation avec la nouvelle topologie. Nous avons détaillé les paramètres géométriques ainsi que les caractéristiques importantes de ce mode de propagation. Nous avons vu l'influence des paramètres du substrat, à savoir sa hauteur, et sa permittivité. Nous avons vu que l'utilisation de substrat de grande hauteur engendre l'apparition de modes de substrat indésirables. En ce qui concerne la permittivité du substrat, nous avons vu également qu'il est préférable de travailler avec de faibles permittivités pour garder un bon confinement électromagnétique autour du guide filaire. Un autre paramètre important est la taille du fil. Nous avons remarqué et confirmé avec des mesures expérimentales que plus la taille du fil diminue, moins nous avons de pertes. Nous avons remarqué également que cette diminution permet de confiner encore d'avantage

le champ électromagnétique, ce qui va dans le bon sens pour une investigation en biologie. Nous avons été les premiers à montrer qu'il est possible de propager une onde électromagnétique le long de fils de tailles nanométriques avec des niveaux de pertes plus que raisonnables. L'ensemble de ces résultats prouve la possibilité de réalisation de propagation filaire THz avec des résolutions nanométriques, tout en gardant un niveau de pertes à l'état de l'art avec ce type de guide. L'ensemble des résultats montre l'énorme potentialité des guides d'ondes filaires THz pour l'investigation d'entités biologiques.

Enfin, dans la suite de ce mémoire, nous avons détaillé la conception du BioMEMS pour l'investigation de cellules biologiques. La fabrication de BioMEMS THz nécessite d'avoir une compatibilité entre la circulation microfluidique et la propagation des ondes THz. Elle ne peut être réalisée qu'au prix de technologies mixtes, déjà pratiquées pour la fabrication des BioMEMS. Le choix est donc d'utiliser une combinaison mixte polymère/verre/silicium. Nous avons montré que le transport et la survie des cellules vivantes est possible avec ces matériaux. Enfin dans une dernière partie, nous avons obtenus les premiers résultats sur des solutions biologiques bien connues, mais également des solutions qui, à ce jour, n'avaient pas encore été caractérisées dans ce spectre de fréquence. C'est notamment le cas de la lactoferrine, qui dans ces premières mesures, montre une influence importante sur la transmission du signal.

Ce travail ouvre des perspectives intéressantes aussi bien en terme de confinement de champ électromagnétique THz qu'en terme de moyen d'investigation sur le vivant. Comme nous l'avons vu au chapitre II. La conception de nouveaux circuits passifs en technologie « Goubau » va nous permettre de développer une véritable instrumentation intégrée. Nous bien ici sur le nouveau paradigme suivant : la microtechnologie pour la nanotechnologie. Nous avons commencé à travailler sur la conception d'un réflectomètre six-port en collaboration avec l'École Polytechnique de Montréal (Professeur Bosisio et Professeur Xu). Il s'agit ici de faire des mesures vectorielles à partir de mesures d'amplitudes, compte tenu que ce sont des composants tels que des diodes de détection qui possèdent aujourd'hui la fréquence de travail la plus élevée, pouvant atteindre 600GHz. Parallèlement à ce travail, et faisant suite à la diminution de la taille des fils, nous avons montré que l'adressage en parallèle de plusieurs fils était possible. Cette notion peut aboutir à celle de micro-imagerie

THz. En terme d'investigation sur le vivant, et après avoir développé le module d'immobilisation cellulaire, nous pourrions être capable de faire du « scanning » rapide de cellules, de trouver des combinaisons de paramètres spectroscopiques, délivrance de produit, qui permettent de caractériser des cellules et bien entendu, de poursuivre avec des moyens de calculs plus conséquent, l'aspect interaction THz – matière vivante. Nous sommes actuellement en contact avec un laboratoire de physique capable de modéliser avec des logiciels de dynamique moléculaire, l'influence de paramètre d'un solvant sur la conformation des protéines. Cela constituera une première base de donnée qui servira dans notre recherche finale qui concerne la caractérisation et le suivi dynamique des voies de l'internalisation moléculaire au sein des membranes cellulaires. L'ensemble de ce travail nous à bien montré la potentialité énorme des BioMEMS THz pour l'investigation cellulaires et de solutions biologiques.

Résumé

Les développements actuels des BioMEMS (Biological MicroElectroMechanical System) permettent des investigations originales sur le vivant, et en particulier sur des cellules biologiques uniques. L'amélioration des moyens d'analyses est nécessaire pour la compréhension plus fine des mécanismes de «communication» intra ou inter cellulaires. La spectroscopie THz peut apporter des informations complémentaires sur des interactions moléculaires, y compris au cours d'une internalisation, compte tenu de son caractère dynamique. La redécouverte d'un mode de propagation filaire, appelé mode de Goubau, nous permet d'atteindre une résolution spatiale micrométrique. Nous sommes les premiers à montrer que la propagation s'effectue dans de bonnes conditions sur des fils métalliques nanométriques réalisés en technologie planaire. Cette thèse expose la conception, la fabrication et le test d'un BioMEMS dédié à la microspectroscopie THz de cellules biologiques. Nous démontrons la faisabilité de cette investigation dans un environnement le plus naturel possible. Nous avons caractérisé des solutions biologiques bien connues dans les sciences de la vie dont certaines n'ont jamais été observées à ces fréquences. Les mesures obtenues sur différentes souches cellulaires créeront la première base de données de spectroscopie THz dans ce domaine. Ce sujet fortement interdisciplinaire a été rendu possible par la collaboration entre un laboratoire de nanotechnologie et un laboratoire de biologie.

Titre

BioMEMS TéraHertz pour l'étude du trafic informationnel de cellules biologiques

Abstract

Current developments in the BioMEMS research domain allow original investigations in life science, especially on single biological cells. The improvement of analysis means is needed for a better understanding of the intra and extra cellular informative molecular transfer. THz spectroscopy can bring new further complementary information on molecular interactions, during internalization. The use of a wire propagation mode, called Goubau mode, allows us reaching a micrometer spatial resolution. We have been the first to show that we obtain good propagation conditions on nanometer metallic wires realized in planar technology. This thesis sets out the design, the fabrication and the test of a BioMEMS dedicated to the THz microspectroscopy of biological cells. We demonstrate the feasibility of this investigation inside a natural environment. We have characterized some well known biological solutions in the living science; some of them have never been characterized at these frequencies. Future measurements on different cellular (strains lines) will create the first THz spectroscopy database in this field. This highly interdisciplinary subject has been made possible through collaboration between a nanotechnology laboratory and a biology laboratory..

Mots Clés

BioMEMS, Microfabrication, Cellules vivantes, Spectroscopie diélectrique large bande, TéraHertz, Lignes de Goubau planaire