



HAL
open science

Électrodes nanocomposites pour applications en microfluidique

Mathieu Brun

► **To cite this version:**

Mathieu Brun. Électrodes nanocomposites pour applications en microfluidique. Autre [cond-mat.other]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2011. Français. NNT : 2011LYO10332 . tel-00744588

HAL Id: tel-00744588

<https://theses.hal.science/tel-00744588>

Submitted on 23 Oct 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



N° d'ordre 332 - 2011

Année 2011

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE Electronique, Electrotechnique et Automatique

Pour l'obtention du

DIPLOME DE DOCTORAT

(Arrêté du 7 août 2006)

Soutenue publiquement le 20 Décembre 2011 par

M. BRUN Mathieu

Electrodes nanocomposites pour applications en microfluidique

Directeur de thèse : Mlle Rosaria FERRIGNO
Co-Encadrant : Mme Marie FRENEA-ROBIN
Co-Encadrant : M. Jean-François CHATEAUX

Jury :

M. AYELA Frédéric, UJF Grenoble
M. SENEZ Vincent, Université Lille 1
M. THOUIN Laurent, ENS Paris
Mme GONDRAN Chantal, UJF Grenoble
M. CHATEAUX Jean-François, UCB Lyon 1
Mme DEMAN Anne-Laure, UCB Lyon 1
Mme FRENEA-ROBIN Marie, UCB Lyon 1
Mlle FERRIGNO Rosaria, UCB Lyon 1

Président
Rapporteur
Rapporteur

Do, or do not... There is no try.

Remerciements

Je souhaite tout d'abord adresser mes remerciements les plus sincères à Vincent Senez et Laurent Thouin pour avoir accepté et pris de leur précieux temps pour évaluer ce travail de thèse. Je tiens ensuite à remercier Chantal Gondran et Frédéric Ayela qui m'ont fait l'honneur de leur présence au sein de ce jury.

Ma thèse s'est déroulée entre l'équipe « Microfluidique et microsystèmes » de l'Institut des Nanotechnologies de Lyon et l'équipe « Bioélectromagnétisme et microsystèmes » du laboratoire Ampère. Durant ces trois années, j'ai eu le plaisir de travailler dans un environnement toujours agréable et productif grâce à l'ensemble de ces membres. Je remercie chaleureusement mes encadrants de thèse dont la complémentarité m'a permis de mener cette thèse dans les meilleures conditions. Je ne saurais jamais assez les remercier de l'énergie qu'ils ont dépensée afin que je puisse réaliser ce travail. Merci à Anne-Laure et Jean-François pour leur franchise et leur dynamisme. Merci à Marie et Naoufel pour leur disponibilité et leur gentillesse. Je remercie enfin Rosaria, ma directrice de thèse, pour l'autonomie et la confiance qu'elle m'a accordée tout en restant constamment à mon écoute.

J'ai également une pensée pour les nombreuses personnes que j'ai pu côtoyer :

- à l'UCB : Isabelle, Jihane, Magalie, Marie-Charlotte, Marie-Pierre, Yasmina, Gaby, Gégé, Laurent, Lotfi, Louis, Michel, Nico, Pascal, Patrick, Pierre, Philou et Vincent.
- à l'ECL : Alice, Christian, François, Jean-Michel, Riccardo, Richard et Sébastien.

Je les remercie sincèrement pour leur sympathie, leurs conseils avisés et les nombreuses doses de caféine partagées.

Naturellement, trois ans dans deux laboratoires, c'est d'autant plus de rencontres avec les thésard(e)s, post-docs, stagiaires qui se suivent (sans se ressembler). Merci d'abord à Amal, Céline, Imene, Laurine et Nohora pour leurs sourires qui ont toujours rendu mes journées plus agréables. Merci également à mes collègues masculins : Charles (*#Monoï*), l'inoubliable Jean-Nano (*#MrPatate*), Jérémy, Joseph, Kyan (*#B2O*), Lionel, Manu, my young apprentice Micky (*#Mickypédia*), O₂, Pascal, Sam, Sylvain, Thierry, Xu et bien sur mein Freund Whitesnake (*#Cylon*). Je leur souhaite toute la réussite qu'ils méritent.

J'ai une enfin pensée toute particulière pour G2 (un peu le Cristiano Ronaldo du labo) et Guinchon (et son ouïe fine) et avec qui j'ai commencé l'aventure et qui sont devenus peu à peu des amis. Merci pour tous ces moments.

Il y a également des personnes qui ont toujours été là pour moi. Je remercie Abdel, Arnaud alias « mecton », Binôme, mon Guigui, Mouhssine et Stéphan. Un grand merci à ma maman, mon papa, mon p'tit frère, Laura ainsi qu'à tous les autres membres de ma famille qui m'ont encouragé au cours de ces années. Mes pensées vont enfin à Pascale, Céçou et Jérém' pour leur soutien pendant ces longs week-ends de rédaction.

Je ne peux terminer ces remerciements que par la personne qui partage ma vie. Merci Audrey pour avoir su me supporter et me rassurer dans les moments de doute, merci pour ta patience, pour ta présence, pour nos projets. Merci pour tout. O

Table des matières

Avant-propos	1
---------------------------	----------

Chapitre 1 – Champs électriques dans les laboratoires sur puce : production et utilisations

I. Procédés d'intégration d'électrodes en microfluidique	6
I.1 Méthodes traditionnelles	6
I.2 Méthodes moins conventionnelles	9
II. Utilisation de l'électrochimie en microsystèmes	12
II.1 Actionnement microfluidique	12
II.2 Piles à combustible	14
II.3 Synthèse électrochimique	14
II.4 Analyses électrochimiques	15
III. Manipulations électrocinétiques de particules	18
III.1 Manipulation électrocinétiques de particules	18
III.2 Lyse cellulaire en microsystème	32
III.3 Electrofusion de cellules	37
Références bibliographiques	44

Chapitre 2 – Développement d'une filière d'intégration du cPDMS en laboratoires sur puce

I. Technologie cPDMS	56
I.1 Les matériaux nanocomposites en microsystèmes	56
I.2 Description du cPDMS.....	58
I.3 Préparation du cPDMS	62
II. Caractérisation du cPDMS	63
II.1 Caractérisation électrique du cPDMS	63
II.2 Dispositif microfluidique et caractérisations.....	66
Références bibliographiques	78

Chapitre 3 – Caractérisation électrochimique d'électrodes en cPDMS

I. Caractéristiques des électrodes de carbone en électrochimie.....	84
I.1 Conductivité électrique	84
I.2 Fenêtre de potentiel électrochimique	84
I.3 Modifications de surface : adsorption et oxydation	85
II. Matériels et méthodes	86
II.1 Configuration d'électrodes, protocoles de fabrication	86
II.2 Couples redox modèles utilisés	89
III. Résultats de voltammétrie cyclique	94
III.1 Etudes préliminaires	94
III.2 Influence du dopage du cPDMS	95
III.3 Evaluation de l'influence du plasma oxygène sur les mesures.....	97
III.4 Caractérisation du courant capacitif	100
Références bibliographiques	104

Chapitre 4 – Manipulation électrique de particules en microsystemes cPDMS

I. Système expérimental	108
I.1 Equipements	108
I.2 Cellules eucaryotes	109
II. Electromanipulation de particules	112
II.1 Manipulation électrocinétique de microbilles	112
II.2 Manipulation électrocinétique de cellules	118
III. Lyse de cellules	123
III.1 Protocoles électriques	124
III.2 Résultats de lyse de cellules HEK-293	124
IV. Electrofusion de cellules	129
IV.1 Expériences préliminaires	129
IV.2 Mise au point d'un microsysteme dédié à l'électrofusion	131
Références bibliographiques	137
Conclusion générale et perspectives	141
Liste des communications.....	145

Avant-propos

La microfluidique est une science dérivée de l'intégration de la notion de miniaturisation dans les domaines des sciences analytiques et des sciences de la vie au début des années 1990. Initialement, cet essor a été rendu possible grâce aux avancées technologiques de la microélectronique, dès les années 1970, conduisant à la réalisation de composants de taille de plus en plus réduite. Plus tard, certains instruments devenant obsolètes dans le domaine de l'industrie microélectronique, se sont démocratisés pour des plateformes technologiques de microfabrication ce qui a permis leur ouverture à d'autres disciplines telles que la chimie, la physique ou la biologie. Les multiples recherches réalisées à l'interface entre ces domaines ont notamment conduit au concept de laboratoire sur puce (LOC¹) ou encore de « Micro Total Analysis System » (μ TAS).

Les LOCs cherchent à réaliser l'ensemble des fonctions des laboratoires d'analyse actuels sur une seule puce de quelques cm . En effet, les laboratoires d'analyses actuels, bien qu'équipés de systèmes de plus en plus évolués, sont confrontés à de nouvelles nécessités telles l'économie de réactifs, le gain de place, ou encore le rendu rapide de résultats fiables. De plus, dans la perspective du développement de la médecine personnalisée, le besoin en analyses rapides va croître et nécessiter des outils innovants permettant de mener rapidement de nombreuses analyses. De même, la perspective du maintien à domicile de patients souffrant de maladies chroniques a conduit à la nécessité de développer des outils adaptés pour l'analyse délocalisée. Les LOCs permettent justement de diminuer les volumes (échantillons et réactifs), de paralléliser les mesures, d'améliorer leur sensibilité, le tout sur un système portable.

Un tel dispositif nécessite la miniaturisation de l'ensemble des fonctions (préparation, manipulation, séparation, détection) nécessaires à l'analyse de l'échantillon. C'est pourquoi la mise au point d'outils dédiés à ces fonctions ainsi que leur intégration dans un système microfluidique constitue un domaine de recherche pluridisciplinaire particulièrement actif. Les principales fonctions microfluidiques sont basées sur des procédés hydrodynamiques, chimiques, électriques, optiques, acoustiques, ou encore magnétiques.

Les champs électriques offrent de nombreuses possibilités permettant de couvrir la plupart des nécessités exprimées par les LOC. Par exemple les fonctions de détection et d'analyse peuvent être réalisées par électrochimie (ampérométrie, impédancemétrie). L'utilisation de la force électrique est également intéressante pour manipuler des fluides (phénomènes électrohydrodynamiques) mais aussi des particules (phénomènes électrocinétiques). De plus, l'utilisation de champs électriques est particulièrement adaptée à une intégration en microsystème. En effet la miniaturisation de l'espace inter-électrodes favorise la réduction des tensions nécessaires pour un champ donné.

L'application de champs électriques dans un canal microfluidique requiert l'intégration d'électrodes de taille micrométrique. Celles-ci peuvent être réalisées par plusieurs approches dépendant du choix du matériau et de la géométrie. Les électrodes les plus utilisées sont métalliques, en silicium ou encore en carbone. Elles peuvent cependant présenter un certain nombre de limites telles que leur coût, la durée des procédés de réalisation, les phénomènes

¹ Lab on Chip

d'oxydation mais également leur intégration étanche en microcanal. L'ensemble de ces contraintes a ainsi justifié le développement et l'utilisation de matériaux moins conventionnels tels que les nanocomposites pour des applications microfluidiques.

Reconnues comme un axe de recherche très prometteur, les nanotechnologies sont en plein essor notamment dans le champ des matériaux. L'introduction de particules de taille nanométrique (nanofils, nanotubes de carbone et nanoparticules) dans une matrice de polymère permet d'obtenir des matériaux aux propriétés améliorées ou nouvelles (mécaniques, électriques, optiques). On parle alors de nanocomposites dont la conception suscite un intérêt croissant dans des domaines allant de la recherche fondamentale à leur utilisation industrielle.

Basée sur des technologies polymères (résines photosensibles, PDMS², COC³), la microfluidique est particulièrement propice à l'utilisation de matériaux nanocomposites. Très récemment, des travaux ont ainsi mis en évidence l'intérêt de rendre ces polymères conducteurs, ferromagnétiques ou encore photosensibles.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans cette dynamique d'intégration de matériaux non conventionnels en systèmes microfluidiques. Il vise à mettre en avant l'utilisation d'électrodes de cPDMS, un matériau nanocomposite formé de PDMS rendu conducteur par l'ajout de nanoparticules de carbone. L'utilisation de cPDMS dans des dispositifs microfluidiques présente ainsi plusieurs avantages :

- le cPDMS est compatible avec les procédés technologiques habituellement utilisés en microfluidique (« soft lithography ») : ainsi, il peut être intégré dans une large gamme d'épaisseurs et de géométries en utilisant des méthodes de moulage et surtout, à l'instar du PDMS, il présente l'avantage de pouvoir être collé par plasma oxygène sur verre, PDMS et silicium de manière étanche et irréversible
- l'intégration est rapide à mettre en œuvre, très économique, et ne nécessite pas d'appareillage particulier.
- le carbone est un matériau inerte chimiquement donc présentant une grande stabilité.

Afin d'évaluer le potentiel du cPDMS en tant qu'électrodes pour des applications microfluidiques, nous avons choisi de l'utiliser d'une part pour des mesures électrochimiques mais également pour la manipulation de cellules.

Le premier chapitre de ce manuscrit vise à aborder les quelques notions bibliographiques utiles pour l'appréhension. La problématique d'intégration d'électrodes en microsystème y sera développée en insistant particulièrement sur les limites des électrodes conventionnelles.

La suite du chapitre décrira quelques exemples de l'utilisation de l'électrochimie en microfluidique. Ce paragraphe n'abordera cependant pas les principes théoriques de la discipline. Ceux-ci seront présentés dans le chapitre dédié à la caractérisation de la réponse électrochimique du cPDMS (Chapitre 3).

La troisième partie du chapitre sera consacrée à une présentation des principaux phénomènes électrocinétiques rencontrés en microfluidiques. La manipulation de particules nécessite en effet la compréhension des différents mécanismes fondamentaux de polarisation. Le chapitre se terminera avec la description de deux applications envisagées pour le cPDMS : la lyse et la fusion de cellules.

² Polydiméthylsiloxane

³ Cyclic Olefin Copolymer

Le Chapitre 2 sera axé sur la présentation et la caractérisation du cPDMS. Il débutera notamment par la mise en évidence des intérêts présentés par les matériaux nanocomposites et plus particulièrement du cPDMS dont la préparation et le procédé d'intégration en microcanal seront détaillés. Les propriétés électriques et de surface qui peuvent être critiques pour l'utilisation d'électrodes de cPDMS en microfluidique seront ensuite caractérisées.

Le Chapitre 3 sera centré sur la caractérisation électrochimique du matériau et la mise en évidence de son potentiel pour des applications d'analyse ou de détection. La réponse électrochimique du cPDMS a été étudiée vis à vis de sondes redox plus ou moins sensibles à l'état de surface. Elle a permis d'évaluer l'influence de l'épaisseur du matériau, de son dopage et du traitement de surface (plasma oxygène).

Dans le Chapitre 4, nous démontrerons le potentiel du cPDMS pour la manipulation de particules (billes et cellules) à travers les différents phénomènes électrocinétiques mis en œuvre avec des électrodes de cPDMS. Des expérimentations de lyse de cellules réalisées sous champs électriques impulsionnels et alternatifs permettront ensuite d'étayer l'intérêt d'électrodes de cPDMS en microfluidique. Le manuscrit se terminera par la mise au point d'un dispositif dédié à la fusion de cellule.

Finalement, la conclusion générale sera suivie par les perspectives et améliorations qui nous paraissent intéressantes et importantes pour la suite de ce travail. Ainsi, l'utilisation de ce matériau pour la lyse de cellules cancéreuses en sortie de chambre microfluidique de séparation nous semble une application très prometteuse de ces électrodes.

Chapitre 1

Champs électriques dans les laboratoires sur puce : production et utilisations

Ce chapitre débute par une présentation des principales méthodes de microfabrication d'électrodes en canal microfluidique. L'aspect technologique de cette entrée en matière est ici indispensable pour la compréhension des limites ayant conduit à l'élaboration de procédés moins conventionnels. Les travaux présentés dans ce manuscrit sont en effet axés sur la mise en œuvre du cPDMS, un matériau nanocomposite, s'inscrivant dans cette dynamique d'intégration de matériaux alternatifs en systèmes microfluidiques.

Deux domaines d'applications, couvrant les besoins les plus courants en LOCs (analyse, détection, manipulation, séparation), ont été choisis pour mettre en évidence le potentiel du cPDMS en microfluidique. La suite du chapitre présentera alors, dans deux parties distinctes, l'utilisation du cPDMS d'une part pour les mesures électrochimiques et d'autre part pour la manipulation électrocinétique de microparticules.

La 2^{ème} partie est axée sur la présentation des principales utilisations de l'électrochimie en microsystèmes. Ce paragraphe, illustré à partir d'exemples concrets, vise à exposer dans quelle mesure le cPDMS pourrait y être intégré. Les nombreux principes théoriques de l'électrochimie n'y seront pas abordés. Certaines notions apparaissent néanmoins dans le chapitre 3 où les résultats de caractérisation électrochimique sont présentés.

La dernière section du chapitre est dédiée aux manipulations électrocinétiques de microparticules (billes et de cellules) en microsystème. La compréhension de ces phénomènes nécessite d'appréhender les différents mécanismes fondamentaux de polarisation. Seront ainsi présentés des phénomènes classiques, comme la diélectrophorèse, mais également des phénomènes moins décrits dans la littérature comme les rotations en champ fixe ou les vortex. Le chapitre se terminera ensuite par une synthèse des mécanismes de lyse et de fusion de cellules, deux applications pour lesquelles l'utilisation du cPDMS pourrait se révéler avantageuse.

I. Procédés d'intégration d'électrodes en microfluidique

Les différentes applications nécessitant l'utilisation de champs électriques dans un canal microfluidique requièrent l'intégration d'électrodes adaptées à ses dimensions micrométriques. C'est pourquoi les méthodes de microfabrication d'électrodes passent quasiment toutes par une étape de photolithographie, une technologie indispensable pour la structuration de matériaux dans de telles dimensions. Ce paragraphe présente les principales techniques d'intégration d'électrodes en microsystème afin d'en décrire les limites. Celles-ci ont justement conduit au développement de procédés et de matériaux moins conventionnels tels que le cPDMS.

I.1 Méthodes traditionnelles de fabrication d'électrodes

- Méthodes de dépôt métalliques

En microfluidique, les électrodes les plus utilisées sont généralement métalliques. Leur fabrication repose sur les deux procédés de « lift-off » et de « LIGA¹ ».

Le premier, basé sur le principe d'évaporation, est destiné à la réalisation d'électrodes minces (entre 50 nm et 1 μm d'épaisseur). Cette technique, simple à mettre en œuvre, est particulièrement adaptée à la réalisation d'électrodes planaires en métaux nobles, tels que l'or ou le platine.

La fabrication d'électrodes métalliques épaisses est souvent réservée au procédé « LIGA » basé sur la réduction de cations métalliques par électrochimie sur une surface conductrice. La technique permet de réaliser des dépôts de cuivre, de nickel, d'or et d'argent d'épaisseurs comprises entre 1 et quelques centaines de μm .

Ces méthodes d'intégration d'électrodes métalliques présentent néanmoins des contraintes liées à la formation de couches isolantes d'oxydes ou encore à leur adhésion sur le substrat [1]. Par ailleurs, leur intégration microfluidique n'est pas parfaitement étanche puisqu'il n'existe, à notre connaissance, encore aucun moyen de coller irréversiblement les métaux et les matériaux polymères traditionnels de la microfluidique (PDMS², COC, PMMA).

- Méthodes de gravure du Silicium

Hormis les métaux, d'autres matériaux peuvent être employés comme électrodes. C'est notamment le cas des semi-conducteurs comme le silicium. Naturellement non conducteur, le silicium peut être dopé à l'aide d'autres éléments³, tels que le bore ou le phosphore [2]. Les propriétés physico-chimiques du silicium étant particulièrement intéressantes en micro-électronique, de nombreux procédés de structuration de ce matériau ont été mis au point. Le silicium est structuré par des méthodes de gravure dites « humides » (type KOH) ou « sèches » (procédés plasma) [2]. Les gravures humides sont cependant anisotropes et d'autant plus lentes que le matériau est dopé. Inversement, les gravures plasma de type DRIE⁴, n'étant ni limitées par la structure cristalline, ni par le dopage du matériau [2], permettent la structuration de motifs de silicium sur des épaisseurs de quelques μm à plusieurs centaines de μm . On notera cependant que ce type de procédé nécessite un appareillage très coûteux et qu'il peut s'avérer relativement long si de grandes épaisseurs sont requises.

¹ Lithographie Galvanoformung (galvanoplastie) Abformung (moulage)

² Polydiméthylsiloxane, Cyclic Olefin Copolymer, Polyméthacrylate de méthyle,

³ On parle usuellement de matériaux III/V en raison de leur classement dans le tableau périodique.

⁴ Deep Reactive Ion Etching

- Electrodes de carbone

La structuration du carbone (conducteur) se présente également comme une alternative sérieuse à l'utilisation de métaux. Son intérêt, notamment en électrochimie, a contribué à la mise au point de plusieurs procédés d'intégration d'électrodes de carbone.

La pyrolyse de résines photosensibles (PPF⁵) permet, par exemple, d'atteindre une large gamme de tailles et de formes. Mais le procédé implique des recuits à haute température (de l'ordre de 1000°C) [3]. La géométrie des structures étant relativement bien conservée pendant le traitement, cette technique est particulièrement intéressante lorsqu'elle est effectuée sur des structures en résine SU8. Elle permet notamment de réaliser des structures en pilier [4] (**Figure 1.1**).

Des films de diamant dopé bore (BDD⁶) peuvent être obtenus par dépôt chimique en phase vapeur assisté au plasma (MPCVD⁷). Le traitement est cependant assez long (10 h pour 40 µm d'épaisseur) et nécessite également de hautes températures (900°C) [5]. Cette technique peut également être employée pour fonctionnaliser des électrodes (d'or ou de carbone vitreux) avec des nanotubes de carbone [6] ou du graphène [7]. D'autres méthodes, plus accessibles, comme la gravure électrochimique du carbone vitreux (GC⁸) (dans NaOH 0,1 M à pH 13) [8], permettent également de structurer des électrodes dans des dimensions micrométriques. Elles nécessitent cependant l'utilisation de colles pour une intégration microfluidique complète.

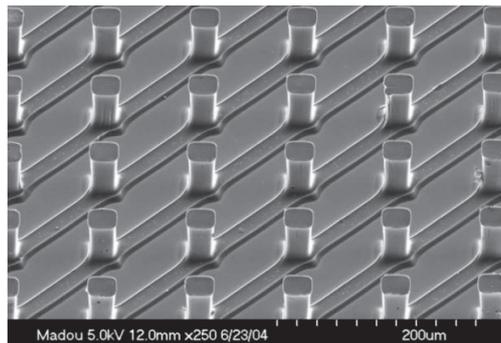


Figure 1.1 – Piliers réalisés par pyrolyse de structures en SU8. Image issue de [4].

Le carbone peut également se mélanger dans divers matériaux. On parle plus généralement de matériaux composites. Les premiers travaux présentant l'utilisation d'une pâte de carbone datent de 1958 [9] et font initialement référence à un mélange de carbone et de bromoforme. D'autres mélanges [10], plus adaptés à la réalisation d'électrodes microstructurées, ont depuis été développés comme par exemple les encres de carbone déposées par sérigraphie [11] ou des résines photosensibles dopées au carbone [12]. Ces deux techniques ne sont cependant pas compatibles avec de nombreux solvants. Le dopage de résines photosensibles révèle également des difficultés pour la réalisation d'électrodes micrométriques du fait de la diffusion des UV par les particules de carbones lors la photolithographie. Ce type d'électrode présente par ailleurs la même limite que les électrodes métalliques quant à leur intégration en microcanal. En effet, comme il n'existe à notre connaissance encore aucun moyen de coller proprement ces électrodes avec les polymères habituellement utilisés en microfluidique, leur intégration n'est pas parfaitement étanche.

⁵ Pyrolyzed Photoresist Film

⁶ Boron Doped Diamond

⁷ Microwave Plasma Assisted Chemical Vapor Deposition

⁸ Glassy Carbon

Le **Tableau 1.1** résume les propriétés des principales méthodes de microfabrication d'électrodes :

Type	Dépôt			Gravure	
Méthode	Evaporation	Électrodéposition	PPF, BDD...	Humide	Plasma
Matériaux	Cr, Au, Pt...	Ni, Cu, Ag...	Carbone	Si dopé, GC	Si dopé
Epaisseurs	50 - 250 nm	1 - 200 μm	1 - 200 μm	Epaisseur du wafer/dépôt	Epaisseur du wafer
Avantages	Rapidité, état de surface	Gamme d'épaisseurs	Gamme d'épaisseurs	Faible coût, étanchéité (pas pour GC)	Rapports de forme, étanchéité
Limites	Appareillage, coûts des matériaux, gamme d'épaisseurs, intégration non étanche, oxydation	Etat de surface après polissage, substrats conducteurs, intégration non étanche, oxydation	Durée du procédé, appareillage, intégration non étanche	Dopage, plans cristallins (Si), gamme d'épaisseur, oxydation	Coût et durée du procédé, oxydation

Tableau 1.1 – Synthèse des méthodes conventionnelles d'intégration d'électrode en microsystème

Ces méthodes peuvent être différenciées d'un point de vue « matériau ». Ainsi, si l'application visée exige une conductivité élevée, seront privilégiées les électrodes métalliques, et particulièrement à base de métaux nobles (Au, Pt, Ag) très peu sujets aux phénomènes d'oxydation. L'utilisation de silicium peut parfois se révéler plus avantageuse que celle des électrodes métalliques dans le cas d'applications biologiques pour des raisons de biocompatibilité. Le carbone est un matériau de choix dans de nombreux procédés électrochimiques, ceci notamment grâce à sa large fenêtre de potentiels, comme sera à nouveau évoqué dans la suite du manuscrit. On notera, par ailleurs, que le coût des matériaux (silicium dopé, or, platine) et du fonctionnement des équipements (notamment les évaporateurs, DRIE et MPCVD) peuvent limiter leur utilisation à quelques grandes plateformes de proximité de micro/nanofabrication.

Les géométries et épaisseurs des électrodes imposent également le procédé de réalisation. Par exemple, la nécessité d'utiliser des électrodes épaisses oriente vers les méthodes d'électrodéposition, de gravure sur silicium ou de PPF.

Néanmoins, l'intégration d'électrodes métalliques et de carbone en microcanal ne peut, à notre connaissance, pas être réalisée de manière étanche. En effet, les systèmes microfluidiques sont classiquement réalisés en PDMS, un élastomère pouvant être collé irréversiblement sur du verre (un mécanisme détaillé dans le chapitre II) et du silicium mais pas sur des métaux ou carbone. Il est alors nécessaire d'utiliser des moyens extérieurs de serrage pouvant endommager le dispositif et rendre sa manipulation difficile. De plus, des fuites de liquide peuvent apparaître entre l'électrode et le polymère lorsque des pressions sont appliquées dans le microsystème. On notera que le PDMS peut être collé de manière étanche sur silicium, mais à condition que celui-ci soit oxydé, ce qui peut limiter sa fonction même d'électrode.

Toutes ces méthodes présentent donc un certain nombre de limites pouvant parfois se révéler critiques, selon les applications recherchées. C'est pourquoi quelques méthodes moins traditionnelles ont été progressivement mises au point dans le but de proposer des alternatives innovantes et spécifiques à certaines applications.

I.2 Intégration d'électrodes par méthodes moins conventionnelles

Ce paragraphe s'intéresse maintenant à quelques techniques de fabrication d'électrodes moins conventionnelles.

- Structuration des parois du canal

La nécessité, pour certaines applications, d'obtenir un champ électrique homogène sur toute la hauteur du canal a conduit à l'élaboration de différentes géométries. Par exemple, si les électrodes sont réalisées face à face, le champ est uniforme (**Figure 1.2.c**), conformément aux simulations réalisées par Wang *et al* [13] (**Figure 1.2**).

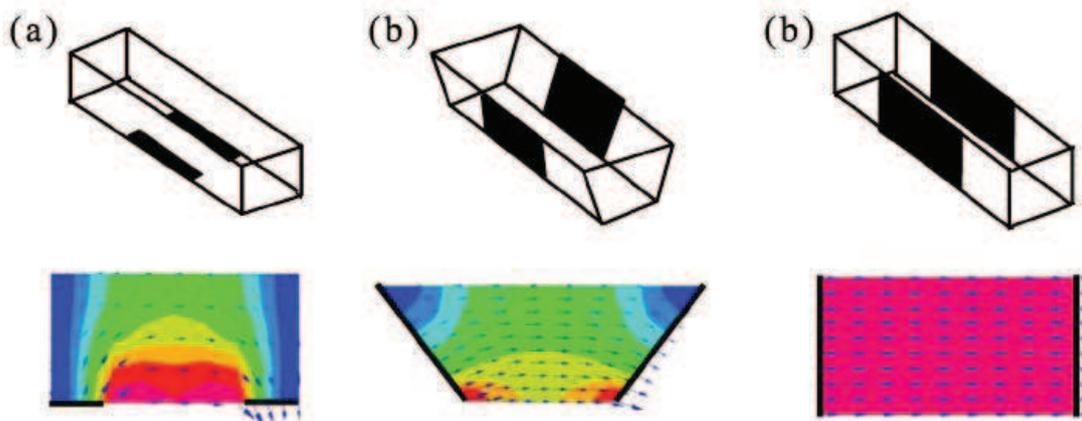


Figure 1.2 – Simulations de l'influence de la forme des électrodes sur la répartition du champ électrique dans un microcanal. Images issues de [13].

Yu *et al* [14] ont réalisé un dispositif intégrant un canal microfluidique cerclé d'électrodes. Le système est constitué de deux parties symétriques réalisées par gravure du verre (HF) suivie d'une évaporation d'électrodes planaires en or. Elles sont ensuite collées l'une sur l'autre pour former un canal cylindrique. Ce microsystème permet ici la concentration de cellules par diélectrophorèse, en guise d'étape préliminaire à l'analyse cytométrique (**Figure 1.3.a**).

Segerink *et al* [15], ont très récemment proposé un dispositif à électrodes planaires mais situées parallèlement sur le fond et le haut du canal. Cette méthode alternative permet également d'obtenir un champ uniforme sur une portion du canal. Une des originalités de ce dispositif, à électrode dite « flottante », est la connexion électrique par l'intermédiaire d'un électrolyte, simplifiant ainsi les contacts entre la puce et le générateur (**Figure 1.3.b**). Leurs auteurs utilisent cette conformation d'électrodes pour déterminer des variations d'impédance lorsqu'une particule traverse l'espace inter-électrodes.

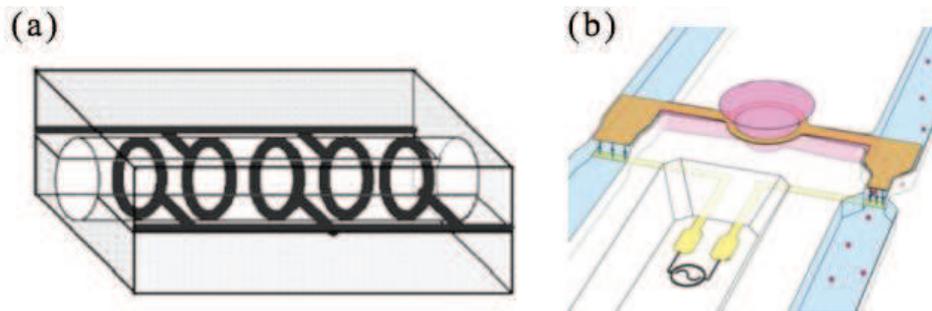


Figure 1.3 – (a) Représentation schématique du dispositif réalisé par Wu *et al* [14] permettant le « focusing » de cellules par DEP dans un canal cylindrique intégrant des électrodes circulaires. (b) Schéma du système d'électrode flottante développé par Segerink *et al* [15]

Wang *et al* [13] ont dernièrement mis au point une méthode d'intégration d'électrodes épaisses dans les parois d'un canal formé de résine SU8. On notera que si les électrodes sont proprement intégrées à fleur de canal (**Figure 1.4.b**), le procédé est particulièrement lourd. Il nécessite près de trois étapes de photolithographie couplées à une évaporation (Ti), une électrodéposition (Or) (**Figure 1.4.a**) suivies une étape de collage à chaud. Composé principalement de matériaux rigides (verre, métaux et SU8), le dispositif présente l'avantage d'être parfaitement étanche. Les auteurs utilisent ici le microsystème pour la manipulation de particules par diélectrophorèse, mais précisent néanmoins son potentiel pour les multiples applications microfluidiques nécessitant l'utilisation de champs électriques homogènes.

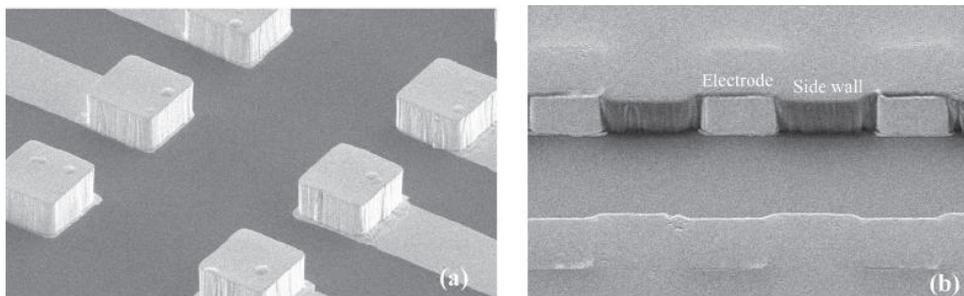


Figure 1.4 – Images issues de [13] présentant des électrodes épaisses d'or électrodéposées sur une couche de titane avant (a) et après intégration en microcanal de SU8 (b).

- Electrodes isolées (électriquement)

Les électrodes métalliques, c'est notamment le cas de celles en cuivre [16], peuvent provoquer, à long terme, le relargage d'ions non désirés dans le canal. Ceux-ci peuvent être nocifs pour la viabilité cellulaire ou polluer le milieu. L'une des solutions les plus efficaces pour s'affranchir de ces phénomènes est probablement l'utilisation d'une couche isolante pour séparer les électrodes du milieu. Ce diélectrique sert alors de filtre à la fois physique et chimique.

Si la méthode avait déjà été utilisée en 2006 par Siegel *et al* [17], pour l'intégration d'électroaimants dans un canal microfluidique, ce n'est que très récemment, avec les travaux de Villemejeane *et al* [18] que son potentiel pour l'isolement d'électrodes a été démontré. La méthode est particulièrement intéressante lorsqu'elle est couplée à l'utilisation d'électrodes liquides. En effet, ce type de matériau conducteur et thermodurcissable peut alors être injecté dans deux canaux parallèles au canal d'intérêt (**Figure 1.5**), simplifiant considérablement la fabrication et l'intégration des électrodes. On notera néanmoins que l'injection nécessite d'être précédée d'un traitement chimique de surface, et suivie

d'un refroidissement afin de solidifier les électrodes. La forme finale des électrodes mais aussi l'épaisseur de la couche isolante (en PDMS) sont donc imposées par la photolithographie. La méthode a ensuite été reprise par Shafiee *et al* pour la séparation de cellules par diélectrophorèse [19][20].

L'utilisation de ce type d'électrodes présente cependant quelques contraintes. Le mur diélectrique se comportant comme une capacité, l'amplitude des champs électriques appliqués nécessite d'être augmentée en fonction de l'épaisseur de l'isolant. Si ce phénomène ne limite pas des applications comme la diélectrophorèse pour laquelle les champs ne sont pas très élevés, son utilisation est plus délicate si des champs pulsés de forte tension sont nécessaires.

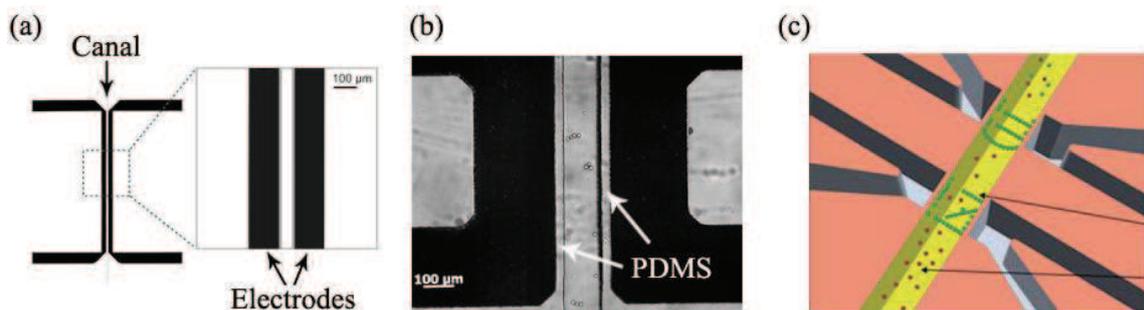


Figure 1.5 – Utilisation d'électrodes isolées dans un système microfluidique. (a) Les électrodes liquides sont injectées dans deux canaux de part et d'autre du canal microfluidique. (b) Ces électrodes sont séparées du canal par un diélectrique (ici du PDMS). Les applications sont notamment l'électroporation de cellules [18], (c) et la séparation de cellules par diélectrophorèse [20].

Les auteurs précisent que leur système est restreint à l'utilisation de champs inférieurs à 2.10^7 V/m, soit la limite de claquage diélectrique de la fine couche isolante de PDMS. Ce champ reste cependant insuffisant pour électroporer des cellules [18]. On notera également que ce type d'électrodes n'est pas adapté à des mesures électrochimiques qui nécessitent un contact entre l'électrode et l'électrolyte.

▪ Matériaux nanocomposites et cPDMS

L'intérêt des matériaux composites réside dans la combinaison des propriétés physico-chimiques de chacun des composants. Avec l'essor des microtechnologies, de nombreux travaux ont été effectués sur la combinaison de polymères utilisés en microfluidique (PDMS, SU8...) avec des nanoparticules/nanotubes [21][22]. Le polymère peut notamment devenir électriquement conducteur (nanoparticules d'argent [23] ou de carbone [24]), ferromagnétique (oxyde de fer [25]) ou encore photosensible [26]. Ces différents matériaux ainsi que leurs propriétés sont détaillés dans le **Chapitre 2**.

Nous proposons dans ce manuscrit d'utiliser du PDMS, le polymère de base pour la fabrication de la grande majorité des systèmes microfluidiques, rendu conducteur par l'ajout de nanoparticules de carbone. Sa base polymère lui assure une compatibilité optimale avec les procédés et les matériaux généralement utilisés en microfluidique, tandis que le carbone vise à le rendre conducteur de manière à l'utiliser en tant qu'électrode. On parle de cPDMS, pour carbone-PDMS, un matériau nanocomposite se distinguant notamment des autres méthodes de réalisation d'électrodes par sa simplicité de fabrication et une intégration parfaitement étanche en microcanal grâce à sa base de PDMS (**Tableau 1.2**). Accessible pour la majorité des laboratoires, le cPDMS présente de nombreuses qualités pour la réalisation d'électrodes d'épaisseurs variables, biocompatibles, robustes et de faible coût.

	PPF	GC	BDD	Fibre	HOPG	NT ⁹	Matériaux composites		
							CP ¹⁰	Encres	cPDMS
Méthodes	Pyrolyse	Gravure	MPCVD	Variables				Sérigraphie	Soft lithography
Epaisseurs	5 - 200 μm		5 - 50 μm		< μm		5 - 200 μm		
Limites	Procédé de fabrication lourd, long et couteux						Faible conductivité		
	Température	Polissage							
	Intégration non étanche en microsystème								
Avantages	Etat de surface			Conductivité élevée			Méthode de fabrication simple		
								Intégration	
Références	[3]	[8]	[27]	[28]	[28]	[28]	[9]	[29]	[24]

Tableau 1.2 – Synthèse des différentes méthodes d'intégration d'électrodes de carbone.

Afin de mettre en avant l'intérêt de ce matériau pour une utilisation en microfluidique, l'efficacité du cPDMS a été évaluée pour deux types d'applications nécessitant des champs électriques. Dans un premier temps, c'est la réponse électrochimique du cPDMS qui a été mise en évidence tout en étudiant ses propriétés de surface. Ensuite, l'utilisation du cPDMS a été démontrée pour la manipulation de particules par champs électriques que ce soit pour des applications telles que la diélectrophorèse ou la lyse de cellules.

Le paragraphe suivant présente, d'un point de vue très général, les principales utilisations de l'électrochimie en microsystème. Nous verrons, à travers quelques exemples, que cette science est ouverte sur de multiples domaines d'applications qui sont alors autant d'utilisations potentielles du cPDMS.

II. Utilisation de l'électrochimie en microsystèmes

L'électrochimie est une science qui allie chimie et électricité et qui décrit les phénomènes chimiques couplés à des échanges d'énergie électrique. Du point de vue socio-économique, on la retrouve dans différents domaines d'applications : électrosynthèse, environnement, analyses et détection, corrosion, traitement de surface, bioélectrochimie, stockage et conversion d'énergie. C'est assez naturellement que cette science a largement été utilisée dans le domaine des microsystèmes fluidiques. Ce paragraphe vise à présenter, de manière générale, certaines utilisations de l'électrochimie dans les systèmes microfluidiques [30][31]. Seront ainsi d'abord abordées rapidement les applications pour l'actionnement, les piles à combustibles et l'électrosynthèse avant de présenter les aspects de détection.

II.1 Actionnement microfluidique

Pour réguler les écoulements microfluidiques dans les canaux, un microsystème fluidique nécessite l'usage de fonctions primaires, telles que des pompes ou des valves. La plupart de ces actionneurs sont basés sur des phénomènes électriques, piézoélectriques ou encore thermo-pneumatiques [32]. Par ailleurs, quelques travaux ont mis en évidence l'intérêt de l'électrochimie pour remplir ces fonctions.

⁹ Nanotubes

¹⁰ Carbon paste (pâte de carbone)

Leur principe est basé sur la formation localisée de bulles de gaz par électrolyse du solvant [33]. Les actionneurs à base de bulles sont intéressants pour leur simplicité de fabrication (électrodes planaires de platine réalisées par lift-off) mais également parce que les bulles formées s'adaptent parfaitement au canal quelle que soit sa géométrie. Les bulles générées par électrochimie apparaissent rapidement mais sont également réversibles (un phénomène néanmoins limité par la cinétique de dissolution du gaz dans le liquide).

- Valve

Alors que l'utilisation de bulles pour moduler les écoulements de fluides dans un canal microfluidique avait déjà été démontrée [33], Hua *et al* [32] publient en 2002 l'un des premiers articles sur l'intégration de valves électrochimiques. Leurs travaux décrivent un multiplexeur fluide à 8 voies contrôlé par des microélectrodes. Le blocage de l'écoulement du liquide dans un canal est effectué par la génération d'une bulle de gaz dans le microcanal. Plus tard, Lee *et al* [34] réalisent un dispositif intégrant une valve composée d'une membrane souple de PDMS déformée par la génération de bulles. (**Figure 1.6**). Les auteurs précisent qu'une différence de potentiel de 1,5 V est suffisante pour induire la déformation de la membrane d'environ 300 µm.

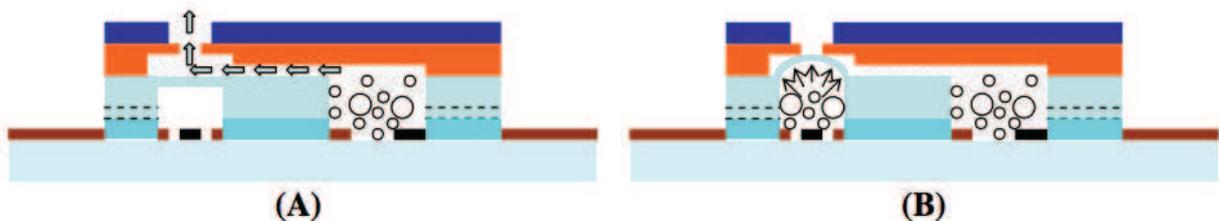


Figure 1.6 – Principe de valve développé par Lee *et al* [34]. La génération contrôlée de bulles par électrochimie induit la déformation d'une membrane souple.

- Aiguillage de cellule

Les travaux de Ho *et al* [35] ont également mis à profit la génération locale et contrôlée de bulles pour aiguiller la direction d'une cellule à l'intersection de deux canaux microfluidiques. La formation de bulles induit l'orientation d'une microstructure en T jouant alors le rôle d'aiguilleur (**Figure 1.7**). Selon si les bulles sont générées d'un côté ou de l'autre du commutateur (ou « switcher »), celui-ci favorise l'orientation de la cellule vers l'un ou l'autre côté du canal.

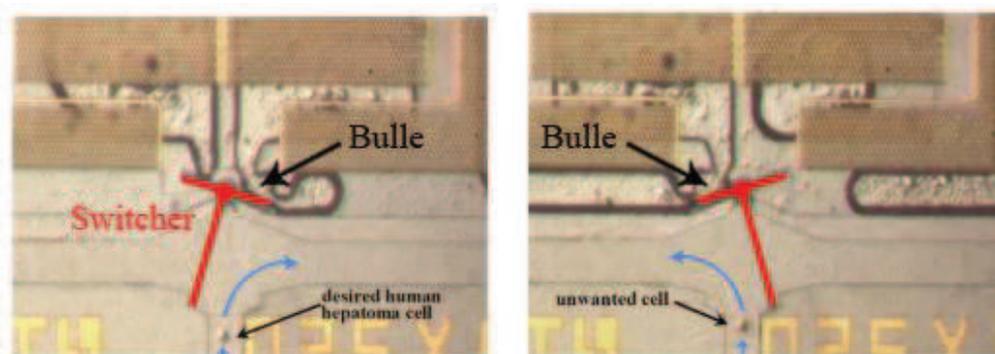


Figure 1.7 – Principe de l'aiguillage de cellules développé par Ho *et al* [35]. La génération contrôlée de bulles par électrochimie induit le changement d'orientation d'une microstructure en forme de T (en rouge) jouant alors le rôle d'aiguilleur. Le système permet de sélectionner les cellules d'intérêt.

II.2 Pile à combustible

L'augmentation des besoins en énergie, et particulièrement dans les systèmes embarqués, a conduit au développement de sources de courant miniaturisées. Les piles à combustibles, basées sur la conversion d'énergie chimique en énergie électrique, sont particulièrement adaptées à une intégration en microfluidique [36][37][38]. De nombreux travaux ont en effet mis à profit l'écoulement laminaire des liquides dans un microcanal pour réaliser des piles à combustible microfluidiques ne nécessitant aucune membrane de séparation. Dans un microcanal contenant deux électrodes, l'oxydant et le combustible (tel que l'hydrogène) circulent en parallèle en raison du caractère laminaire de l'écoulement (**Figure 1.8**). Les électrodes peuvent être réalisées par évaporation (titane) [36] ou par l'intégration de matériaux moins conventionnels tels que des feuillets de carbone poreux (**Figure 1.8.b**) déposés manuellement [39]. Le cPDMS semble ici particulièrement adapté à ce type d'application.

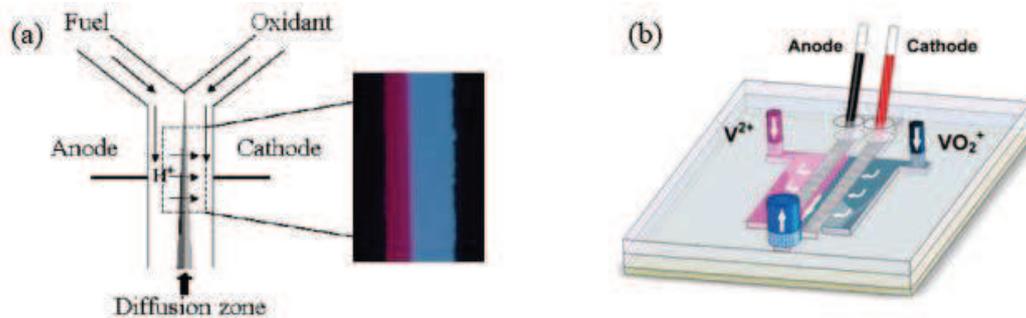


Figure 1.8 – Exemples de piles à combustible intégrées en canal microfluidique (a) utilisant les écoulements laminaires [36] (b) associée à la diffusion à travers des électrodes poreuses [39].

II.3 Synthèse électrochimique

A l'inverse, la conversion d'énergie électrique en énergie chimique peut conduire à la synthèse de molécules. On parle alors d'électrosynthèse. Yoon *et al* ont présenté un exemple mettant en valeur l'intérêt de la microfluidique pour la synthèse électrochimique. Dans un système macroscopique, la conversion de NADH en NAD⁺ n'est pas thermodynamiquement favorable. L'utilisation de la microfluidique, permettant de concentrer une espèce proche de l'électrode (**Figure 1.9**), a abouti à renverser cette tendance. Dans ce microsystème, le taux de conversion de NADH a atteint 30% tandis que dans les systèmes conventionnels, ce taux est de l'ordre de 5%.

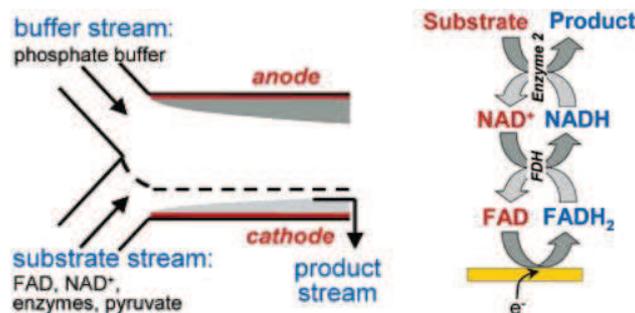


Figure 1.9 – Système microfluidique permettant l'augmentation du taux de synthèse d'un produit en agissant sur la régénération du cofacteur et en rapprochant (jeu d'écoulements laminaires) la réaction à proximité de l'électrode de travail. Figure réalisée d'après [40].

II.4 Analyses électrochimiques

Depuis quelques années, l'émergence des laboratoires sur puce a conduit à la mise au point d'outils d'analyse chimique et biochimique de plus en plus performants. De nombreux efforts ont notamment été portés sur l'intégration d'outils microfluidiques indispensables au contrôle et à la manipulation de volumes parfois inférieurs au nL. La diminution du volume des échantillons et des réactifs est notamment intéressante d'un point de vue économique (prix des réactifs).

La fluorescence est l'une des méthodes de détection les plus populaires en biologie cellulaire (cytométrie en flux) et moléculaire (ELISA). Cette méthode nécessite cependant l'utilisation de marqueurs (pouvant justement limiter la mesure) ainsi qu'un appareillage optique encombrant. C'est également le cas de la chimiluminescence.

L'électrochimie est une méthode de détection largement utilisée présentant une remarquable sensibilité [41], un faible coût de mise en œuvre, et une compatibilité avec les procédés de microfabrication. Cette technique se limite néanmoins à la détection d'espèces électroactives (ou à des espèces qui modifient la concentration d'espèces électroactives secondaires dans le milieu) [41]. Ainsi, contrairement à la fluorescence, cette technique présente l'avantage de ne pas nécessiter de marquage. On notera par ailleurs qu'elle peut être utilisée à la fois comme système de détection mais également comme outil de caractérisation, nous aurons l'occasion de revenir sur ce point dans la suite du manuscrit.

Les outils électrochimiques ont pour fonction de convertir un signal chimique/biochimique en signal électrique beaucoup plus simple à traiter. Les différentes méthodes de mesure électrochimique sont distinguées selon le mode de transduction utilisé [30]:

- les systèmes de mesure de potentiels, dits potentiométriques,
- les outils de mesure de conductivité, on parle de conductimétrie,
- les capteurs basés sur l'électrochimiluminescence,
- les dispositifs de mesure du courant, dits ampérométriques, qui nous intéressent plus particulièrement dans ce manuscrit.

▪ Méthode potentiométrique

Les capteurs potentiométriques sont des capteurs chimiques permettant notamment de déterminer la concentration des composants d'une solution. Le signal est mesuré par la différence de potentiel entre une électrode de référence et une électrode de travail dont le potentiel varie avec la concentration de l'électrolyte, conformément à la relation de Nernst. De manière à mesurer spécifiquement la concentration d'un ion, l'électrode est recouverte d'une membrane semi-perméable. On parle alors d'IES (Ion Selective Electrode). Ces membranes sont cependant fragiles, couteuses et difficilement compatibles avec l'intégration microfluidique.

Des systèmes plus complexes sur la base d'un transistor à effet de champ ont également été mis au point (ISFET¹¹) (**Figure 1.10.a**) [42]. Ce type de capteur peut notamment mesurer le pH d'un milieu en temps réel. Intégré en canal microfluidique (**Figure 1.10.b**), il permet par exemple l'étude du métabolisme bactérien [43].

¹¹Ion Sensitive Field Effet Transistor

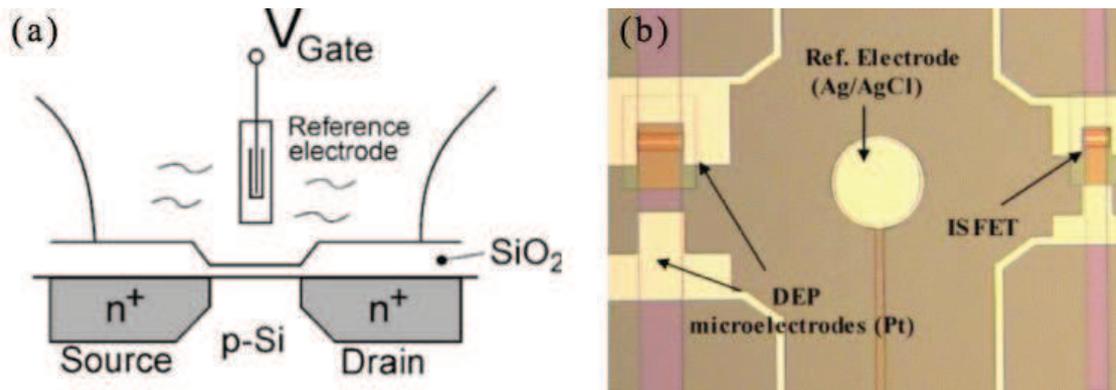


Figure 1.10 – (a) Schéma d'un ISFET. Pour simplifier, le courant Source-Drain dépend de la capacité formée par la couche de silice (SiO_2). Un changement chimique permet de moduler cette capacité et donc de faire varier le courant. Lorsque la couche est sensible à la concentration en protons, l'ISFET permet la mesure du pH. (b) Exemple d'intégration d'un ISFET en canal microfluidique. Images tirées de [42] et [43].

▪ Conductimétrie

La plupart des réactions biochimiques s'accompagnent de la production ou de la consommation d'espèces ioniques. Ceci conduit à une modification de la conductivité de la solution. A la différence de la méthode potentiométrique, la mesure de la concentration n'est ici pas spécifique à un type d'ion, et toutes les espèces chargées de l'électrolyte sont prises en compte. La mesure de résistance s'effectue à l'aide de simples électrodes (parfois interdigitées [30]) et est donc largement compatible avec l'intégration en microsystème (**Figure 1.11**). Le contrôle de la conductivité d'une solution en temps réel est, par exemple, intéressant pour l'étude de la viabilité de cellules dont le cytoplasme est particulièrement conducteur.

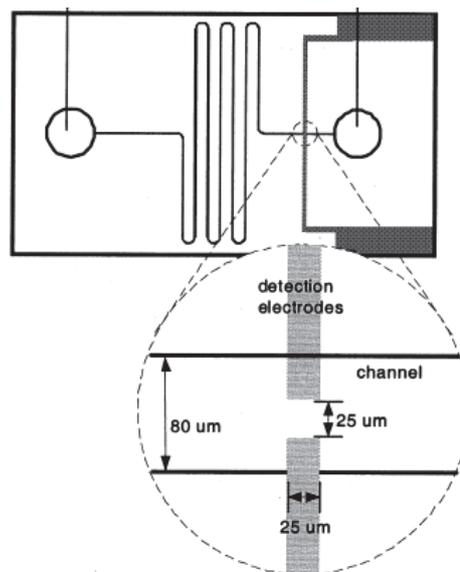


Figure 1.11 – Exemple de dispositif dédié à la mesure de conductivité dans un canal microfluidique. La résistance entre les deux électrodes de platine est mesurée en continu. Figure issue de [44]

▪ Electrochimiluminescence (ECL)

Certaines molécules, excitées par un processus chimique, reviennent à un état fondamental en restituant une partie de leur énergie dégagée sous forme d'émission de lumière, on parle de chimiluminescence. Cette propriété a notamment conduit à une méthode de détection de taches de sang à l'aide d'un mélange luminol/peroxyde d'hydrogène. On notera qu'à l'inverse de la fluorescence, cette méthode ne requiert pas de source lumineuse d'excitation, ce qui permet notamment de diminuer le bruit de fond et donc la limite de détection [30].

L'excitation de ces molécules peut cependant s'effectuer par électrochimie, c'est l'ECL, qui a conduit à la mise au point d'un grand nombre d'applications de diagnostic [45] tels que les dosages immuno-enzymatiques [46], ou l'utilisation de sondes à ADN marquées [47] (**Figure 1.12**).

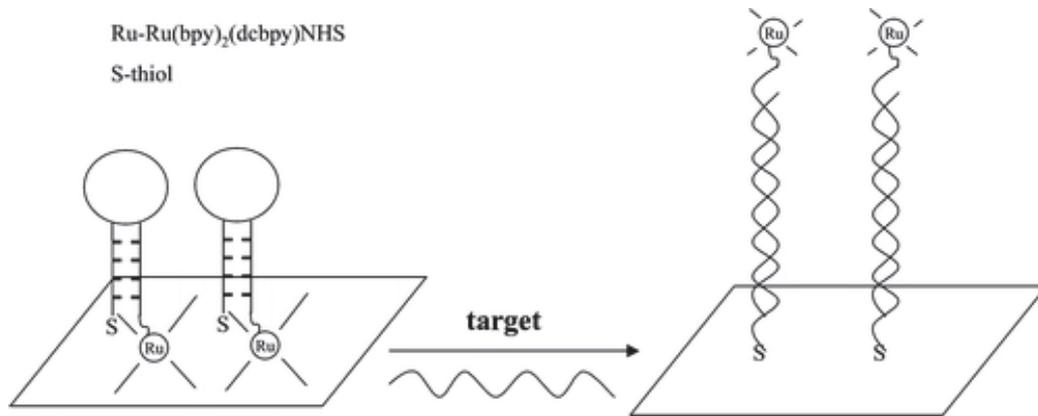


Figure 1.12 – Utilisation de l'ECL pour mettre en évidence l'hybridation ADN/sonde. Une sonde taguée par un marqueur (ici complexe de ruthénium) est immobilisée sur une électrode en or. Sa structure (tige-boucle) impose alors la proximité du marqueur avec la surface de l'électrode ce qui lui permet une forte réponse à l'ECL. L'ajout d'un ADN (simple brin) dans le milieu peut conduire à une hybridation de celui-ci sur la sonde. Ceci conduit à une modification de sa structure (double hélice) et donc à l'éloignement de la sonde. L'hybridation se traduit par la diminution du signal d'ECL.

Figure issue de [47].

▪ Ampérométrie

Les capteurs ampérométriques sont basés sur la mesure d'un courant généré par réaction d'oxydoréduction entre une électrode et une ou plusieurs espèces électroactives. La caractérisation de ce courant renseignant alors directement sur la composition du milieu, ceci a conduit au développement de techniques de mesure en temps réel.

La détection par ampérométrie peut notamment être utilisée en électrophorèse capillaire (EC). Cette association permet la séparation rapide de composés et leur identification avec une sensibilité remarquable [41]. Ainsi très récemment, Chandra *et al* [48] ont mis au point un capteur ampérométrique permettant de détecter des molécules anticancéreuses dans les urines jusqu'à des concentrations de l'ordre du fM. L'utilisation clinique d'un tel dispositif est notamment cruciale pour ajuster le traitement des patients et limiter ainsi ses effets secondaires.

▪ Conclusion

De nombreux travaux [1][49][50] mettent en avant l'intérêt d'utiliser des électrodes de carbone dans les multiples applications de l'électrochimie. Cependant, leurs procédés d'intégration en microcanal limite encore leur utilisation au profit des électrodes métalliques (cf. **Tableau 1.2**) [1].

Ce manuscrit se positionne dans cette problématique d'intégration d'électrodes de carbone par des procédés simples, économiques et efficaces. Il vise ainsi à démontrer le potentiel du cPDMS pour des applications électrochimiques et microfluidiques. Pour cela un certain nombre de mesures par ampérométrie ont été effectuées sur ce matériau. L'utilisation d'espèces électroactives a ainsi permis de caractériser l'état de surface du cPDMS tout en mettant en valeur son aptitude pour la détection électrochimique. L'ensemble de ces résultats fait l'objet du **Chapitre 3**.

Dans cette thèse, le cPDMS a également été évalué pour des applications de manipulations électrocinétiques de particules. Le paragraphe suivant présente alors les notions indispensables pour appréhender ces phénomènes. De plus, la plupart de ces aspects n'étant pas forcément familiers, cette partie abordera les mécanismes mis en œuvre avec une approche plus fondamentale que la section précédente.

III. Manipulations électrocinétiques de particules

L'utilisation des champs électriques a rapidement été mise à profit pour la manipulation de particules en microfluidique. De nombreux laboratoires sur puces utilisent ainsi des phénomènes tels que la diélectrophorèse pour le déplacement ou la caractérisation de cellules. Par ailleurs, l'action d'un champ électrique pulsé peut également conduire à la déstabilisation de la membrane cellulaire. Ce phénomène a été mis à profit pour l'élaboration d'applications en recherche fondamentale mais également thérapeutiques.

Ce paragraphe vise à présenter les différents mécanismes d'interaction mis en œuvre lorsque des particules sont soumises à un champ électrique ainsi que les conséquences sur leur comportement dans un canal microfluidique.

III.1 Manipulation électrocinétique de particules

Les phénomènes électrocinétiques décrivent toute forme de couplage entre un champ électrique et le mouvement de fluides ou de particules. Leur caractérisation et leur maîtrise ont conduit à la mise au point d'applications parmi les plus abouties [51]. Le **Tableau 1.3** en distingue les principales.

Manipulations	Régime	Phénomènes	Applications	Références
Liquides	Continu	Électro-osmose DC	Séparation	[52]
	Alternatif	Électro-osmose AC	Transport	[53]
	Continu	Electromouillage	Déplacement de gouttes	[54]
	Alternatif	Electrothermie	Transport	[55]
Particules	Continu	Electrophorèse	Séparation	[56]
	Alternatif	Diélectrophorèse	Séparation, capture...	[57]
	Alternatif	Electrorotation	Caractérisation	[58]

Tableau 1.3 – Principaux phénomènes électrocinétiques utilisés en microsystèmes

L'**électro-osmose** est la conséquence de l'application d'un champ électrique de manière tangentielle à une interface solide/liquide. La structure en double couche électrique (détaillée dans la suite du manuscrit) est alors modifiée : la migration des contre-ions sous l'effet de ce champ associée à l'entraînement induit sur les molécules de solvant permet de mettre en écoulement un fluide dans un microcanal [53]. Les applications sont principalement orientées sur les techniques séparatives telle que l'électrophorèse capillaire [52] où des profils d'écoulements de type bouchon sont obtenus en comparaison avec les profils d'écoulements de type Poiseuille habituels [51].

L'**électromouillage** traduit l'utilisation d'un champ électrique pour déplacer des petits volumes de liquide en modifiant les tensions de surface. La technique permet par exemple de déplacer des gouttes sur des réseaux d'électrodes couvertes d'un diélectrique [54].

L'échauffement par effet joule d'un liquide diélectrique induit des gradients de température et donc des déplacements de matière dans le milieu. Ceux-ci créent à leur tour des gradients de permittivité et de conductivité. C'est le phénomène d'**électrothermie**, parfois utilisé comme pompe [55].

La description des méthodes de manipulation électrocinétique de particules fait l'objet de ce paragraphe. Nous serons ainsi amenés à décrire les différents phénomènes de polarisation intervenant. Néanmoins leur compréhension passe par la présentation des propriétés diélectriques des particules utilisées dans ce manuscrit, à savoir des microbilles de polystyrène/latex (PSL¹²) et des cellules eucaryotes HEK-293.

III.1.a Modèles électriques des particules

▪ Charges de surface d'une bille homogène

Lorsqu'un matériau (de surface initialement chargée ou non¹³) est placé en contact avec un électrolyte, une structure en double couche électrique (EDL¹⁴) apparaît aux abords de sa surface. S'il existe différents modèles d'EDL, celui de Gouy-Chapman-Stern est l'un des plus couramment utilisés. Restant suffisant pour présenter les phénomènes mis en évidence dans nos travaux, seul ce modèle sera pris en compte dans ce manuscrit.

Les charges de surface attirent une première couche compacte dite de « Stern » composée de contre-ions (de charge opposée) immobiles compensant une partie du potentiel de surface. Une seconde couche dite « diffuse » est ensuite formée (**Figure 1.13**). Celle-ci est composée de contre-ions et de co-ions (minoritaires) mobiles sous l'effet de la compétition des effets électrostatiques et thermodynamiques [59]. L'épaisseur de cette EDL dépend en particulier de la force ionique et de la température.

On notera ensuite que le plan de cisaillement, correspondant à l'interface entre les couches compacte et diffuse, est caractérisé par le potentiel zêta (ζ), un paramètre particulièrement critique sur la faculté des particules à se déplacer sous l'effet d'un champ électrique.

¹² PolyStyrène Latex

¹³ La surface peut se charger par dissociation ionique et sous l'effet de l'adsorption d'espèces chargées [59].

¹⁴ Electrical Double Layer

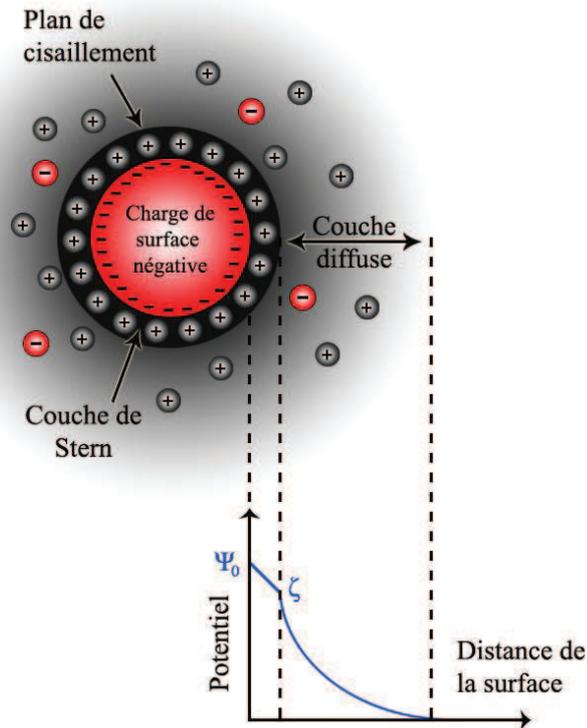


Figure 1.13 – Modèle EDL d'une particule. Les charges de surface (ici négatives) apparaissant lorsque la particule est plongée dans un électrolyte, attirent des contre-ions (positifs) dans une première couche compacte dite de Stern. La couche mobile ou diffuse correspond ensuite à la zone d'attraction d'ions qui sont également soumis à des forces thermodynamiques. Le plan de cisaillement correspond à l'interface entre les charges fixes et mobiles.

- Composition et propriétés diélectrique d'une cellule

La cellule, unité fonctionnelle à la base de tous les organismes vivants (hormis les virus), est formée d'un cytoplasme entourée d'une membrane plasmique. Cette membrane, de 2 à 10 nm [60], joue un rôle de barrière et assure l'intégrité de la cellule. Constituée principalement de lipides et de protéines, elle est sélectivement perméable aux petites molécules (O_2 , H_2O) et imperméable aux ions inorganiques (Cl^- , K^+ , Na^+ ...). Elle est dite alors « semi-perméable », une propriété ayant notamment un rôle essentiel dans le maintien de la composition des cellules et dans leur contrôle de la circulation des signaux à l'intérieur et à l'extérieur.

Chez certaines cellules (végétales, levures, bactéries...), la membrane est recouverte d'une paroi, une protection supplémentaire qui leur permet notamment d'être moins sensibles aux phénomènes osmotiques. Ce n'est pas le cas des cellules HEK-293 utilisées dans nos travaux, qui sont en revanche recouvertes d'un glycolalyx perméable aux ions. Cette couche glucidique visqueuse recouvrant la membrane assure des fonctions diverses telles que l'adhésion avec d'autres cellules mais également la protection de la membrane [61]. La présence de cette forte densité de glucides à l'extérieur de la membrane induit la formation d'une charge de surface par la prédominance de fonctions carboxylates et phosphates chargées négativement à pH physiologique [62]. Cependant, la structure particulière du glycocalyx impose une répartition ionique de surface différente de celle prise en compte dans le modèle de Gouy-Chapman-Stern (**Figure 1.14**).

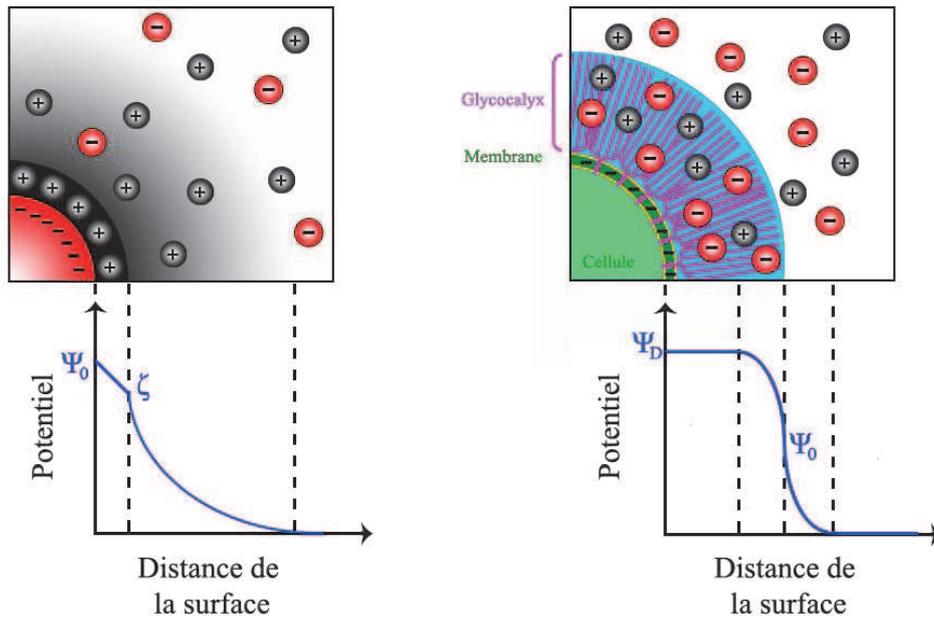


Figure 1.14 – Comparaison des phénomènes de réarrangement ionique associés à la présence de charges de surface sur une bille homogène (à gauche) et une cellule animale (à droite). Cette dernière est caractérisée par la présence d'une membrane plasmique entourée d'une couche de glycocalyx. Les potentiels sont représentés en valeurs absolues. Schéma réalisé d'après [63].

Le modèle cellulaire de la variation du potentiel de surface est assez complexe et reste peu décrit. A l'instar de beaucoup de phénomènes biologiques, il varie sensiblement avec le type de cellules. Si l'on considère un cas général, la charge de surface d'une membrane, définie par le potentiel de Donnan (Ψ_D), attire une première couche de contre-ions diffusant dans le glycocalyx et masquant ce potentiel (**Figure 1.14**). La surface de la cellule est alors caractérisée par un potentiel Ψ_0 dépendant donc de Ψ_D , de l'épaisseur du glycocalyx et de la concentration en contre-ions. Ce potentiel de surface conduit ensuite à la formation d'une couche diffuse, caractérisée par la longueur de Debye (λ_D), conformément au modèle EDL de Gouy-Chapman-Stern. On notera que l'épaisseur du glycocalyx (de l'ordre de 10 nm) est environ 10 fois supérieure à celle de la longueur de Debye dans les conditions physiologiques (soit 1 nm).

- Modèles électriques des particules

Les microbilles constituées d'un polymère (PSL) peuvent être considérées électriquement comme des sphères homogènes dont les propriétés électriques dépendent du matériau (conductivité 10^{-6} S.m⁻¹ et permittivité relative 2.55 pour le latex), mais leur modèle électrique tient généralement compte de la charge de surface. La conductivité d'une particule (σ_p) est donnée dans l'équation suivante :

$$\sigma_p = \sigma_{pbulk} + \frac{2K_s}{r} \quad (\text{Equation 1.1})$$

où σ_{pbulk} représente la conductivité du matériau constituant la particule (négligeable dans le cas du latex), K_s est la conductance de surface (ordre de grandeur 1 nS), et r désigne le rayon de la particule [64]. Comme indiqué par cette équation, l'influence de la charge de surface sur le comportement de la particule en présence d'un champ électrique augmente lorsque la taille de la particule diminue.

Les cellules sont formées de plusieurs compartiments de propriétés électriques différentes. Il est donc nécessaire d'adopter un modèle à plusieurs couches pour les modéliser. On parle plus couramment de modèle « multi-shell », pour lequel chaque couche est caractérisée par des propriétés diélectriques propres (conductivité et permittivité).

La structure de base, qui peut être appliquée dans le cas de cellules de composition simple, est constituée d'une membrane entourant un cytoplasme, tous deux étant considérés comme électriquement homogènes. C'est le modèle « single-shell » particulièrement adapté aux cellules possédant un petit noyau (**Figure 1.15**):

- La membrane plasmique, particulièrement isolante du fait de sa composition, présente une faible conductivité comprise entre 10^{-8} et 10^{-4} S/m. On l'assimile souvent à un condensateur dont la capacité est exprimée relativement à la surface membranaire. Sa valeur est typiquement de l'ordre de $1\mu\text{F}/\text{cm}^2$ [65]. Sa permittivité relative varie en fonction de sa composition, elle est située dans la gamme 2-10 [62].
- Le cytoplasme des cellules est classiquement composé de nombreux ions (K^+ , Mg^{2+} , Na^{2+} , HCO_3^-), protéines, acides nucléiques et autres molécules, et généralement modélisé comme un diélectrique avec pertes, dont la permittivité relative et la conductivité varient respectivement dans les gammes de 50-200 et 0,1-10 S/m [62].

On notera cependant que ce modèle ne prend pas en compte la présence d'organites membranaires cytoplasmiques (noyau et vésicules) de propriétés diélectriques comparables à celles de la membrane plasmique¹⁵ [66][67][68]. Néanmoins le modèle « single-shell » est le plus couramment utilisé, dans la mesure où il reflète bien la composition typique d'une cellule [66][69].

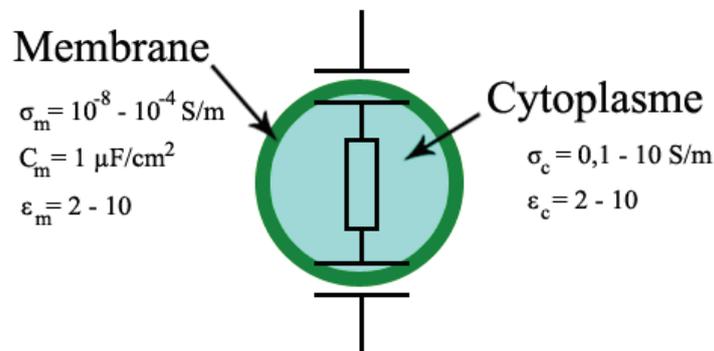


Figure 1.15 – Modèle « single-shell » d'une cellule. La membrane est considérée comme une capacité, tandis que le cytoplasme est assimilé à une sphère homogène assez conductrice.

III.1.b Mécanismes de polarisation des particules

Lorsqu'une particule diélectrique, bille ou cellule, est soumise à un champ électrique, différents phénomènes de polarisation peuvent intervenir. Si ceux-ci dépendent des propriétés de la particule, nous comprendrons à travers les notions de relaxation et de dispersion que la fréquence du champ est particulièrement critique sur ces mécanismes.

¹⁵ Dans une certaine gamme de fréquences

▪ DC et basses fréquences : déformation de l'EDL et relaxation des contre-ions

On rappelle que la charge de surface d'une particule attire un nuage de contre-ions selon le modèle EDL décrit précédemment. Considérons maintenant cette particule placée dans un champ électrique continu. Toute espèce chargée dans le milieu se déplace, sous l'effet de la force de Coulomb, en direction de l'une ou l'autre des électrodes (en fonction de son signe). Les contre-ions sont attirés à la fois par la particule et par l'électrode. Ceci conduit à la déformation de l'EDL. Cette nouvelle répartition non sphérique des contre-ions de l'EDL peut alors être considérée électriquement comme un dipôle induit parallèle au champ appliqué.

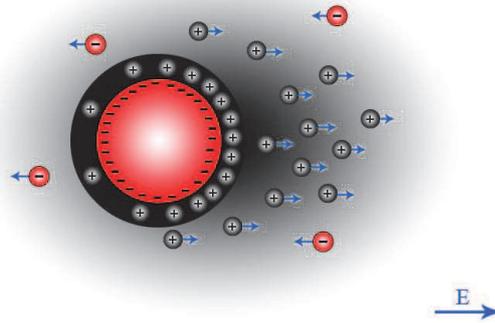


Figure 1.16 – Illustration de la déformation de l'EDL d'une particule soumise à un champ électrique (E). Les charges de la couche de Stern s'accroissent préférentiellement d'un côté et la couche diffuse s'étire dans la direction du champ. Schéma réalisé d'après [64][70].

Conformément au modèle d'EDL, les ions de la couche diffuse sont attirés par la charge de surface de la particule sur une distance caractérisée par la longueur de Debye (λ_D). Cependant λ_D augmente lorsque la concentration ionique du milieu diminue [59]. Si l'on considère l'exemple d'une particule en suspension dans une solution de KCl de 1 M ou de 10^{-5} M, les λ_D sont alors respectivement de 0.3 nm à 90 nm conformément à l'équation de Poisson-Boltzman (augmentation d'un facteur 300). Ceci signifie que plus la concentration ionique du milieu est faible, plus la double couche se déformera facilement sous l'effet d'un champ extérieur. Le moment dipolaire induit est donc plus important à faible concentration.

Examinons maintenant les conséquences de l'application d'un champ alternatif sur l'EDL. Lorsque la fréquence du champ est basse, les contre-ions de la couche diffuse se déplacent sur de larges distances (comparables à la taille de la particule). Le dipôle induit est alors important et parallèle au champ électrique. Avec l'augmentation de la fréquence, la double couche n'a plus le temps de se déformer et ce mécanisme de polarisation cesse de dominer.

Le modèle de Schwartz [71] décrit le déplacement des contre-ions autour de la particule comme étant le résultat d'une compétition entre la déformation de la couche diffuse sous l'effet du champ, et du processus de diffusion qui tend à rééquilibrer la distribution sphérique [72]. Ce phénomène de polarisation disparaît avec l'augmentation de la fréquence du champ électrique ce qui se traduit par une diminution de la permittivité (dispersion diélectrique) d'une quantité :

$$\Delta\epsilon = \frac{1}{1 + j\omega\tau} \frac{e_0^2 a \sigma_0}{\epsilon_0 k_B T} \quad (\text{Equation 1.2})$$

où e_0 désigne la charge d'un contre-ion, a , le rayon de la particule, σ_0 , la densité de charges de surface, k_B , la constante de Boltzmann, et T , la température.

Le temps de relaxation (τ_D) associé à ce phénomène dépend de la taille de la particule et est décrit par l'équation suivante :

$$\tau_D = \frac{a^2}{2\mu k_B T} = \frac{a^2}{2D} \quad (\text{Equation 1.3})$$

avec μ , la mobilité mécanique d'un contre-ion, et D , la constante de diffusion d'un contre-ion. La dispersion correspondante est notée dispersion « α ».

Dans le cas d'une particule micrométrique, la fréquence de relaxation est habituellement inférieure au kHz [72][73]. En basse fréquence, le phénomène de polarisation lié à la déformation du nuage de contre-ions domine. Au-delà, un autre phénomène de polarisation l'emporte. Il trouve son origine dans la différence de propriétés diélectriques entre la particule et son milieu de suspension. Ce phénomène, dit de Maxwell-Wagner, est donc un mécanisme de polarisation interfaciale.

▪ Polarisation interfaciale et relaxation de Maxwell-Wagner

Considérons une particule diélectrique en suspension dans un électrolyte. Lorsqu'un champ électrique est appliqué, une accumulation de charges se produit de part et d'autre de l'interface particule/électrolyte. En raison de leur différence de propriétés électriques, cela peut conduire à la formation d'un dipôle net sur la particule (**Figure 1.17**). On notera que ce phénomène est d'autant plus prononcé que les propriétés des matériaux sont éloignées. Il se manifeste notamment dans les milieux biologiques tels que les cellules compte-tenu des différences de propriétés entre membrane et cytoplasme [62].

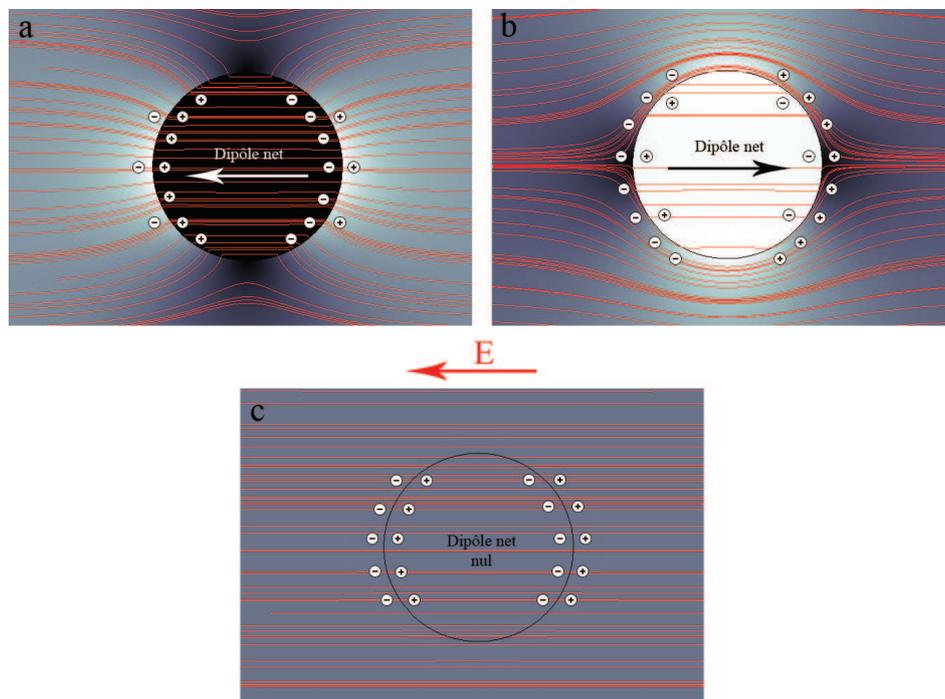


Figure 1.17- Simulations Comsol® présentant le phénomène de polarisation interfaciale. (a) La particule est plus polarisable que le milieu de suspension, le dipôle net induit est alors orienté dans le sens du champ. (b) Le milieu est plus polarisable que la particule, le dipôle net induit est orienté dans le sens inverse du champ (c) La polarisabilité de la particule et du milieu sont identiques.

Comme l'ensemble des phénomènes de polarisation, celui de Maxwell-Wagner est limité en fréquence. Son temps de relaxation (τ_{MW}) est défini [74] par:

$$\tau_{MW} = \frac{\epsilon_p + 2\epsilon_m}{\sigma_p + 2\sigma_m} \quad (\text{Equation 1.4})$$

avec ϵ_p/ϵ_m , les permittivités respectives de la particule et du milieu, et σ_p/σ_m , leurs conductivités respectives.

Dans le cas d'une cellule, on distingue toutefois généralement deux relaxations. La première est due à la nature capacitive des membranes, la seconde, observée à des fréquences plus élevées, est liée à la différence de conductivité entre le cytoplasme et le milieu extracellulaire [57][75]. Intervenant jusqu'à une centaine de MHz, cette dispersion est parfois appelée « β ».

- Dispersion γ

Les molécules dépourvues de symétrie sont naturellement polaires et donc caractérisées par un moment dipolaire permanent¹⁶. Cette polarisation intrinsèque confère à ces molécules la possibilité de s'orienter lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. On parle alors de polarisation dite « d'orientation » ou « dipolaire ». Ce phénomène, également limité par la fréquence du champ électrique, est caractérisé par une fréquence de relaxation associée à une chute de la permittivité du matériau. C'est la dispersion « γ », apparaissant classiquement autour de 20 GHz.

Cependant, ce mécanisme intervenant bien au-delà des fréquences auxquelles se limitent nos travaux, celui-ci ne sera pas pris en compte dans ce manuscrit.

- Synthèse

Lorsqu'une particule diélectrique (en suspension dans un électrolyte) est soumise à un champ électrique, différents mécanismes de polarisation peuvent se manifester. Si à basse fréquence, c'est la déformation de l'EDL qui dicte la répartition des charges autour de la particule, l'augmentation de la fréquence conduit à la prédominance des phénomènes de polarisation interfaciale. Les conséquences de ces phénomènes de polarisation sur le comportement des particules sont décrites dans la suite.

III.1.c Phénomènes électrocinétiques associés

Ce paragraphe est axé sur la description des principaux phénomènes électrocinétiques associés à la polarisation de particules. Seront ainsi décrits l'électrophorèse, observée principalement en continu, mais également la diélectrophorèse et les phénomènes d'interaction dipolaires à l'origine de la formation de filaments de particules. Enfin seront présentés des phénomènes plus rarement décrits tels que l'électrorotation et la formation de bandes non alignées sur la direction du champ.

- Electrophorèse

L'électrophorèse se définit comme le phénomène de déplacement de particules chargées sous l'effet des forces de Coulomb. Ainsi, lorsqu'un milieu est soumis à un champ électrique continu et uniforme, l'ensemble des espèces anioniques et cationiques migrent respectivement vers l'anode et la cathode. Cette technique est l'une des principales méthodes de séparation ou de caractérisation de molécules (ADN, protéines) utilisées en biochimie [76].

¹⁶ C'est-à-dire même en absence de champ électrique extérieur.

Considérons à présent le cas d'une particule non chargée placée en suspension dans un électrolyte. Celle-ci acquiert une charge de surface, par dissociation ionique ou adsorption d'espèces chargées présentes en solution, attirant progressivement des contre-ions du milieu. Le déplacement électrophorétique d'une particule diélectrique est alors issu de l'interaction entre le champ électrique et cette charge de surface. Cependant, à notre connaissance, peu de travaux portant sur l'électrophorèse de cellules sont référencés dans la littérature.

L'aptitude d'une particule à se déplacer par électrophorèse est le résultat d'une opposition entre la force de Coulomb et la force de frottement subie par la particule caractérisée par la loi de Stokes. Sa mobilité électrophorétique dépend donc de sa taille, du champ appliqué, mais également de la température et de la concentration ionique du milieu (agissant directement sur le potentiel zêta [77]) [63].

Les effets électrophorétiques subis par une particule micrométrique disparaissent au-delà de quelques Hz, en raison de son inertie qui limite son déplacement. La double couche continue cependant de se déformer jusqu'à des fréquences pouvant atteindre quelques dizaines de kHz [72].

▪ Diélectrophorèse (DEP)

Une particule neutre polarisée sous l'effet d'un champ alternatif uniforme ne subit donc aucun mouvement au delà de quelques Hz (fréquence limite des phénomènes électrophorétiques). Cependant, si la particule est placée dans un champ non uniforme, elle peut se déplacer par diélectrophorèse [57] sous l'effet d'une force F_{DEP} décrite par:

$$F_{DEP} = 2\pi\epsilon_0\epsilon_m a^3 Re[f_{CM(\omega)}] \nabla E^2 \quad (\text{Equation 1.5})$$

avec a le rayon de la particule, ϵ_0 la permittivité du vide, ϵ_m la permittivité relative du milieu, $Re[f_{CM}]$ la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti, et E le champ électrique efficace.

L'expression de la force met ici en évidence l'absence de DEP lorsque le champ est homogène ($\nabla E^2=0$). Le sens de la force diélectrophorétique ne dépend pas du sens du champ (E^2) mais du signe de la partie réelle du facteur de Clausius Mossotti (f_{CM}). Sous sa forme complexe, le f_{CM} est défini par:

$$f_{CM(\omega)} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*} \quad \epsilon^* = \epsilon_0\epsilon - \frac{j\sigma}{\omega} \quad (\text{Equations 1.6 et 1.7})$$

avec ω , la fréquence angulaire du champ électrique, ϵ_m^* et ϵ_p^* respectivement les permittivités complexes du milieu et de la particule, ϵ la permittivité relative, ϵ_0 la permittivité du vide, et σ la conductivité.

Le f_{CM} dépend donc des propriétés respectives de la particule et de son milieu d'immersion, ainsi que de la fréquence du champ. Sa partie réelle peut varier entre -0.5 et +1. Lorsque $Re[f_{CM}] > 0$, la particule, plus polarisable que le milieu (cf. **Figure 1.17**), se déplace vers les maxima de champ sous l'effet de la DEP positive (pDEP). Inversement, pour $Re[f_{CM}] < 0$, la particule est moins polarisable que le milieu (cf. **Figure 1.17**) et se déplace à l'opposé du gradient, vers les zones de champ minimum. On parle alors de DEP négative (nDEP).

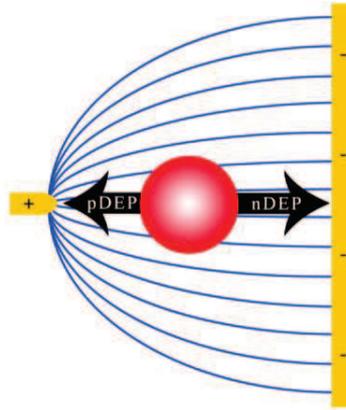


Figure 1.18 – Illustration des phénomènes de diélectrophorèse positive (pDEP) et négative (nDEP). Schéma réalisé d’après [78].

D’après les équations **1.6** et **1.7**, le f_{CM} est dominé par la conductivité aux faibles fréquences (ω petit) [57]. A l’inverse, l’influence de la permittivité devient prépondérante pour les hautes fréquences (ω grand). Dans ces deux cas extrêmes, le f_{CM} est alors respectivement décrit les équations **1.8** et **1.9** :

$$f_{CM(\omega_{petit})} = \frac{\sigma_p - \sigma_m}{\sigma_p + 2\sigma_m} \quad f_{CM(\omega_{grand})} = \frac{\epsilon_p - \epsilon_m}{\epsilon_p + 2\epsilon_m}$$

L’augmentation de la fréquence peut conduire au changement de signe de $\text{Re}[f_{CM}]$. Ce phénomène correspond à la relaxation interfaciale. La fréquence de transition, pour laquelle $\text{Re}[f_{CM}]$ devient nulle, est couramment appelée fréquence de « cross-over » [57]. Il s’agit de l’inverse du temps de relaxation interfaciale τ_{MW} introduit précédemment (Equation **1.4**).

Le spectre diélectrophorétique représente l’évolution des parties réelle et imaginaire du f_{CM} en fonction de la fréquence (**Figure 1.19**). La partie réelle décrit la polarisabilité de la particule, tandis que la partie imaginaire, liée aux pertes diélectriques, indique si celles-ci sont plus importantes dans la particule ou dans le milieu d’immersion [79].

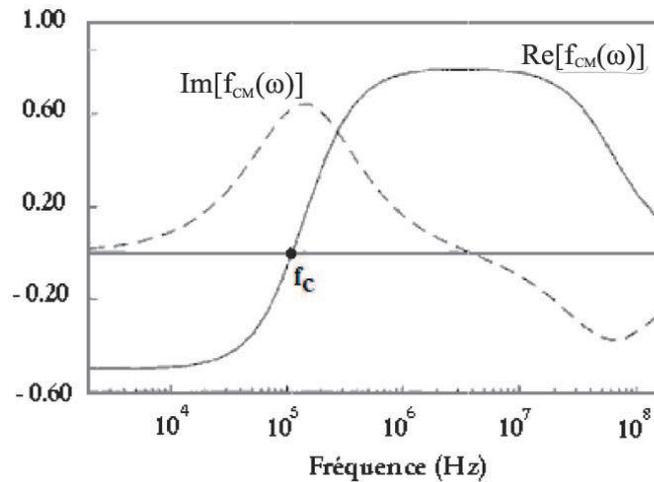


Figure 1.19 – Evolution des parties réelle et imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti en fonction de la fréquence pour des cellules DS19 suspendues dans un milieu de conductivité 56 mS/m.

Figure issue de [80].

Le premier pic d'intensité de la partie imaginaire du f_{CM} intervient à la fréquence de « cross-over » (f_c). Celle-ci correspond au changement de signe de la partie réelle du f_{CM} . Elle est caractéristique de la première relaxation due à la membrane plasmique de la cellule (polarisation de Maxwell-Wagner) [70].

Le f_{CM} dépendant des permittivités complexes de la cellule et du milieu, un certain nombre de paramètres peuvent avoir une influence critique sur le spectre diélectrique d'une cellule. La littérature présente de nombreux cas d'étude de l'impact de paramètres tels que la conductivité du milieu [81] ou la taille de la cellule [57] (**Figure 1.20**). Intervenant dans l'expression de ϵ_p^* , les paramètres de la membrane (conductance G_m , épaisseur, capacité C_m) et du cytoplasme (permittivité ϵ_c , conductivité σ_c) ont aussi une influence sur le spectre diélectrophorétique. La DEP est ainsi particulièrement adaptée pour positionner ou séparer des particules selon leur propriétés diélectriques [57].

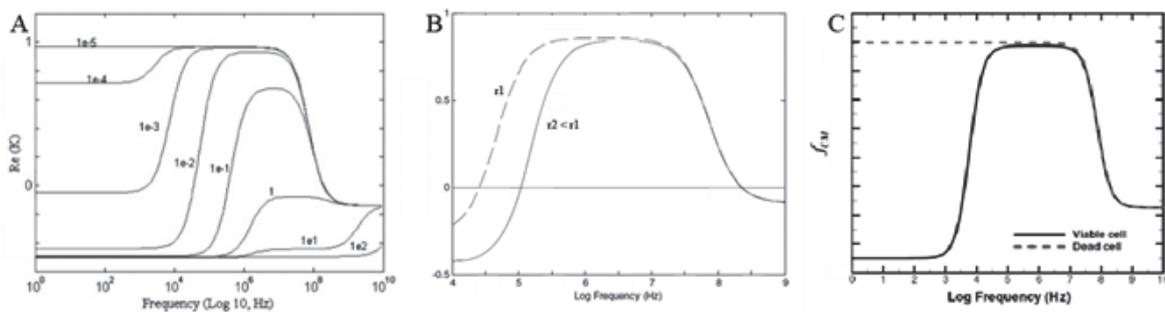


Figure 1.20 – Influence (A) de la concentration du milieu [81], (B) de la taille de la cellule [57] et (C) de l'intégrité de la membrane [82] sur le spectre diélectrophorétique d'une cellule (single-shell).

▪ Interaction dipôle-dipôle

On rappelle qu'une particule placée dans un champ uniforme alternatif se polarise mais reste statique (au-delà du kHz) en raison de la compensation des forces de Coulomb s'exerçant sur les charges opposées (**Figure 1.17**). Cependant, la présence d'autres particules à proximité peut conduire à des interactions entre les dipôles voisins. On parle alors de DEP mutuelle, plus couramment appelée interaction dipôle-dipôle [73]. Dès que l'attraction dipolaire est supérieure à l'énergie thermique du milieu, les particules s'alignent pour former des chaînes [74] (**Figure 1.21**).

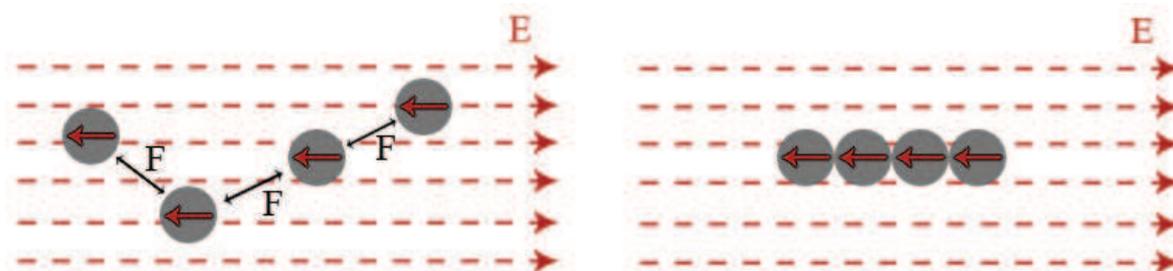


Figure 1.21 – Mécanisme d'interaction dipôle-dipôle. Chaque particule est polarisée sous l'effet du champ (E) et présente un dipôle induit dont le sens dépend du signe de $Re[f_{CM}]$. Ce dipôle net peut interagir avec celui d'une particule voisine et conduire à la formation d'une chaîne.

Schéma réalisé d'après <http://nanoparticles.org/>

Les alignements en chaînes issus d'une interaction dipolaire ont été présentés dans un certain nombre d'articles de référence [72][83][84][84]. Tous mettent en évidence l'influence du rapport entre les énergies d'attraction dipolaire et thermique. Ce rapport (λ) est notamment simplifié par Mittal *et al* [73] sous la forme :

$$\lambda = \frac{\pi\epsilon_m a^3 (Re[f_{CM}]E)^2}{k_B T} \quad (\text{Equation 1.10})$$

λ décrit la transition ordre-désordre du système. Les particules s'alignant lorsque $\lambda \gg 1$, ceci met en évidence l'influence du f_{CM} , mais également de l'intensité du champ appliqué. Il existe donc une valeur de champ limite à partir de laquelle la force d'interaction devient suffisante pour permettre la formation de chaînes [74].

▪ Electrorotation

L'électrorotation traduit le mouvement d'une particule en rotation sous l'effet d'un champ électrique. Ce phénomène est classiquement obtenu lorsque la particule est placée dans un champ tournant (**Figure 1.22**) dont la fréquence est suffisamment élevée pour induire déphasage temporel du dipôle induit sur le champ tournant [74][70]. Ce déphasage se traduit par un couple s'exerçant sur la particule. Il est décrit par l'équation suivante [62]:

$$\Gamma = -4\pi\epsilon_m a^3 Im[f_{CM}]E^2 \quad (\text{Equation 1.11})$$

avec Γ le couple (N/m), et $Im[f_{CM}]$ la partie imaginaire du f_{CM} . Le signe négatif marque le retard du dipôle par rapport au champ.

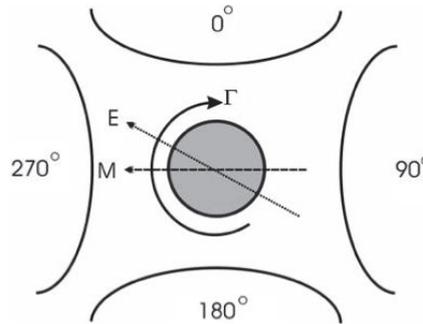


Figure 1.21 – Système d'électrodes pour lequel les tensions appliquées à deux électrodes adjacentes sont déphasées de 90°. En fonction du déphasage entre le moment dipolaire induit (M) et le champ électrique (E), le couple (Γ) met la particule en mouvement dans le sens inverse ou identique à celui du champ électrique appliqué. Image tirée de [64].

Le sens du couple dépend directement du signe de la partie imaginaire du f_{CM} [74]. Ainsi, pour $Im[f_{CM}]$ positif, correspondant à un déphasage compris entre 0 et 180°, la particule et le champ tournent en sens contraires. Inversement, quand $Im[f_{CM}]$ est négatif, soit pour un déphasage compris entre -180° et 0°, la particule tourne dans le même sens que champ.

La technique d'électrorotation est essentiellement employée pour déterminer les caractéristiques diélectriques de cellules uniques (notamment C_m , G_m , σ_c , et ϵ_c). Elle permet en effet de remonter à la signature diélectrophorétique d'un type de cellule, car l'évolution fréquentielle de la partie imaginaire

du f_{CM} peut être directement déduite de celle de la vitesse de rotation [62][70]. Cette méthode a d'ailleurs dernièrement été utilisée par Zimmermann *et al* [85] pour caractériser le spectre d'électrorotation des cellules HEK-293, qui sont utilisées dans ce manuscrit.

D'autre part, l'expérience d'électrorotation permet la caractérisation de la structure interne de la cellule et est suffisamment sensible pour détecter la présence de parasites [86] ou même différencier des sous populations de cellules [87] (**Figure 1.22**).

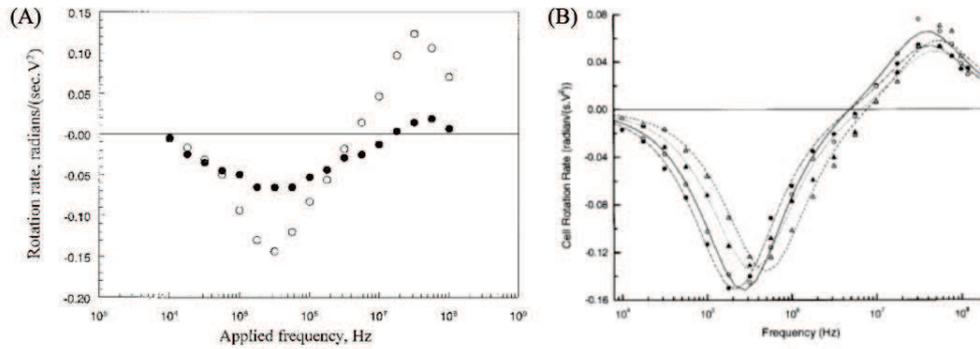


Figure 1.22 – Mise en évidence de l'influence des propriétés diélectriques des cellules sur leur vitesse d'électrorotation. (A) Cellules infectées (●) ou non (○) par un parasite (*Plasmodium falciparum*) [86]. (B) Sous-populations de leucocytes [87].

Cependant, des phénomènes de rotation de cellules peuvent également intervenir en présence d'un champ électrique fixe. Holzapfel *et al* [88], ont été les premiers à observer ces mécanismes sur plusieurs cellules se trouvant à proximité les unes des autres. Ils décrivent alors cet effet comme le résultat d'une polarisation mutuelle des particules.

Le moment dipolaire (\vec{m}) induit au sein d'une particule est proportionnel au champ appliqué (\vec{E}), mais présente un retard de phase par rapport à ce dernier d'un angle Φ (**Figure 1.23**). Cet angle est maximal ($\pm \pi/2$) à la fréquence de relaxation de Maxwell-Wagner.

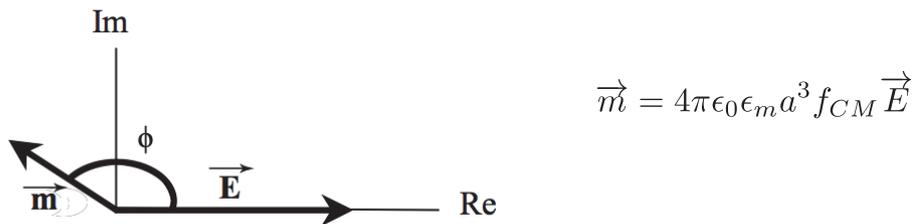


Figure 1.23 - Les pertes, mises en évidence par la partie imaginaire du f_{CM} , entraînent un déphasage temporel (Φ) entre le moment dipolaire induit et le champ appliqué.

Considérons deux cellules voisines soumises à un champ électrique (\vec{E}). Le moment dipolaire (\vec{m}_1) de la particule 1 induit un champ électrique \vec{E}_1 à l'emplacement de la particule 2. Ce champ \vec{E}_1 engendre à son tour un moment dipolaire \vec{m}_2 sur la particule 2 qui s'ajoute au moment \vec{m}_1 déjà présent. Le moment résultant $\vec{m}_{total} = \vec{m}_1 + \vec{m}_2$ n'est pas aligné avec $\vec{E}_1 + \vec{E}_2$, ce qui crée un couple (M) entre les 2 particules [72][84].

L'expression du couple est la suivante:

$$M = -F_0 a \frac{2 \sin \theta \cdot \cos \theta}{(r/a)^3} (1 - \cos 2\phi) \quad (\text{Equation 1.12})$$

Avec $F_0 = 6\pi\epsilon_0\epsilon a^2 f_{CM}^2 E_0^2$, a le rayon des particules et r leur espacement. θ correspond à l'angle formé entre la direction du champ et la ligne reliant deux particules voisines

Le couple M est donc [72][84][88] :

- nul pour $\Phi = 0$, autrement dit l'existence de ce couple est lié au retard de polarisation
- maximal pour un déphasage temporel $\Phi = \pm \pi/2$, obtenu à la fréquence de relaxation
- maximal pour un angle $\theta = 45^\circ$ comme présenté sur la **Figure 1.24**.

Il est à noter que ce phénomène a pu être observé sur des billes en basse fréquence [84] ou sur des cellules autour de quelques dizaines de kHz [88]. Il est maximisé autour de la fréquence de relaxation du phénomène de polarisation prédominant (polarisation de la double couche dans le cas des billes, polarisation interfaciale dans le cas des cellules).

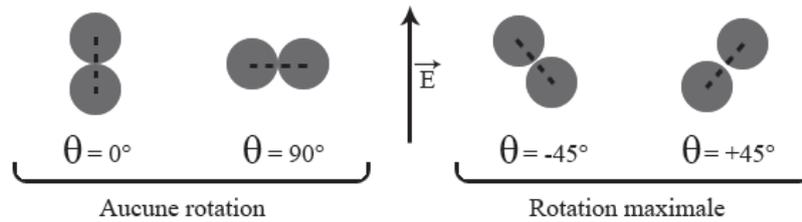


Figure 1.24– Schéma des différentes positions relatives entre deux cellules. Lorsque l'angle formé entre la direction du champ et l'axe entre les deux cellules, est différent de 0° ou 90° , la polarisation mutuelle induit la rotation des cellules. La vitesse de rotation est maximale pour un angle de 45° .

Réalisé d'après [88]

▪ Bandes, zigzags et vortex

En 1993, les travaux de Hu *et al* [72] mettent en évidence des instabilités hydrodynamiques lorsque des microparticules (PSL) sont placées dans un champ électrique de fréquence comprise entre 2 et 200 kHz. Les auteurs observent alors la formation de bandes circulantes non alignées dans le sens du champ. Ces phénomènes, parfois appelés « zigzag » ou « vortex » [84][73] sont décrits comme la conséquence des interactions mutuelles entre particules voisines entraînant leur rotation (**Figure 1.24**) et celle de la double-couche entourant chacune d'elles. Ceci introduit une dissymétrie dans le flux des contre-ions et a pour effet la création d'un dipôle qui n'est pas orienté dans la même direction que le champ appliqué, ce qui explique l'inclinaison des bandes (**Figure 1.25**).

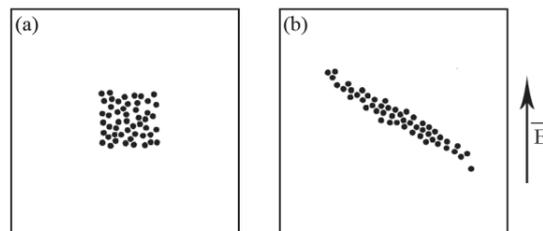


Figure 1.25 – (a) Configuration initiale de 50 particules placées aléatoirement dans une région donnée. (b) Formation d'une bande circulante inclinée par rapport au champ appliqué [72].

▪ Synthèse

Tous les phénomènes électrocinétiques observés sur des particules dépendent donc directement des différents mécanismes de polarisation. Ceux-ci sont dirigés par les paramètres du champ électrique, mais sont également fonction des propriétés diélectriques des particules.

Lele *et al* [84] ont synthétisé l'ensemble des comportements observés pour une suspension de microbilles en fonction des paramètres du champ électrique (fréquence, intensité). Le diagramme présenté sur la **Figure 1.26** met en évidence les principaux phénomènes rencontrés à savoir les alignements dipolaires et les vortex.

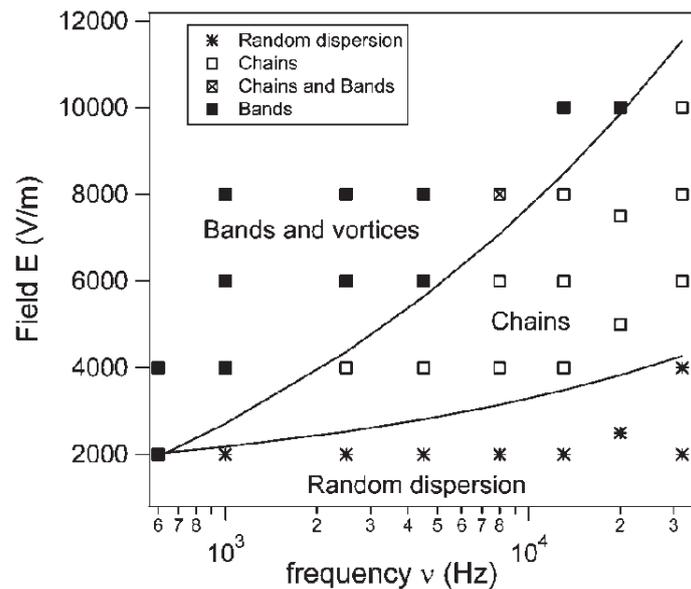


Figure 1.26 – Diagramme de synthèse des phénomènes observés par Lele et al [84] pour une suspension de particules de polystyrène placées dans un champ alternatif.

Le comportement d'une cellule polarisée est plus complexe du fait de sa composition. Les cellules peuvent être manipulées séparées ou caractérisées par diélectrophorèse. La technique est en effet particulièrement sensible aux propriétés diélectriques mais également à la taille des cellules. Au-delà des aspects de caractérisation et de séparation, l'utilisation de champs électriques intense peut également conduire la formation de pores dans la membrane et conduire à sa destruction. C'est le phénomène de lyse auquel le paragraphe suivant est consacré.

III.2 Lyse cellulaire en microsystème

Comme décrit précédemment, la membrane plasmique est une barrière semi-perméable permettant de réguler spécifiquement les entrées-sorties de molécules dans la cellule. Ceci conduit à conserver une différence de potentiel entre les milieux extra et intracellulaire. Le potentiel transmembranaire (TMP) est ainsi le résultat d'une distribution inégale d'ions et de macromolécules chargées de part et d'autre de la membrane. Cependant, l'application d'un champ électrique pulsé entraîne une accumulation de charges de part et d'autre de la membrane plasmique. Ceci entraîne la modification du TMP et peut conduire à la formation de pores à travers la membrane cellulaire. On parle alors d'électroperméabilisation, un phénomène induisant l'augmentation significative de la conductivité de la membrane. Son étude a notamment conduit au développement de plusieurs applications notamment thérapeutiques [89].

▪ Théorie de l'électroporation

Un champ électrique \vec{E} extérieur induit une accumulation de charges de part et d'autre de la membrane. Cette différence de potentielle « induite » $\Delta\Psi_i$ se superpose au TMP « intrinsèque » de la cellule (de rayon r) (**Figure 1.27.a**). L'augmentation du champ conduit à la dégradation de la membrane à partir d'un potentiel critique Ψ_c (**Figure 1.27.b**). Néanmoins, la géométrie de la cellule induisant une répartition inhomogène des lignes de champ, ce potentiel critique n'est pas atteint simultanément sur toute la surface de la membrane (**Figure 1.27.c**).

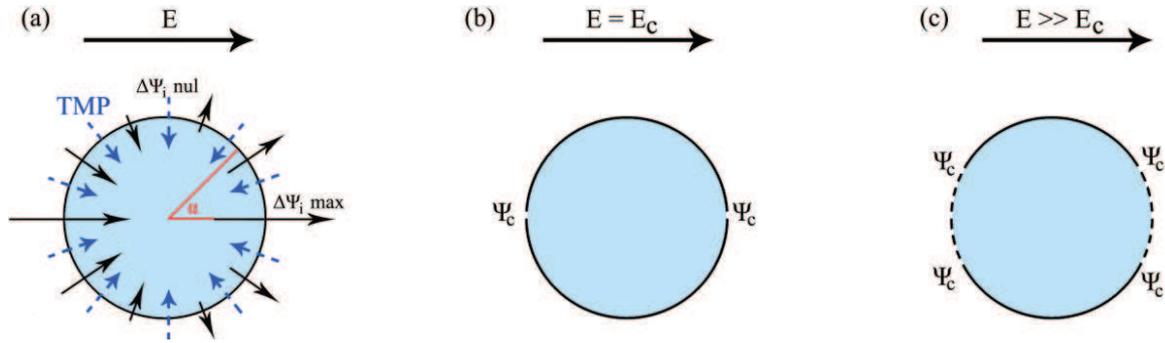


Figure 1.27 – (a) Représentation des potentiels intrinsèques (TMP) et induits ($\Delta\Psi_i$) par le champ électrique E . α représente l'angle entre la direction du champ électrique et la tangente à la membrane. (b) A partir d'un champ critique (E_c typiquement 1 kV/cm [90]), un pore est formé sur la membrane au point où le potentiel est le plus élevé ($\cos \alpha = 1$), on parle de potentiel critique (Ψ_c). Si l'on augmente le champ, le potentiel critique est progressivement atteint pour des $\cos \alpha$ de plus en plus faibles. Schéma réalisé d'après [91] et [69].

L'effet du champ est classiquement décrit par la relation de Schwann [92] qui tient alors compte des propriétés biologiques et électriques de la cellule (f_s) mais également de l'aspect cinétique de la déformation de la membrane (constante de temps de charge τ) :

$$\Delta\Psi_i = f_s \cdot E \cdot r \cdot \cos(\alpha) \cdot (1 - \exp^{-\frac{t}{\tau}}) \quad (\text{Equation 1.13})$$

Avec :

$$f_s = \frac{3\sigma_0(3dr^2\sigma_i + (3d^2r - d^3)(\sigma_m\sigma_i))}{2r^3(\sigma_m + 2\sigma_0)(\sigma_m + 0,5\sigma_i) - 2(r-d)^3(\sigma_0 - \sigma_m)(\sigma_i - \sigma_m)} \quad \tau = \frac{rC_m}{\frac{2\sigma_0\sigma_i}{2\sigma_0 + \sigma_i} + \frac{r}{d}\sigma_m}$$

où σ_0 , σ_m et σ_i , les conductivités respectives du milieu, de la membrane et du cytoplasme (S/m), r le rayon de la cellule ($\sim 5 \mu\text{m}$), d l'épaisseur de la membrane ($\sim 5\text{nm}$) et C_m la capacité de la membrane ($\sim 10^{-2} \text{F/m}$).

Dans les conditions physiologiques classiques, σ_m ($\sim 10^{-7} \text{S/m}$) est largement inférieure à σ_i (0.2 S/m), et si l'on considère le temps de charge de la membrane ($\tau \sim \mu\text{s}$) inférieur à la durée du pulse, l'équation 1.13 peut se simplifier:

$$\Delta\Psi_i = 1,5Ercos(\alpha) \quad (\text{Equation 1.14})$$

Les mécanismes de formation des pores sont particulièrement complexes et ont fait l'objet de nombreux travaux [90][93]. Le détail de ces phénomènes n'aidant pas particulièrement à la compréhension des mesures effectuées dans ce manuscrit, je me contenterai d'en présenter brièvement les grandes lignes.

Selon l'énergie apportée à la membrane, les pores formés sont d'abord hydrophobes, c'est-à-dire de simples espacements entre les lipides membranaires dus aux fluctuations thermiques, puis à partir d'un certain diamètre, deviennent hydrophiles par recombinaison des lipides. La théorie est ainsi basée sur le principe thermodynamique de minimisation d'énergie [92]. Seul ce dernier type de pore permet le passage d'ions et d'autres molécules solubles. Ensuite, aussi longtemps que la tension de seuil est maintenue, le nombre et le diamètre des pores augmentent constamment, on parle de phase d'extension. On distingue alors deux issues selon les paramètres du champ [93].

La formation des pores peut notamment être réversible, c'est-à-dire que la membrane finit par se reformer après l'arrêt du champ. Cette étape peut prendre de quelques secondes à plusieurs minutes [92]. Ce cas de figure a conduit à l'élaboration de plusieurs applications thérapeutiques. Les exemples les plus courants sont le transfert de gènes (thérapie génique) [89], l'électrochimiothérapie [94] ou encore l'électrofusion cellulaire [69]. Nous y reviendrons dans la suite du manuscrit.

En revanche, si le champ dépasse un seuil de perméabilisation réversible [91], la membrane ne pouvant plus se reformer, se fractionne. On parle alors de lyse cellulaire servant dans la grande majorité des cas d'étape préliminaire à l'étude de la composition cellulaire.

- Lyse cellulaire en microsystèmes

Dans le cas d'un système microfluidique, la lyse de cellule peut s'effectuer mécaniquement [95], thermiquement [96], chimiquement [96] et comme abordé ci-dessus par électroporation irréversible. L'utilisation de champs électriques étant particulièrement adaptée à une utilisation en microsystème, cette méthode s'est donc naturellement imposée. En effet, les distances entre les électrodes d'une puce microfluidique peuvent être micrométriques grâce à l'utilisation de la photolithographie. Ainsi une faible différence de potentiel est suffisante pour appliquer des champs électriques très élevés dans les régions inter-électrodes.

Par exemple, le champ électrique typiquement utilisé pour déstructurer une membrane plasmique est de l'ordre de 1 kV/cm [90]. Ainsi, pour une distance inter-électrodes de 1 cm, il est nécessaire d'appliquer une tension de 1 kV. En revanche si cette distance est de 100 μm (soit une dimension habituellement retrouvée en microfluidique), cette tension passe à 10 V.

L'analyse des contenus intracellulaires est essentielle pour de nombreuses études biologiques fondamentales et nécessite cependant la destruction de la membrane [97]. L'émergence des microsystèmes dans le domaine de la manipulation de cellules a donc rapidement conduit à la réalisation de dispositifs dédiés à la lyse. On notera néanmoins qu'ils sont encore majoritairement limités à l'étude de la faisabilité et la mise au point des paramètres optimaux. Quelques exemples récents démontrent cependant la volonté d'intégrer la fonction de lyse en amont de modules dédiés à la séparation [98] et/ou l'analyse des lysats cellulaires [99].

Le **Tableau 1.4** recense quelques-uns de ces microsystèmes.

	Références	[99]	[100]	[98]	[101]	[102]	[103]
Paramètres électriques	Type	AC	AC	AC	DC	DC	DC
	Potentiel	6 - 8,5 V	> 20 V	55 V	0 - 200 V	0 - 20 V	0 - 35 V
	Pulse				10 - 100 ms	1 ms	0,1 - 1 s
	Fréquence	5 - 10 kHz	0,1 - 1 MHz	50 kHz			
Electrodes	Matériau	Or	Or	Platine	Platine (fil)	Or	Cuivre
	Distance	30 - 130 μm	10 μm	-	7 mm	60 μm	20 μm
	Epaisseur	50 μm	60 nm	200 nm		200 nm	50 μm
	Géométrie	dentelée	constriction	constriction	constriction	dentelée	cylindrique
Conditions	Cellules	HT29	A431	Levure	CHO	Végétale	Leucocyte
	Nombre	> 100	< 10	> 100	< 10	> 100	< 10
	Déplacement	Mouvement	Stationnaire	300 $\mu\text{m/s}$	Mouvement	Stationnaire	50 $\mu\text{m/s}$
	Applications	Préparation	Etude	Etude	Préparation	Préparation	Etude

Tableau 1.4 – Tableau récapitulatif (liste non exhaustive) des principaux systèmes microfluidiques dédiés à la lyse de cellules trouvés dans la littérature.

Si les premières expériences de lyse ont été effectuées à l'aide de champs pulsés, la tendance actuelle est à l'utilisation de champs alternatifs. On notera cependant qu'à l'inverse de l'électroporation, la mise au point des paramètres de lyse n'est pas particulièrement critique, puisqu'il suffit de dépasser le seuil de perméabilisation réversible.

Dans le cas de lyse par champ pulsé, la durée des impulsions est relativement importante pour assurer la formation d'un grand nombre de pores. Il s'agit d'ailleurs généralement d'une seule impulsion classiquement comprise entre 10 ms et 1 s (**Tableau 1.4**). Son amplitude doit être supérieure au potentiel critique, afin d'assurer la non réversibilité des pores. De manière générale, c'est le rapport entre la durée et l'amplitude du pulse qui détermine l'efficacité de la lyse. Ainsi, une faible durée de pulse peut être compensée par une forte amplitude, et inversement.

L'application de pulses trop long et de trop forte amplitude peut cependant parfois provoquer l'électrolyse de l'eau et l'apparition de bulles sur les électrodes. C'est pourquoi l'utilisation de champs alternatifs a récemment été mise en avant [98].

La valeur du potentiel transmembranaire critique dépend alors de la fréquence du champ et d'une constante de temps fonction des paramètres de la membrane [88].

$$\Delta\Psi_i = 1,5Ercos(\alpha) \frac{1}{\sqrt{1 + (\omega\tau)^2}} \quad (\text{Equation 1.15})$$

$$\tau = \frac{rC_m}{\frac{2\sigma_0\sigma_i}{2\sigma_0 + \sigma_i} + \frac{r}{d}\sigma_m}$$

Avec ω , la fréquence angulaire du champ (rad/s) = $2\pi f$, σ_0 , σ_m et σ_i , les conductivités respectives du milieu, de la membrane et du cytoplasme (S/m), r , le rayon de la cellule ($\sim 5 \mu\text{m}$), d , l'épaisseur de la membrane ($\sim 5\text{nm}$) et C_m , la capacité de la membrane ($\sim 10^{-2} \text{F/m}$),

L'évolution du potentiel transmembranaire induit en fonction de la fréquence est donc de type passe-bas du premier ordre, avec une fréquence de coupure égale à $1/(2\pi\tau)$. Ainsi, dans le cas d'une levure [98] $\tau = 3.3 \cdot 10^{-7}$ s, la valeur du potentiel transmembranaire induit diminue au delà de 500 kHz environ. Ainsi, pour lyser ces cellules avec une fréquence supérieure, il est nécessaire de compenser avec l'augmentation de l'amplitude du champ.

Les paramètres de lyse sont assez variables selon les différents systèmes retrouvés dans la littérature. Ceci s'explique par la diversité de la géométrie des électrodes. En effet, même si la distance inter-électrodes est critique sur la valeur du champ, d'autres méthodes permettent d'augmenter localement celui-ci. Les travaux se sont ainsi également focalisés sur la modulation des lignes de champ principalement par des effets de pointes [99] ou par l'utilisation de zones isolantes [100] dont les principes sont présentés sur la **Figure 1.28**.

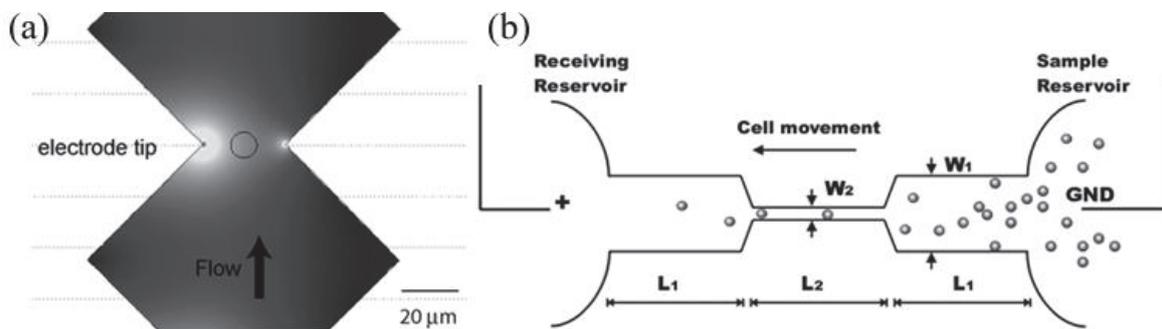


Figure 1.28 – Exemples de focalisation du champ électrique par effet de pointe [99] (à gauche) ou par constriction du canal microfluidique [101] (à droite)

L'intérêt de l'utilisation d'électrodes épaisses a également été mis en évidence par la comparaison entre des électrodes cylindriques épaisses et planaires [103]. Les expériences, effectuées sous débit constant ($\sim 50 \mu\text{m/s}$), dans les mêmes conditions (pulses de 0 - 30 V, de durée entre 100 et 1000 μs) ont démontré l'augmentation conséquente du rendement de lyse de 8 à près de 30 %. Les auteurs justifient cet effet par la décroissance beaucoup plus rapide du champ avec l'éloignement des électrodes dans le cas des électrodes planaires.

On notera enfin que si la conductivité du milieu n'est pas forcément précisée dans les articles, celle-ci est pourtant primordiale pour l'efficacité du processus d'électroporation. Les travaux de Sukhorukov *et al* [104], montrent par exemple que le rendement de lyse d'érythrocytes passe de 100 % à 20 % avec l'augmentation de la conductivité de 1 à 6 mS/cm. Les auteurs le justifient par la diminution des phénomènes d'électrodéformation. Inversement, Pucihar *et al* [105] précisent que si l'usage d'un milieu faiblement conducteur n'améliore pas particulièrement l'électroporation, cela contribue néanmoins à augmenter la viabilité des cellules après les pulses. Les auteurs spécifient par ailleurs qu'une diminution trop importante conduit à augmenter la constante de temps de charge (τ) de la membrane et nécessite au final d'augmenter la durée des pulses ou leur amplitude. Cette considération est par ailleurs confirmée par Ivorra *et al* [106] dont les simulations démontrent qu'il est nécessaire d'appliquer de plus fortes tensions lorsque la conductivité du milieu devient inférieure à 0.01 S/m.

Les techniques optiques et électriques sont classiquement utilisées pour évaluer l'efficacité d'une lyse. En effet le changement de morphologie de la cellule est suffisamment conséquent pour être observé au microscope optique [103]. Néanmoins l'utilisation d'un fluorophore (cytoplasmique) est souvent

privilegiée [99]. Par ailleurs, la lyse modifiant considérablement les propriétés diélectriques de la cellule, la diélectrophorèse peut être employée pour le tri des cellules lysées ou non [98]. La conductivité du milieu augmentant avec la lyse, sa mesure pourrait également renseigner sur l'état des cellules [107].

III.3 Electrofusion de cellules

La formation des pores peut cependant être réversible, c'est-à-dire conduisant à la reformation de la membrane quelques secondes à plusieurs minutes après l'arrêt du champ [92][93]. Cette particularité est principalement utilisée pour l'insertion d'un gène dans une cellule, on parle alors de transfection [92], mais également de molécules antitumorales (bléomycine [69]), c'est l'électrochimiothérapie. Cependant, l'électroporation réversible de la membrane peut également conduire à un autre phénomène : la fusion de cellules [108].

- Fusion de cellule, processus et applications

La fusion de cellule est un processus biologique naturel intervenant notamment lors de l'infection virale mais également dans les processus du développement [109]. On notera que la fusion de cellules est avant tout une fusion des membranes [110]. Celles-ci nécessitent alors d'être fragilisées par un moyen quelconque avant d'être mises en contact. La réorganisation des lipides peut alors conduire à un mélange de ces membranes comme présenté sur la **Figure 1.29**.

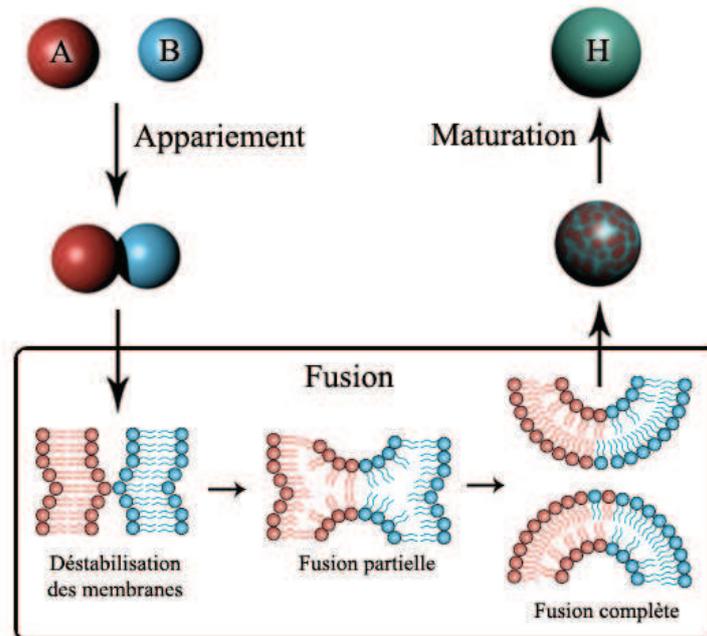


Figure 1.29 – Représentation schématique du processus de la fusion de deux cellules A et B préalablement appariées. La fragilisation de leur membrane conduit, après maturation, à la formation d'une cellule hybride (H). Figure réalisée d'après [109].

La fusion cellulaire permet de combiner les propriétés spécifiques des deux cellules. On obtient ainsi une cellule hybride ayant des fonctions mixtes. Parmi les applications majeures de la fusion de cellules, on retrouve la production massive d'anticorps monoclonaux à partir d'une cellule hybride combinant les avantages d'un lymphocyte B (se différenciant en plasmocyte) et d'une cellule

cancéreuse (durée de vie illimitée, machinerie cellulaire accélérée). C'est la technique de l'hybridome [111] qui a notamment permis à ses inventeurs d'obtenir le prix Nobel de médecine en 1984. Une autre application prometteuse concerne l'utilisation d'un hybride pour favoriser l'immunité à médiation cellulaire. La fusion d'une cellule tumorale avec une cellule dendritique permet à cette dernière de pouvoir (après réinjection dans le corps) activer la prolifération des lymphocytes T. Ceux-ci exercent alors une activité cytotoxique dirigée spécifiquement contre les cellules tumorales [112].

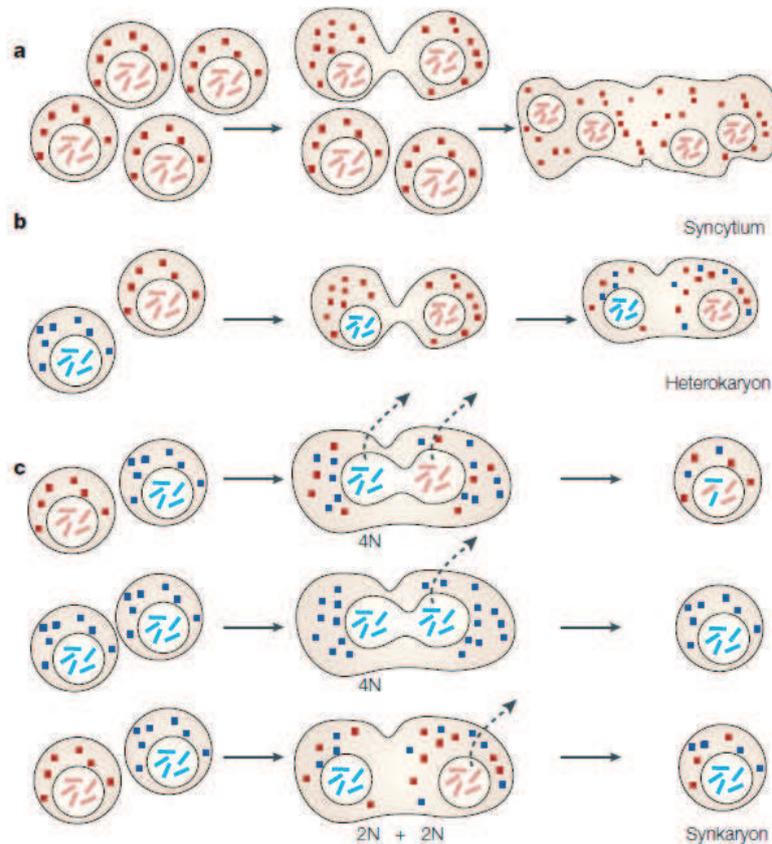


Figure 1.30 – (a) Si une ou plusieurs cellules de la même lignée fusionnent pour donner une cellule avec plusieurs noyaux, on parle de syncytium (processus retrouvé dans le développement [113]). (b) Lorsque des cellules de lignées différentes sont fusionnées en une cellule hybride contenant au moins deux noyaux différents, on parle d'hétérocaryon. (c) Si la cellule hybride ne contient plus qu'un seul noyau, le produit de fusion est appelé syncaryon. Ceci peut intervenir à partir d'un hétérocaryon après fusion de noyaux, ou bien rejet de chromosomes ou de l'un des noyaux hors de la cellule hybride. Schéma issu de [109].

Les perspectives, notamment thérapeutiques, offertes par le contrôle de ce phénomène ont donc logiquement motivé son étude. Des techniques de fusion cellulaire par voies chimiques (détergents) [114], biochimiques (peptide viral) [110] et électriques ont ainsi été mises au point.

La découverte de la méthode électrique revient à Zimmermann dans les années 1980 [115]. Il met en évidence que la mise en contact de deux cellules ayant été électroporées conduit à la fusion mutuelle de leur membrane. Les contenus des deux cellules sont alors entourés par une seule membrane. Cependant, les fortes tensions nécessaires mais surtout le manque de contrôle dans le positionnement des cellules ont longtemps conduit à de très faibles rendements (5-10%) [69].

En effet, la position des cellules avant la fusion est primordiale si l'on souhaite s'assurer que la fusion s'effectue spécifiquement entre deux cellules. La **Figure 1.30** rappelle les différents cas de figure possibles lorsqu'une expérience de fusion est réalisée. Elle met particulièrement en évidence la difficulté de contrôler la répartition des noyaux et des chromosomes pendant la fusion de cellule. La conservation du matériel génétique étant primordiale pour les applications thérapeutiques visées, l'étude fondamentale de ces phénomènes a donc été une nécessité supplémentaire à l'élaboration d'outils microfluidiques plus adaptés à une étude à l'échelle de la cellule.

▪ Microsystèmes dédiés à l'électrofusion de cellules

La microfluidique, par la miniaturisation des électrodes et la diminution des tensions, a contribué à l'amélioration des dispositifs de fusion. Le **Tableau 1.5** synthétise les principaux microsystèmes dédiés à l'électrofusion retrouvés dans la littérature en répertoriant les géométries d'électrodes ainsi que les protocoles utilisés. La mise au point d'un microsystème d'électrofusion cellulaire fait face à un certain nombre de contraintes. Tout d'abord, la fusion doit se faire spécifiquement entre les cellules désirées. Les applications nécessitent ainsi principalement une fusion entre deux cellules de types différents (A et B). Si d'un point de vue biologique, la fusion entre deux cellules identiques (A+A) peut être spontanée [109], ce n'est pas forcément le cas des cellules de lignées différentes.

L'une des premières difficultés que présente la mise au point d'un dispositif d'électrofusion est donc de favoriser un appariement spécifique A+B. Ceci peut s'effectuer par plusieurs méthodes (DEP, couplage Avidine/Biotine, hydrodynamiquement) et a conduit à un certain nombre de systèmes. On citera notamment les travaux de Skelley *et al* [116] utilisant des pièges hydrodynamiques couplés à une inversion du sens d'injection des cellules (**Figure 1.31.a**). Ce système est particulièrement adapté à la fusion sur puce de haute densité.

Un autre système réalisé par Kimura *et al* [117], met en œuvre la DEP couplée à l'utilisation d'une membrane séparant les deux types de cellules. La convergence des lignes de champ dans les pores de la membrane favorise l'appariement par DEP positive. (**Figure 1.31.b**)

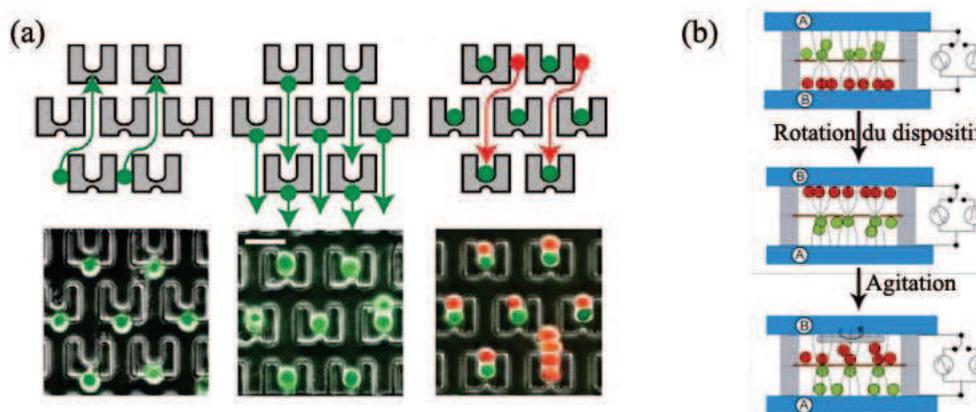


Figure 1.31 – Exemples d'appariements utilisés en étape préliminaire à la fusion de cellules, (a) par piège hydrodynamique [116], (b) par piège diélectrophorétique [117].

Passé l'appariement, le protocole électrique appliqué doit être extrêmement précis. En effet, si les pulses utilisés pour la lyse doivent simplement dépasser le seuil de perméabilité réversible, le cas de figure de la fusion est plus complexe. En effet les conditions optimales de fusion doivent permettre de fragiliser suffisamment les membranes pour favoriser leur fusion, mais ne doit pas conduire à la lyse cellulaire.

	Références	[118]	[119]	[120]	[121]	[116]	[122]	[123]	[117]
Electrodes	Matériaux	Silicium	(Platine)	Silicium/Or	Or	Chrome/époxy	Cuivre	Aluminium	ITO
	Epaisseur	250 μm	Eppendorf [®]	> 600 μm	0,2 - 100 μm		40 - 70 μm	planaires	
	Espacement	30 - 500 μm	Helix	50 - 100 μm	75 - 100 μm	4 mm	200 μm	400 μm	400 μm
	Géométrie	Constriction	Multiporator ¹	Interdigitée	Interdigitée	Constriction	Constriction	Constriction	Membrane
	Appariement	DEP	(cuvette)	DEP	DEP	Hydrodynamique	DEP	DEP	DEP
Protocole	Champ	1 - 15 kV/cm	1 - 2,5 kV/cm	1 - 10 kV/cm	1 - 1,2 kV/cm	0,5 - 5 kV/cm	1 - 3 kV/cm	0,1 kV/cm	0,5 kV/cm
	Durée	10 μs	40 μs	5 - 50 μs	20 ms	50 μs	100 μs	300 μs	50 μs
	Nombre	5 - 6	1 - 4	3 - 9		5	1	1	1
	Ecart	200 ms		0,2 - 2 s					
Conditions	Cellule	Liposomes	DC/Karpa	HEK/BC	Protoplaste	3T3/mESC	DC3F/B16F10	L929	Jurkat/HL60
	σ (milieu)	14 mS/cm	1 mS/cm			0,1 mS/cm	0,1 mS/cm	0,15 mS/cm	0,15 mS/cm
	Post-fusion	DEP	DEP	DEP	DEP		DEP	DEP	DEP
	Applications	Etude	Hybrides	Haute densité	Etude	Haute densité	Haute densité	Etude	Haute densité

Tableau 1.5 – Tableau récapitulatif (liste non exhaustive) des principaux systèmes microfluidiques dédiés à l'électrofusion de cellules retrouvés dans la littérature. Ils sont classés par date de publication (de 2004 à 2011).

¹ Il s'agit d'un appareil commercialisé par la société Eppendorf dédié à l'électroporation et l'électrofusion.

Les protocoles électriques appliqués en fusion sont très semblables à ceux utilisés en électroporation. Ils sont généralement basés sur la répétition de pulses (jusqu'à une dizaine [120]) dont la durée est comprise entre 10 et 100 μ s. L'amplitude des pulses conduit à des valeurs de champ comprises entre 0.5 et 15 kV/cm selon la taille des cellules, ce qui correspond globalement aux valeurs rencontrées en électroporation [92].

Tout comme les dispositifs dédiés à la lyse, plusieurs géométries d'électrodes sont utilisées pour atteindre ces valeurs de champ en appliquant le minimum de potentiel possible. Ceci permet d'éviter l'électrolyse de l'eau, mais surtout de localiser l'application des pulses spécifiquement sur les cellules à fusionner. En effet, considérons le cas d'une fusion entre deux cellules de tailles différentes. Les potentiels nécessaires pour les électroperméabiliser n'étant pas équivalents, la grosse cellule se lysera avant que la petite ne soit affectée (Equation 1.14). En revanche la concentration des maxima de champ à l'interface entre les deux cellules permet de localiser plus précisément la perméabilisation des membranes. L'augmentation du champ est alors beaucoup moins critique pour la viabilité des cellules [124].

La technique la plus efficace pour concentrer le champ électrique à l'interface entre deux cellules à fusionner est sans doute l'utilisation d'un isolant au centre du canal. Ce système mis au point en 1989 [125] reste encore l'une des méthodes les plus utilisées, son principe est présenté sur la **Figure 1.32**.

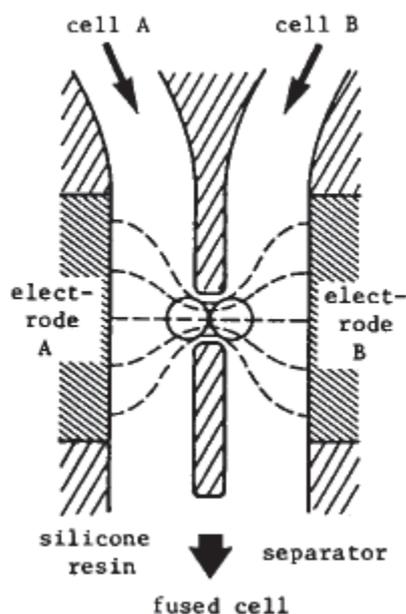


Figure 1.32 – Les deux populations de cellules sont introduites dans deux canaux distincts séparés par un diélectrique. Une ouverture permet alors le contact entre deux cellules (A + B) mais également la convergence du champ électrique (représenté en pointillé). Les maxima de champ sont alors localisés principalement à l'interface entre les deux cellules, ceci facilitant la fusion.

Schéma issu de [125].

Par ailleurs, cette convergence des lignes de champ assure d'agir uniquement sur les cellules placées au maximum du champ. L'effet de l'électroporation sur les autres cellules se trouvant dans le canal n'est alors pas significatif [124]. On notera par ailleurs que cette configuration évite que les cellules soient trop proches des électrodes.

L'intérêt des électrodes épaisses pour la fusion de cellules a été également plusieurs fois mis en évidence dans la littérature. Les travaux de Ju *et al* [121] ont par exemple comparé la répartition des lignes de champ entre électrodes planaires (200 nm) et épaisses (100 μm). Leurs simulations (**Figure 1.33**) suggèrent notamment que les électrodes épaisses offrent de meilleures conditions de fusion par une distribution plus homogène sur toute la hauteur du canal.

Ceci confirme d'ailleurs les conclusions de l'article de Lu *et al* [103], comparant la distribution du champ entre des électrodes cylindriques de différentes épaisseurs. C'est également pour ces mêmes justifications que des électrodes épaisses ont été utilisés dans les travaux de Tresset *et al* [118] et Pham Van *et al* [122].

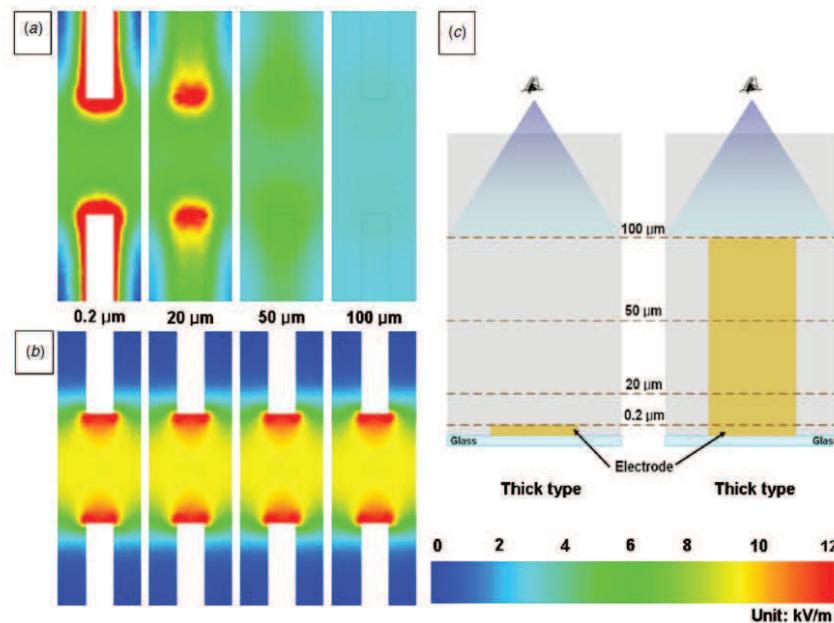


Figure 1.33 – Simulations issues de [121], mettant en évidence la répartition du champ sur l'épaisseur d'un microcanal dans le cas d'électrodes planaires (a) ou d'électrodes épaisses (b). Chaque image correspond à une coupe effectuée à différentes hauteurs du canal conformément au schéma (c). On remarque que le champ varie avec la hauteur pour les électrodes planaires, à l'inverse de celui produit à l'aide d'électrodes épaisses.

Après application des pulses, la réorganisation des lipides conduit à la fusion des membranes si les membranes sont bien en contact. Le processus est ainsi favorisé par un bon appariement des cellules pendant l'application des pulses mais également pendant l'étape de maturation des membranes (environ 30 min). La DEP [123] et les forces hydrodynamiques [116] sont classiquement utilisées à cet effet jusqu'à la formation complète des cellules hybrides.

- Rendement de fusion

L'efficacité du processus d'électrofusion est généralement évaluée par le marquage spécifique d'une ou des deux cellules. Celui-ci peut être effectué sur la membrane (Dil), le cytoplasme (Calcéine AM [123]) ou encore le noyau (Hoechst [116]). Comme présenté sur la **Figure 1.34**, l'observation au microscope à fluorescence permet alors de distinguer directement les hybrides.

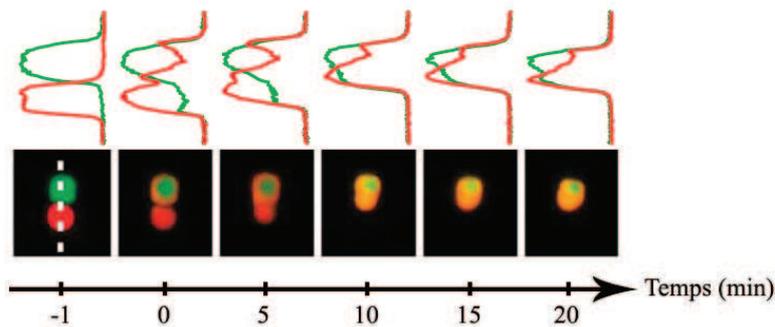


Figure 1.34 – Observation d’une fusion de deux cellules 3T3 exprimant respectivement la DsRed (en rouge) et la GFP (en vert). 20 min après le protocole d’électrofusion, la cellule hybride contient les deux marqueurs et émet dans l’orange. Image tirée de [116]

Les microsystèmes d’électrofusion sont comparés avec leur rendement de fusion, en particulier s’il s’agit de dispositifs à haute densité (plusieurs centaines de fusions simultanées). On notera cependant que cette notion ne renvoie pas toujours à la même signification. Par exemple, l’équipe de Kimura *et al* [117], annonce ainsi un rendement de 78 à 90%. Il s’agit ici du pourcentage de fusions réussies sur le nombre de paires formées. Dans un autre article [116], l’équipe de Skelley *et al* présente un rendement de 50 % qui correspond cette fois au nombre d’hybrides formés (AB) sur le nombre total de cellules. Ces mêmes auteurs affirment notamment atteindre un rendement 5 fois supérieur au système Helix commercialisé par Eppendorf®.

Enfin, l’une des fonctionnalités que doit idéalement offrir un microsystème dédié à la fusion cellulaire est l’isolement des cellules hybrides d’intérêt. Cette étape est particulièrement délicate puisque comme décrit précédemment, la fusion peut générer des syncaryons, des homocaryons ou des hétérocaryons, ce qui rend d’autant plus difficile leur sélection. C’est pourquoi l’étude des hybrides formés, cruciale pour le futur développement de microsystèmes de fusion fiables, fait toujours l’objet de recherches fondamentales. On notera néanmoins que selon l’application du microsystème, la récupération des hybrides n’est pas forcément une nécessité. Ceci en particulier s’il s’agit d’un outil de caractérisation de la division de hybrides [123], ou encore d’un microsystème dédié à la mise au point des conditions optimales de fusion.

Références bibliographiques

- [1] N. A. Lacher, K. E. Garrison, R. S. Martin, and S. M. Lunte, "Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry.," *Electrophoresis*, vol. 22, no. 12, pp. 2526-36, Aug. 2001.
- [2] M. J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication*. CRC Press, 1997, p. 589 S.
- [3] D. J. Fischer, W. R. Vandaveer, R. J. Grigsby, and S. M. Lunte, "Pyrolyzed Photoresist Carbon Electrodes for Microchip Electrophoresis with Dual-Electrode Amperometric Detection.," *Electroanalysis*, vol. 17, no. 13, pp. 1153-1159, 2005.
- [4] B. Y. Park and M. J. Madou, "3-D electrode designs for flow-through dielectrophoretic systems.," *Electrophoresis*, vol. 26, no. 19, pp. 3745-3757, 2005.
- [5] J. Wang, G. Chen, M. P. Chatrathi, A. Fujishima, D. A. Tryk, and D. Shin, "Microchip capillary electrophoresis coupled with a boron-doped diamond electrode-based electrochemical detector.," *Analytical Chemistry*, vol. 75, no. 4, pp. 935-939, 2003.
- [6] J. Gooding, "Nanostructuring electrodes with carbon nanotubes: A review on electrochemistry and applications for sensing.," *Electrochimica Acta*, vol. 50, no. 15, pp. 3049-3060, 2005.
- [7] M. Zhou, Y. Zhai, and S. Dong, "Electrochemical sensing and biosensing platform based on chemically reduced graphene oxide.," *Analytical Chemistry*, vol. 81, no. 14, pp. 5603-5613, 2009.
- [8] S. Ssenyange, J. Taylor, D. J. Harrison, and M. T. McDermott, "A glassy carbon microfluidic device for electrospray mass spectrometry.," *Analytical Chemistry*, vol. 76, no. 8, pp. 2393-2397, 2004.
- [9] R. Adams, "Carbon Paste Electrodes.," *Analytical Chemistry*, vol. 30, no. 9, pp. 1576-1576, Sep. 1958.
- [10] I. Švancara, K. Vytr̃as, K. Kalcher, A. Walcarius, and J. Wang, "Carbon Paste Electrodes in Facts, Numbers, and Notes: A Review on the Occasion of the 50-Years Jubilee of Carbon Paste in Electrochemistry and Electroanalysis.," *Electroanalysis*, vol. 21, no. 1, pp. 7-28, Jan. 2009.
- [11] L. C. Mecker, L. A. Filla, and R. S. Martin, "Use of a Carbon-ink Microelectrode Array for Signal Enhancement in Microchip Electrophoresis with Electrochemical Detection.," *Electroanalysis*, vol. 22, no. 19, pp. 2141-2146, Oct. 2010.
- [12] C. F. Gonzalez, D. M. Cropek, and C. S. Henry, "Photopatternable Carbon Electrodes for Chip-Based Electrochemical Detection.," *Electroanalysis*, vol. 21, no. 19, pp. 2171-2174, Oct. 2009.

- [13] W. Lisen, L. Flanagan, and A. P. Lee, "Side-wall vertical electrodes for lateral field microfluidic applications," *Journal of microelectromechanical systems*, vol. 16, no. 2, pp. 454-461, 2007.
- [14] C. Yu, J. Vykoukal, D. M. Vykoukal, J. A. Schwartz, and P. R. C. Gascoyne, "A three-dimensional dielectrophoretic particle focusing channel for microcytometry applications," *Journal Of Microelectromechanical Systems*, vol. 14, no. 3, pp. 480-487, 2005.
- [15] L. I. Segerink, A. J. Sprenkels, J. G. Bomer, I. Vermes, and A. van den Berg, "A new floating electrode structure for generating homogeneous electrical fields in microfluidic channels.," *Lab on a chip*, vol. 11, no. 12, pp. 1995-2001, Jun. 2011.
- [16] M. C. Cortizo and M. F. Lorenzo De Mele, "Cytotoxicity of copper ions released from metal," *Biological Trace Element Research*, vol. 102, no. 1, pp. 129-141, 2004.
- [17] A. C. Siegel, S. S. Shevkoplyas, D. B. Weibel, D. A. Bruzewicz, A. W. Martinez, and G. M. Whitesides, "Cofabrication of electromagnets and microfluidic systems in poly(dimethylsiloxane).," *Angewandte Chemie (International ed. in English)*, vol. 45, no. 41, pp. 6877-82, Oct. 2006.
- [18] J. Villemejeane, G. Mottet, O. Français, P. Lefèvre, L. M. Mir, and B. Le Pioufle, "Insulated liquid electrodes in a microfluidic chip for the nanomanipulation of living cells," in *Proceedings of the 1st European Conference on Microfluidics*, 2008.
- [19] H. Shafiee, J. L. Caldwell, M. B. Sano, and R. V. Davalos, "Contactless dielectrophoresis: a new technique for cell manipulation.," *Biomedical microdevices*, vol. 11, no. 5, pp. 997-1006, May 2009.
- [20] H. Shafiee, M. B. Sano, E. A. Henslee, J. L. Caldwell, and R. V. Davalos, "Selective isolation of live/dead cells using contactless dielectrophoresis (cDEP).," *Lab on a chip*, vol. 10, no. 4, pp. 438-45, Feb. 2010.
- [21] S. Shang, W. Zeng, and X.-ming Tao, "High stretchable MWNTs/polyurethane conductive nanocomposites," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, no. 20, p. 7274, Apr. 2011.
- [22] C.-L. Wu, H.-C. Lin, J.-S. Hsu, M.-C. Yip, and W. Fang, "Static and dynamic mechanical properties of polydimethylsiloxane/carbon nanotube nanocomposites," *Thin Solid Films*, vol. 517, no. 17, pp. 4895-4901, Jul. 2009.
- [23] A. Khosla and B. L. Gray, "Photopatternable Electrical Conductive Ag- SU-8 Nanocomposite for MEMS/MST," *ECS Transactions*, vol. 33, no. 8, pp. 313-318, 2010.
- [24] X. Z. Niu, S. L. Peng, L. Y. Liu, W. J. Wen, and P. Sheng, "Characterizing and Patterning of PDMS-Based Conducting Composites," *Advanced Materials*, vol. 19, no. 18, pp. 2682-2686, Sep. 2007.

- [25] F. Pirmoradi, L. Cheng, and M. Chiao, "A magnetic poly(dimethylsiloxane) composite membrane incorporated with uniformly dispersed, coated iron oxide nanoparticles," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 20, no. 1, p. 015032, 2010.
- [26] H. Cong and T. Pan, "Photopatternable Conductive PDMS Materials for Microfabrication," *Advanced Functional Materials*, vol. 18, no. 13, pp. 1912-1921, Jul. 2008.
- [27] Y. V. Pleskov, *Electrochemistry of Diamond: A Review*, vol. 38, no. 12. MAIK Nauka/Interperiodica distributed exclusively by Springer Science+Business Media LLC., 2002, pp. 1275-1291-1291.
- [28] R. L. McCreery, "Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry.," *Chemical reviews*, vol. 108, no. 7, pp. 2646-87, Jul. 2008.
- [29] G. A. M. Mersal, "Electrochemical Sensor for Voltammetric Determination of Catechol Based on Screen Printed Graphite Electrode," *Forschung*, vol. 4, pp. 1167 - 1177, 2009.
- [30] F. Sassa, K. Morimoto, W. Satoh, and H. Suzuki, "Electrochemical techniques for microfluidic applications.," *Electrophoresis*, vol. 29, no. 9, pp. 1787-800, May 2008.
- [31] W. B. Zimmerman, "Electrochemical microfluidics," *Chemical Engineering Science*, vol. 66, no. 7, pp. 1412-1425, 2010.
- [32] S. Z. Hua, F. Sachs, D. X. Yang, and H. D. Chopra, "Microfluidic actuation using electrochemically generated bubbles.," *Analytical Chemistry*, vol. 74, no. 24, pp. 6392-6396, 2002.
- [33] H. Suzuki, "A reversible electrochemical nanosyringe pump and some considerations to realize low-power consumption," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 86, no. 2-3, pp. 242-250, 2002.
- [34] D. E. Lee, S. Soper, and W. Wang, "Design and fabrication of an electrochemically actuated microvalve," *Microsystem Technologies*, vol. 14, no. 9-11, pp. 1751-1756, 2008.
- [35] C.-T. Ho, R.-Z. Lin, H.-Y. Chang, and C.-H. Liu, "Micromachined electrochemical T-switches for cell sorting applications.," *Lab on a chip*, vol. 5, no. 11, pp. 1248-58, Nov. 2005.
- [36] M. Sun et al., "Characterization of microfluidic fuel cell based on multiple laminar flow," *Microelectronic Engineering*, vol. 84, no. 5-8, pp. 1182-1185, 2007.
- [37] E. Choban, "Microfluidic fuel cell based on laminar flow," *Journal of Power Sources*, vol. 128, no. 1, pp. 54-60, 2004.

- [38] E. Kjeang, N. Djilali, and D. Sinton, "Microfluidic fuel cells: A review," *Journal of Power Sources*, vol. 186, no. 2, pp. 353-369, 2009.
- [39] E. Kjeang, R. Michel, D. A. Harrington, N. Djilali, and D. Sinton, "A microfluidic fuel cell with flow-through porous electrodes.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 130, no. 12, pp. 4000-4006, 2008.
- [40] S. K. Yoon, E. R. Choban, C. Kane, T. Tzedakis, and P. J. A. Kenis, "Laminar flow-based electrochemical microreactor for efficient regeneration of nicotinamide cofactors for biocatalysis.," *Journal of the American Chemical Society*, vol. 127, no. 30, pp. 10466-10467, 2005.
- [41] J. Wang, "Electrochemical detection for microscale analytical systems: a review.," *Talanta*, vol. 56, no. 2, pp. 223-231, 2002.
- [42] P. Bergveld, "Thirty years of ISFETOLOGY What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 88, no. 1, pp. 1-20, 2003.
- [43] M. Castellarnau et al., "Integrated cell positioning and cell-based ISFET biosensors," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 120, no. 2, pp. 615-620, 2007.
- [44] R. M. Guijt et al., "New approaches for fabrication of microfluidic capillary electrophoresis devices with on-chip conductivity detection.," *Electrophoresis*, vol. 22, no. 2, pp. 235-41, Jan. 2001.
- [45] M. M. Richter, "Electrochemiluminescence (ECL).," *Chemical reviews*, vol. 104, no. 6, pp. 3003-36, Jun. 2004.
- [46] L. Hu and G. Xu, "Applications and trends in electrochemiluminescence.," *Chemical Society Reviews*, vol. 39, no. 8, pp. 3275-3304, 2010.
- [47] J. Zhang, H. Qi, Y. Li, J. Yang, Q. Gao, and C. Zhang, "Electrogenerated chemiluminescence DNA biosensor based on hairpin DNA probe labeled with ruthenium complex.," *Analytical chemistry*, vol. 80, no. 8, pp. 2888-94, Apr. 2008.
- [48] P. Chandra, S. A. Zaidi, H.-B. Noh, and Y.-B. Shim, "Separation and simultaneous detection of anticancer drugs in a microfluidic device with an amperometric biosensor.," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 28, no. 1, pp. 326-332, 2011.
- [49] X. Xu, S. Zhang, H. Chen, and J. Kong, "Integration of electrochemistry in micro-total analysis systems for biochemical assays: recent developments.," *Talanta*, vol. 80, no. 1, pp. 8-18, 2009.
- [50] F. Sassa, K. Morimoto, W. Satoh, and H. Suzuki, "Electrochemical techniques for microfluidic applications.," *Electrophoresis*, vol. 29, no. 9, pp. 1787-800, May 2008.
- [51] P. Tabeling, *Introduction à la microfluidique*. Belin, 2003, p. 254.

- [52] J. W. Jorgenson and K. DeArman Lukacs, "High-resolution separations based on electrophoresis and electroosmosis," *Journal Of Chromatography*, vol. 218, pp. 209-216, 1981.
- [53] N. I. and J. Wu, "Microfluidic transport by AC electroosmosis," *Journal of Physics: Conference Series*, vol. 34, no. 1, pp. 356-361, Apr. 2006.
- [54] M. G. Pollack, R. B. Fair, and A. D. Shenderov, "Electrowetting-based actuation of liquid droplets for microfluidic applications," *Applied Physics Letters*, vol. 77, no. 11, p. 1725, 2000.
- [55] M. Lian and J. Wu, "Microfluidic flow reversal at low frequency by AC electrothermal effect," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 7, no. 6, pp. 757-765, Mar. 2009.
- [56] S. Hardt and F. Schönfeld, "Microfluidic Technologies for Miniaturized Analysis Systems," *Analysis*, p. 616, 2007.
- [57] R. Pethig, "Review Article-Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications.," *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 2, p. 022811, Jan. 2010.
- [58] C. D. Falokun and G. H. Markx, "Electrorotation of beads of immobilized cells," *Journal of Electrostatics*, vol. 65, no. 7, pp. 475-482, 2007.
- [59] V. Tandon, S. K. Bhagavatula, W. C. Nelson, and B. J. Kirby, "Zeta potential and electroosmotic mobility in microfluidic devices fabricated from hydrophobic polymers: 1. The origins of charge.," *Electrophoresis*, vol. 29, no. 5, pp. 1092-101, Mar. 2008.
- [60] B. Alberts, A. Johnson, P. Walter, J. Lewis, M. Raff, and K. Roberts, *Molecular Biology of the Cell*. Garland Publishing Inc, 2007, p. 1392.
- [61] S. Weinbaum, J. M. Tarbell, and E. R. Damiano, "The structure and function of the endothelial glycocalyx layer.," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 9, no. 1, pp. 121-167, 2007.
- [62] G. H. Markx and C. L. Davey, "The dielectric properties of biological cells at radiofrequencies: applications in biotechnology," *Enzyme and Microbial Technology*, vol. 25, no. 3-5, pp. 161-171, 1999.
- [63] T. Akagi and T. Ichiki, "Cell electrophoresis on a chip: what can we know from the changes in electrophoretic mobility?," *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, no. 7, pp. 2433-2441, 2008.
- [64] M. Hughes, "AC electrokinetics: applications for nanotechnology," *Biomedical Engineering*, vol. 11, no. 2, pp. 124-132, 2000.
- [65] R. Pethig and D. B. Kell, "The passive electrical properties of biological systems: their significance in physiology, biophysics and biotechnology.," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 32, no. 8, pp. 933-970, 1987.

- [66] C.-P. Jen and T.-W. Chen, "Selective trapping of live and dead mammalian cells using insulator-based dielectrophoresis within open-top microstructures," *Biomedical Microdevices*, vol. 11, no. 3, pp. 597-607, 2009.
- [67] K. L. Chan, P. R. Gascoyne, F. F. Becker, and R. Pethig, "Electrorotation of liposomes: verification of dielectric multi-shell model for cells.," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1349, no. 2, pp. 182-196, 1997.
- [68] A. Irimajiri, T. Hanai, and A. Inouye, "A dielectric theory of 'multi-stratified shell' model with its application to a lymphoma cell.," *Journal of Theoretical Biology*, vol. 78, no. 2, pp. 251-269, 1979.
- [69] U. Zimmermann and G. A. Neil, *Electromanipulation of Cells*. CRC-Press, 1996, p. 416.
- [70] A. D. Goater and R. Pethig, "Electrorotation and dielectrophoresis.," *Parasitology*, vol. 117, pp. S177-89, Jan. 1998.
- [71] M. A. Schwarz and P. C. Hauser, "Recent developments in detection methods for microfabricated analytical devices.," *Lab on a chip*, vol. 1, no. 1, pp. 1-6, Sep. 2001.
- [72] Y. Hu, J. L. Glass, A. E. Griffith, and S. Fraden, "Observation and simulation of electrohydrodynamic instabilities in aqueous colloidal suspensions," *Journal of Chemical Physics*, vol. 100, no. 6, pp. 4674-4682, 1994.
- [73] M. Mittal, P. P. Lele, E. W. Kaler, and E. M. Furst, "Polarization and interactions of colloidal particles in ac electric fields.," *The Journal of chemical physics*, vol. 129, no. 6, p. 064513, Aug. 2008.
- [74] T. B. Jones, *Electromechanics of Particles*. Cambridge University Press, 2005, p. 288.
- [75] J. Gimsa and D. Wachner, "A unified resistor-capacitor model for impedance, dielectrophoresis, electrorotation, and induced transmembrane potential.," *Biophysical Journal*, vol. 75, no. 2, pp. 1107-1116, 1998.
- [76] D. Voet, J.-G. Voet, G. Rousseau, and L. Domenjoud, *Biochimie*. De Boeck, 2005, p. 1583.
- [77] B. J. Kirby and E. F. Hasselbrink, "Zeta potential of microfluidic substrates: 2. Data for polymers.," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 2, pp. 203-213, 2004.
- [78] D. Li, *Encyclopedia of microfluidics and nanofluidics*. Springer, 2008, p. 2242.
- [79] P. R. C. Gascoyne and J. V. Vykoukal, "Dielectrophoresis-Based Sample Handling in General-Purpose Programmable Diagnostic Instruments.," *Proceedings of the IEEE Institute of Electrical and Electronics Engineers*, vol. 92, no. 1, pp. 22-42, 2004.

- [80] X. B. Wang, Y. Huang, P. R. C. Gascoyne, and F. F. Becker, "Dielectrophoretic manipulation of particles," *Industry Applications IEEE Transactions on*, vol. 33, no. 3, p. 34105, 2008.
- [81] L. Wang, J. Lu, S. A. Marchenko, E. S. Monuki, L. A. Flanagan, and A. P. Lee, "Dual frequency dielectrophoresis with interdigitated sidewall electrodes for microfluidic flow-through separation of beads and cells," *Electrophoresis*, vol. 30, no. 5, pp. 782-791, 2009.
- [82] Y. Huang, R. Hölzel, R. Pethig, and X. B. Wang, "Differences in the AC electrodynamics of viable and non-viable yeast cells determined through combined dielectrophoresis and electrorotation studies.," *Physics in Medicine and Biology*, vol. 37, no. 7, pp. 1499-1517, 1992.
- [83] S. O. Lumsdon, E. W. Kaler, and O. D. Velev, "Two-Dimensional Crystallization of Microspheres by a Coplanar AC Electric Field," *Langmuir*, vol. 20, no. 6, pp. 2108-2116, Mar. 2004.
- [84] P. P. Lele, M. Mittal, and E. M. Furst, "Anomalous particle rotation and resulting microstructure of colloids in AC electric fields.," *Langmuir* : the ACS journal of surfaces and colloids, vol. 24, no. 22, pp. 12842-8, Nov. 2008.
- [85] D. Zimmermann et al., "A combined patch-clamp and electrorotation study of the voltage- and frequency-dependent membrane capacitance caused by structurally dissimilar lipophilic anions.," *The Journal of membrane biology*, vol. 221, no. 2, pp. 107-21, Jan. 2008.
- [86] P. Gascoyne, R. Pethig, J. Satayavivad, F. F. Becker, and M. Ruchirawat, "Dielectrophoretic detection of changes in erythrocyte membranes following malarial infection.," *Biochimica et Biophysica Acta*, vol. 1323, no. 2, pp. 240-252, 1997.
- [87] J. Yang, Y. Huang, X. Wang, X. B. Wang, F. F. Becker, and P. R. Gascoyne, "Dielectric properties of human leukocyte subpopulations determined by electrorotation as a cell separation criterion.," *Biophysical Journal*, vol. 76, no. 6, pp. 3307-3314, 1999.
- [88] C. Holzapfel, J. Vienken, and U. Zimmermann, "Rotation of cells in an alternating electric field theory and experimental proof," *The Journal of Membrane Biology*, vol. 67, no. 1, pp. 13-26, Dec. 1982.
- [89] J. Gehl, "Electroporation: theory and methods, perspectives for drug delivery, gene therapy and research.," *Acta physiologica Scandinavica*, vol. 177, no. 4, pp. 437-47, Apr. 2003.
- [90] M. B. Fox et al., "Electroporation of cells in microfluidic devices: a review.," *Analytical and bioanalytical chemistry*, vol. 385, no. 3, pp. 474-85, Jun. 2006.

- [91] J. Teissié and M. P. Rols, "An experimental evaluation of the critical potential difference inducing cell membrane electroporation," *Biophysical Journal*, vol. 65, no. 1, pp. 409-413, 1993.
- [92] S. Movahed and L. Dongqing, "Microfluidics cell electroporation," *Microfluidics and nanofluidics*, vol. 10, no. 4, pp. 703-734, 2011.
- [93] J. Weaver and Y. A. Chizmadzhev, "Theory of electroporation: A review," *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, vol. 41, no. 2, pp. 135-160, 1996.
- [94] L. M. Mir and S. Orlowski, "Mechanisms of electrochemotherapy," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 35, no. 1, pp. 107-118, 1999.
- [95] J. Kim, S. Hee Jang, G. Jia, J. V. Zoval, N. A. Da Silva, and M. J. Madou, "Cell lysis on a microfluidic CD (compact disc)," *Lab on a Chip*, vol. 4, no. 5, pp. 516-522, 2004.
- [96] J. Kim, M. Johnson, P. Hill, and B. K. Gale, "Microfluidic sample preparation: cell lysis and nucleic acid purification," *Integrative biology quantitative biosciences from nano to macro*, vol. 1, no. 10, pp. 574-586, 2009.
- [97] H. Andersson, "Microfluidic devices for cellomics: a review," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 92, no. 3, pp. 315-325, 2003.
- [98] G. Mernier, N. Piacentini, T. Braschler, N. Demierre, and P. Renaud, "Continuous-flow electrical lysis device with integrated control by dielectrophoretic cell sorting," *Lab on a chip*, vol. 10, no. 16, pp. 2077-82, Aug. 2010.
- [99] H. Lu, M. A. Schmidt, and K. F. Jensen, "A microfluidic electroporation device for cell lysis," *Lab on a chip*, vol. 5, no. 1, pp. 23-9, Jan. 2005.
- [100] H. Sedgwick, F. Caron, P. . Monaghan, W. Kolch, and J. . Cooper, "Lab-on-a-chip technologies for proteomic analysis from isolated cells," *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 5, no. 2, p. S123-S130, Oct. 2008.
- [101] H.-Y. Wang and C. Lu, "Electroporation of mammalian cells in a microfluidic channel with geometric variation," *Analytical chemistry*, vol. 78, no. 14, pp. 5158-64, Jul. 2006.
- [102] S. W. Lee and Y.-C. Tai, "A micro cell lysis device," *Proceedings MEMS 98 IEEE Eleventh Annual International Workshop on Micro Electro Mechanical Systems An Investigation of Micro Structures Sensors Actuators Machines and Systems Cat No98CH36176*, vol. 73, no. 1998, pp. 74-79, 1999.
- [103] K.-Y. Lu, A. M. Wo, Y.-J. Lo, K.-C. Chen, C.-M. Lin, and C.-R. Yang, "Three dimensional electrode array for cell lysis via electroporation," *Biosensors and Bioelectronics*, vol. 22, no. 4, pp. 568-574, 2006.
- [104] V. L. Sukhorukov, H. Mussauer, and U. Zimmermann, "The Effect of Electrical Deformation Forces on the Electroporation of Erythrocyte Membranes in Low-

- and High-Conductivity Media,” *Journal of Membrane Biology*, vol. 163, no. 3, pp. 235-245, Jun. 1998.
- [105] G. Pucihar, T. Kotnik, M. Kanduser, and D. Miklavcic, “The influence of medium conductivity on electroporation and survival of cells in vitro.,” *Bioelectrochemistry Amsterdam Netherlands*, vol. 54, no. 2, pp. 107-115, 2001.
- [106] A. Ivorra, J. Villemejeane, and L. M. Mir, “Electrical modeling of the influence of medium conductivity on electroporation,” *Physical chemistry chemical physics* : *PCCP*, vol. 12, no. 34, pp. 10055-64, Sep. 2010.
- [107] M. Pavlin et al., “Effect of cell electroporation on the conductivity of a cell suspension.,” *Biophysical journal*, vol. 88, no. 6, pp. 4378-90, Jun. 2005.
- [108] S. Movahed and D. Li, “Microfluidics cell electroporation,” *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 10, no. 4, pp. 703-734, Oct. 2010.
- [109] B. M. Ogle, M. Cascalho, and J. L. Platt, “Biological implications of cell fusion.,” *Nature reviews. Molecular cell biology*, vol. 6, no. 7, pp. 567-75, Jul. 2005.
- [110] R. Jahn, T. Lang, and T. C. Südhof, “Membrane Fusion,” *Cell*, vol. 112, no. 4, pp. 519-533, Feb. 2003.
- [111] G. Köhler, S. C. Howe, and C. Milstein, “Fusion between immunoglobulin-secreting and nonsecreting myeloma cell lines.,” *European journal of immunology*, vol. 6, no. 4, pp. 292-5, Apr. 1976.
- [112] J. Gong, D. Chen, M. Kashiwaba, and D. Kufe, “Induction of antitumor activity by immunization with fusions of dendritic and carcinoma cells,” *Nature Medicine*, vol. 3, no. 5, pp. 558-561, May 1997.
- [113] M. Oren-Suissa and B. Podbilewicz, “Cell fusion during development.,” *Trends in Cell Biology*, vol. 17, no. 11, pp. 537-546, 2007.
- [114] G. Pontecorvo, “Production of mammalian somatic cell hybrids by means of polyethylene glycol treatment,” *Somatic Cell Genetics*, vol. 1, no. 4, pp. 397-400, Oct. 1975.
- [115] U. Zimmermann and J. Vienken, “Electric field-induced cell-to-cell fusion,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 67, no. 1, pp. 165-182, Dec. 1982.
- [116] A. M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch, and J. Voldman, “Microfluidic control of cell pairing and fusion,” *Nature Methods*, vol. 6, no. 2, pp. 147-152, 2009.
- [117] Y. Kimura, M. Gel, B. Techaumnat, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu, “Dielectrophoresis-assisted massively parallel cell pairing and fusion based on field constriction created by a micro-orifice array sheet.,” *Electrophoresis*, Aug. 2011.

- [118] G. Tresset and S. Takeuchi, "A microfluidic device for electrofusion of biological vesicles.," *Biomedical Microdevices*, vol. 6, no. 3, pp. 213-218, 2004.
- [119] V. L. Sukhorukov et al., "A biophysical approach to the optimisation of dendritic-tumour cell electrofusion.," *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 346, no. 3, pp. 829-839, 2006.
- [120] Y. Cao, Y. H. Y. L. M. Yang, Z. Q. Yin, H. Y. Luo, J. R. Q. Z. R. Xu, and X. L. Zheng, "Study of high-throughput cell electrofusion in a microelectrode-array chip," *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 5, no. 5, pp. 669-675, 2008.
- [121] J. Ju, J.-M. Ko, H.-C. Cha, J. Y. Park, C.-H. Im, and S.-H. Lee, "An electrofusion chip with a cell delivery system driven by surface tension," *Journal of Micromechanics and Microengineering*, vol. 19, no. 1, p. 015004, 2009.
- [122] N. Pham Van et al., "A high density microfluidic device for cell pairing and electrofusion," *Procedia Engineering*, vol. 5, pp. 49-52, 2010.
- [123] M. Gel, Y. Kimura, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu, "Dielectrophoretic cell trapping and parallel one-to-one fusion based on field constriction created by a micro-orifice array.," *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 2, Jan. 2010.
- [124] B. Techaumnat and M. Washizu, "Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells," *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 40, no. 6, pp. 1831-1837, Mar. 2007.
- [125] S. Masuda, M. Washizu, and T. Nanba, "Novel method of cell fusion in field constriction area in fluid integration circuit," *IEEE Transactions on Industry Applications*, vol. 25, no. 4, pp. 732-737, 1989.

Chapitre 2

Développement d'une filière d'intégration du cPDMS en microfluidique

Ce chapitre est dédié à la description du cPDMS, un matériau nanocomposite formé de PDMS dopé au noir de carbone dont la caractérisation et l'utilisation en microfluidique font l'objet de cette thèse.

Il débute par la présentation rapide des matériaux nanocomposites et plus particulièrement de l'intérêt de leur utilisation en microsystèmes. Suivent ensuite la description détaillée du cPDMS et son processus de préparation. Dans ce cadre, seront détaillées les propriétés physico-chimiques de chacun de ses deux composants.

La seconde partie du chapitre est axée sur la caractérisation du cPDMS. Ce matériau étant destiné à être utilisé comme électrode, sa conductivité électrique est étudiée en fonction du dopage en carbone. Cependant, l'intégration du cPDMS nécessite une adaptation de la chaîne de microfabrication utilisée. C'est justement l'objet de la troisième partie du chapitre qui décrit en détail le processus développé au laboratoire permettant la réalisation d'un système microfluidique avec électrodes épaisses.

Dans la dernière partie, d'autres caractérisations effectuées sur le cPDMS sont présentées. Elles permettent de mettre en évidence les propriétés de surface du matériau, celles-ci pouvant s'avérer critiques en microfluidique.

I. TECHNOLOGIE cPDMS

I.1 Les matériaux nanocomposites en microsystèmes

▪ Définition et intérêt

Un matériau composite est formé de plusieurs éléments dont l'association confère un ensemble de propriétés qu'aucun des composants, pris séparément, ne possède. Ils sont classiquement constitués de deux phases distinctes : la matrice et la charge (ou dopant). Lorsque l'un des composants (le plus souvent le dopant) présente des dimensions nanométriques, on parle alors de matériaux nanocomposites.

Les matrices de matériaux nanocomposites peuvent être d'origine métallique, céramique ou organique. Parmi les matrices organiques, on distingue les polymères thermoplastiques (PVC¹, COC²) et les polymères thermodurcissables (résine époxy, PDMS³) selon le type de liaisons existant entre les monomères.

Les dopants, possédant une ou plusieurs dimension(s) nanométrique(s), peuvent avoir différentes géométries. On distingue ainsi les feuillets (graphène, argiles), les nanotubes (CNTs⁴) ou les nanoparticules (carbone, Au, Ag, TiO₂).

L'intérêt des nanocomposites provient principalement de la réduction d'échelle. En effet, lorsque l'on diminue la taille d'un objet, son rapport surface/volume augmente. Ainsi à volume de dopants égal, il y a une plus grande surface de contact dopant/matrice lorsque l'on diminue la dimension des dopants. Or, c'est précisément cette interface qui contrôle l'interaction entre la matrice et les dopants, et qui explique en grande partie les avantages des nanocomposites :

- Augmentation de la résistance mécanique, par exemple la capacité du matériau à se déformer sans se rompre est accrue. La diminution de la taille du dopant ne génère pas l'apparition de contraintes dans le matériau [1].
- Amélioration des propriétés optiques, notamment grâce aux dimensions des nanoparticules inférieures aux longueurs d'onde de la lumière visible (380-780 nm) [2].
- Augmentation des propriétés thermiques et électriques sans trop altérer l'état de surface du matériau [1].

▪ Dopage électrique et percolation

La grande majorité des polymères commercialisés ne sont intrinsèquement pas de bons conducteurs électriques (**Figure 2.1**). Ils présentent en effet une résistivité électrique de surface de l'ordre de $10^{15}\Omega/\square$ (ohm par carré). Cependant, rendre un polymère conducteur peut parfois être intéressant. Là encore, les principales applications de dopage électrique de polymères sont surtout industrielles avec par exemple la dissipation de charges électrostatiques dans les emballages de produits électroniques [3].

¹ Polychlorure de vinyle

² Cyclic Olefin Copolymer

³ Polydimethylsiloxane

⁴ Carbon Nano Tubes

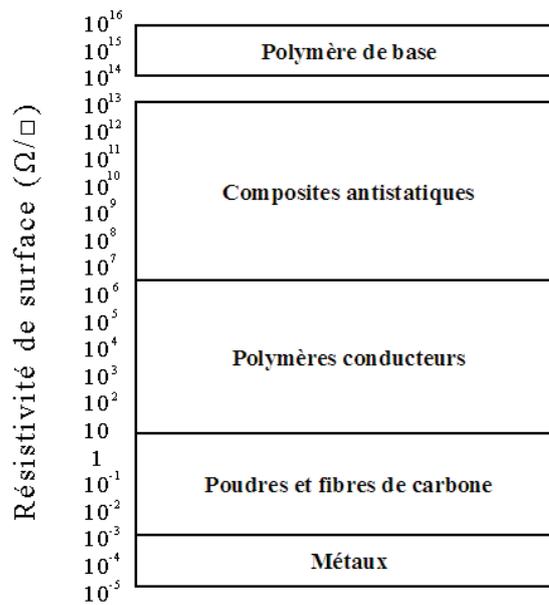


Figure 2.1 – Comparaison de la résistivité de surface de différentes classes de matériaux.
Figure réalisée d'après www.boedeker.com/esdmatls.htm.

Le polymère peut être rendu électriquement conducteur :

- de manière non permanente par l'utilisation de dopants chimiques consommables. Sont typiquement utilisés des esters d'acides gras ou des amines quaternaires qui peuvent migrer progressivement jusqu'à la surface pour former un film humide abaissant ainsi la résistivité superficielle ($\sim 10^{11} \Omega/\square$).
- de manière permanente en ajoutant des dopants dans le matériau et augmentant ainsi définitivement la conductivité superficielle et volumique. Les dopants les plus courants sont à base de carbone (nanoparticules, fibres, nanotubes) ou de métaux (or, argent, aluminium, etc.).

L'augmentation de la conductivité électrique avec le dopage en particules conductrices suit la théorie de percolation [4]. Celle-ci est basée sur le fait que les dopants, ajoutés à une matrice diélectrique, se lient (aléatoirement) pour former des régions plus conductrices que la moyenne. En augmentant la quantité de dopants, ces régions s'agrandissent et le matériau composite devient conducteur lorsqu'un chemin conducteur continu est formé. Cette conduction électrique s'effectue à partir d'une concentration critique de particules chargées appelée seuil de percolation, qui ne nécessite pas forcément de contact entre particules. En effet, la conduction peut se faire par effet tunnel entre particules séparées par une distance de l'ordre de l'Angström. En revanche, cette limite de conduction est extrêmement dépendante de la forme du dopant [5].

Les nanocomposites se présentent donc comme une technologie alternative prometteuse, même si leur usage est actuellement limité par leur surcoût et la problématique de leur manipulation (toxicité). Cependant, l'émergence de systèmes microfluidiques en polymères offre de nouvelles perspectives quant à leur utilisation.

▪ Électrodes nanocomposites en microsystèmes

Comme décrit dans le premier chapitre, les méthodes traditionnelles de fabrication d'électrodes dans les microsystèmes présentent de nombreuses limitations. Les principales difficultés concernent la réalisation d'électrodes épaisses (allant de quelques micromètres à plusieurs centaines de micromètres), réalisées en matériau biocompatible, le tout intégré en microsystème de manière parfaitement étanche. L'ensemble de ces verrous technologiques peut être contourné par l'utilisation de matériaux composites. C'est pourquoi on rencontre dans la littérature de plus en plus d'exemples de dopage des polymères utilisés en microsystèmes tels que le polyuréthane [6], les résines époxy [7], et plus récemment le PDMS [8][9][10]. Ce dernier étant le polymère le plus utilisé en microfluidique, il fait légitimement l'objet d'études pour son utilisation en tant que matrice de matériaux nanocomposites depuis une dizaine d'années. On retrouve majoritairement des exemples de dopage du PDMS par des nanoparticules d'argent [8], des nanotubes de carbone [9] et parfois des nanoparticules d'or [10]. Mais le PDMS peut également être dopé par l'ajout de noir de carbone, on parle alors de cPDMS pour carbone-PDMS [8]. Ses propriétés et ses utilisations sont détaillées dans la seconde partie de ce chapitre.

I.2 cPDMS

Comme précisé brièvement dans le paragraphe précédent, le cPDMS est un matériau nanocomposite composé de PDMS dopé avec du noir de carbone.

I.2.a Polydiméthylsiloxane

Le PDMS est un polymère classé dans la famille des polysiloxanes. Comme présenté sur la **Figure 2.2.a**, il est composé de groupements siloxanes répétés, c'est-à-dire de liaisons Si-O, dans lesquelles deux groupements méthyles (-CH₃) sont substitués sur l'atome de silicium [11].

Matériau diélectrique (résistivité $\rho = 1,2 \cdot 10^{14} \Omega \cdot \text{cm}$), transparent, perméable aux gaz, simple à mettre en œuvre, le PDMS dispose de propriétés idéales pour le prototypage de laboratoires sur puce [11]. Moins cher que le silicium ou le verre [12], cet élastomère de silicone, permettant de réaliser des structures submicrométriques, s'est rapidement imposé comme le polymère de référence en microfluidique.

Le développement des techniques de « soft lithography » [13] a largement contribué à son utilisation. Cette technique de réplique par moulage nécessite la réalisation préalable d'un moule typiquement formé en résine photosensible. Le PDMS est ensuite versé sur ce moule afin d'en former une réplique inversée pendant sa polymérisation.

Un traitement plasma oxygène peut ensuite être utilisé pour coller cette réplique de PDMS à d'autres matériaux (verre, silicium, polystyrène...) de manière covalente et ainsi former un dispositif microfluidique complet et étanche [14]. Ce processus n'est pas encore détaillé avec précision mais il correspond à l'augmentation du nombre d'atomes d'oxygène à la surface du PDMS [15]. En effet, sous l'action des radicaux oxygénés, les groupements méthyles de surface sont progressivement remplacés par des groupements hydroxyles (-OH) pour former des silanols (Si-OH) [16] (**Figure 2.2.b**). Ainsi, lorsque deux surfaces exposées au traitement sont mises en contact, des liaisons Si-O-Si (appelées également « ponts siloxanes ») lient les deux parties de manière covalente.

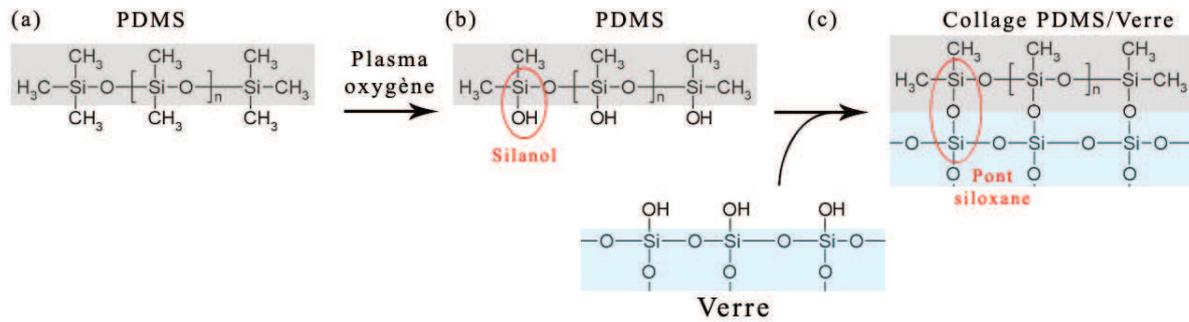


Figure 2.2 – Principe schématique de collage par plasma O₂ entre le PDMS et le verre. Les groupements méthyles (-CH₃) en surface du PDMS (a) sont remplacés par des groupements hydroxyles (-OH) sous l'effet du plasma oxygène (b). Le traitement de surface permet alors le collage covalent (pont siloxane) de PDMS sur verre (c).

Même si de nombreux groupes ont publié leurs paramètres de traitement optimum, notamment sur la durée ou la puissance du plasma, peu d'articles présentent en détail le phénomène. En règle générale, les surfaces doivent être mises en contact pendant environ 1 min et une goutte de solvant (éthanol) peut être placée comme lubrifiant entre les surfaces traitées afin de faciliter un éventuel alignement. Le dispositif assemblé doit être ensuite chauffé plusieurs minutes, ceci permettant d'évaporer la goutte de solvant et de terminer le processus de formation des liaisons. En augmentant la quantité de groupements silanols à la surface du PDMS, le traitement plasma oxygène permet par ailleurs de réduire l'hydrophobicité du matériau. Ce phénomène réversible, largement retrouvé dans la littérature [16], sera détaillé dans la suite du manuscrit.

1.2.b Noir de carbone

Le carbone est un matériau non métallique existant sous les formes cristallines (graphite, diamant) ou amorphes (charbon, noir de carbone). Les propriétés physiques du carbone varient considérablement avec sa forme allotropique. Par exemple, le diamant, l'un des matériaux les plus durs, est transparent, et caractérisé par une très forte conductivité thermique et une très faible conductivité électrique. À l'inverse, le graphite est opaque et est très bon conducteur électrique [17].

Chimiquement, le carbone peut se trouver sous forme inorganique, comme dans les calcaires [18], mais il est surtout l'élément de base de près de dix millions de composés organiques [19]. En effet, étant tétravalent, il peut se lier à d'autres atomes via trois types de liaisons différentes selon l'hybridation des orbitales atomiques [17]. Le type de liaison entre les atomes permet d'expliquer un certain nombre de propriétés physico-chimiques des matériaux. Ainsi la double liaison (hybridation sp²), par la délocalisation des électrons π, est responsable de la couleur noire et surtout de la conductivité électrique du graphène [20,21], une propriété particulièrement recherchée dans les matériaux nanocomposites.

Parmi les formes allotropiques amorphes du carbone, on trouve le noir de carbone. Il s'agit d'un terme générique désignant la substance granuleuse réalisée à partir de la combustion d'hydrocarbures (huiles aromatiques) ou leur décomposition (acétylène) [22]. Celles-ci produisent une fumée noire contenant de très fines particules de carbone pouvant être séparées des gaz de combustion pour former une poudre légère et noire (**Figure 2.3**). Le noir de carbone est l'un des produits chimiques les plus stables et est utilisé principalement pour le renforcement du caoutchouc. C'est l'industrie du pneu qui consomme 70% des 10 millions de tonnes de noir de carbone produites par an [23].

La structure amorphe du noir de carbone, dépendant de la manière dont le matériau est synthétisé, permet la coexistence des formes sp^1 , sp^2 et sp^3 (**Figure 2.3**) mais peut également contenir quelques impuretés [22,24]. La forme sp^2 , la plus stable d'un point de vue thermodynamique (à température ambiante), représente ainsi 80% des liaisons présentes dans le noir de carbone, ce qui le rend électriquement conducteur. C'est pourquoi le noir de carbone est largement utilisé comme charge conductrice pour polymères nanocomposites [25].

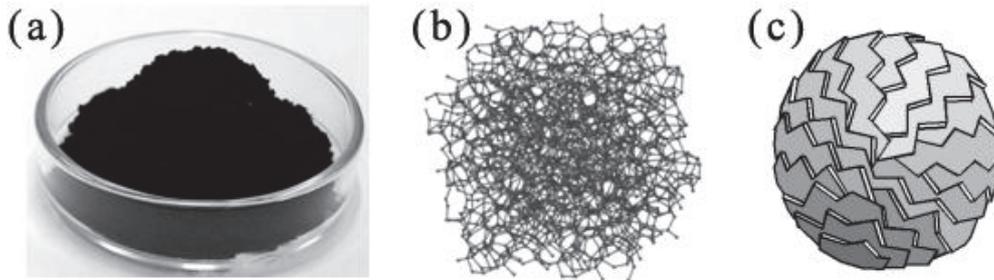


Figure 2.3 – Aspect (a), structure chimique (b) et représentation schématisée d'une particule (c) de noir de carbone.

Le noir de carbone est composé de particules nanométriques (10-50nm) formées d'un ensemble de couches de graphène (plan graphitique) désordonnées [17]. Ceci confère aux particules une conductivité électrique particulièrement élevée en dépit de la présence de discontinuités (dues à des atomes de carbone sp^3). Les particules s'assemblent très rapidement en grappes pendant la synthèse, certaines couches de graphène sont étendues sur plusieurs particules adjacentes et assurent ainsi une conductivité élevée entre les particules d'un même ensemble. On parle alors d'agrégats mesurant typiquement de 100 à 500 nm [26].

Le noir de carbone utilisé ici pour la préparation du cPDMS est le Vulcain[®] XC-72R produit par Cabot Corporation. Il est largement utilisé pour le dopage de matériaux polymères [25,27].

L'examen (**Figure 2.4**) du Vulcain[®] XC-72R au microscope électronique à balayage (MEB) révèle une composition en particules de taille comprise entre 20 nm et 60 nm et d'agrégats supérieurs à 100 nm, ce qui reste cohérent avec les données de la fiche technique et les mesures retrouvées dans la littérature [26].

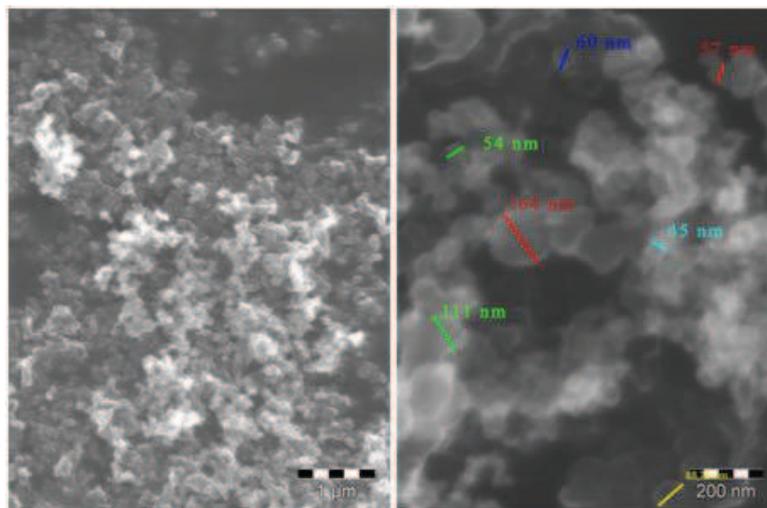


Figure 2.4 – Observations MEB du noir de carbone (Vulcain XC72) mettant en évidence les dimensions des particules de noir de carbone ainsi que la formation d'agrégats.

Des mesures de la taille des agrégats ont également été effectuées à l'aide d'un Zetasizer[®] (Malvern Instruments Ltd). Cette technique spectroscopique permet de détecter la présence et la dimension de particules dans une solution par diffusion dynamique de la lumière. Les résultats sont représentés sous la forme d'un spectre décrivant la distribution de tailles des particules dans le milieu. La hauteur des pics n'est en revanche pas proportionnelle à la quantité de particules correspondante. En effet, lors de la mesure, la détection de grosses particules tend à cacher celle des plus petites [28].

Pour l'expérience, quelques milligrammes de Vulcain[®] XC-72R sont mélangés à de l'eau distillée. Cependant, le noir de carbone étant hydrophobe, il ne se mélange pas à l'eau et se colle préférentiellement aux parois de la cuvette d'analyse du Zetasizer[®]. Quelques secondes au vortex permettent néanmoins de mettre partiellement en suspension les particules avant la mesure. Les résultats, présentés sur la **Figure 2.5**, confirment la présence d'agrégats de rayon compris entre 100 et 500 nm. Ces valeurs, supérieures à la taille des agrégats observés dans les mesures au MEB (**Figure 2.4**), s'expliquent par la mauvaise dispersion du noir de carbone dans l'eau qui provoque des agglomérats d'agrégats [29].

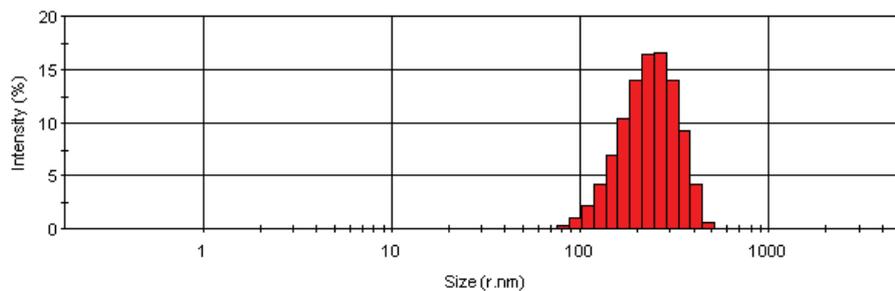


Figure 2.5 – Mesures au Zetasizer[®] des diamètres (hydrodynamiques) des particules de noir de carbone dispersées dans de l'eau distillée.

L'expérience a donc été refaite en ajoutant une goutte de surfactant (savon liquide) dans le mélange eau-noir de carbone. L'ensemble est ensuite passé au vortex pendant quelques secondes. Les résultats, présentés sur la **Figure 2.6**, montrent une distribution de taille différente. Les mesures révèlent des entités inférieures à 100 nm. Celles-ci correspondent à la dissociation d'agrégats plus gros sous l'effet du détergent et du vortex. Ces valeurs sont néanmoins légèrement supérieures à celles observées au MEB. Cela peut s'expliquer notamment par le fait que le Zetasizer[®] mesure le diamètre hydrodynamique des particules. De plus, comme décrit précédemment, la mesure de grosses particules masquant celle des plus petites, l'intensité des pics n'est pas proportionnelle à la concentration en particules. C'est pourquoi la faible augmentation des pics est malgré tout assez significative.

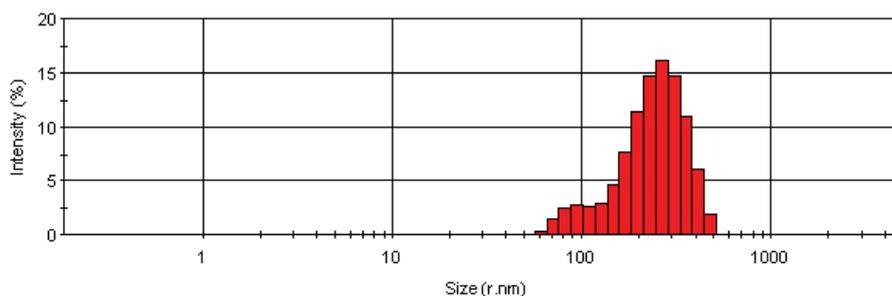


Figure 2.6 – Mesures au Zetasizer[®] des diamètres (hydrodynamiques) des particules de noir de carbone dispersées dans un mélange d'eau distillée et de savon.

La contribution la plus importante à la résistance électrique du noir de carbone est située à l'interface entre les différents agrégats. La taille, la structure et la nature chimique de la surface des particules élémentaires sont ainsi directement responsables de la conductivité électrique [24].

La conductivité du noir de carbone est cependant difficilement mesurable en raison de la faible densité du matériau (entre 0.1 et 0.6), et nécessite de compacter des poudres. Les pressions appliquées et la température influençant grandement la mesure, la conductivité du noir de carbone est très variable et n'est connue que pour des conditions données (typiquement entre 10^{-4} et 10 S/cm pour quelques dizaines de MPa [30]). Réputé pour son excellente conductivité électrique, de l'ordre de 4 S/cm (pour une compacité ou APF⁵ de 0,3), le Vulcain[®] XC-72R est largement utilisé pour le dopage électrique des matériaux.

I.3 Préparation du cPDMS

Lors du mélange du PDMS et du noir de carbone, des forces électrostatiques créent une cohésion entre les agrégats de noir de carbone pour former des agglomérats (1-100 μ m) [25]. L'équilibre entre la dimension et l'espacement de ces agglomérats est primordial pour atteindre la percolation [26,30].

La première étape de la réalisation du mélange consiste en la préparation du PDMS (Sylgard 184, Dow Corning[®]). Ceci s'effectue classiquement par le mélange de ses deux composants à savoir l'élastomère auquel est ajouté 10% en masse de durcisseur. L'ensemble est ensuite placé dans un dessiccateur pendant 40 min. Après dégazage, la masse de PDMS désirée est prélevée et utilisée rapidement pour le mélange. Dans le cas où le mélange ne peut pas être directement effectué, il est préférable de conserver le PDMS au réfrigérateur afin de ralentir sa polymérisation.

Dans un second temps, le noir de carbone est prélevé, pesé et ajouté au PDMS. Cependant, compte tenu des études sur la toxicité des nanoparticules et leur implication potentielle dans les cancers[22], la manipulation de nanopoudres nécessite de nombreuses précautions. L'ensemble du protocole suivant est effectué sous une hotte à extraction et requiert le port de protections adaptées aux nanoparticules (blouse intégrale KleenGuard[®] A20, masque 3M[®] 9332, lunettes et gants).

En raison de la volatilité du noir de carbone et des contraintes dues aux protections, le mélange est très délicat. La quantité désirée (en masse) de nanoparticules est ajoutée progressivement et le mélange manuel est effectué lentement à l'aide d'une spatule métallique. Le dopage est alors exprimé par la relation suivante :

$$dopage = \frac{m(Carbone)}{m(Carbone + PDMS)} \quad (\text{Equation 2.1})$$

Différents mélanges sont ainsi effectués avec des quantités de carbone croissantes jusqu'à atteindre la saturation de la matrice en noir de carbone. Celle-ci est atteinte pour un dopage de l'ordre de 30% conformément à la littérature [8]. Cependant compte tenu de la différence de densité des deux matériaux, cela correspond, en terme de volume, à un rapport d'environ 1:10 (PDMS:Carbone).

La viscosité du matériau augmentant avec le dopage, le matériau alors obtenu est très friable. La structure du cPDMS doit cependant rester compatible avec son utilisation en microsystèmes. Parmi les

⁵Atomic Packing Factor, qui correspond à la fraction d'un volume occupée par les atomes.

différentes concentrations testées, le cPDMS contenant 25% de carbone (en masse) s'est trouvé être le plus adapté à la fabrication des dispositifs microfluidiques. Ce dopage représente le bon compromis entre la mise en forme du matériau et sa conductivité (caractérisée dans la suite du manuscrit).

L'ajout de solvant spécifique comme l'hexane est parfois utilisé afin de fluidifier le PDMS [32]. Cette solution a été ici envisagée dans le but de faciliter le mélange et d'augmenter la concentration maximale de noir de carbone. Cependant si les solvants utilisés (hexane, mésitylène) ont effectivement amélioré le mélange, ils ont provoqué des fissures dans le cPDMS en s'évaporant pendant la polymérisation. Cette possibilité n'a donc pas été retenue.

La texture obtenue pour un mélange à 25% de carbone est néanmoins très différente de celle du PDMS. Le mélange est alors pâteux, très collant, et donc beaucoup plus délicat à manipuler (**Figure 2.7**). Ainsi à la différence du PDMS, le cPDMS, bien trop visqueux pour être étalé à la tournette ou même être versé dans un moule, nécessite d'être étalé à l'aide d'une spatule. C'est cependant cette différence de texture, bien qu'elle ait nécessité une adaptation des techniques de microfabrication, qui a permis la fabrication d'un microsystème à électrodes épaisses.



Figure 2.7 – Photographie d'une préparation de cPDMS dopé à 25%.

La polymérisation du cPDMS nécessite le même protocole de recuit que le PDMS. Il dépend de la température et peut être compris entre 48h à température ambiante et 10min à 150°C. Au laboratoire, le cPDMS est recuit 2h à 75°C.

II. CARACTERISATIONS DU cPDMS

Le cPDMS étant peu caractérisé dans la littérature, ce paragraphe vise à mettre en évidence son potentiel en microfluidique notamment pour ses propriétés électriques.

II.1 Caractérisation électrique du cPDMS

II.1.a Mesures de conductivité en fonction du dopage

Le cPDMS étant majoritairement constitué d'un matériau isolant, sa conductivité électrique dépend directement du dopage en carbone conformément à la théorie de la percolation. Niu et al [8] ont été les

premiers à caractériser cette conductivité électrique qui est de l'ordre de 20 S/m à la concentration utilisée par les auteurs (25% en masse de carbone).

Nous avons donc voulu comparer la conductivité du cPDMS réalisé au laboratoire avec celle obtenue dans la littérature. Conformément à l'article [8], les mesures ont été effectuées sur un film de cPDMS de 200 μm d'épaisseur, par un banc de mesure 4 pointes. Cependant le matériau testé étant particulièrement souple, les pointes peuvent facilement pénétrer dans le cPDMS ce qui n'est plus en adéquation avec le modèle utilisé par l'appareil pour déterminer la conductivité.

Une configuration alternative de mesure a donc été développée. Elle consiste à réaliser des structures de cPDMS de dimensions contrôlées puis de mesurer leur résistance électrique à l'aide d'un ohmmètre. La résistivité du matériau est ensuite facilement déduite par la relation suivante:

$$R = \frac{\rho L}{S} \quad (\text{Equation 2.2})$$

Avec :

R la résistance mesurée (Ω), ρ la résistivité électrique du matériau ($\Omega\cdot\text{m}$), L la longueur de la structure (m), et S la surface de la structure (m^2).

Pour simplifier la fabrication et afin d'effectuer des mesures dans des ordres de grandeurs compatibles avec notre appareillage, le cPDMS est préparé sous forme de cylindres de 5 mm de diamètre et 5 mm d'épaisseur. Pour cela du cPDMS à différents dopages (de 10 à 25 % en masse de carbone) est préparé puis étalé dans un moule formé d'une plaque de PMMA⁶ (de 5 mm d'épaisseur) préalablement percée (\varnothing de 5 mm). Comme présenté sur la **Figure 2.8**, l'ensemble est pris en sandwich entre deux lames de verre (silanisées), puis placé à l'étuve pendant 2h. La polymérisation du matériau sur verre permet d'assurer un état de surface à moindre rugosité. Après avoir enlevé les lames de verre, une couche d'or (50 nm) est déposée (par évaporation) sur chaque face de la plaque. Les cylindres de cPDMS sont ensuite délicatement démoulés avant les mesures de résistance effectuées à l'aide d'un ohmmètre (2000, Keithley[®]).

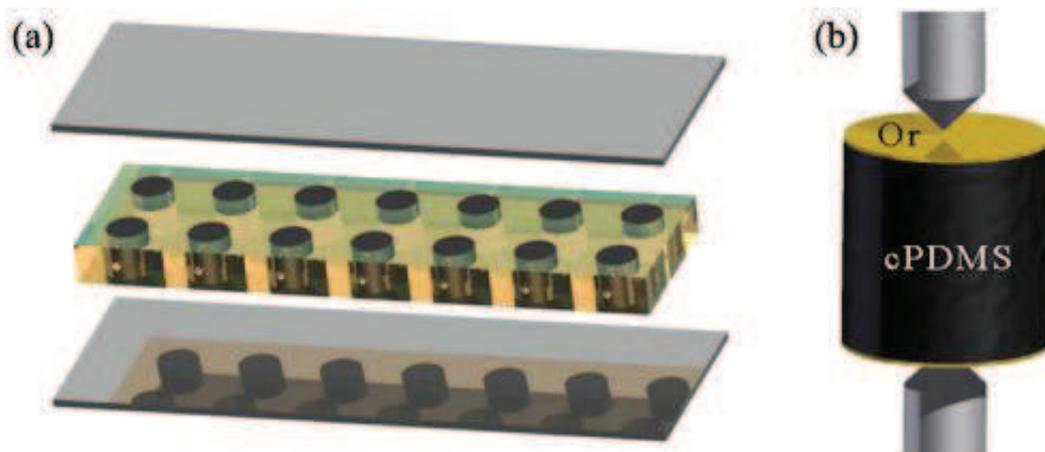


Figure 2.8 – Principe de fabrication des cylindres de cPDMS (a) et de leur mesure de résistance après métallisation (b).

⁶Poly(methyl metacrylate) plus connu sous le nom de Plexiglass[®]

La fine couche surfacique d'or, dont la résistance est négligeable devant celle du cPDMS (la conductivité de l'or étant environ 2 millions de fois supérieure), permet d'homogénéiser le passage du courant dans l'ensemble du volume de cPDMS. Les valeurs sont présentées et comparées aux résultats obtenus par Niu *et al* [8] sur la **Figure 2.9**.

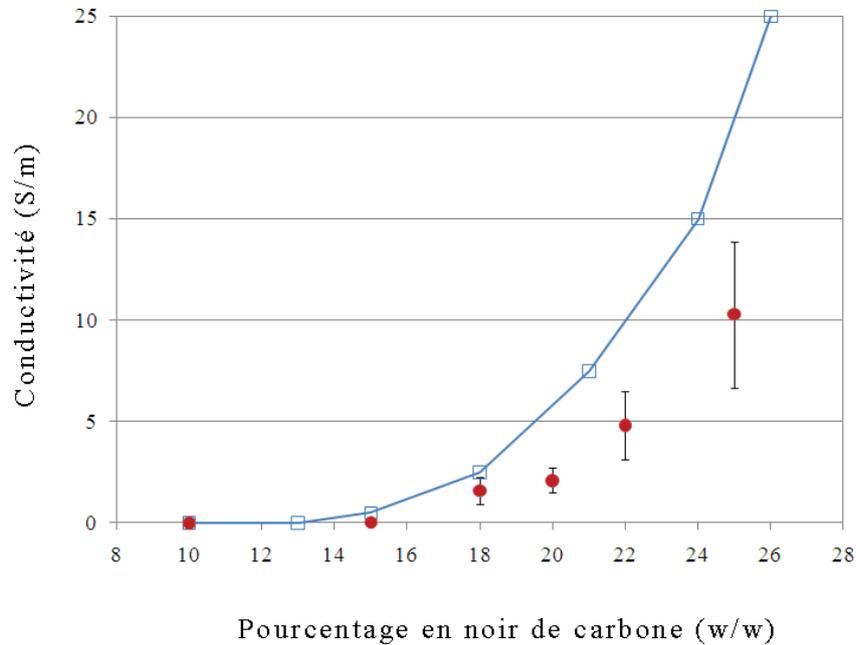


Figure 2.9 – Mesures de conductivité du cPDMS en fonction du dopage effectuées au laboratoire (●) et comparées avec les résultats (□) de l'article de Niu *et al* [8].

Les deux allures sont conformes à la percolation. Cependant, la courbe obtenue expérimentalement au laboratoire présente des valeurs de conductivité en moyenne deux fois plus faibles à même dopage. Une conductivité de l'ordre de 10 S/m contre près de 20 S/m est ainsi obtenue à 25% de carbone. Cette différence de conductivité peut être attribuée à la qualité du mélange, qui, effectué manuellement, peut ne pas être parfaitement homogène. De plus, les barres d'erreur (3 fois la valeur de l'écart type), reflètent la variabilité des mesures, augmentent avec le dopage du matériau. Ceci traduit également d'importantes inhomogénéités entre les différents échantillons et donc au sein du même matériau. Ces écarts de mesure peuvent cependant provenir de la mesure elle-même. En effet, une légère variation de l'épaisseur se répercute directement la mesure de résistance électrique du matériau.

Par ailleurs, la courbe de l'article de Niu *et al* [8], n'est pas réalisée avec la même méthode (4 pointes) et ne présente pas de barres d'erreur. Il est donc délicat d'interpréter cette différence de conductivité. On notera également, qu'à notre connaissance, cet article est le seul à caractériser la conductivité du cPDMS, la base de comparaison est donc limitée.

II.1.b Caractérisation de l'interface cPDMS/Or

L'utilisation de reprises de contact métalliques, servant d'interface entre le matériau nanocomposite et la connectique, est indispensable afin d'appliquer le champ électrique aux électrodes de cPDMS. La caractérisation de ce contact à l'aide d'un analyseur d'impédance est importante pour comprendre le comportement électrique du cPDMS dans le microsystème.

Des mesures d'impédance (HP4194, Hewlett Packard®) ont donc été réalisées afin de caractériser l'interface cPDMS/or et de mettre en évidence d'éventuels phénomènes capacitifs.

Un dispositif est réalisé à cet effet. Il est composé d'une lame de verre sur laquelle des reprises de contact en Cr/Au (50 nm/150 nm) ont été réalisées par lift-off. Du cPDMS à 25% a été alors préparé et déposé sur la lame de verre en prenant soin de recouvrir les reprises de contact comme présenté sur la **Figure 2.10.a**. Enfin, une dernière étape de polymérisation (1h à 75°C) a été effectuée avant la mesure.

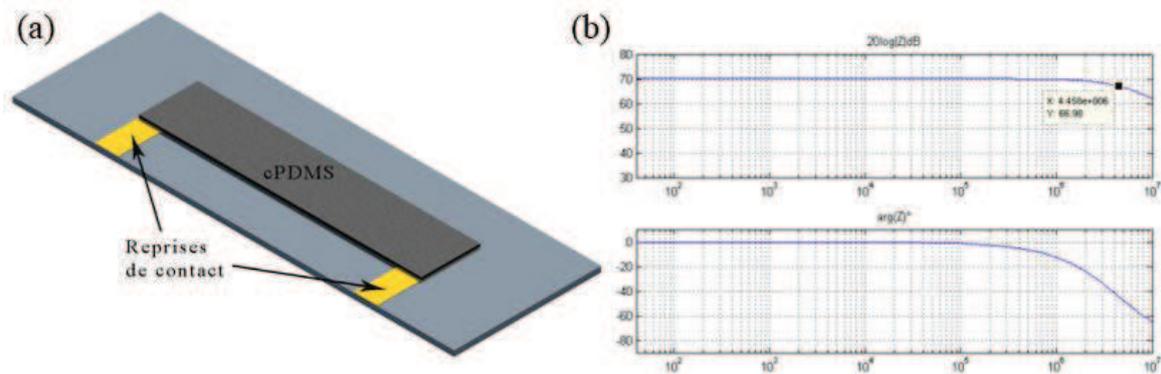


Figure 2.10 – Schéma du principe de mesure d'impédance de l'interface cPDMS/Or (a) et diagramme de Bode associé (b).

La mesure est effectuée entre les deux reprises de contact dans une gamme allant de 40 Hz à 10 MHz. L'impédance électrique est décrite sur le diagramme de Bode [33] (**Figure 2.10.b**).

Les courbes présentent un comportement purement résistif jusqu'à 10⁵ Hz (au delà, les capacités parasites de la connectique peuvent expliquer l'argument non nul mesuré). L'interface cPDMS/or se comporte donc comme une résistance dans la gamme de fréquences de nos applications.

A partir de la résistance mesurée (3174 Ω), de la distance inter électrodes (4,6 cm) et des dimensions du cPDMS (1,2 cm de largeur, 100 μm d'épaisseur), la résistivité du cPDMS peut être retrouvée par le calcul à partir de l'**Equation 2.2**. La conductivité obtenue est alors de 12,1 S/m, ce qui est en accord avec les mesures réalisées avec les plots de cPDMS.

II.2 Dispositif microfluidique en cPDMS et caractérisations

Le premier objectif était de réussir à intégrer des électrodes de cPDMS de part et d'autre d'un canal microfluidique afin de mettre en valeur les avantages du matériau : à savoir le contrôle de l'épaisseur des électrodes et une intégration complète et étanche.

II.2.a Mise au point d'un système microfluidique cPDMS

- Processus de fabrication développé au laboratoire

Basée sur le principe de « soft lithography », la réalisation du microsystème a été effectuée à l'aide d'une technique à double photolithographie spécifiquement développée au laboratoire. Le protocole de fabrication est présenté sur la **Figure 2.11**.

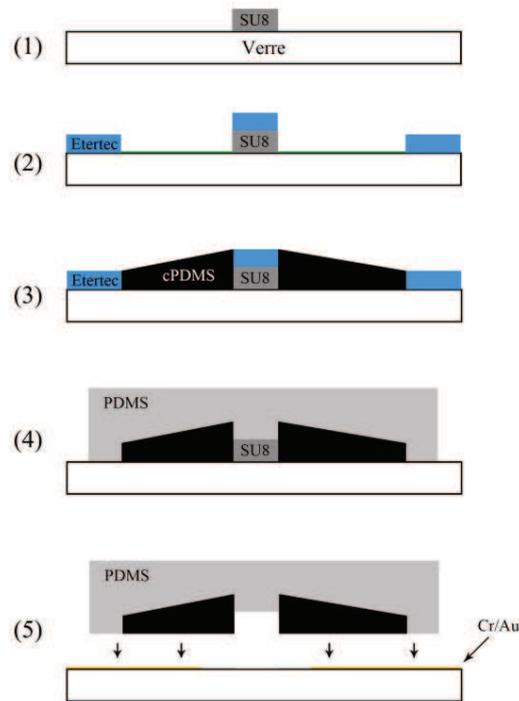


Figure 2.11 – Etapes de fabrication d'un microcanal avec électrodes épaisses en cPDMS.

(1) La première étape consiste à réaliser un moule de 100 μm d'épaisseur et 200 μm de largeur par photolithographie en utilisant la résine SU8-2100 (MicroChem[®]). Pour cela le substrat de verre (lame de 25x75 mm) est d'abord rincé à l'éthanol, séché à l'azote puis nettoyé au plasma O_2 (50 W pendant 2 min). Une épaisseur de 100 μm de résine SU8-2100 est ensuite déposée sur le verre à l'aide d'une tournette (5 s à 500 tr/min puis 30 s à 3000 tr/min). Après recuit (20 min à 65°C et 30 min à 95°C), la résine est insolée sous lampe UV avec un masque en plastique (réalisé avec CléWin[®] et imprimé à 3600 dpi). A la suite du second recuit (5 min à 65°C et 15 min à 95°C), les parties non insolées sont développées (Propylène Glycol Methyl Ether Acetate, 10-15 min). Les lames sont ensuite rincées à l'isopropanol puis séchées à l'azote.

(2) Un second masquage est alors réalisé à l'aide d'une autre résine photosensible (Laminar Etertec[®], épaisseur 50 μm). Sous forme de film, cette résine sèche (négative) est manuellement laminée directement sur les lames (lithographiées dans l'étape 1). L'insolation est effectuée sous lampe UV avec alignement entre le canal de SU8 existant et le second masque avant le premier recuit (20 s à 105°C). Les parties non insolées sont ensuite développées (carbonate de calcium 10 g/L, 10 min). Après rinçage à l'eau distillée et séchage à l'azote, un dernier recuit (20 s, 105°C) est effectué afin de sécher complètement les lames. L'ensemble est alors silanisé (Octadecyltrichlorosilane) sous vide pendant 2h. Il est important de noter que cette double lithographie n'est possible que parce que le processus de mise en forme de la résine sèche utilise une solution de développement et de « stripping » compatible avec la SU8.

(3) Le cPDMS est alors préparé à 25% de carbone comme décrit précédemment puis étalé sur le moule. Ainsi en plus de structurer les électrodes, la résine sèche permet d'empêcher la présence de cPDMS sur le canal de SU8 et ainsi d'éviter tout court-circuit entre les deux électrodes. Cette seconde

lithographie permet donc de localiser précisément et de faciliter le dépôt de cPDMS. Le moule couvert de cPDMS est placé à l'étuve (1h, 75°C) pour accélérer sa polymérisation.

(4) L'ensemble est ensuite placé quelques minutes dans un bain d'acétone qui permet d'éliminer la résine sèche sans abîmer la résine SU8. Après rinçage à l'éthanol, puis séchage à l'azote, le tout est recouvert de PDMS non polymérisé puis placé à l'étuve (2h, 75°C). Caractérisée dans la suite de ce chapitre, l'adhésion entre le PDMS et le cPDMS est bonne même si les polymérisations respectives de chacun des deux matériaux ne sont pas effectuées simultanément.

(5) Le démoulage est effectué manuellement avec précautions. Cette étape délicate est néanmoins facilitée par la silanisation effectuée lors de l'étape 2.

Au final, dans ce procédé, l'épaisseur des électrodes de cPDMS dépend exclusivement de celle du canal en SU8. Celui-ci pouvant être modulé pour des épaisseurs entre 1 et 300 μm , le procédé de fabrication peut potentiellement s'adapter à la majorité des systèmes microfluidiques simples.

- Observation du microcanal

La rugosité et la définition du canal ont été observées par MEB. Les images sont présentées sur la **Figure 2.12**. Les canaux étant constitués de parties conductrices et de parties isolantes, un dépôt de quelques nanomètres d'or à la surface de l'échantillon (par évaporation) a été nécessaire pour faciliter les observations.

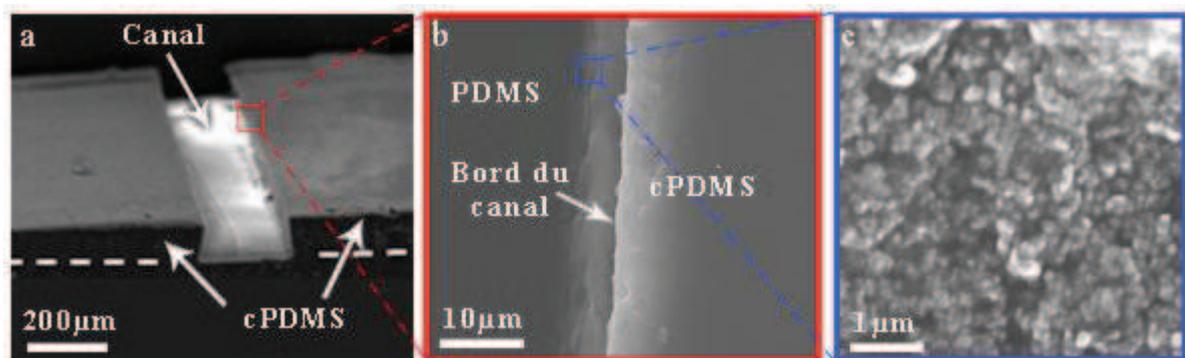


Figure 2.12 – Photographies MEB du microcanal dans son ensemble (a), de dessus (b) et de la paroi des électrodes de cPDMS au grossissement $\times 15000$ (c)

La photographie (a) présente une vue transversale du microcanal (retourné). Sa section apparaît légèrement trapézoïdale ce qui peut être observé pour des lithographies sur résine négative de type SU8 [34]. L'image (b) est centrée sur la paroi du canal observé de dessus. Celle-ci se révèle légèrement rugueuse et présente des aspérités de l'ordre du micromètre sur quasiment toute son épaisseur. Ceci peut s'expliquer par la polymérisation du cPDMS effectuée directement sur la tranche du canal en SU8. Les lithographies ayant été réalisées à partir d'un masque en plastique, la résolution du canal peut difficilement descendre en dessous de 10 μm . La rugosité du moule peut être responsable de ces aspérités. La photographie (c) a été effectuée en inclinant le canal à grossissement $\times 15000$. Elle permet d'observer plus précisément la paroi interne du canal constituée de cPDMS. On observe une grande densité d'agrégats de carbone affleurant la surface.

Ces observations ont ainsi pu mettre en évidence :

- que l'état de surface du moule en résine semble directement responsable des aspérités de tailles micrométriques retrouvées sur le cPDMS, ceci rendant l'étape de lithographie critique pour la définition du canal.
- la présence d'agrégats de noir de carbone conducteur directement à fleur de canal.

▪ Collage du canal

Deux trous cylindriques sont ensuite réalisés, à chaque extrémité du canal, en perçant le PDMS sur toute son épaisseur à l'aide d'un poinçon (Harris Unicore®). Ces entrées-sorties fluidiques permettront après le collage l'insertion de capillaires et donc l'entrée des liquides dans le microcanal.

La dernière étape de la fabrication du microsystème consiste à refermer le canal de PDMS/cPDMS par collage plasma sur une lame de verre. Ce type de collage, largement utilisé en microfluidique, assure l'étanchéité entre le PDMS et le verre de manière irréversible. Cependant, afin de permettre la reprise de contact du cPDMS, la lame de verre nécessite des reprises de contact (50 nm Cr/200 nm Au) préalablement réalisées par lift-off. Les électrodes Cr/Au permettent en effet, après soudure à l'étain, de connecter le microsystème à toute l'électronique nécessaire pour l'application des champs électriques dans le canal (**Figure 2.13**).

Le bloc de PDMS/cPDMS et la lame de verre sont donc traités au plasma oxygène (50 W, 2,5 min), rapidement mis en contact avec alignement (à l'aide d'une goutte d'éthanol permettant de retarder le collage) puis laissés quelques minutes à l'étuve (75°C).

▪ Finitions

Après collage, un certain nombre de finitions sont encore indispensables. Tout d'abord, afin de permettre les entrées et sorties de liquides dans le microcanal, des tubes de polyéthylène (Smiths®) sont insérés dans les trous réalisés avant le collage. Du silicone (JS533, Loctite®) permet d'assurer l'étanchéité entre le PDMS et les tubes. Enfin des fils électriques sont soudés à faible température (~250°C) sur les reprises de contact en or. Le dispositif final est présenté sur la **Figure 2.13**.

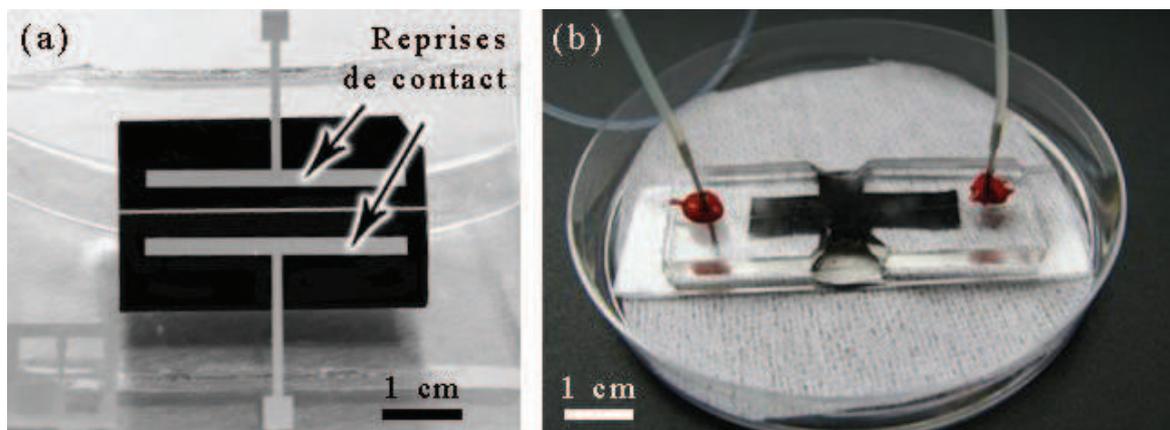


Figure 2.13 – Photographies (a) de la face arrière du dispositif mettant en évidence les reprises de contact, (b) et de l'ensemble du microsystème.

II.2.b Évaluation de l'adhésion PDMS/cPDMS

Le cPDMS étant formé en majorité de PDMS (dans notre cas à 75% en masse), l'évaluation de sa capacité à adhérer au PDMS non dopé était donc importante. Des objets bi-composants ont été réalisés afin d'évaluer cette adhérence par des mesures d'étirement. Ces objets sont fabriqués en deux étapes. La partie cPDMS est d'abord réalisée en étalant le matériau dans la première moitié du moule. La seconde partie du moule est ensuite remplie de PDMS. Après polymérisation (2 h, 75°C), l'ensemble est démoulé puis découpé en lamelles de différentes épaisseurs. Chaque tranche est alors étirée à la main comme présenté sur la **Figure 2.14**. Sur la quinzaine d'essais effectués, le plan de rupture ne s'est jamais trouvé à l'interface PDMS-cPDMS. Les liaisons créées entre les deux polymères pendant la polymérisation sont donc fortes et irréversibles malgré la présence des nanoparticules.

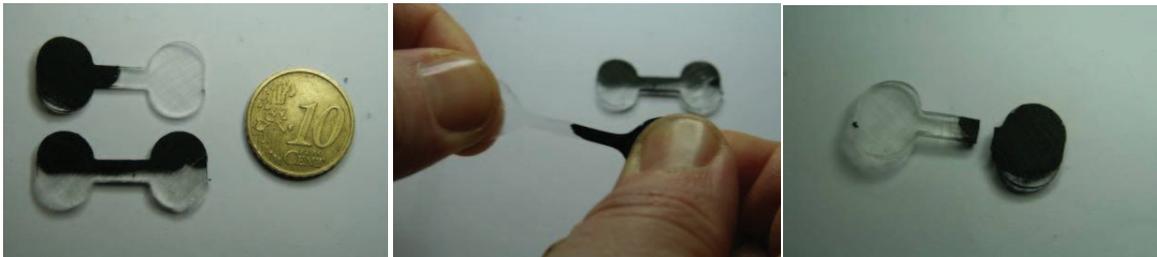


Figure 2.14 – Principe de la mesure d'étirement manuel des bi-composants PDMS/cPDMS.

II.2.c Chimie de surface du cPDMS

Dans les systèmes microfluidiques envisagés, la surface des électrodes de cPDMS doit être directement en contact avec les fluides. Il est donc intéressant d'évaluer les modifications physico-chimiques de surface apportées par le dopage. Des mesures d'angle de contact permettent de renseigner sur l'hydrophobicité du matériau, c'est-à-dire la capacité des groupements de surface à interagir avec les molécules d'eau [35].

- Mesures d'angle de contact

Présentée sur la **Figure 2.15**, l'expérience consiste à déposer une goutte d'eau (1 μ L) sur la surface à analyser. Selon les propriétés chimiques de surface du matériau, la goutte doit plus ou moins s'étaler. L'angle formé entre la surface du matériau et la tangente à la goutte au point d'interface est alors mesuré. Plus l'angle est grand, plus la surface est hydrophobe.

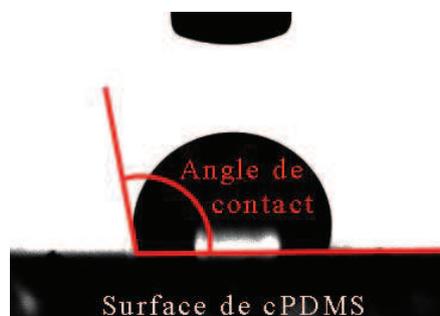


Figure 2.15 – Principe de la mesure d'angle de contact. Une goutte d'eau d'1 μ L est déposée à la surface du matériau, ici du cPDMS. L'angle formé (~100°) est caractéristique d'une surface hydrophobe.

Des mesures d'angles de contact sont effectuées pour comparer les surfaces de PDMS et de cPDMS (25% de carbone). Cependant, la rugosité de surface ayant une forte influence sur la mesure [35], les surfaces à analyser doivent être préparées de manière à être les plus planes possibles. Chaque matériau est donc étalé sur une lame de verre préalablement silanisée (OTS), la polymérisation sur ce substrat traité permettant d'assurer une faible rugosité tout en facilitant le démoulage. Les mesures, répétées une trentaine de fois sur différents endroits du matériau, donnent conformément à la littérature (entre 90 et 120° [36]), un angle de contact de **93,3°** ($\pm 5,3^\circ$) pour le PDMS. L'angle passe à **103,1°** ($\pm 5,5^\circ$) pour le cPDMS. Cette différence d'angle de contact (de l'ordre de 10%) provient donc de la présence de carbone. Ce phénomène peut s'expliquer de deux manières. Il est d'abord possible que les particules de carbone, présentes en surface sous forme d'agglomérats, augmentent la rugosité de surface et donc son hydrophobicité. Mais cet effet peut également provenir de l'apport en surface de groupements chimiques hydrophobes provenant du noir de carbone.

De nombreux travaux présentent l'effet du plasma oxygène sur les propriétés physico-chimiques d'un matériau. Ces modifications apportées par ce traitement peuvent être chimiques, comme par exemple la réduction de son hydrophobicité par la substitution de groupements oxygénés (cétones, carboxylates, hydroxyles, éther-oxydes...) à sa surface [37]. Le phénomène, présenté sur la **Figure 2.2**, permet notamment de remplacer les groupements méthyles de surface du PDMS par des silanols, des groupements polaires rendant la surface hydrophile. Mais le traitement peut également induire des modifications physiques puisqu'on l'utilise couramment pour le décapage des impuretés adsorbées à la surface d'échantillons avant leur utilisation. L'oxydation peut également provoquer l'augmentation de la rugosité de surface de nombreux matériaux, par exemple sur les polymères amorphes [38].

Pour comprendre ces phénomènes, il est nécessaire d'appréhender brièvement le principe général de cette technique. Les échantillons sont placés sous vide dans un bâti de gravure ionique réactive (Reactive Ion Etching, RIE). Du gaz (ici du dioxygène) est alors injecté dans la chambre avec un certain débit compensé par le pompage. Cet apport contrôlé en oxygène assure ainsi le renouvellement constant du gaz. Le plasma est ensuite activé dans la chambre par l'application d'un champ électromagnétique à haute fréquence d'une puissance comprise entre 50 et 200 Watts. Sous l'effet de ce champ, le gaz se transforme en plasma, soit un mélange d'ions et de radicaux oxygénés très réactifs. Selon leur charge, ces molécules vont être instantanément dirigées vers l'une ou l'autre des électrodes, ce qui empêche leur recombinaison. Les échantillons placés sur l'anode sont ainsi notamment bombardés par des anions radicalaires (ici des anions superoxydes O_2^\ominus).

Les modifications de la composition chimique de surface sont alors directement dues à ces radicaux qui réagissent (non spécifiquement) avec des groupements de la surface. Ceci conduit à la formation de composés oxygénés. Plus les radicaux arrivent avec une forte énergie sur la surface, plus le plasma va induire des modifications « physiques » en détruisant progressivement des groupements chimiques à la surface. Ce mode de gravure est d'ailleurs le rôle initial de ce type de bâti.

Le contrôle des paramètres du plasma joue donc un rôle décisif sur les modifications de la surface. Ainsi, si l'on cherche à favoriser la modification chimique de la surface, le traitement doit être effectué avec une forte quantité d'oxygène mais à faible puissance. Ceci permet de générer de nombreux radicaux mais pas trop destructeurs, qui conduisent à la formation de composés oxygénés en surface sans trop la détruire.

Inversement, si l'on cherche un traitement plus physique, c'est la puissance et la durée du traitement qu'il faut augmenter. Schématiquement, on peut dire que si les radicaux arrivent à la surface avec une plus grande énergie, ils auront tendance à détruire les groupements chimiques plutôt qu'à les modifier

Afin d'évaluer l'influence du traitement plasma sur la chimie de surface du cPDMS, quelques échantillons sont traités au plasma oxygène (50 W) pendant différentes durées. Chaque échantillon est ensuite immédiatement placé dans l'eau, afin de conserver l'effet du traitement plasma jusqu'aux mesures d'angles de contact, qui pour des raisons pratiques ont été effectuées 24h après. Les résultats comparant le cPDMS et le PDMS sont présentés sur la **Figure 2.16**. On notera que chaque point de la courbe est une moyenne effectuée sur plus d'une trentaine de mesures.

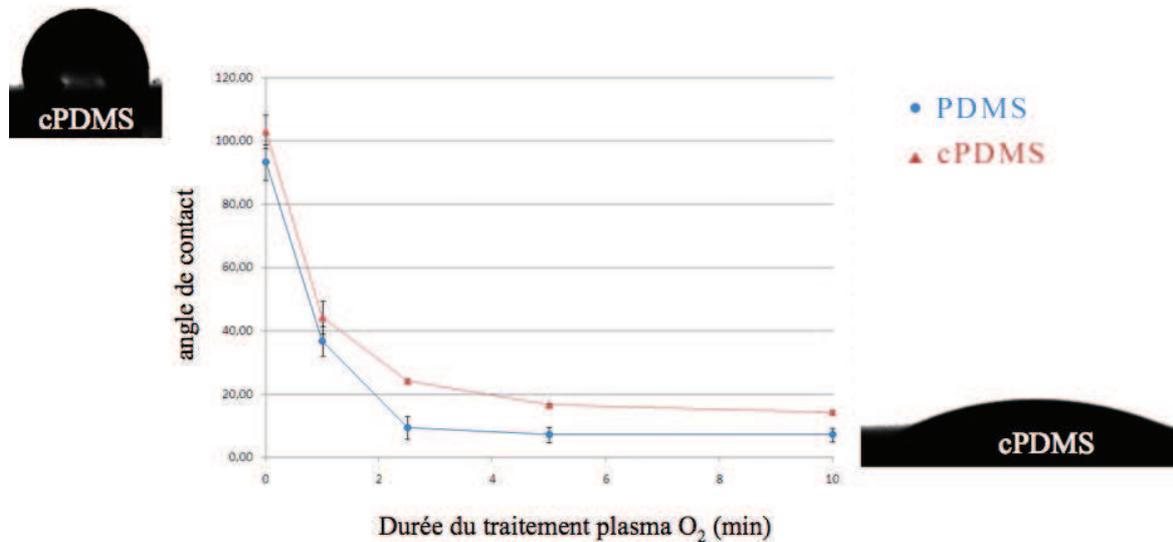


Figure 2.16 – Mesures d'angles de contact sur PDMS (●) et cPDMS (▲) à différentes durées de traitements plasma oxygène (1, 2.5, 5 et 10 min). 50 W, + 200mTorr O₂.

L'hydrophobicité du PDMS diminue ici rapidement avec le traitement plasma conformément à la littérature [39]. Dès la première minute de traitement, l'angle de contact diminue de près de 60 %. A partir de 2,5 min de traitement, un plateau est observé. Ce seuil reflète le remplacement, probablement total, des groupements méthyles de surface par les silanols. La surface du matériau est alors tellement hydrophile que la goutte s'étale complètement et l'angle n'est quasiment plus mesurable.

Le cPDMS présente un comportement identique et semble donc être bien influencé par le traitement plasma. De manière analogue au PDMS, l'hydrophobicité diminue rapidement pour finalement atteindre un plateau. Les valeurs d'angle de contact sont cependant toujours légèrement supérieures à celles obtenues pour le PDMS. Cette différence, de l'ordre de 10%, n'est visiblement pas influencée par le traitement plasma.

Le cPDMS étant plus hydrophobe que le PDMS, l'effet apporté par l'ajout de carbone n'est apparemment pas modifié par le plasma oxygène. Or, si ce phénomène provenait de la rugosité du cPDMS, l'effet devrait s'inverser après le traitement plasma. En effet, des travaux ont démontré le parallèle entre la rugosité et l'hydrophobicité d'un matériau [36,37]. Ainsi, pour un même matériau hydrophobe, la surface la plus rugueuse sera la plus hydrophobe puisqu'elle comporte un plus grand nombre de groupements chimiques hydrophobes en contact avec la solution. Mais inversement, si ces surfaces sont rendues hydrophiles par un traitement chimique, c'est la surface la plus rugueuse qui sera la plus hydrophile puisqu'elle comporte le plus de groupements chimiques hydrophiles. C'est à dire

que la rugosité accentue l'effet du traitement de surface [38,39]. Or dans nos mesures, le cPDMS étant plus hydrophobe que le PDMS, cette différence ne peut pas être uniquement due à une éventuelle rugosité apportée par des agglomérats de carbone [44].

On notera que ce comportement du cPDMS après traitement au plasma oxygène permet d'expliquer l'efficacité des collages plasma effectués entre le cPDMS et le verre. Par ailleurs, des essais de collage entre deux morceaux de cPDMS et entre cPDMS et PDMS ont également été réalisés avec succès.

- Evaluation de l'état de surface du cPDMS par microscopie électronique à balayage

Il est néanmoins intéressant d'évaluer la rugosité du cPDMS. Des échantillons (non métallisés) de cPDMS non traités et traités au plasma oxygène (5 min, à 50 W) ont donc été observés au MEB. Deux images à grossissement x25000 sont présentées sur la **Figure 2.17**.

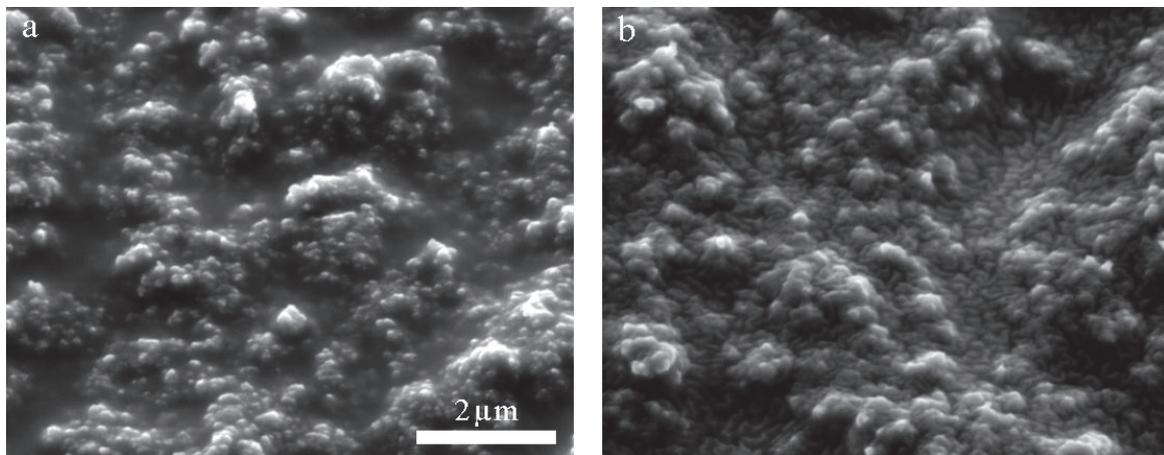


Figure 2.17 – Images MEB de l'état de surface d'échantillons de cPDMS non traité (a) et traité au plasma oxygène (5 min, 50 W, +200 mTorr O_2) (b). Grossissement 25000x.

On retrouve ici les agrégats de carbone à la surface du cPDMS non dopé (a). Conducteurs, donc bien visibles, ils présentent des dimensions de l'ordre de la centaine de nm ce qui reste cohérent avec les mesures effectuées sur noir de carbone seul (**Figure 2.4**). Cependant, la surface non traitée révèle également des zones non conductrices qui se chargent (surbrillances) sous l'effet du faisceau d'électrons et rendent floue une partie de l'image.

La surface de cPDMS traitée au plasma (b) présente quant à elle moins de zones de surbrillances et de flou et nous pouvons donc estimer que la surface est globalement plus conductrice après traitement plasma. Le traitement au plasma semble avoir gravé les parties isolantes et permis de mettre à jour de nouvelles zones conductrices.

La littérature est riche d'exemples de l'influence du plasma oxygène sur la modification de la chimie de surface des polymères [45]. Cependant ce traitement peut également agir physiquement sur la rugosité de matériaux. Les travaux de Cvelbar *et al* [46], effectués sur un composite de Poly(p-phénylène sulfide) et de graphite, démontrent que l'oxydation au plasma dégrade à la fois le polymère et le graphite en désorbant des composés tels que le CO, CO₂, HO... Les auteurs précisent cependant que dans leur cas, la gravure du graphite étant plus lente que celle du polymère, le prolongement de l'oxydation tend à augmenter la rugosité de la surface. Néanmoins, cette gravure du polymère

entraînant progressivement le détachement de particules de carbone, la rugosité est limitée par la taille des agrégats du dopant. Ce phénomène est présenté sur la **Figure 2.18**.

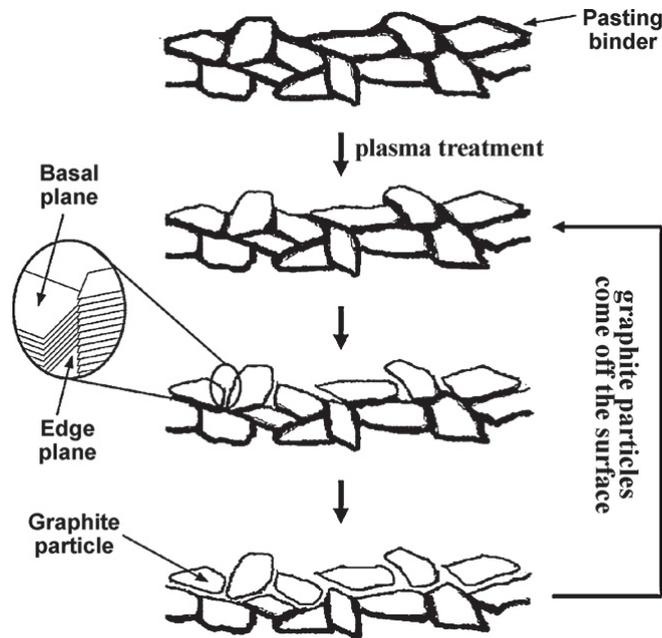


Figure 2.18 – Schéma du mécanisme supposé de la modification de la surface SPCE après traitement au plasma oxygène. Tiré de [44]

Dans notre cas et au vu des images MEB, la rugosité du cPDMS ne semble cependant pas avoir particulièrement augmenté à la suite du traitement plasma. Il est cependant très délicat de conclure sur cet effet à partir de ces images et une étude plus approfondie de l'évolution de la rugosité de la surface (par exemple par AFM) pour différents paramètres de traitement apporterait des informations complémentaires.

- Hypothèse sur la différence d'hydrophobicité entre le cPDMS et le PDMS

Les mesures d'angles de contact indiquent que le cPDMS présente une surface toujours légèrement plus hydrophobe que celle du PDMS (d'environ 10°) quelle que soit la durée du traitement au plasma oxygène. Cet effet ne peut pas provenir de la rugosité du cPDMS puisque le matériau devrait, à l'inverse, être plus hydrophile que le PDMS après le traitement plasma. Ceci est d'ailleurs confirmé par les observations MEB qui ne révèlent pas de modification majeure de la rugosité du matériau après traitement au plasma.

Cette différence d'hydrophobicité entre PDMS et cPDMS doit donc probablement être le reflet de la présence de groupements chimiques apportés par le noir de carbone. Le Vulcain XC-72R est composé à 99,5 % de carbone et 0,5 % de soufre [24]. La grande majorité des groupements chimiques présents dans le noir de carbone sont très hydrophobes, comme les alcènes ou les alcanes, mais se modifient sous l'action du plasma [47]. Le noir de carbone devient ainsi hydrophile après traitement [37]. Des composés organo-sulfurés peuvent cependant se trouver en surface et être donc responsables de ce comportement. Des mesures par spectroscopie Raman du XC-72R [24] ont notamment permis de mettre en évidence que près des $\frac{3}{4}$ de ces composés sulfurés présentent une liaison thioéther (R-S-R'). Ce type de liaison peut être oxydé en sulfoxyde et former ainsi des composés hydrophobes. Des études complémentaires par spectroscopie Raman ou XPS (X-ray Photoelectron Spectroscopy) permettraient

certainement d'identifier les groupements polaires et apolaires présents en surface avant et après oxydation au plasma.

II.2.d Evaluation de la cohésion du cPDMS : perte de carbone

Les électrodes d'or sont les plus utilisées en microsystème. Réalisées par évaporation, elles nécessitent une couche d'accroche, typiquement en chrome, pour adhérer au substrat. Cependant, si des potentiels trop élevés sont appliqués à ce type d'électrode, celles-ci peuvent rapidement se dégrader, voir se détacher dans la solution. Ce phénomène se produit notamment lors de l'électrolyse de l'eau [48].

Il est important de pouvoir s'assurer que le composite ne se dégrade pas pendant son utilisation. Nous avons étudié la cohésion, soit la tenue mécanique, du matériau sous différents champs électriques. Des mesures électrochimiques ont été réalisées dans un microsystème incorporant des électrodes en cPDMS (présenté précédemment **Figure 2.13**) à l'aide d'un potentiostat (développé au laboratoire). Une configuration à deux électrodes a été utilisée. Celles-ci sont raccordées, via les reprises de contact en or, aux deux électrodes épaisses de cPDMS (100 μm d'épaisseur, 1 cm de longueur) séparées d'un microcanal de 200 μm de largeur rempli avec de l'eau distillée.

La différence de potentiel appliquée aux bornes des électrodes est alors progressivement augmentée (à 50 mV/s) jusqu'à 2,5V. Le courant associé est mesuré à l'aide du potentiostat. Il est le reflet des réactions électrochimiques se produisant dans la solution analysée en fonction des potentiels appliqués. Les résultats sont présentés sur la **Figure 2.19**.

Nous observons une courbe $I(V)$ ayant un comportement classique pour une cellule électrochimique. Le courant est relativement faible entre 500 mV et 1500 mV, correspondant globalement à un courant capacitif. A partir de 1500 mV le courant augmente en raison de l'oxydoréduction du solvant. La solution étant composée d'eau, il s'agit ici du phénomène d'électrolyse de l'eau. Plus le potentiel augmente, plus la réaction est favorisée, ce qui conduit rapidement à l'apparition de bulles (H_2 et O_2) dans le canal. La même expérience conduite avec des électrodes d'or conduisant à leur détérioration, l'étude de la cohésion du nanocomposite sous différents champs électriques a été réalisée.

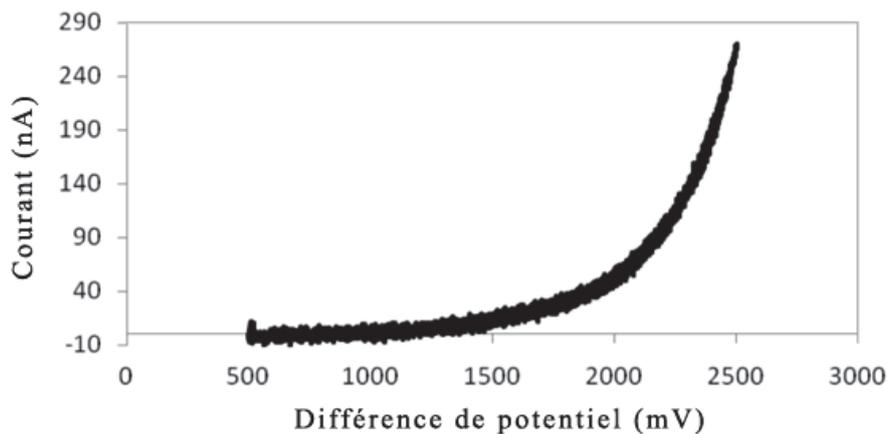


Figure 2.19 - Détermination du seuil d'électrolyse par caractérisation $I(V)$ (50mV/sec). La différence de potentiels est appliquée entre deux électrodes de cPDMS en présence d'eau désionisée dans le microcanal.

De l'eau pure est injectée par l'une des entrées du canal (avec électrodes de cPDMS), récupérée puis analysée à sa sortie à l'aide du Zetasizer[®], un appareillage déjà présenté dans le paragraphe précédent. Le principe de la mesure est représenté **Figure 2.20**.

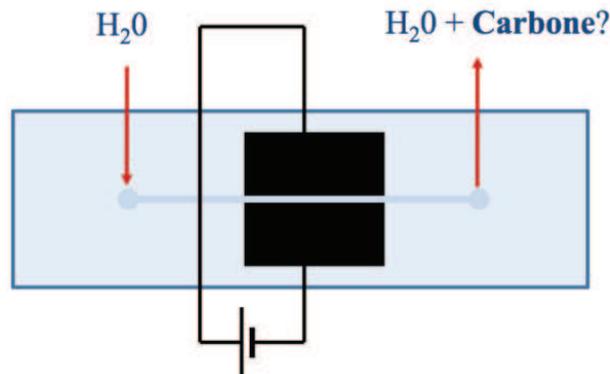


Figure 2.20 – Principe de la mesure d'évaluation du détachement de particules de carbone. L'eau injectée est récupérée et analysée au Zetasizer pour vérifier l'absence de particules de carbone.

Des expériences témoins sont effectuées avant les mesures: témoin positif (eau/noir de carbone, déjà réalisé dans le paragraphe précédent), et témoin négatif (eau seule). Le Zetasizer est théoriquement capable de détecter des particules en solution dans des dimensions comprises entre 5 μm et 1 nm. La limite de concentration n'est cependant pas précisée.

La gamme de conditions testées prend en compte différents débits appliqués par un contrôleur d'écoulement (MFCS, Fluigent[®]) mais surtout différents protocoles électriques imposés (pendant le passage de l'eau) dans des gammes de champs électriques et de différences de potentiel qui seront classiquement utilisés dans nos microsystèmes. Le contrôle électrique est assuré par un générateur (33250E, Agilent[®]) associé à un amplificateur (HSA4011, NF Corporation[®]), l'ensemble est piloté via une interface Labview[®] développée au laboratoire Ampère, et contrôlé par un oscilloscope (DSO6034A, Agilent[®]). Le **Tableau 2.1** décrit une partie des différents protocoles testés qui sont notamment choisis en fonction des types d'applications visées. Ainsi, l'utilisation de régime continu est intéressante pour des mesures électrochimiques (de type voltammétrie cyclique), tandis que le régime alternatif est utilisé, par exemple, pour la manipulation de particules par diélectrophorèse. Pour chaque mesure, les champs électriques sont appliqués pendant quelques minutes, soit le temps suffisant pour récupérer 500 μL (soit le volume minimal nécessaire à la mesure au Zetasizer).

Champ électrique (V/m)		Formation de bulles	Détection de particules
DC	$2,5 \cdot 10^4$	Non	Non
	$5 \cdot 10^4$	Non	Non
	$10 \cdot 10^4$	Non	Non
	$20 \cdot 10^4$	Oui	Non
	$30 \cdot 10^4$	Oui	Non
	$40 \cdot 10^4$	Oui	Non
AC 300kHz	$5 \cdot 10^4$	Non	Non
	$10 \cdot 10^4$	Non	Non
	$20 \cdot 10^4$	Non	Non
	$30 \cdot 10^4$	Non	Non

Tableau 2.1 – Exemples de protocoles électriques appliqués et détection de particules associée (liste non exhaustive). Expériences réalisées sur microsystèmes de 200 et 600 μm de largeur.

D'après les mesures effectuées à l'aide du Zetasizer[®], aucun détachement de particules de carbone n'a été détecté quels que soient les protocoles électriques appliqués. Compte tenu de la sensibilité et de la limite de résolution de l'appareil [28], on peut admettre que s'il y a détachement de carbone, celui-ci n'est pas significatif. Ceci est d'ailleurs particulièrement intéressant dans le cas où les protocoles électriques ont conduit à l'électrolyse de l'eau. Ainsi contrairement aux électrodes d'or, l'électrolyse apparaît ici sans conséquence pour les électrodes de cPDMS. L'expérience peut être réitérée plusieurs fois sans détériorer les parois du cPDMS ni modifier les paramètres d'électrolyse. C'est pourquoi la robustesse des électrodes vis-à-vis des champs électriques, particulièrement importante en microfluidique, se présente ici comme un atout majeur du cPDMS.

Conclusion du chapitre

Formé à partir d'une matrice de PDMS, le cPDMS est un matériau compatible avec des procédés largement utilisés en microfluidique tels que la soft-lithographie. Son intégration en microcanal sous la forme d'électrode a néanmoins nécessité la mise au point d'un procédé de microfabrication spécifique lui permettant d'être structuré dans une large gamme d'épaisseurs et de géométries.

Conducteur (σ de l'ordre de 10 S/m), très robuste (notamment à l'électrolyse), compatible avec le collage plasma, le cPDMS présente donc des avantages certains pour une intégration étanche d'électrodes épaisses en canaux microfluidiques.

De plus, le carbone et le PDMS étant biocompatibles et chimiquement stables, le cPDMS peut présenter un intérêt dans un large éventail d'applications telles que la détection électrochimique d'espèces en solution ou encore la manipulation sans contact de cellules, deux domaines où l'utilisation d'électrodes épaisses peut se révéler avantageuse [48,49]

Comme présenté dans ce chapitre, les propriétés physico-chimiques (hydrophobicité, surface active) de surface du cPDMS peuvent être modifiées par un traitement au plasma oxygène. Les phénomènes physico-chimiques mis en jeu ne sont cependant pas encore clairement identifiés.

Il est connu dans la littérature que certaines espèces électroactives ont des signatures électrochimiques qui sont particulièrement sensibles à l'état de surface de l'électrode sur laquelle a lieu leur réaction. Ainsi, le chapitre suivant correspondant à une étude du comportement électrochimique des électrodes de cPDMS apporte quelques éléments de réponse quant aux modifications induites par le traitement plasma. L'intérêt du matériau pour l'analyse d'espèces électroactives sera évalué par la même occasion.

Références bibliographiques

- [1] J. Koo, *Polymer Nanocomposites - Processing, Characterization, and Applications*. 2006.
- [2] S. Uchida, A. Martinez, Y.-W. Song, T. Ishigure, and S. Yamashita, "Carbon nanotube-doped polymer optical fiber," *Optics Letters*, vol. 34, no. 20, p. 3077, Oct. 2009.
- [3] J. G. Smith, K. A. Watson, D. M. Delozier, and J. W. Connell, "Carbon nanotube-conductive additive-space durable polymer nanocomposite films for electrostatic charge dissipation," *Polymer*, vol. 45, no. 18, pp. 6133-6142, 2004.
- [4] S. Kirkpatrick, "Percolation and Conduction," *Reviews of Modern Physics*, vol. 45, no. 4, pp. 574-588, 1973.
- [5] R. K. Gupta, E. Kennel, and K.-J. Kim, *Polymer Nanocomposites Handbook*. CRC Press Inc, 2008, pp. 463-482.
- [6] S. Shang, W. Zeng, and X.-ming Tao, "High stretchable MWNTs/polyurethane conductive nanocomposites," *Journal of Materials Chemistry*, vol. 21, no. 20, p. 7274, Apr. 2011.
- [7] A. Khosla and B. L. Gray, "Photopatternable Electrical Conductive Ag- SU-8 Nanocomposite for MEMS/MST," *ECS Transactions*, vol. 33, no. 8, pp. 313-318, 2010.
- [8] X. Z. Niu, S. L. Peng, L. Y. Liu, W. J. Wen, and P. Sheng, "Characterizing and Patterning of PDMS-Based Conducting Composites," *Advanced Materials*, vol. 19, no. 18, pp. 2682-2686, Sep. 2007.
- [9] C.-L. Wu, H.-C. Lin, J.-S. Hsu, M.-C. Yip, and W. Fang, "Static and dynamic mechanical properties of polydimethylsiloxane/carbon nanotube nanocomposites," *Thin Solid Films*, vol. 517, no. 17, pp. 4895-4901, Jul. 2009.
- [10] A. Massaro, F. Spano, R. Cingolani, and A. Athanassiou, "Experimental Optical Characterization and Polymeric Layouts of Gold PDMS Nanocomposite Sensor for Liquid Detection," *IEEE Sensors Journal*, no. 99, pp. 1-1, 2011.
- [11] E. M. James, *Polymer Data Handbook (2nd Edition)*. 1999.
- [12] J. M. K. Ng, I. Gitlin, A. D. Stroock, and G. M. Whitesides, "Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems.," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 20, pp. 3461-3473, 2002.
- [13] Y. Xia and G. M. Whitesides, "Soft Lithography," *Annual Review of Materials Science*, vol. 28, no. 1, pp. 153-184, Aug. 1998.

- [14] J. C. McDonald and G. M. Whitesides, "Poly(dimethylsiloxane) as a Material for Fabricating Microfluidic Devices," *Accounts of Chemical Research*, vol. 35, no. 7, pp. 491-499, Jul. 2002.
- [15] M. Morra, "On the aging of oxygen plasma-treated polydimethylsiloxane surfaces," *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 137, no. 1, pp. 11-24, Jun. 1990.
- [16] H. Hillborg, "Crosslinked polydimethylsiloxane exposed to oxygen plasma studied by neutron reflectometry and other surface specific techniques," *Polymer*, vol. 41, no. 18, pp. 6851-6863, Aug. 2000.
- [17] H. Pierson, *Handbook of Carbon, Graphite, Diamonds and Fullerenes*. 1994.
- [18] G. L. Miessler and D. A. Tarr, *Inorganic Chemistry (3rd Edition)*. Prentice Hall, 2003, p. 720.
- [19] J. Clayden, N. Greeves, S. Warren, and P. Wothers, *Organic Chemistry*. OUP Oxford, 2001.
- [20] R. L. McCreery, "Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry.," *Chemical reviews*, vol. 108, no. 7, pp. 2646-87, Jul. 2008.
- [21] S. Stankovich et al., "Graphene-based composite materials.," *Nature*, vol. 442, no. 7100, pp. 282-6, Jul. 2006.
- [22] "Carbon Black, Titanium Dioxide, and Talc," in *International Agency for research on Cancer*, 2010.
- [23] E. L. Crump, "Economic Impact Analysis For the Proposed Carbon Black Manufacturing NESHAP Prepared by □ :," *U.S. Environmental Protection Agency*, no. May, 2000.
- [24] D. Pantea, "Electrical conductivity of thermal carbon blacks Influence of surface chemistry," *Carbon*, vol. 39, no. 8, pp. 1147-1158, 2001.
- [25] J.-C. Huang, "Carbon black filled conducting polymers and polymer blends," *Advances in Polymer Technology*, vol. 21, no. 4, pp. 299-313, 2002.
- [26] J. Liang and Q. Yang, "Aggregate structure and percolation behavior in polymer/carbon black conductive composites," *Journal of Applied Physics*, vol. 102, no. 8, p. 083508, Oct. 2007.
- [27] G. Y. Yu, W. X. Chen, Y. F. Zheng, J. Zhao, X. Li, and Z. D. Xu, "Synthesis of Ru/carbon nanocomposites by polyol process for electrochemical supercapacitor electrodes," *Materials Letters*, vol. 60, no. 20, pp. 2453-2456, 2006.
- [28] "Fiche technique," *Malvern Zetasizer*. [Online]. Available: www.malvern.com/common/downloads/MRK496.pdf.

- [29] H. Naono, M. Shimoda, N. Morita, M. Hakuman, K. Nakai, and S. Kondo, "Interaction of Water Molecules with Nongraphitized and Graphitized Carbon Black Surfaces †," *Langmuir*, vol. 13, no. 5, pp. 1297-1302, Mar. 1997.
- [30] J. Sanchez-Gonzalez, A. Macias-Garcia, M. Alexandre Franco, and V. Gomez Serrano, "Electrical conductivity of carbon blacks under compression," *Carbon*, vol. 43, no. 4, pp. 741-747, 2005.
- [31] K. Miyasaka, K. Watanabe, E. Jojima, H. Aida, M. Sumita, and K. Ishikawa, "Electrical conductivity of carbon-polymer composites as a function of carbon content," *Journal of Materials Science*, vol. 17, no. 6, pp. 1610-1616, Jun. 1982.
- [32] A. L. Thangawng, R. S. Ruoff, M. A. Swartz, and M. R. Glucksberg, "An ultra-thin PDMS membrane as a bio/micro-nano interface: fabrication and characterization.," *Biomedical microdevices*, vol. 9, no. 4, pp. 587-95, Aug. 2007.
- [33] C. K. Alexander and M. Sadiku, *Fundamentals of Electric Circuits*. McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 2003, p. 960.
- [34] M. J. Madou, *Fundamentals of Microfabrication*. CRC Press, 1997, p. 589 S.
- [35] P. de Gennes, "Wetting: statics and dynamics," *Reviews of Modern Physics*, vol. 57, no. 3, pp. 827-863, Jul. 1985.
- [36] A. Mata, A. J. Fleischman, and S. Roy, "Characterization of polydimethylsiloxane (PDMS) properties for biomedical micro/nanosystems.," *Biomedical microdevices*, vol. 7, no. 4, pp. 281-93, Dec. 2005.
- [37] X. Li, "Electrochemical characterization of carbon black subjected to RF oxygen plasma," *Carbon*, vol. 38, no. 1, pp. 133-138, 2000.
- [38] I. Junkar, U. Cvelbar, A. Vesel, N. Hauptman, and M. Mozetič, "The Role of Crystallinity on Polymer Interaction with Oxygen Plasma," *Plasma Processes and Polymers*, vol. 6, no. 10, pp. 667-675, Oct. 2009.
- [39] M. J. Owen and P. J. Smith, "Plasma treatment of polydimethylsiloxane," *Journal of Adhesion Science and Technology*, vol. 8, no. 10, pp. 1063-1075, 1994.
- [40] M. Miwa, A. Nakajima, A. Fujishima, K. Hashimoto, and T. Watanabe, "Effects of the Surface Roughness on Sliding Angles of Water Droplets on Superhydrophobic Surfaces," *Langmuir*, vol. 16, no. 13, pp. 5754-5760, Jun. 2000.
- [41] M. Ma and R. Hill, "Superhydrophobic surfaces," *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, vol. 11, no. 4, pp. 193-202, Oct. 2006.
- [42] H. Irie, T. S. Ping, T. Shibata, and K. Hashimoto, "Reversible Control of Wettability of a TiO₂ Surface by Introducing Surface Roughness," *The Electrochemical Society*, vol. 8, no. 9, p. D23-D25, 2005.

- [43] N. Verplanck, Y. Coffinier, V. Thomy, and R. Boukherroub, "Wettability Switching Techniques on Superhydrophobic Surfaces," *Nanoscale Research Letters*, vol. 2, no. 12, pp. 577-596, Nov. 2007.
- [44] S. C. WANG, K. S. CHANG, and C. J. YUAN, "Enhancement of electrochemical properties of screen-printed carbon electrodes by oxygen plasma treatment," *Electrochimica acta*, vol. 54, no. 21, pp. 4937-4943.
- [45] C. Chan, "Polymer surface modification by plasmas and photons," *Surface Science Reports*, vol. 24, no. 1-2, pp. 1-54, 1996.
- [46] U. Cvelbar, S. Pejovnic, M. Mozeti, and A. Zalar, "Increased surface roughness by oxygen plasma treatment of graphite / polymer composite," *Applied Surface Science*, vol. 210, pp. 255-261, 2003.
- [47] T. Takada, "Surface modification and characterization of carbon black with oxygen plasma," *Carbon*, vol. 34, no. 9, pp. 1087-1091, 1996.
- [48] S. Z. Hua, F. Sachs, D. X. Yang, and H. D. Chopra, "Microfluidic Actuation Using Electrochemically Generated Bubbles," *Analytical Chemistry*, vol. 74, no. 24, pp. 6392-6396, Dec. 2002.
- [49] L. Wang et al., "Design and Fabrication of Vertical Electrodes in Microchannels for Particles/cells Sorting by Dielectrophoresis," *Microtechnologies in Medicine and Biology, 2006 International Conference*, 2006. .
- [50] W. Lisen, L. Flanagan, and A. P. Lee, "Side-wall vertical electrodes for lateral field microfluidic applications," *Journal of microelectromechanical systems*, vol. 16, no. 2, pp. 454-461, 2007.

Chapitre 3

Caractérisation électrochimique d'électrodes en cPDMS

Ce chapitre est consacré à la caractérisation électrochimique du cPDMS mais également à l'évaluation de son potentiel en vue d'une intégration en système microfluidique dédié à la détection d'espèces électroactives.

Il débute par quelques généralités concernant les électrodes de carbone avant d'aborder les aspects «matériels et méthodes» qui présentent le protocole de fabrication d'électrode en cPDMS ainsi que les espèces redox utilisées pour la caractérisation de ces électrodes. La dernière partie du chapitre synthétise l'ensemble des mesures électrochimiques effectuées sur ces électrodes. Le caractère critique de l'épaisseur mais également du dopage du matériau sur sa réponse électrochimique seront mis en évidence.

Des études plus approfondies avec plusieurs espèces électroactives permettront la caractérisation de l'interface cPDMS/électrolyte. Nous serons d'ailleurs amenés, dans ce cadre, à démontrer l'influence du traitement au plasma oxygène.

I. ELEMENTS CARACTERISTIQUES DES ELECTRODES DE CARBONE EN ELECTROCHIMIE

Le carbone est un élément largement utilisé en électrochimie analytique présentant des formes allotropiques radicalement différentes [1]. Ce polymorphisme est à l'origine de la grande diversité des électrodes de carbone et de leurs propriétés. Pour comparer les électrodes de carbone entre elles, il est nécessaire de bien distinguer les propriétés de la masse (ou « bulk ») du matériau (conductivité électrique) de ses propriétés de surface (fenêtre de potentiel, oxydation, adsorption).

I.1 Conductivité électrique

Toutes les formes allotropiques du carbone ne permettent pas la conduction électrique entre atomes de carbone. C'est pourquoi les électrodes les plus courantes sont réalisées en carbone de type sp^2 . On distingue ainsi classiquement les électrodes de graphite (HOPG¹), en carbone vitreux (GCE²) et à base de résines pyrolysées (PPF³) [2]. Des travaux plus récents ont également démontré le potentiel de matériaux émergents tels que le graphène [3] et les nanotubes de carbone [4]. Il existe néanmoins une exception avec le diamant (hybridation sp^3) rendu conducteur après dopage à l'aide d'impuretés telles que le bore [5].

La conductivité électrique de tous ces matériaux n'est cependant pas équivalente. Le **Tableau 3.1** compare leur résistivité électrique avec celle obtenue pour le cPDMS dans le chapitre II.

	Résistivité électrique ($\Omega.cm$)
HOPG	$\sim 10^{-5}$
Carbone Vitreux	$\sim 10^{-3}$
Fibre de carbone	$\sim 10^{-3}$
Noir de carbone	0,25
Résine pyrolysée	0,006
cPDMS	10

Tableau 3.1: Résistivités électriques des principales électrodes de carbone comparées à celle du cPDMS. Valeurs tirées de [2] et [6].

En électrochimie, la conductivité du matériau n'est pas la seule caractéristique importante qui influe sur les performances de l'électrode. En effet, ses propriétés de surface, qui lui permettent des transferts de charges avec les espèces électroactives, jouent également un rôle prépondérant.

I.2 Fenêtre de potentiel électrochimique

Le carbone est reconnu pour avoir une large fenêtre électrochimique [2], c'est à dire la gamme de potentiel dans laquelle aucune réaction d'oxydoréduction, provenant de la dégradation des électrodes, du solvant ou de l'électrolyte support, n'a lieu. Cette fenêtre correspond donc au domaine de potentiel

¹ Highly oriented pyrolytic graphite

² Glassy Carbon Electrode

³ Pyrolyzed Photoresist Film

dans lequel l'ajout dans le milieu d'une espèce électroactive est observable sur une courbe *I-E* (**Figure 3.1**). Ainsi, plus cette fenêtre est large, plus le système électrochimique (matériau d'électrode, solvant, électrolyte) permet d'observer l'oxydation et la réduction d'un grand nombre de couples électrochimiques.

En solution aqueuse, la limite négative (de réduction) de potentiel correspond très souvent à la réduction du solvant: H^+ en H_2 . De même, la limite positive (d'oxydation) de potentiel est souvent due à l'oxydation soit de l'électrode de travail, soit de l'eau en O_2 . La fenêtre de polarisation peut également dépendre du pH.

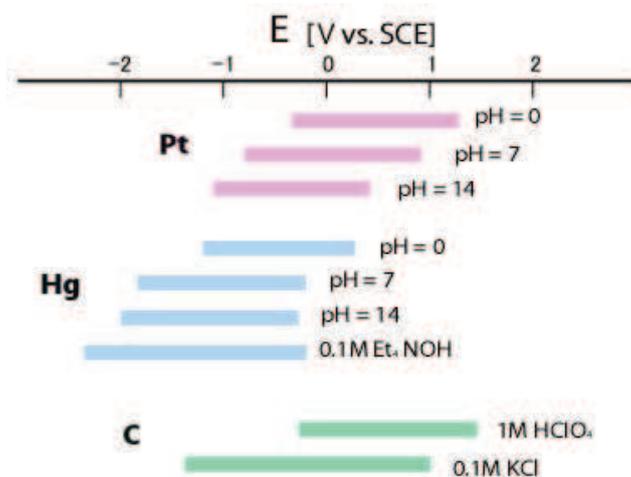


Figure 3.1 : Comparaison de la fenêtre de potentiels des principales électrodes de travail utilisées en électrochimie (Platine, Mercure et Carbone).

Image issue de www.bio-logic.info/potentiostat/electrodes.html

La gamme d'utilisation d'une électrode de carbone en présence de KCl 0,1M se situe donc globalement entre 1 V et -1 V (vs SCE).

I.3 Modification de surface : adsorption et oxydation

Le carbone est particulièrement propice aux phénomènes d'adsorption à sa surface [7]. Les forces (interactions électrostatiques, Van der Waals, liaisons covalentes) qui gouvernent ces phénomènes ne sont pas particulièrement spécifiques mais dépendent de la chimie de surface de l'électrode.

Si le carbone est réputé pour être chimiquement inerte [2], sa surface peut réagir en présence d'oxygène, d'eau ou d'autres composés oxygénés pour former de nouveaux groupements chimiques (acides carboxyliques, éthers, carbonyles). On parle alors de surfaces oxydées.

Les charges de surface apportées par ces nouveaux groupements facilitent l'adsorption de composés désirés (ou non) sur la surface de l'électrode. Leur impact sur la mesure électrochimique ne doit pas être ignoré. La présence d'impuretés peut notamment perturber le transfert de charges à l'interface électrode/électrolyte lors des processus faradiques. C'est pourquoi les électrodes de carbone nécessitent souvent une étape d'activation, telle qu'un polissage mécanique, un traitement thermique, laser ou encore au plasma [2], avant leur utilisation [8].

II. MATERIELS ET METHODES

Les électrodes réalisées en cPDMS ont joué le rôle d'électrode de travail (WE) alors qu'une électrode de Pt et une électrode Ag/AgCl ont respectivement joué le rôle d'électrode auxiliaire (AUX) et de référence (REF). Les mesures électrochimiques ont été menées sur deux potentiostats différents : (i) un potentiostat « maison » et (ii) un potentiostat commercial (Voltalab[®] 40, Radiometer Analytical).

II.1 Configurations d'électrodes en cPDMS, protocoles de fabrication

L'ensemble des résultats de caractérisation présentés dans ce chapitre ont nécessité la mise au point et la réalisation de configuration d'électrodes dédiées. Ces systèmes à électrodes de cPDMS ont tout d'abord été élaborés de manière à être compatibles avec les outils d'analyse électrochimiques habituellement utilisés au laboratoire avant d'être progressivement optimisés et miniaturisés. Ce paragraphe vise à détailler les différents protocoles de fabrication de ces microsystèmes de l'échelle « macro » à leur l'intégration microfluidique.

II.1.a Configuration type « Embout d'Electrode Tournante » (EET)

Afin d'évaluer l'intérêt du cPDMS en électrochimie, la première configuration réalisée s'est naturellement orientée vers une géométrie adaptable au système d'électrodes tournantes (EDI101, Radiometer Analytical[®]), un équipement de caractérisation électrochimique habituellement utilisé au laboratoire Ampère. Ce type d'appareillage est constitué d'un moteur prolongé d'un axe auquel vient se visser un embout d'électrode de différents matériaux tels que l'or ou le platine (**Figure 3.2**).

Pour adapter cet équipement au matériau cPDMS, nous avons privilégié un système s'emboitant directement sur l'embout en or, comme présenté sur la **Figure 3.2**.

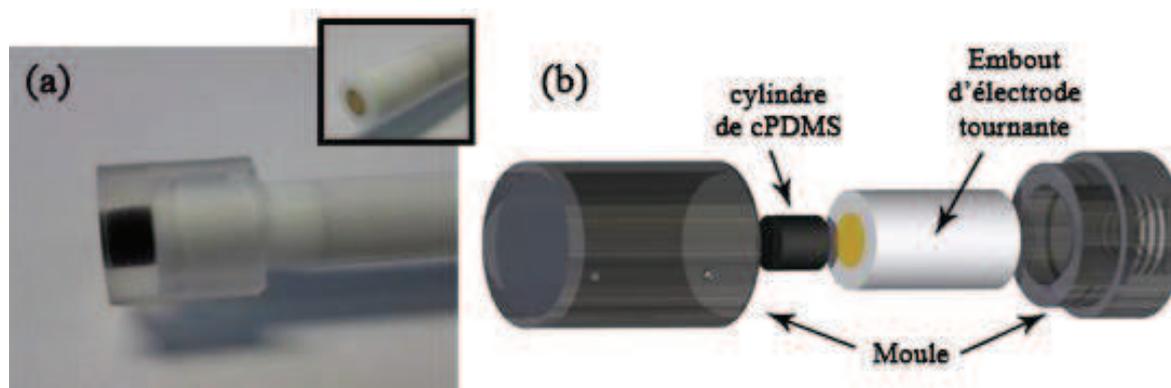


Figure 3.2 – (a) Embout d'électrode en or (Ø5mm, épaisseur 5mm) recouvert d'un bouchon de PDMS/cPDMS (Ø5mm, épaisseur 5mm) et (b) vue d'ensemble du moule à injection permettant la fabrication des bouchons de PDMS-cPDMS.

La réalisation de ces EET en cPDMS/ PDMS a nécessité le développement au laboratoire d'une méthode largement inspirée des moules à injection utilisés en plasturgie. Leur fabrication s'effectue en deux étapes :

- réaliser des cylindres de cPDMS de hauteurs et diamètres contrôlés, préparés, comme décrit sur la **Figure 2.6**, à l'aide de plaques percées ($\varnothing 5$ mm) et pris entre deux lames de verre.

- recouvrir ces cylindres avec du PDMS en ne laissant que les deux faces (avant et arrière) de cPDMS apparentes : l'une des faces permettra la reprise de contact avec l'embout d'électrode tournante en or, l'autre sera en contact avec la solution à analyser. Pour cela, un cylindre cPDMS est d'abord posé sur l'embout d'électrode tournante en or, puis l'ensemble est placé dans un moule (**Figure 3.2**). Du PDMS non polymérisé est alors injecté par l'une des entrées jusqu'au remplissage complet du moule. Après polymérisation (2h à 75°C), l'ensemble est délicatement démoulé. Plusieurs embouts d'épaisseur variable de cPDMS (2mm ou 5mm) ont ainsi été formés.

Pour cette configuration, les mesures électrochimiques ont été réalisées dans une cellule électrochimique conventionnelle en verre.

Cependant, cette technique ne permettant pas de fabriquer des électrodes d'épaisseur inférieure à 2 mm, nous avons été amenés à mettre au point d'autres configurations.

II.1.b Configuration en Film Mince pleine plaque (FM1)

Le procédé de fabrication de cette configuration d'électrode est le suivant (**Figure 3.3**):

- (1) Une lame de verre est recouverte, par évaporation, de 50 nm de chrome et 200 nm d'or.
- (2) Un gabarit de 100 μm d'épaisseur est déposé sur cette plaque.
- (3) Le dépôt et l'épaisseur de cPDMS sont contrôlés par ce gabarit.
- (4) Le gabarit est éliminé après polymérisation du cPDMS, afin de permettre la reprise de contact.

Pour cette configuration, nous avons privilégié l'utilisation de cuvettes en PDMS, placées au-dessus des électrodes FM, afin qu'elles assurent le rôle de cellule électrochimique et qu'elles définissent la surface de l'électrode WE (ici $\varnothing 1\text{cm}$).

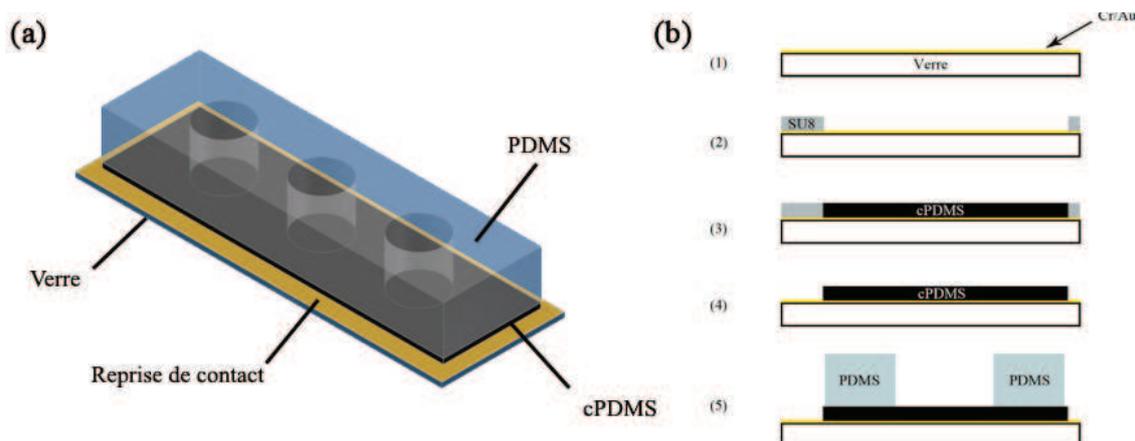


Figure 3.3 – (a) Représentation schématique d'un dispositif FMI contenant 3 cellules électrochimiques miniatures avec électrodes de travail en cPDMS de 100 μm d'épaisseur. (b) Etapes de fabrication.

II.1.c Configuration en Film Mince localisé (FM2)

L'intégration future du cPDMS en système microfluidique a nécessité le développement d'un protocole plus adapté que celui utilisé pour la configuration FM1. Ainsi, nous avons été amenés à résoudre le problème de la localisation d'électrodes en cPDMS sur un substrat de verre. Le protocole développé a conduit à une configuration d'électrodes en film mince localisé (FM2) selon les étapes détaillées sur la **Figure 3.4**.

- (1) Des reprises de contact (Cr/Au : 50/200 nm) sont réalisées par lift-off sur une lame de verre.
- (2) Réalisation d'un moule en résine Etertec®, une résine sèche photosensible de 50 μm d'épaisseur, privilégiée à la SU8 pour sa simplicité d'utilisation.
- (3) Le cPDMS est alors étalé dans les ouvertures. Le tout est alors placé à l'étuve (30 min, 75°C) afin de permettre une polymérisation partielle du cPDMS. La résine est ensuite éliminée (acétone).
- (4) Une seconde lame de verre, préalablement structurée (par photolithographie sur résine Etertec®) et silanisée (OTS), est plaquée contre la première avant injection de PDMS liquide. L'ensemble est alors maintenu sous pression à l'aide de pinces et placé 2h à 75°C afin de polymériser le PDMS et le cPDMS. Il est important d'utiliser deux fois la même résine afin que l'épaisseur du PDMS soit égale à celle du cPDMS, ceci afin d'assurer la présence de cPDMS à la surface.
- (5) La silanisation de la seconde lame de verre permet de faciliter le démoulage. La bonne adhésion entre le cPDMS et le PDMS (démontrée au chapitre II) assure l'étanchéité entre l'électrolyte et la couche d'or.

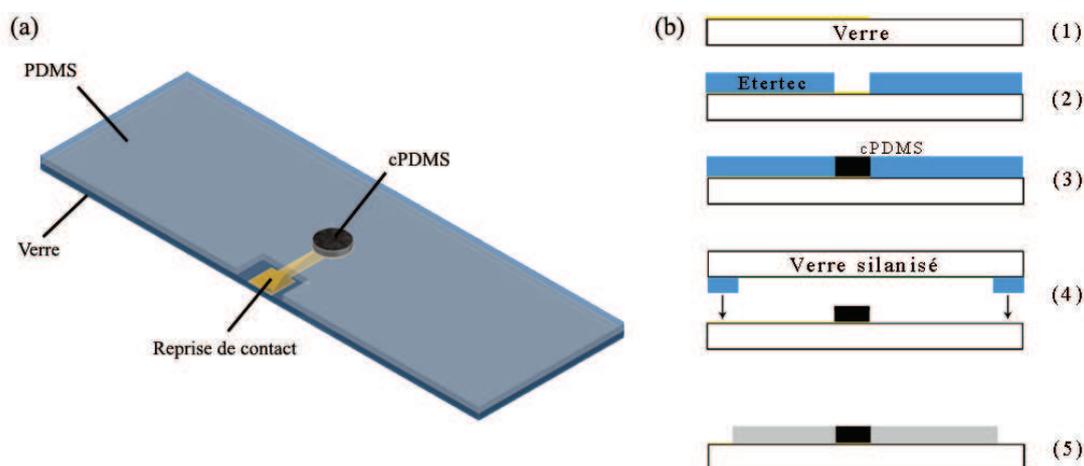


Figure 3.4 - (a) Représentation schématique du dispositif planaire à électrodes de cPDMS miniaturisées. (b) Processus de microfabrication associé.

Les dispositifs réalisés à l'aide de ce nouveau procédé sont composés d'une électrode de travail cylindrique de cPDMS (5 mm de diamètre et 50 μm d'épaisseur) intégrée dans un film de PDMS de la même épaisseur. Le contact est repris par-dessous à l'aide d'une piste en or.

Pour les mesures électrochimiques, ce dispositif est fixé au fond d'une boîte de Petri, les reprises de contact sont soudées à l'étain puis isolées à l'aide d'Araldite®. La boîte est remplie de l'électrolyte à analyser avant d'y plonger les deux électrodes restantes (AUX et REF).

II.2 Couples redox modèles utilisés

Par usage, on qualifie une sonde redox de « sensible » si sa constante cinétique de transfert électronique apparaît modifiée après traitement physique ou/et chimique de la surface de l'électrode. Cette constante cinétique, caractérisant le transfert électronique entre les espèces et l'électrode, peut être comparée à la constante de transport de matière pour définir si un couple est rapide ou lent [9]. On distingue ainsi deux modes de transfert électronique :

- le premier système est dit de « sphère interne ». Le transfert d'électron(s) est réalisé si un pont chimique permet de lier l'électrode et l'espèce redox. Compte tenu de la structure en double couche de l'interface, le mécanisme n'est donc possible que si l'espèce en solution vient s'adsorber à la surface de l'électrode.

- dans le second système, dit de « sphère externe », le transfert peut s'effectuer directement entre deux espèces non connectées chimiquement et sans échange de ligand. L'électron est alors forcé de traverser la couche de Stern par effet tunnel [2]. Même si ce mécanisme est thermodynamiquement moins favorable, ce type de réaction est couramment retrouvé dans les réactions d'oxydoréduction biochimiques puisque les encombrements stériques (dans les macromolécules) peuvent empêcher la formation de liaisons chimiques directes entre deux centres redox.

Ces deux processus sont présentés sur la **Figure 3.5**.

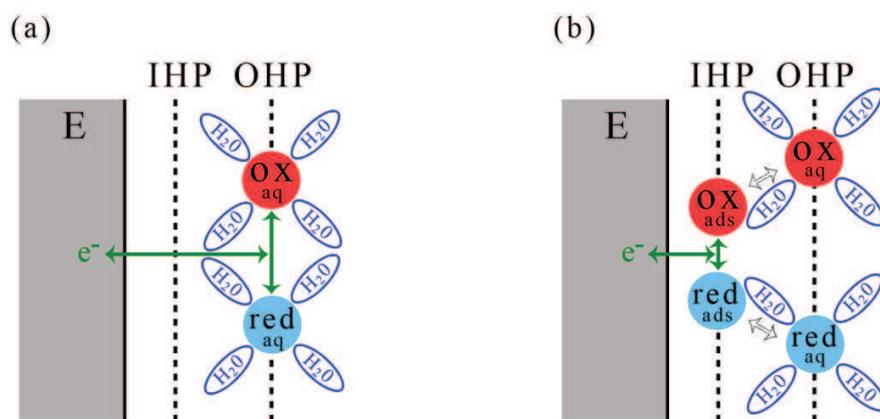


Figure 3.5 - Représentation schématique des deux modes de transfert d'électrons (a) Dans le procédé redox de sphère externe les électrons sont transférés par effet tunnel entre l'électrode l'espèce redox solvatée (dans le plan externe d'Helmholtz). (b) Dans le procédé dit de sphère interne, les électrons sont transférés chimiquement entre l'électrode et l'espèce redox adsorbée à sa surface.

L'utilisation de sondes redox permet : (i) de comparer la réponse obtenue pour des électrodes en cPDMS avec celles obtenues pour d'autres types de carbone et (ii) d'évaluer les modifications de surface apportées par un éventuel traitement tel qu'une oxydation ou une activation.

Par exemple, une électrode, devenue négativement chargée à la suite d'un traitement de surface, pourrait devenir plus sensible à une espèce chargée positivement et inversement pour un composé négativement chargé, du fait des interactions électrostatiques. Chaque espèce redox est en effet plus ou moins affectée par les propriétés de surface des électrodes comme le présente la **Figure 3.6**.

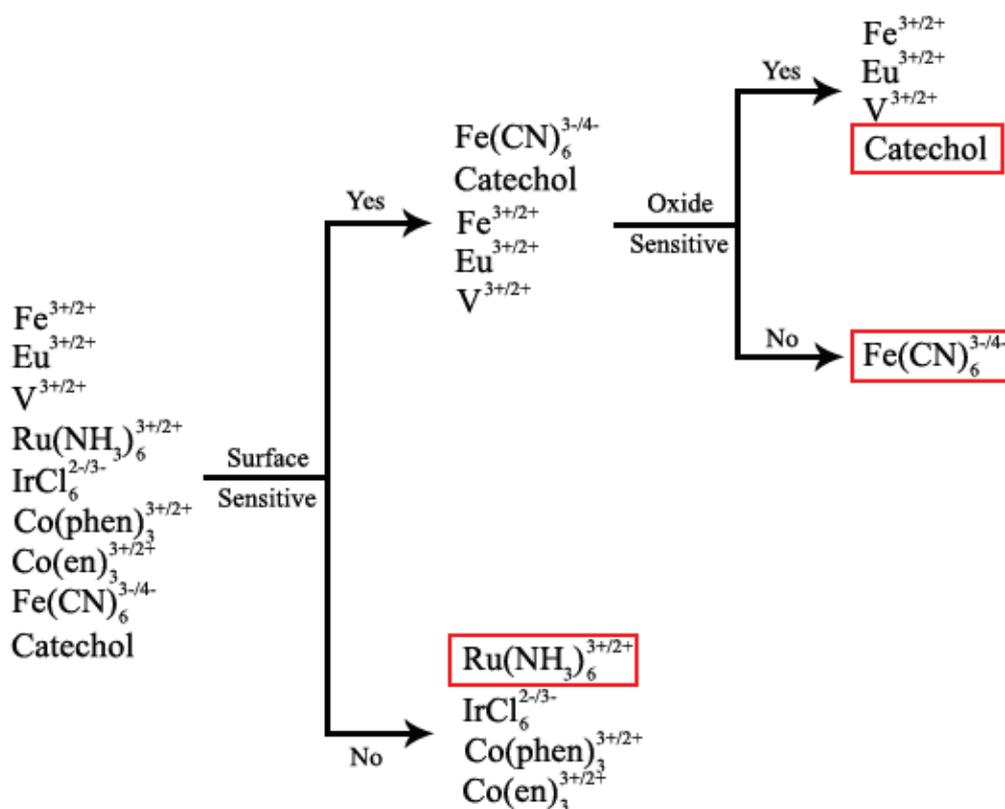


Figure 3.6 : Classement des principales espèces redox en fonction de leur sensibilité à la modification de surface des électrodes de carbone. Figure réalisée d'après [8].

La voltammétrie cyclique, une des méthodes électrochimiques les plus courantes, peut être utilisée pour mettre en évidence cette « sensibilité ». Cette technique consiste à balayer le potentiel appliqué à l'électrode de travail, E , et mesurer l'évolution du courant associé, I . Ce dernier est le résultat de deux composantes distinctes:

- I_f , le courant faradique, associé au transfert de charges à l'interface électrode/solution accompagnant les réactions d'oxydoréduction des espèces.
- I_c , le courant capacitif, provenant de l'accumulation de charges à l'interface entre l'électrode et la solution. Il dépend de la charge et de la décharge de la double couche électrochimique, et apparaît à chaque fois que le potentiel de l'électrode est modifié.

La représentation de I en fonction de E conduit à une courbe caractéristique appelée voltammogramme dont un exemple est présenté sur la **Figure 3.7**. Ce voltammogramme peut être décrit, la plupart du temps, par l'apparition d'un pic de courant anodique en position E_{pa} et d'un pic de courant cathodique en position E_{pc} . La valeur $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$ caractérise la rapidité du transfert électronique du couple rédox et permet de calculer la constante cinétique du couple. Néanmoins, il faut manier ces valeurs avec précaution et, par exemple, s'assurer de l'absence de chute ohmique. La variation de $\Delta E = E_{pa} - E_{pc}$ permet de mettre en évidence des effets de surface et sera utilisée dans cette étude.

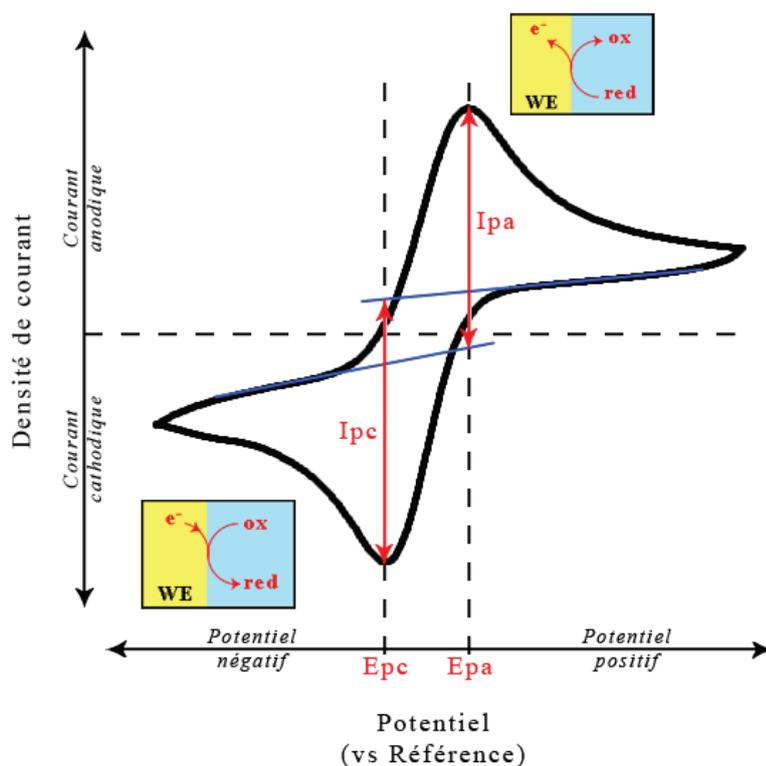
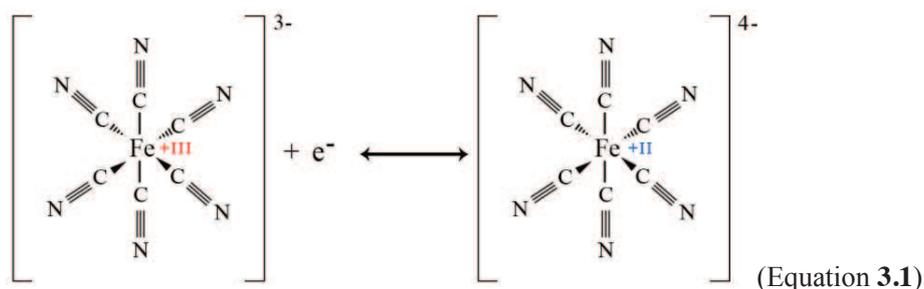


Figure 3.7 - Voltammogramme schématisé d'un système redox réversible caractérisé par ses pics anodique d'oxydation (I_{pa} , E_{pa}) et cathodique de réduction (I_{pc} , E_{pc}).

Trois sondes redox modèles ont été choisies ici pour la caractérisation d'électrode de cPDMS en raison de leurs propriétés chimiques et donc leur « sensibilité » vis à vis de la surface des électrodes.

II.2.a Ferricyanure/ferrocyanure

Le couple ferricyanure/ferrocyanure ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$), usuellement appelé ferri/ferro, met en jeu le processus redox monoélectronique à sphère interne suivant :



L'atome de Fer dit ferrique (ou Fe(III) de degré d'oxydation III) du ferricyanure est réduit en Fer dit ferreux (Fe(II) de degré d'oxydation II) en donnant du ferrocyanure. Les deux molécules présentent des propriétés physico-chimiques sensiblement identiques. Elles sont hydrophiles, négativement

chargées [10] et la constante cinétique de transfert électronique de cette réaction apparaît très sensible à l'état de surface des électrodes (conformément à la **Figure 3.5**)

Le couple ferri/ferro est donc largement utilisé pour la mise en évidence, par voie électrochimique, des modifications de surface d'électrodes [2] induites par traitement chimique ou physique. La **Figure 3.8** présente un exemple de l'utilisation de ce couple rédox pour démontrer l'effet du DNPH (Dinitrophenylhydrazine, un réactif organique modifiant la composition de surface) sur la réponse électrochimique d'une électrode de carbone vitreux [8].

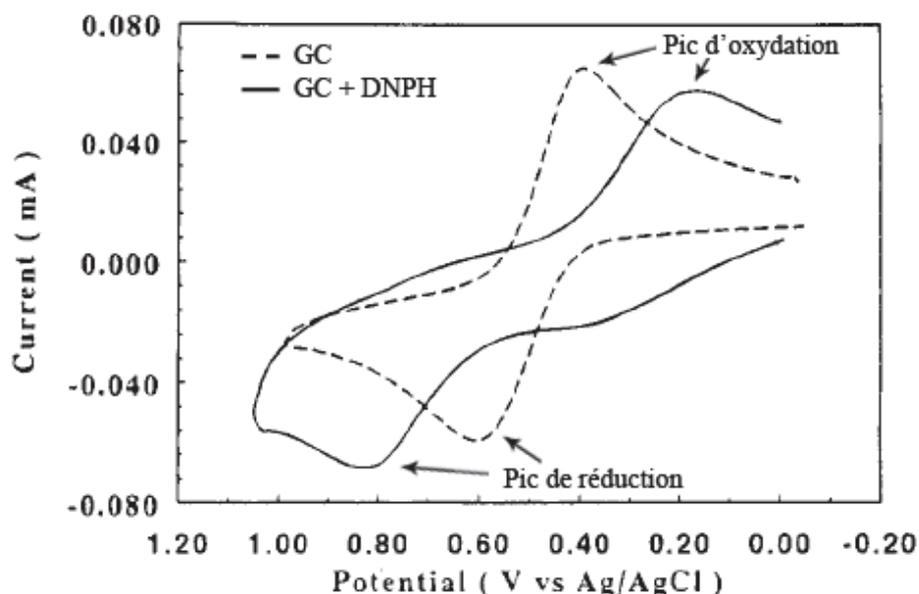


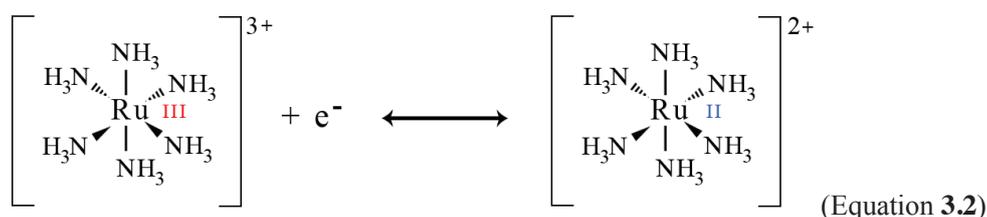
Figure 3.8 – Voltammogrammes présentant l'influence de la modification de surface (DNPH) d'électrodes de carbone vitreux (GC). Les mesures sont réalisées en présence de ferri/ferro (5 mM dans 0,2 M HClO₄). Figure réalisée d'après [9].

Chaque électrode présente un pic de courant anodique (I_{pa} , E_{pa}), reflet de l'oxydation (FeII en FeIII), et un pic de courant cathodique (I_{pc} , E_{pc}) correspondant à la réduction (FeIII en FeII).

Il est possible d'observer une augmentation du ΔE de la réaction après traitement de l'électrode, ce qui suggère un transfert électronique plus lent. On rappelle que celui-ci est théoriquement égal à $0,059/n$ (V) dans un système rapide idéal (avec n électrons transférés (ici 1) durant la réaction, à 25°C).

II.2.b Ruthénium hexaammine

Cette molécule est un complexe constitué d'un atome de ruthénium, lié à 6 groupements amines, pouvant se trouver à plusieurs degrés d'oxydation. La réaction redox qui nous intéresse est la suivante :



Le complexe de ruthénium hexaammine $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ est un composé cationique et hydrophile. Il est couramment admis que la rapidité du transfert électronique, lors de sa réaction avec une électrode, n'est pas affectée par la modification de sa chimie de surface [2][8].

La **Figure 3.9** présente l'influence de l'adsorption de DNPH sur la réponse électrochimique d'électrode de carbone vitreux vis-à-vis du $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$.

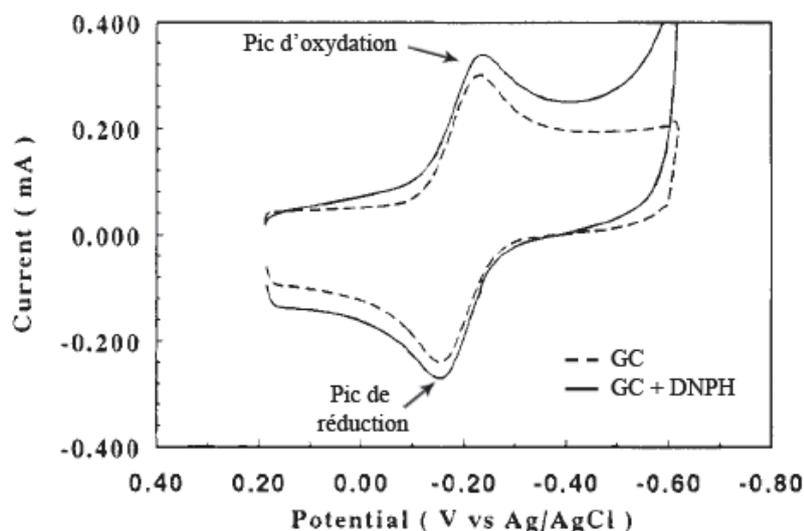


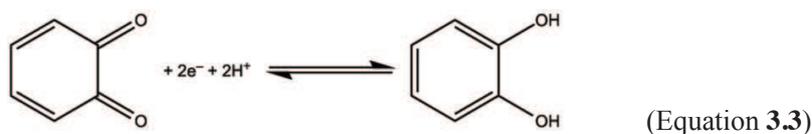
Figure 3.9 – Voltammogrammes présentant l'influence de la modification de surface (dépôt de DNPH) d'électrodes de carbone vitreux (GC). Les mesures sont réalisées en présence de Ruthénium hexaammine (1 mM dans 1 M KCl). Figure réalisée d'après [9].

A l'inverse du comportement observé pour le ferri/ferro, la réponse électrochimique de l'électrode GC, n'est pas modifiée après traitement au DNPH. En effet, le changement de chimie de surface n'influence pas le ΔE de la réaction. D'autres exemples de modification de surface mettent en évidence ce phénomène [8].

On notera cependant, qu'à l'instar des autres sondes redox, les mesures électrochimiques du $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{2+/3+}$ sont sensibles aux variations de surface active (comme l'augmentation du nombre de sites de transfert de charges) de l'électrode parfois induites lors de traitements physico-chimiques.

II.2.c Catéchol

Egalement appelé 1,2-dihydroxybenzène, le catéchol est composé d'un cycle benzénique sur lequel sont substitués deux groupements hydroxyles (fonctions alcools) en position ortho. La molécule est obtenue par réduction d'une orthoquinone (1,2-benzoquinone) selon la réaction redox (à deux électrons) suivante :



Le catéchol est l'un des composés phénoliques les plus courants et a logiquement fait l'objet d'analyses. Il est depuis largement utilisé pour la caractérisation des méthodes analytiques du fait de son excellente activité électrochimique.

Le couple catéchol/benzoquinone est réputé pour être sensible à l'état de la surface de l'électrode, et notamment à la présence d'une couche d'oxyde [11], signe que le transfert de charges avec la surface dépend d'une interaction du catéchol avec certains groupements chimiques spécifiques [8].

III. RÉSULTATS DE VOLTAMMETRIE CYCLIQUE

III.1 Etudes préliminaires

Tout d'abord, afin d'évaluer le potentiel du cPDMS pour une utilisation en électrochimie, le comportement du couple ferricyanure/ferrocyanure ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$) a été étudié. La sonde électro-active a été préparée à 20 mM (dans du KCl 0,1 M). On notera que cette concentration est élevée car des mesures effectuées avec des concentrations inférieures n'ont pas donné de signal significatif. Les mesures ont été réalisées avec un dispositif de cPDMS de type EET de 2 mm d'épaisseurs. Le cPDMS a été préparé à 25% de carbone afin de se placer dans les conditions optimales de conductivité.

La superposition des courbes obtenues, avec et sans couple, est présentée sur la **Figure 3.10**.

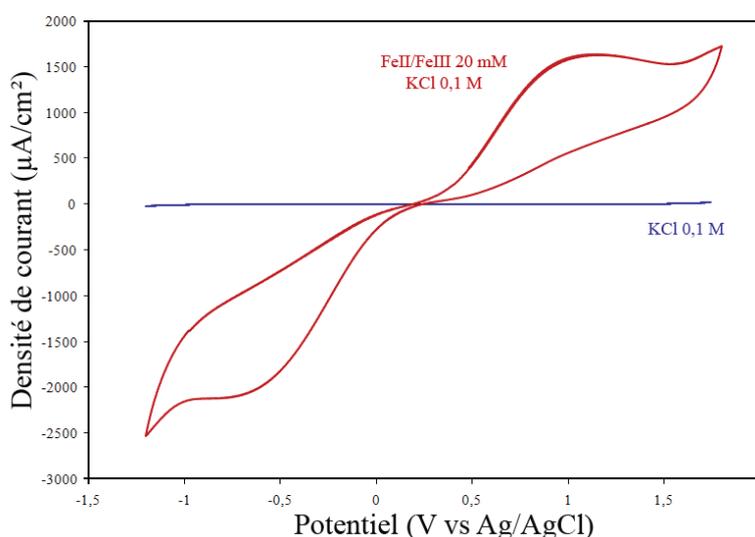


Figure 3.10 – Superposition des voltammogrammes obtenus dans KCl 0,1 M avec et sans $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 20 mM. Mesures à 250 mV/s sur électrodes de cPDMS (25%) de type EET de 2 mm d'épaisseur.

La courbe obtenue pour les électrodes plongées dans une solution contenant du KCl seul, renseigne sur la fenêtre de potentiel de l'électrode en cPDMS qui est ici comprise entre -1000 mV et +1500 mV (vs Ag/AgCl). Cette large fenêtre de potentiel est conforme au comportement général du carbone [2]. L'allure de la courbe en présence de Fe(II) et Fe(III) est caractéristique d'une réaction redox. Les pics de courant d'oxydation et de réduction sont distinctement observés, signe que les électrodes de cPDMS semblent adaptées à ce type d'expérience.

Cependant, la valeur de ΔE , ici autour de 2000 mV, est très largement supérieure à la valeur théorique attendue (59 mV) et à celles habituellement retrouvées dans la littérature [8]. Deux phénomènes peuvent expliquer cette différence :

- D'une part, cette valeur importante de ΔE peut provenir de la chute ohmique engendrée par la forte résistivité du matériau ainsi que son épaisseur.
- D'autre part, la rapidité de transfert de charges à l'interface électrode/électrolyte peut être limitée par l'état de surface du cPDMS. Celui-ci, de manière native, n'est peut être pas particulièrement adapté à l'oxydoréduction de ce couple.

Pour identifier les effets de ces phénomènes, différents tests ont été conduits dans la suite de l'étude:

- Caractérisation de l'influence du dopage.
- mise en évidence de l'influence de l'état de surface du cPDMS par l'évaluation des conséquences du traitement plasma oxygène sur sa réponse électrochimique pour l'électrolyte seul et pour les trois couples électrochimiques présentés précédemment. En effet, de nombreux travaux mettent en évidence la nécessité d'activer la surface des électrodes de carbone avant leur utilisation [2]. Le choix de ce traitement et l'étude de son influence se justifient également par son utilisation lors du procédé technologique d'intégration d'électrodes de cPDMS dans un système PDMS.

III.2 Influence du dopage du cPDMS

III.2.a Réduction de l'épaisseur du cPDMS

Afin de limiter l'effet de la chute ohmique, nous avons travaillé avec des épaisseurs de cPDMS de 100 μm ce qui nous a également permis de réduire la concentration de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$.

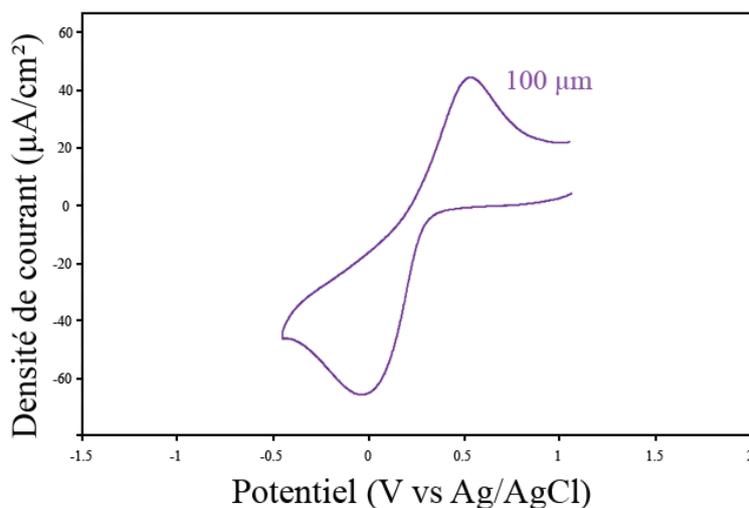


Figure 3.11 – Voltammogramme obtenu avec $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ 1mM (dans KCl 0,1 M). Mesures à 200 mV/s sur électrodes de cPDMS (25%) de type FM1 de 100 μm d'épaisseur.

La **Figure 3.11** présente le voltammogramme ainsi obtenu pour une électrode de cPDMS de 100 μm d'épaisseur et pour une concentration en espèces électroactives de 1 mM.

Ces électrodes présentent ainsi un ΔE de 540 mV, soit une réduction de plus de 70% par rapport à l'électrode de 2 mm. Cette valeur reste néanmoins supérieure aux 59 mV théoriquement attendus.

III.2.b Influence du dopage du cPDMS

Une autre manière de diminuer la résistance du matériau consiste en l'augmentation de sa conductivité. On rappelle que la proportion de noir de carbone dans le cPDMS influence directement sa conductivité, mais aussi probablement le nombre de sites actifs et donc la surface électroactive de l'électrode. Nous avons donc voulu évaluer l'influence du dopage sur la réponse électrochimique du matériau envers le $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-/4-}$ (1 mM dans KCl 0,1 M).

Des électrodes de cPDMS (de type FM1) de 100 μm d'épaisseur mais de dopages allant de 18 à 25% de carbone ont été réalisées. Les résultats sont présentés sur la **Figure 3.12**.

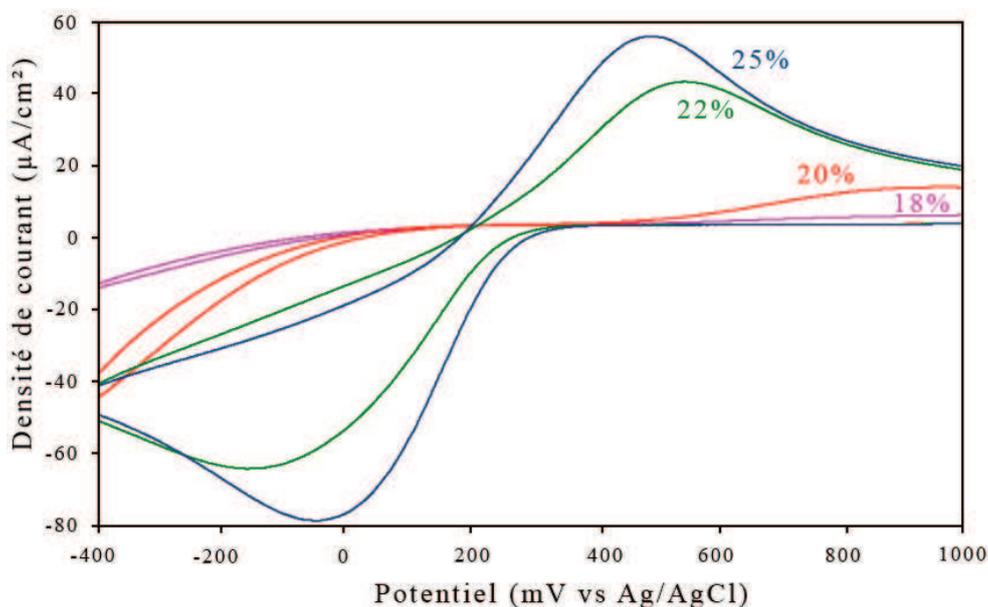


Figure 3.12 – Voltammogrammes des mesures effectuées sur électrodes de cPDMS de type FM1 ($e=100 \mu\text{m}$) à différents dopages (18, 20, 22 et 25% de carbone w/w) en présence de $\text{Fe}(\text{CN}_6)^{3-/4-}$ (1 mM dans KCl 0,1 M). Vitesse de balayage 50 mV/s.

L'allure générale des courbes montre clairement l'impact de la concentration en noir de carbone sur la réponse électrochimique du matériau. La diminution du dopage entraîne ainsi l'augmentation du ΔE allant de 536 mV pour 25% à 823 mV pour 20%, mais également la réduction des courants de pic. Ceci est d'ailleurs conforme au modèle de percolation traduisant la dépendance critique du dopage d'un matériau sur sa conductivité.

Ce comportement est également décrit dans les travaux de Ferrera *et al* [12] effectués sur diamant dopé bore. Les auteurs justifient alors ces observations par l'amélioration du passage de courant dans le matériau mais également par l'augmentation du nombre de sites de transfert de charges à l'interface avec l'électrolyte. Ces deux phénomènes cumulés entraînent alors une amélioration visible de la rapidité de la réaction. Nous pouvons supposer qu'il en est de même avec le cPDMS où une augmentation du dopage entraîne à la fois une amélioration de la conductivité du matériau mais également l'augmentation du nombre de sites actifs en surface de l'électrode.

III.3 Evaluation de l'influence du plasma oxygène sur les mesures

Les mesures d'angle de contact décrites dans le chapitre II ont mis en évidence la modification de la surface du cPDMS par une oxydation au plasma oxygène. Le traitement permet d'une part de modifier sa chimie de surface en augmentant, par exemple, considérablement ses propriétés hydrophiles, mais également de nettoyer l'électrode en détruisant les impuretés adsorbées.

Les mesures réalisées dans ce paragraphe visent donc à caractériser l'effet du plasma oxygène sur la réponse électrochimique du cPDMS vis-à-vis de trois sondes électroactives.

III.3.a Influence de la durée du plasma

Dans un premier temps l'influence de la durée du plasma a été évaluée sur la réponse électrochimique du cPDMS envers le $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$. Les électrodes, réalisées selon le modèle FM1 ($e=100\ \mu\text{m}$, $\varnothing\ 5\ \text{mm}$, 25%), sont traitées au plasma oxygène (50 W, 200 mTorr) pendant des durées variables : 2,5 min, 10 min, 20 min et non traitées. On rappelle que les électrodes sont conservées dans l'eau désionisée pour conserver leur caractère hydrophile avant leur utilisation.

Les résultats sont présentés sur la **Figure 3.13**.

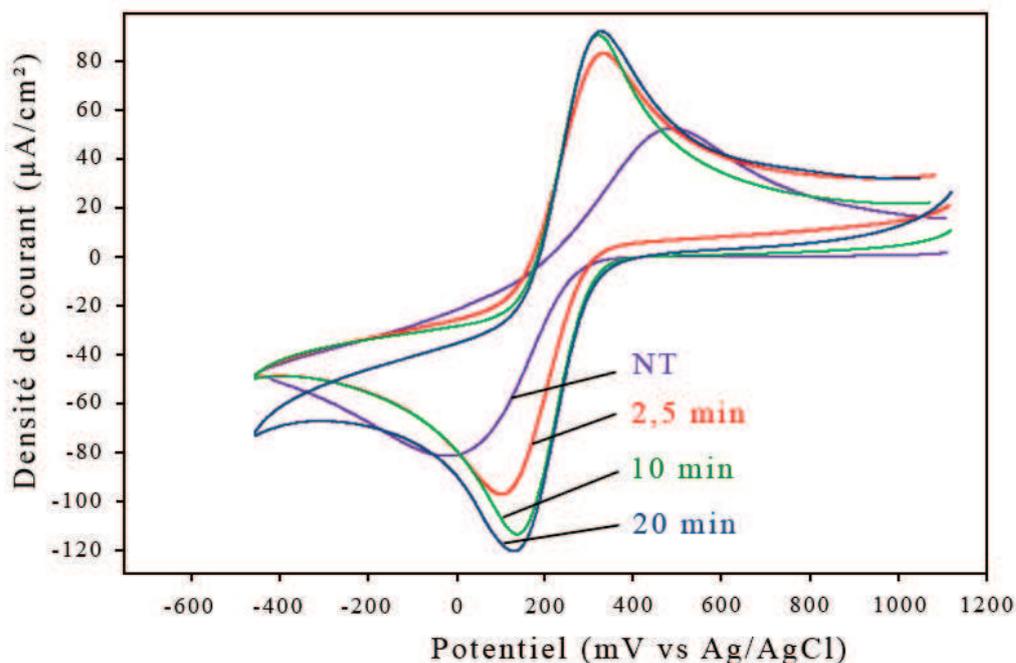


Figure 3.13 – Voltammogrammes des mesures effectuées sur électrodes type FM1 de cPDMS ($e=100\ \mu\text{m}$) traitées au plasma oxygène pendant différentes durées (2,5 min, 10 min, 20 min et non traitée) en présence de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ (1mM dans KCl 1M). Vitesse de balayage 50 mV/s. Plasma O_2 , 50 W, + 200 mTorr.

L'allure générale des courbes présente directement l'influence du plasma oxygène sur la réaction du couple $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ sur l'électrode cPDMS. Ainsi, dès 2,5 min de traitement, le ΔE est largement réduit (227 mV contre 511 mV, soit une réduction de 50%). Ces observations sont conformes aux travaux effectués sur électrodes de carbone sérigraphiées [13] pour lesquels les auteurs décrivent une diminution du ΔE de 440 à 156 mV après oxydation au plasma oxygène 100 W.

Parallèlement, le traitement entraîne une nette augmentation de la valeur des courants de pic, soit un comportement similaire à ceux décrits dans la littérature [13].

L'oxydation plasma de la surface de cPDMS favorise ainsi considérablement le transfert électronique entre celle-ci et l'électrolyte. Les molécules de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ étant reconnues sensibles aux changements de surface de l'électrode, ce comportement confirme une modification de la surface de cPDMS suite au plasma. On notera, en revanche, que le prolongement du traitement au-delà de 10 min ne semble pas modifier de manière significative la réponse de l'électrode.

Plusieurs pistes peuvent être proposées pour expliquer la variation de la réponse électrochimique du cPDMS:

- La modification des groupements chimiques de la surface (notamment mise en évidence grâce au caractère hydrophile de la surface après traitement).
- L'augmentation du nombre de sites actifs (mis en évidence par les images MEB) peut conduire à l'augmentation de la surface active de l'électrode.

La caractérisation de l'effet du plasma sur le cPDMS, à l'aide d'autres sondes électroactives, permet d'apporter des éléments de réponse complémentaires. Par la suite, les électrodes sont traitées au plasma oxygène pendant 2,5 min, ce qui reste suffisant pour l'amélioration significative de la réponse de $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$ tout en restant compatible avec les procédés de collage plasma.

III.3.b Influence du plasma O_2 sur la mesure de ruthénium hexaammine

Les mesures de voltammétrie cyclique ont été effectuées sur des électrodes réalisées selon le modèle FM2 ($e=50 \mu\text{m}$, $\text{Ø} 5 \text{ mm}$, 25%). Celles-ci ont été traitées (2,5 min) ou non au plasma oxygène afin d'en évaluer l'impact sur leur réponse électrochimique vis à vis du ruthénium hexaammine (2 mM dans KCl 0,1 M). Les voltammogrammes obtenus sont présentés sur la **Figure 3.14**.

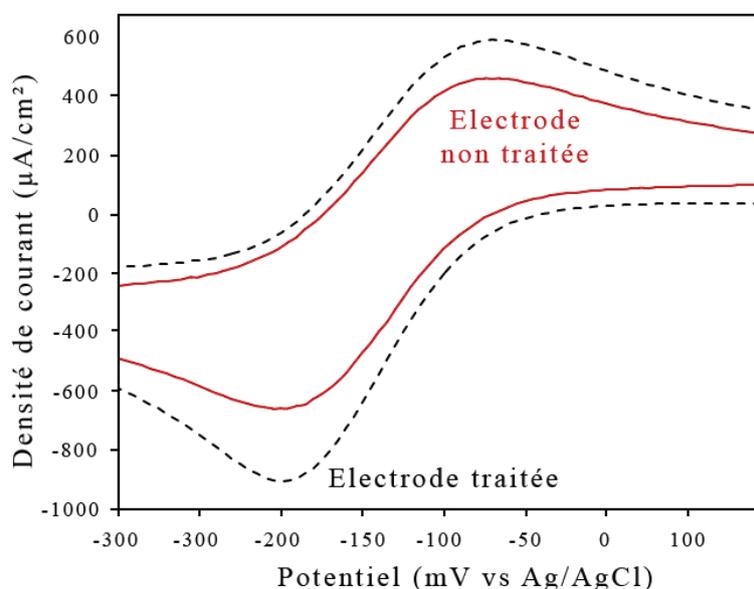


Figure 3.14– Voltammogrammes des mesures effectuées sur FM2 de cPDMS ($\text{Ø} 5 \text{ mm}$, $e=50 \mu\text{m}$) traitées (2,5 min, 50 W, 200 mTorr) ou non en présence de ruthénium hexaammine 2mM (dans KCl 0,1M). Vitesse de balayage 200mV/s.

Les deux courbes correspondant aux électrodes traitée et non traitée présentent des ΔE identiques (de 114 mV). Le traitement de surface ne semble donc pas modifier la rapidité du transfert électronique entre le couple et la surface de l'électrode. Ceci est cohérent avec le comportement habituel du ruthénium hexaammine pour lequel le transfert de charges avec l'électrode s'effectue par procédé de sphère externe [2]. Ces valeurs sont par ailleurs conformes à celles retrouvées dans la littérature sur électrodes GC (~ 110 mV) [8].

Cependant, le traitement des électrodes de cPDMS au plasma oxygène entraîne une augmentation des valeurs de courant de pic. Cette différence de courant faradique indique probablement que le nombre de sites actif est augmenté lors du traitement plasma O_2 . Ces observations ont également été décrites dans la littérature sur des électrodes GC [14]. Les auteurs de l'article justifient la hausse du courant par une augmentation de la rugosité des électrodes utilisées, ce qui entraîne une augmentation de leur surface.

III.3.c Influence du plasma O_2 sur la réaction du catéchol à l'électrode

Les mesures de voltammétrie cyclique sont effectuées sur électrodes réalisées selon le modèle FM2 ($e=50$ μm , \varnothing 5 mm, 25%). La réponse électrochimique des électrodes vis à vis du catéchol (2 mM) est comparée avant et après traitement (2,5 min). Les résultats obtenus sont présentés sur la **Figure 3.15**. On notera qu'à la différence des deux couples redox précédents, le catéchol est préparé dans du PBS 0.1 M à pH 6.5 qui s'avère être le tampon optimal pour la mesure des courants de pic [15].

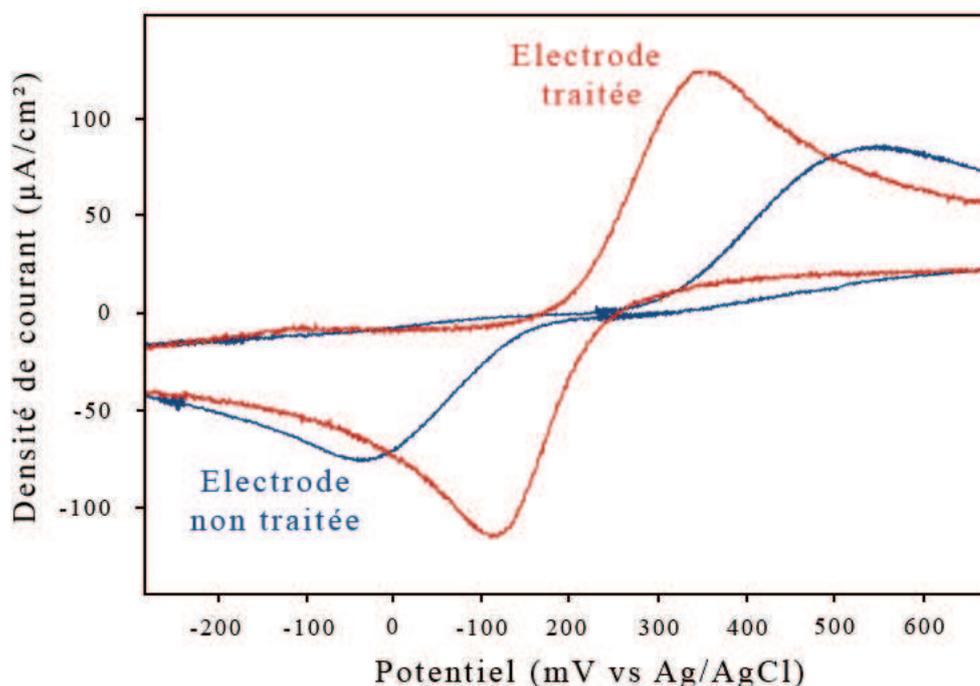


Figure 3.15 – Voltammogrammes des mesures effectuées sur FM2 de cPDMS (\varnothing 5 mm, $e=50$ μm , 25%) traitées au plasma (2,5 min, 50 W, 200 mTorr) ou non en présence de catéchol 2mM (dans PBS 0,1M). Vitesse de balayage de 200mV/s.

L'allure des deux courbes met clairement en évidence de nouveau l'influence du plasma sur la réponse électrochimique du cPDMS pour le catéchol. Le traitement de surface améliore significativement les mesures : le ΔE passe de 603 mV à 234 mV, soit plus de 60% de réduction sous l'effet du plasma

oxygène. Ces mesures sont particulièrement conformes aux travaux de Wang *et al* [13] présentant l'effet du plasma oxygène sur la réponse électrochimique d'électrodes d'encre de carbone sérigraphiées. Les auteurs observent une diminution du ΔE de 665 mV à 233 mV après 20 min de traitement à 100 W pour la même espèce (0.4 mM de catéchol dans 50 mM PBS).

Le catéchol étant sensible à la présence d'oxydes qui favorisent son adsorption [11], ce résultat confirme l'oxydation de la surface suite au plasma oxygène et la présence de groupements contenant de l'oxygène.

III.4 Caractérisation du courant capacitif

Lorsque les mesures ampérométriques sont réalisées en absence de couple électroactif, un courant résiduel, dit capacitif, est observé pendant une expérience de voltammétrie cyclique. On rappelle qu'il provient de l'accumulation de charges dans la double couche, à l'interface électrode/électrolyte. Chaque électrode est ainsi caractérisée par une capacité d'interface qui renseigne sur les phénomènes de répartition des charges à sa surface. Cette capacité est particulièrement dépendante de l'état de surface mais également de l'électrolyte.

Dans les cas d'utilisation de l'électrochimie comme outil de détection, ce courant capacitif est considéré comme du bruit. Il peut en effet masquer la mesure de pics de courant faradiques, en particulier si l'espèce à détecter est en faible concentration. Le rapport entre le courant faradique et le courant capacitif est ainsi limitant pour la mesure. On parle de rapport signal sur bruit ($R_{S/B}$)

III.4.a Influence du plasma oxygène sur le courant capacitif

Si le traitement au plasma oxygène peut influencer la mesure des courants faradiques, nous avons observé que ce traitement agissait également sur les phénomènes capacitifs. Des mesures en voltammétrie cyclique ont été réalisées sur des électrodes (type FM1), traitées (2,5 min) ou non au plasma oxygène, en présence de l'électrolyte support seul. Les résultats sont présentés sur la **Figure 3.16**.

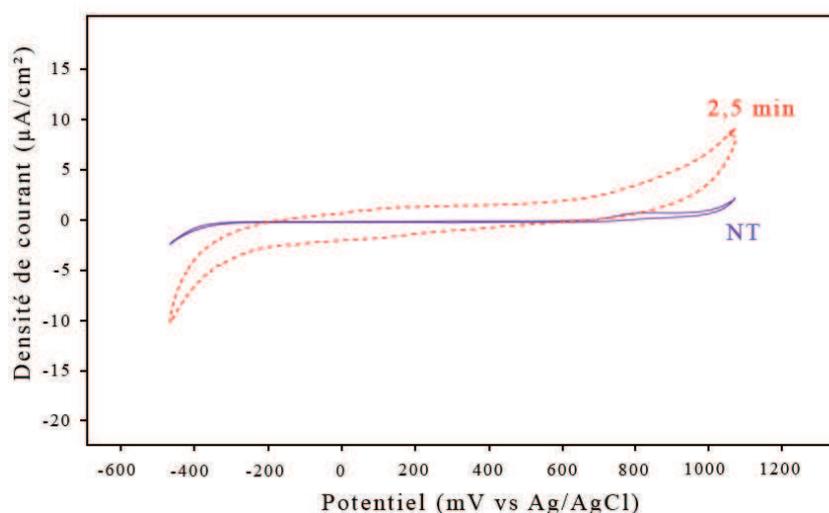


Figure 3.16 – Voltammogrammes des mesures effectuées sur électrodes FM1 de cPDMS ($e=100\ \mu\text{m}$) traitées au plasma O_2 (50 W, 200 mTorr, 2,5 min) ou non en présence de KCl 0,1 M.

Vitesse de balayage 50 mV/s.

Le plasma induit ici une augmentation très significative du courant capacitif. L'électrode non traitée présente un signal capacitif de l'ordre de 100 nA/cm, qui passe à près de 2,5 µA/cm après traitement au plasma. Cette augmentation conjointe du courant capacitif et de la durée du traitement au plasma oxygène est également retrouvée dans la littérature pour des électrodes en fibre de carbone [16] où une augmentation de la surface active est également démontrée.

III.4.b Détermination de la capacité d'interface

La voltammétrie cyclique permet l'estimation de la capacité de la double couche à l'interface. La mesure de cette capacité de double couche s'effectuant directement à partir de l'étude du courant capacitif, il est important de s'affranchir au maximum des phénomènes faradiques. L'expérience est effectuée en présence d'un électrolyte inerte seul (sans couple électroactif). Il est également important de réaliser les mesures dans une gamme de potentiel ne permettant pas l'oxydoréduction du solvant. Le courant mesuré ne dépend alors que du courant capacitif. Il est décrit par l'hypothèse suivante :

$$i_c = \frac{dQ}{dt} = C \frac{dU}{dt} = C\nu \quad (\text{Equation 3.4})$$

Avec I le courant (en Ampère), Q la charge électrique (en Coulomb), C la capacité de la double couche (en Farad), ν la vitesse de balayage (en V/s), soit la variation de potentiel (E) par unité de temps (t)

Le courant capacitif est ainsi proportionnel à la vitesse de balayage. Des expériences de voltammétrie cyclique ont été réalisées à différentes vitesses de balayage (entre 50 et 2000 mV/s). Ces mesures sont effectuées sur la même électrode (type FM1, 25%) avant puis après traitement au plasma oxygène (50 W, +200 mTorr, 2,5 min). Les courants capacitifs ainsi obtenus ont été représentés en fonction des vitesses de balayage sur la **Figure 3.17**.

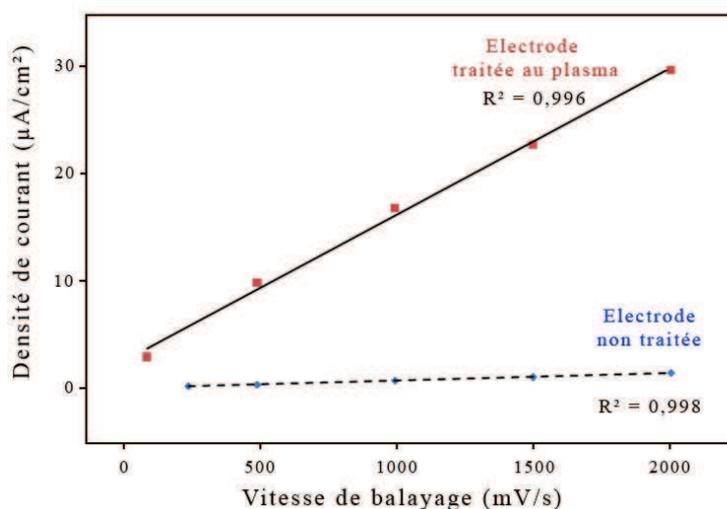


Figure 3.17 – Influence du plasma oxygène sur la capacité de la double couche de l'interface cPDMS/KCl (0.1M). Les mesures sont effectuées avant (en bleu) et après (en rouge) plasma oxygène (50 W, +200 mTorr, 2,5 min) sur EPM de cPDMS (25%).

Conformément au résultat attendu, le courant capacitif varie linéairement ($R > 0,996$) avec la vitesse de balayage, aussi bien avant qu'après l'oxydation de la surface. La capacité semble ici nettement augmenter sous l'effet du plasma oxygène. En effet, avant traitement, l'électrode présente une capacité d'interface de 710 nF/cm^2 , soit une valeur légèrement plus faible que celles habituellement retrouvées dans la littérature, à savoir comprises entre 1 et $35 \text{ } \mu\text{F/cm}$ (sur électrodes de carbone en KCl 0,1 M) [17]. Après le plasma, la pente indique une capacité de $13,9 \text{ } \mu\text{F/cm}$. Les mêmes expériences, réalisées en présence de PBS 0,1 M, ont également mis en évidence l'augmentation de la capacité d'interface de $4,3 \text{ } \mu\text{F/cm}$ ($R = 0,997$) à $13,8 \text{ } \mu\text{F/cm}$ ($R = 0,999$) après le traitement plasma. Une étude plus rigoureuse utilisant la méthode de spectroscopie d'impédance devrait permettre de valider ces mesures.

La double couche se comportant comme un condensateur plan, l'augmentation de la capacité d'interface peut notamment s'expliquer par l'agrandissement de la surface de l'électrode. L'augmentation du nombre de sites actifs sous l'effet du traitement au plasma oxygène semble ici particulièrement cohérente au vu des résultats obtenus avec les sondes électroactives.

III.4.c Rapport Signal/Bruit

Les mesures précédentes ont mis en évidence l'influence du traitement plasma sur les phénomènes faradiques et capacitifs. Cependant, afin d'évaluer l'intérêt d'un tel traitement sur les mesures électrochimiques, l'analyse des résultats passe par la détermination du $R_{S/B}$, c'est-à-dire le rapport entre les valeurs de courant obtenues avec et sans espèce électroactive.

Le **Tableau 3.2** présente l'effet du plasma oxygène sur le ΔE et le $R_{S/B}$.

	Ferri/Ferro		Ruthénium Hexaammine		Catéchol	
	Non traitée	2,5 min	Non traitée	2,5 min	Non traitée	2,5 min
ΔE	511	227	114	114	603	234
Rapport (S/B)	1080	65	1852	98	84	21

Tableau 3.2 – Influence du traitement plasma O_2 (2,5 min, 50 W, +200 mTorr) sur les paramètres de détection du ferri/ferro (1 mM, dans KCl 0,1 M), du ruthénium hexaammine (2 mM dans KCl 0,1M) et du catéchol (2 mM dans PBS 0,1M). Mesures effectuées sur FM2 (25%) à 250 mV/s.

Les résultats montrent clairement que le traitement plasma entraîne la diminution du $R_{S/B}$. Un bon rapport signal sur bruit étant essentiel pour toute technique analytique, le traitement plasma semble donc relativement défavorable pour la détection de molécules faiblement concentrées.

Cependant, si la mesure est effectuée pour détecter un mélange de plusieurs espèces redox, il est plus intéressant de se placer dans les conditions pour lesquelles la réversibilité de la réaction est optimale (faible ΔE).

Le meilleur compromis entre le ΔE et le rapport signal sur bruit dépend donc finalement de l'objectif de la mesure et des conditions dans lesquelles celle-ci est réalisée.

Conclusion

Les avantages de la microfluidique pour les mesures électrochimiques n'est plus à démontrer. En plus de diminuer les consommations de réactifs nécessaires [18], la miniaturisation permet d'augmenter la rapidité, la précision et le rendement des analyses [19]. Les outils microfluidiques assurent la détection électrochimique de concentrations d'électrolytes inférieures au nM, dans l'espace et le temps avec une sensibilité remarquable [20]. Ces microsystèmes nécessitent cependant l'intégration d'électrodes de dimensions micrométriques.

Le cPDMS constitue une alternative intéressante aux électrodes de carbone classiquement utilisées. Si les mesures présentées dans ce paragraphe ont démontré le potentiel de ce matériau pour une utilisation en électrochimie, celle-ci passe nécessairement par la maîtrise de plusieurs contraintes.

La résistivité du cPDMS limitant notamment la mesure de courant, ce matériau implique un dopage rigoureux et nécessite d'être utilisé dans des épaisseurs inférieures à 100 μm .

Par ailleurs, la réactivité électrochimique du matériau peut être modulée par un traitement au plasma oxygène. L'étude de ce phénomène, à l'aide de sondes électroactives, a notamment démontré que la conséquence du plasma est avant tout chimique avec l'augmentation du caractère hydrophile couplée à l'oxydation de la surface. Ces deux effets combinés favorisent alors l'adsorption des espèces électroactives à la surface du cPDMS.

Si l'oxydation diminue le ΔE et augmente les valeurs de courant, elle n'est cependant pas sans conséquence sur la valeur du rapport signal sur bruit. Une caractérisation plus approfondie de la puissance et de la durée du traitement plasma permettrait sans doute d'optimiser les conditions du traitement tout en restant compatible avec les procédés de microfabrication.

Les systèmes décrits précédemment restent néanmoins tous dépendants d'une cellule électrochimique. Le passage à un dispositif microfluidique nécessite cependant l'intégration des trois électrodes. Si les électrodes de travail et auxiliaire peuvent être réalisées en cPDMS (type FM2), la miniaturisation de l'électrode de référence est plus délicate. Elle pourrait cependant être réalisée à partir d'une FM2 de cPDMS recouverte d'une couche d'Ag/AgCl, ou encore avec une électrode d'AgPDMS couverte d'AgCl. La **Figure 3.18** propose une configuration intégrant des électrodes coplanaires en cPDMS dans un canal microfluidique en PDMS.

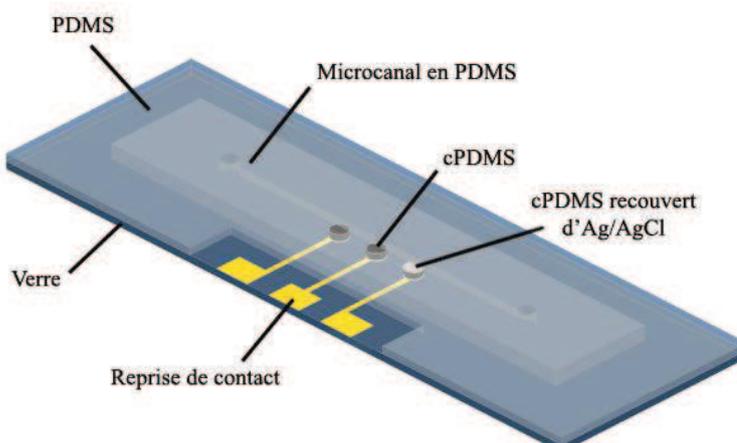


Figure 3.18 - Représentation schématique d'un dispositif microfluidique intégrant trois électrodes de cPDMS. L'électrode de référence est recouverte d'Ag/AgCl.

Références Bibliographiques

- [1] H. Pierson, *Handbook of Carbon, Graphite, Diamonds and Fullerenes*. 1994.
- [2] R. L. McCreery, "Advanced carbon electrode materials for molecular electrochemistry.," *Chemical reviews*, vol. 108, no. 7, pp. 2646-87, Jul. 2008.
- [3] C. Shan, H. Yang, J. Song, D. Han, A. Ivaska, and L. Niu, "Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene.," *Analytical chemistry*, vol. 81, no. 6, pp. 2378-82, Mar. 2009.
- [4] J. Wang, M. Li, Z. Shi, N. Li, and Z. Gu, "Direct electrochemistry of cytochrome c at a glassy carbon electrode modified with single-wall carbon nanotubes.," *Analytical Chemistry*, vol. 74, no. 9, pp. 1993-1997, 2002.
- [5] Y. V. Pleskov, *Electrochemistry of Diamond: A Review*, vol. 38, no. 12. MAIK Nauka/Interperiodica distributed exclusively by Springer Science+Business Media LLC., 2002, pp. 1275-1291-1291.
- [6] S. Ranganathan, R. McCreery, S. M. Majji, and M. Madou, "Photoresist-Derived Carbon for Microelectromechanical Systems and Electrochemical Applications," *Journal of the Electrochemical Society*, vol. 147, no. 1, p. 277, 2000.
- [7] M. T. Mcdermott and R. L. McCreery, "Scanning Tunneling Microscopy of Ordered Graphite and Glassy Carbon Surfaces: Electronic Control of Quinone Adsorption," *Adsorption Journal Of The International Adsorption Society*, pp. 4307-4314, 1994.
- [8] P. Chen and R. L. McCreery, "Control of Electron Transfer Kinetics at Glassy Carbon Electrodes by Specific Surface Modification," *Analytical Chemistry*, vol. 68, no. 22, pp. 3958-3965, 1996.
- [9] P. Chen, M. A. Fryling, and R. L. McCreery, "Electron Transfer Kinetics at Modified Carbon Electrode Surfaces: The Role of Specific Surface Sites," *Analytical Chemistry*, vol. 67, no. 18, pp. 3115-3122, Sep. 1995.
- [10] R. De Levie, "The influence of surface roughness of solid electrodes on electrochemical measurements," *Electrochimica Acta*, vol. 10, no. 2, pp. 113-130, Feb. 1965.
- [11] S. H. Duvall and R. L. McCreery, "Control of Catechol and Hydroquinone Electron-Transfer Kinetics on Native and Modified Glassy Carbon Electrodes," *Optimization*, vol. 71, no. 20, pp. 4594-4602, 1999.
- [12] N. G. Ferreira, L. L. G. Silva, E. J. Corat, and V. J. Trava-Airoldi, "Kinetics study of diamond electrodes at different levels of boron doping as quasi-reversible systems," *Reactions*, vol. 11, no. 8, pp. 1523-1531, 2002.
- [13] S. C. WANG, K. S. CHANG, and C. J. YUAN, "Enhancement of electrochemical properties of screen-printed carbon electrodes by oxygen plasma treatment," *Electrochimica acta*, vol. 54, no. 21, pp. 4937-4943.
- [14] I. Yagi, "Electrochemical selectivity for redox systems at oxygen-terminated diamond electrodes," *Journal of Electroanalytical Chemistry*, vol. 473, no. 1-2, pp. 173-178, 1999.

- [15] G. A. M. Mersal, "Electrochemical Sensor for Voltammetric Determination of Catechol Based on Screen Printed Graphite Electrode," *Forschung*, vol. 4, pp. 1167 - 1177, 2009.
- [16] K. Okajima, K. Ohta, and M. Sudoh, "Capacitance behavior of activated carbon fibers with oxygen-plasma treatment," *Electrochimica Acta*, vol. 50, no. 11, pp. 2227-2231, 2005.
- [17] J. Xu, Q. Chen, and G. M. Swain, "Anthraquinonedisulfonate electrochemistry: a comparison of glassy carbon, hydrogenated glassy carbon, highly oriented pyrolytic graphite, and diamond electrodes.," *Analytical chemistry*, vol. 70, no. 15, pp. 3146-54, Aug. 1998.
- [18] W. R. Vandaveer, S. A. Pasas-Farmer, D. J. Fischer, C. N. Frankenfeld, and S. M. Lunte, "Recent developments in electrochemical detection for microchip capillary electrophoresis.," *Electrophoresis*, vol. 25, no. 21-22, pp. 3528-49, Nov. 2004.
- [19] N. A. Lacher, K. E. Garrison, R. S. Martin, and S. M. Lunte, "Microchip capillary electrophoresis/electrochemistry.," *Electrophoresis*, vol. 22, no. 12, pp. 2526-36, Aug. 2001.
- [20] J. Rossier, F. Reymond, and P. E. Michel, "Polymer microfluidic chips for electrochemical and biochemical analyses.," *Electrophoresis*, vol. 23, no. 6, pp. 858-67, Mar. 2002.

Chapitre 4

Manipulation électrique de particules en microsysteme cPDMS

Ce chapitre est consacré à la mise en évidence du potentiel du cPDMS pour la manipulation électrocinétique de particules en microsysteme. Il débute par la présentation rapide du système expérimental utilisé avec notamment une description de l'instrumentation et des particules manipulées dans ce chapitre. Nous serons d'ailleurs amenés à décrire les précautions nécessaires à la manipulation de cellules.

Les différents phénomènes électrocinétiques observés en présence de microbilles ou de cellules sont ensuite décrits dans la deuxième partie du chapitre. Nous verrons qu'ils sont particulièrement dépendant des paramètres du champ électrique conformément aux mécanismes de polarisation présentés dans le chapitre 1.

La troisième section présente l'ensemble des résultats de lyse de cellules en microsysteme cPDMS. Ces expérimentations, notamment réalisées par l'application de signaux impulsionnels et alternatifs, ont conduit à la détermination des paramètres d'électroporation réversible. Leur connaissance est indispensable dans des procédés tels que l'électrofusion de cellules qui fait justement l'objet du dernier paragraphe. Celui-ci est dédié à la mise au point d'un microsysteme destiné à la fusion de cellules intégrant un procédé de piégeage hydrodynamique couplé au système de Washizu [1] permettant la concentration des lignes de champ.

I. SYSTEME EXPERIMENTAL

I.1 Équipement

▪ Instrumentation

Les résultats présentés dans ce chapitre ont été obtenus à l'aide de dispositifs microfluidiques intégrant des électrodes en cPDMS. Les étapes nécessaires à leur fabrication sont détaillées dans le chapitre 2 (**Figure 2.11**). Ces microsystèmes sont composés d'un canal de 50 μ m d'épaisseur dont les parois sont constituées de cPDMS. Cette épaisseur est suffisamment importante pour permettre le libre déplacement des microparticules (billes de 3 et 10 μ m, bactéries *E. Coli* et cellules HEK-293 et reste compatible avec la profondeur de champ du microscope. Les expériences ont été réalisées avec l'instrumentation adaptée au contrôle des paramètres fluidiques et électriques ainsi qu'à l'observation des effets induits par les champs électriques appliqués (**Figure 4.1**).

- Les solutions sont injectées dans le microcanal à l'aide d'un contrôleur d'écoulement (MCFS Fluigent[®]). Cet équipement, piloté par un logiciel d'instrumentation virtuelle, permet de réguler la pression sur plusieurs voies différentes et de l'ajuster en temps réel.

- Les particules à l'intérieur du canal sont observées à l'aide d'un microscope droit (Nikon Eclipse LV150) et d'un microscope à fluorescence (Axio Imager Zeiss), tous deux équipés d'une caméra (Zeiss AxioCam HS).

- Les signaux électriques appliqués aux électrodes sont produits à l'aide d'un générateur (Agilent[®] 33250A) piloté sous Labview[™] via son interface GPIB. Ce générateur est couplé à un amplificateur (NF[®] HSA 40114011 – bande passante 1 MHz) permettant des gains en tension de 10, 20, 50 ou 100. Les tensions appliquées sont contrôlées à l'oscilloscope (Agilent[®] DSO6034A – bande passante 300 MHz).

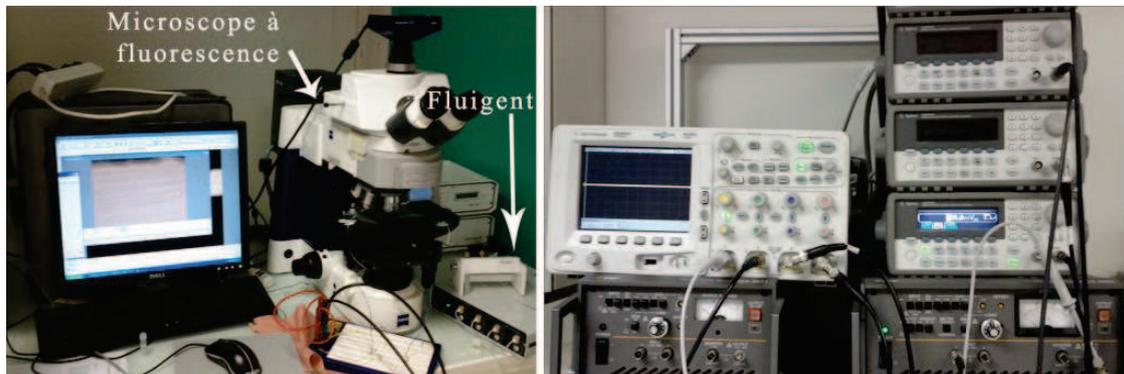


Figure 4.1 – Instrumentation optique, fluidique et électrique utilisée lors des expérimentations.

Pour découpler, dans la mesure du possible les effets électrocinétiques des effets hydrodynamiques, les expérimentations ont été réalisées en l'absence de débit [2].

Cependant, si le contrôleur d'écoulement (Fluigent[®]) permet de stopper assez efficacement le déplacement de liquide, quelques mouvements résiduels persistent et peuvent perturber la mesure. La majorité des expériences ont été effectuées en canaux de 200 μ m de largeur. Néanmoins, certains phénomènes étudiés, relativement lents, sont particulièrement sensibles à la présence d'un écoulement résiduel. C'est pourquoi les manipulations sont réalisées dans certains cas en canaux de 600 μ m de large, moins sensibles à l'influence de ces variations [2].

Afin de simplifier la comparaison entre les expériences, l'amplitude de la tension appliquée est rapportée à la largeur du canal et les protocoles électriques appliqués sont donc décrits en valeur de champs électriques.

Enfin, afin d'éviter tout phénomène d'adsorption des particules (billes ou cellules) sur le verre, les canaux sont remplis d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumin) à 1% et incubés à 37°C pendant 2 h. Ils sont ensuite rincés (eau désionisée) avant leur utilisation pour éliminer l'excédent de BSA.

- Microbilles

L'intérêt des électrodes de cPDMS pour la manipulation électrocinétique de particules a d'abord été mis en évidence par l'utilisation de microbilles (Polybeads, Polysciences Inc.) diélectriques (polystyrène latex, PSL) sphériques et de diamètres contrôlés (ici 3 μm et 10 μm).

Ces particules sont lavées plusieurs fois avec de l'eau désionisée par centrifugation avant leur utilisation. Ceci permet d'éliminer les traces de surfactant et de s'assurer d'être en milieu très faiblement conducteur.

Parallèlement, des mesures réalisées à l'aide du Zetasizer[®] ont été effectuées sur ces microbilles afin d'évaluer leur potentiel zêta. Pour cela, les billes sont remises en suspension à faible concentration (la solution doit être transparente) dans de l'eau désionisée, puis placées dans une cuvette adaptée à la mesure (DTS1061, Malvern[®]). L'appareil applique alors un champ électrique à travers la dispersion et mesure la mobilité électrophorétique des particules. Cette mobilité peut être reliée au potentiel zêta lorsque l'on connaît les propriétés du solvant utilisé. Les mesures ont mis en évidence une charge de surface négative, ce qui reste conforme à la littérature.

- Bactéries

Dans un deuxième temps, des bactéries ont fait l'objet d'une étude préliminaire à la manipulation de cellules eucaryotes. Moins contraignantes que ces dernières (moins sensible à l'osmose, à la température, et à la composition du milieu), les bactéries permettent de se familiariser plus simplement à l'utilisation d'organismes vivants.

Des bactéries *Escherichia Coli* TOP10 (Invitrogen[®]) ont été cultivées dans un milieu Luria-Bertani liquide incubé à 37°C pendant 24 h (5 μl de bactéries dans 15 mL de milieu). Après centrifugation (5000 rpm 5 min), elles ont été remises en suspension dans une solution de glycérol à 10% (2 fois) assurant une faible conductivité tout en évitant les chocs osmotiques.

De la classe des entérobactéries, les *E. Coli* sont des bacilles ($\sim 1 \mu\text{m}$) à Gram négative, c'est-à-dire présentant une membrane dite externe composée de lipopolysaccharides et de protéines. Ces molécules sont alors responsables de la charge de surface négative (à pH neutre) [3] des bactéries à Gram-. Des mesures de potentiel zêta effectuées sur différentes lignées d'*E. Coli* confirment leur charge de surface négative [4].

I.2 Cellules eucaryotes

- Cellules et milieu

Les manipulations ont été effectuées sur des cellules adhérentes HEK-293, dérivées de cellules embryonnaires du rein (humain). Elles sont souvent utilisées d'après la littérature [5][6] et leur culture est par ailleurs bien maîtrisée au laboratoire Ampère. Leurs propriétés diélectriques ont de plus été récemment caractérisées par Zimmerman *et al* [7]. Elles sont présentées dans le **Tableau 4.1** :

Cell line	Medium osmolarity	C_m (mF/m ²) ^a	G_m (S/m ²) ^a	σ_i (mS/m) ^b	ϵ_i/ϵ_0 ^b
HEK293	300 (mOsm)	8.5 ± 0.3	~ 0	533 ± 63	71 ± 9
HEK293	100 (mOsm)	7.5 ± 0.3	126 ± 33	175 ± 14	85 ± 15

Tableau 4.1 – Propriétés électriques des cellules HEK-293. C_m et G_m désignent respectivement la capacité et la conductance surfacique de la membrane. σ_i et ϵ_i sont les conductivité et permittivité du cytoplasme des cellules. Tableau issu de [7]

Les cellules HEK-293 (ATCC CRL-1573TM) commandées chez PAA sont cultivées sur milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) complété par 10% de FBS (Fetal Bovine Serum), 5% de glutamine et 5% de pénicilline-streptomycine. Les cellules sont incubées à 37°C pendant deux jours en atmosphère à 5% de CO₂ / 95% O₂. A confluence (80% de la surface couverte), les cellules sont rincées avec du DMEM, détachées avec de la trypsine, puis récupérées dans du DMEM. Après centrifugation douce (5 min à 233g), les cellules HEK-293 sont remises en suspension dans un milieu adapté à leur manipulation, c'est-à-dire un milieu devant être préférentiellement isotonique mais surtout présenter une faible conductivité (cf. **Chapitre 1**).

Pour nos expériences, les cellules ont été préparées dans un tampon à pH 7.02, d'osmolarité 300 mOsm.L⁻¹ et de conductivité 93.6 μ S/cm acheté chez Eppendorf[®] (Electrofusion Buffer Isoosmolar). Cependant, le passage du milieu de culture (très conducteur, supérieur à 10 mS/cm) au milieu de fusion (très peu conducteur) nécessite plusieurs rinçages afin de réduire efficacement la conductivité. Ces étapes de lavage ne sont en revanche pas sans conséquence sur la viabilité des cellules. Des tests effectués au bleu Trypan ont mis en évidence jusqu'à près de 35% de pertes de cellules à la suite d'un lavage (centrifugation + changement de milieu). Un milieu contenant très peu d'ions peut en effet induire un stress pour les cellules [8]. Ce phénomène couplé aux contraintes mécaniques liées à la centrifugation peut être la raison de cette diminution significative du nombre de cellules.

Un protocole incluant deux étapes de centrifugations semble être le bon compromis pour permettre l'ajustement de la conductivité tout en préservant au mieux la viabilité cellulaire. Il permet ainsi d'obtenir une conductivité électrique de l'ordre de 100 μ S/cm, ce qui reste sensiblement proche du tampon de fusion pur (93.6 μ S/cm).

- Marquage et contraintes d'utilisation

Afin de faciliter les observations des cellules, en particulier pour la lyse ou la fusion, l'utilisation d'un marqueur fluorescent est idéale. Pour certaines expériences, les HEK-293 ont été marquées à la calcéine AM (pour acetoxyméthyl), un marqueur cytoplasmique. Ce fluorophore, réputé pour sa stabilité (quenching faible), est un dérivé de la calcéine issu de la modification de ses groupements carboxyliques (très polaires) par des groupements esters (lipophiles). La molécule peut diffuser dans les membranes cellulaires. Une fois à l'intérieur de la cellule, les groupements esters sont hydrolysés par des enzymes présentes naturellement dans la cellule (estérases non spécifiques). Les composés formés, alors chargés et polaires, sont ainsi piégés dans la cellule (**Figure 4.2**). La calcéine AM est incolore et non fluorescente jusqu'à son hydrolyse. Les longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 490 nm et 515 nm.



Figure 4.2 – Principe du marquage à la calcéine AM. La molécule entre dans la cellule où elle est hydrolysée par une enzyme du cytoplasme. La calcéine formée est alors fluorescente et piégée dans la cellule.

L'utilisation d'un marqueur de fluorescence pouvant parfois se révéler toxique pour les cellules[9], nous avons voulu dans un premier temps évaluer l'influence de la calcéine sur la viabilité de HEK-293 en milieu de fusion.

Afin de comparer l'effet du marqueur, des cellules marquées et non marquées ont été observées sous microscope à fluorescence. Pour cela, la moitié d'une flasque de cellules a été placée en présence de calcéine (1% v/v) puis incubée à 37°C pendant 30 min. La seconde moitié non traitée est conservée à l'étuve. Chaque lot de cellules est ensuite préparé séparément selon le protocole décrit précédemment (centrifugations et passage en milieu de fusion). Ceci permet d'éliminer le marqueur en excès dans le lot de cellules marquées et éviter ainsi qu'il ne s'incorpore aux cellules non marquées lors du mélange des deux lots. Une goutte de ce mélange a été observée au microscope à fluorescence (entre lame et lamelle). La **Figure 4.3** présente l'évolution dans le temps de la morphologie des cellules marquées et non marquées.

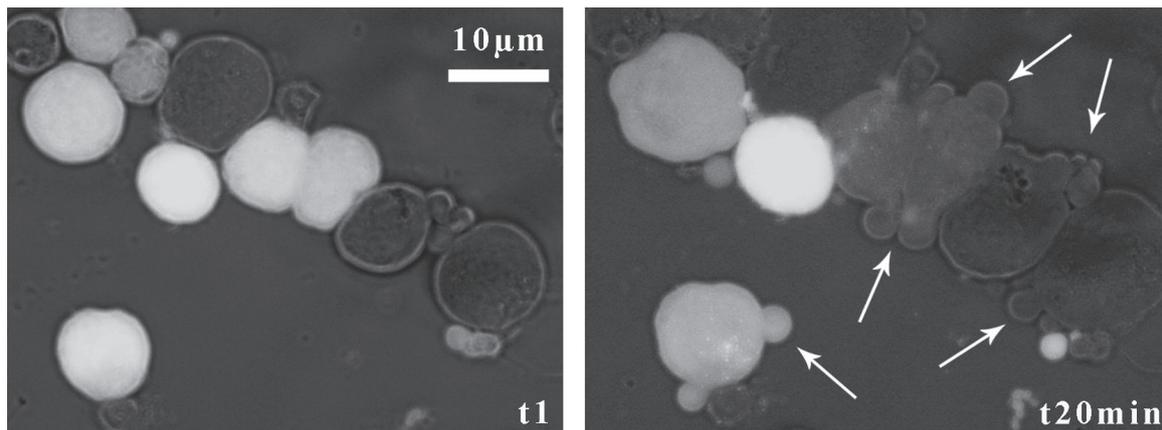


Figure 4.3 – Modifications morphologiques observées sur cellules HEK-293 marquées et non marquées (calcéine AM). Les images sont prises 1 min et 20 min après la dernière remise en suspension dans le milieu de fusion (Eppendorf). Les flèches blanches mettent en évidence les bourgeonnements caractéristiques du processus apoptotique.

Ces photographies correspondent à la superposition d'une image en contraste de phase (toutes les cellules sont visibles) avec une image en fluorescence (seules les cellules marquées sont visibles). Le marquage est très efficace, il est aisé à t_1 (c'est-à-dire à l'instant 1 min après la dernière remise en suspension dans le milieu de fusion) de différencier les cellules marquées à la calcéine AM (ici blanches) des cellules non marquées (sombres). Les cellules sont plutôt sphériques, de diamètre relativement constant ($\sim 10 \mu\text{m}$). Ni le protocole de préparation, ni le marquage ne semblent influencer ici leur morphologie. On admettra qu'à t_1 , les cellules sont en bonne santé.

Des photographies ont été prises régulièrement (toutes les 5 minutes) en prenant soin d'éviter tout phénomène de quenching. A partir de 15 minutes, des bourgeonnements¹ ont été observés à surface de quelques cellules. Ce phénomène, significatif du processus apoptotique, s'étend à l'ensemble des cellules vers 20 minutes d'observation qu'elles soient marquées ou non (**Figure 4.3**). La présence de la calcéine AM ne semble donc pas influencer ce phénomène.

L'expérience de marquage a été reproduite en remplaçant le milieu de fusion par du DMEM beaucoup plus favorable à la viabilité des cellules. L'ensemble du protocole de préparation (centrifugations) est conservé. Les mêmes phénomènes de bourgeonnements sont alors observés mais cette fois après 30-40 minutes d'observation (au lieu de 20 minutes dans le milieu de fusion). Ce dernier, drastiquement appauvri en ions et dénué de nutriments, doit donc probablement induire un stress supplémentaire chez la cellule, ce qui réduit considérablement la durée des expériences.

Les effets cumulés des centrifugations et du changement de milieu sont donc critiques pour la viabilité des cellules. Cependant placer les cellules dans un milieu très faiblement conducteur étant indispensable pour leur manipulation sous champ électrique, nous devons nous contenter d'expériences de courtes durées.

II. ELECTROMANIPULATION DE PARTICULES

II.1 Manipulation électrocinétique de microbilles

L'intérêt des électrodes de cPDMS pour la manipulation électrocinétique de particules a d'abord été mis en évidence par l'utilisation de microbilles de polystyrène ($3 \mu\text{m}$ et $10 \mu\text{m}$). Ces phénomènes ayant déjà fait l'objet d'un certain nombre de travaux (cf. **Chapitre I**), nous avons voulu vérifier que les mêmes comportements pouvaient être retrouvés avec les électrodes de cPDMS.

Les particules ont été injectées dans le canal à l'aide du Fluigent[®]. Après arrêt de l'écoulement, quelques secondes sont nécessaires pour stabiliser le déplacement du liquide et donc des particules dans le microcanal. En absence de champ électrique, ces billes sont dispersées dans tout le canal de manière très homogène (**Figure 4.4.a**). Les billes de $10\mu\text{m}$ de diamètre sont particulièrement immobiles, à l'inverse de celles de $3\mu\text{m}$ qui s'agitent légèrement sous l'effet du mouvement brownien.

On rappelle que le comportement d'une particule sous champ électrique est fonction des paramètres du champ appliqué mais également de ses propriétés diélectriques. Différents protocoles électriques ont été testés en faisant varier l'amplitude et la fréquence des champs électriques appliqués. Trois comportements majeurs décrits dans la littérature ont pu être mis en évidence lors de ces expériences.

¹ « Blebbing » ou « budding » en anglais

- *Formation de chaines/alignements*

Pour des fréquences comprises entre 10 Hz et quelques MHz, des phénomènes d'alignement ont été observés. Les particules s'organisent en chaines parallèles au champ électrique comme présenté sur la **Figure 4.4**. Ce phénomène correspond à l'interaction dipôle-dipôle [10], [11]. L'accumulation de charges non homogènes de part et d'autre de l'interface particule/milieu est à l'origine d'un dipôle induit sur chaque particule (cf. **Chapitre I**) dont l'orientation dépend du signe de la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti. Les charges induites de part et d'autre des particules s'attirent et s'alignent dans le sens du champ électrique.

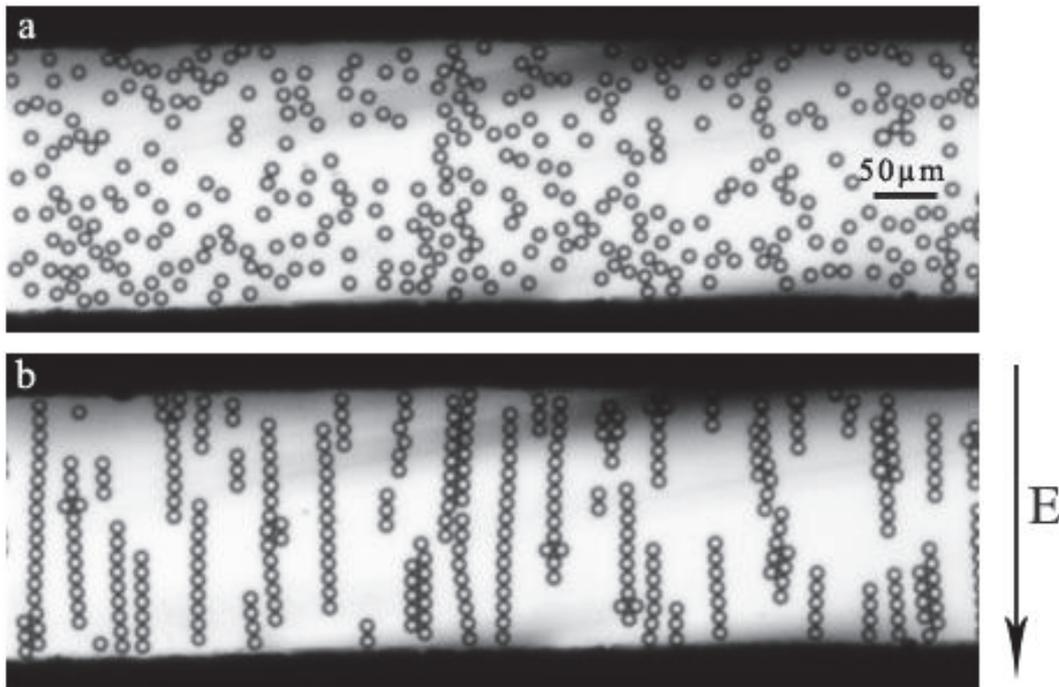


Figure 4.4 – Alignements de microbilles de polystyrène (\varnothing 10 μm , dans l'eau désionisée) sous l'effet d'un champ électrique alternatif ($3 \cdot 10^5$ V/m 500 kHz). Expérience effectuée en microcanal de 200 μm de largeur bordé de deux électrodes de cPDMS (25 %) de 50 μm d'épaisseur.

- Pour des fréquences comprises entre 100 kHz et 5 MHz, la vitesse de formation des chaines semble peu influencée par la fréquence (pour une intensité de champ donnée). Ceci indique que la polarisabilité des billes est sensiblement constante dans cette gamme. En revanche, pour une même fréquence, l'augmentation de l'intensité du champ entraîne un alignement plus rapide des billes entre elles. Ces phénomènes ont été observés pour les deux tailles de billes (10 μm ou 3 μm). Conformément à la littérature [10], le seuil à partir duquel l'organisation en chaîne est effective, a été observé autour de $1 \cdot 10^5$ V/m (cf. **Figure 4.7**). Il s'agit du champ à partir duquel les forces d'interaction particule-particule deviennent supérieures à l'énergie thermique.

- Pour les fréquences inférieures à 100 kHz, ces alignements n'ont été observés que pour des champs électriques présentant une intensité comprise entre $0,5 \cdot 10^5$ et $2 \cdot 10^5$ V/m. L'interaction dipôle-dipôle semble alors plus faible, les alignements étant plus longs à s'organiser et impliquant moins de billes. Pour des intensités supérieures, le phénomène de rotation du à la polarisation mutuelle entre 2 particules voisines l'emporte (cf. **Figure 4.7**).

▪ *Mouvements Zigzag/ vortex (50 Hz – 1 kHz)*

Pour des fréquences comprises entre 10 Hz et 100 kHz, à mesure que l'amplitude augmente, les phénomènes d'alignements sont progressivement remplacés par des phénomènes circulants. En effet, au delà de 1.10^5 V/m, le phénomène de rotation des particules, induit par la polarisation mutuelle des billes voisines, l'emporte sur les alignements dipôle-dipôle. Les billes s'organisent alors sous la forme de bandes en mouvement, plus souvent appelées « zigzag » ou « vortex », qui finissent par s'incliner à 45° par rapport au champ électrique (**Figure 4.5**). On notera également que les billes ne tournent pas dans le même sens selon l'angle formé avec le champ électrique.

L'amplitude du champ semble jouer un rôle important dans ces phénomènes. Ainsi, l'augmentation de l'intensité entraîne une accélération du processus de rotation avec notamment des échanges de particules entre les différents vortex. Autour de 3.10^5 V/m, des mouvements elliptiques légèrement désordonnés commencent à être observés. Au delà de 4.10^5 V/m, les phénomènes deviennent très rapides et très irréguliers mais conservent néanmoins globalement une allure circulante [12].

Par ailleurs, en raison de leur sensibilité à la variation de flux dans le canal, ces phénomènes ont principalement été étudiés en canal de $600\ \mu\text{m}$ de largeur.

Ces vortex sont décrits dans la littérature pour des fréquences comprises entre 100 Hz et quelques kHz dans des conditions similaires aux nôtres (taille de bille, conductivité du milieu) [13]. Ils impliquent des interactions mutuelles entre particules voisines, associées aux effets de rotation induits par relaxation de la double couche [10][14][15]. La coexistence de ces deux mécanismes est à l'origine de ces phénomènes.

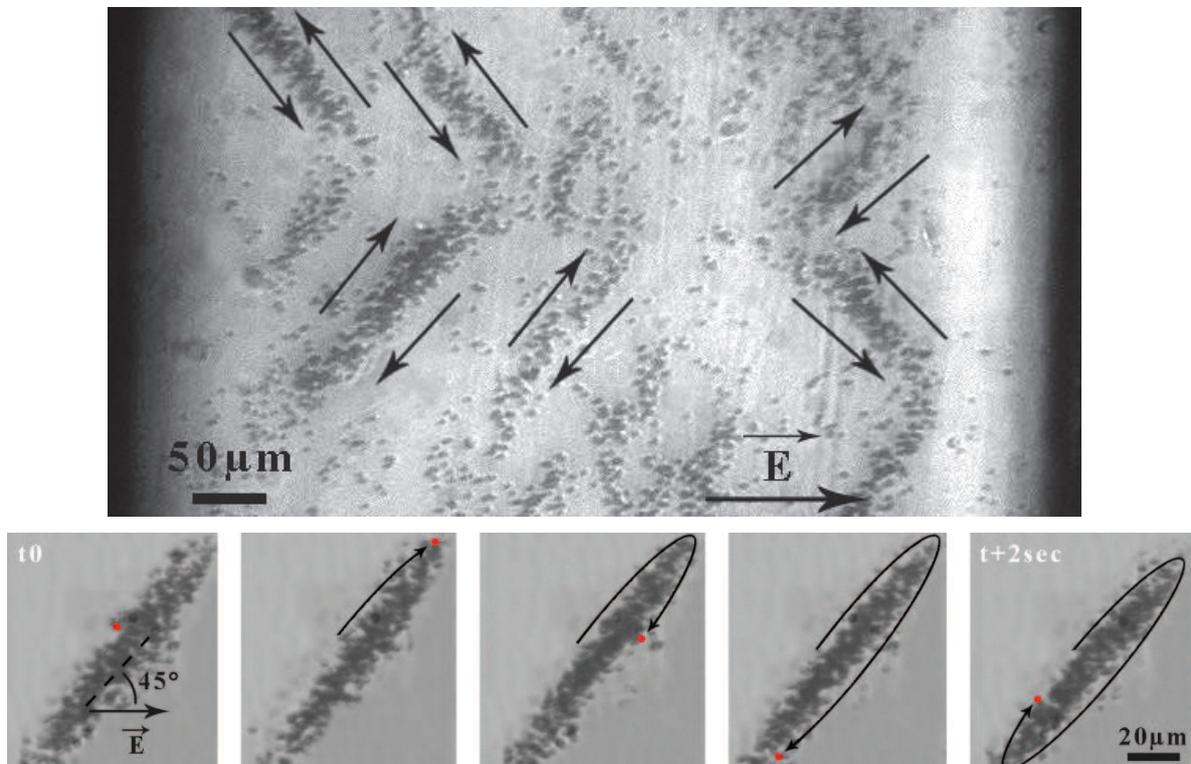


Figure 4.5 – Phénomènes zigzags observés sur des billes de $3\ \mu\text{m}$ dans un canal de $600\ \mu\text{m}$ de largeur à 500Hz et 5.10^4 V/m. Détail du phénomène : les images permettent de suivre la mobilité d'une bille (coloriée ici en rouge) à 500 Hz et 1.10^5 V/m.

- Déplacements latéraux en alternance (0.1 Hz – quelques Hz)

A faible fréquence, c'est-à-dire entre 0.1 Hz et quelques Hz, des mouvements latéraux de billes ont été observés. Les particules se déplacent alternativement en direction d'une électrode puis de l'autre (**Figure 4.6**). D'après nos observations, les paramètres du champ influencent directement les déplacements de billes. Ainsi la fréquence du champ appliquée paraît correspondre à la fréquence d'alternance des particules. Quant à l'amplitude, elle semble proportionnelle à la vitesse de déplacement des billes et donc à la distance parcourue pendant la période donnée.

Ainsi à fréquence constante, si l'on augmente l'amplitude, le déplacement des billes est plus rapide, et donc la distance de migration plus importante. De même, à amplitude constante, les billes se déplacent plus loin pour des faibles fréquences. On notera cependant qu'à ces faibles fréquences, si l'on augmente trop l'amplitude, le courant peut devenir suffisamment important pour permettre l'électrolyse de l'eau, phénomène traduit par l'apparition de bulles d'air dans le canal.

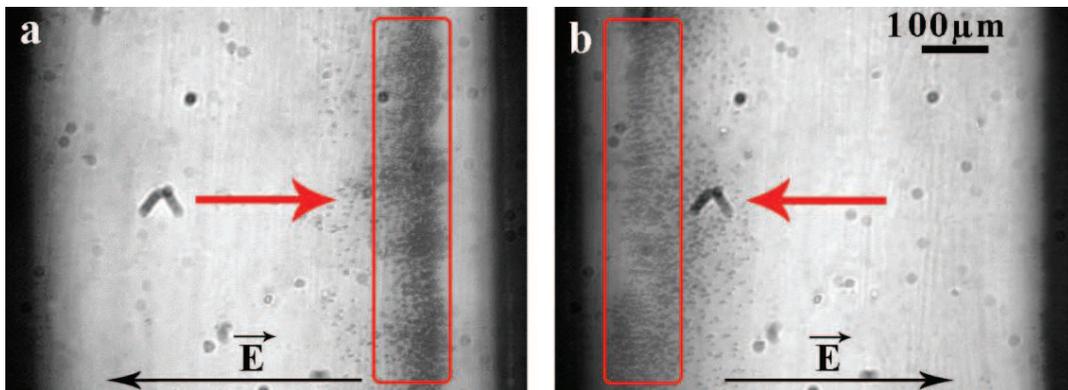


Figure 4.6 – Phénomène de déplacement alternatif de microbilles (3 μm) sous l'effet d'un champ électrique d'1 Hz et $2 \cdot 10^5$ V/m. L'image b correspond à l'image a prise 1/2 sec plus tard. Les expériences sont effectuées dans un canal avec électrodes de cPDMS ($e=50$ μm) séparées de 600 μm.

Ce phénomène semble ici très proche de la migration électrophorétique observée sous un champ électrique continu. En effet, les billes présentant une charge de surface négative (informations obtenues grâce aux mesures de potentiel zêta), elles se déplacent sous l'effet du champ électrique appliqué [16] en direction de l'anode (chargée positivement). L'augmentation corrélée de la vitesse de déplacement des particules avec le champ électrique est cohérente avec la littérature [17].

Cependant, en basse fréquence, il est difficile de discerner tous les phénomènes impliqués (effets électrohydrodynamiques [18][19], processus électrolytiques, électrophorèse) et de conclure sur la mobilité électrophorétique [20].

- Schéma de synthèse

Afin de synthétiser l'ensemble de ces résultats, une cartographie des phénomènes observés a été réalisée sur un seul microsysteme de 200 μm de largeur avec une concentration en billes (3 μm de diamètre) de l'ordre de $2 \cdot 10^6$ particules/mL. La plage de fréquences couverte, comprise entre 0.1 Hz et 1 MHz, correspond à la bande passante de l'ensemble générateur-amplificateur de tension. Les phénomènes observés ont été classifiés en fonction de la fréquence et l'amplitude du champ. Ils sont présentés dans la **Figure 4.7**.

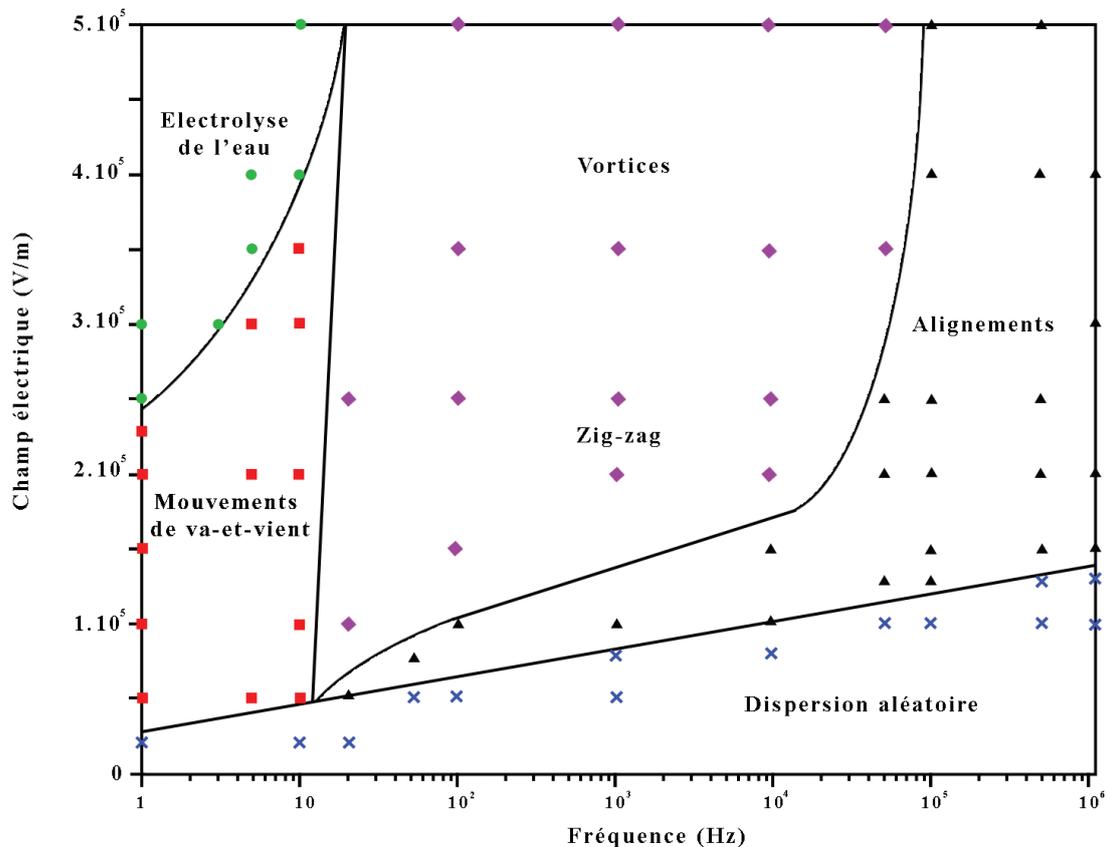


Figure 4.7 – Schéma de synthèse des phénomènes observés pour une suspension de billes ($\text{Ø } 3\mu\text{m}$, dans de l'eau désionisée) dans un microcanal avec électrodes de cPDMS ($50\mu\text{m}$ d'épaisseur) séparées de $200\mu\text{m}$.

Le graphique permet de mettre en évidence différents comportements décrits précédemment. Ces phénomènes sont ici limités entre :

- la répartition aléatoire obtenue lorsque le champ électrique est trop faible pour provoquer l'apparition d'un des phénomènes,
- et l'électrolyse de l'eau conduisant à l'apparition de bulles.

- Conformément à la littérature [10][14], les phénomènes d'alignement dipôle-dipôle ont été observés pour des fréquences supérieures à 100 kHz. L'amplitude du champ est ici particulièrement critique sur la force d'interaction qui détermine la rapidité de formation des chaînes et le nombre de particules concernées. Des filaments de billes ont également été observés pour des fréquences comprises entre 0.1 et 10 kHz, mais seulement pour de faibles amplitudes (inférieures à 10^5 V/m). Ces résultats sont également en accord avec les travaux de Lele *et al* [14].

- Les phénomènes « vortex » ou « zigzags » observés lors de nos expériences ont été obtenus pour des protocoles électriques comparables en fréquence avec la littérature mais pas forcément avec les mêmes valeurs de champ, ce qui peut s'expliquer par la différence de nature et de géométrie d'électrodes [14][13] (**Figure 4.8**). La gamme de fréquences est située entre une centaine de Hz et quelques dizaines de kHz. Nos expériences ont été complétées par des observations à des intensités de champ supérieures. Ainsi pour des amplitudes supérieures à $3 \cdot 10^5$ V/m, les mouvements sont de plus en plus désordonnés [12].

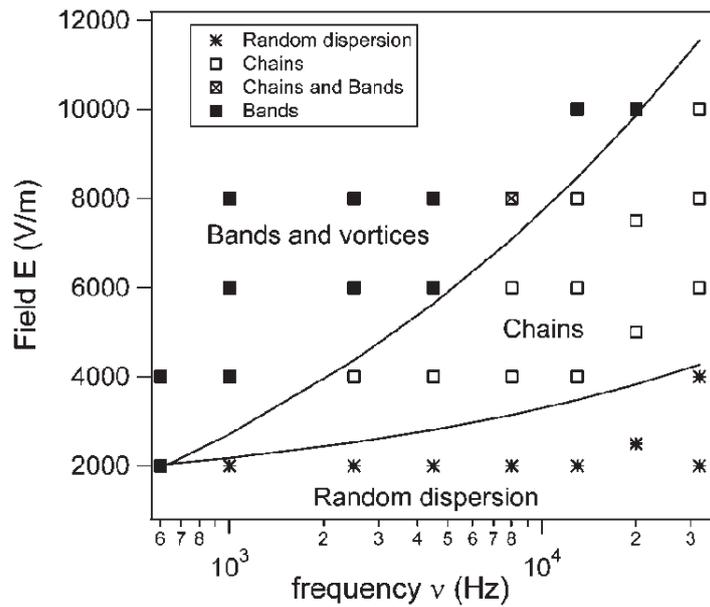


Figure 4.8 – Diagramme des phénomènes observés par Lele *et al* [14] pour une suspension de particules de polystyrène (\varnothing 3 μ m, 10 μ M KCl) placées dans un champ alternatif.

- Pour les plus faibles fréquences, les particules se déplacent alternativement vers l'une ou l'autre des électrodes. Ce phénomène se produit jusqu'à une fréquence d'environ 10 Hz. D'après nos observations, la vitesse de déplacement des billes dépend de l'intensité du champ, la fréquence du champ déterminant la durée du mouvement. L'intensité est toutefois limitée par l'électrolyse de l'eau autour de $3 \cdot 10^5$ V/m. Compte tenu de l'ensemble de phénomènes électrohydrodynamiques pouvant être observés à basse fréquence, il n'est ici pas rigoureux de définir ces mouvements comme étant la seule conséquence de l'électrophorèse.

On notera qu'il est difficile de déterminer avec précision les fréquences et amplitudes de transition entre les différents phénomènes. Il ne s'agit pas en effet d'une limite distincte mais véritablement d'une zone plus ou moins large dans laquelle les deux phénomènes coexistent. L'un des deux phénomènes prend progressivement l'ascendant sur l'autre. Par exemple la **Figure 4.9** présente le passage d'alignements en chaînes à des mouvements « zigzags ». Ainsi lorsque la fréquence est réduite progressivement de 10^5 Hz à 10^4 Hz (à $2 \cdot 10^5$ V/m), les chaînes de billes commencent par se rapprocher latéralement, puis les phénomènes circulatoires apparaissent, ce qui permet aux billes de s'aligner perpendiculairement au champ électrique (avant de former des vortex).

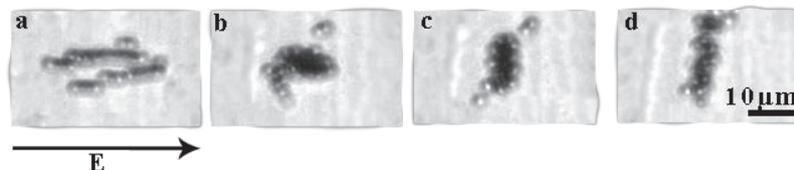


Figure 4.9 – Changement d'organisation des billes avec la diminution de la fréquence: 10^5 Hz (a), $6 \cdot 10^4$ Hz (b), $3 \cdot 10^4$ Hz (c), 10^4 Hz (d) à amplitude constante ($2 \cdot 10^5$ V/m).

Si les observations décrites à la **Figure 4.9** sont cohérentes avec les travaux de Lele *et al* [14], elles vont néanmoins à l'encontre des conclusions de Holzapfel *et al* [21]. Ces derniers expliquent que la vitesse et le sens de la rotation induite entre particules voisines dépendent de leur position relative par

rapport au champ. Ils précisent ainsi que des particules parfaitement alignées, selon une ligne parallèle au champ, ne devraient pas entrer en rotation sous l'effet de la polarisation mutuelle (cf. **Chapitre 1**). Cependant, nos mesures étant effectuées avec des billes de $3\ \mu\text{m}$, celles-ci peuvent être plus facilement sujettes aux variations d'écoulement dans le canal et à l'agitation thermique. Elles ne restent donc, d'après nous, jamais parfaitement alignées et peuvent ainsi provoquer la rotation des cellules adjacentes.

▪ Conclusion :

L'ensemble des comportements observés dans ce paragraphe (alignements dipôle-dipôle, vortex) sont conformes à la littérature et retrouvés dans des gammes de fréquences et d'amplitudes comparables. Ceci montre que les électrodes de cPDMS sont adaptées pour une utilisation dans la gamme de fréquences généralement utilisée lors de manipulation de microbilles. Le paragraphe suivant présente les résultats obtenus en présence de cellules.

II.2 Manipulation électrocinétique de cellules

II.2.a Manipulation de bactéries

Quelques expériences préliminaires sur bactéries ont été réalisées. Comme précédemment, les canaux ($200\ \mu\text{m}$ de largeur) sont traités avec une solution de BSA 1% puis laissés pendant 2h à l'étuve à 37°C . Cette étape de saturation est indispensable pour éviter tout phénomène d'adsorption des bactéries à la surface du verre. Les protocoles sont identiques à ceux appliqués pour les billes. Les comportements tels que les zigzags, les mouvements de va-et-vient et les alignements ont été retrouvés pour des paramètres électriques comparables. Les expériences ont cependant été principalement focalisées sur la formation de chaînes parallèles aux champs électriques appliqués dans le canal.

De manière très similaire aux billes, les bactéries s'assemblent en chaînes (**Figure 4.10.b**) sous l'effet du champ pour des fréquences comprises entre 100 kHz et quelques MHz. Avec l'augmentation de l'amplitude ($3 \cdot 10^5\ \text{V/m}$, 1 MHz), les filaments s'associent latéralement par groupes de 10-20 (**Figure 4.10.c**). Le phénomène est réversible, puisque les bactéries se dispersent immédiatement après arrêt du champ (**Figure 4.10.d**).

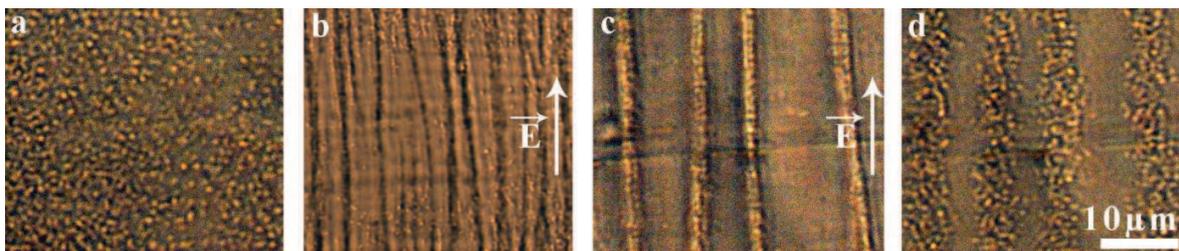


Figure 4.10 – Bactéries *E. Coli* en absence de champ (a), sous $1\text{MHz}/2 \cdot 10^5\text{V/m}$ (b), sous 1MHz et $3 \cdot 10^5\text{V/m}$ (c) et enfin 1 seconde après l'arrêt du champ électrique (d). Expériences effectuées dans un canal microfluidique avec électrodes de cPDMS (épaisseur $50\ \mu\text{m}$) séparées de $200\ \mu\text{m}$.

Ces expériences préliminaires ont mis en évidence le potentiel des électrodes en cPDMS pour la manipulation d'entités biologiques. L'utilisation de champs électriques pour diriger l'organisation de micro-organismes pourrait par exemple faciliter la formation de biofilms [22] qui font l'objet de nombreuses études depuis une dizaine d'années du fait de leur vaste domaine d'applications [23].

II.2.b Manipulation de cellules HEK-293

Les cellules HEK-293, préparées dans le milieu de fusion, sont injectées dans un canal microfluidique de 200 μm de largeur avec électrodes de cPDMS ($e=50 \mu\text{m}$). En absence de champ électrique, la répartition des cellules est assez homogène. A l'arrêt du Fluigent[®], les cellules sont immobiles mais restent parfois sujettes aux écoulements résiduels dans le canal.

Différents protocoles électriques ont été testés en faisant varier l'amplitude et la fréquence des champs électriques appliqués. Les expériences ont cependant été axées sur les alignements compte tenu de leur intérêt avéré dans de nombreuses applications microfluidiques.

▪ Filaments de cellules

Pour les fréquences allant de quelques kHz au MHz, des phénomènes d'alignement ont été observés. Les HEK-293 s'assemblent progressivement en chaînes perpendiculaires au canal, selon les lignes de champ électrique. Comme décrit précédemment, ce phénomène résulte de la polarisation des cellules sous l'effet du champ à l'origine d'interactions dipôles-dipôles. Comme pour les microbilles, l'intensité du champ joue un rôle déterminant sur la rapidité d'assemblage des filaments et le nombre de cellules impliquées. Cependant, deux comportements différents correspondant aux phénomènes de diélectrophorèse positive et négative ont été ici mis en évidence. En effet, la rugosité des électrodes peut induire, par effet de pointe, des inhomogénéités de champ électrique.

Par ailleurs, la seule présence des cellules contribue à rendre le champ non uniforme et permet le déplacement des cellules par diélectrophorèse comme cela a été démontré numériquement par Kua *et al* [24]. Leurs travaux précisent que la force diélectrophorétique induite par les inhomogénéités de champs dues aux cellules augmente avec la taille des particules mais également lorsque celles-ci sont proches des parois du canal.

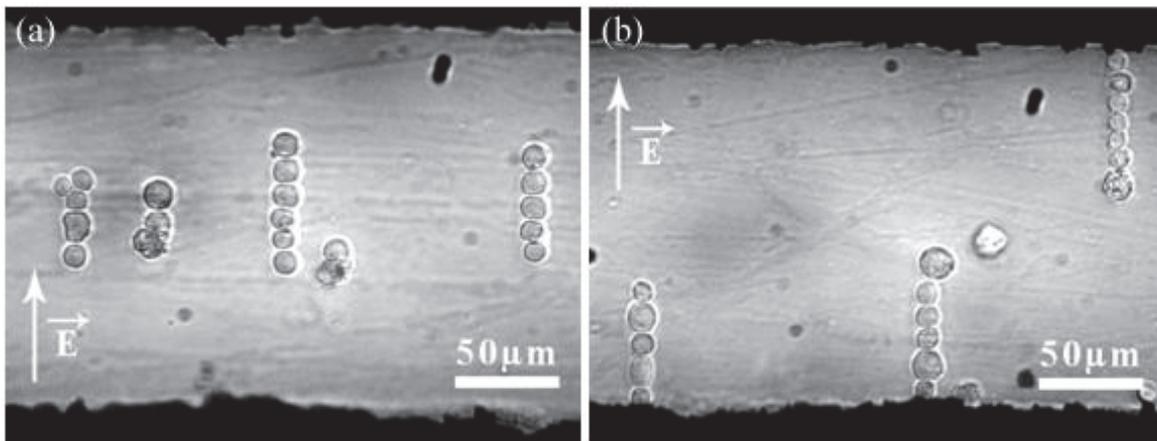


Figure 4.11 – Alignement de HEK-293 par diélectrophorèse (a) négative à 10 kHz (b) et positive à 1 MHz (Amplitude constante 2.10^5 V/m). Expérience réalisée en microcanal de 200 μm de largeur avec électrodes de cPDMS de 50 μm d'épaisseur.

- Pour les fréquences comprises entre 1 et 50 kHz, les cellules s'assemblent en chaînes tout en restant centrées dans le canal comme présenté sur la **Figure 4.11.a**. Ce comportement est caractéristique de la diélectrophorèse négative (cf. **Chapitre I**) pour laquelle les cellules, en présence d'un gradient de champ électrique, se déplacent vers les minima de champ. La nDEP se produit habituellement dans une gamme de fréquences similaire (pour des milieux de conductivité comparable) [25].

- Pour les fréquences allant de 100 kHz à quelques MHz, les billes s'assemblent toujours en chaînes mais sont cette fois préférentiellement accrochées à l'une des électrodes (**Figure 4.11.b**). Ce comportement traduit le fait que les cellules sont soumises à la diélectrophorèse positive puisqu'elles se rapprochent des maxima de champ. Ces phénomènes de pDEP sont d'ailleurs généralement rencontrés pour des fréquences comparables (pour des milieux de conductivité similaires) [25].

▪ Rotation de cellules

Pour les fréquences intermédiaires, c'est à dire comprises entre 50 et 100kHz, les cellules ne s'alignent plus et restent isolées les unes des autres. Ce phénomène est habituellement retrouvé lors du passage entre la pDEP et la nDEP [26], c'est-à-dire lorsque la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti devient nulle (à la fréquence de « cross-over »).

Les expériences ont également révélé des phénomènes de rotation de cellules dans cette gamme de fréquences. Ces observations étant effectuées après arrêt du Fluigent® et quelques minutes de stabilisation, seule l'application du champ électrique a pu être responsable de ces phénomènes, d'autant plus que ceux-ci s'arrêtent immédiatement après coupure du champ. En variant le champ appliqué, plusieurs facteurs modulant ces phénomènes de rotation ont pu être mis en évidence. Les vitesses de rotations ont été caractérisées manuellement à partir d'images extraites de fichiers vidéo. Ainsi, en suivant une aspérité sur la membrane des cellules (représentée par un point rouge sur la **Figure 4.12**), et connaissant la vitesse d'acquisition de la caméra, il est possible de remonter à la vitesse de rotation de la cellule.

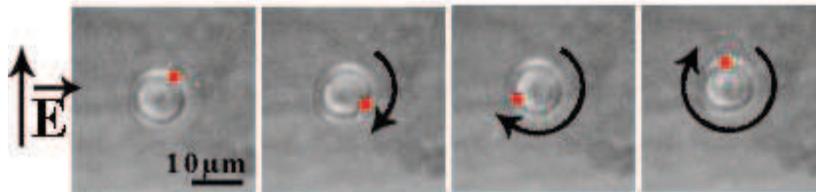


Figure 4.12 – Rotation d'une cellule HEK-293 sous l'effet d'un champ électrique alternatif de 80 kHz et 1.10^5 V/m. Expérience réalisée en microcanal de 200 μ m de largeur avec électrodes de cPDMS de 50 μ m d'épaisseur.

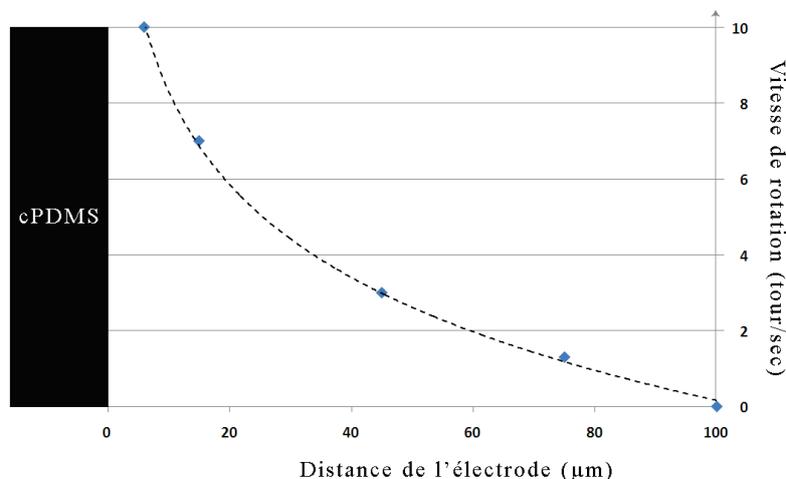


Figure 4.13 – Influence de la distance électrode-cellule sur sa vitesse de rotation. Mesures effectuées en canal de 200 μ m de largeur à 80 kHz et 1.10^5 V/m avec électrodes de cPDMS de 50 μ m d'épaisseur.

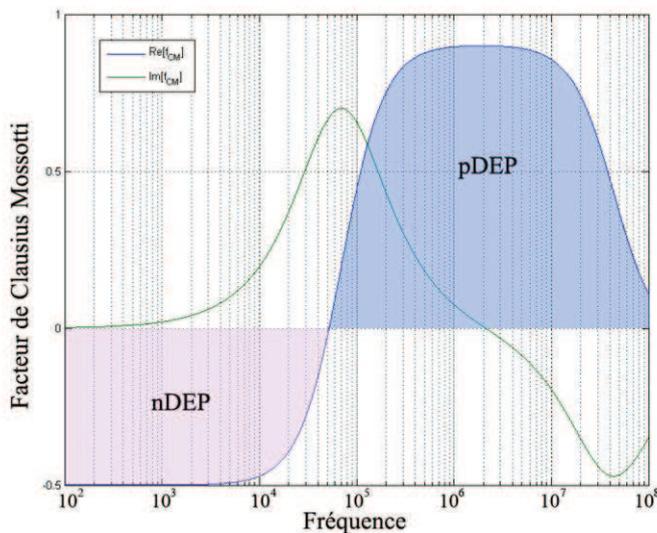
Les mesures ont mis en évidence que la vitesse de rotation des cellules :

- augmente avec l'amplitude appliquée (à fréquence constante),
- dépend directement de la fréquence appliquée (à amplitude constante) selon une allure gaussienne centrée autour de 80 kHz pour laquelle la vitesse de rotation est maximale,
- est fonction de la position des cellules dans le canal. Ainsi, comme le présente la **Figure 4.13**, plus les cellules sont proches des électrodes de cPDMS plus la vitesse de rotation est élevée. Inversement, les cellules sont immobiles au centre du canal.

Les phénomènes de rotation de cellules sont habituellement la conséquence d'une interaction mutuelle avec d'autres cellules se trouvant à proximité [14][15]. Nos mesures ont pourtant révélé que certaines cellules pouvaient être en rotation alors qu'elles étaient isolées, et notamment lorsqu'elles se trouvaient à proximité des électrodes. Holzapfel *et al* [21] ont également décrit des rotations de cellules isolées lorsque celles-ci se trouvent dans une perturbation du champ électrique. Ils précisent que des irrégularités locales dans la structure ou la composition des électrodes peuvent être considérées comme équivalentes à la présence d'une autre cellule. Ceci semble donc particulièrement cohérent avec nos observations.

▪ Spectre diélectrophorétique des HEK-293

Les paramètres diélectriques des cellules HEK-293 ont récemment été caractérisées par électrorotation par Zimmermann *et al* [7]. Ces résultats, (cf. **Tableau 4.1**) associés à l'expression du facteur de Clausius-Mossotti (selon le modèle « single-shell » [27]) nous ont permis de tracer le spectre diélectrophorétique théorique des HEK-293 pour nos conditions de mesures (milieu de fusion). Il est présenté sur la **Figure 4.14**.



$$f_{CM(\omega)} = \frac{rC_m(\epsilon_c^* - \epsilon_e^*) - \epsilon_c^*\epsilon_e^*}{rC_m(\epsilon_c^* + 2\epsilon_e^*) + 2\epsilon_c^*\epsilon_e^*}$$

Avec :

$$r = 5e^{-6}m$$

$$C_m = 8,5e^{-3}F.m^{-2}$$

$$\epsilon_c = 71$$

$$\epsilon_e = 80$$

$$\sigma_e = 10^{-2}S.m^{-1}$$

$$\sigma_c = 0,533S.m^{-1}$$

Figure 4.14 – Spectre diélectrophorétique des cellules HEK-293 tracé pour nos conditions expérimentales à partir de données extraites de la littérature [7][27].

Pour l'interprétation de ce spectre, nous ne tiendrons compte que des fréquences utilisées lors des mesures avec les cellules, c'est à dire comprises entre 100 Hz et quelques MHz.

La fréquence de cross-over (changement de signe de la partie réelle du f_{CM}) est ainsi théoriquement observée pour 50 kHz. Pour les fréquences inférieures, la $Re[f_{CM}]$ est négative, ce qui est cohérent

avec le phénomène de nDEP observé dans cette gamme. Inversement, au delà de 50 kHz la $Re[f_{CM}]$ est positive conformément au phénomène de pDEP mis en évidence dans cette gamme de fréquence. L'intensité de la $Im[f_{CM}]$ est maximale pour une fréquence de 70 kHz, ce qui correspond quasiment à la fréquence pour laquelle les phénomènes de rotation observés étaient les plus rapides (80 kHz).

Les observations sont donc conformes aux prévisions théoriques, ce qui prouve que les électrodes de cPDMS sont adaptées pour ce type de mesures.

▪ Caractérisation des alignements

Les cellules étant formées d'un cytoplasme entouré d'une membrane souple, celles-ci sont facilement déformables sous l'effet de contraintes. Pour caractériser les alignements de cellules, l'évolution de la surface de contact entre les cellules a été étudiée en fonction de la fréquence d'alignement. Contrôler le contact entre deux cellules peut s'avérer crucial dans des applications telles que la fusion de cellules.

Pour cette étude, des cellules ont été alignées en microcanal de cPDMS par des champs électriques de fréquence comprise entre 10 kHz et 1 MHz (à amplitude constante 10^5 V/m).

Un paramètre de comparaison est élaboré afin de caractériser quantitativement le contact entre les cellules. Pour ne pas négliger l'influence de la dimension d'une cellule sur l'autre, leurs périmètres sont pris en compte. Le paramètre (R) est ici défini comme le rapport entre la longueur de contact et le périmètre moyen des deux cellules adjacentes :

$$R = \frac{2D_c}{P_1 + P_2} 100 \quad \text{(Equation 4.1)}$$

Avec D_c , la longueur de contact entre deux cellules, P_1 et P_2 , les périmètres des deux cellules.

Considérons le cas idéal dans lequel les cellules sont de dimensions sensiblement identiques, il sera admis qu'elles subissent la même influence du champ électrique et qu'elles présentent la même déformabilité. L'influence de la déformation des cellules durant l'expérience est également limitée en admettant que le périmètre reste constant. Une étude basée sur les volumes des cellules et la surface de contact aurait été plus complète mais ces mesures ne visent ici qu'à évaluer la fréquence optimale d'alignement.

Les conditions limites ont d'abord été définies. Ainsi R est nul lorsque les cellules ne sont pas en contact. Inversement, R atteint sa valeur maximale si les deux cellules sont confondues, ce qui est physiquement absurde. C'est pourquoi, de manière à rendre cette formule plus cohérente avec la réalité, la valeur maximale de ce rapport est fixée pour une D_c égale au diamètre initial de la cellule. Ceci est néanmoins une limite arbitraire car, à notre connaissance, aucun élément dans la littérature ne caractérise la déformation limite (avant rupture de la membrane) des HEK-293. La valeur de R_{max} est ainsi définie pour 31,8%.

L'évolution du contact cellule-cellule est présentée en fonction de la fréquence sur la **Figure 4.15**. Chaque mesure est une moyenne effectuée sur plus d'une vingtaine de cellules. Si, les écarts types sont importants, c'est qu'ils sont directement le reflet de la variabilité de près de 14% dans la distribution des diamètres des cellules. Celle-ci peut dépendre de la distribution de taille assez variable des cellules mais également du plan focal dans lequel sont effectuées les mesures.

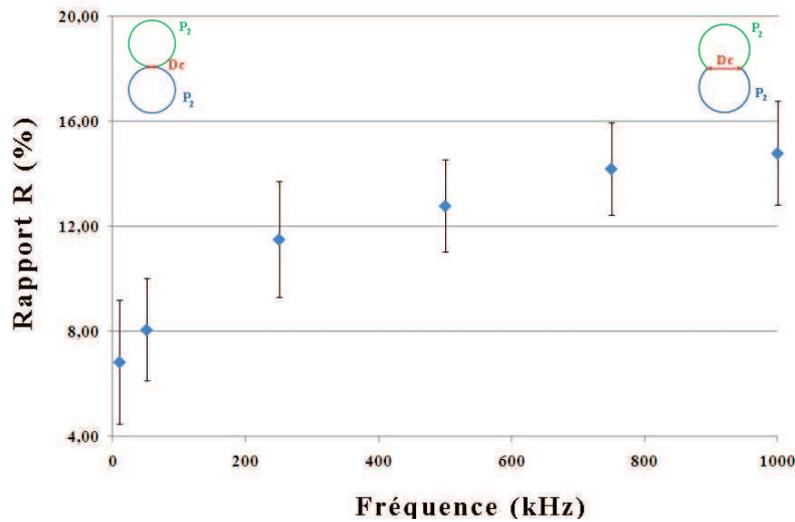


Figure 4.15 – Evolution du contact entre les cellules en fonction de l'évolution de la fréquence à amplitude constante (ici 10^5 V/m) dans un canal de $200\mu\text{m}$ de largeur.

Il apparaît ici que le contact entre les cellules varie avec la fréquence. En effet, pour les fréquences de 1 et 10 kHz, les forces d'alignement sont plus faibles que pour les fréquences supérieures à 250 kHz. Par exemple, le contact entre deux cellules est pratiquement doublé entre 1 kHz et 500 kHz (**Figure 4.15**).

Il est donc préférable d'utiliser une fréquence supérieure à 250 kHz (pDEP) si l'on souhaite un contact maximal entre les cellules. Ceci est d'ailleurs cohérent avec la définition de la force diélectrophorétique (**Equation 1.5**). En effet, d'une part le terme ∇E^2 est plus important vers les maxima de champ, d'autre part la partie réelle du f_{CM} est près de deux fois plus élevée en pDEP comme présenté sur la **Figure 4.14**. N'envisageant pas d'utiliser des fréquences plus élevées que le MHz en raison de la limite de la bande passante de l'amplificateur, on admettra dans la suite du manuscrit que les alignements optimaux sont obtenus pour des fréquences comprises entre 500 kHz et 1 MHz.

▪ Conclusion

L'ensemble des comportements observés dans ce paragraphe (nDEP, rotation, pDEP) est conforme à la théorie et à la littérature. Par ailleurs les alignements effectués à basse fréquence ont mis en évidence l'apparition de phénomènes de lyse avec l'augmentation de l'amplitude du champ. Leur caractérisation fait l'objet du paragraphe suivant.

III. LYSE DE CELLULES

La lyse de cellule par voie électrique est directement basée sur le phénomène d'électroporation, c'est-à-dire la formation de pores dans la membrane induite par l'application d'un champ électrique intense. A partir d'un seuil critique, dépendant de la taille de la cellule et du champ appliqué (amplitude, durée), le mécanisme d'électroperméabilisation devient irréversible (cf. **Chapitre I**). La membrane se fracture et la cellule se vide de son contenu.

Le chapitre I présente quelques exemples de microsystèmes intégrant des fonctions de lyse cellulaire. Ce type de procédé est notamment employé comme étape préliminaire à l'analyse du contenu d'une cellule. Si la lyse est généralement réalisée par l'application de champs pulsés, les travaux publiés récemment semblent privilégier l'utilisation de champs alternatifs. Ces derniers permettent notamment de limiter l'électrolyse de l'eau et de réduire le nombre de paramètres électriques à ajuster.

III.1 Protocoles électriques

Après préparation en milieu de fusion (décrit précédemment), les HEK-293 sont injectées dans le microcanal. Les cellules sont d'abord alignées en chaînes à 500 kHz et $2 \cdot 10^5$ V/m (pDEP). Cette étape permet à la fois de contrôler que le système d'électrodes est opérationnel (absence de mauvais contact) mais également, en maintenant les cellules les unes contre les autres, de minimiser l'effet des écoulements qui perturbent parfois l'observation des cellules. Différents paramètres électriques de lyse inspirés de la littérature [6] ont été testés.

- Lyse induite par signal impulsionnel

Le protocole électrique est décrit dans le **Tableau 4.2**. Le nombre d'impulsions, ainsi que leur période sont restés fixes, tandis que leur largeur et amplitude ont été variées :

Série	4 impulsions
Période	1 ms
Largeur	10 μ s - 1 ms
Champ	1 - $3,5 \cdot 10^5$ V/m

Tableau 4.2 – Paramètres testés lors des expériences de lyse en impulsions

Ces paramètres sont contrôlés par une interface Labview[®] développée au laboratoire Ampère. L'observation de ces impulsions à l'oscilloscope permet de vérifier leur allure et plus particulièrement le bon respect des périodes et des largeurs d'impulsions. En effet, si le générateur permet théoriquement d'atteindre des largeurs d'impulsions inférieures à la microseconde, l'amplificateur ne permet concrètement pas de les atteindre pour de fortes amplitudes. Les mesures à l'oscilloscope ont ainsi pu déterminer que pour des largeurs inférieures à 10 μ s, les signaux générés sont limités par la bande passante de l'amplificateur et ne sont plus carrés. Nous ne sommes pas descendus en dessous de cette durée.

- Lyse induite par signal sinusoïdal

Les protocoles électriques sont plus simples à mettre en œuvre car seules la fréquence et l'amplitude du champ électrique sont à déterminer. La gamme de fréquences explorée s'étend de 1 kHz à 500 kHz ce qui correspond à ce qui peut être relevé dans la littérature (cf. **Chapitre I**). Pour chaque fréquence, l'amplitude est augmentée progressivement par paliers jusqu'à l'observation de la lyse.

III.2 Résultats de lyse de cellules HEK-293

- Résultats de lyse induite par signal impulsionnel

La **Figure 4.16**, présente un résultat de lyse obtenue par champ pulsé.

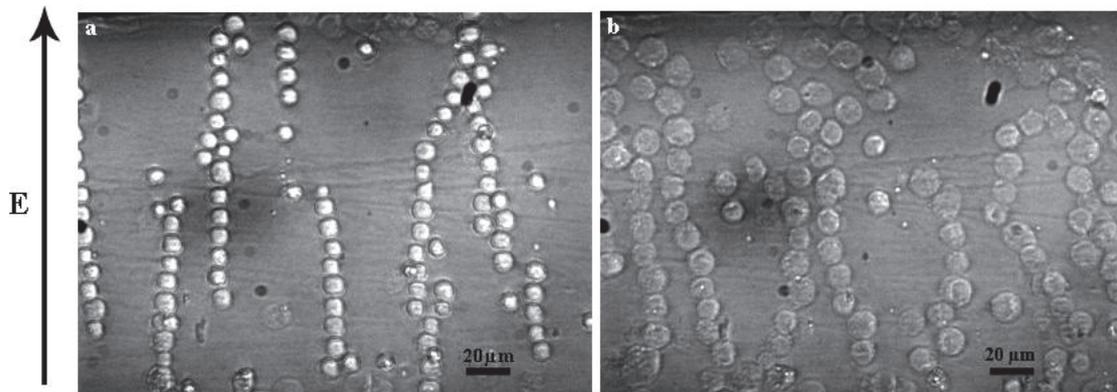


Figure 4.16 – Observation (contraste de phase) de cellules HEK-293 avant (a) et après (b) lyse par application de 4 impulsions d'1 ms de largeur et $3 \cdot 10^5$ V/m de hauteur (séparés d'1 ms).

Les observations en contraste de phase permettent de distinguer les cellules du milieu extracellulaire. Avant la lyse (a), les cellules sont alignées par pDEP (500 kHz, $2 \cdot 10^5$ V/m). Après l'application des impulsions (b), les cellules changent radicalement de morphologie. Le changement de contraste des membranes des cellules laisse supposer la destruction de la membrane même si les cellules conservent une allure sphérique. Elles présentent un diamètre en moyenne deux fois supérieur qui reflète une anomalie dans le contrôle de l'osmolarité. La structure des cellules après l'application des impulsions est caractéristique des « ghost cells » [28][29].

De manière à confirmer qu'il s'agit ici bien de lyse et non pas d'un simple gonflement des cellules par osmose suite à l'électroporation, une étude avec marqueur est indispensable. Les mesures ont été effectuées sur des HEK-293 marquées à la calcéine AM (1%). La fluorescence des cellules a été suivie avant et après l'application des impulsions. Un exemple de mesure est présenté sur la **Figure 4.17**.

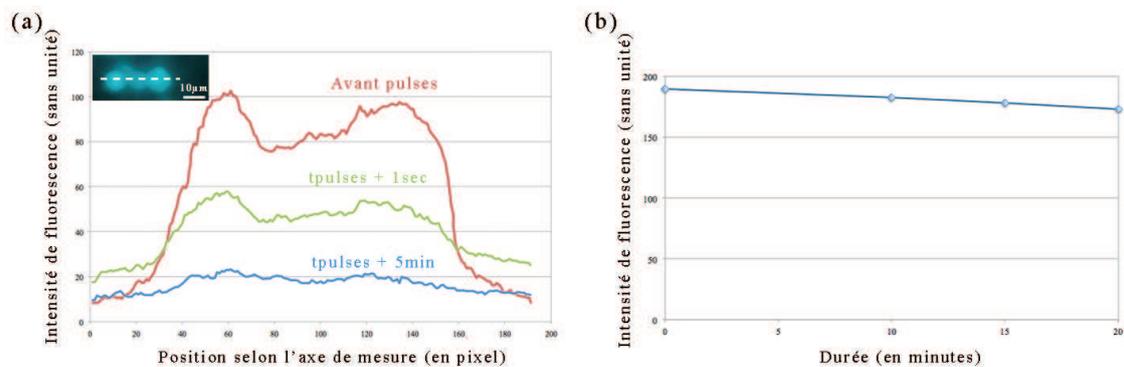


Figure 4.17 – (a) Suivi de l'intensité de fluorescence de 3 cellules HEK-293 marquées à la calcéine avant (rouge), 1 seconde après (vert) et 5 minutes après (bleu) l'application de 4 impulsions de 1 ms et $3 \cdot 10^5$ V/m séparés d'1ms. (b) Evolution de la fluorescence sur 20 minutes d'une cellule non exposée à un champ électrique. Expériences réalisées dans un microcanal de $200 \mu\text{m}$ de largeur avec électrodes de cPDMS de $50 \mu\text{m}$ d'épaisseur. Mesures effectuées avec le logiciel AxioVision® (Zeiss).

Les courbes de fluorescence sont tracées selon l'axe d'alignement des cellules comme présenté sur la photographie. Le premier spectre (en rouge), tiré d'une mesure effectuée avant les impulsions, permet de distinguer les profils des cellules alignées par pDEP, ainsi que la ligne de base correspondant à la fluorescence du milieu de suspension.

Grâce à l'interface Labview[®], une série de 4 impulsions (1 ms, $3 \cdot 10^5$ V/m) espacées d'1 ms est appliquée immédiatement après l'arrêt des champs d'alignement (500 kHz, $2 \cdot 10^5$ V/m). Le second spectre (en vert) présente le profil de fluorescence des cellules relevé 1 seconde après l'application des impulsions. Une diminution de la fluorescence de près de 50 % est observée, ce qui pourrait signifier que près de la moitié du cytoplasme est sorti de la cellule (en négligeant le quenching **Figure 4.17.b**). Ceci est d'ailleurs corrélé à l'augmentation de la fluorescence du milieu extracellulaire. 5 minutes après l'application des impulsions, la fluorescence des cellules est d'intensité sensiblement proche de celle du bruit de fond mesuré avant la lyse. Cela semble signifier que le marqueur est sorti presque entièrement (près de 80%) des cellules et s'est progressivement dispersé dans le canal sous l'effet de la diffusion.

Ces résultats confirment que le marqueur est sorti des cellules sous l'effet des impulsions et donc qu'il y a bien eu électroporation massive.

Dans le cadre d'un travail préliminaire à la fusion cellulaire, nous avons cherché à déterminer les paramètres d'électroporation réversible. Les résultats sont synthétisés sur la **Figure 4.18** pour des largeurs d'impulsion comprises entre 10 et 2000 μ s et d'amplitude comprise entre 1 et $3,5 \cdot 10^5$ V/m. Nous avons défini arbitrairement une limite entre lyse et non lyse lorsque 70% de cellules sont lysées.

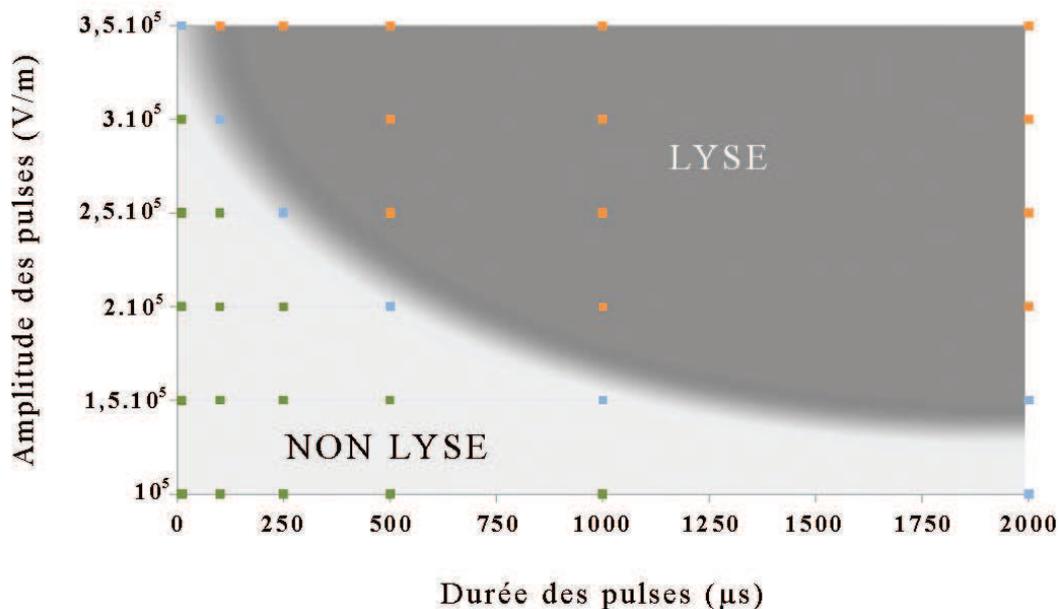


Figure 4.18 – Tableau de synthèse de l'influence des paramètres des impulsions sur la lyse (orange) ou non lyse (vert). La limite (bleu) est établie pour un rendement de 70% de lyse. Mesures effectuées dans un microcanal de 200 μ m de largeur avec électrodes de cPDMS de 50 μ m d'épaisseur.

La **Figure 4.18** met en évidence le rapport entre la durée des impulsions et leur amplitude. Ainsi, la réduction de la largeur des impulsions nécessite d'être compensée par l'augmentation du champ. Inversement, l'application d'impulsions de longue durée permet de diminuer les champs nécessaires. On notera que la détermination des conditions limites de lyse renseigne sur le seuil de réversibilité de la membrane des cellules. L'identification de ce seuil est justement indispensable dans des applications où l'électroporation nécessite d'être réversible.

▪ Résultats de lyse induite par champ alternatif

Les électrodes de cPDMS ont ensuite été utilisées pour lyser des cellules par des protocoles impliquant des champs alternatifs. Les cellules HEK marquées sont injectées dans le microcanal puis soumises à un champ de fréquence donnée. L'amplitude est alors augmentée jusqu'à l'observation des phénomènes de lyse. La **Figure 4.19** présente un exemple de lyse par champ alternatif ici effectuée à 10 kHz (nDEP).

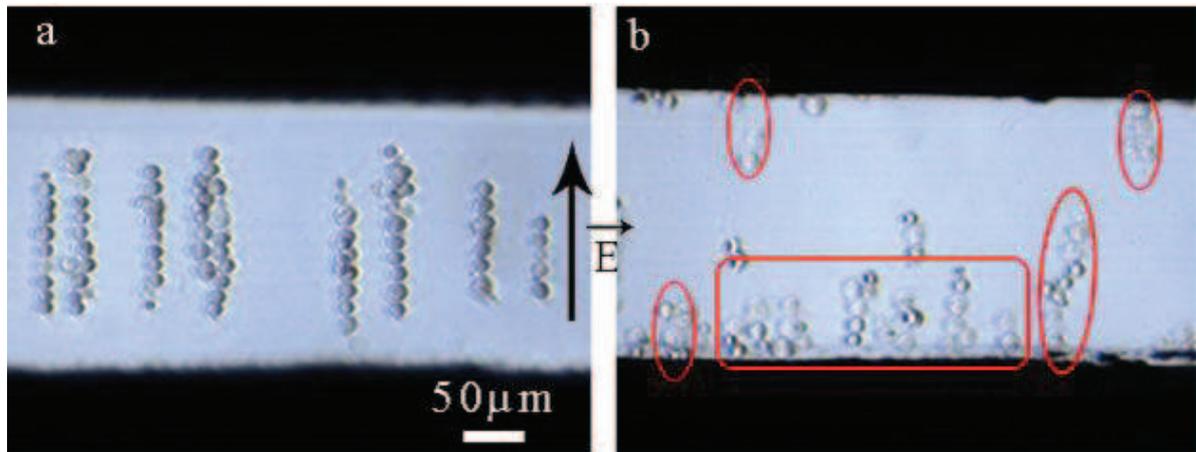


Figure 4.19 – Mise en évidence du phénomène de lyse en sinus. (a) Les cellules HEK-293 sont alignées par l'application d'un champ alternatif de 10kHz et 10^5 V/m. (b) L'augmentation de l'amplitude du champ conduit à la lyse des cellules, ici à partir de 2.10^5 V/m. Mesures effectuées dans un microcanal de 200 μ m de largeur avec électrodes de cPDMS de 50 μ m d'épaisseur

A 10 kHz, les cellules sont assemblées en filaments globalement centrés au milieu du canal sous l'effet de la nDEP. L'augmentation progressive de l'amplitude provoque la lyse de cellules à partir de 2.10^5 V/m.

Cependant nos mesures ont révélé que les cellules lysées tendent à se rapprocher de la paroi des électrodes. Ce phénomène traduisant le passage de la nDEP à la pDEP est conforme aux observations décrites dans la littérature [30][31]. La déstructuration de la membrane induit une modification des propriétés diélectrique de la cellule (ϵ_p^*) se répercutant sur l'évolution de $\text{Re}[f_{CM}]$ en fonction de la fréquence, d'où la différence de comportement diélectrophorétique observée entre cellules lysées et non lysées (cf. **Chapitre I**). Ce phénomène est ici intéressant pour l'identification des cellules lysées pour les fréquences inférieures à 80 kHz.

La **Figure 4.20** présente les différents comportements des cellules HEK-293 en fonction des paramètres du champ testés. Elle met en évidence le rapport entre la fréquence et l'amplitude du champ. Pour les plus faibles fréquences, les cellules sont lysées à partir de $1,5.10^5$ V/m, soit le champ nécessaire pour lyser avec des impulsions de longue durée (cf. **Figure 4.18**). On peut également remarquer que pour lyser des cellules à des fréquences supérieure à 50 kHz, il est nécessaire d'augmenter l'amplitude. A partir de ce seuil, plus la fréquence est élevée, plus il faut augmenter l'intensité du champ afin d'être en mesure d'observer la lyse.

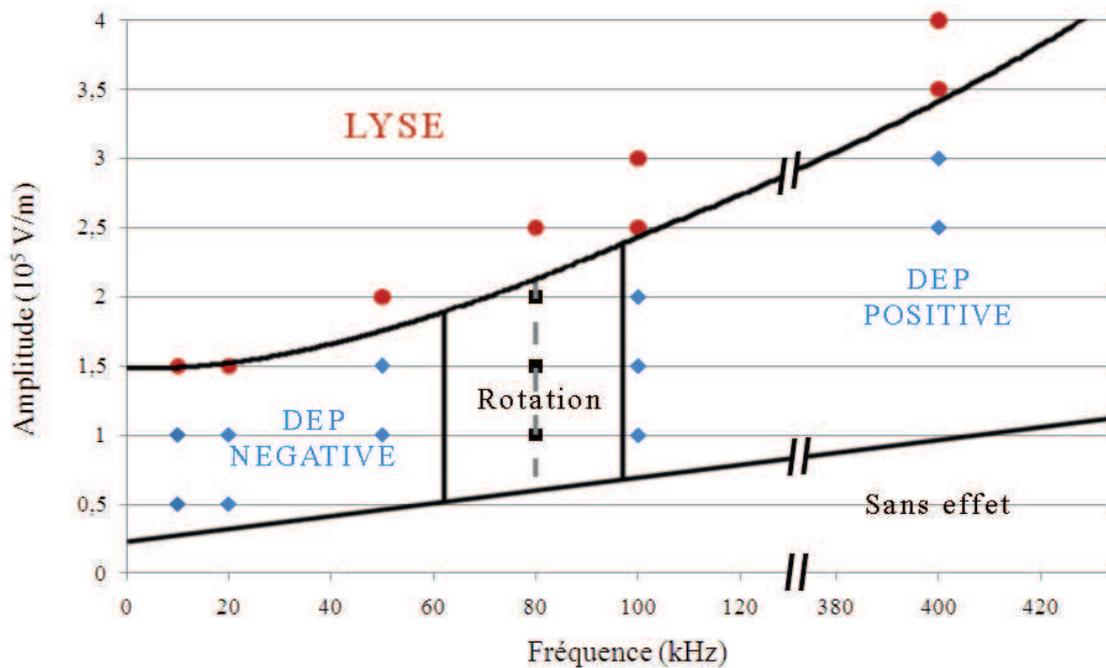


Figure 4.20 – Synthèse de l’influence de la fréquence et de l’amplitude du champ sur le comportement des cellules HEK-293. Mesures effectuées dans un microcanal de 200 μm de largeur avec électrodes de cPDMS de 50 μm d’épaisseur.

Afin d’évaluer la cohérence de ces observations, l’évolution théorique du TMP (pour un champ donné) est tracée en fonction de la fréquence du champ d’après la relation de Schwann (Equation 1.14). La courbe, présentée sur la **Figure 4.21**, met en évidence qu’il est théoriquement nécessaire d’appliquer une intensité de champ plus élevée pour des fréquences supérieures à 10 kHz ce qui reste du même ordre de grandeur que nos observations.

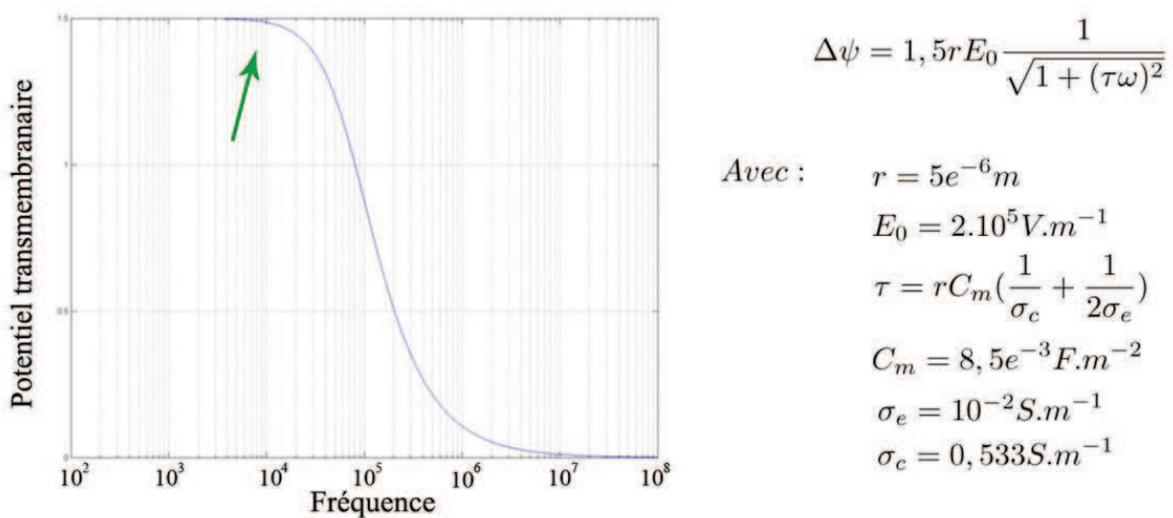


Figure 4.21 – Evolution du TMP en fonction de la fréquence du champ appliqué. Les paramètres électriques de la cellule sont tirés de [7].

▪ Conclusion

Que ce soit via des champs impulsionsnels ou alternatifs, des expériences des lyses ont été réalisées avec succès sur cellules HEK-293 (avec ou sans marquage). Par ailleurs, la détermination des paramètres limites de lyse (Figure 4.18 et 4.20) permet d'ouvrir des perspectives quant à l'utilisation du cPDMS pour des applications basées sur l'électroporation réversible. Le paragraphe suivant présente les étapes de mise au point d'un dispositif microfluidique avec électrodes de cPDMS dédié à l'électrofusion de cellules.

IV. ELECTROFUSION DE CELLULES

IV.1 Expériences préliminaires

La majorité des dispositifs dédiés à la fusion retrouvés dans la littérature permettent de concentrer localement le champ électrique (**Figure 1.32**). Quelques microsystèmes intégrant des électrodes épaisses parallèles sont aussi rapportés. Le champ électrique ainsi produit présente l'intérêt d'être uniforme sur toute la hauteur du canal [32][33]. Des expériences d'électrofusion ont donc été effectuées à l'aide de dispositifs intégrant des électrodes épaisses de cPDMS. En plus d'être simples et rapides à réaliser, ces systèmes ayant déjà été utilisés pour la lyse permettent de se baser sur les paramètres d'électroporation réversible mis au point dans le paragraphe précédent.

Pour ce type d'expérience, le protocole se déroule généralement en trois étapes (**Figure 4.22**) :

- un appariement des deux cellules d'intérêt. Comme dans la plupart des dispositifs dédiés à la fusion de cellules, nous avons choisi de réaliser cette étape par diélectrophorèse. Conformément aux résultats présentés sur la **Figure 4.15**, l'appariement a été effectué à 500 kHz (2.10^5 V/m), soit en diélectrophorèse positive ($F_{pDEP} > F_{nDEP}$).
- Pour cette application, le phénomène d'électroporation doit être réversible. Il est donc nécessaire de se placer juste à la limite de la lyse, de manière à favoriser la formation d'un grand nombre de pores tout en évitant de dépasser le seuil de perméabilisation réversible (**cf. Chapitre I**). D'après la littérature, l'électrofusion peut s'effectuer par la succession de 1 à 9 impulsions dont la durée est située entre 10 et 100 μ s (**cf. Tableau 1.5**). Différents protocoles à base de champs pulsés ont été testés. Ils sont basés sur les résultats de lyse présentés sur la **Figure 4.18**, c'est à dire composés de 4 impulsions séparées d'1 ms. Leur durée est variée entre 10 et 1000 μ s et leur amplitude entre 10^5 et 3.10^5 V/m.
- Enfin, de manière à favoriser la fusion des membranes, les cellules peuvent être maintenues en contact pendant toute la durée de maturation (20 – 30 min). Cette étape post-fusion a ici été réalisée par diélectrophorèse positive (500 kHz, 2.10^5 V/m).

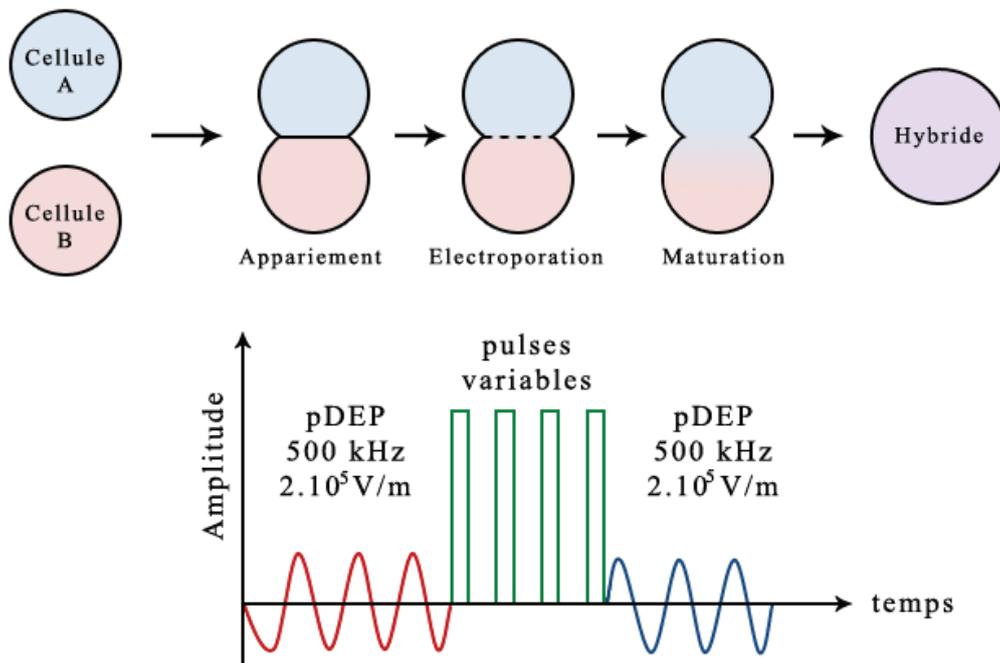


Figure 4.22 – Schéma présentant le principe de l'électrofusion de cellules ainsi que protocole électrique utilisé dans nos expérimentations.

▪ **Résultats**

Pour ces expériences préliminaires, un seul type de cellule (HEK-293) a été injecté dans le canal. L'appariement A+B n'étant ici pas nécessaire, les cellules ont été alignées par DEP en chaînes de 5 à 15 cellules chacune. Différents protocoles d'électroporation ont été réalisés. Ainsi pour chaque durée d'impulsion (10, 100, 250, 500 ou 1000 μ s), les expériences ont été répétées en augmentant progressivement l'amplitude (de 0,5 à $3 \cdot 10^5$ V/m) tout en prenant soin de laisser entre 20 et 30 min de maturation. Parmi l'ensemble des expériences effectuées, si aucune fusion n'a pu être démontrée, plusieurs phénomènes ont cependant été mis en évidence :

- Il est difficile de définir les paramètres pour électroporabiliser simultanément des cellules de tailles différentes. Conformément à la relation de Schwann (cf. **Chapitre I**), les plus grosses cellules ont tendance à se lyser pour des amplitudes plus faibles sans que les petites cellules ne soient affectées par les pulses.
- L'application de champs peut parfois induire le « collage » de groupe de deux ou trois cellules. Même après arrêt de la diélectrophorèse, d'après nos observations, les cellules restent attachées de manière irréversible. Ces phénomènes ont notamment été obtenus avec les champs pulsés les plus courts. La **Figure 4.23** présente l'évolution d'une chaîne de cellules (alignées par pDEP selon le protocole décrit précédemment) après l'application d'une série de 4 impulsions électriques de 10 μ s ($3 \cdot 10^5$ V.m⁻¹). Les images sont prises durant la maturation (entre 1 et 10 min après le protocole d'électroporation). Juste après les impulsions (+1 min), les cellules sont encore relativement bien distinctes et dissociées les unes des autres. Après 5 min de maturation, les cellules, ayant la même morphologie que les « ghost cells » présentées sur la **Figure 4.23**, semblent lysées. Cependant, après 10 min, les cellules ne sont plus vraiment différenciables et paraissent former une sorte d'agrégat cellulaire entouré d'une membrane unique. Au delà de 10 min, les observations n'ont mis en évidence aucune

évolution significative. A l'arrêt de la pDEP, des mouvements de flux ont été effectués, à l'aide du contrôleur d'écoulements, afin d'essayer de dissocier cet amas de cellules. Ces tests n'ont pas permis de séparer ces agrégats. Si ce comportement peut s'apparenter à de la fusion, d'autres expériences en présence de calcéine AM n'ont cependant pas mis en évidence de transfert de cytoplasme entre les cellules collées.

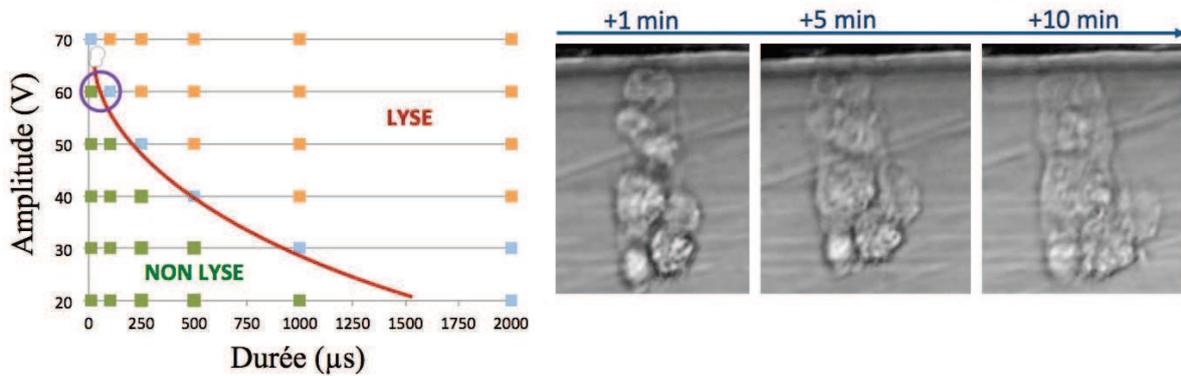


Figure 4.23 – Exemple d'expérience de fusion réalisée par l'application d'une série de 4 pulses ($10\mu s$, $3.10^5 V.m^{-1}$, séparés d'1 ms). Les photographies sont prises durant la maturation qui s'effectue avec maintien des cellules par pDEP ($500 kHz$, $2.10^5 V.m^{-1}$). Mesure réalisée dans un canal de $200 \mu m$ de largeur avec électrodes de cPDMS de $50 \mu m$ d'épaisseur.

▪ Conclusion

L'idée de ces expériences préliminaires était d'évaluer, à partir d'un dispositif de base simple et rapide à réaliser, l'intérêt du cPDMS pour la mise en œuvre d'un procédé complexe tel que la fusion de cellules. Si, au vu des résultats de diélectrophorèse et de lyse, les électrodes semblent adaptées à ce type d'application, elles nécessitent cependant d'être intégrées dans un dispositif optimisé pour l'électrofusion. En effet, la majorité des microsystèmes dédiés à ce procédé sont plus complexes (cf. **Tableau I.X**). Le paragraphe suivant présente la mise au point du dispositif avec électrodes épaisses de cPDMS dédié à l'électrofusion.

IV.2 Mise au point d'un microsystème dédié à l'électrofusion

Le développement de ce microsystème passe par l'étude des problématiques liées à la méthode. Le cahier des charges décrit pour la mise au point du dispositif est le suivant :

- le système doit assurer un appariement de type A + B le plus simple possible,
- le phénomène d'électroporation doit être localisé afin d'agir spécifiquement sur les cellules d'intérêt,
- le dispositif doit intégrer des électrodes de cPDMS et utiliser d'un procédé de microfabrication relativement simple.

Pour la réalisation de ce dispositif, nous avons ici fait le choix de combiner les avantages des principaux dispositifs retrouvés dans la littérature (cf. **Tableau I.5**) :

- Les méthodes d'appariement de cellules intégrées dans les microsystemes dédiés à l'électrofusion, sont particulièrement complexes à mettre en œuvre. Par exemple le dispositif de Skelley *et al* [34] nécessite d'alterner les sens d'injection des cellules. Le système à membrane décrit par Kimura *et al* [35] requiert de retourner plusieurs fois le dispositif. Le système d'appariement développé ici a donc été inspiré de pièges hydrodynamiques issus des travaux de Tan *et al* [36] et de Teshima *et al* [37]. Il permet d'assurer exclusivement des appariements de A + B. Très simple à mettre en œuvre, il permet également d'éviter la formation indésirable de chaînes parfois observées dans la littérature [34][35].

- La technique pour concentrer localement le champ électrique a été, en revanche, directement inspirée des multiples travaux de Washizu [1][38][35][39][40]. Décrite dans le chapitre I, cette méthode consiste à concentrer les lignes de champ dans une zone d'intérêt à l'aide d'un matériau diélectrique. Elle permet d'une part de diminuer les tensions nécessaires pour atteindre le seuil d'électroperméabilisation de la cellule, mais également d'éviter d'agir sur toutes les cellules présentes dans le canal.

Nous avons imaginé un dispositif combinant un appariement hydrodynamique et la structure de Washizu. Il est présenté sur la **Figure 4.24**. La géométrie du microcanal a été étudiée pour favoriser la fusion spécifique entre deux types de cellules (A et B). Afin d'assurer cette spécificité, l'idée d'injecter chaque type cellulaire dans un canal indépendant a été retenue. Des ouvertures, de taille inférieure au diamètre d'une cellule, sont ajoutées entre ces deux canaux pour assurer un point de contact entre une cellule A et une cellule B et y concentrer les lignes de champ électrique. Ces pièges ont été dimensionnés de manière à ne retenir qu'une seule cellule de chaque type et donc éviter la formation de chapelets.

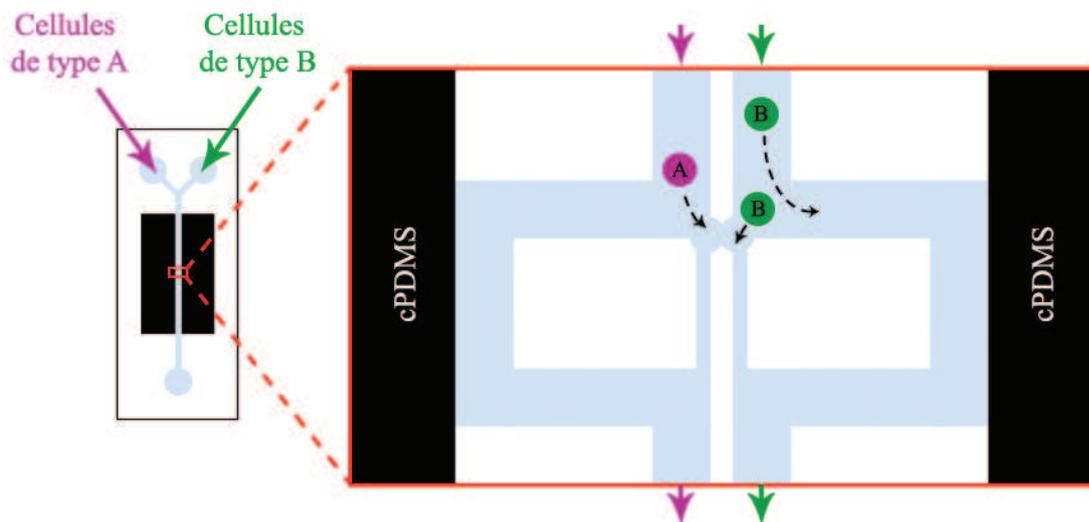


Figure 4.24 – Représentation schématique du dispositif d'électrofusion mis au point. Les deux types de cellules sont injectés par deux canaux séparés d'un mur de PDMS. Des petites ouvertures dans le PDMS permettent le contact entre deux cellules. Des pièges hydrodynamiques favorisent le positionnement d'une seule cellule de part et d'autre de ces ouvertures.

La mise au point et l'optimisation du système ont été effectuées à l'aide d'un logiciel de simulation par éléments finis (Comsol®).

IV.2.a Simulations hydrodynamiques

Chaque piège est dimensionné pour une cellule de 10 µm de diamètre (par canal). L'« aspiration » d'une cellule a lieu grâce à un canal de 3 µm de large permettant le passage de liquide mais pas celui des cellules. Cette structure assure le positionnement précis d'une cellule unique juste devant une ouverture dans la séparation entre les deux canaux. L'orifice de 5µm entre les 2 parties assure le contact entre les cellules tout en empêchant de les laisser passer (**Figure 4.25**).

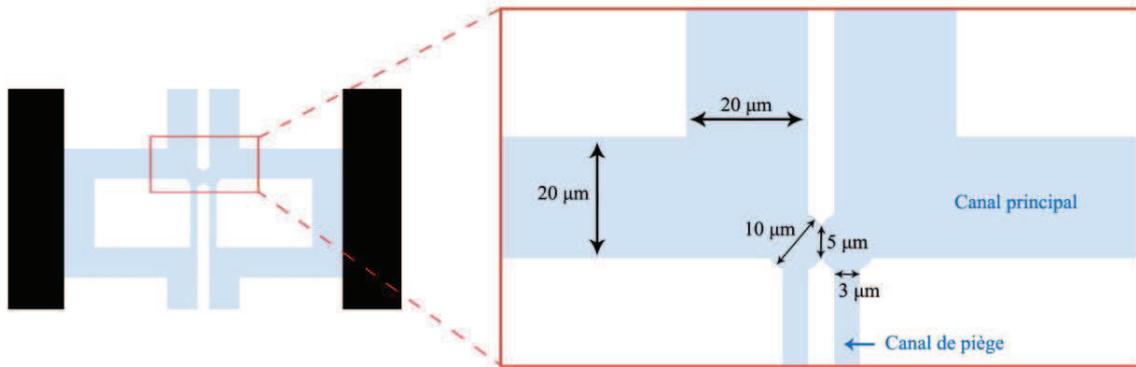


Figure 4.25 – Dimensions des pièges hydrodynamiques.

Les pièges hydrodynamiques sont basés sur les résistances microfluidiques des microcanaux. Leur dimensionnement permet alors de favoriser les écoulements vers les zones désirées. La résistance fluidique d'un microcanal est donnée par l'équation de Darcy-Weisbach [36][37] :

$$\Delta P = \frac{C(\alpha)\mu LQP^2}{32A^3} \quad (\text{Equation 4.2})$$

Avec ΔP la résistance du canal, $C(\alpha)$ une constante dépendant d'un facteur d'aspect et du nombre de Reynolds. μ la viscosité du milieu, L la longueur du canal, Q le débit, P le périmètre du canal ($2 \times$ hauteur $h + 2 \times$ largeur l), et A la section du canal ($h \times l$).

Ainsi si l'on souhaite favoriser le passage des cellules dans le piège, il est donc possible:

- d'agrandir les dimensions du canal de piège. Ceci n'est ici pas envisageable puisque les cellules pourraient être aspirées dedans.
- de diminuer la section du canal principal, ce qui n'est possible que dans une certaine limite. En effet celui-ci doit permettre le passage des cellules. Nous l'avons ainsi limité volontairement à 20 µm (largeur et épaisseur).
- d'augmenter la longueur du canal principal, ce qui ne pose qu'une limite d'encombrement et d'optimisation des dimensions (notamment en ajoutant des serpentins).

La détermination du rapport entre les résistances microfluidiques (en y intégrant les dimensions de nos canaux) permet ici de déterminer à partir de quelle longueur de canal principal, les écoulements s'effectuent préférentiellement dans le piège :

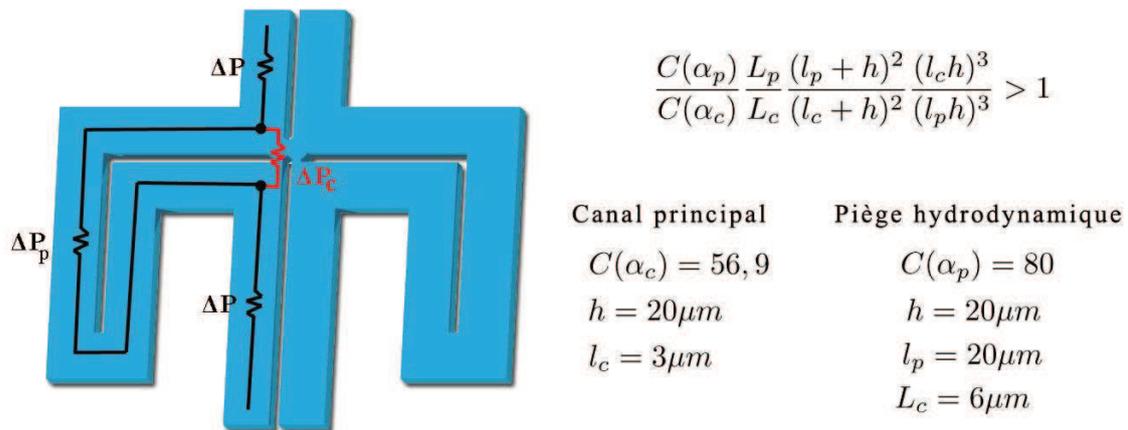


Figure 4.26 – Paramètres pris en compte pour le calcul du rapport entre les résistances fluidiques

Ainsi, la longueur du canal principal doit être supérieure à 800 μm pour qu'une cellule aille préférentiellement dans le piège hydrodynamique. Différentes simulations (de vitesse d'écoulement) ont été effectuées de manière à confirmer l'influence de l'augmentation de la longueur du canal principal. Elles sont présentées sur la Figure 4.27.

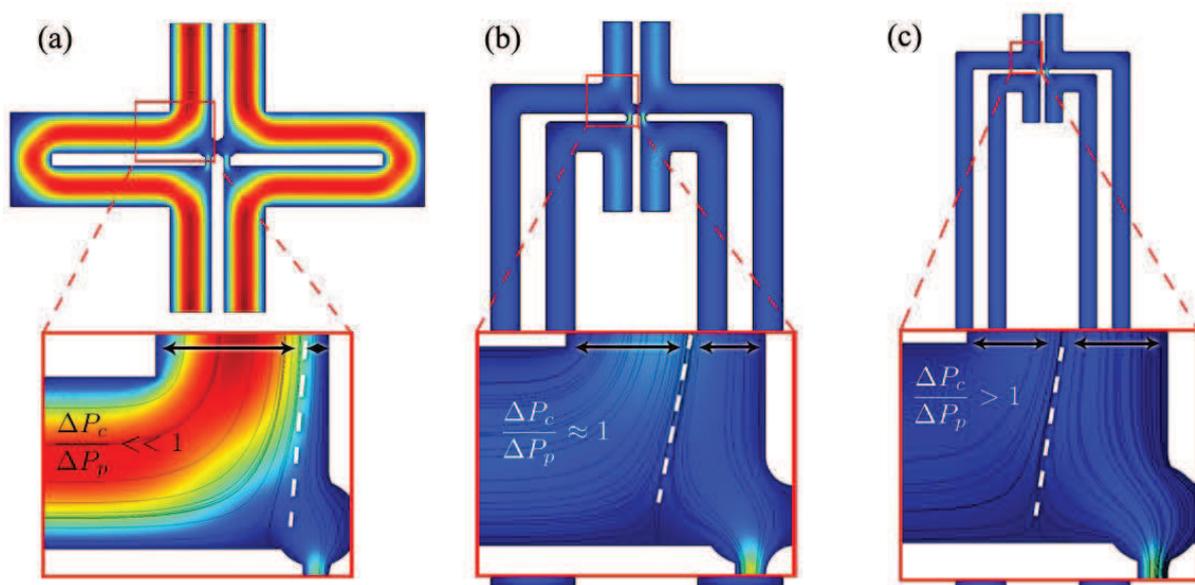


Figure 4.27 – Simulations de l'influence de la longueur du canal microfluidique sur la vitesse d'écoulement dans le piège hydrodynamique. (a) 250 μm , (b) 800 μm et (c) 1200 μm .

Toutes les simulations sont à la même échelle.

Les simulations mettent ici en évidence que l'augmentation de la distance du canal principal favorise les écoulements dans le piège. Ainsi à 250 μm (Figure 4.27.a), la résistance fluidique du canal principal étant largement inférieure à celle du piège, l'écoulement s'effectue préférentiellement dans le canal principal. Pour une longueur de 800 μm (Figure 4.27.b), où $\Delta P_p \approx \Delta P_c$, le phénomène tend à s'équilibrer. L'effet est encore plus significatif lorsque la longueur du canal principal est de 1200 μm (Figure 4.27.c). Les écoulements s'effectuent alors majoritairement dans le piège ($\Delta P_p > \Delta P_c$).

La position spatiale d'une particule avant l'intersection entre le canal principal et le piège est alors déterminante sur son parcours. La ligne blanche en pointillée (**Figure 4.27**) met en évidence l'influence du rapport $\Delta P_p/\Delta P_c$ sur le déplacement d'une particule (représenté ici par des lignes noires) au niveau de l'intersection. Si le centre de la particule est situé sur la gauche de cette ligne, elle s'orientera dans le piège. Inversement, si son centre est sur la droite de cette ligne, la particule ira préférentiellement dans le canal principal. Ceci confirme que l'augmentation de la longueur du canal principal privilégie le passage d'une particule dans le piège.

Pour nous, le bon compromis entre la longueur du canal et l'efficacité du piège est situé à l'équilibre des résistances fluidiques ($\Delta P_p \approx \Delta P_c$). Ces conditions sont suffisantes pour la capture de cellule avec une probabilité de l'ordre de 50%, tout en évitant de trop réduire le nombre de pièges par dispositif.

IV.2.b Simulations électriques

Des simulations du comportement du champ électrique dans ce type de géométrie ont été effectuées. Elles sont présentées sur la **Figure 4.28**. La concentration du champ électrique dans la zone d'appariement des cellules permet ici d'augmenter significativement sa valeur. La différence de potentiel appliquée est ici de 10 V, soit un champ théorique de $0,5 \cdot 10^5$ V/m (électrodes séparées de 200 μm). Cependant, la structure diélectrique permet de concentrer ce champ jusqu'à un facteur 5 (**Figure 4.28.c**). Ces simulations, conformes aux travaux de Washizu [38], mettent ici en évidence l'intérêt d'une telle géométrie pour l'électrofusion de cellules.

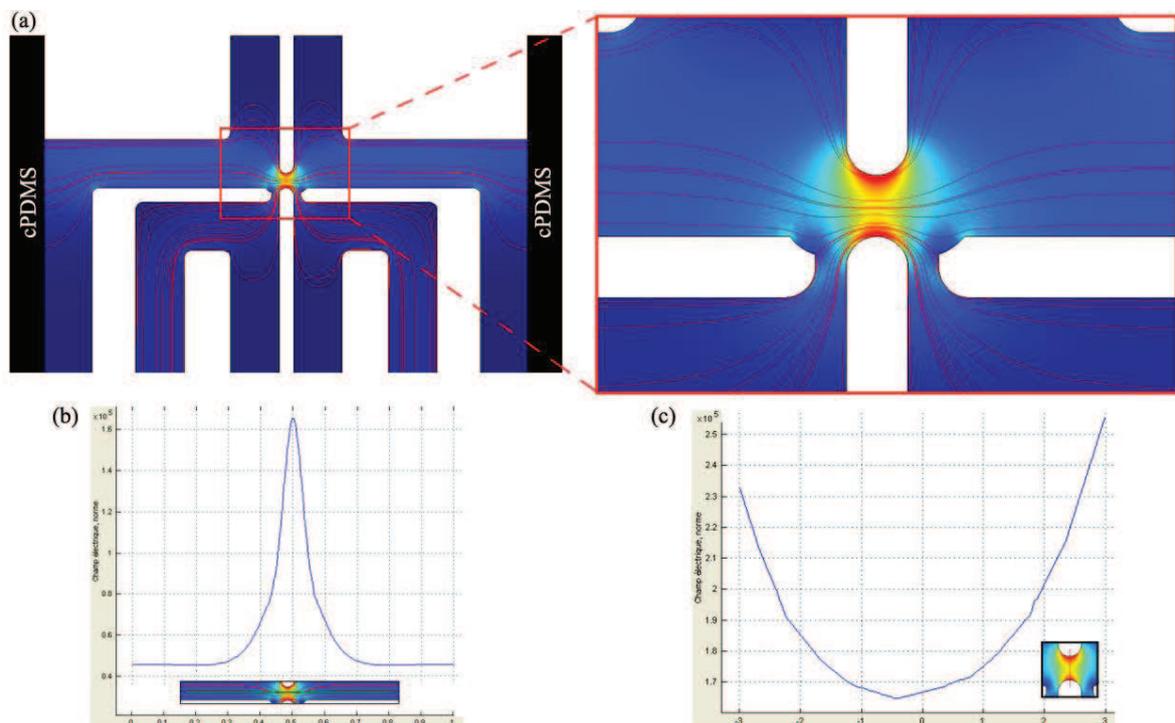


Figure 4.28 – (a) Simulations de la répartition du champ électrique dans le canal (une différence de potentiel de 10 V est appliquée entre deux électrodes séparées de 200 μm). (b&c) Courbes de l'évolution du champ électrique de part et d'autre de la zone de convergence.

Dans un premier temps, nous avons testé le principe d'appariement. Les plus petites dimensions étant de $3\ \mu\text{m}$ et le facteur de forme le plus grand de $20/3$, l'étape de lithographie devient critique. C'est pourquoi, pour en valider le principe, nous avons souhaité d'abord évaluer ce système à plus grande échelle. Les dimensions ont été multipliées par 7 et le dispositif, réalisé uniquement en PDMS à partir d'une matrice de résine SU8 (2100), a été testé avec des billes de $70\ \mu\text{m}$ de diamètre. Les résultats sont présentés sur la **Figure 4.29**.



Figure 4.29 – Essais d'appariements de particules de $70\ \mu\text{m}$. (a) Photographie effectuée avant l'injection des billes. (b) Une bille est attirée dans un des pièges. (c) Une seconde bille est piégée en face de la première. Les autres billes ne sont alors plus attirées par les pièges et les contournent.

Le système d'appariement permet donc de piéger efficacement des billes indépendamment dans chaque canal. Cette expérience ayant validé ce procédé, la réalisation d'un masque en verre de dimensions adapté au piège de cellules a été effectuée. Cependant les rapports d'aspects élevés rendent la lithographie d'autant plus difficile à cette échelle et nécessitent un certain nombre de mises au point (choix de la résine optimale, couche d'accroche, protocole de révélation). Le dispositif est toujours en cours de développement.

Conclusion du chapitre

L'utilisation des champs électriques en microsystèmes est à la base de nombreux procédés de manipulation de fluides et de particules. Ces phénomènes électrocinétiques ont notamment conduit à l'élaboration de fonctions de séparation ou de positionnement de particules en microcanal. Les nombreux mécanismes mis en jeu dépendant des propriétés du champ mais également des particules. Ils peuvent aussi être utilisés en tant qu'outils de caractérisation de leurs propriétés diélectriques, et en particulier celles des cellules. Ce chapitre a démontré que l'ensemble des phénomènes électrocinétiques (alignement dipolaires, vortex, diélectrophorèse, électrorotation) testés pouvaient être réalisés à partir d'un dispositif intégrant des électrodes de cPDMS.

Des expérimentations de lyse, en cohérence avec la théorie et la littérature, ont également été menées. La caractérisation du seuil d'électroperméabilisation réversible a ensuite permis d'envisager des applications plus complexes telles que l'électrofusion de cellules. Ce procédé nécessite cependant la mise au point d'un microsystème complexe devant répondre à la problématique de l'appariement spécifique de cellules. Le dispositif proposé intègre un piège hydrodynamique, validé expérimentalement, associé à un système de concentration du champ. Un tel système pourrait permettre d'assurer des fusions des cellules exclusivement A/B sans être limité par leur taille.

Références bibliographiques

- [1] S. Masuda, M. Washizu, and T. Nanba, “Novel method of cell fusion in field constriction area in fluid integration circuit,” *IEEE Transactions on Industry Applications*, vol. 25, no. 4, pp. 732-737, 1989.
- [2] P. Tabeling, *Introduction à la microfluidique*. Belin, 2003, p. 254.
- [3] M. E. Bayer and J. L. Sloyer, “The electrophoretic mobility of Gram-negative and Gram-positive bacteria: an electrokinetic analysis,” *Microbiology*, vol. 136, no. 5, pp. 867-874, May 1990.
- [4] J. Li and L. A. McLandsborough, “The effects of the surface charge and hydrophobicity of Escherichia coli on its adhesion to beef muscle.,” *International journal of food microbiology*, vol. 53, no. 2-3, pp. 185-93, Dec. 1999.
- [5] D. Cui, F. Tian, C. S. Ozkan, M. Wang, and H. Gao, “Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells.,” *Toxicology Letters*, vol. 155, no. 1, pp. 73-85, 2005.
- [6] S. Movahed and D. Li, “Microfluidics cell electroporation,” *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 10, no. 4, pp. 703-734, Oct. 2010.
- [7] D. Zimmermann et al., “A combined patch-clamp and electrorotation study of the voltage- and frequency-dependent membrane capacitance caused by structurally dissimilar lipophilic anions.,” *The Journal of membrane biology*, vol. 221, no. 2, pp. 107-21, Jan. 2008.
- [8] D. Attwell, I. Cohen, and D. Eisner, “Membrane Potential and Ion Concentration Stability Conditions for a Cell with a Restricted Extracellular Space,” *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, vol. 206, no. 1163, pp. 145-161, Nov. 1979.
- [9] R. Alford et al., “Toxicity of organic fluorophores used in molecular imaging: literature review.,” *Molecular imaging*, vol. 8, no. 6, pp. 341-54, Dec. 2009.
- [10] M. Mittal, P. P. Lele, E. W. Kaler, and E. M. Furst, “Polarization and interactions of colloidal particles in ac electric fields.,” *The Journal of chemical physics*, vol. 129, no. 6, p. 064513, Aug. 2008.
- [11] T. B. Jones, *Electromechanics of Particles*. Cambridge University Press, 2005, p. 288.
- [12] C. L. Pérez and J. D. Posner, “Electrokinetic vortices and traveling waves in nondilute colloidal dispersions.,” *Langmuir* : *the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 26, no. 12, pp. 9261-8, Jun. 2010.
- [13] M. Abe, A. Yamamoto, M. Orita, T. Ohkubo, H. Sakai, and N. Momozawa, “Control of particle alignment in water by an alternating electric field.,” *Langmuir* : *the ACS journal of surfaces and colloids*, vol. 20, no. 17, pp. 7021-6, Aug. 2004.

- [14] P. P. Lele, M. Mittal, and E. M. Furst, “Anomalous particle rotation and resulting microstructure of colloids in AC electric fields.,” *Langmuir* : the ACS journal of surfaces and colloids, vol. 24, no. 22, pp. 12842-8, Nov. 2008.
- [15] Y. Hu, J. L. Glass, A. E. Griffith, and S. Fraden, “Observation and simulation of electrohydrodynamic instabilities in aqueous colloidal suspensions,” *Journal of Chemical Physics*, vol. 100, no. 6, pp. 4674-4682, 1994.
- [16] T. Akagi and T. Ichiki, “Cell electrophoresis on a chip: what can we know from the changes in electrophoretic mobility?,” *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, vol. 391, no. 7, pp. 2433-2441, 2008.
- [17] J. Zhu and X. Xuan, “Particle electrophoresis and dielectrophoresis in curved microchannels.,” *Journal of Colloid and Interface Science*, vol. 340, no. 2, pp. 285-290, 2009.
- [18] C. Wei, C.-W. Hsu, and C.-C. Wang, “The role of electro-osmosis and dielectrophoresis in collection of micro/nano size particles in low frequency AC electric field,” *Proceedings of SPIE*, vol. 6645, p. 664528, 2007.
- [19] M. Lian and J. Wu, “Microfluidic flow reversal at low frequency by AC electrothermal effect,” *Microfluidics and Nanofluidics*, vol. 7, no. 6, pp. 757-765, Mar. 2009.
- [20] T. B. Jones, *Electromechanics of Particles*. Cambridge University Press, 1995, p. 288.
- [21] C. Holzappel, J. Vienken, and U. Zimmermann, “Rotation of cells in an alternating electric field theory and experimental proof,” *The Journal of Membrane Biology*, vol. 67, no. 1, pp. 13-26, Dec. 1982.
- [22] G. O’Toole, H. B. Kaplan, and R. Kolter, “Biofilm formation as microbial development.,” *Annual review of microbiology*, vol. 54, pp. 49-79, Jan. 2000.
- [23] H.-C. Flemming and J. Wingender, “The biofilm matrix,” *Nature Reviews Microbiology*, vol. 8, no. 9, pp. 623-633, Aug. 2010.
- [24] C. H. Kua, C. Yang, S. Goh, R. Isabel, K. Youcef-Toumi, and Y. C. Lam, “Generation of Dielectrophoretic Force under Uniform Electric Field.” 10-Jan-2006.
- [25] P. R. C. Gascoyne and J. Vykoukal, “Particle separation by dielectrophoresis.,” *Electrophoresis*, vol. 23, no. 13, pp. 1973-83, Jul. 2002.
- [26] R. Pethig, “Review Article-Dielectrophoresis: Status of the theory, technology, and applications.,” *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 2, p. 022811, Jan. 2010.
- [27] V. Sukhorukov, “A single-shell model for biological cells extended to account for the dielectric anisotropy of the plasma membrane,” *Journal of Electrostatics*, vol. 50, no. 3, pp. 191-204, 2001.

- [28] M. P. Szostak et al., “Bacterial ghosts: non-living candidate vaccines.,” *Journal of Biotechnology*, vol. 44, no. 1-3, pp. 161-170, 1996.
- [29] H. Lu, M. A. Schmidt, and K. F. Jensen, “A microfluidic electroporation device for cell lysis.,” *Lab on a chip*, vol. 5, no. 1, pp. 23-9, Jan. 2005.
- [30] C.-P. Jen and T.-W. Chen, “Selective trapping of live and dead mammalian cells using insulator-based dielectrophoresis within open-top microstructures,” *Biomedical Microdevices*, vol. 11, no. 3, pp. 597-607, 2009.
- [31] G. Mernier, N. Piacentini, T. Braschler, N. Demierre, and P. Renaud, “Continuous-flow electrical lysis device with integrated control by dielectrophoretic cell sorting.,” *Lab on a chip*, vol. 10, no. 16, pp. 2077-82, Aug. 2010.
- [32] U. Zimmermann and G. A. Neil, *Electromanipulation of Cells*. CRC-Press, 1996, p. 416.
- [33] G. Tresset and S. Takeuchi, “A microfluidic device for electrofusion of biological vesicles.,” *Biomedical Microdevices*, vol. 6, no. 3, pp. 213-218, 2004.
- [34] A. M. Skelley, O. Kirak, H. Suh, R. Jaenisch, and J. Voldman, “Microfluidic control of cell pairing and fusion,” *Nature Methods*, vol. 6, no. 2, pp. 147-152, 2009.
- [35] Y. Kimura, M. Gel, B. Techaumnat, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu, “Dielectrophoresis-assisted massively parallel cell pairing and fusion based on field constriction created by a micro-orifice array sheet.,” *Electrophoresis*, Aug. 2011.
- [36] W.-H. Tan and S. Takeuchi, “A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications,” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 104, no. 4, pp. 1146-1151, 2007.
- [37] T. Teshima, H. Ishihara, K. Iwai, A. Adachi, and S. Takeuchi, “A dynamic microarray device for paired bead-based analysis.,” *Lab on a chip*, vol. 10, no. 18, pp. 2443-8, Sep. 2010.
- [38] B. Techaumnat and M. Washizu, “Analysis of the effects of an orifice plate on the membrane potential in electroporation and electrofusion of cells,” *Journal of Physics D: Applied Physics*, vol. 40, no. 6, pp. 1831-1837, Mar. 2007.
- [39] M. Gel, Y. Kimura, O. Kurosawa, H. Oana, H. Kotera, and M. Washizu, “Dielectrophoretic cell trapping and parallel one-to-one fusion based on field constriction created by a micro-orifice array.,” *Biomicrofluidics*, vol. 4, no. 2, Jan. 2010.
- [40] M. Washizu and B. Techaumnat, “Cell membrane voltage during electrical cell fusion calculated by re-expansion method,” *Journal of Electrostatics*, vol. 65, no. -561[6]0, pp. 555-561, 2007.

Conclusion générale et perspectives

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit concerne la caractérisation et la valorisation du cPDMS, un matériau nanocomposite formé du mélange de PDMS et de nanoparticules de carbone.

Nous avons proposé dans le premier chapitre une présentation générale des différentes méthodes d'intégration d'électrodes en canal microfluidique. Les procédés traditionnels de microfabrication y ont été détaillés en portant particulièrement l'accent sur leurs limites d'intégration (coût, appareillage, oxydation, intégration non étanche). Celles-ci ont ainsi justifié le développement de techniques et de matériaux moins conventionnels tels que les nanocomposites. La deuxième partie de ce chapitre a permis de présenter, d'un point de vue général, les principales applications de l'électrochimie en microsystème. Cette science est en effet mise à profit pour réaliser des fonctions allant de l'actionnement à la synthèse de molécules en microfluidique. Les différents aspects de détection ont plus particulièrement été détaillés. La troisième section du chapitre a cherché à présenter les notions de base pour la compréhension des phénomènes électrocinétiques observés dans nos expériences de manipulation de billes et de cellules. Le paragraphe a d'ailleurs mis en évidence les conséquences de la fréquence du champ électrique sur les différents mécanismes de polarisation. Enfin, la dernière partie du chapitre a décrit le procédé d'électroporation. La formation de pores, réversibles ou non, dans les membranes cellulaires est ainsi à l'origine de phénomènes tels que la lyse et l'électrofusion de cellules. La présentation de ces applications et des optimisations nécessaires pour leur utilisation en microsystèmes a conclu ce chapitre.

Le Chapitre 2 a débuté avec une présentation des nanocomposites et plus particulièrement du cPDMS et de son intérêt potentiel en microfluidique. Le cPDMS présente en effet plusieurs avantages pour une utilisation en microsystèmes. Il est compatible avec les procédés technologiques habituellement utilisés en microfluidique et peut ainsi être intégré dans une large gamme d'épaisseurs et de géométries. Il peut de plus, à l'instar du PDMS, être collé de manière étanche et irréversible sur substrats de verre, PDMS et silicium (par plasma oxygène). Par ailleurs, ses composants (carbone et PDMS) étant particulièrement inertes chimiquement, le cPDMS présente une grande stabilité. Ce matériau étant destiné à être utilisé pour la fabrication d'électrodes, ses propriétés électriques ont été évaluées et comparées à la littérature. Conformément au principe de percolation, la conductivité électrique du cPDMS dépend alors du dopage en carbone (10 S/m à 25 % de carbone). Dans un second temps, des mesures d'angle de contact ont mis en évidence l'influence du traitement plasma oxygène sur la surface d'électrodes de cPDMS. L'augmentation du caractère hydrophile, similaire à celle observée sur PDMS, a notamment permis de justifier l'efficacité du collage plasma entre le cPDMS et le verre.

Dans le cadre de ce travail, l'intérêt du cPDMS a été caractérisé pour une utilisation en électrochimie et pour la manipulation électrocinétique de particules. Ces deux applications ont ainsi fait l'objet de deux chapitres distincts.

Le Chapitre 3 a été centré sur la caractérisation électrochimique du matériau couplée à la mise en évidence de son potentiel pour des applications d'analyse ou de détection. Dans ce but, la réponse électrochimique du cPDMS a été étudiée par voltammétrie cyclique vis à vis d'espèce électroactives. Les mesures, effectuées sur des électrodes de plus en plus fines, ont d'abord permis de mettre en évidence l'amélioration de la réponse électrochimique du matériau. Ce phénomène, résultant d'une chute ohmique dans le matériau, impose alors de travailler avec des électrodes de cPDMS les plus fines possibles ($< 100 \mu\text{m}$). Les conséquences du traitement au plasma oxygène ont également été caractérisées à l'aide de trois couples redox ayant des sensibilités différentes aux modifications de surface des électrodes. Leur combinaison a ainsi mis en évidence l'augmentation de la surface active de l'électrode après son oxydation au plasma. Si ce traitement de surface augmente la rapidité des transferts électroniques entre le cPDMS et les espèces électroactives, il n'est pas sans conséquence sur les courants capacitifs. Ceci induit une large diminution du rapport signal sur bruit, un paramètre pouvant parfois être critique dans les techniques analytiques.

Dans le Chapitre 4, nous avons démontré le potentiel du cPDMS pour des applications nécessitant la manipulation de microbilles (polystyrène latex) et de cellules (HEK-293). Différents phénomènes électrocinétiques ont été observés dans une gamme de fréquences comprises entre quelques Hz et plusieurs MHz. Les interactions dipôles-dipôles, la diélectrophorèse mais également des phénomènes moins courants tels que les vortex ou les rotations en champ statique, ont été mis en évidence avec différents paramètres électriques conformes à ceux retrouvés dans la littérature.

Par ailleurs des phénomènes de lyses de cellules ont été observés lors de l'utilisation de champs électrique intenses produits avec des électrodes de cPDMS. Ces expériences ont permis caractériser les paramètres de champs (impulsionnels et alternatifs) critiques pour lyser des cellules. La détermination du seuil d'électroperméabilisation réversible a conduit à l'élaboration d'un microsystème dédié à l'électrofusion de cellules. La problématique de l'appariement spécifique de cellules a abouti au développement d'un piège hydrodynamique. Celui-ci a alors été optimisé à l'aide de simulations par éléments finis puis validé par des tests en canal microfluidique. La réalisation complète du dispositif, c'est-à-dire intégrant des électrodes de cPDMS est en cours de finalisation.

Les perspectives de ce travail de thèse sont nombreuses. Celles-ci peuvent en effet s'articuler à la fois sur des caractérisations complémentaires du matériau, sur la poursuite des expérimentations de lyse et de fusion, mais également sur la mise au point de nouveaux nanocomposites à base de PDMS :

- Caractérisations : L'étude de l'influence du traitement au plasma oxygène sur la réponse électrochimique du cPDMS pourrait par exemple être complétée par spectroscopie d'impédance, par AFM ou encore par XPS. Cette caractérisation pourrait contribuer à optimiser le traitement de surface notamment en étudiant l'effet de la concentration en oxygène ou la puissance appliquée. L'identification des groupements chimiques de surface pourrait ensuite conduire à la fonctionnalisation de surface du cPDMS (électropolymérisation, greffage covalent sur les groupements chimiques du PDMS ou du carbone). L'immobilisation d'espèces biochimiques couplée à leur détection peut être une première évolution vers un biocapteur.

- Application électrochimique : Le cPDMS semble adapté à la plupart des applications nécessitant des électrodes. Son utilisation dans les piles à combustible, ou pour la détection d'espèces électroactives sont tout à fait envisageables.
- Applications lyse et fusion : L'utilisation de ce matériau pour la lyse de cellules nous semble une application très prometteuse de ces électrodes. Cette fonction peut par exemple être intégrée dans un dispositif microfluidique en guise d'étape préliminaire à l'analyse de contenus de cellules cancéreuses.
Le microsystème mis au point pour l'électrofusion nécessite encore quelques optimisations en termes de microfabrication, mais les simulations électriques et fluidiques semblent prometteuses quant à son efficacité. Un certain nombre d'expérimentations, notamment à l'aide de différents fluorophores, permettraient d'en valider définitivement le principe.
- Dopage : Nous envisageons également de doper le PDMS avec d'autres matériaux comme les nanotubes de carbone, des nanoparticules de fer ou d'ITO. La simplicité de préparation et d'intégration de ces nanocomposites pourrait présenter un intérêt pour de nombreux dispositifs microfluidiques.

Liste des communications

Articles :

“Nanocomposite Carbon-PDMS Material for Chip-Based Electrochemical Detection” [**Brun M.**, Chateaux J.F., Deman A.L., Pittet P., Ferrigno R.]. *Electroanalysis*. **2011**, 23, No. 2, 321 – 324.

“Characterization of C-PDMS electrodes for electrokinetic applications in microfluidic systems” [Deman A.L., **Brun M.**, Quatresous M., Chateaux J.F., Frénéa-Robin M., Haddour N, Semet V., Ferrigno R.]. *Journal of Micromechanics and Microengineering*. **2011**, 21, 095013.

Proceedings :

EMRS 2009: “Microfluidic chip for the screening of crystallization conditions and in-situ crystallographic analyses” [**Brun M.**, Dhoubi K., Morin P., Giegé R., Deman A.L., Lorber B., Chateaux J.F, Sauter C., Ferrigno R.].

μTAS 2010: “Nanocomposite Carbon-PDMS thick electrodes for electrokinetic manipulation during cell fusion” [**Brun M.**, Deman A.L., Chateaux J.F., Frenea-Robin M., Haddour N, Ferrigno R.], 978-0-9798064-3-8/μTAS 2010/\$20 ©2010 CBMS.

Communications orales :

EMRS 2009: “Development of a microfluidic chip for in-situ crystallization and crystallographic analysis”. **M. Brun**.

μFLU 2010: Carbon-PDMS Thick Electrodes for Electrokinetic Manipulation during Cell Fusion. [M. Brun, **J.-F. Chateaux**, M. Frenea-Robin, A.-L. Deman, N. Hadour, R. Ferrigno].

Communications par poster :

I3N 2009: Microfluidic chips for the crystallization and the structural analysis of biomolecules. [**M. Brun**, K. Dhoubi, R. Giegé, A.-L. Deman, B. Lorber, J.-F. Chateaux, C. Sauter, R. Ferrigno]

GDR Microfluidique 2009: Microfluidic chips for the crystallization and the structural analysis of biomolecules. [**M. Brun**, K. Dhoubi, R. Giegé, A.-L. Deman, B. Lorber, J.-F. Chateaux, C. Sauter, R. Ferrigno]

LIA 2010: Microsystems for research and optimization of cell fusion parameters [**M. Brun**, J.-F. Chateaux, M. Frenea-Robin, A.-L. Deman, N. Hadour & R. Ferrigno].

μFLU 2010: Microfluidic Chip for the Screening of Crystallization Conditions and In-Situ Crystallographic Analysis. [**M. Brun**, K. Dhouib, P. Morin, R. Giegé, A.-L. Deman, B. Lorber, J.-F. Chateaux, C. Sauter, R. Ferrigno].

μFLU 2010: Carbon-PDMS Thick Electrodes for Electrokinetic Manipulation during Cell Fusion. [**M. Brun**, J.-F. Chateaux, M. Frenea-Robin, A.-L. Deman, N. Hadour, R. Ferrigno].

μTAS 2010: “Nanocomposite Carbon-PDMS thick electrodes for electrokinetic manipulation during cell fusion” [**Brun M.**, Deman A.L., Chateaux J.F., Frenea-Robin M., Haddour N, Ferrigno R.].

Résumé

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit s'inscrit dans une dynamique d'intégration de matériaux non conventionnels en systèmes microfluidiques. Il vise à démontrer le potentiel du cPDMS, un matériau nanocomposite formé d'une matrice de polydiméthylsiloxane rendu conducteur par l'ajout de nanoparticules de carbone. Compatible avec les procédés technologiques habituels, le cPDMS peut être structuré dans une large gamme d'épaisseurs et de géométries mais présente surtout l'avantage de pouvoir être collé irréversiblement sur verre, PDMS et silicium. Son intégration est parfaitement étanche, rapide à mettre en œuvre, et très économique. La première partie du manuscrit est consacrée à la caractérisation de ce matériau. Ses propriétés électriques et de surface, pouvant être critiques pour une utilisation en microfluidique, ont été particulièrement étudiées. Les champs électriques offrant de nombreuses possibilités pour réaliser des fonctions clés en microfluidique (détection, séparation, manipulation de fluides ou de particules), nous avons choisi d'évaluer l'intérêt d'électrodes de cPDMS dans deux types d'applications. Les aspects de détection ont d'abord été mis en évidence à l'aide de mesures électrochimiques. Cette méthode a permis à la fois de caractériser la surface du cPDMS tout en validant son utilisation potentielle pour des applications d'analyses électrochimiques. Dans la dernière partie du manuscrit, le matériau a été testé pour la manipulation de particules à travers l'observation de différents phénomènes électrocinétiques. Ceux-ci ont conduit à la mise au point de dispositifs microfluidiques (intégrant des électrodes de cPDMS) dédiés à la lyse et à l'électrofusion de cellules.

Mots clefs: microfluidique, matériau nanocomposite, laboratoire sur puce, électrochimie, manipulation électrocinétique, lyse de cellule, électrofusion cellulaire.

Abstract

The work presented in this thesis deals with the integration of non-conventional materials in microfluidic systems. It aims to demonstrate the potential of cPDMS, a conductive nanocomposite material made up of polydimethylsiloxane matrix mixed with carbon nanoparticles. Compatible with the usual technological processes such as soft lithography, cPDMS can be microstructured in a large range of thicknesses and geometries. Moreover, cPDMS can be quickly, irreversibly and perfectly sealed to glass, PDMS and silicon substrates, something that is not possible for conventional metallic electrodes. The first part of the manuscript is centered on the characterization of this material. Its electrical and surface properties that may turn out critical for microfluidic applications have been particularly studied. Electric fields present many opportunities to perform key functions in microfluidic (detection, separation, fluid or particles handling). We have chosen to assess the potential of cPDMS electrodes for two kinds of applications. Aspects of detection were first demonstrated using cyclic voltammetry measurements. This electrochemical method has enabled both to characterize the cPDMS surface while validating its potential as an electrochemical analysis tool. In the last part of this manuscript, cPDMS was tested for the electrokinetic manipulation of particles through the study of different electrical fields with induced phenomena. This has led to the development of microfluidic devices (integrating cPDMS electrodes) designed for cell lysis and cells electrofusion.

Keywords: microfluidic, nanocomposite material, lab-on-chip, electrochemistry, electrokinetic manipulation, cell lysis, cell fusion.