Electrocinétique tridimensionnelle de particules colloïdales en géométrie microfluidique et application à la manipulation de cellules

Thibault Honegger

▶ **To cite this version:**

Thibault Honegger. Electrocinétique tridimensionnelle de particules colloïdales en géométrie microfluidique et application à la manipulation de cellules. Autre. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT : 2011GRENT059 . tel-00668280

HAL Id: tel-00668280

https://theses.hal.science/tel-00668280

Submitted on 9 Feb 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.

UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR

Spécialité : **Nanoélectronique et nanotechnologie**

Arrêté ministérial : 7 aout 2006

Présentée par

Thibault Honegger

Ingénieur de l'école Centrale de Nantes

Thèse dirigée par **David PEYRADE**

préparée au sein **Laboratoire des Technologies de la Microélectronique - LTM CNRS, 17, avenue des Martyrs, 38054 Grenoble - France**
et de **l'Ecole Doctorale E.E.A.T.S.- Electronique, Electrotechnique, Automatique et Traitement du Signal**

Électrocinétique tridimensionnelle de particules colloïdales en géométrie microfluidique et application à la manipulation de cellules

Thèse soutenue publiquement le **17 Novembre 2011**,
devant le jury composé de :

M. Franz BRUCKERT
Université de Grenoble, Président
Mme. Nelly HENRY
Institut Curie, Rapporteur
M. Vincent SENEZ
IEMN, Rapporteur
M. Vincent STUDER
IIN, Examinateur
M. Olivier JOUBERT
LTM, Examinateur
M. David PEYRADE
LTM, Directeur de thèse
M. Xavier GIDROL
CEA-iRTSV, Invité
M. Emmanuel PICARD
CEA-INAC, Invité

Remerciements

Le travail présenté dans cette thèse représente le fruit de trois années passées au Laboratoire des Technologies de la Microélectronique (LTM) dans l'équipe NanoBioTech (anciennement BioCollona) sous la direction de David Peyrade. Lorsque j'ai rencontré David pendant mes enseignements de master, nous nous sommes mis à rêver ensemble sur la possibilité de réaliser des nano-robots pouvant interagir localement avec des cellules humaines. Nos imaginations créatives réunies et mélangées à des moyens scientifiques et technologiques de pointe ont donné naissance à 3 ans de thèse dont les résultats sont présentés dans ce manuscrit.
Je remercie donc tout d'abord David Peyrade, mon directeur de thèse, qui m'a soutenu depuis le début dans mes interrogations, dans mes choix et dans la compréhension de ces choix. Merci de m'avoir supporté au jour le jour, certains disent que ce n'est pas facile, mais nous avons développé une relation de confiance qui nous a permis d'aller jusqu'au bout du rêve initial...
Je souhaite aussi remercier Olivier Joubert qui m'a accueilli dans son laboratoire, ainsi que Jumana Boussey pour son aide dans les démarches administratives qui, comme chacun le sait, peuvent devenir rapidement procédurières.
Merci aussi à Malou, Stéphanie, Sylvaine et Leila pour leurs aides quotidiennes, surtout pour les cartes de cantine !
Je remercie aussi les chercheurs avec lesquels j'ai pu échanger et qui m'ont apporté de l'aide précieuse pendant ces 3 ans : Emmanuel Picard pour tous ses conseils avisés, tant professionnels que personnels, et son expertise sans laquelle je n'aurais pas pu réaliser mes expériences. Marc Zelsmann pour sa bonne humeur, surtout lorsque nous débattions à l'étranger. Alice Nicolas pour nos échanges au quotidien. Laurence Latu-Romain pour son aide avec ses outils d'enseignement.
Remerciements spéciaux à l'équipe : Olivier Lecarme, nous nous suivons depuis le début et malgré nos différences de caractère, nous sommes devenus amis ; Kevin Berton pour sa bonne humeur essentielle et son aide précieuse au quotidien ; Tatiana Pinedo-Rivera lors de mon arrivée au LTM ; Emmanuela Rossitto pour ses émotions fortes ; Victor Gaude avec qui j'ai pu beaucoup échanger ; Julien Cordeiro pour ces moments de musiques et de vie partagés ainsi que Michel Moussus pour ces business communs.
Je remercie aussi tous les stagiaires qui ont bien voulu que je les encadre : Timothé Flenet, pour son volontarisme de réussite et son expertise en électronique et mécanique ; Alexandre Bigot, pour son professionnalisme, maintenant que tu es en thèse, n'oublie pas de me citer ; Antoine Bourrier, pour son dynamisme à outrance et son humour ; Sarla pour cette expérience de vie ; Tobias Elmberg pour sa droiture dans son travail ; Thomas Bonnerue pour m'avoir supporté au jour le jour ainsi que Clarisse Benoit pour sa maturité et son implication.
Je souhaite aussi remercier l'ensemble des chercheurs et thésards avec lesquels j'ai pu collaborer et qui ont soutenu nos actions communes : Franz Bruckert et Marianne Weidenhaupt. Orphée Cougat, Gilbert Reyne, Paul Kauffmann et Alain Masse. Vincent Forge et Christophe Horvat. Grant Wilson et Ryan Deschner pour son approche américaine et son aide. Emmanuel Théry, Théo Cambier et Remi Galland. Ulrich Soupremanien et Philippe Coronel.
Encore merci à tous mes amis qui m'ont permis de m'intégrer dans cette nouvelle vie et qui m'ont apporté tant de moments heureux : Jean-Hervé, Francois Biosniak, Francois M, Jérome, Phil, Nico, Claude, la liste serait trop longue...
Enfin, je remercie tout particulièrement ma famille qui m'a soutenu depuis le début de mes

études et dans mes orientations professionnelles. Merci à ma femme, Anne-Sigolène, qui m'a donné de l'énergie au quotidien et soutenu dans les moments de joie et de difficultés. Merci à mes parents de m'avoir permis de réaliser ces études qui m'ont conduit aujourd'hui à être heureux professionnellement et personnellement. Merci à mes frères, Alex et Greg. Merci à ma grand-mère Jacqueline qui a été et sera toujours omniprésente dans ma vie de chercheur. Merci à mes grands-parents, Maryse et Daddy, pour leur soutient. Enfin, merci à Roland Bacon et Claudine Schmidt-Lainé qui m'ont suivis et encouragés à poursuivre une carrière dans la recherche.

Liste des Abréviations

Acronymes

$ACEO$	Électroosmose induite par un champ alternatif
Au	Or, matériau
$DMEM$	Milieu de culture cellulaire Dulbecco's Modified Eagle Medium
ETE	Effet électrothermique
IBE	Gravure par faisceau d'ions, Ion Beam Etching
ITO	Oxyde d'étain et d'indium, Indium Tin Oxyde
MES	Solution acide de 2-(N-morpholino)Ethane Sulfonique
MHA	acide 16-mercapto-1-hexanedecanoic
$MuOH$	11-mercapto-1-unadecanol
$nDEP$	Diélectrophorèse négative
PBS	Solution tampon de phosphate Phosphate Buffer Solution
$pDEP$	Diélectrophorèse positive

Symboles

Δ_ρ	Différence de masse volumique de la particule et du milieu de dispersion	$kg.m^{-3}$
ε_0	Permittivité du vide	$kg^{-1}.m^{-3}.A^2.s^4$
ε	Permittivité relative du milieu spécifié	
$\tilde{\varepsilon}$	Permittivité complexe du milieu spécifié	
λ	Longueur de Debye	m
μ	Viscosité dynamique du milieu spécifié	$Pa.s$
ν	Viscosité cinématique du fluide spécifié	m^2/s
ω	Pulsation d'un champ électrique alternatif	$rad.s^{-1}$
ρ	Masse volumique du milieu spécifié	$kg.m^{-3}$
σ	Conductivité du milieu spécifié	$S.m^{-1}$
ζ	Potentiel zêta	V
E	Champ électrique	$V.m^{-1}$
F_A	Poussée d'Archimède	N
F_f	Force de freinage visqueux de Stokes	N
F_g	Force de gravité	N

g	Constante d'accélération terrestre	$m.s^{-2}$
k	Conductivité thermique du milieu spécifié	$W.m^{-1}.K^{-1}$
k_B	Constante de Boltzmann	$J.K^{-1}$
k_f	Facteur de forme dépendant de la géométrie de la particule	m
K_s	Capacité surfacique de la particule spécifiée	S
n	Indice optique du milieu spécifié	
N_A	Nombre d'Avogadro	mol^{-1}
R	Rayon de la particule colloïdale	m
$Re(\omega)$	Facteur de Clausius-Mossotti d'une particule spécifiée suspendue dans un milieu spécifié	
T	Température du milieu spécifié	°C
V_{p-p}	Différence de potentiel crête à crête	V

Table des matières

Remerciements i

Liste des Abréviations iii

Introduction 1

1 Manipulation de particules : état de l'art 5
- 1.1 Particules colloïdales . . . 6
  - 1.1.1 Micro- et nano-particules : du sphérique à l'anisotrope . . . 6
  - 1.1.2 Suspension colloïdale . . . 8
- 1.2 Manipulation de particules colloïdales en géométrie microfluidique . . . 10
  - 1.2.1 Force hydrodynamique . . . 11
  - 1.2.2 Force magnétique . . . 11
  - 1.2.3 Force optique . . . 13
  - 1.2.4 Force diélectrophorétique . . . 14
  - 1.2.5 Bilan des forces sans contact . . . 17
- 1.3 Électrocinétique en canal microfluidique . . . 18
  - 1.3.1 Force hydrodynamique . . . 18
  - 1.3.2 Électrocinétique . . . 19
  - 1.3.3 Bilan des forces électrocinétiques . . . 25
  - 1.3.4 Des géométries coplanaires aux géométries tridimensionnelles . . . 26
- 1.4 Conclusion . . . 34

2 Puce et plateforme électro-microfluidique 35
- 2.1 Technologie de puce microfluidique tridimensionnelle . . . 35
  - 2.1.1 Introduction aux technologies d'ouverture de canal microfluidique . . . 35
  - 2.1.2 Puce microfluidique verre-PDMS-verre tridimensionnelle alignée et transparente . . . 36
  - 2.1.3 Performances électrique, optique et fluidique de la puce . . . 43
- 2.2 Plateforme électro-microfluidique . . . 53
  - 2.2.1 Module Fluidique . . . 54
  - 2.2.2 Module électronique . . . 56
  - 2.2.3 Module optique et suivi de particule . . . 59
- 2.3 Conclusion . . . 64

3 Fabrication de colloïdes fonctionnels 65
- 3.1 Colloïdes Janus . . . 65
  - 3.1.1 Microfabrication par la méthode combinante . . . 65
  - 3.1.2 Biofonctionnalisation de surface de particules colloïdales . . . 71
- 3.2 Conclusion . . . 78

4 Propriétés diélectrophorétiques de particules colloïdales 79
4.1 Introduction au Facteur de Clausius-Mossotti . . . 79
4.2 Méthode de détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti . . . 82
4.3 Détermination du Facteur de Clausius-Mossotti de particules diélectriques et métalliques . . . 85
4.3.1 Détermination des Facteurs de Clausius-Mossotti . . . 85
4.3.2 Détermination des conductances surfaciques . . . 86
4.3.3 Comparaison de la méthode avec celles de la littérature . . . 87
4.4 Détermination du Facteur de Clausius-Mossotti de particules bio-fonctionnalisés . 88
4.4.1 Particules présentant des charges surfaciques . . . 88
4.4.2 Particules présentant des protéines en surface . . . 89
4.4.3 Particules Janus nues ou présentant des protéines en surface . . . 95
4.5 Conclusion . . . 98

5 Manipulation tridimensionnelle de particules colloïdales 101
5.1 Positionnement tridimensionnel de colloïdes en géométrie d'électrodes tridimensionnelles . . . 102
5.1.1 Géométrie d'électrodes . . . 102
5.1.2 Modélisation des forces électro-hydrodynamiques et diélectrophorétiques induites par des champs électriques 3D . . . 103
5.1.3 Localisation tridimensionnelle expérimentale de particules soumises à des champs électriques 3D . . . 113
5.2 Manipulation tridimensionnelle collective - Fonctions clés . . . 121
5.2.1 Fonction Stop / Séparation . . . 121
5.2.2 Fonction Focalisation . . . 123
5.2.3 Fonction Piège . . . 127
5.3 Manipulation tridimensionnelle individuelle . . . 131
5.3.1 Observation de particules uniques . . . 131
5.3.2 Rotation de particules Janus . . . 132
5.3.3 Diélectrophorèse impulsée mobile . . . 136
5.4 Conclusion . . . 145

6 Électrocinétique cellulaire et interaction colloïdale 147
6.1 Introduction aux interactions particules - cellules . . . 148
6.2 Électrocinétique de cellule . . . 151
6.2.1 Visualisation et milieu de suspension . . . 151
6.2.2 Détermination du Facteur Clausius-Mossotti de cellules . . . 153
6.2.3 Rotation de cellules en configuration co-planaire . . . 158
6.3 Interaction particules fonctionnalisées et cellules . . . 159
6.3.1 Internalisation de particules colloïdales . . . 159
6.3.2 Accroche surfacique de particules colloïdales . . . 163
6.4 Réponse diélectrophorétique d'un complexe cellule / particules colloïdales . . . 165
6.4.1 Particules internalisées . . . 165
6.4.2 Particules externalisées . . . 171
6.5 Conclusion . . . 174

Conclusion générale **175**

Publications **179**

Annexes **181**

A Technologies de puces microfluidiques **181**
A.1 Utilisation du PDMS . . . 181
A.1.1 PDMS . . . 181
A.1.2 Moulage . . . 181
A.1.3 Scellement . . . 184
A.2 Puce microfluidique verre-PDMS . . . 184
A.3 Puce microfluidique verre-PDMS-verre avec électrodes coplanaires . . . 185

B Performances du module de suivie de particules, analyse du mouvement Brownien **189**

C Photolithographie dynamique par vidéo-projecteur **191**
C.1 Dispositif de photolithographie par vidéoprojecteur . . . 191
C.1.1 Parcours lumineux . . . 192
C.1.2 Montage mécanique . . . 193
C.2 Performances du système d'insolation statique . . . 194
C.2.1 Performances optiques . . . 194
C.2.2 Performances lithographie sur résine . . . 196
C.2.3 Optimisation du masque . . . 200
C.3 Perspectives : vers un système dynamique . . . 203
C.3.1 Amélioration du chemin optique . . . 204
C.3.2 Evaluation du logiciel existant . . . 205
C.3.3 Application : Electrode pour nano-fil . . . 206

D Photolithographie à 2 photons de particules colloïdales **207**
D.1 Étude des voxels en fonction de la dose utilisée . . . 208
D.2 Fabrication de structures 3D . . . 211
D.3 Fabrication de structures hétérogènes électro-sensibles . . . 212
D.4 Ablation d'ITO par lithographie 2 photons . . . 213

Bibliographie **215**

Introduction

Il était une fois... la vie, cette série télévisée d'animation française crée par Albert Barillé en 1986 montre souvent des lymphocytes sous forme de robots qui interagissent avec d'autres cellules. Vieux rêve que de pouvoir fabriquer et contrôler des micro-robots qui pourraient parcourir l'organisme pour aider, réparer ou tuer des cellules en difficulté ou malades. Que ce soit pour faire une micro-opération localisée, du ciblage thérapeutique ou la réparation de réseaux neuronaux, la réalisation d'interventions locales in-vivo et in-vitro sur des cellules isolées, des tissus ou des organes ouvrirait la voie à de nouvelles possibilités en terme médical ou thérapeutique. Ce rêve peut aujourd'hui être caressé grâce à l'accès aux technologies de miniaturisation issues du monde de la micro-électronique. Il est ainsi possible de structurer physiquement et chimiquement des surfaces dont les dimensions sont inférieures à celles des cellules (diamètre typique de 10 μm). Dans cette perspective, les solutions colloïdales (phase dispersée dans un milieu de dispersion) sont fabriquées chimiquement pour former des micro et nano particules en suspension qui ne s'agrègent pas dans le temps. La figure 1 montre quelques suspensions colloïdales synthétiques (micro et nano particules, vésicules) ainsi que leurs gammes de tailles caractéristiques comparées à celles de différentes entités biologiques (biomolécules, bactéries, cellules).

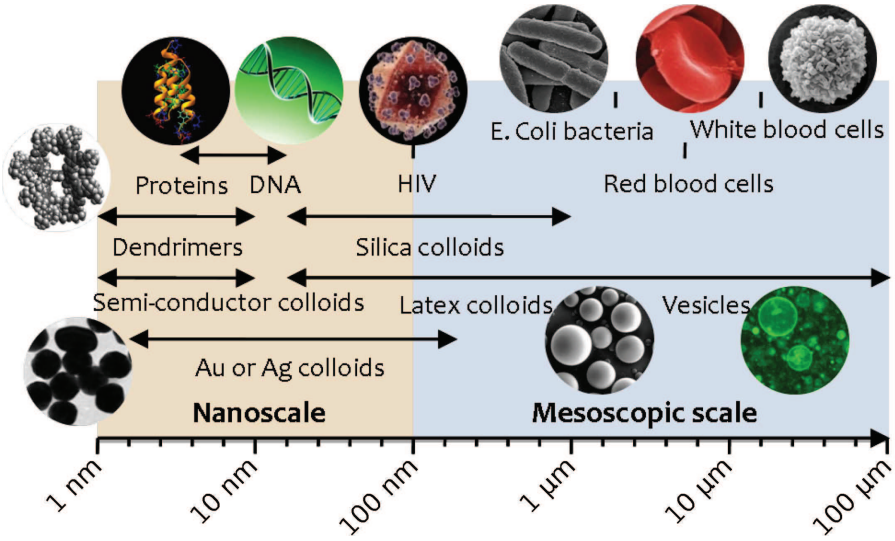


Figure 1 – Tailles caractéristiques de suspensions colloïdales synthétiques ou biologiques.[Pinedo-Rivera 2009]

La littérature scientifique commence à mettre en évidence les applications possibles issues du contrôle des interactions de nano-particules colloïdales avec des cellules. Ainsi, des nano-particules d'Au de 10 nm diffusent à travers la membrane cellulaire et envahissent la cellule. Couplées à des traitements chimiques permettant le greffage de protéines sur leurs surfaces, ces particules peuvent cibler des types cellulaires particuliers par reconnaissance anticorps/antigène [Mailänder 2009]. Cependant, les nano-particules ainsi employées peuvent diffuser à travers la membrane cellulaire et devenir toxiques pour la cellule. Une particule dont la taille serait de l'ordre de grandeur d'une cellule pourrait dès lors créer une véritable interaction entre la particule et la cellule. Le vecteur de cette interaction serait alors engendré par une

fonctionnalisation de surface propre au type cellulaire étudié : les cellules adhérentes, comme les cellules constituant les tissus, ont besoin d'un matrice extra-cellulaire composée de protéines spécifiques comme la fibronectine, alors que les cellules non-adhérentes, comme les lymphocytes, sont compétentes pour la phagocytose ciblée par des complexes anticorps-antigènes. Le greffage de protéines spécifiques sur des micro-particules structurées pourrait donner naissance à de nouvelles particules capables de cibler et d'interagir localement avec des cellules isolées ou directement sur des tissus.
Néanmoins, le contrôle de ces interactions, à l'échelle individuelle ou collective, nécessite un positionnement tridimensionnel des particules colloïdales relativement aux cellules. Les outils permettant de manipuler ces particules in-vitro ont été considérablement impactés par la miniaturisation issue de la micro-électronique. L'émergence des laboratoires sur puces et de la microfluidique a ainsi permis d'appliquer localement des forces sans contact aux particules colloïdales sur des volumes de suspension réduits à quelques nano-litres. A ces échelles, la dynamique des forces agissant sur des cellules et des particules sont modifiés et donnent accès à de nouvelles capacités de positionnement déterministe à l'échelle micro et nanométrique. La levée du verrou technologique permettant d'appliquer de telles forces localisées ouvrira la voie à l'étude fine des interactions physiques entre des particules bio-fonctionnalisées et des cellules. Ce travail multidisciplinaire combine à la fois des enjeux technologiques (puce microfluidique et fabrication de colloïdes multi-fonctionnels), des interprétations physiques (description des champs électriques et leurs effets sur des particules et des cellules) et des compétences chimiques et biologiques.

> L'objectif de ce travail de doctorat est donc de développer une technologie de laboratoire sur puce permettant d'appliquer des forces sans contact pour positionner et manipuler en trois dimensions des particules colloïdales micrométriques fonctionnalisées en surface et d'étudier leurs interactions avec des cellules eucaryotes. Le choix d'utiliser des forces électrostatiques sera justifié et permettra de mettre en évidence les mouvements de particules et des magnitudes de force qui ne sont pas réalisables avec d'autres types de forces sans contact.

Le présent manuscrit est composé de cinq chapitres qui sont brièvement décrits dans les paragraphes suivants.

- **Le chapitre 1** présente tout d'abord l'état de l'art des forces sans contact accessibles dans les laboratoires sur puce pour manipuler des particules colloïdales. La deuxième partie de ce chapitre décrit les forces électro-hydrodynamiques présentes lorsqu'une différence de potentiel est appliquée à une solution colloïdale confinée en milieu microfluidique. Nous présenterons enfin les technologies utilisées actuellement pour manipuler des particules colloïdales dans des géométries microfluidiques.
- **Le chapitre 2** est consacré à la réalisation technologique des puces microfluidiques tridimensionnelles et à leur caractérisations tant des points de vue électrique, qu'optique ou fluidique. La technologie de puces comportant des électrodes à la fois sur la partie inférieure et supérieure du canal sera détaillée. La plateforme d'étude est basée sur un microscope et est composée de trois modules : fluidique, électrique et visualisation.
- **Le chapitre 3** est dédié à l'ingénierie de particules colloïdales pour les rendre multi-fonctionnelles. Il sera présenté l'élaboration de particules anisotropes, dites Janus, ainsi que le greffage de la fibronectine sur leur surface.
- **Le chapitre 4** détaillera les propriétés diélectrophorétiques des particules colloïdales ainsi

fabriquées. Une nouvelle méthode de détermination du Facteur de Clausius-Mossotti sera tout d'abord expliquée puis appliquée à différents types de particules en terme de matériau, taille, fonctionnalisation de surface et anisotropie de forme. Ces mesures expérimentales corrélées à une modélisation des propriétés diélectriques de ces particules nous permettront de remonter au propriétés diélectriques intrinsèques des particules.

– **Le chapitre 5** présentera la manipulation de ces particules dans les puces microfluidiques incorporant des électrodes tridimensionnelles. La modélisation des forces électrohydrodynamiques et diélectrophorétiques permettra de mettre en évidence leurs compétitions pour des couples fréquence-tension donnés. Nous comparerons ensuite ces résultats de modélisations aux comportements expérimentaux observés dans les puces microfluidiques. Enfin, nous introduirons le concept de fonctions clés pour la manipulation tridimensionnelle de particules à l'échelle individuelle ou collective.
– **Le chapitre 6** ouvrira la voie à la manipulation de cellules de lignée humaine et d'amibe. Dans un premier temps, nous déterminerons expérimentalement leurs propriétés diélectrophorétiques par la méthode établie au chapitre 4. La caractérisation expérimentale de leurs déplacements dans la puce lors de l'application d'un champ électrique alternatif permettra de fixer des fréquences de manipulation lorsque des particules colloïdales structurées sont internalisées ou greffées en surface sur les cellules. Nous établirons différents scénario de manipulation de ces complexes particules-cellule et mettrons en évidence des comportements de répulsion ou d'attraction des particules relativement aux cellules. Ce dernier chapitre montrera toutes les potentialités des particules colloïdales multi-fonctionnelles pour interagir localement avec les cellules par diélectrophorèse.

Chapitre 1

Manipulation de particules colloïdales en confinement microfluidique : état de l'art

Sommaire

1.1 Particules colloïdales 6
1.1.1 Micro- et nano-particules : du sphérique à l'anisotrope 6
1.1.2 Suspension colloïdale 8
1.2 Manipulation de particules colloïdales en géométrie microfluidique . . 10
1.2.1 Force hydrodynamique 11
1.2.2 Force magnétique 11
1.2.3 Force optique 13
1.2.4 Force diélectrophorétique 14
1.2.5 Bilan des forces sans contact 17
1.3 Électrocinétique en canal microfluidique 18
1.3.1 Force hydrodynamique 18
1.3.2 Électrocinétique 19
1.3.3 Bilan des forces électrocinétiques 25
1.3.4 Des géométries coplanaires aux géométries tridimensionnelles 26
1.4 Conclusion 34

L'engouement pour les microsystèmes a permis de démontrer leur formidable potentiel pour les applications de manipulation de particules ou de cellules par le développement de la branche microfluidique. De nombreux systèmes ont pu être présentés : pompes, mélangeurs, circuits de commande... Pour développer de nombreuses applications : analyses chimiques, biologiques, synthèse de produits.

Les suspensions colloïdales offrent la possibilité d'étudier la technique utilisée pour la manipulation en s'affranchissant des contraintes liées à l'utilisation de cellules (nécessité des équipements de cultures cellulaires qui empêchent la contamination bactérienne des échantillons de cultures ou le rinçage systématique des capillaires d'injections avec des produits agressifs). Ainsi, de nombreux travaux montrent des résultats de principe avec des particules colloïdales qui peuvent être reportés sur des cellules, sous réserve que les milieux de suspension soient les mêmes.

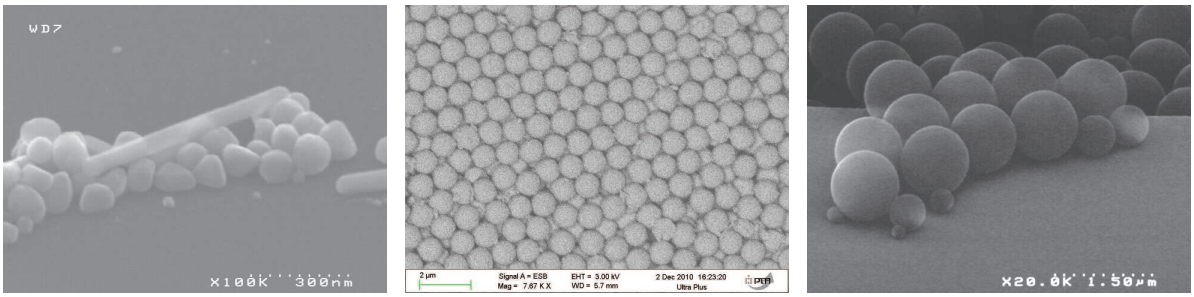
Ce chapitre présente tout d'abord une description des particules colloïdales commerciale ou micro-fabriquées ainsi que leur dynamique lorsqu'elles sont suspendues en milieu liquide. Nous présenterons ensuite les différentes forces qui peuvent être mises en oeuvre pour manipuler ces particules dans les systèmes microfluidiques. Un bilan de ces forces nous permettra de justifier le

choix d'utiliser les forces électrocinétiques pour effectuer cette manipulation dans des puces microfluidiques. Enfin, nous détaillerons les force électro-hydrodynamiques et diélectrophorétiques ainsi que leur mise en application dans les systèmes microfluidiques présentés par la communauté scientifique.

1.1 Particules colloïdales

1.1.1 Micro- et nano-particules : du sphérique à l'anisotrope

Les propriétés physiques des matériaux à l'échelle submicronique sont différentes de celles du matériau massif. En effet, à cette échelle les propriétés physico-chimiques des matériaux sont dominées par les effets de surface et non plus par le corps du matériau.
La grande majorité des particules colloïdales ont une forme sphérique induite par la minimisation de l'énergie de surface intervenant lors des phénomènes de nucléation de croissance des entités [Vaia 2004]. Les voies de synthèse les plus répandues sont basées sur des réactions d'oxydoréduction [Goia 1999], de précipitation [LaMer 1950] ou encore de polymérisation [Smith 1948]. Ainsi, la synthèse de sphères inorganiques dont l'exemple le plus célèbre est celle de particules de silice réalisées par Stöber en 1968 [Stöber 1968], ou l'obtention de latex de polymères mono disperses de quelques nanomètres sont très fréquemment décrites dans la littérature [Matijevic 1982, Ishikawa 1988]. La figure 1.1 montre ainsi des photographies de particules colloïdales sphériques.
Diverses propriétés (magnétiques, optiques, catalytiques...) peuvent être aisément conférées à



(a) (b) (c)

Figure 1.1 – Photographies au microscope électronique à balayage de particules colloïdales de (a) : Argent 100 nm de diamètre, (b) : Silice 1 μm de diamètre organisé en réseau et de (c) : polystyrène de 1 μm de diamètre.

une particule colloïdale de forme sphérique en faisant varier la nature de son coeur et/ou de sa fonctionnalité de surface. La classification de ces colloïdes fonctionnels est alors délicate à établir, celle-ci pouvant être ordonnée selon la nature de l'entité déposée à leur surface (particules finement divisées, agent chimique), la composition de leur coeur, leur degré de symétrie et toute autre combinaison de ces divers modes.
Aujourd'hui, la communauté scientifique s'intéresse à la réalisation de colloïdes multifonctionnels. A cette fin, la dissymétrisation de particules est un axe de recherche privilégié [de Gennes 1998]. En effet, l'association d'un comportement asymétrique aux propriétés originales (optiques ou magnétiques) peut permettre d'envisager la réalisation de matériaux multifonctionnels. Du point de vue des applications, les particules dissymétriques pourraient présenter

des propriétés très intéressantes comparativement à leurs homologues symétriques. Elles pourraient ainsi par exemple constituer de nouveaux systèmes amphiphiles (si un hémisphère hydrophile était associé à un hémisphère hydrophobe), des dipôles géants (avec des charges opposées réparties sur chaque hémisphère) ou de nouveaux nanobjets biofonctionnels à vocation biologique. En 1991, lors du discours prononcé à l'occasion de la réception de son prix Nobel, Pierre Gilles De Gennes fut le premier à utiliser le terme original « Janus » afin de décrire des particules présentant des hémisphères dont la surface n'est pas homogène d'un point de vue chimique ou physique [de Gennes 1992]. Cette dénomination a été étendue à toutes les entités présentant une asymétrie de surface. Ainsi, une micelle, un dendrimère ou une particule bifonctionnelle peuvent être considérés comme des structures « Janus » comme le montre la figure 1.2.

A l'échelle particulaire, le terme « Janus » peut s'étendre à toute une catégorie d'objets dont

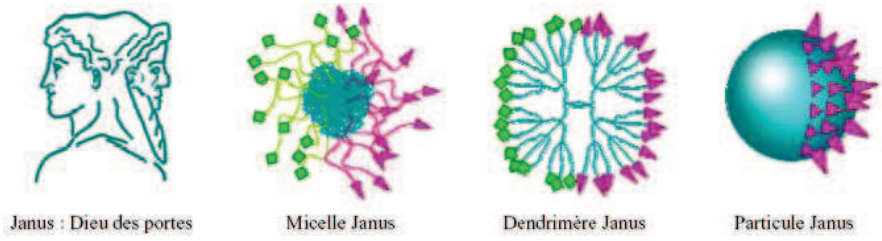


Figure 1.2 – Représentation schématique d'entités « Janus ».[Perro 2005a]

le caractère dissymétrique est issu de l'association de deux matériaux. L'utilisation d'une matrice bi- [Sukhorukov 2005], ou tri-dimensionnelle [Manoharan 2003] permettent de générer des particules présentant des asymétries de forme plus ou moins complexes, pouvant également être considérées comme des entités « Janus » comme présenté dans la figure 1.3.

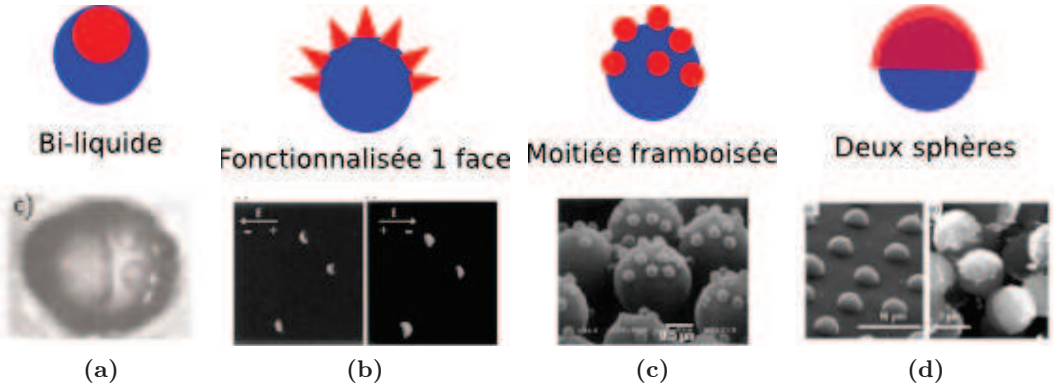


Figure 1.3 – Schémas et exemples de particules Janus (a) : bi-liquides [Casagrande 1988], (b) : fonctionnalisées sur une face seulement [Takei 1997], (c) : framboisées où des particules de diamètre inférieur à la particule principale sont greffées sur une de ses faces seulement [Fujimoto 1999], (d) : deux sphères où la particule principale est chapeautée par une autre demi sphere [Paunov 2004].

Les techniques de fabrication de masse de particules colloïdales de formes anisotropes reposent sur les approches ascendantes (bottom-up), descendantes (top-down) ou combinantes. Diverses procédures de dissymétrisation de particules initialement sphériques et isotropes par voie chimique ou physico-chimique ont été développées (par modification toposélective de sur-

face [Casagrande 1988], par séparation de phase [Perro 2005b] ou par la nucléation de surface [Suzuki 2007]). De plus, le recours conjoint aux voies de synthèse chimiques associées aux techniques classiques de la micro-électronique (voie combinante) émerge dans les techniques de fabrication de ces particules Janus. Ainsi, l'immobilisation de microsphères sur un substrat peut être exploitée afin d'exposer la partie non masquée à un dépôt directionnel. Cette technique, généralement employée pour le dépôt par évaporation d'un film métallique (or, titane, argent ou platine) ou d'oxyde métallique, peut être appliquée à des particules de nature et de taille très variées. L'utilisation de techniques classique de la micro électronique d'évaporation par canon d'électrons directionnelle d'une fine couche permet ainsi de créer des particules Janus dissymétriques lorsque celles ci sont positionnées sur un substrat.

1.1.2 Suspension colloïdale

En raison de leur faible dimension, le mouvement des particules dans un milieu de dispersion liquide est principalement déterminé par le mouvement Brownien. Celui-ci se caractérise par un mouvement perpétuel et aléatoire (en zigzags) des particules individuelles. Ce phénomène est dû aux nombreuses collisions que subissent les particules avec les molécules du milieu de dispersion, d'autres particules ou les parois du récipient contenant le système colloïdal. L'agitation thermique dans un liquide est responsable du constant mouvement des molécules. Le détail de la théorie du mouvement Brownien est présenté en annexe A avec des mesures de trajectoires sur des particules colloïdales de tailles variables. Le déplacement moyen des particules et le coefficient de diffusion sont plus importants pour des particules de faible taille, comme le montre la figure B.

L'appellation « dispersion colloïdale » n'est justifiée que si les particules sont uniformément

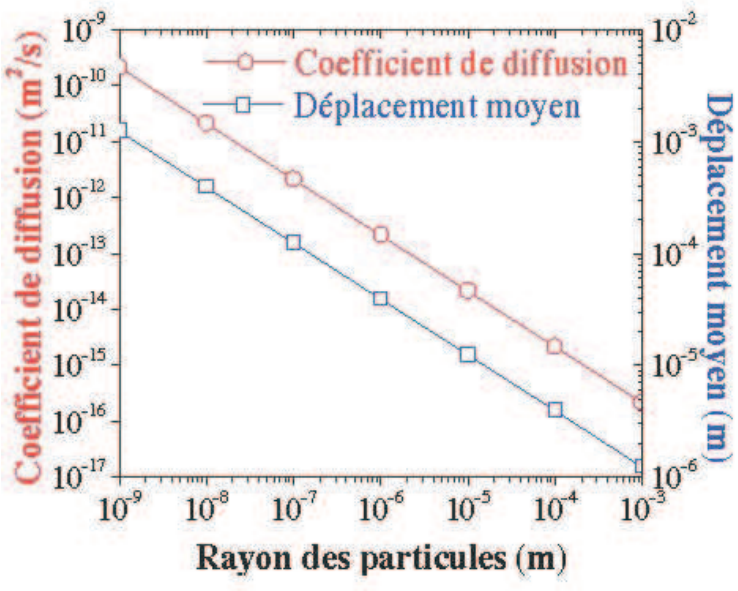


Figure 1.4 – Coefficients de diffusion et déplacements moyens calculés en fonction du rayon des particules. Les particules sont non-chargées. Le milieu de dispersion est l'eau et la température est de 25 ° C.[Pinedo-Rivera 2009]

dispersées dans leur milieu de dispersion. Dans une suspension de particules non chargées, les

colloïdes ne sont suspendus que si l'effet de la gravité est faible par rapport au mouvement Brownien. Pour des grandes particules, la gravité est responsable de leur sédimentation. Il existe une taille critique de colloïdes en dessous de laquelle la sédimentation n'a pas lieu. Afin de déterminer cette taille critique, on compare la vitesse de sédimentation d'une particule sphérique de rayon R non chargée avec la vitesse moyenne de cette même particule induite par le mouvement Brownien. La vitesse Brownienne (v_B) est donnée par l'équation [Eq. 1.1] dans laquelle k_B est la constante de Boltzmann, T la température du milieu et ρ la masse volumique du milieu (eau désionisée). La vitesse de sédimentation (v_{sed}) est déterminée en écrivant l'équilibre des forces sur la particule en sédimentation [Eq. 1.2] où F_g est la force de gravité de la particule, F_A la poussée d'Archimède et F_f la force de freinage visqueux de Stokes. De manière développée l'équilibre des forces sur la particule devient l'équation [Eq. 1.3] où μ est la viscosité dynamique du milieu. Ainsi, la vitesse de sédimentation est finalement donnée par la relation [Eq. 1.4]. La taille critique de sédimentation (R_c), qui correspond à la condition $v_{sed} = v_B$, est donnée par l'équation [Eq. 1.5].

$$v_B = \frac{3}{2}\left(\frac{k_B T}{\pi \rho R^3}\right)^{\frac{1}{2}} \qquad \text{[Eq. 1.1]}$$

$$F_g = F_A + F_f \qquad \text{[Eq. 1.2]}$$

$$\frac{4}{3}\pi R^3 \Delta_\rho g = 6\pi\mu R v_{sed} \qquad \text{[Eq. 1.3]}$$

$$v_{sed} = \frac{2}{9}\frac{\Delta_\rho g R^2}{\mu} \qquad \text{[Eq. 1.4]}$$

$$R_c \approx \left(45.5\frac{k_B T \mu^2}{\pi \rho \Delta_\rho^2 g^2}\right)^{\frac{1}{7}} \qquad \text{[Eq. 1.5]}$$

Les particules ayant un rayon $R < R_c$ ne sédimentent pas. Le Tableau 1.1 récapitule quelques valeurs du rayon critique de sédimentation pour différents matériaux dans l'eau. On observe que la limite de sédimentation est fortement dépendante de la masse volumique des particules.

Matériau	ρ ($\times 10^3 kg/m^3$)	$R_c(\mu m)$
Au	19.3	2
SiO_2	2.2	5.5
Polystyrène	1.05	15

Table 1.1 – Valeurs du rayon critique de sédimentation à 25 °C dans l'eau pour trois matériaux couramment rencontrés sous forme colloïdale. [Pinedo-Rivera 2009]

Les forces intrinsèques aux particules colloïdales sont résumées dans le tableau 1.2.

Type de force	Origine	Expression	Ordre de grandeur
Mouvement Brownien *directions aléatoires*	Collisions dues à l'agitation thermique des molécules	$F_B = \frac{k_B T}{dx}$	$\sim 10^{-15} N$
Force de gravité *verticalement vers le bas*	Omniprésente sur terre	$F_g = \frac{4}{3}\pi R^3 \rho_{part} g$	$\sim 10^{-13} N$
Poussée d'Archimède *verticalement vers le haut*	Phénomène hydrostatique	$F_A = \frac{4}{3}\pi R^3 \Delta_\rho g$	$\sim 10^{-14} N$
Force hydrodynamique d'entraînement *dans la direction du flux*	Friction visqueuse d'un fluide	$F_d = 6\pi\mu R v_{part}$	$\sim 10^{-12} N$

Table 1.2 – Forces en présence dans les suspensions colloïdales. Les ordres de grandeur sont donnés pour des particules colloïdales de polystyrène de 1μm de diamètre. Adapté de [Pinedo-Rivera 2009]

Les forces utilisées ultérieurement pour la manipulation de particules en suspension doivent être suffisamment importantes en terme de norme pour outrepasser les mouvements induits par les forces propres aux systèmes colloïdaux présentées dans le tableau 1.2.

1.2 Manipulation de particules colloïdales en géométrie microfluidique

De nombreux principes de préhension ont été développés afin de manipuler des micro-objets. Le principe de préhension est le principe physique que produit la force nécessaire pour assurer la saisie de l'objet. Ce principe physique conditionne le choix du préhenseur, les stratégies et les conditions environnementales à mettre en oeuvre pour saisir et déposer l'objet [Tichem 2004, Dionnet 2005]. Deux voies principales se dégagent :

- **les solutions de préhension par contact** comme les préhenseurs capillaires, les préhenseurs à gel, les micro pinces ou les propensions par adhésion [WALLE 2008], permettent la manipulation d'un grand type de matériaux et de formes de micro-objets. Ils sont également capables d'engendrer une force importante (typiquement jusqu'au quelques mN) pouvant être intéressantes par exemple, dans le cadre d'une opération d'insertion pour un micro-assemblage. Ces principes sont en général perturbés par les effets d'adhésion et des stratégies innovantes de lâcher doivent être développées pour assurer une relâche contrôlée et précise de l'objet.
- **les solutions sans contact** comme les pinces optiques, les pinces magnétiques ou la manipulation par diélectrophorèse qui présentent l'avantage de ne jamais créer de contact entre l'outil de manipulation et l'objet. Elles ne sont, par conséquent, pas perturbées par les effets d'adhésion. Généralement, dans ces solutions, les forces de blocage sur les micro-objets sont faibles (typiquement inférieure au micronewton) et sont souvent basées sur une classe de matériaux ayant une réponse à la force utilisée.

Cette étude s'inscrit dans une volonté de contrôler la position et la trajectoire de micro-objets dont la taille caractéristique est dans le domaine du micro-monde (typiquement inférieure à 10

μm). Pour ces valeurs dimensionnelles, les effets d'adhésion sont importants et ne peuvent être évités lors du contact. Nous avons par conséquent choisi de limiter l'étude à des manipulations sans contact.
Les forces physiques les plus répandues pour stabiliser et maintenir l'objet en lévitation et sans contact physique avec son environnement sont : la force hydrodynamique, la force magnétique, la force optique et la force diélectrophorétique.

1.2.1 Force hydrodynamique

En géométrie microfluidique les flux sont laminaires, ce qui permet aux micro-canaux de prendre n'importe quelle forme, sans risque de générer des turbulences qui perturberaient l'écoulement des particules. Pour mettre un flux en mouvement, des pousses seringues sont généralement utilisés, mais depuis quelques années des micro-pompes sont apparues. Elles ont l'avantage de réduire les volumes morts en minimisant la connectique et par leur petite dimension, aident à la mobilité du système.
L'utilisation conjointe d'un flux hydrodynamique d'entrainement et d'une matrice de micro-trous permet de placer des particules dans ces trous par aspiration dans un second canal [Tixier-Mita 2003] comme le montre la figure 1.5a. Ce système nécessite une technique complexe de gravure pour obtenir une taille de trou ni trop grande (risque d'avaler les particules) et ni trop petite (aspiration trop faible). De plus, il s'avère impossible de placer cote à cote deux types de particules différentes. Une alternative, toujours basée sur l'aspiration, consiste cette fois-ci à attraper les particules, non pas via des micro-trous, mais via des micro-capillaires. En plaçant ces micro-capillaires de part et d'autre du canal, différentes particules peuvent être capturées et mises en contact si le canal a la largeur de deux cellule [Lee 2005] (Figure 1.5b).
D'autres études plus récentes se sont focalisées sur l'utilisation du flux pour piéger des micro-objets [Dittrich 2006, Tan 2007]. Le principe est de bloquer une particule en la coinçant avec la force hydrodynamique tout en laissant passer les autres particules (Figures 1.5c et 1.5d). Cette technique a l'avantage d'être rapide et fortement parallélisable. Par contre, il semble difficile de placer deux types de particules l'une à coté de l'autre.

1.2.2 Force magnétique

Un autre principe de manipulation de micro-objets passe par l'exploitation de l'énergie magnétique. L'effort magnétique appliqué par un champ magnétique $\overrightarrow{B_0}$ sur un volume V possédant une permittivité magnétique $\xi_1(\overrightarrow{B_0})$ dans un milieu possédant une permittivité magnétique $\xi_2(\overrightarrow{B_0})$, vaut [Furlani 2007] :

$$\overrightarrow{F_{mag}} = \frac{1}{\mu_0} \iiint_V (\xi_1(\overrightarrow{B_0}) - \xi_2(\overrightarrow{B_0}))\overrightarrow{B_0} \bigtriangledown \overrightarrow{B_0}.dv$$

L'effort engendré par cette méthode peut être un effort répulsif ou un effort attractif en fonction du signe de $(\xi_1(\overrightarrow{B_0}) - \xi_2(\overrightarrow{B_0}))$. Ainsi lorsque cette différence est positive, la force appliquée a tendance à ramener l'objet vers la source de champ magnétique ; quand celle-ci est négative, l'objet a tendance à s'éloigner de la source de champ. Ce principe est principalement utilisé pour le tri de cellule. Les cellules n'étant que très peu sensibles au champ magnétique (ξ_1 faible), l'effort magnétique appliqué directement aux cellules est extrêmement faible et peut

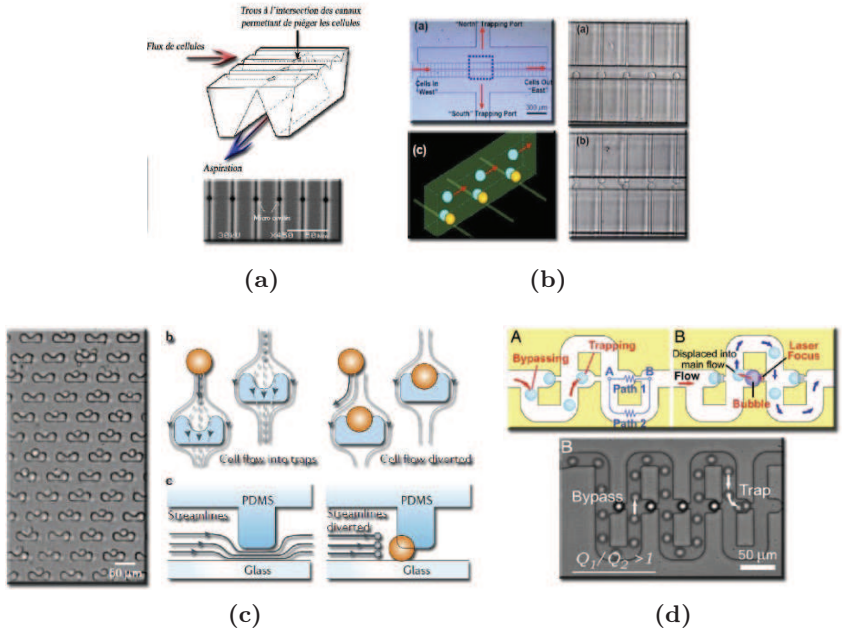


Figure 1.5 – (a) : principe et image du système composé de micro-trous [Tixier-Mita 2003]. (b) : principe et image du système constitué de micro-capillaires pour capturer les cellules [Lee 2005]. (c) et (d) Techniques pour capturer des micro-objets à l'aide de la force hydrodynamique [Dittrich 2006, Tan 2007].

ne pas être suffisant pour engendrer un déplacement. Le moyen le plus couramment utilisé consiste à fixer des particules colloïdales magnétiques sur les cellules. Récemment, des travaux d'optimisation de la structure du système créant le gradient de champ magnétique nécessaire à la création de la force magnétique ont permis d'accroitre sensiblement l'effort applicable. Ainsi, il est désormais possible de manipuler directement les cellules et de les trier en fonction de leur propriétés magnétiques sans ajout de particules [Zborowski 2003, Furlani 2007] (voir figure 1.6). De manière plus générale l'utilisation de ces effets magnétiques est importante dans le cadre de la manipulation d'objets artificiels :

- immobilisation de particules magnétiques dans un conduit à l'aide de micro- électroaimants [Smistrup 2006].
- lévitation diamagnétique d'une particule unique [Hichem 2006].

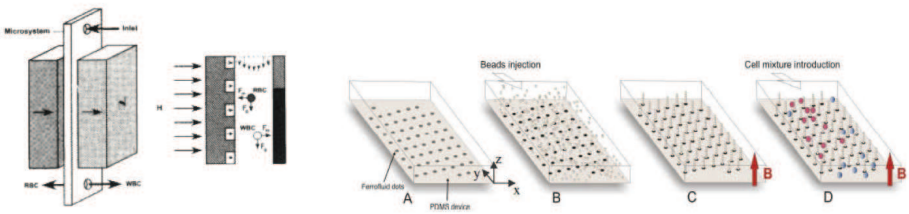


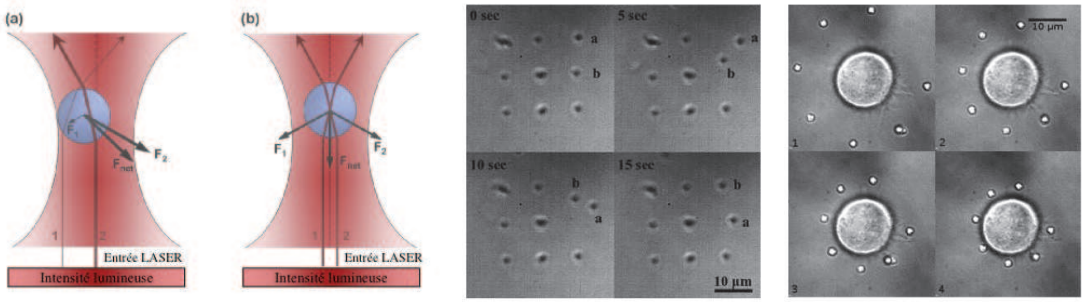
Figure 1.6 – (a) : Principe de tri de cellules par magnétophorèse. [Furlani 2007] (b) : Schéma illustrant la capture des cellules par une matrice de colonnes de billes magnétiques recouvertes d'anticorps[Laure 2009].

1.2.3 Force optique

Les pinces optiques sont capables de manipuler des micro-objets diélectriques en utilisant un faisceau laser focalisé. Ces pinces optiques fonctionnent sur des objets transparents possédant des indices de réfraction supérieurs aux indices de réfraction du milieu de manipulation. La largeur du faisceau est le siège d'un fort gradient de champ électromagnétique. La particule est donc attirée vers la région où le champ est maximal se trouvant au centre du faisceau. La force de rappel optique appliquée sur une particule de rayon R, suspendue dans un milieu de permittivité relative $\varepsilon_{mopt} = n^2\varepsilon_0$ est soumise à la force de gradient suivante :

$$\overrightarrow{F_{opt}} = 2\pi R^3 \varepsilon_{mopt} K_{opt} \nabla |E^2|$$

Où $K = \frac{n_p^2 - n_{mopt}^2}{n_p^2 + 2n_{mopt}^2}$ dénote la différence relative d'indice de réfraction. Son signe est donc celui de $n_m - n_{part}$. Cette méthode permet ainsi de manipuler des objets allant d'une taille de quelques dizaines de nanomètres à quelques dizaines de micromètres [Ashkin 1970, Ashkin 1986, Ohta 2007]. Le principe de la manipulation de micro-objets par pinces optiques est décrit dans la figure 1.7a. Si la particule est écartée du centre du faisceau, une force résultante non nulle est appliquée



(a) **(b)** **(c)**

Figure 1.7 – (a) : Principe physique de la pince optique : la particule est attirée vers le centre du faisceau laser (a) ; la particule au centre du faisceau subit une force résultante verticale suivant l'axe optique (b) [KHARBOUTLY 2011]. (b) :Manipulation des bactéries en utilisant un système à multifaisceaux laser. 4 photos prises en différentes intervalles de temps montrent le positionnement de 9 bactéries [Ferrari 2005]. (c) : Les micro particules de polystyrène sont déplacées relativement à une bille de 10 μm de polystyrène a l'aide d'un dispositif qui scanne la scène avec une fréquence de 60 Hz [Emiliani 2004].

au centre de la particule et dirigée vers le centre du faisceau. Si la position du centre de la particule est au centre du faisceau laser, les rayons sont réfractés symétriquement, donnant une force latérale résultante nulle. En revanche, la composante verticale de la force résultante tend à ramener le centre de l'objet sphérique sur le centre de focalisation. En réalité, les rayons réfléchis induisent une composante de force verticale supplémentaire et la position stable est par conséquent légèrement décalée du centre de focalisation du faisceau suivant l'axe z et dépend de la taille du micro-objet.
Un système élémentaire de pince optique comprend : une source laser, un élargissement de faisceau, un objectif microscopique, un condenseur optique pour créer le piège optique et un capteur de position.
Ce principe permet de manipuler une grande variété de micro-objets comme des sphères artificielles, des objets biologiques ou des nano-objets comme des nanotubes de carbone. Les pinces

optiques ont été utilisées pour capturer, sélectionner et déplacer de nombreux types cellulaires ou organismes unicellulaires : bactéries, virus, spermatozoïdes, globules rouges, cellules rétiniennes en culture [Ashkin 1997]. La manipulation optique de cellules mobiles comme les spermatozoïdes pour la mesure de leurs forces de propulsion flagellaire et d'échappement au piège optique constitue un outil diagnostique de certaines stérilités [König 1996]. L'association pinces et ciseaux optiques pour sélectionner, déplacer et injecter un spermatozoïde directement dans l'ovule a également été proposée [Sasaki 1991].
La manipulation de plusieurs objets nécessite le déplacement de plusieurs pièges optiques dans le champ de manipulation. Cette contrainte peut être obtenue soit en scannant la scène rapidement avec un laser unique [Sasaki 1991, Arai 2006, Arai 2009], soit en créant une image possédant plusieurs pièges optiques à l'aide de plusieurs pinces optiques [Dufresne 1998, Chapin 2006, Grier 2006].
Une illustration des capacités de ces moyens de micromanipulation est présentée sur la figure 1.7b. Des bactéries ont été manipulées en utilisant un dispositif à plusieurs pièges optiques [Ferrari 2005]. Un autre exemple qui illustre la manipulation de plusieurs objets en utilisant un seul rayon laser mais en scannant la scène rapidement (60 Hz) pour position des micro-billes de 2 μm de diamètre autour d'une cellule (voir figure 1.7c). Dans ce système les forces exercées sur les particules peuvent être contrôlées précisément en fonction de l'intensité du rayon laser et de la fréquence de balayage [Emiliani 2004].

1.2.4 Force diélectrophorétique

La force diélectrophorétique est le résultat d'une différence de pression électrostatique exercée sur une particule polarisable suspendue dans un milieu polarisable par un champ électrique alternatif non-uniforme, E.
Au repos et sans champ, une particule peut présenter des charges surfaciques qui sont contre balancées [Lyklema 1995] par les ions contenus dans son milieu de suspension, comme le montre la figure 1.8a. Placée dans un champ continu uniforme, la particule présentera un dipôle répondant à la contrainte électrique imposée et les contres-ions avoisinants assureront l'électroneutralité de la particule. Dans ce cas, celle ci ne bouge pas, comme le montre la figure 1.8a. Dans cette même configuration, si la particule est plus polarisable que le milieu, le déplacement de charge induit dans la particule sera plus important que celui des contres-ions environnants, résultant en une direction du moment dipolaire dans le sens du champ électrique, comme le montre la figure 1.8b.1 et 1.8c.1. A l'inverse, si la particule est moins polarisable, la direction du moment dipolaire induit sera inversée, comme le montre la figure 1.8b.2 et 1.8c.2.
Dans le cas d'un champ électrique alternatif, le dipôle induit par le mouvement de charge dans la particule suivra les changements de sens du champ électrique et ce de manière non-instantanée puisque le temps de déplacement des porteurs de charge n'est pas nul. Typiquement, à basse fréquence de champ électrique alternatif, ces temps de réponse sont quasiment nuls et donc la particule est plus polarisable que le milieu. A haute fréquence, les porteurs de charge n'ont pas le temps nécessaire pour se stabiliser et la particule devient moins polarisable que le milieu.
Dans une configuration de champ électrique alternatif et non-uniforme, le dipôle induit répond à une différence de pression électrostatique d'une face à une autre de la particule comme le montre la figure 1.8c.3 et 1.8c.4 et la particule se déplace selon $\nabla|E|^2$. Cette pression exerce donc une force, appelée force diélectrophorétique [Pohl 1950] dont l'expression est donnée par

l'équation [Eq. 1.6], et agit sur les particules en fonction de leur volume (ν, rayon R), du gradient de le norme du champ électrique appliqué ($\nabla|E|^2$) et de la différence de polarisabilité de la particule et de son milieu de suspension.

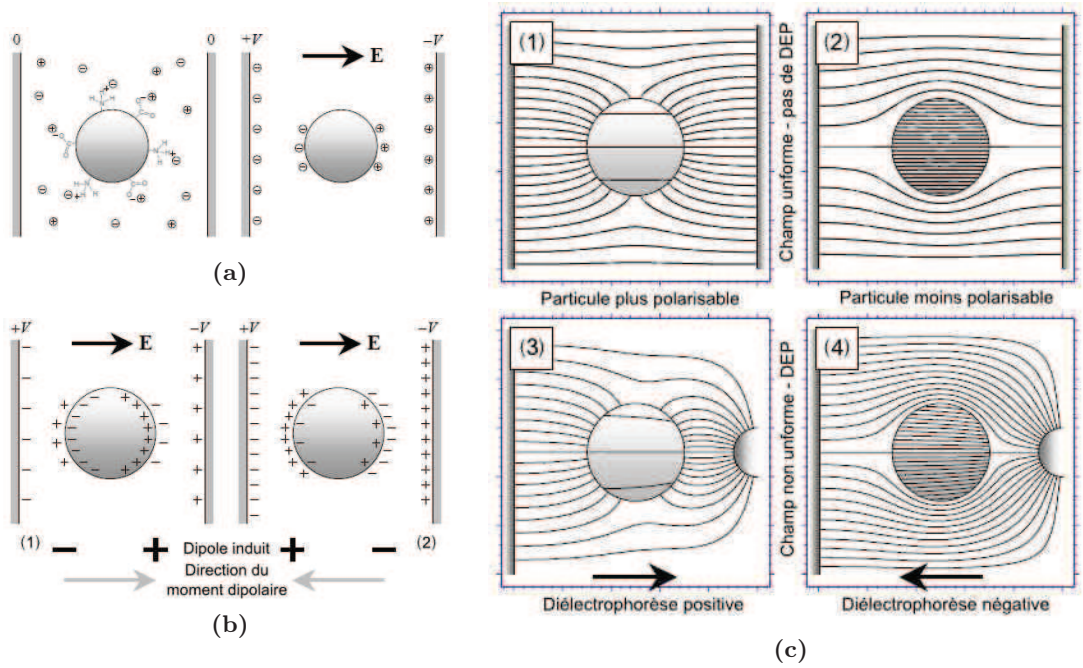


Figure 1.8 – (a) : Schéma du mouvement des charges d'une particule plongée dans un champ électrique continu, (b) : Schéma de déplacement des charges dans une particule plongée dans un champ continu lorsque (1) la particule est plus polarisable que le milieu et (2) lorsque la particule est moins polarisable que le milieu, (c) : Schémas des lignes de champ dans une particule plongée dans des champ uniformes ou non-uniformes lorsque celle-ci est plus ou moins polarisable que le milieu de suspension.

Cette différence est fonction de la fréquence du champ électrique appliqué et du système particule - milieu de suspension. Elle est quantifiée par le Facteur de Clausius-Mossotti ($Re(\omega)$) dont l'expression générale est présenté dans l'équation [Eq. 1.7].

$$< F_{DEP} >= \pi\varepsilon_m R^3 Re(\omega)\nabla|E|^2 \text{ où } |E|^2 = E \cdot E^* \qquad \text{[Eq. 1.6]}$$

$$Re(\omega) = Re\left(\frac{\tilde{\varepsilon}_p - \tilde{\varepsilon}_m}{\tilde{\varepsilon}_p + 2\tilde{\varepsilon}_m}\right) \text{ où } \tilde{\varepsilon}_{m/p} = \varepsilon_{m/p} - i\frac{\sigma_{m/p}}{\omega} \qquad \text{[Eq. 1.7]}$$

Où $\varepsilon_{m/p}$ est la conductivité du milieu ou de la particule, R le rayon de la particule, ω la pulsation d'un champ électrique alternatif E, $\sigma_{m/p}$ la conductivité du milieu ou de la particule.
Ainsi, la direction de la force est imposée par $\nabla|E^2|$ qui est définit par la géométrie d'une paire d'électrodes. En revanche, le sens de la force est donné par le signe du Facteur de Clausius-Mossotti.
L'expression du Facteur de Clausius-Mossotti est établie par les permittivités et conductivité complexes des particules et du milieu. Notons qu'il existe des ordres supérieurs du Facteur de Clausius-Mossotti qui traduisent des phénomènes de polarisabilité plus fins que ceux décrits

ici. Bien que la mesure des propriétés diélectriques d'un liquide soit réalisables par des techniques standards, il est en revanche difficile de les établir pour des micro-particules. Le détail de l'établissement expérimental du Facteur de Clausius-Mossotti pour un type de particule colloïdale sera présenté au chapitre 4. A titre d'exemple, la figure 1.9 donne quelques Facteurs de Clausius-Mossotti pour des particules de polystyrène de tailles croissantes, pour des cellules et à des conductivités croissantes.

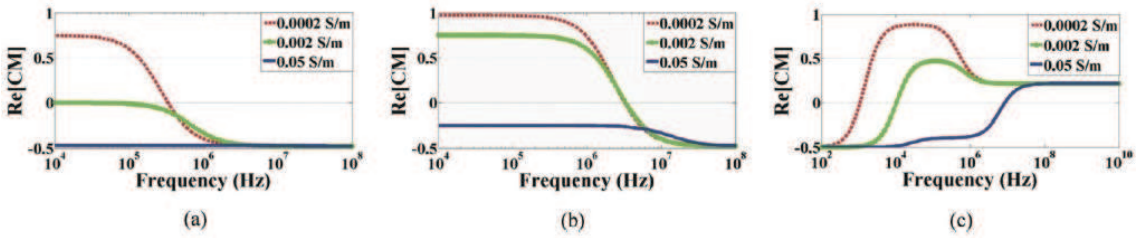


Figure 1.9 – Exemples de Facteur de Clausius-Mossotti pour des particules colloïdales de (a) polystyrène 2 μm de diamètre, (b) polystyrène 200 nm de diamètre et (c) de cellule Chlorella sp., en fonction de la fréquence et pour 3 conductivités différentes. Extrait de [Oh 2009].

Lorsque le champ électrique est alternatif (de pulsation ω), c'est à dire imposé par une différence de potentiel alternative, le Facteur de Clausius-Mossotti change de valeur et de signe. Ainsi, lorsque la particule est plus polarisable que le milieu, $Re(\omega) > 0$, elle est attirée vers les zones de fort gradient. Ce régime est appelé régime de diélectrophorèse positive. A l'inverse, lorsque la particule est moins polarisable que le milieu, $Re(\omega) < 0$, elle est repoussée des zones de forts gradients. Lorsque $Re(\omega) = 0$, la diélectrophorèse est nulle et correspond à une fréquence du signal alternatif appelée fréquence de coupure. On distingue alors 3 régimes fréquentiels :

- **Diélectrophorèse positive (pDEP)**, où les particules sont attirés vers les zones de forts gradients,
- **Fréquence de coupure (f_0)**, où les particules ne sont plus soumises à la diélectrophorèse,
- **Diélectrophorèse négative (nDEP)**, où les particules sont repoussées des zones de forts gradients.

Dans les systèmes microfluidiques avec des électrodes embarquées, ces zones de forts gradients sont généralement les bords des électrodes.

Ce phénomène est utilisé dans de nombreuses applications essentiellement biologiques. Plusieurs méthodes sont utilisées pour réaliser la manipulation par diélectrophorèse. Ces méthodes diffèrent par la forme et le nombre d'électrodes employées et par la nature des objets manipulés.

Le tri de particules par exemple, trouve de nombreuses applications dans le domaine de la recherche médicale [Fiedler 1998, Pedersen 2006, Cui 2009b]. L'intérêt de séparer certains types de cellules d'une population indifférenciée permet aux chercheurs d'effectuer des études plus précises et mieux ciblées. Par exemple, la séparation de cellules cancéreuses et de cellules non cancéreuses permet de fiabiliser les tests de traitements spécifiques de la maladie. D'autres travaux utilisent la force de diélectrophorèse positive pour attire des particules, en créant des zones de stagnation. Le positionnement de particules par la diélectrophorèse négative consiste à maintenir une particule dans une position désirée définie par le champ électrique imposé. La diélectrophorèse permet en effet de créer un effort suffisant pour maintenir en lévitation une particule à proximité des électrodes [Voldman 2003, Rosenthal 2005, Hunt 2008, Thomas 2009].

1.2.5 Bilan des forces sans contact

Les forces sans contact présentées sont alors classées selon les critères présentés dans le tableau 1.3.

	Hydrodynamique	**Magnétique**	**Optique**	**Diélectrophorèse**
Composante du système	flux de liquide	bobines, source de courant	laser, condenseur, guide optique	électrodes, source de tension
Type d'objets	liquides	ferro-, para- et dia-magnétiques	diélectriques transparents non sensibles	diélectriques
Degré de liberté	1 degré de liberté	6 degrés de liberté	3 translations	6 degrés de liberté
Ordre de grandeur de la force	1 μN	1 μN	0.1 nN	0.1 μN

Table 1.3 – Comparaison des différentes forces de manipulation sans-contact.

- **Les flux hydrodynamiques** permettent de placer des objets grâce aux forces hydrodynamiques d'entrainement. Leur mise en application nécessite la conception et la fabrication de canaux microfluidiques suffisamment précis dédiés à un unique type de particule, ce qui peut limiter leur utilisation.
- **La manipulation en utilisant des forces magnétiques** peut s'effectuer sur des objets paramagnétiques, diamagnétiques ou ferromagnétiques en milieu liquide. Le système utilisé pour générer des forces magnétiques est moins compliqué que celui d'une pince optique. Il est constitué de bobines et d'une source de courant électrique. A l'échelle micrométrique, les objets doivent être de nature ferromagnétique [Hichem 2006, Chetouani 2007] pour engendrer un niveau de force suffisant pour les déplacer. Ceci constitue le principal inconvénient de cette méthode.
- **Les pinces optiques** permettent de manipuler à l'aide d'un faisceau laser, en milieu liquide, plusieurs types d'objets à condition que ces derniers soient diélectriques, transparents et d'indice de réfraction supérieur au milieu liquide. Le rayon laser focalisé sur une particule engendre une forte énergie qui parfois endommage l'objet surtout si ce dernier est sensible (cellule, bactérie). De plus, cette méthode nécessite des matériaux très sensibles et coûteux et son intégration dans des environnements microfluidiques est difficile.
- **L'utilisation des forces électrocinétiques** et précisément la force diélectrophorétique permet de manipuler des objets possédant des propriétés diélectriques, ce qui est le cas des cellules biologiques et des composants microfabriqués inorganiques. La génération de la force de diélectrophorèse nécessite des électrodes et une source de tension alternative. La manipulation des microparticules par la force de diélectrophorèse nécessite des électrodes micrométriques réalisables avec des moyens de microfabrication classiques et donc fortement intégrable en configuration microfluidique. De plus, grâce au Facteur de Clausius-Mossotti, cette force devient duale, à la fois attractive ou répulsive, en

fonction de la fréquence du potentiel électrique appliqué, ce qui la rend particulièrement intéressante pour la manipulation d'objets micro-métriques.

Nous avons fait le choix d'utiliser la force diélectrophorétique pour manipuler des micro-objets en canal microfluidique.

1.3 Électrocinétique en canal microfluidique

L'application d'un champ électrique dans un canal microfluidique rempli d'une solution colloïdale va générer une ensemble de forces électrocinétiques qui vont agir sur le fluide et sur les particules. Nous expliciterons dans cette partie les forces électro-hydrodynamiques qui se décomposent en force électro-osmotique et électrothermique, ainsi que la force diélectrophorétique. Préalablement, nous décrirons la force hydrodynamique d'entrainement qui agit sur les particules lorsque leur milieu de suspension est confiné en géométrie microfluidique.

1.3.1 Force hydrodynamique

Le flux d'un fluide quelconque est caractérisé par son nombre de Reynolds *Re*. Le nombre de Reynolds représente le rapport entre les forces d'inertie et les forces visqueuses d'un écoulement et est donné par l'équation [Eq. 1.8].

$$Re = \frac{VL}{\nu} \qquad \text{[Eq. 1.8]}$$

Avec V la vitesse du fluide, L la dimension caractéristique du système d'écoulement (la dimension jugée la plus pertinente : le diamètre d'une conduite, la longueur d'une plaque, etc.), et ν la viscosité cinématique de l'eau ($\nu_{eau} = 10^{-6}\ m^2/s$). Par exemple, pour une canal de longueur L = 100 μm dans un écoulement d'eau ayant une vitesse V =1 mm/s, le nombre de Reynolds est $Re = 0.1$.
Dans des canaux microfluidiques le nombre de Reynolds est généralement très petit ($Re \ll 1$) et les forces de viscosité deviennent prépondérantes face aux forces d'inertie [Tabeling 2003]. Ceci implique que le flux est laminaire (des éléments de fluide voisins demeurent voisins). Lorsqu'un micro-objet est placé dans un flux laminaire uniforme, la loi de Stokes établit directement la force hydrodynamique appliquée à l'objet. Cette loi n'est valable que lorsque $Re \ll 1$, mais peut être extrapolée jusqu'à $Re < 10$ avec une bonne approximation. Pour un fluide uniforme de vitesse V , la force appliquée à l'objet de vitesse U_{part} s'écrit :

$$F_{drag} = k_f \mu (V - U_{part}) \qquad \text{[Eq. 1.9]}$$

avec k_f le facteur de forme de l'objet entrainé ($k_f = 6\pi R$ dans le cas d'une sphère de rayon R) et μ la viscosité dynamique du milieu.
La force hydrodynamique est donc proportionnelle à la viscosité dynamique du fluide. Lorsque la particule est au repos avant l'application de la force d'entrainement, sa vitesse est souvent considérée comme nulle et par conséquent, la totalité de la force hydrodynamique d'entrainement s'applique sur la particule, induisant une vitesse de déplacement égale à celle du fluide moyennant le facteur k_f .

1.3.2 Électrocinétique

La force diélectrophorétique est une force de gradient de champ électrique. Ainsi, l'accès à de forts gradients peut être rendu possible par la diminution d'échelle des électrodes et des espaces inter-électrodes. Par exemple, des électrodes séparées de 10 μm ayant une différence de potentiel électrique de 1 V produiront un champ électrique global de $\frac{1V}{10\mu m} = 10^5$ V/m. De plus, un potentiel alternatif évite les problèmes liés à l'utilisation de potentiels continus dont les normes seraient trop importantes. En effet, des effets parasites et destructeurs peuvent intervenir lorsque de tels champs continus sont créés dans un liquide, comme l'électrolyse de l'eau sur les électrodes, produisant du dihydrogène et une destruction irréversible des électrodes.
Toutefois, un champ électrique alternatif créé au sein d'un liquide induit des mouvements du liquide lui-même. Pour déterminer les forces mises en jeux, nous considérons un élément de fluide de masse volumique ρ, de permittivité ε et nous supposons qu'il contient une densité volumique de charge ρ_E et est soumis à un champ électrique E.
La force engendrée par E sur cet élément, dite force électro-hydrodynamique (EHD), est donnée par l'équation 1.10.

$$F_{EHD} = \rho_E E - \frac{1}{2}|E|^2 grad(\varepsilon) + \frac{1}{2} grad\left[\rho_E |E|^2 \left(\frac{\partial \varepsilon}{\partial \rho}\right)_T\right] \qquad \text{[Eq. 1.10]}$$

Le premier terme de cette équation représente la force de Coulomb qui est la force électrique agissant sur les charges libres dans un liquide. Il est généralement prépondérant vis-à-vis des deux autres [Ramos 2005]. Le deuxième terme, appelé force diélectrique, représente une force de polarisation induite dans le liquide. Cette force, dont le module est une fonction du gradient de permittivité du liquide, est habituellement plus faible que la force de Coulomb (facteur 10^{-2}) [Atten 1969]. Le troisième terme est la pression d'électrostriction qui ne joue aucun rôle moteur dans la mise en mouvement du fluide. En fait, l'électrostriction est par définition la déformation non uniforme d'un substrat lorsqu'il est soumis à un champ électrique. Les forces qui sont à l'origine du mouvement du fluide sont donc la force électrique et la force diélectrique. La force EHD est alors donnée par l'équation 1.11.

$$F_{EHD} = \rho_E E - \frac{1}{2}|E|^2 grad(\varepsilon) \qquad \text{[Eq. 1.11]}$$

Les charges créées spontanément par électro-osmose (EO) (charges surfaciques) ou par électrothermie (ET) (charges volumiques) peuvent mettre en mouvement le liquide. L'électro-osmose est basée sur la mise en mouvement par un champ électrique (continu ou alternatif) de la densité de charge électrique engendrée dans la double couche électrique entre un solide isolant hydrophile et un liquide. L'électrothermie existe lorsqu'un gradient de température est couplé à un champ électrique continu ou alternatif.

1.3.2.1 Électro-osmose

Lorsqu'un fluide entre en contact avec les parois des canaux, une double couche électrique peut se former. Si l'on applique un champ électrique continu et perpendiculaire aux parois, on produit alors un flux électro-osmotique. La première mise en évidence du flux osmotique revient à Reuss en 1809 [Probstein 1994]. Il remarque en effet que sous l'influence d'un champ électrique, l'eau migre à travers une cloison d'argile poreuse. Ce phénomène résulte de l'interaction entre

l'électrolyte (liquide contenant des ions dissous) et les parois des canaux, qui a pour conséquence d'induire des charges à l'interface solide/liquide. Cette couche électrique peut avoir pour origine différents événements : adsorption d'ions, dissociation de groupe d'ions, séparation de charges... Et la surface va se charger positivement ou négativement ce qui produira via la force coulombienne, l'attraction de contres-ions au niveau du liquide. Cette couche de contres-ions est divisée en deux parties : une qui est directement accolée à la surface, dite couche de Stern et une autre couche qui est diffuse et riche en contres-ions, résultant d'un équilibre entre l'agitation thermique et les forces électriques, comme le montre la figure 1.10. Cette dernière ne mesure en général que

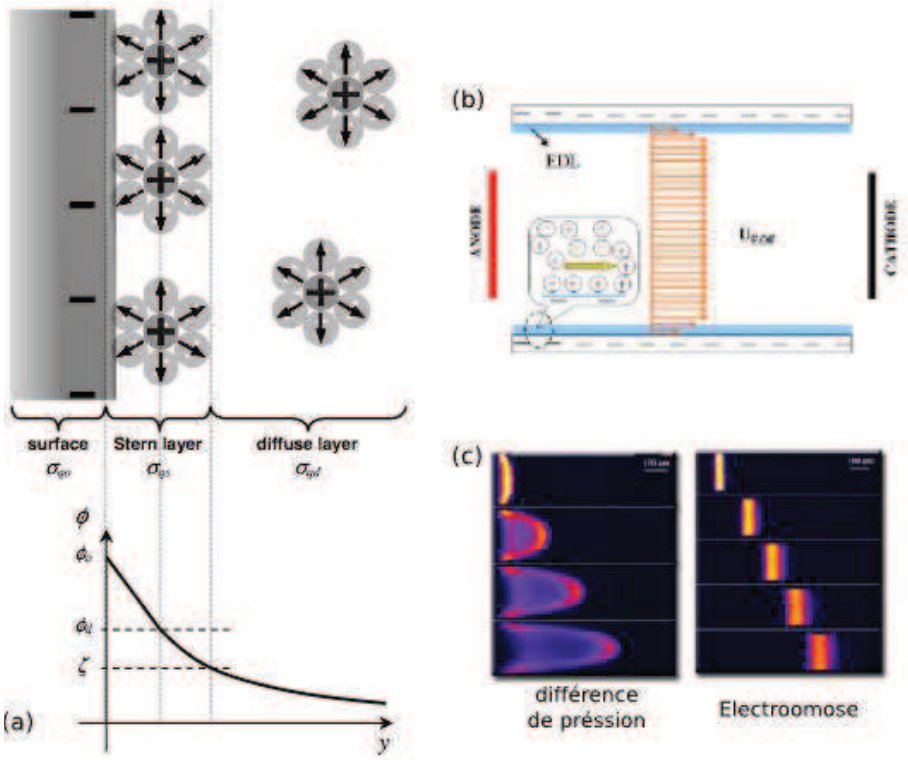


Figure 1.10 – (a) Répartition du potentiel électrique normal à la paroi d'une interface solide/liquide. (b) Schéma de principe d'un flux électro-osmotique lorsqu'une différence de potentiel est appliquée perpendiculairement au canal microfluidique. Sous l'effet du champ électrique, la double couche est mise en mouvement et draine le fluide selon l'axe du champ électrique. (c) Photographie d'un écoulement induit par une différence de pression et celui induit par un flux électro-osmotique.

quelques nanomètres. Cette double couche induit donc une inhomogénéité électrique au niveau de l'interface, générant un potentiel local. Le modèle de Gouy-Chapman décrit ce potentiel Ψ, qui suit une loi en décroissance exponentielle suivant la distance x à la paroi [Eq. 1.12] où ζ est le potentiel en x=0, appelé potentiel zêta, et λ la longueur de Debye-Huckel définie par l'équation [Eq. 1.13].

$$\Psi(x) = \zeta e^{-x/\lambda} \qquad \text{[Eq. 1.12]}$$

$$\lambda = \sqrt{\frac{D\varepsilon}{\sigma}} \qquad \text{[Eq. 1.13]}$$

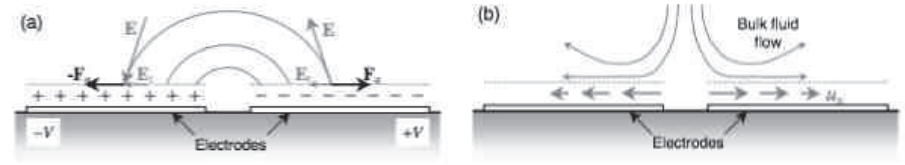
ε et σ représentent respectivement la permittivité et la conductivité du milieu et D est le coefficient de diffusion moléculaire des espèces chargées considérées. On peut remarquer que dès que

l'on s'éloigne de la paroi d'une longueur supérieure à λ, le potentiel ζ devient pratiquement nul. Le potentiel zêta dépend principalement de la quantité de contres-ions dans la solution ayant la mobilité suffisante pour se lier avec la paroi chargée. Le tableau 1.4 donne quelques longueurs de Debye pour des milieux de dispersions communs. Si l'on applique un champ électrique continu

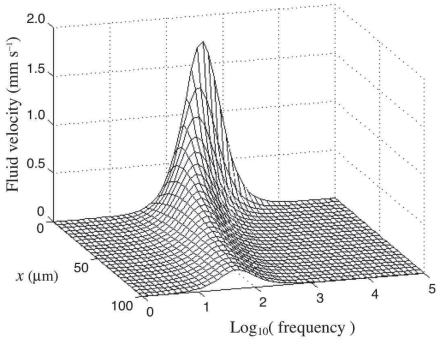
Liquide	Conductivité (S/m)	λ (nm)
Électrolyte	10^{-1}	~ 3
	10^{-2}	~ 10
Eau déionisée	10^{-4}	~ 80
Acétone (organique)	10^{-6}	~ 500

Table 1.4 – Longueurs de Debye pour différents électrolytes.

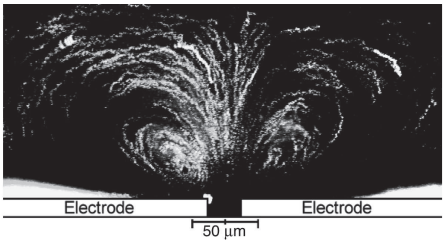
parallèle aux parois des canaux présentant cette double couche, sous l'effet des forces de Coulomb induites par le champ électrique, la double couche chargée électriquement va se mettre en mouvement, entrainant à son tour le reste du fluide sous l'action des forces visqueuses comme le montre la figure 1.10.
Dans une telle configuration, si le champ est alternatif, l'équilibre et le mouvement des charges ne pourront induire de déplacement. En revanche, dans une configuration où le champ électrique alternatif n'est pas uniforme, il apparait un déplacement de fluide. De nombreux travaux ont pu mettre en évidence ce déplacement [Ramos 1999, Green 2000, González 2000, Green 2002]. La polarisation des électrodes par l'application de la différence de potentiel gouverne en même temps le potentiel présent dans le liquide à la limite de la double couche électronique (ce qui détermine le potentiel tangent) mais aussi la chute du potentiel au sein de la double couche (ce qui détermine la charge surfacique). Dans le cadre d'électrodes coplanaires, comme le montre l'exemple de la figure 1.11a, une différence de $\pm V$ est appliqué entre les électrodes, ce qui donne naissance à un champ E avec la composante tangentielle E_t en dehors de la double couche et une charge induite sur chacune des électrodes. Cette dernière est soumise à une force F_q due à l'action du champ tangent, induisant alors un mouvement de liquide. La figure 1.11a.(a) montre le système pour une demi-période du signal électrique alternatif. Pendant l'autre demi-période, la direction du champ tangent et le signe de la charge induite sont opposés. Sur un cycle entier, la direction de la force reste constante et donne naissance à une force non nulle dans le temps et un flux de liquide continu comme le montre la figure 1.11a.(b).
Ce flux électro-osmotique alternatif (ACEO) résulte donc de la compétition entre la polarisabilité de l'électrode et la réponse de la double couche électronique au champ tangent. Ainsi, ce flux dépend de la fréquence du signal électrique et du potentiel zeta initial comme le montre l'équation [Eq. 1.14] où σ_{qo} représente la conductivité surfacique de charge sur l'électrode, E_t le champ tangent à l'électrode, ν la viscosité cinématique du milieu. En introduisant une fréquence non-dimensionnelle Ω [Eq. 1.15], où x est la distance au centre du système, la chute de potentiel à travers la double couche est donnée par [Eq. 1.16] où V_0 est le potentiel réel appliqué à l'électrode. Finalement dans un système coplanaire, la vitesse de glissement du liquide sur une



(a)



(b)



(c)

Figure 1.11 – (a).(a) Schéma du mécanisme de l'électro-osmose AC. (a).(b) L'interaction du champ tangent à la surface des électrodes et des charges surfaciques de la double couche donne naissance à une vitesse surfacique u_x et un mouvement général du liquide.[Morgan 2003a]. (b) Flux de liquide induit par ACEO à la surface d'une électrode en fonction de la distance au centre du système et de la fréquence du signal électrique. La différence de potentiel est de 1 V dans de l'eau déionisée et les électrodes co-planaires séparées de 25 μm[Morgan 2003a]. (c) Photographie de lignes de courant obtenue par superposition successive d'images du mouvement de particules mises en mouvement par ACEO à $f = 100Hz$ et une conductivité de 2.1 mS/m

électrode induite par ACEO est donné par l'équation [Eq. 1.17].

$$\langle u_x \rangle = \frac{1}{2} Re \left[\frac{\sigma_{qo} E_t^*}{\nu \lambda} \right] \qquad \text{[Eq. 1.14]}$$

$$\Omega = (1/2)\pi\lambda x(\varepsilon/\sigma)\omega \qquad \text{[Eq. 1.15]}$$

$$\phi_d = \frac{V_0}{2(1+i\Omega)}) \qquad \text{[Eq. 1.16]}$$

$$\langle u_x \rangle = \frac{1}{8} \frac{\varepsilon \phi_0^2 \Omega^2}{\nu x (1+\Omega^2)^2} \qquad \text{[Eq. 1.17]}$$

Un exemple d'évolution de la vitesse de glissement est présenté figure 1.11b où le maximum de vitesse est obtenu pour une fréquence de 200 Hz environ. La figure 1.11c montre ainsi les lignes de courant induit par l'électro-osmose au dessus d'électrodes coplanaires.
Dans des géométries co-planaires, l'effet de l'électro-osmose se traduit par un positionnement des particules au centre des électrodes [Oh 2009]. Alors que de nombreux travaux ont pu caractériser et utiliser les flux électro-osmotiques alternatifs, peu en revanche ont pu les mettre en évidence dans des géométries de confinement tridimensionnelles où les électrodes ne sont plus co-planaires mais parallèles de part et d'autre du canal microfluidique. Ainsi, Chen et al. [Chen 2009] ont pu observé des flux électro-omostiques en géométrie verticale (voir schéma 1.12a) allant jusqu'à des vitesses de déplacement de l'ordre du millimètre par seconde, et des lignes de champ verticales comme montrées sur la figure 1.12b.

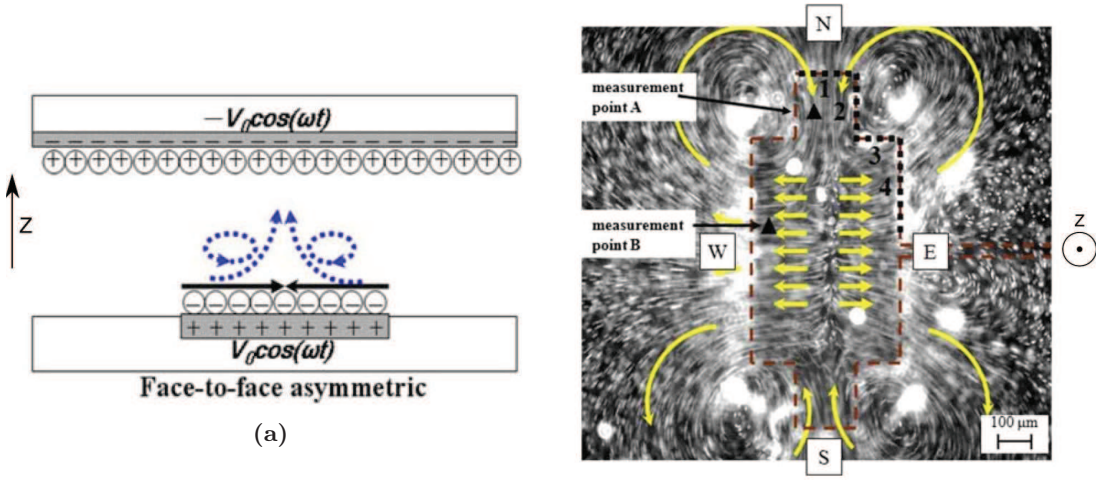


FIGURE 1.12 – (a) : Schéma du dispositif d'électro-osmose en électrodes verticales, (b) : Lignes de courant mises en évidence par superposition d'images de particules.

Électro-osmose par induction de charge.
De récents travaux ont mis en évidence le mouvement de particules Janus sous champs électriques alternatifs induit par de l'électro-osmose locale sur la face Au des particules [SQUIRES 2004, Bazant 2004, SQUIRES 2006, Gangwal 2008a]. Ce phénomène, appelé électro-osmose par induction de charge (induced charge electro-osmosis), s'explique par la mise en mouvement locale des ions présents dans la double couche électronique de l'interface Au/liquide sur les particules. Ce phénomène de mouvement d'ions à l'interface est semblable à celui observé sur des électrodes mises à un potentiel électrique. La principale différence réside dans le fait que la partie Au de la particule n'est pas mise à un potentiel réel mais ce potentiel est flottant et induit par le champ électrique dans lequel la particule est immergée. Il apparait alors des vortex de déplacement de fluide sur la surface d'Au qui induisent un mouvement globale de déplacement de la particule orienté perpendiculairement au champ électrique comme le montre la figure 1.13a. Gangwal et al. ont montré le déplacement linéaire de particules Janus polystyrène/ Au en géométrie d'électrodes coplanaires, comme le montre la figure 1.13b et 1.13c, sous champs électriques alternatifs de fréquences comprises entre 20 Hz à 12 kHz et d'intensités inférieures à 500 V/m. Ces fréquences correspondent aux temps de relaxation de la double couche électronique sur la face Au en fonction de la conductivité du milieu de suspension.

Les premières tentatives d'utilisation de particules Janus sous champs électriques alternatifs à plus hautes fréquences et intensités ont été présentées par Gangwal [Gangwal 2008b] lors d'un assemblage de particules Janus toujours en géométrie d'électrodes coplanaire. Comme le montre la figure 1.13d, les particules ont tendance à former des chaines aux basses intensités ($< 100V/cm$) et aux hautes fréquences ($> 10kHz$).

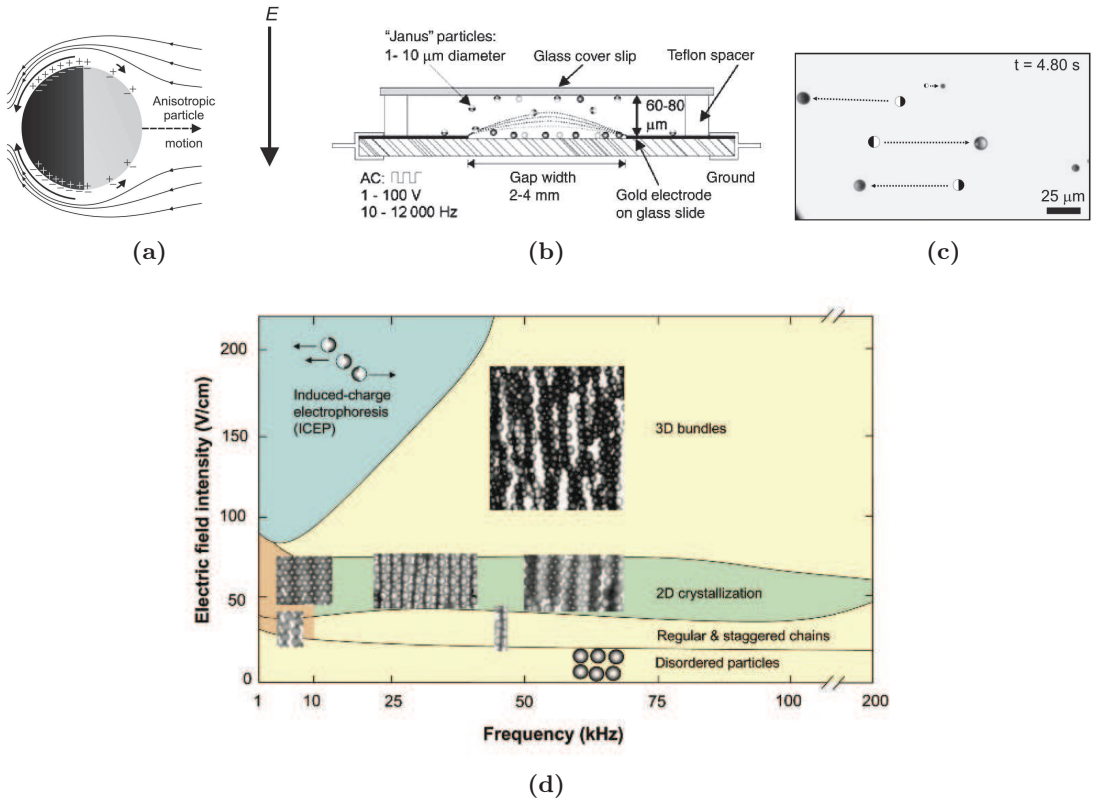


Figure 1.13 – (a) : Schémas des écoulements locaux d'une particule Janus sous champ électrique alternatif, (b) et (c) : Expériences de déplacement de particules Janus sous champs électriques alternatifs de faible fréquences (f=20 Hz) et (d) : Cartographie du comportement de particules Janus sous l'effet de champs électriques alternatifs [Gangwal 2008a].

L'électro-osmose est un phénomène électro-hydrodynamique puissant qui génère des vitesses de déplacement de particules importantes ($v \sim 1\ mm/s$) mais dépend principalement de la conductivité de la solution (maximales à faible conductivité, typiquement $\sigma < 10^{-2}$ S/m) et de la fréquence du signal électrique appliqué (maximales à faibles fréquences, typiquement $f < 5$ kHz).

1.3.2.2 Électrothermique

Lorsqu'un champ électrique E est appliqué sur un liquide de conductivité électrique σ_m, l'effet Joule apparait au sein du liquide selon l'équation [Eq. 1.18] où k est la conductivité thermique du milieu. Si le champ E est non-uniforme, il y aura une variation spatiale de la diffusion de chaleur et donc l'apparition d'un gradient de température dans le liquide, ∇T. Ce gradient génère à son tour des gradients de conductivité et de permittivité, respectivement notés α [Eq. 1.19] et β [Eq. 1.20], induisant des mouvement des charges mobiles (ρ) dans le liquide selon $\rho = \nabla(\varepsilon_m E) = \nabla\varepsilon_m E + \varepsilon_m \nabla E$ et $d\rho/dt + \nabla(\varepsilon_m E) = 0$ respectivement. La moyenne temporelle de la force électrothermique qui agit sur le liquide par sa viscosité et qui conduit au transport d'espèce est donné par l'équation [Eq. 1.21] où le facteur Π (équation [Eq. 1.22]) joue un rôle crucial dans l'intensité et le sens de cette force. Lorsque le terme de gauche de la force est plus important que le droit, Π est positif et le liquide est en mouvement des bords des

électrodes vers le centre. A l'inverse, lorsque Π est négatif, le mouvement de liquide est inversé.

$$k\nabla T^2 + \sigma E^2 = 0 \qquad \text{[Eq. 1.18]}$$

$$\alpha = \frac{1}{\varepsilon_m}\frac{\nabla \varepsilon_m}{\nabla T} = -0.4\% K^{-1} \qquad \text{[Eq. 1.19]}$$

$$\beta = \frac{1}{\sigma_m}\frac{\nabla \sigma_m}{\nabla T} = 2\% K^{-1} \qquad \text{[Eq. 1.20]}$$

$$\begin{aligned} <\overrightarrow{F_{ETE}}> &= -0.5[\frac{\varepsilon_m(\frac{\nabla\sigma_m}{\sigma_m} - \frac{\nabla\varepsilon_m}{\varepsilon_m})\overrightarrow{E}^2}{1+(\omega\varepsilon_m/\sigma_m)^2} + 0.5\nabla|\overrightarrow{E}|^2\nabla\varepsilon_m] \\ &= 0.5\varepsilon_m\nabla T\overrightarrow{E}^2\Pi(\omega) \end{aligned} \qquad \text{[Eq. 1.21]}$$

$$\Pi(\omega) = (\frac{\alpha-\beta}{1+(\omega\varepsilon_m/\sigma_m)^2} - \frac{\alpha}{2}) \qquad \text{[Eq. 1.22]}$$

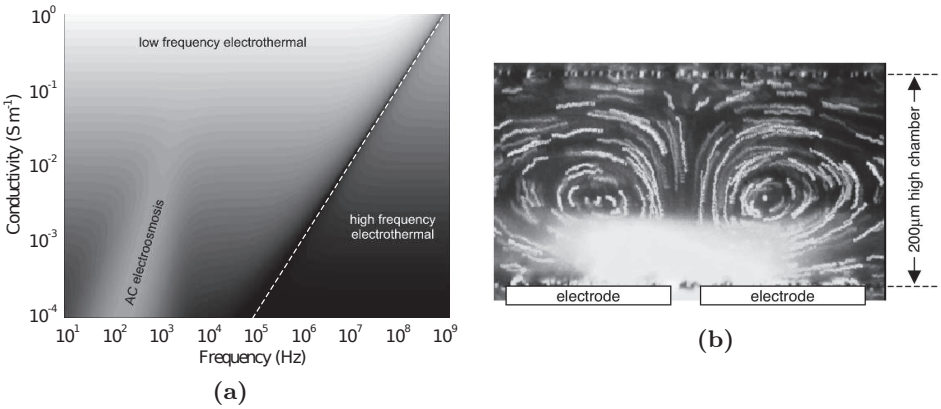


Figure 1.14 – (a) : Cartographie d'effet prédominant entre l'électro-osmose et l'effet électrothermique en fonction de la conductivité du milieu et de la fréquence du champ électrique appliqué, le tension étant fixée à 10 V. (b) : Lignes de courant visualisées par imagerie superposée de particules où l'effet électrothermique est prédominant [Morgan 2003a]

L'effet électrothermique est fortement dépendant de la conductivité du milieu (typiquement induisant des vitesses de liquide maximales lorsque $\sigma_m > 10^{-2}$ S/m) et peut donner naissance à de forts flux ($v \sim 1$ mm/s) pour toutes les fréquences utilisées comme le montre la figure 1.14. Dans une géométrie co-planaire, les flux de liquide seront alors des vortex centrés au dessus des électrodes comme visualisés sur la figure 1.14b.

1.3.3 Bilan des forces électrocinétiques

Le tableau 1.5 résume les propriétés de chacune des force électrocinétiques présentées.

DEP	ACEO	ETE
– Force électrocinétique, positive ou négative – Grande dépendance de la taille et des propriétés des particules (manipulation sélective) – Forts effets proches des électrodes avec décroissance exponentielle de la force avec la distance – Dépendance de la fréquence du champ électrique appliqué et de la différence de polarisabilités entre la particule et le milieu	– Force électro-hydrodynamique – Ne dépendant pas de la taille et des propriétés des particules (manipulation non-sélective) – Flux à longue distance (mouvement circulaire) – Flux directionnel constant des bords aux centres des électrodes – Dépendance fréquentielle des charges surfaciques et de E_t – L'augmentation de la conductivité du milieu conduit à des effets faibles	– La direction du flux dépend de la conductivité du milieu et de la fréquence du champ appliqué – Dépendance fréquentielle des forces volumiques de coulomb – L'augmentation de la conductivité conduit à des effets forts

Table 1.5 – Comparaison des forces diélectrophorétique (DEP), électro-osmotique (ACEO) et électrothermique (ETE)

> Les forces électro-osmotique, électrothermique et diélectrophorétiques sont liées entre elle par nature : elles sont issues de l'établissement d'un champ électrique alternatif non-uniforme au sein d'une solution colloïdale lorsque la norme de ce dernier est importante (typiquement $> 10^4$ V/m). Les intensités et directions de ces forces dépendent des propriétés du champ électrique appliqué et du système colloïdale utilisé. Une de ces forces pourra éventuellement être dominante par rapport aux autres et la réalisation de cartes de force dominante pour l'ensemble des couple (fréquence-tension) est nécessaire pour une géométrie d'électrode donnée [Oh 2009].

1.3.4 Des géométries coplanaires aux géométries tridimensionnelles

De nombreuses applications de la diélectrophorèse ont pu être développée grâce à l'accès aux techniques de microfabrication. Plus particulièrement, ce sont les capacités à créer des électrodes et des espaces inter-électrodes de petites dimensions ($< 100\mu$ m) qui permettent l'établissement de champs électriques de fortes normes ($> 10^4$ V/m) et donc de forts gradients ($> 10^{10}\ V^2/m^{-1}$). Les dispositifs ainsi réalisés peuvent être répertoriés selon les formes des électrodes micro structurées, créant ainsi des gradients de champs électriques dont les distributions spatiales permettent de localiser les particules colloïdales en des positions déterministes. L'ensemble des configurations d'électrodes sont présentées dans le tableau 1.6. Pour des raisons de facilité de fabrication, la majorité des configurations sont co-planaires, c'est à dire que les électrodes qui sont soumises à une différence de potentiels électriques sont dans le même plan. Ce type de configuration implique que la distribution spatiale du champ électrique dans la solution est atténuée avec l'éloignement aux électrodes et que les gradients sont localisés au niveau des

bords des électrodes (atténuation quadratique avec l'éloignement des bords des électrodes). Les particules en suspension seront donc soumises à un régime diélectrophorétique que si elles sont suffisamment proches des bords des électrodes, typiquement de l'ordre de grandeur de la taille de la particule. Les particules plus éloignées en profondeur dans le canal microfluidique ne seront alors pas soumises à la force diélectrophorétique. Pour adresser l'ensemble des particules, il faut créer des gradients de part et d'autre du canal microfluidique, ce qui implique une intégration poussée de paires d'électrodes alignées verticalement le long du canal. Comme il le sera présenté ci-après, cette solution a été explorée par quelques équipes mais les technologies de fabrication utilisées demeurent lourdes et les tailles des électrodes restent importantes (> 50 μm).
Ces dispositifs peuvent être utilisés selon des stratégies d'application temporelle du champ électrique. Ces stratégies déterminent la manière dont agit les forces électrocinétiques sur les particules et donc sur les applications visées. Le tableau 1.7 présente les stratégies d'opération des dispositifs ainsi que les applications visées qui sont également détaillées dans les paragraphes suivants :

- **Fractionnement continu de flux gravitationnel (FFF gravitationnel)**. Les particules sont repoussées par diélectrophorèse négative à différentes hauteurs de lévitation. Sous flux hydrodynamique laminaire, le profil de vitesse parabolique entraine les particules à des vitesses différentes. Les particules sont alors séparées temporellement par leur vitesse d'entrainement. Plusieurs particules peuvent être séparées si leurs différences de densité ou de propriétés diélectriques sont suffisamment éloignées et le micro canal suffisamment long. Les particules en dehors du champ d'application de la diélectrophorèse ne sont pas séparées.

- **Séparation latérale**. Les particules sont défléchies transversalement dans la largeur du micro canal par diélectrophorèse négative. Deux situations se produisent sous l'effet des forces électrocinétiques aux bords des électrodes : à forts flux, les particules sont focalisées le long de la ligne centrale alors qu'à faible flux, les particules sont poussées vers les murs latéraux du canal. Les particules éloignées des électrodes ne sont pas séparées et suivent le profil d'entrainement hydrodynamique.

- **Barrière**. Les particules sont repoussées des électrodes par diélectrophorèse négative mais retenues par les forces d'entrainement hydrodynamiques devant les piliers insérés dans la profondeur du micro canal. Elles sont alors piégées devant les piliers où la vitesse du flux est presque nulle.

- **Assistée par électrothermie**. Un champ est appliqué sur les électrodes co-planaires en configuration quadripolaires. Les particules sont sous diélectrophorèse positive et sont attirées vers le centre du piège lorsque l'intensité du champ électrique induit de même des vortex de convections électrothermiques. Ces mouvements généraux de fluide permettent la concentration des particules éloignées des électrodes mais le piège centrale peut alors perdre des particules piégées.

- **Ondulatoire**. Des potentiels électriques alternatifs déphasés sont appliqués sur les

électrodes co-planaires. Les particules sont lévitées par diélectrophorèse négative et séparées en fonction de leur Facteur de Clausius-Mossotti. Les particules éloignées des électrodes ne sont pas soumises à un régime diélectrophorétique.

- **Multiples fréquences**. Les particules sont exposées à plusieurs champs alternatifs qui n'ont pas les mêmes fréquences. La force diélectrophorétique induite est alors une combinaison des Facteurs de Clausius-Mossotti. Ce type de stratégie permet une séparation efficace entre différents types de particules lorsqu'elle est couplée à un flux hydrodynamique d'entrainement dans des microcanaux en triangle qui suivent les électrodes.

- **Pulsée**. La force diélectrophorétique est impulsée en hachant le signal électrique induisant la diélectrophorèse dans les particules. Cette stratégie permet d'induire une moyenne temporelle de la force diélectrophorétique qui, couplée à un flux hydrodynamique d'entrainement, entraine une séparation efficace des particules selon leurs tailles.

- **Mobile**. Cette stratégie repose sur une application tridimensionnelle de champ électrique en imposant un signal électrique entre une matrice d'électrodes linéaires sous le canal et un substrat entier conducteur au dessus du canal. L'application successive d'un potentiel sur des électrodes voisine va attirer puis repousser les particules selon la fréquence choisie. Le déplacement des particule s'effectue en contrôlant temporellement l'application des potentiels et la position des particules. Cette unique configuration tridimensionnelle permet de positionner une ou des particules selon un axe unique perpendiculaire aux électrodes.

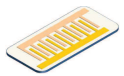
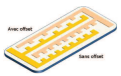
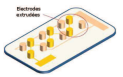
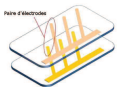
	Parallèle	Imbriquée	Oblique	Incurvée	Quadripôle	Puit	Matrice	Extrudée	3-D Haut/Bas
Fabrication simple	+	+	+	+	+	+	+	-	o
Distribution du champ sur une large proportion du micro-canal	+	+	-	+	-	+	+	+	+
Susceptible à l'effet Joule	-	-	+	-	+	-	-	-	o
Exposition des particules aux surfaces	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Opération en flux continu	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Nécessite des potentiel AC faibles	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fournit de larges zones de piégeage	-	-	-	+	-	-	+	-	+
Programmables	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Interface dynamique avec visualisation	-	-	-	-	-	-	+	-	+
Exposition des particules à forts gradients	+	+	+	+	-	-	+	-	+
Exemple d'application									
Références	[Gascoyne 1997, Auerswald 2003, Crews 2007, Li 2002, Wang 1997, Yang 2006]	[Becker 1995, Choi 2008, Gray 2004, Pethig 1992]	[Hu 2005, Kim 2008, Pommer 2008]	[Khoshmanesh 2009, Khoshmanesh 2010]	[Hughes 1997, Grom 2006, Morgan 1999]	[Mittal 2007, Rosenthal 2005, Thomas 2009]	[Gascoyne 2004, Hunt 2004, Krishnan 2008]	[Iliescu 2006, Tay 2007, Voldman 2003]	[Aldaeus 2005, Dürr 2003]

Table 1.6 – Comparaison des configurations d'électrodes pour les systèmes microfluidiques utilisant la force diélectrophorétique. Les '+' indiquent que le critère est favorable pour l'utilisation de la diélectrophorèse dans la configuration d'électrodes précisée alors que le '-' ne l'est pas.

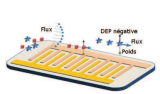
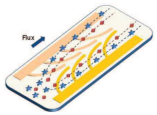
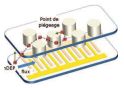
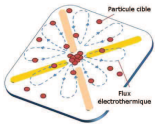
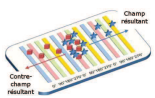
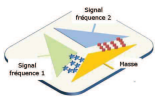
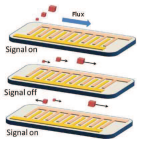
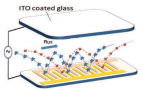
	FFF gravitationnel	Séparation latérale	Barrière	ETE assisté	Ondulatoire	Multiples fréquences	Pulsée	Mobile
Bas coût	+	+	+	+	+	+	+	+
Mise en oeuvre rapide	+	+	+	+	+	+	+	+
Réponse DEP rapide	-	+	+	-	+	+	+	+
Suivie de particule en temps réel	-	+	+	+	+	+	+	+
Opération en flux continu	+	-	-	-	-	-	+	+
Séparation basée sur la taille	-	+	-	-	-	-	+	+
Séparation basée sur les propriétés diélectriques	+	+	-	-	+	-	+	+
Caractérise	-	-	-	-	-	-	-	-
Exposition des particules à forts gradients	-	+	-	-	-	-	-	+
Compatible survie de bio-particules	+	+	+	-	+	+	-	+
Exemple d'application								
Références	[Gascoyne 2009, Wang 1998, Vykoukal 2008]	[Doh 2005, Hu 2005, Wang 2009]	[Cui 2009a]	[Du 2008, Grom 2006]	[Pethig 2003, Choi 2009]	[Urdaneta 2007]	[Cui 2009b]	[Kua 2007, Kua 2008]

Table 1.7 – Comparaison des stratégies spatio-temporelles d'utilisation des champs électriques pour les systèmes microfluidiques. Les '+' indiquent que le critère est favorable pour la stratégie d'utilisation de la diélectrophorèse alors que le '-' ne l'est pas.

L'ensemble des dispositifs et leurs stratégies d'utilisation peuvent être regroupés dans des classes d'application :

- **Séparation**. Le principe de séparation diélectrophorétique est basé sur les écarts de forces induites par diélectrophorèse au sein de deux particules différentes à une même fréquence. En effet ces différences de matériaux, de tailles ou de fonctionnalisations de surface, peuvent conduire à des valeurs de Facteur de Clausius-Mossotti opposées pour une même fréquence de champ électrique, comme le montre les figures 1.15a et 1.15b. Le principale inconvénient de ces méthodes de séparation réside dans l'application co-planaire du champ, c'est à dire que les particules qui se trouvent "loin" des gradients dans la solution ne sont pas affectées par la diélectrophorèse. De fait, il est impossible d'effectuer une séparation totale dans un échantillon ou en flux continu. Un concept de solution proposée est le recours à des électrodes tri-dimensionnelles qui ont montrées une efficacité importante pour la séparation en flux continu [Dürr 2003, Aldaeus 2005]. Cette configuration d'électrodes nécessite toujours une technologie qui permet de fabriquer et d'aligner des électrodes de faibles dimensions dans un canal de hauteur maitrisée et relativement faible (typiquement inférieur à la centaine de micromètre) pour établir des champs électriques suffisamment puissants pour induire la diélectrophorèse sur toute la hauteur du canal.

- **Piégeage**. La capacité à positionner une ou plusieurs particules en une localisation déterministe et de maintenir cette position permet d'accéder à de l'analyse répétitive de particule ou de cellule. Ajoutée à ceci, une alimentation continue sous flux, de tels types de pièges permettraient d'ouvrir la voie vers des laboratoires sur puce d'analyse massive d'échantillons biologiques. Deux stratégies se distinguent : D'une part le piégeage par diélectrophorèse positive, où les particules sont attirées vers des zones de forts gradients et sont maintenues en cette position jusqu'à ce que le champ soit coupé, comme le montre la figure 1.15c. D'autre part, le piégeage par diélectrophorèse négative, où les particules sont repoussées des électrodes qui les entourent et confinées dans des "puits" de gradients, appelés cage de diélectrophorèse, comme le montre la figure 1.15c. L'utilisation de la force diélectrophorèse positive est au moins deux fois plus importante en magnitude que la force négative (voir la section 1.2.4 pour le détail du Facteur de Clausius-Mossotti) et donne accès à des forces de retient qui permettent le maintien en position de particules sous flux hydrodynamiques [Voldman 2001]. Bien que ces pièges soient suffisamment puissants pour maintenir des flux hydrodynamiques (jusqu'à la centaine de picolitre par seconde), la principale contrainte de leur utilisation est l'adhérence des particules aux substrats, principalement due aux forces de van der Waals, une fois attirées et mises en contact avec les bords des électrodes, empêchant ainsi leur relâchement après coupure du champ électrique. L'utilisation de la force négative évite de mettre en contact les particules avec le substrat, empêchant ainsi l'adhérence irréversible ou la contamination éventuelle des particules par la paroi du micro canal. La nature même de ces pièges nécessite que les particules soient piégées dans les trois dimensions sinon les particules peuvent être entrainées par le flux hydrodynamique environnant. L'utilisation de ce type de piège nécessite une intégration tridimensionnelle des électrodes pour créer la cage de diélectrophorèse. Ici encore, la difficulté technologique d'intégration empêche l'accès à des dimensions réduites et les travaux publiés présentent le concept d'un unique piège

[Fiedler 1998], comme le montre la figure 1.15d.

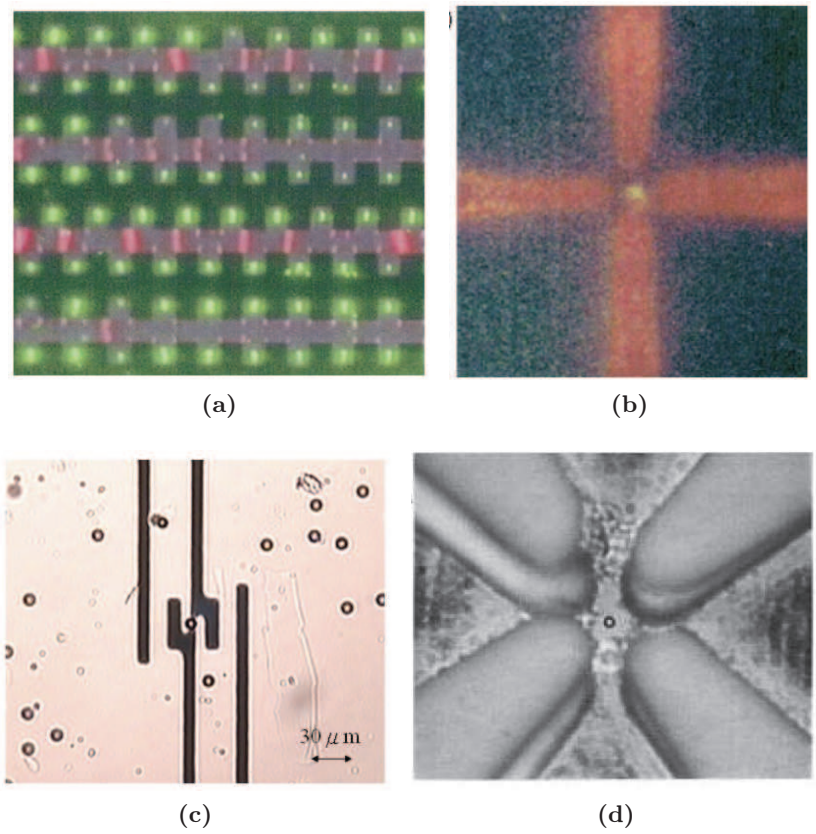
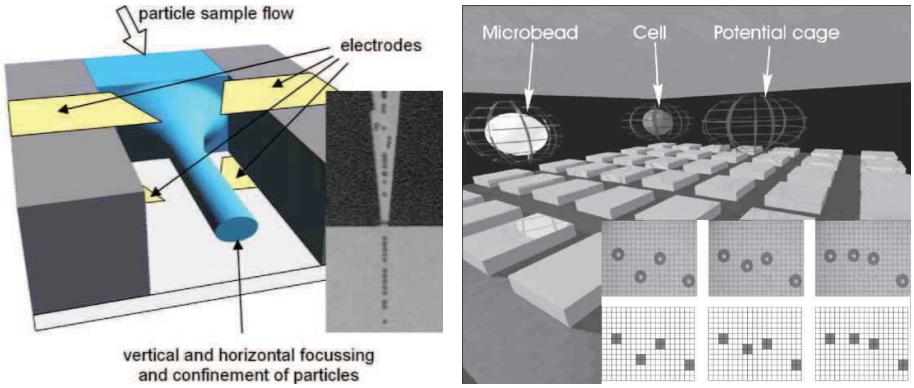


Figure 1.15 – (a) : Séparation de particules de latex de 216 (en rouge) et 557 nm (en vert) de diamètre sur des électrodes inter-digitées. Le potentiel appliqué est de $10V_{p-p}$ à 2 MHz [Gonzalez 2005]. (b) : Séparation de virus type Tobacco mosaic (TMV) en rouge et herpes simplex type 1 (HSV) en vert par des électrodes quadripolaires à 5 V_{p-p} à 6 MHz [Green 1999]. Dans ces conditions de potentiel, le virus TMV est sous diélectrophorèse positive alors que le virus HSV sous diélectrophorèse négative. En régime stationnaire, les virus de TMV se positionnent entre les électrodes alors que les virus HSV sont repoussés des électrodes pour se confiner au centre du quadripole co-planaire. (c) : Positionnement de particules entre deux pointes co-planaires soumises à un potentiel électrique induisant de la diélectrophorèse positive [Lan 2010]. (d) : Piégeage d'une particule en configuration d'électrodes octopolaires de part et d'autre du canal microfluidique. Une cage de diélectrophorèse est crée entre les électrodes et la particule de 3.4 μm de latex est piégée à l'intérieur de la cage [Fiedler 1998].

– **Contrôle de la trajectoire**. La manipulation ultime consiste à piéger une ou des particules et à leur imposer des déplacements déterministes. La contrôle de la trajectoire de particules colloïdales sous flux nécessite une puce microfluidique présentant une intégration tridimensionnelle d'électrodes puisque l'ensemble des particules présentes dans l'échantillon doivent être adressées. Ainsi, Holmes [Holmes 2005] présent une technologie de focalisation tridimensionnelle d'un faisceau de particules, comme le montre la figure 1.16a. De même, la diélectrophorèse mobile [Kua 2007, Kua 2008] semble être une stratégie de déplacement efficace mais demeure unidirectionnelle.
Enfin, Manaresi présente une stratégie de manipulation de particules de 50 μm de polystyrène en déplaçant un piège de diélectrophorèse négative grâce à une matrice d'électrodes

adressables individuellement et établissant un champ vertical avec une contre électrode plane au dessus du canal microfluidique, comme présenté dans la figure 1.16b. Comme le précise les auteurs, la matrice d'électrodes représente un fort niveau d'intégration électronique qui empêche la diminution des dimensions des électrodes et donc des particules à manipuler. Il faut noter que dans les deux dernières stratégies de manipulation, les contre électrodes ne sont pas micro structurées mais des plans entiers conducteurs. Il n'existe donc pas de gradient de champ électrique sur la partie supérieure du micro canal, diminuant ainsi l'efficacité de la manipulation individuelle.



(a) (b)

Figure 1.16 – (a) : Principe de la focalisation dynamique d'un flux de particules colloïdales de polystyrène de 5 μm de diamètre [Holmes 2005]. Les électrodes triangulaires sont situées de part et d'autre du canal microfluidique et imposent une répulsion du flux total entrant dans les cages de diélectrophorèse négative. (b) : Piégeage de multiples particules de 50 μm de polystyrène. Les trajectoires des particules sont contrôlées par déplacement des cages de diélectrophorèse sur la matrice d'électrodes située sur la bas du canal microfluidique [Manaresi 2003].

1.4 Conclusion

Nous avons montré dans ce chapitre d'introduction que les particules colloïdales, sphériques ou structurées, sont soumises spontanément à un ensemble de forces parmi lesquelles le mouvement Brownien est proportionnel à leur taille. Ces forces doivent être surpassées pour effectuer un manipulation sans contact de ces particules dans une puce microfluidique.
Parmi l'ensemble des forces de manipulation sans contact, les forces électrocinétiques permettent de manipuler des particules colloïdales à l'échelle collective ou individuelle. L'accès à des champs électriques de norme importante ($> 10^4$ V/m) grâce aux techniques de microfabrication, permet l'établissement de forts gradients électriques dans des solutions colloïdales confinées en géométrie microfluidique. Ainsi, des champs alternatifs non-uniformes peuvent induire des mouvements de fluide par électro-osmose ou électrothermie ou des mouvements de particules par diélectrophorèse. La mise en oeuvre de ces forces électro-hydrodynamiques et de diélectrophorèse permet d'attirer ou de repousser ces particules des zones de forts gradients du champ électrique. Cette dualité de manipulation, basée sur la taille ou les propriétés diélectriques des particules, confère à la diélectrophorèse une puissance unique de manipulation de particule.
De nombreux travaux présentent des configurations d'électrodes co-planaires dans des puces microfluidiques qui permettent d'utiliser ces forces électrocinétiques pour séparer, piéger ou contrôler les trajectoires des particules. Cependant, la capacité à adresser l'ensemble des particules dans un échantillon, que ce soit pour une manipulation collective ou individuelle, par l'établissement de champs électriques alternatifs non-uniformes et perpendiculaires au canal microfluidique demeure un verrou technologique pour une manipulation ultime de particules colloïdales.

L'objectif de cette thèse est donc de proposer une nouvelle technologie permettant la mise en oeuvre de tels champs électriques alternatifs et non-uniformes dans des puces microfluidiques. L'utilisation de ces puces doit permettre de manipuler des particules colloïdales ou des cellules à l'échelle collective ou individuelle de façon à appliquer des forces locales sur des cellules.

Chapitre 2

Puce et plateforme électro-microfluidique

Sommaire

2.1 Technologie de puce microfluidique tridimensionnelle 35
2.1.1 Introduction aux technologies d'ouverture de canal microfluidique 35
2.1.2 Puce microfluidique verre-PDMS-verre tridimensionnelle alignée et transparente 36
2.1.3 Performances électrique, optique et fluidique de la puce 43
2.2 Plateforme électro-microfluidique 53
2.2.1 Module Fluidique 54
2.2.2 Module électronique 56
2.2.3 Module optique et suivi de particule 59
2.3 Conclusion 64

Ce chapitre propose une nouvelle technologie de fabrication de puce microfluidique à 2 niveaux d'électrodes de part et d'autre du canal microfluidique. Il présente ensuite les caractéristiques électriques, optiques et fluidiques de cette puce. Enfin, la plateforme électro-microfluidique sera détaillée. Cette plateforme permet à la fois de contrôler les débits du fluide et les signaux électriques injectés dans la puce mais également de visualiser et de déterminer les trajectoires des particules.

2.1 Technologie de puce microfluidique tridimensionnelle

2.1.1 Introduction aux technologies d'ouverture de canal microfluidique

La manipulation de l'ensemble des particules présentes dans le canal microfluidique nécessite une intégration bi-planaire des électrodes, situées alors de part et d'autre du canal microfluidique (figure 2.1c). Nous proposons donc une technologie de puce microfluidique intégrant 2 niveaux d'électrodes alignés et directement en contact avec le liquide. Ce contact direct des électrodes et de la solution colloïdale est crucial pour transmettre l'intégralité du champ électrique à la solution sans perte éventuelle. Pour ce faire, une solution colloïdale doit être injectée dans un canal microfluidique dont les bords supérieurs et inférieurs comportent des électrodes. La hauteur du canal microfluidique détermine alors la distance inter électrodes et donc les magnitudes des champs électriques imposées en profondeur dans la solution.
La principale difficulté pour réaliser de tels puces microfluidiques concerne l'ouverture simultanée des parties supérieures et inférieures du canal. Ce dernier est classiquement réalisé en

PolyDiMéthylSiloxane (PDMS) dont les propriétés et les utilisations sont détaillées en Annexe A. Lorsqu'il est moulé pour former un canal microfluidique, la partie supérieure du canal est toujours fermée par le PDMS lui même, comme le montre la figure 2.1a. De fait, l'épaisseur résiduelle de PDMS restant au dessus du canal doit être supprimée pour permettre d'ouvrir le canal dans sa profondeur. Outre la minimisation de l'épaisseur de la couche résiduelle [Takayama 2001, Garra 2001, Plecis 2007, Bartolo 2007] (figure 2.1b), quelques stratégies ont été développées pour obtenir un canal microfluidique complètement ouvert sur des électrodes mais ces solutions technologiques requièrent de nombreuses étapes de fabrication comme la gravure profonde du silicium [Iliescu 2006] ou l'utilisation de polymères jouant le rôle d'espaceurs dont les hauteurs sont difficilement contrôlables [Dürr 2003]. L'objectif ici est d'obtenir un canal microfluidique directement ouvert sur les électrodes supérieures et inférieures du canal microfluidique, comme le montre la figure 2.1c.

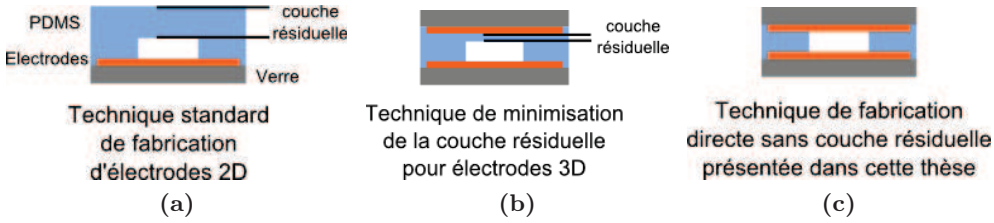


Figure 2.1 – Schéma des différents procédés de fabrications de puces microfluidiques intégrants des électrodes dans un canal microfluidique. (a) : Électrodes co-planaires, (b) et (c) : Électrodes bi-planaires

2.1.2 Puce microfluidique verre-PDMS-verre tridimensionnelle alignée et transparente

L'utilisation d'un PDMS photosensible commercial (WL-5150, Dow Corning) qui allie les avantages du PDMS et de la résine SU-8 (MicroChem) permet de créer en une seule étape un canal microfluidique directement ouvert sur son substrat et sur l'environnement extérieur sans couche résiduelle [Honegger 2009]. La prise en sandwich de ce canal par des plaques de verre comportant des électrodes micro structurées permet ainsi de former une puce microfluidique à 3 niveaux : Niveau électrodes bas (I), niveau canal microfluidique d'épaisseur h (II) et niveau électrodes haut (III). La figure 2.2 présente un schéma des étapes de fabrication d'une telle puce électro-microfluidique permettant d'appliquer des champs électriques en profondeur dans le canal.

2.1.2.1 Fabrication des niveaux d'électrodes (étapes a, b et d)

Les niveaux d'électrodes sont fabriqués par photolithographie standard associée à un dépôt métallique par la technique d'évaporation au canon d'électrons. Les électrodes peuvent être fabriquées en Au ou en ITO (Indium Tin Oxyde).

– L'utilisation de l'or permet d'avoir des électrodes très conductrices mais opaques. Les électrodes sont fabriquées par dépôt métallique (détails en Annexe A) sur des plaques de verre de microscope standard (76 x 26 x 1.1 mm Borosilica).

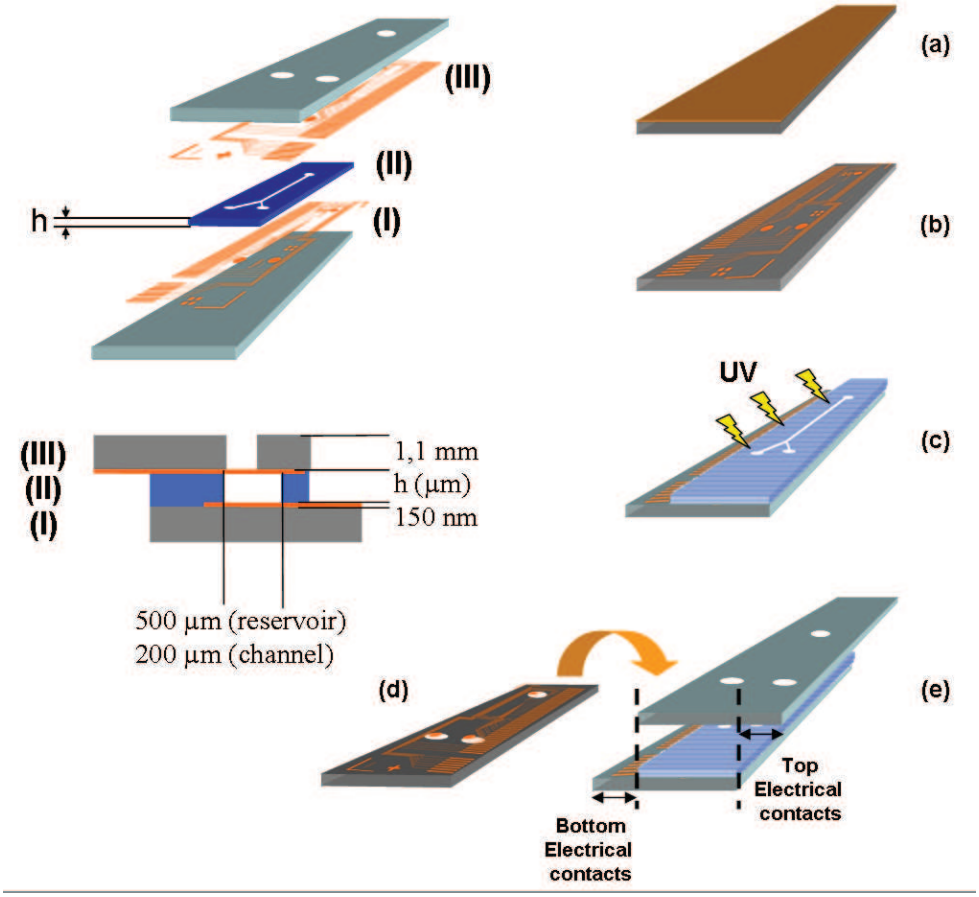
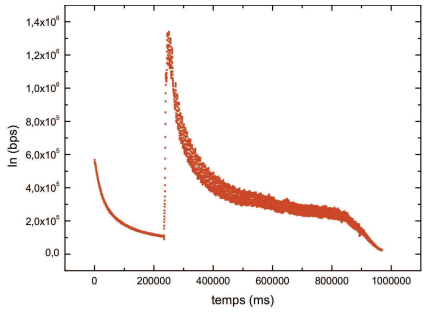


Figure 2.2 – Schéma des différentes étapes de fabrication d'une puce électro-microfluidique : (a) dépôt par centrifugation de résine photosensible, (b) insolation, développement de la résine et gravure des électrodes Au ou ITO par IBE, (c) création du canal microfluidique (II) aligné sur le niveau électrode (I), (d) perçage du niveau électrode haut (III), (e) encapsulation après alignement [Honegger 2009].

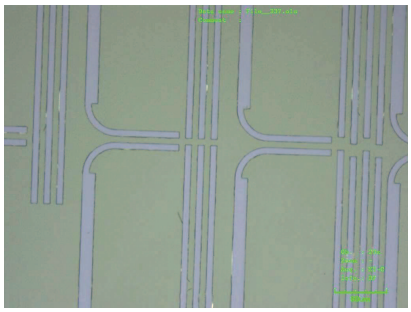
– L'ITO est un oxyde conducteur transparent composé à 90 % d' In_2O_3 et à 10% de SnO_2. Les plaques de verre sont directement achetées avec un dépôt uniforme d'ITO de 150 nm (76 x 26 x 1.1 mm Borosilica, 150 nm ITO, 12 Ω par carré, VisionTek Systems Ltd.) et les électrodes sont gravées par gravure sèche (Ion Beam Etching) dont les paramètres de gravure et les électrodes sont présentés dans la figure 2.3.

Ces dernières sont photolithographiées avec de la résine AZ1512-HS, insolées à travers un masque en chrome puis développées. La couche d'ITO est ensuite gravée par flux d'ions Argon (Ion Beam Etching, Plassys) intégrant un spéctromètre de masse d'ions (SIMS). La capacité de détection des ions indium et étain permet de réaliser une gravure précise et uniforme. La figure 2.3 présente un spectre de masse des ions indium lors de la gravure des plaques d'ITO ainsi que des images des électrodes gravées. La gravure commence à t=220 s et se termine à t=980 s. La résine résiduelle est enlevée par bain dans l'acétone. Les plaques ainsi obtenues sont analysées au microscope confocal et les mesures associées présentées dans le tableau 2.3c.

Les mesures obtenues au microscope confocal sont présentées dans le tableau 2.3c.



(a)



(b)

Largeur électrode visée (μm)	Largeur électrode obtenue (μm)	Pente (°)
10	9.85	75
Vitesse de gravure résine (nm/s)	Vitesse de gravure ITO (nm/s)	
0.82	0.56	

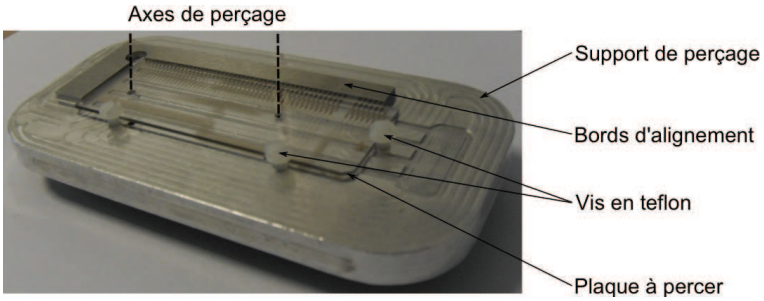
(c)

Figure 2.3 – Gravure des électrodes d'ITO : (a) Spectre de masse des ions In lors de la gravure ITO et (b) Photographie des électrodes d'ITO gravées. (c) : Mesures au microscope confocal des distances critiques des électrodes d'ITO obtenues par photolithographie.

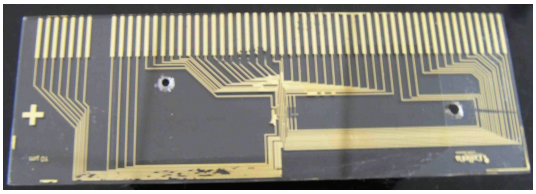
Les plaques de verre du niveau électrode haut (III) sont ensuite percées pour permettre l'injection du liquide dans le canal microfluidique. Le perçage du verre est délicat car ce dernier est très fragile. Nous réalisons le perçage des plaques grâce à une fraiseuse numérique 3D et un foret en diamant de 2 mm de diamètre. La figure 2.4a présente le support de perçage réalisé et la figure 2.4b montre une plaque de verre ainsi percée.

Le perçage peut être réalisée manuellement avec un foret en diamant ou carbure de tungstène sous réserve de perçage avec une colonne perpendiculaire à la plaque de verre, une vitesse de rotation faible (typiquement 5000 tours par minutes), une vitesse de descente très faible (typiquement inférieure à 500 μm par minute) et une lubrification abondante. Cependant, cette technique est peu répétable et sujette à l'expertise du manipulateur. Pour ces raisons, le perçage de plaque est alors réalisé grâce un foret diamanté de 2 mm de diamètre monté dans une fraiseuse numérique tridimensionnelle sous lubrifiant. La fraiseuse permet à la fois de contrôler précisément les positions planaires des réservoirs d'injection mais aussi la force normale exercée sur le verre lors du perçage, assurant ainsi un perçage fiable et répétable. Pour ce faire, un système de maintien de plaque de verre a été spécialement développé pour assurer des positions répétables de perçage et pour maintenir la plaque de verre pendant le perçage. La figure 2.4 présente une photographie de ce système de maintien.

Ce système a été fabriqué par fraisage direct dans une masse d'aluminium. Il se compose de cales qui permettent de bloquer le déplacement horizontal d'une plaque rectangulaire de 26 x 76 x 1.1 mm. Des vis en téflon ont été disposées de manière à contraindre la plaque contre ces cales et les têtes de vis maintiennent la plaque dans un plan horizontal. Des rainures ont été ajoutées sous la plaque de sorte que la fraise puisse déboucher sans toucher le support. Un tel dispositif permet de percer une plaque de 1.1 mm d'épaisseur avec un trou de diamètre minimal 2 mm. La trajectoire de la fraise est hélicoïdale avec une avancée verticale de 100 μm par circonférence parcourue.



(a)



(b)

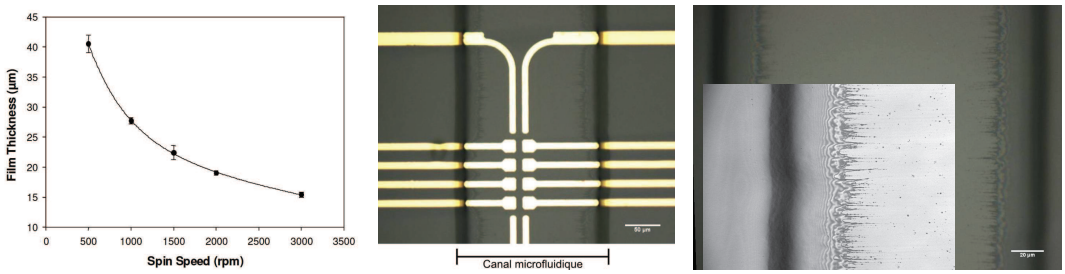
Figure 2.4 – Photographie du support de perçage des plaques de verre. (a) Support avec plaque à percer. (b) : Photographie d'une plaque de verre percée avec des réservoirs de 2 mm de diamètre.

2.1.2.2 Fabrication du canal microfluidique aligné sur le premier niveau d'électrode (étape c)

Le niveau microfluidique est réalisé par photo-lithographie de la résine WL-5150 préalablement déposée sur la plaque de verre du niveau électrodes bas (I). Outre les avantages de photosensitivité de cette résine en PDMS, il est possible de l'étaler uniformément grâce à une centrifugeuse, permettant ainsi de maitriser avec précision (± 1 μm) la hauteur du canal microfluidique et donc les intensités des champs électriques. La figure 2.5a présente la hauteur du canal en fonction de la vitesse de centrifugation. La hauteur du canal microfluidique est fixée à 10 ou 40 μm en fonction de la taille des particules injectées.

Un premier recuit à 110°C après étalement permet de faire évaporer le solvant (toluène) de la résine. De façon à aligner le canal microfluidique avec les réservoirs et les électrodes, les marques d'alignement de type croix-carré sur les 2 niveaux électrode bas et canal doivent être superposées. La résine WL-5150 étant très visqueuse, elle ne peut être mise en contact directement avec le masque en chrome. Nous avons alors opté pour une insolation sans contact dont la hauteur entre la résine et le masque est de 170 μm, comme préconisé par le fournisseur. Pour cela, la résine présente sur les bords de la plaque est dissoute manuellement grâce à de l'isopropanol, libérant ainsi les connecteurs électriques extérieurs et le bord inférieur droit de la plaque. Des lamelles de microscopes de 170 μm sont insérées entre la plaque et le masque sans qu'elles ne rentrent en contact avec la résine. Une fois alignée et insolée, la plaque est de nouveau recuite à 150°C. Le développement est réalisé par un bain de siloxane puis la plaque est abondamment rincée avec de l'isopropanol. Les figures 2.5b présentent une image optique du canal microfluidique ouvert aligné sur les électrodes métalliques.

La figure 2.5c montre l'interface électrode bas / WL-5150. On peut remarquer la présence de doigts d'adhérence systématique sur le substrat. Ces doigts sont probablement issues du développement chimique de la résine et montrent la bonne adhésion de la résine sur la plaque de verre inférieure.



(a) (b) (c)

Figure 2.5 – (a) : Courbe d'étalement de la résine WL-5150 en fonction de la vitesse de centrifugation (d'après documentation fournisseur Dow Corning), (b) : Photographie du canal microfluidique avec électrodes immergées (x100). La hauteur du canal est ici de 10 μm et sa largeur du canal de 200 μm. (c) : Photographie (x63) du canal microfluidique avec détails des doigts d'adhérence.

2.1.2.3 Rugosité du canal, Alignement et Scellement(étape e)

Rugosité du niveau canal microfluidique

Une cartographie de la rugosité du niveau canal (II) face ouverte est présentée figure 2.6. On mesure une rugosité RMS (Root Mean Square) importante (500 nm) qui peut empêcher le scellement hermétique entre le niveau électrode haut (III) et la WL-5150 (II).

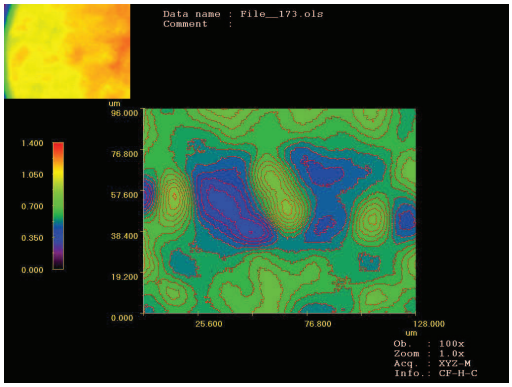


Figure 2.6 – Cartographie de la rugosité de surface de la résine.

Scellement de la puce

Les niveaux (I) et (II) sont directement scellés par adhésion de la couche de WL-5150 préalablement étalée par centrifugation et recuite sur le niveau électrode bas (I).

Le scellement des niveaux (I-II) et (III) est effectué par adhérence d'une couche de 1 μm de PDMS non recuit sur la face supérieure du niveau canal (II). La face supérieure du niveau électrode haut (III) est alors mise en contact avec cette couche de PDMS non recuite, évitant ainsi que les électrodes présentes dans le canal ne soit recouvertes de PDMS. Une fois l'alignement effectué, cette couche est recuite pour assurer le scellement définitif de l'ensemble niveau canal (I-II) et (III).

La couche de PDMS non recuite est étalée de manière sélective sur le niveau canal (II), comblant

ainsi les aspérités dues à sa forte rugosité comme le montre la figure 2.7a. Cette technique est inspirée du travail de Wu [Wu 2005, Liu 2007].

Comme l'illustre la figure 2.7a, une couche de PDMS mélangée avec du toluène est étalée par centrifugation sur un substrat de silicium. Un morceau de PDMS rigide est alors mis en contact avec le PDMS non recuit puis tamponné sur le haut de la résine WL-5150. Le fait que la couche de PDMS non recuit ait une hauteur inférieure à celle du canal empêche du PDMS ne soit déposé sur les électrodes niveau bas. Ainsi, les aspérités de la face supérieure de la résine WL-5150 sont comblées. L'ensemble verre-WL est ensuite aligné grâce au dispositif d'alignement présenté dans le paragraphe suivant et scellé avec la plaque du bas par recuit de la fine couche de PDMS.

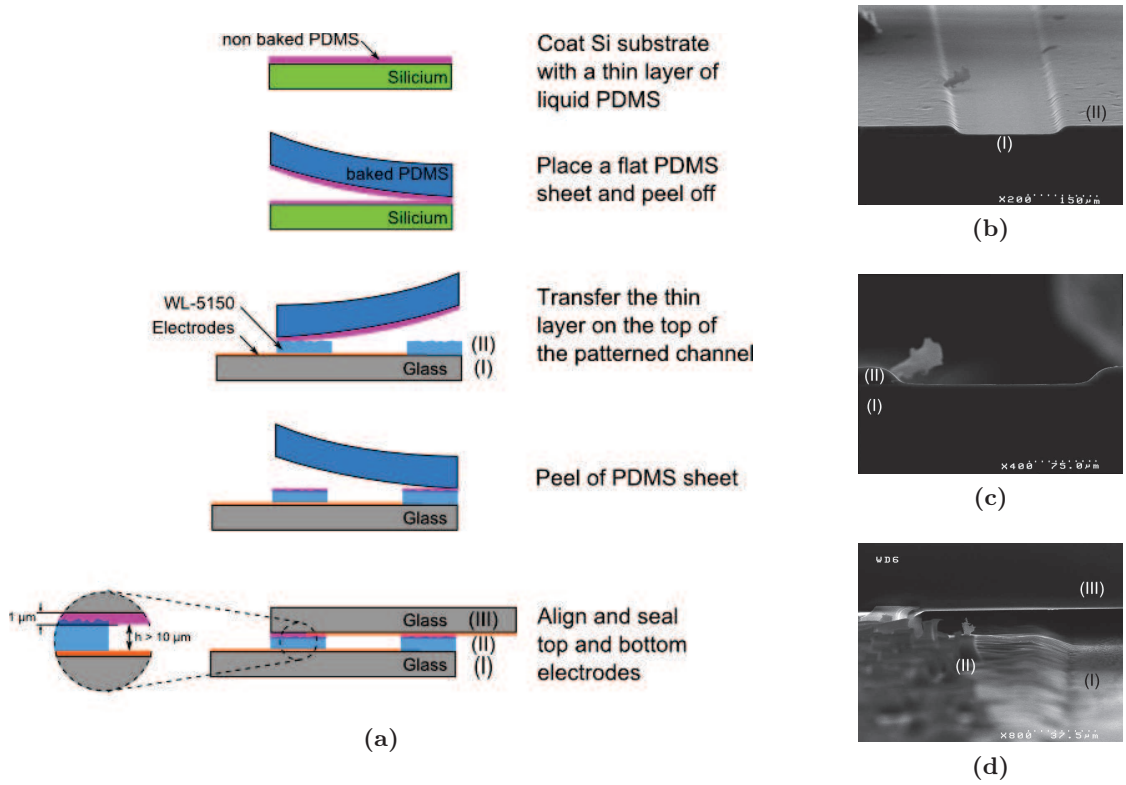


Figure 2.7 – (a) : Schéma de la méthode de scellement d'une puce microfluidique. (b) et (c) : Photographie au microscope électronique à balayage des niveaux électrode bas (I) et canal (II), (d) : de la plaque scellée avec le niveau électrode haut (III).

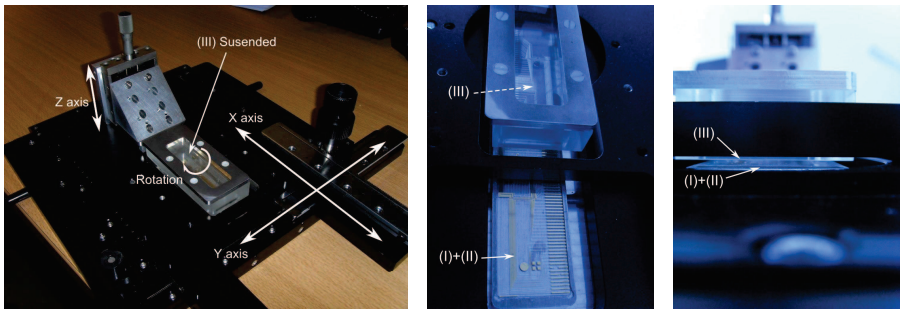
La figure 2.7 présente des photographies en coupe du canal ainsi réalisé. Ces photographies montrent les larges pentes du canal, qui a priori ne portent pas préjudice à l'écoulement. La figure 2.7d montre clairement le scellement des niveaux électrodes haut (III) et WL-5150 (II). Le canal microfluidique ainsi créé est hermétique comme il le sera présenté dans la section 2.1.3.3.

Alignement des niveaux

Les niveaux électrodes bas et canal microfluidique sont directement alignées lors de l'insolation du PDMS photosensible comme le montre la photographie 2.5b.
L'alignement du niveau électrodes haut (III) aux niveaux - électrodes bas et canal - (I-II) doit

se faire avant mise en contact des plaques sous peine de scellement définitif. Cet alignement préalable est réalisé grâce à un dispositif d'alignement spécialement conçu pour maintenir la plaque (III) face métallique vers le bas. Ce dispositif est présenté figure 2.8. Il permet de mouvoir la plaque du haut relativement à la plaque du bas (X, Y, Z et θ). Une fois alignées les plaques sont mises en contact et l'ensemble est chauffé à 100°C pour effectuer le scellement définitif de la puce microfluidique.

La plaque supérieure doit être maintenue face vers le bas grâce en ayant toute sa surface de disponible pour effectuer le scellement. Cette contrainte empêche l'utilisation d'un système mécanique (pinces) pour maintenir la plaque suspendue. Nous avons alors utilisé une goutte d'eau préalablement appliquée sur le porte échantillon qui contre la force de gravité par la force de capillarité (cette technique a fait l'objet d'un brevet [Honegger 2011e]).



(a) (b) (c)

Figure 2.8 – Photographies du dispositif de scellement de puces microfluidiques. (a) Photographie générale, la plaque en or est maintenue par rainurage ajusté sur le support du bas dont la rotation selon l'axe vertical est possible, la plaque du haut est maintenue par capillarité d'une goute sur un support en plexiglas transparent. (b) Photographie d'alignement des plaques. (c) Photographie en coupe juste avant contact entre les 2 plaques.

2.1.2.4 Injecteurs microfluidiques

Les solutions colloïdales sont injectées dans les canaux microfluidiques par des capillaires en téflon. La connexion macroscopique vers microscopique est assurée par des connecteurs Nanoport N-333 (Upchurch). Ceux ci sont constitués de deux parties : une partie s'encastre dans un capillaire microfluidique et se termine par une férule. L'autre partie se colle sur le réservoir du canal microfluidique avec un joint thermo-réticulable. Les deux parties se vissent l'une dans l'autre et assurent à la fois l'étanchéité nécessaire à l'injection de liquide mais aussi une forte résistance mécanique. Toutes les parties sont en téflon et assurent une bonne compatibilité chimique avec les applications microfluidiques.

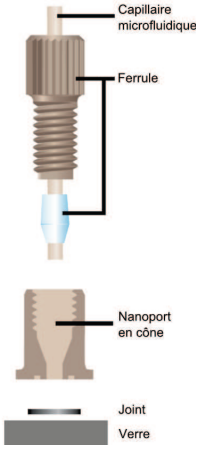
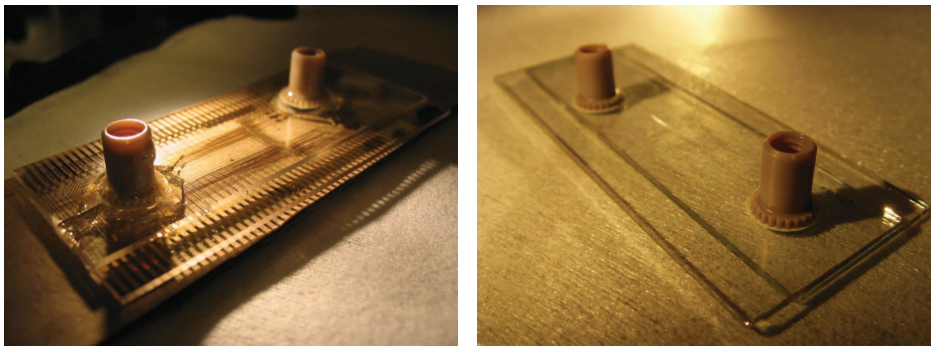


Figure 2.9 – Schéma de la mise en oeuvre du connecteur macro vers microfluidique N-333



(a) (b)

Figure 2.10 – Photographies des puces microfluidiques à 3 niveaux : (a) Puce avec électrodes en Ti/Au, (b) Puce avec électrodes transparente en ITO.

La figure 2.10 présente des photographies de puces microfluidiques à 3 niveaux alignés en Ti/Au ou ITO qui intègrent 56 électrodes sur chaque niveau métallique (112 au total). Cette nouvelle technologie de puce microfluidique ouvre l'accès à des confinements tridimensionnels du champ électrique. L'utilisation du PDMS photosensible permet de créer un canal microfluidique ouvert de part et d'autre de sa profondeur sans gravure d'une couche résiduelle.

2.1.3 Performances électrique, optique et fluidique de la puce

De façon à valider leurs conditions d'utilisation, les performances électriques, optiques et fluidiques des puces multi-niveaux sont évaluées [Honegger 2010b]. Il existe en effet des pertes électriques (fréquences et tensions) entre les potentiels appliqués aux connexions macroscopiques et ceux réellement vus par le liquide et les particules. De même, il peut exister des fuites de liquide entre les connexions fluidiques macro et microscopiques.

2.1.3.1 Performances électriques des puces

Le schéma électrique équivalent à l'ensemble de la puce, présenté figure 2.11, traduit les différentes pertes électriques dans ses éléments constitutifs :

- Les fils de connexions entre les électrodes macro vers microscopiques représentées par la résistance R_1 et capacité C_1,
- L'interface électrode / liquide est modélisée par un élément à déphasage constant CPE1 représentant la capacité constante de la double couche électronique [Dürr 2003, Senez 2008] ayant une impédance complexe $Z = 1/Q_1(i\omega)^n$,
- Le liquide séparant les électrodes est représenté par une résistance R_2.

Il est nécessaire de connaitre les valeurs expérimentales de chaque élément de façon à établir les potentiels réels effectivement transmis à la solution colloïdale.

Une analyse électrique par spectromètre d'impédance est réalisée sur les puces. L'analyse des spectres obtenus permet d'obtenir les valeurs des éléments constitutifs du modèle électrique, présentées dans le tableau 2.1.

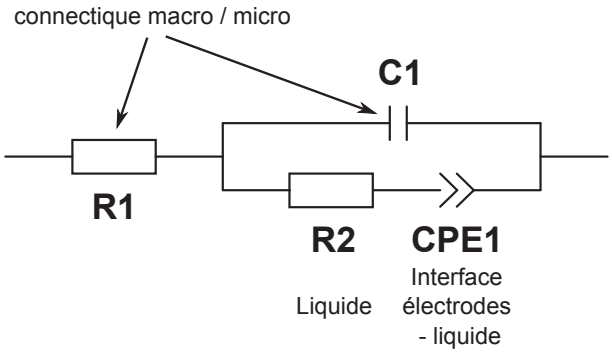


Figure 2.11 – Schéma électrique équivalent de la puce microfluidique multi-niveaux. La résistance R_1 et la capacité C_1 représentent les fuites des connexions macroscopiques vers les électrodes. L'élément à déphasage constant CPE1 correspond à l'interface électrode / liquide et la résistance R_2 au liquide entre les électrodes.

Les puces dont les électrodes sont en Ti/Au et en ITO sont testées électriquement avec un spectromètre d'impédance Novocontrol Alpha-AK. Les spectres d'impédance ont été réalisés consécutivement en injectant une tension AC de 1 V_{p-p} avec adaptation du courant entre 3 paires d'électrodes de 10 μm de large séparés d'une hauteur du canal de 10 μm. Les puces en électrodes Ti/Au et ITO ont été ainsi testés sans et avec liquide (eau dé-ionisée de conductivité $\sigma = 2.10^{-4} S/m$) à température constante (21°C). Les valeurs des composants constitutifs sont déduites des expériences en modélisant le circuit équivalent dans le logiciel EIS Spectrum Analyzer. Ce dernier permet d'ajuster les valeurs des éléments en analysant le spectre expérimental par la méthode des moindre carrés. Les valeurs des éléments constitutifs sont obtenus par modélisation du circuit équivalent.

La figure 2.12 présente les parties réelles des impédances globales pour les puces Ti/Au et ITO.

Lorsque les microcannaux ne sont pas remplis :
L'impedance complexe équivalente au circuit vaut :

$$Z_{equ} = \frac{1+iR_1C_1\omega}{iC_1\omega}$$

La capacité C_1 et la résistance R_1 due aux fils de connexion contribuent à eux seuls à l'impédance globale. Les deux types de puces présentent un même comportement capacitif. Le graphique 2.12 indique une pente de s = -1 pour toutes les fréquences au-dessus de 1 kHz, ce qui signifie un comportement capacitif pur induit par des électrodes planes séparées par de l'air. Pour des fréquences inférieures (1-10Hz), les mesures d'impédances sont bruitées probablement dû à l'incapacité du spectromètre d'impédance à mesurer de très faibles intensités. La valeur de la résistance R_1 est mesurée directement par des micro-pointes et celle de la capacitée C_1 est extrapolée par les mesures présentées dans la figure 2.12.

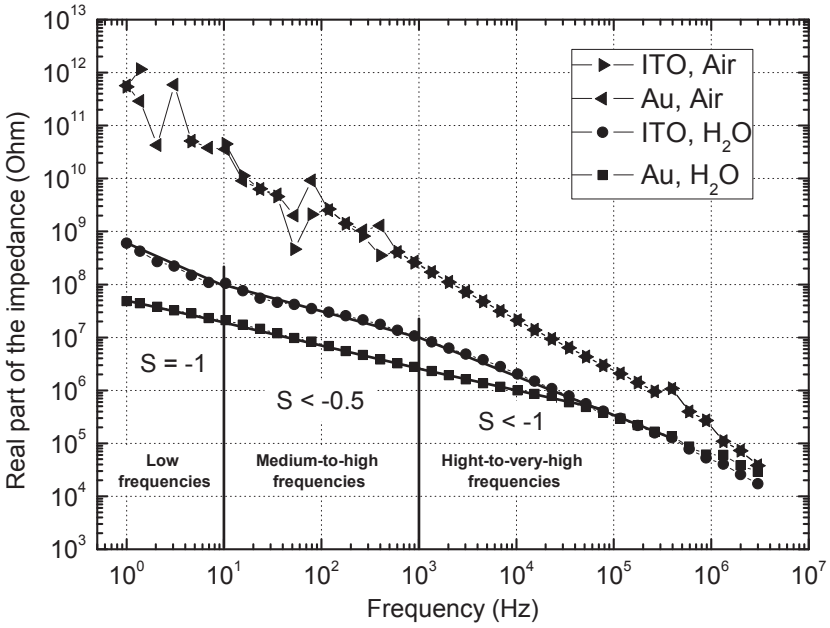


Figure 2.12 – Partie réelle des impédances mesurées pour les puces multi-niveaux Ti/Au et ITO, remplie ou non d'eau dé-ionisée. *s* représente la pente de la courbe bornée sur diverses bandes fréquentielles. [Honegger 2010a]

Lorsque les microcanaux sont remplis :

$$Z_{equ} = R_1 + \frac{1+iR_2Q_1(i\omega)^n}{iC_1\omega+Q_1(i\omega)^n+R_2C_1Q_1(i\omega)^{n+1}}$$

les spectres d'impédance se distinguent en trois régions.

- **Aux basses fréquences (1-10Hz)**, le graphique montre une pente presque égale à s = -1 avec les électrodes d'ITO, démontrant un comportement capacitif prédominant. Dans cette gamme de fréquence, l'impédance globale du système est dominée par la capacité CPE1 de l'interface électrode/électrolyte. Pour les électrodes de Ti/Au, le comportement n'est pas totalement capacitif (s < -1) signifiant que la capacité parasite C_1 des électrodes de Ti/Au a un effet négligeable comparé à la résistance des fils de connexion. Le décalage de la valeur de l'impédance pour les 2 types d'électrodes dans cette gamme de fréquences ($f < 10Hz$) est probablement dû à leurs différences de conductivités.
- **Aux fréquences moyennes (10Hz-1kHz)**, l'impédance des puces présente une modification de pente. Cette tendance dénote une concurrence entre l'impédance CPE1 de l'interface électrode/électrolyte et de la résistance R_2 du liquide entre les électrodes. Par conséquence, la tension réelle appliquée entre les électrodes sera diminuée par rapport à celle appliquée entre les connecteurs macroscopiques. Cette chute de tension est principalement réalisée par la capacité de l'interface électrode/électrolyte. Dans cette gamme de fréquence, les ions mobiles dans cette interface répondent au champ électrique induit et font écran au reste du liquide dans le canal.
- **Aux plus hautes fréquences (f > 1kHz)**, la contribution de la capacité CPE1 devient négligeable comparée à celle de la résistance R_2, et l'amplitude totale de la tension appliquée est transmise à l'ensemble du liquide. Dans cette gamme de fréquence on

observe alors un comportement capacitif et résistif où l'intégralité du signal appliqué est dissipé dans R_2, soit au travers du canal, et dans les fils de connexion R_1 et C_1. Toutefois, la pente qui reste différente ($s < -1$) de celle observée à basse fréquence indique que la résistance R_2 joue un rôle dominant par rapport aux fils de connexion. On remarque aussi que dans le cas des électrodes de Ti/Au, le changement de pente est plus doux (s = 0.6) que celle en ITO (s = 0.8) mettant en évidence les différences de conductivité entre ces matériaux : L'Au conduisant mieux, il apparait donc moins de pertes dans les connexions en Au que celles en ITO.

Puce	$R_1(\Omega)$	C_1 (pF)	$R_2(\Omega)$	CPE1 (F)
Au/Ti	163±5	1372±0.5	3.23 10^8±0.2	1.25 10^{-10}±0.3, n=0.98
ITO	259±5	1.02±0.5	2.6 10^9±0.2	5.22 10^{-12}±0.3, n=1

Table 2.1 – Valeurs des composants constitutifs du modèle électriques équivalent des puces microfluidiques.

Les performances électriques des puces permettent de définir leurs gammes d'utilisation en terme de fréquences et tensions appliquées. Ainsi pour les puces en ITO, l'intégralité du signal appliqué par le générateur est transmis aux électrodes et au fluide pour des fréquences supérieures à 1 kHz. En revanche les puces en Ti/Au peuvent être utilisées à partir de 10 Hz. Les valeurs des capacités et résistances obtenues permettent de quantifier les pertes électriques dans la puce de façon à déterminer le potentiel réel appliqué dans le canal microfluidique. Aux vues des valeurs présentées dans le tableau 2.1, $R_1 \ll R_2$ et donc les pertes nettes du potentiel électrique sont négligeables pour des fréquences supérieures à 1 kHz. Dans ce cas ($f > 1kHz$), le potentiel V appliqué aux bornes macroscopiques de la puce et le potentiel V_{reel} appliqué dans la solution sont équivalents car $V = (1 + \frac{R_1}{R_2})V_{reel} \simeq V_{reel}$ puisque $R_1 \ll R_2$.

2.1.3.2 Performances optiques des puces

Les performances optiques des puces permettent de déterminer la capacité à suivre les trajectoires des particules colloïdales à travers l'épaisseur de la plaque de verre supérieure et à travers les électrodes. Par nature, les électrodes en Ti/Au sont opaques et réduisent la visibilité des colloïdes à proximité des électrodes car la diffusion de la lumière par les électrodes est trop importante. En revanche, les électrodes d'ITO sont transparentes. La figure 2.13.a montre l'observation de particules colloïdales avec les deux types de puces.

Bien que l'étude sur les performances électriques ait montré que les puces en ITO transmettent partiellement les signaux électriques pour des fréquences inférieures à 1 kHz, l'expérience montre une dégradation immédiate et importante des électrodes pour ces fréquences et à des tensions $V > 5\ V_{p-p}$. De plus la durée d'application de telles tensions augmente cette dégradation comme le montre la figure 2.13.b. De même, à de faibles fréquences ($f < 5Hz$), il apparait un phénomène d'opacification alternative des électrodes. Ainsi, au cours d'une période du potentiel alternatif, les électrodes oscillent entre transparentes et opaques comme le montre la figure 2.13.c.

Le phénomène de dégradation a été analysé par spectroscopie optique localisée sur des électrodes en ITO dégradées.

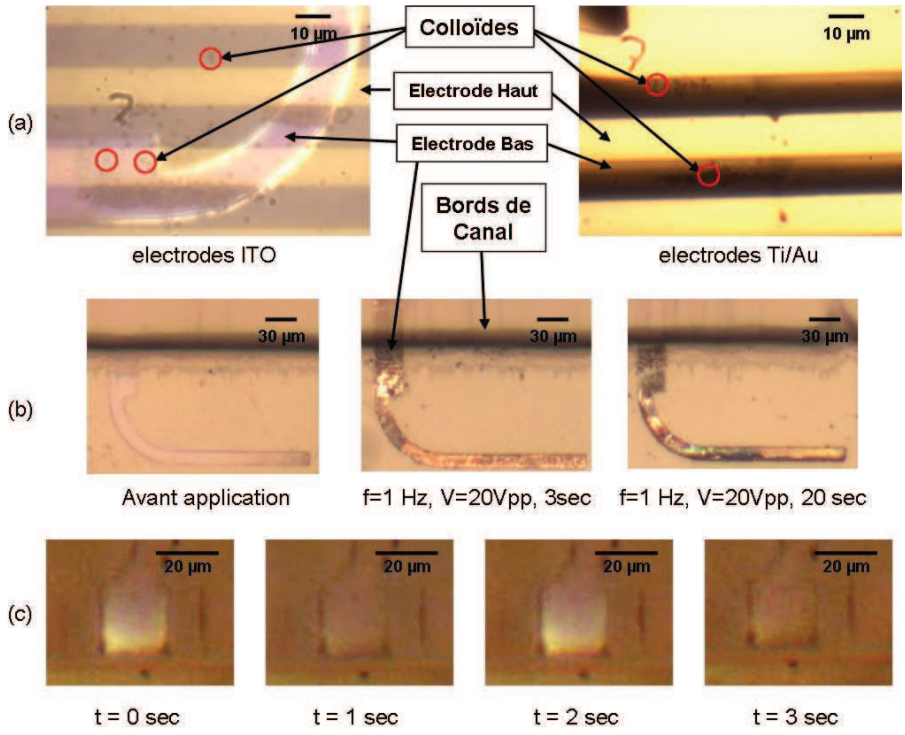


Figure 2.13 – Performances optiques des puces microfluidiques. (a) Images au microscope optique x50 en champ sombre des colloïdes de 1 μm à travers les puces en ITO et Ti/Au. (b) Images au microscope optique x20 de la dégradation des électrodes ITO [Honegger 2010a]. (c) Images successives d'une électrode d'ITO dans les conditions de modification de sa transparence.

Les électrodes sont observées par un microscope optique en champ sombre focalisé sur leur surface. La lumière diffusée est alors récoltée par l'objectif x100 et injectée dans un spectromètre USB. La zone de collection des photons diffusés par les électrodes est un cercle de 4 μm de diamètre. Les spectres ainsi obtenus sont tous normalisés par rapport à celui d'un miroir parfait. Le degré de dégradation est alors estimé par la quantité de lumière diffusée par l'électrode en intégrant le spectre obtenu dans la gamme visible (400-700 nm).

Dégradation des électrodes lors de l'application d'un potentiel électrique.
La figure 2.14 présente les valeurs moyennes de lumière diffusée (récoltée par le spectromètre) ainsi obtenues pour 2 durées d'application de potentiels de dégradation. Dans les 2 cas, il n'apparait plus de lumière diffusée pour des fréquences $f > 10Hz$, ce qui signifie que la dégradation des électrodes est bornée à ces basses fréquences. De plus les électrodes apparaissent comme très fortement dégradées à quasiment inexistantes. Leur degré de dégradation, c'est à dire leur état de surface et l'épaisseur d'ITO restante, est relié à l'intensité de leur lumière diffusée. Pour une durée d'application de 3 secondes, la lumière diffusée augmente presque linéairement avec la tension alors qu'il existe un pic de diffusion à 10 V pour une durée d'application de 20 secondes. L'observation des électrodes pour des tensions plus importantes révèle des traces d'ITO et non plus une couche uniforme. La dégradation des électrodes répond donc à une cinétique de destruction jusqu'à élimination complète des électrodes.

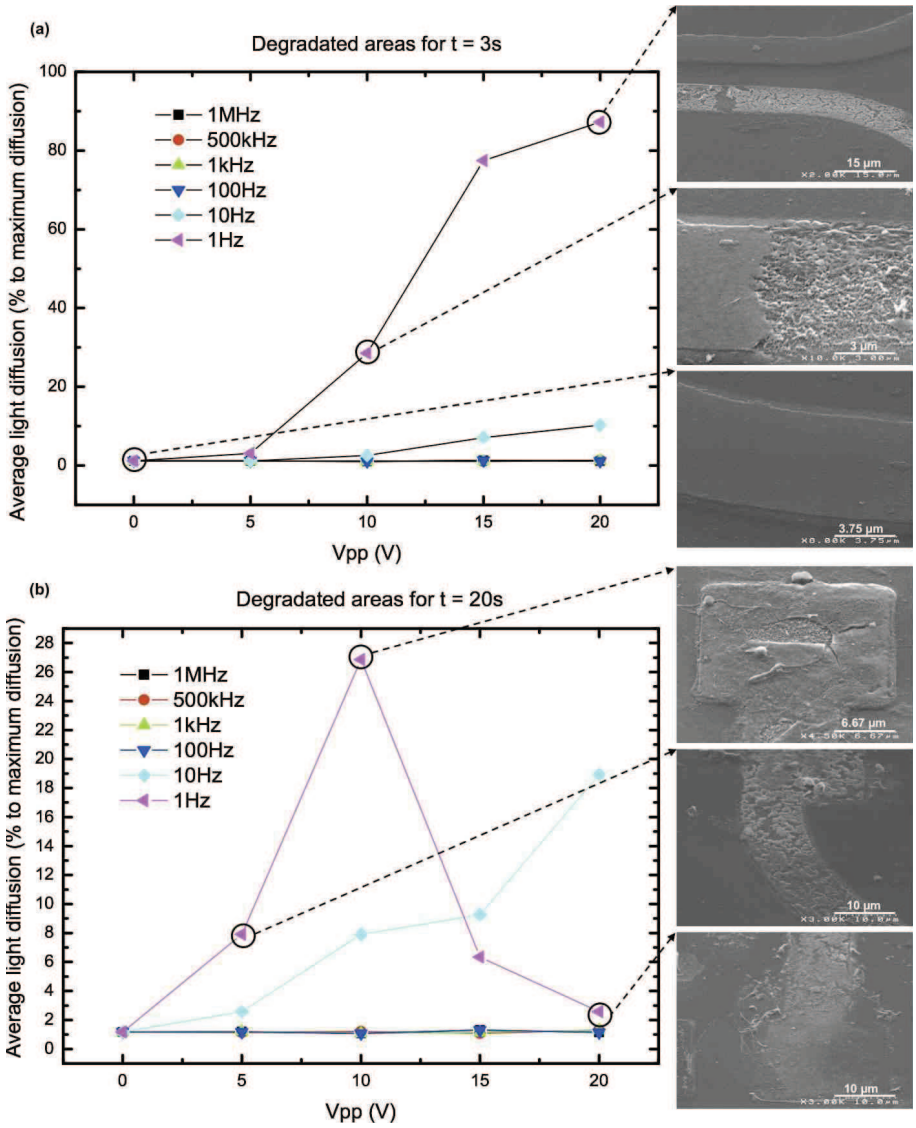


Figure 2.14 – Valeurs moyennes des spectres de diffusion des électrodes ITO dégradées pour une application de (a) 3 secondes et (b) 20 secondes.[Honegger 2010a]

Modification de la transparence à faibles fréquences.
Lorsque le potentiel alternatif appliqué est à faibles fréquences ($f \sim 1$ Hz) et à faibles intensités ($V_{p-p} < 10$V), il apparait une modification de la transparence des électrodes. Ce phénomène semble être répétitif à chaque période de la fréquence du potentiel électrique. On observe aussi une dégradation temporelle des électrodes. La figure 2.15 présente les valeurs moyennes des spectres de la lumière diffusée localement par les électrodes. Dans de telles conditions, il apparait une oscillation atténuée temporellement de l'intensité de diffusion de la lumière émise par les électrodes : la quantité de lumière diffusée par l'électrode après une opacification est diminuée mais ne revient pas à son état initial : la dégradation se produit de manière progressive. Comme le montre la photographie insérée, après plusieurs oscillations, seulement une partie de l'électrode semble être attaquée et l'électrode reste fonctionnelle. On note la

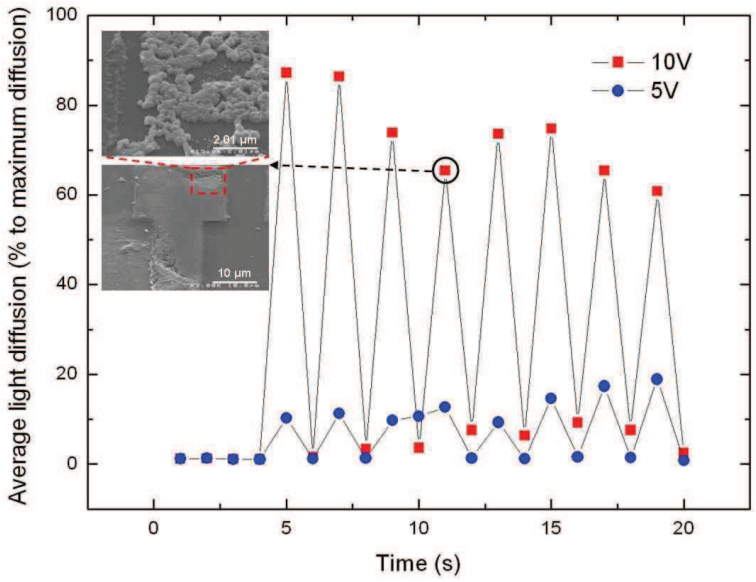


Figure 2.15 – Valeurs moyennes des spectres de diffusion des électrodes lors de la modification de leurs transparences lorsque celles-ci sont soumises à des champs électriques de fréquence 1 Hz.[Honegger 2010a]

présence d'une forte granularité de l'ITO après dégradation.

Analyse de la dégradation par EDX.

Une analyse dispersive en énergie (EDX) est alors réalisée dans un microscope électronique à balayage sur différentes électrodes à des degrés de dégradation croissants. Cette analyse permet de quantifier les éléments présents dans les électrodes au fur et à mesure de la dégradation. La figure 2.16 montre ces analyses avec les photographies au microscope électronique à balayage associées.

Le microscope est focalisé sur 5 différentes régions : La plaque de verre proche des électrodes (Glass sur la figure), une électrode non dégradée (ITO) et des électrodes à degrés croissants de dégradation (Area 3 à 1 sur la figure). La présence de sodium, magnésium, d'oxygène et de silice est observée dans toutes les régions et correspond au verre de la plaque étant donnée que l'analyse EDX se fait sur un volume d'environ 1 μm^3 avec une épaisseur d'ITO de 150 nm. L'aluminium provient de la métallisation de l'ensemble de l'échantillon nécessaire à l'observation au microscope électronique. La présence d'indium et d'étain sur le verre s'explique par la proximité des électrodes de la région observée. Bien que les variations de magnésium et de silice ne soient pas significatives dans les différentes régions, il semble que du sodium soit libéré lors de la dégradation. De plus, la quantité d'oxygène diminue avec la dégradation. Cette perte en oxygène dans les électrodes influe fortement sur leur conductivité étant donnée que c'est l'oxygène qui favorise le déplacement des électrons dans l'oxyde conducteur. Les comportements de l'indium et de l'étain confirment la dégradation chimique des électrodes.

La réaction de détérioration des électrodes peut être alors expliquée par une réaction chimique d'oxydoréduction [Eq. 2.1] induite à basses fréquences par le courant transféré dans le liquide [Wang 2005] (avec $pH > 7$).

$$In_2O_3 + 3H_2O + 6e^- \longrightarrow 2In + 6OH^- \qquad \text{[Eq. 2.1]}$$

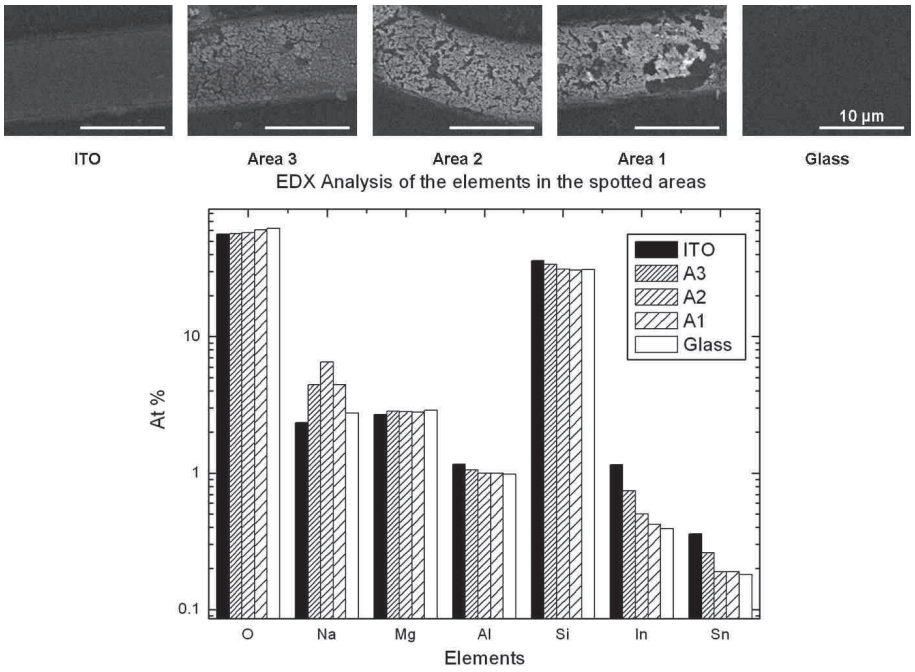


Figure 2.16 – Quantification des éléments constituant les électrodes lors de la dégradation de l'ITO avec photographies MEB associées. Les différentes régions présentées montrent le verre, une électrode non dégradée, région 1 (1 Hz, 15 V, 20 secondes), région 2 (1 Hz, 20 V, 3 secondes) et région 3 (1 Hz, 10 V, 20 secondes).

Le processus de dégradation peut alors être divisé en deux phases : en premier lieu, la libération de l'indium par la réaction d'oxydoréduction puis celle de l'étain car l'oxyde ne peut maintenir son intégrité sans indium. La présence d'étain sur le verre proche des électrodes en quantité plus importante que l'indium corrobore la libération d'étain dans le liquide et la formation de nanoparticule d'indium sur les électrodes. Ces nanoparticules forment alors la granularité apparente sur les électrodes dégradées induisant leur opacité croissante. La cinétique de cette réaction avec la quantité d'électrons injectés corrobore aussi une vitesse de dégradation augmentée avec la tension. Lorsque tout l'étain est consommé, l'électrode est alors complètement dégradée et n'est plus visible. Étant donné que cette réaction d'oxydoréduction est basée sur la capacité du liquide à transférer des électrons, les milieux salins doivent aussi favoriser le phénomène de dégradation des électrodes lors de l'utilisation de fortes tensions.

> Les analyses par spectroscopie d'impédance et par EDX montrent les limites d'utilisation des puces microfluidiques : Les puces transmettent partiellement les signaux électriques dont les fréquences sont en dessous de 1 kHz et les puces en ITO peuvent être endommagées à très basses fréquences ($f \leq 10Hz$), fortes tensions ($V_{p-p} > 3V$) ou dans des milieux où la conductivité est élevée. Par contre, aucune dégradation n'est constatée dans la gamme de fréquences $f = [10^3 - 10^7$ Hz] et la gamme de tensions $V = [0 - 20\ V_{p-p}]$. Les puces microfluidiques de type Ti/Au et ITO sont donc utilisables dans ces gammes.

2.1.3.3 Performances fluidiques des puces microfluidiques

Les performances fluidiques de la puce sont évaluées par sa capacité à créer un écoulement de Poiseuille confiné dans le canal microfluidique. Les différences de pression en entrée et en sortie de canal induisent un écoulement laminaire caractérisé par un nombre de Reynolds ($Re \ll 1$). L'équation [Eq. 2.2] présente un rapide calcul dans le cas des puces microfluidiques transparente en ITO où v est la vitesse du fluide, L la hauteur du canal, ρ la masse volumique du liquide et μ sa viscosité dynamique. [1]

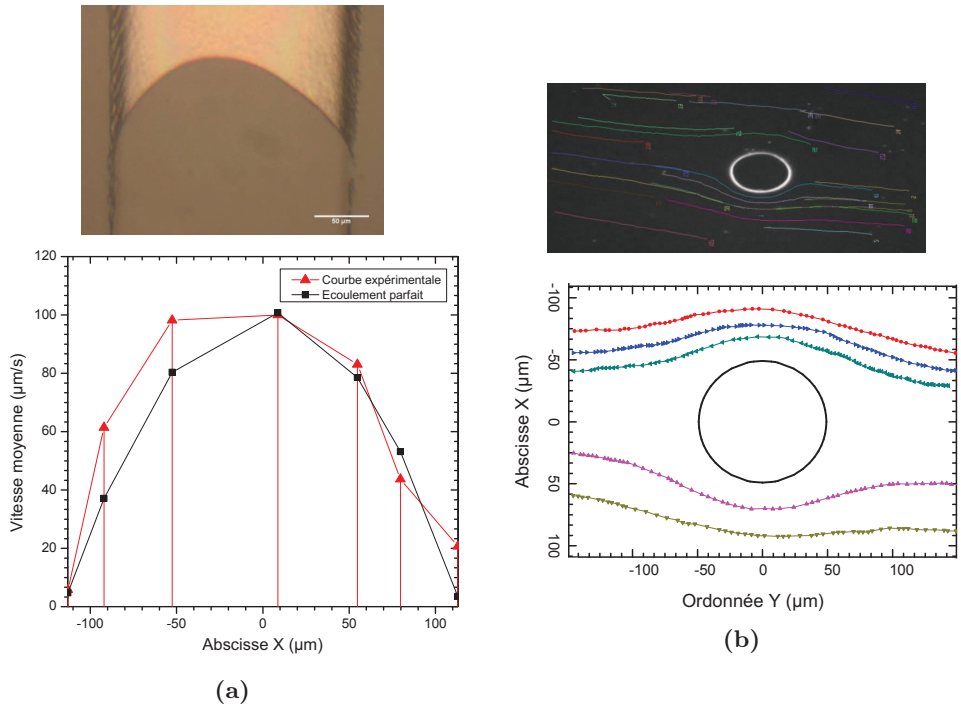
$$Re = \frac{\rho v L}{\mu} \ll 1 \qquad \text{[Eq. 2.2]}$$

De tels écoulements se caractérisent par un profil parabolique en mouvement lors de la pénétration du liquide dans le canal et une fois le régime permanent installé. Le profil expérimental de l'interface air/liquide en mouvement lors de l'injection dans le canal est présenté figure 2.17a. Ce profil est parabolique, caractéristique typique d'un écoulement laminaire de Poiseuille. A l'aide du module de détection et de suivi de particules détaillé plus loin, les trajectoires et vitesses de particules soumises à un tel écoulement dans la puce sont évaluées. La loi de vitesse de l'écoulement s'écrit dans une configuration rectangulaire de canal comme le montre l'équation [Eq. 2.3] où v_{max} représente la vitesse maximale des particules, x la distance au centre du canal et L la largeur du canal.

$$v(x) = v_{max}(1 - \frac{x^2}{L^2}) \qquad \text{[Eq. 2.3]}$$

Le suivi a été réalisé sur 8 particules réparties sur tout le long du canal. Le graphique 2.17b montre le profil de vitesse ainsi obtenu dans le canal. Le profil des vitesse des particule distribuées sur la largeur du canal suit une loi parabolique, dont le maximum se situe au milieu du canal avec $v_{max} = 101,33\ \mu m/s$. La non-nullité de la vitesse sur les bords du canal montre l'existence d'une vitesse de glissement. Le glissement aux parois provient certainement des pentes du canal qui sont très accentuées (voir paragraphe 2.1.2.2).
L'analyse de la trajectoire des particules lors du contournement d'un obstacle (bulle d'air emprisonnée) permet de visualiser les lignes de courant au voisinage du contournement. Dans un écoulement laminaire, les particules ne subissent pas de turbulences classiquement observées dans le cas d'un écoulement non laminaire à la traine de l'obstacle. La figure 2.17b présente les trajectoires de particules de 1 μm de polystyrène superposées à la photographie optique correspondante. Il apparait des trajectoires qui ne subissent pas de turbulences en trainée d'obstacle confirmant un écoulement laminaire confiné dans le canal microfluidique.

1. Pour les puces microfluidiques étudiées ici :
$\rho = 10^3\ kg.m^{-1}$ et $\mu = 10^{-3}$ Pa.s pour l'eau déionisée, $v = 10^{-4}$ m/s est la vitesse maximale des particules dans la puce, $L = 10\ \mu$m, hauteur typique du canal microfluidique.



(a) (b)

Figure 2.17 – (a) : Photographie optique 20X du profil d'un front de liquide se déplaçant dans le canal microfluidique et champ de vitesse de colloïdes de 1 μm dans un canal de 300 μm de largeur. (b) : Image au microscope optique 20X et trajectoires de particules de 1 μm de polystyrène franchissant un obstacle circulaire de rayon 49 μm.

Les performances électriques, optiques et fluidiques des puces ont pu être évaluées par différentes techniques qui ont permis de déterminer leurs conditions d'utilisation :

- Les potentiels appliqués aux puces doivent satisfaire des contraintes sous peine de destruction électrochimique des électrodes : $f > 10$ Hz et $V_{p-p} < 3$ V surtout si le milieu est salin ($\sigma_m > 10^{-2}$ S/m). Les puces peuvent soutenir des potentiels plus important $V_{p-p} > 3$ V lorsque $f > 1$ kHz.
- les électrodes Ti/Au, très robustes électriquement et opaque par nature, ne permettent pas de visualiser les colloïdes de 1 μm lorsque les électrodes sont séparées de moins de 10 μm. En revanche, la transparence des électrodes ITO permet la visualisation des colloïdes proches et en dessous des électrodes. Si les électrodes d'ITO sont dégradées électrochimiquement, leur transparence est fortement diminuée jusqu'à opacification totale.
- Les canaux microfluidiques fabriqués par les techniques de microfabrication classiques et l'utilisation du PDMS photosensible permettent de créer des écoulement laminaires pour des vitesses de particules de l'ordre de $v < 10^{-4}$ m/s.

2.2 Plateforme électro-microfluidique

Les puces microfluidiques sont insérées dans une plateforme d'expérimentation qui permet d'injecter une solution colloïdale dans les puces, d'appliquer un ou plusieurs potentiels électriques sur une ou plusieurs électrodes et de visualiser les mouvements des colloïdes dans les canaux microfluidiques. La plateforme est constituée de 3 modules : *module fluidique, module électrique et module visualisation.* L'ensemble est construit autour d'un microscope optique Leica modifié pour observer des échantillons en champ clair, en fluorescence ou en champ sombre avec des objectifs à longues distances focales (5X, 10X, 20X et 50X). Une platine motorisée (Markshauser) permet de déplacer la puce microfluidique avec l'ensemble de ses connecteurs. La figure 2.18 présente une photographie de la plateforme avec les 3 modules identifiés ainsi qu'un agrandissement de la zone où est située la puce.
La puce est maintenue par deux connecteurs électriques dits à zéro forces d'insertion (PCI ZIF

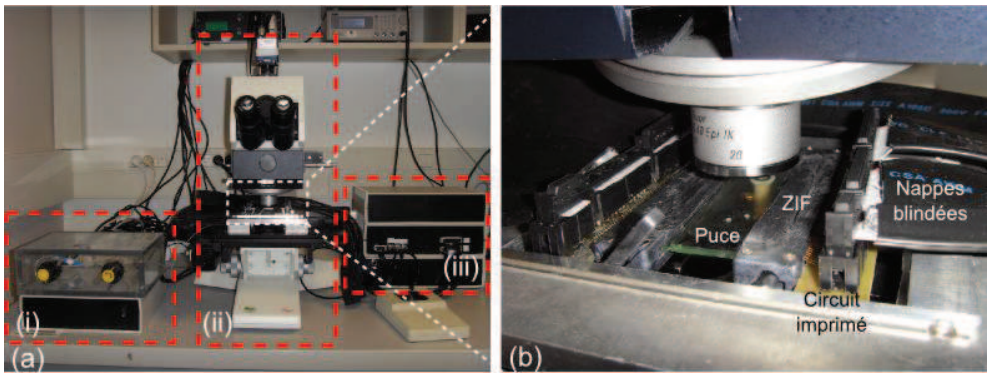


Figure 2.18 – Photographie de la plateforme électro-microfluidique avec les 3 modules : (i) fluidique, (ii) visualisation et (iii) électrique. Un agrandissement de la zone (ii) montre une puce maintenue par les connecteurs électriques.

Testconnecteur, AP Products GmbH). Ce sont des connecteurs informatiques qui permettent de maintenir des cartes PCI comportant 60 connecteurs électriques de part et d'autre de la carte. Ces connecteurs permettent une bonne tenue mécanique car ils appliquent une pression sur les plaques de verre en position fermée ou la relâchent en position ouverte. En position fermée, les pinces de connexion en cuivre permettent de transmettre une tension du connecteur à la puce.

Ces connecteurs ZIF sont soudés sur un circuit imprimé en époxy. Ces derniers sont fabriqués par lithographie standard (insolation à travers un masque imprimé sur un transparent puis gravure chimique à l'acide sulfurique et eau oxygénée) et découpés avec une scie à métaux. Leurs longueurs sont plus importantes que celles des connecteurs ZIF de façon à loger l'ensemble dans un support aluminium et d'assurer une liaison glissière. De cette manière, une puce est d'abord connectée à un module ZIF puis le deuxième est déplacé pour venir pincer la seconde partie de la puce. Une seule face des connecteurs ZIF est utilisée et correspond à la face qui vient prendre les contacts électriques sur la puce.

L'ensemble est relié au module électrique par des nappes blindées. L'utilisation de telles nappes permet d'éviter des tensions induites sur les électrodes voisines de celles activées.
Les 3 modules sont interfacés et pilotés sous Labview (National Instrument). Le logiciel de pilotage permet un contrôle total de l'ensemble de la plateforme.

2.2.1 Module Fluidique

L'injection de liquide dans un système microfluidique est généralement produite par une surpressurisation de l'entrée, ou par la mise en mouvement du piston d'un pousse-seringue. Dans ce dernier cas, il peut apparaitre un phénomène perturbant l'expérience, l'*effet bouchon*. Comme le montre Tabeling [Tabeling 2003], la pression dans un liquide mis en écoulement par un pousse seringue (D le diamètre du piston, L la longueur totale du piston) dans un canal microfluidiques est reportée dans l'équation [Eq. 2.4].

$$p(t) = p_{inf}(1 - e^{-t/\tau}) \text{ avec } \tau = \frac{3\pi l \mu D^2 L}{Eph^2} \qquad \text{[Eq. 2.4]}$$

Avec l la longueur du canal, p sa largeur et h sa hauteur, μ la viscosité du fluide et E son module d'Young.
Puisque τ varie comme l'inverse de la profondeur du canal élevé à la puissance 3, il peut arriver que dans les configurations microfluidiques, ce temps soit important. Ainsi dans le cas des puces microfluidiques 3D, $\tau = 1h30$ pour un canal de 10 μm de hauteur et plusieurs heures pour un canal de 1 μm de haut.
Il y a possibilité de s'affranchir de cette contrainte en travaillant à pression constante, et non à vitesse ou flux constants. De ce point de vue, il est plus indiqué d'utiliser des sources de pression pour mettre en mouvement des fluides dans des microcanaux que des sources de débit. Ainsi, un pousse seringue est utilisé pour compresser un volume d'air qui mettra en mouvement le liquide à injecter dans la puce microfluidique. La figure 2.19 présente une vue schématique du module fluidique ainsi créé. Une boucle d'injection de liquide est placée en sortie du sélecteur et permet d'injecter un liquide jusqu'à un volume de 100 μL qui sera mis en mouvement par la compression du volume d'air en amont.

Le pousse seringue utilisé est un Cavro XP 3000 (Tecan). Il comprend un moteur pas à pas qui actionne un

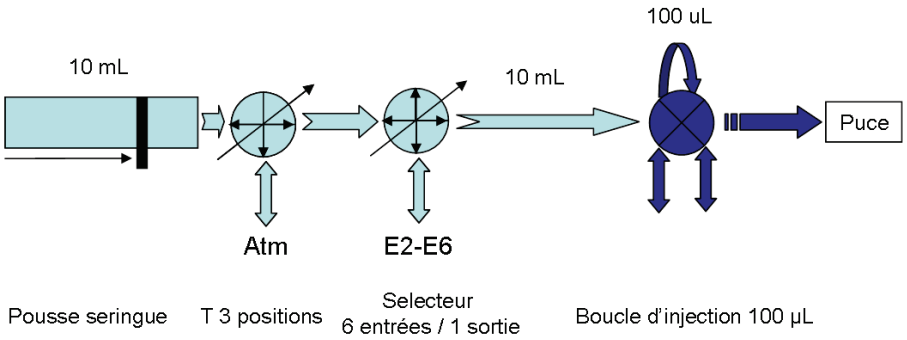


Figure 2.19 – Schéma fluidique du module.

piston dans une seringue de 1 mL de volume et une valve qui permet de sélectionner l'entrée (mise à la pression atmosphérique) ou la sortie vers l'injection dans le canal. De façon à pouvoir remettre rapidement la pression d'injection à la pression atmosphérique ou pouvoir contrôler manuellement la pression (à l'aide d'une seringue), un sélecteur 6 entrées / 1 sortie est placé en sortie du pousse seringue. Enfin, le capillaire de sortie est encastré avec une férule qui se loge dans le connecteur N-333 collé sur les puces.

L'écoulement ainsi créé est bien laminaire comme observé dans les paragraphes précédents. L'étalonnage du débit en fonction de la pression injectée est effectué par mesure des vitesses de particules de polystyrène de 1 μm de diamètre dans le canal en fonction du pourcentage d'air pressurisé dans la seringue de 1 mL. La vitesse des particules est ensuite multipliée par l'aire en coupe du canal pour obtenir les débits du flux laminaire. La figure 2.20 montre les vitesses du flux en fonction du pourcentage d'air injecté. Les vitesses ont été moyennées sur 3 vitesses de particules au centre du canal. Les mesures de vitesses montrent qu'il est possible de contrôler les vitesses de particules dans la gamme [0-76 $\mu m/s$] et d'arrêter l'injection de liquide pour retrouver le mouvement brownien des colloïdes. L'interpolation linéaire met en évidence une corrélation directe entre la vitesse des particules et la pression d'injection (correspondant au déplacement du piston dans le pousse seringue). Il devient alors possible d'obtenir une vitesse donnée à partir de la quantité d'air comprimée par le pousse-seringue.

Une interface Labview est développée à partir du contrôle du pousse-seringue via une liaison CAN (Controller

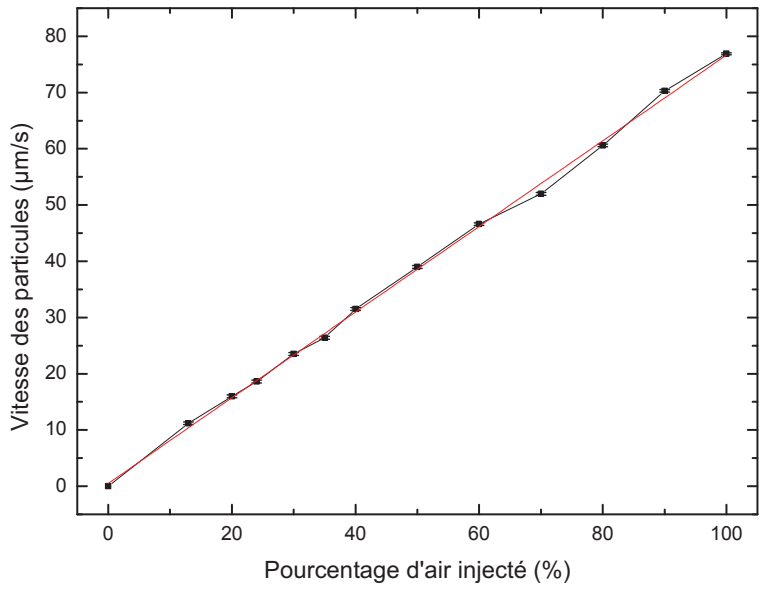


Figure 2.20 – Vitesse du flux en fonction du pourcentage d'air injecté par le pousse seringue. L'interpolation linéaire (R^2 = 0.998 fournit l'équation $y = Ax + B$ où A=7.61 10^{-7} $\mu m/s$ est une vitesse de particules par pourcentage d'air injecté et B=5 10^{-7} μm/s la vitesse minimale des particules.

Area Network). Ce type de protocole de communication permet de contrôler plusieurs instruments en parallèle et prend en compte toutes les instructions envoyées par le maitre (ici le logiciel Labview). La quantité d'air comprimé est contrôlée suivant 2 modes :

- **mode direct**. Ce mode permet d'injecter ou d'aspirer un volume d'air donné à la demande. Il est aussi possible d'aspirer ou d'injecter la totalité du volume.
- **mode automatique.** Ce mode injecte ou aspire un volume d'air donné de manière itérative. Ce mode permet par exemple d'augmenter la vitesse des particules colloïdales progressivement jusqu'à une valeur donnée.

La réalisation d'un module d'injection microfluidique basé sur la compression d'un volume d'air nous permet :

- d'injecter des particules colloïdales dans le canal microfluidique avec un temps d'établissement d'écoulement faible ($<$ 1 s),
- de contrôler la vitesse des particules en temps réel dans la gamme de vitesse [0-76$\mu m/s$].

2.2.2 Module électronique

Le module électronique permet d'appliquer 1 ou 2 potentiels électriques indépendant à une ou plusieurs électrodes parmi les 112 embarquées dans les puces.

Générateurs de signaux alternatifs.
Un potentiel électrique est composé d'un potentiel de signal et d'une masse. Ainsi, ces potentiels sont fournis par 2 générateurs (TG2000 fabriqué par TTi) reliés en masse commune, capables de délivrer des tensions continues (maximum ± 5V) ou alternatives (0-10 MHz, maximum 20 V_{p-p}, sinusoïdale, triangulaire ou carré). Ils peuvent être programmés à distance par liaison série (RS232) pour proposer de telles tensions avec 3 modes possibles :

- **Tension seule** (mode Trigger). La fréquence et l'amplitude du signal sont transmises par l'ordinateur qui active ou désactive l'application d'un tel potentiel.
- **Permutation entre 2 fréquences** (mode FSK). Les paramètres de 2 fréquences sont données par l'ordinateur ainsi qu'une fréquence d'oscillation. Cette dernière permet une commutation en phase continue entre les 2 fréquences sélectionnées.
- **Permutation continue** (mode Tone). Les potentiels de sorties ont des fréquences qui défilent selon une liste définie par l'utilisateur et qui peut comprendre jusqu'à 16 fréquences.

L'implémentation du protocole de communication de ces générateurs sous Labview permet un contrôle temporel d'application de tensions sur les électrodes.

Routage des signaux alternatifs vers les électrodes.
L'adressage unique ou multiple des 112 électrodes se fait par un circuit électronique basé sur des micro-contrôleurs et des relais électromagnétiques. Nous avons choisi d'utiliser les relais Multicomp HRA-S-DC5V qui présentent un encombrement et un coût faibles.

Pour piloter les relais, c'est à dire fermer le circuit d'activation de la bobine, on utilise le micro-contrôleur industriel MC33996 de Freescale semiconductor. Ce composant est une série de 16 interrupteurs commandés par un signal de 24 bits transmis en série, ce qui permet de contrôler 16 sorties avec un mot binaire unique. Lorsque l'une des sorties est activée le circuit de commande de la bobine est alors fermé et le signal à transmettre est alors appliqué en sortie des relais. Ces microcontrolleurs sont eux même pilotés par une carte programmable intermédiaire (VM1, MicroRobotics LTD) qui réceptionne les données de commande utilisateur et les convertis en mots de commande pour les MC33996.
Le système final est une mise en parallèle du circuit de commande d'une électrode. Le système est composé de plusieurs cartes : un étage de commande comportant la carte VM1 et les micro-contrôleurs ainsi que des cartes « Relais ». Les puces microfluidiques comportent 112 électrodes et chacune d'entre elles est commandée par deux relais, il faut un total 224 relais et donc 14 MC33996 (16 sortie par MC33996). La figure 2.21b présente le schéma d'activation d'une électrode parmi 112.
La conception des cartes est effectuée grâce au logiciel libre KiCad. Les typons des cartes de commande et relais sont créés à partir des schémas électriques. Des circuits imprimés vierges sont insolés (2 minutes) et révélés (30 secondes). La gravure se fait chimiquement par attaque du cuivre non protégé avec un mélange d'acide chlorhydrique et d'eau oxygénée (1,5 volume d'acide chlorhydrique (37%), 2 volumes d'eau oxygénée (120 vol) et 3 volumes d'eau désionisée). Les circuits sont ensuite étamés à froid. Cette étape permet de recouvrir les pistes

d'étain de manière à les protéger contre l'oxydation et consiste à baigner le circuit fraichement gravé et nettoyé à l'acétone dans un produit à base d'acide sulfurique et d'étain qui va déposer une couche très fine d'étain sur le cuivre du circuit. Enfin, les circuits sont percés et les composants soudés.
L'ensemble est monté dans des boites sur 3 étages comme le montre la figure 2.18.(iii).
L'utilisateur entre les paramètres du signal électrique, le ou les numéros d'électrodes à activer dans le programme Labview. Ce dernier converti le numéro d'électrode en commande à transmettre au module électrique qui va activer la ou les sorties des micro-contrôleurs correspondants. Les relais à activer sont ensuite fermés et le signal transmis.

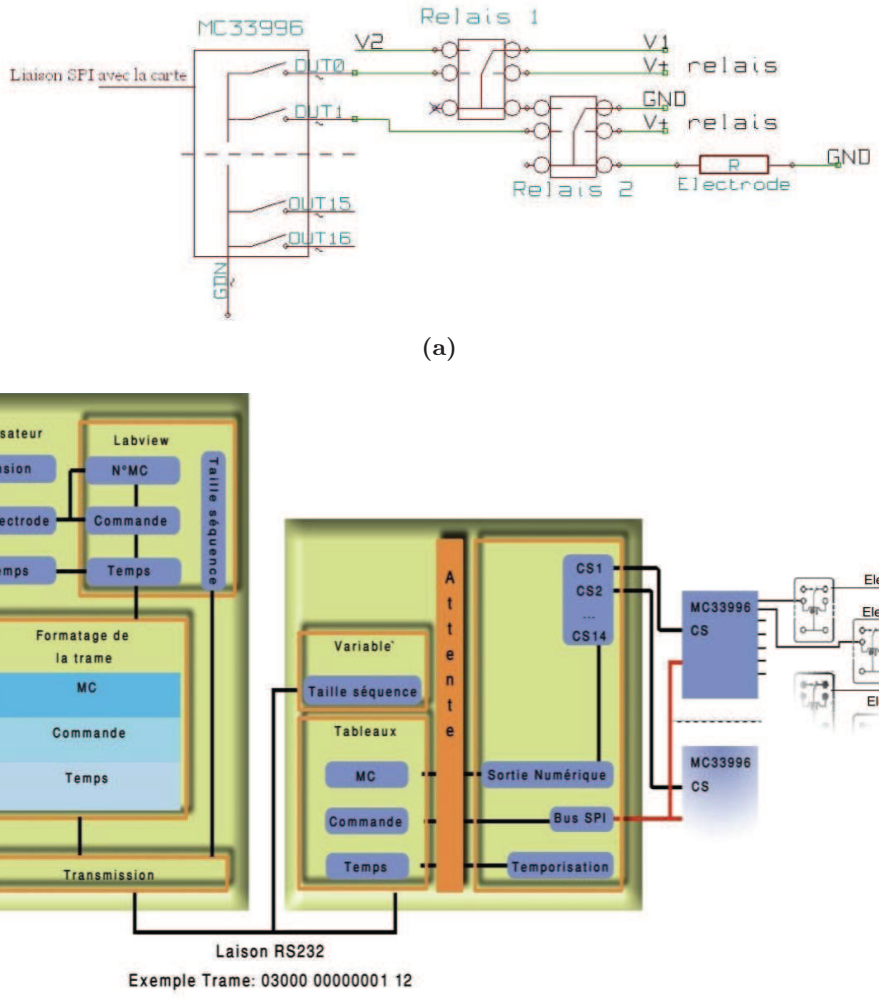


Figure 2.21 – (a) : Schéma électrique de commande d'une électrode. (b) : Schéma d'activation d'une électrode parmi 112.

3 potentiels sont possibles pour chaque électrode, potentiel 1 (V1), potentiel 2 (V2) et la masse, or chaque relais n'a que 2 états possibles. C'est pourquoi les relais sont utilisés par paire. Câblés en série ils permettent de transmettre trois tensions. La figure 2.21a montre le schéma électrique

de commande d'une électrode. Le temps de réponse de commutation des relais est estimé à 232 μs pour que le signal de sortie soit stabilisé. La durée minimale de commutation entre 2 relais ne peut excéder ce temps de stabilisation soit une fréquence maximale de commutation de 4 kHz. *Par défaut les électrodes sont reliées à la masse.*

Il est possible de contrôler le module selon 3 configurations :

- **mode direct**. Ce mode permet de contrôler l'application du potentiel sur une électrode. Comme par défaut toutes les électrodes sont reliées à la masse, l'application d'un potentiel permet de créer un champ électrique dans la puce sur la paire d'électrode concernée. Le potentiel appliqué est celui définit par le générateur.
- **mode séquentiel**. Il est possible de définir une séquence d'application de potentiels sur une ou plusieurs électrodes pendant un délais donné. Les séquences sont enregistrées dans un fichier texte qui est lu lors de l'activation du mode. Ces fichiers sont crées manuellement ou par une interface directement activée pendant l'exécution du programme et permettent d'activer une série d'électrodes avec leurs délais associés. Ce délai de commutation entre les relais ne doit pas être inférieur à 1 ms car les relais ne peuvent maintenir une telle fréquence de commutation (d'après la documentation du fournisseur Multicomp). Une fois chargée, la séquence peut être exécutée plusieurs fois.
- **mode joystick**. Pour faciliter le contrôle global de l'application, un joystick est relié à l'ordinateur. Ce dernier est un manette de playstation (Sony) reliée au port parallèle de l'ordinateur. Les instructions envoyées par la manettes sont une composition de mots binaires faisant référence aux états des boutons. L'utilisation de pilotes associés permet à l'ordinateur de reconnaitre la manette comme un joystick classique et Labview peut lire l'état des boutons en temps réel. Ainsi, chaque bouton sur la manette propose une action comme le montre la figure 2.22. Lorsque le mode joystick est activé, toutes les

Figure 2.22 – Définition des boutons de contrôle du joystick.

électrodes sont mises à la masse et l'application du potentiel électrique est suspendue. La fréquence à appliquer peut être sélectionnée parmi 2 fréquences dites *basse* et *haute* rentrées manuellement dans le logiciel. Si l'injecteur est initialisé, il devient contrôlable par les boutons *R1* et *R2* sur la manette. Il est aussi possible de déplacer la platine motorisée sur laquelle est montée la puce grâce aux boutons *triangle*, *carré*, *croix* et *rond* qui correspondent aux déplacements dans le plan de visualisation de la camera. Une fois le mode initialisé, le numéro d'électrode à activer peut être incrémenté par les boutons

flechés en accord avec la visualisation.

L'ensemble générateur et module électrique permet de contrôler le champ électrique dans la puce microfluidique non seulement temporellement, par modulation du signal électrique transmis à la puce, mais aussi spatialement, par application de ce signal sur une ou plusieurs électrodes.

2.2.3 Module optique et suivi de particule

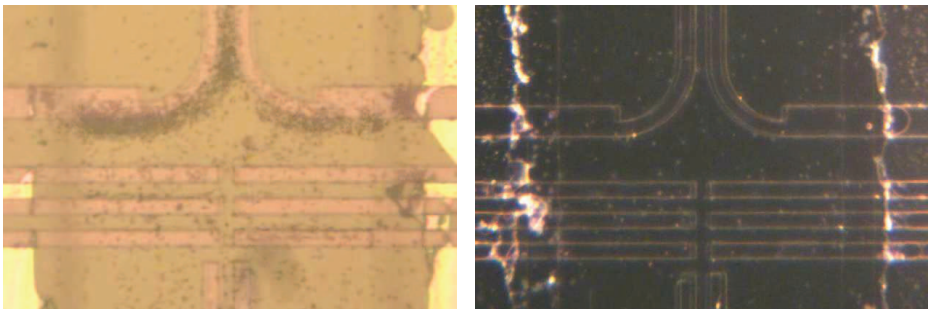
La puce microfluidique est observée en réflexion sur un microscope Leica inversé. Ce dernier a été modifié pour augmenter ses performances en terme d'illumination et de collection de la lumière diffusée par l'échantillon.

En effet, l'illumination d'origine du microscope est obtenue par une lampe halogène 12V avec un réflecteur dont l'angle d'illumination effectivement transmis à l'échantillon est faible (environ 10°) par rapport à l'angle d'illumination total (170°). Cette lampe est donc remplacée par un module d'illumination de microscope comportant une lampe halogène 12V sans réflecteur et des miroirs paraboliques qui permettent de rediriger les faisceaux lumineux émis par la lampe à 360° vers le cône d'illumination du microscope. Une telle configuration augmente de manière significative (au moins 50%) la quantité de lumière injectée dans le microscope. L'accès à de telles intensités permet l'utilisation de filtres optiques placés en sortie de lampe et avant l'échantillon pour l'observer en fluorescence par exemple.

Il existe plusieurs modes d'observation :

- **mode champ clair**. La lumière est injectée à travers l'objectif du microscope et la lumière diffusée par l'échantillon est récoltée par ce même objectif. Une telle configuration permet par exemple d'observer directement des particules colloïdales en mouvement avec une limitation en résolution (typiquement 1 μm). La figure 2.23a montre une photographie des particules colloïdales en observation champ clair.
- **mode champ sombre**. L'échantillon est illuminé en incidence rasante par les contours de l'objectif et la lumière diffusée par l'échantillon est récoltée par le centre de l'objectif. L'utilisation de ce mode nécessite une illumination en anneau de l'objectif, faite par un masque annulaire en entrée du cube dichroïque du microscope. La figure 2.23b montre une photographie de particules colloïdales en observation champ sombre.
- **mode fluorescence**. Ce mode est en faite un champ clair avec des longueurs d'onde d'illumination spécifiques au fluorophore utilisé. Les pics d'excitation et de diffusion de particules fluorescentes étant différents, ce mode permet d'observer des particules sans le fond d'image. Étant donné que les filtres utilisés absorbent une partie de la lumière (environ 10 %) il est important d'utiliser des sources lumineuses puissantes pour visualiser le déplacement des colloïdes. Ainsi il est possible d'exciter les fluorophores directement par des LED ou des LED laser émettant aux bonnes longueurs d'ondes d'excitation et placées au plus près de l'échantillon, soit en dessous soit directement dans les cavités de l'objectif champ sombre.
- **mode transmission**. Une source lumineuse est placée sous la plateforme de maintien des puces et éclaire vers le centre de l'objectif. Ainsi, lorsque le substrat est transparent, typiquement des puces microfluidiques, il est possible d'illuminer ces dernières par dessous pour observer les échantillons en transmission. La source lumineuse choisie est une diode

électroluminescente jaune (λ = 570 nm) de sorte qu'il devient possible d'observer en transmission et en fluorescence verte en même temps. Ce mode est principalement utilisé pour visualiser les cellules qui sont biréfringentes et donc peu visibles en champ clair ou sombre.



(a) **(b)**

Figure 2.23 – Photographies optiques 20X de particules de 1 μm en mode (a) : champ clair, (b) : champ sombre.

La visualisation de l'échantillon est assurée par une camera CCD (GigE C1024 Dalsa) fournissant des images 1024x768 pixels jusqu'à 20 images par secondes. La vitesse d'acquisition des images est critique lors du calcul des vitesse des particules et peut être réglée en ajustant le temps d'exposition et le gain de la camera. Une fois acquise, la vidéo peut être compressée. Les paramètres lors de l'acquisition (tension, fréquence, électrode active, pourcentage air pousse-seringue) sont directement incrustés dans l'image de sortie.

Détection et suivi des particules.
La reconstitution des trajectoire et les calcules des vitesses des particules sont constitués de 2 étapes. La première consiste à reconnaitre la ou les particules dans une image, excluant les parties fixes telles que les électrodes. La deuxième étape assure la reconnaissance du mouvement de chaque particule parmi l'ensemble de particules reconnues dans la première étape. Ainsi pour un ensemble d'images issues d'un film par exemple, la reconnaissance des particules s'effectue sur l'ensemble des images et la liaison entre ces particules permet de calculer les trajectoires et les vitesses de chaque particule individuellement.
Le domaine de la vélocimetrie par image de particule (particle image velocimetry, PTV en anglais) est une technique d'imagerie visant une mesure du champ de vitesse dans un écoulement grâce au calcul de l'ensemble des vitesses des traceurs, typiquement des nano- ou microparticules. Parmi l'ensemble des algorithmes de reconnaissance et de suivi de particules nous utilisons l'algorithme très répandu de Crocker [Besseling 2009], qui permet de localiser le maximum d'intensité d'un objet sphérique, ou l'algorithme de corrélation d'image de référence [Milne 2007]. Le choix entre ces deux algorithmes dépend du type de particules utilisées et de leur illumination. Typiquement, des particules de diamètres supérieurs à 1 μm en champ sombre peuvent être suivies par les deux algorithmes alors que les plus petites particules ne peuvent être suivies que par l'algorithme de Crocker.
Il existe plusieurs implémentations logicielles pour ces algorithmes : ImageJ, IDL Rytrack, Labview ou Matlab. Étant donné que les autres modules sont implémentés sous Labview, le

choix se base sur l'utilisation du logiciel libre StAT[Milne 2007] qui permet la reconnaissance et le suivi de particules. Ce programme est modifié et intégré au logiciel globale. Ainsi le programme s'articule autour de 3 étapes majeures comme le montre la figure 2.24.

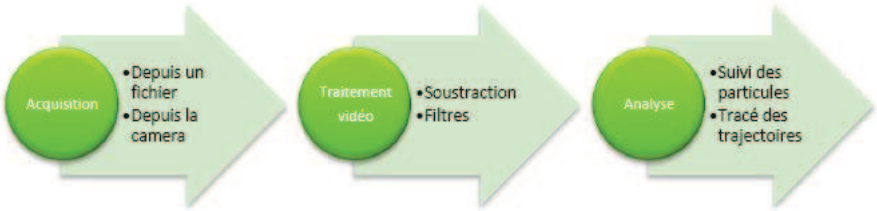
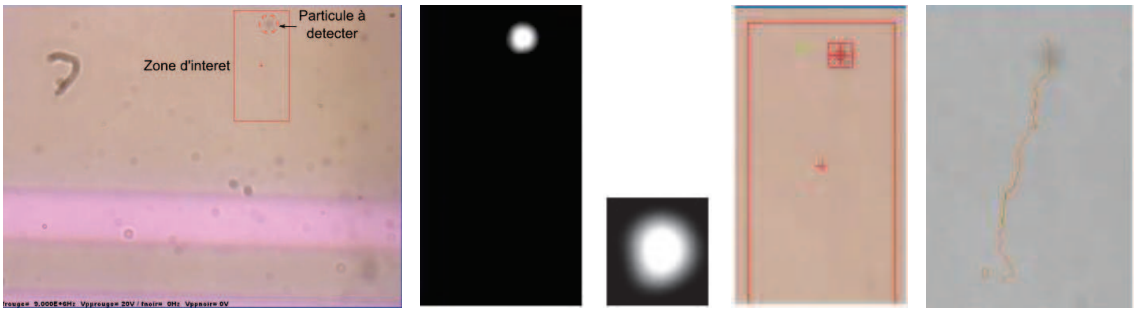


Figure 2.24 – Étapes du logiciel de détection et suivi de particule.

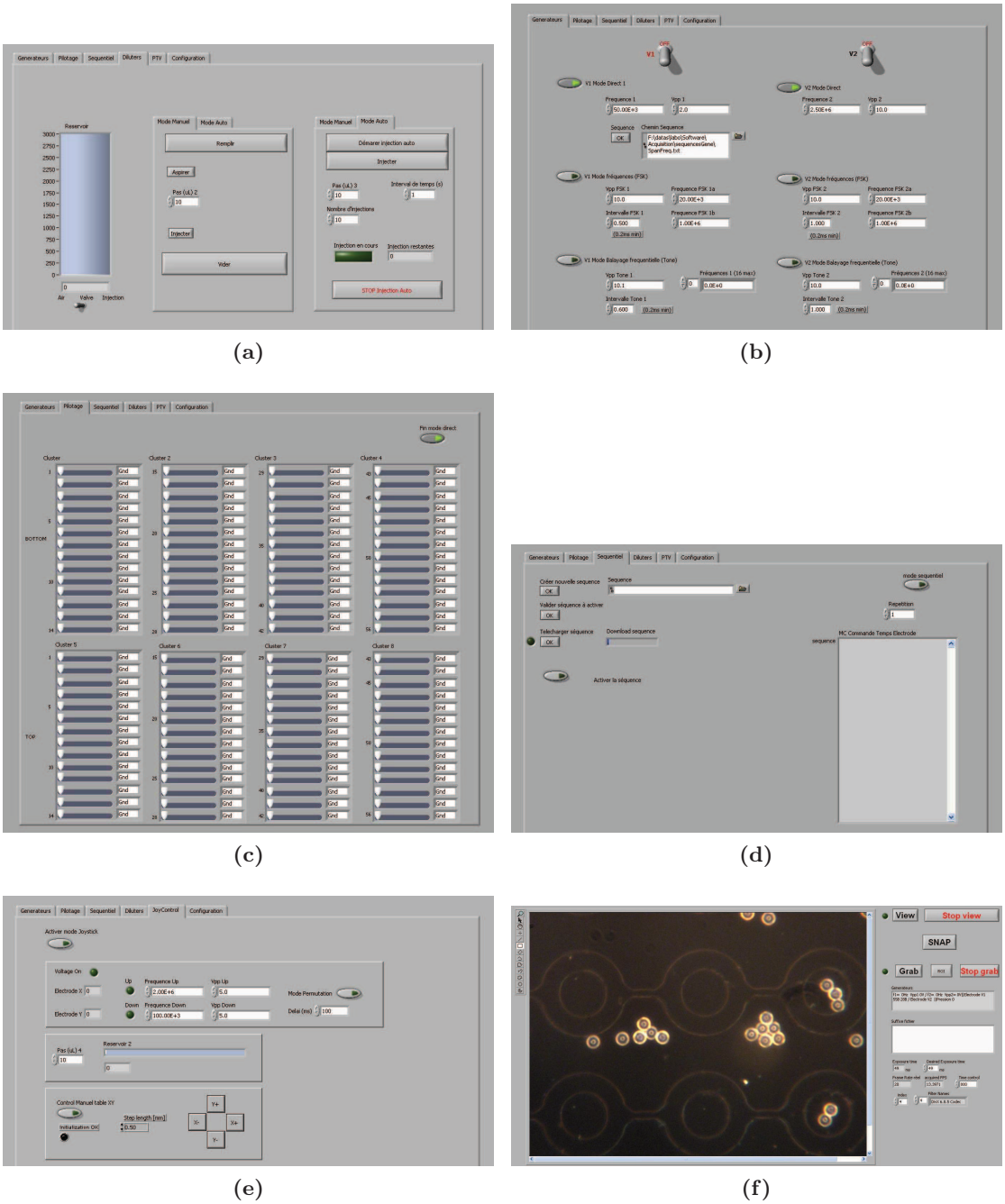
- **Acquisition**. Les images sont entrées dans le logiciel soit en direct par la camera pour un suivi en temps réel, soit a posteriori d'une acquisition par un film compressé ou non. La figure 2.25a montre un exemple de zone à traiter avec une particule à suivre.
- **Traitement**. Dans certaines situations de visualisation il est indispensable de traiter les images. Du bon réglage des paramètres de traitement vidéo va dépendre le succès du suivi des particules. Cet algorithme est composé de sept étapes : Soustraction d'une image de fond ; conversion en niveau de gris ; réglage de la luminosité, du contraste et du niveau gamma ; binarisation de l'image par application d'un seuil, inversion des pixels, application d'une dilatation, filtrage des fréquences par transformée de Fourier. L'utilisateur doit donc régler l'ensemble des paramètres des sept étapes précédemment citées afin de rendre visible, sans ambiguïté, les particules à suivre. La figure 2.25b montre la zone préalablement sélectionnée une fois l'image traitée.
- **Analyse**. Cette étape consiste alors en la détection des positions des particules sur l'ensemble des images et la corrélation des particules entre les images. Tout d'abord, l'image de référence est comparée à la vidéo. L'utilisateur doit donc sélectionner le modèle qui correspond le plus au motif à reconnaître. L'image 2.25c montre une image de référence dans le cas de l'image traitée. Ce choix peut se faire de deux façons : sélection depuis une bibliothèque d'images déjà existantes ou création d'une nouvelle image de référence par sélection directe. Ensuite Labview compare chaque pixel du motif à l'image de travail et lui attribue un score entre 0 et 1000, 1000 étant une correspondance parfaite. Afin de cibler au mieux les particules, l'utilisateur peut jouer sur plusieurs paramètres dont le score minimal ou le nombre de résultats voulu. Les résultats sont superposés à l'image originale comme montré sur la figure 2.25d et les données issues de la reconnaissance (coordonnées (x,y) et score) sont enregistrées pour chaque particule dans des fichiers textes. Ces fichiers vont permettre de tracer les trajectoires des particules comme montré sur la figure 2.25.

Les performances du module de suivi sont évaluées grâce à l'observation du mouvement Brownien de particules colloïdales de diamètres allant de 100 nm à 5 μm, présenté en annexe B.
L'implémentation graphique du Logiciel est présentée sur la figure 2.26.



(a) (b) (c) (d) (e)

Figure 2.25 – Exemple de reconnaissance et de suivi de particule. La zone à analyser est sélectionnée sur l'image d'origine (en cours ou après acquisition) (a). Après traitement approprié, la particule apparait sur fond noir et est dilatée (b). Une image de référence peut être choisie parmi une bibliothèque ou créé à partir de l'image traitée (c). Les coordonnées de la particules ainsi détectée sont superposées sur l'image originale et enregistrées dans un fichier texte (d) puis la trajectoire de la particule est superposée sur l'image (e).



(a) **(b)**

(c) **(d)**

(e) **(f)**

Figure 2.26 – (a) : Programme Labview de contrôle du module fluidique. (b) : Programme Labview de contrôle des générateurs. (c) : Programme Labview du mode direct. (d) : Programme Labview du mode séquentiel. (e) : Programme Labview du mode Joystick. (f) : Programme Labview du mode visualisation.

2.3 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté une nouvelle technologie de fabrication de puce microfluidique tridimensionnelle qui intègre des électrodes bi-planaires de part et d'autre du canal, alignées et transparentes. L'accès à de telles puces permet de lever le verrou technologique qui limite la diélectrophorèse à des géométries co-planaires d'électrodes. La facilité de fabrication de ces puces réside principalement dans l'utilisation d'un PDMS photosensible qui n'impose pas de couche résiduelle au dessus du canal.
Les puces microfluidiques ainsi fabriquées présentent des caractéristiques optique (transparence des électrodes d'ITO dans la gamme de fréquence choisie), électrique (moins de 1 % de perte du signal électrique transmis) et fluidique (création de flux laminaire dans la gamme de vitesse choisie) permettant de les utiliser dans les gammes de fréquence (1 kHz à 10 MHz), de tension (0 - 20 V_{p-p}) et de vitesse (de 0 à 100 μm/s) nécessaires à induire de la diélectrophorèse dans des solutions colloïdales injectées dans les microcanaux.
Nous avons aussi présenté une plateforme électro-microfluidique complète qui permet à la fois de contrôler la vitesse hydrodynamique des particules colloïdales dans les microcanaux, d'appliquer des champs électriques alternatifs sur une ou plusieurs électrodes de la puces et de détecter et suivre des particules colloïdales en temps réel suivant différents modes d'observation.
Le programme Labview de pilotage des 3 modules électrique, fluidique et optique permet de contrôler :

- **L'application spatio-temporel d'un champ électrique alternatif.** La programmation des générateurs conjointement au numéro de l'électrode à activer permet en effet d'appliquer une différence de potentiel alternative sur une électrode donnée pendant une durée déterminée.
- **Le positionnement de particules colloïdales par flux hydrodynamique.** Le contrôle précis de la vitesse hydrodynamique d'injection des particules permet en effet de positionner ces particules le long du canal microfluidique.
- **La détection et le suivi de trajectoire de particules colloïdales.** Le module optique permet d'illuminer les particules suivant différents modes d'observation et de calculer en temps réel leurs trajectoires et leurs vitesses.

Chapitre 3

Fabrication de colloïdes fonctionnels

Sommaire

3.1 Colloïdes Janus 65
3.1.1 Microfabrication par la méthode combinante 65
3.1.2 Biofonctionnalisation de surface de particules colloïdales 71
3.2 Conclusion 78

Au delà des particules commerciales sphériques standards, la capacité à nanostructurer ou fonctionnaliser des particules permet de leur conférer des propriétés multifonctionnelles.
Dans ce chapitre, nous montrons la réalisation de particules dissymétriques de type Janus en forte densité à partir de la fabrication de monocouches denses de particules sur un substrat. L'étude optique des particules Janus permet de déterminer l'orientation d'une particule unique sur un substrat. Finalement nous explorons plusieurs chimies de greffage (par adsorption ou liaison covalente) de protéines d'adhésion cellulaire sur ces particules Janus dans des milieux de cultures cellulaires.
Ces particules multifonctionnelles optique et biologique seront utilisées au chapitre 6 pour interagir avec des cellules.

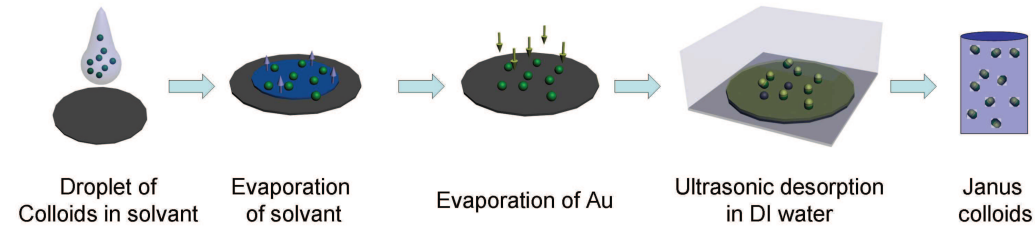
3.1 Colloïdes Janus

Les particules Janus réalisées et étudiées dans ce chapitre sont de type "*deux sphères*"(voir la figure 1.3 au chapitre 1). Nous avons fait le choix technologique de fabriquer de telles particules par des méthodes combinantes, à savoir de créer l'anisotropie à partir de particules commerciales sphériques.

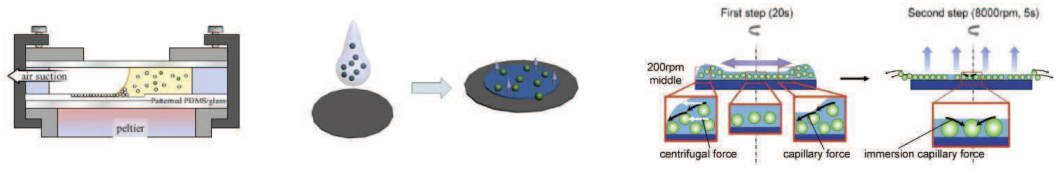
3.1.1 Microfabrication par la méthode combinante

La figure 3.1 présente le procédé de fabrication de particules Janus Au/polystyrène. Elle est basée sur le dépôt d'une monocouche de particules sur un substrat. Ces particules sont ensuite placées dans un évaporateur à canon d'électrons qui dépose de manière directionnelle un film de métal. Les particules étant sphériques, elles créent un masque naturel, la couche métallique n'est alors déposée que sur la partie supérieure de la sphère. Le substrat est ensuite immergé dans un bêcher d'eau désionisée. Il est finalement placé dans un sonicateur à ultra-son pour resuspendre les particules en solution.

Pour obtenir des densités de particules élevées permettant la fabrication en masse de colloïdes Janus ($> 10^5 part/mL$) par cette méthode, il est préalablement nécessaire de réaliser des substrats contenant des monocouches denses de particules.



(a)



(b)

Figure 3.1 – (a) : Procédé de fabrication des particules Janus. Les particules sont étalées en monocouche sur un substrat puis l'ensemble est placé dans un évaporateur métallique. Les particules sont resuspendues en solution par ultra-sonication. (b) : Schémas des 3 méthodes de fabrication de monocouches de particules denses : assemblage par par convection [Lecarme 2010], par évaporation [Honegger 2010b] ou par centrifugation [Ogi 2007].

3.1.1.1 Fabrication de monocouches denses de particules

Il existe principalement trois grandes techniques de création de monocouches de particules sur un substrat basées soit sur **l'assemblage convectif**, **la centrifugation** ou **l'évaporation** d'une goutte colloïdale comme le montre la figure 3.1b.

- **L'assemblage convectif** consiste à déplacer l'interface goutte-air sur le substrat (interface triple) de manière contrôlée. Le substrat peut être immergé dans une solution colloïdale puis retiré de la solution avec un angle d'inclinaison déterminé (technique "dip-coating" [Micheletto 1995, Nagao 2008, Prevo 2004]). A l'inverse, le substrat peut être immobile et la solution balaie ce dernier par contrôle de son évaporation (technique d'assemblage par force capillaire [Rivera 2008]). Le nombre de particules déposées peut être modulé par l'épaisseur du ménisque formé à l'interface triple dans les deux cas. L'inconvénient de ces méthodes réside dans une temps d'évaporation relativement long (jusqu'à plusieurs heures) et implique l'utilisation de bancs expérimentaux spécifiques.
- **L'assemblage par évaporation** réside dans l'évaporation d'une petite goutte colloïdale ((100 μL ou 300 μL) déposée au centre du substrat. Dans ce cas, la phase de dispersion choisie est un solvant mouillant qui permet un étalement homogène de la goutte sur le substrat et volatil qui entraine le dépôt localisé des particules.
- **L'assemblage par centrifugation** est basée sur le dépôt d'une goutte colloïdale sur un substrat subissant deux étapes de rotation. La première étape consiste à utiliser les forces de centrifugation pour étaler les colloïdes sur le substrat alors que la seconde étape force l'évaporation du solvant et l'assemblage des particules en monocouches. Cet assemblage conduit à un étalement uniforme des particules grâce aux forces centrifuges [Ogi 2007]. L'utilisation d'une machine d'étalement par centrifugation ("spin-coater") permet de contrôler l'épaisseur finale d'une solution colloïdale suivant la force de centrifugation

imposée (vitesse de rotation), la viscosité de la solution et la température de dépôt.

Selon Ogi et al. [Ogi 2007], le processus de dépôt de monocouches de colloïdes réside dans la compétition entre les vitesses d'étalement et d'évaporation du solvant sur le substrat. Le dépôt homogène des particules sur le substrat sera conditionné par la mouillabilité du solvant qui modifie le taux d'étalement de la goutte sur le substrat dans le cas de l'assemblage par évaporation. Le choix du solvant affecte également les vitesses hydrodynamiques des colloïdes dans le cas de la méthode par centrifugation.
Nous avons choisi d'explorer et de comparer les méthodes **d'assemblage par évaporation** et **d'assemblage par centrifugation** qui permettent une mise en oeuvre rapide pour obtenir une fabrication en masse de monocouche de particules.

Les substrats choisis sont des fines lamelles de verre circulaires de diamètre 30 mm. Les expériences sont menées avec une solution initiale aqueuse à 2% en poids de colloïdes fluorescents en polystyrène (PS) contenant plus de $10^{11} particules/ml$. Les colloïdes ont tout d'abord été dilués et resuspendus dans différents solvants pour obtenir des solutions filles de 1% en poids pour chaque solution étudiée. Les solvants étudiés sont : eau désionisée, eau désionisée avec 1 :1000 de Triton X (de façon à supprimer le surfactant introduit par le fabriquant), de l'éthanol et de l'isopropanol qui présentent tout deux des vitesses d'évaporation importantes à l'air ambiant.
La méthode par évaporation consiste alors en le dépôt d'une solution colloïdale (100 μL ou 300 μL) au centre du substrat.
La méthode par centrifugation a été réalisée en 2 étapes, une à vitesse de centrifugation lente (500 à 100 tours par minutes pendant 20 secondes) et une à vitesse rapide (5000 tours par minutes pendant 5 secondes). Une fois les méthodes réalisées et lorsqu'il ne reste plus de solvant sur le substrat, ces derniers sont observés au microscope optique 50X. Le nombre de particule est compté du centre (position 0 cm) jusqu'au bord de la lame de verre (position 15 cm) avec un programme réalisé avec NI-Vision et Labview.

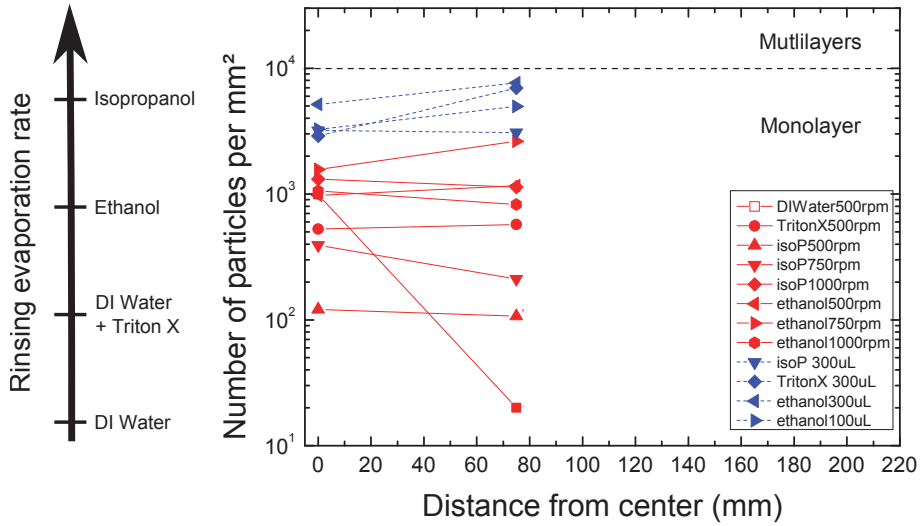


Figure 3.2 – Densité et répartition de particules sur un substrat obtenus avec les méthodes d'assemblage par évaporation (trait pointillé) et par centrifugation (trait plein). Les taux relatifs d'évaporation croissants des solvants sont indiqués sur la flèche. [Honegger 2010c].

La figure 3.2 présente une comparaison des quantités de particules déposées avec les 2 méthodes pour différents solvants. Sur ce graphe, la ligne pointillée représente la transition entre une monocouche organisée en réseau hexagonal compact (10^4 $part./mm^2$) et la formation de multicouches de particules.

La méthode par évaporation d'une goutte peut conduire à la formation de monocouche ou de multicouches. Cette technique permet d'obtenir des densités de particules élevées ($> 3.10^3$ $part/mm^2$) étant donné que les toutes les particules sont déposées sur le substrat. Les volumes de gouttes employés (la centaine de microlitre) permettent d'obtenir des vitesses d'évaporation des solvants comprises entre 2 et 5 minutes montrant la rapidité de cette technique. On remarque tout d'abord que la densité de particules déposée est inversement proportionnelle à la vitesse d'évaporation des solvants. De plus, si le temps d'évaporation est trop long, les particules ont le temps de se déposer en multicouches à l'interface triple. En effet, au début de l'évaporation de la goutte, les colloïdes s'accumulent à la ligne triple (grâce aux flux de Marangoni) et se déposent en multicouches avant que la ligne triple ne commence à se déplacer. Pour éviter la formation de multicouches pour une solution donnée, des volumes de goutte initiaux moins importants (100 μL) peuvent être employés. Cette méthode permet alors avec de l'éthanol d'obtenir des densités de particules de 3.10^3 $part/mm^2 \pm 10^3$ en moyenne sur l'ensemble du substrat de verre.

La méthode par centrifugation permet quant à elle de produire une monocouche en moyenne 3 fois moins denses que la précédente technique. La première étape de centrifugation a une influence sur l'homogénéité du dépôt. En effet, la compétition entre les forces centrifuges et les forces de capillarité pendant l'évaporation du solvant définit l'organisation sur le substrat. Ainsi, une vitesse de 1000 tours par minute permet d'obtenir une monocouche uniforme de 10^3 $part/mm^2$ avec de l'isopropanol ou de l'éthanol comme milieu dispersif des colloïdes.

> Nos résultats expérimentaux montrent donc que la méthode qui permet d'obtenir la plus grande densité de monocouche (3.10^3 $part/mm^2$) est celle de l'assemblage par évaporation de gouttes (volume 100 μL) de solution colloïdale redispersée dans de l'éthanol, comme le montre la figure 3.3. Suite à la redispersion des particules en solution aqueuse, cette méthode permet ainsi d'obtenir 2.10^7 $part/mL$. A titre de comparaison, les solutions commerciales de polystyrène de 1 μm de diamètre sont concentrées à des ordres de grandeur de 10^{10} $part/mL$.

Une fois la monocouche crée, le substrat est placé dans un évaporateur métallique par canon d'électron. Une bi-couche Ti/Au (Titane :Or) est évaporée en proportion 1 :10. La couche de titane permet une accroche forte de l'Au ce qui permet d'éviter une resuspension de la couche d'or en solution lors de la prochaine étape. Enfin, les colloïdes sont resuspendues dans 1 mL d'eau désionisée par sonication pendant 2h dans un bêcher.

3.1.1.2 Propriétés optiques des particules Janus

Plusieurs types de particules Janus d'épaisseur d'Au variable (de 20 nm à 500 nm) ont été fabriquées (figure 3.4) à partir de sphères de polystyrène fluorescentes par la méthode d'assemblage par évaporation. L'évolution des propriétés optiques des particules Janus en fonction de l'épaisseur de la couche métallique et de l'orientation de la particule déposée sur un substrat sont ensuite étudiés.

La microspectroscopie des particules Janus sous excitation de fluorescence ($\lambda_{excitation}$ = 468 nm, $\lambda_{emission}$ = 508 nm) suite à l'étape de dépôt métallique permet de quantifier la lumière

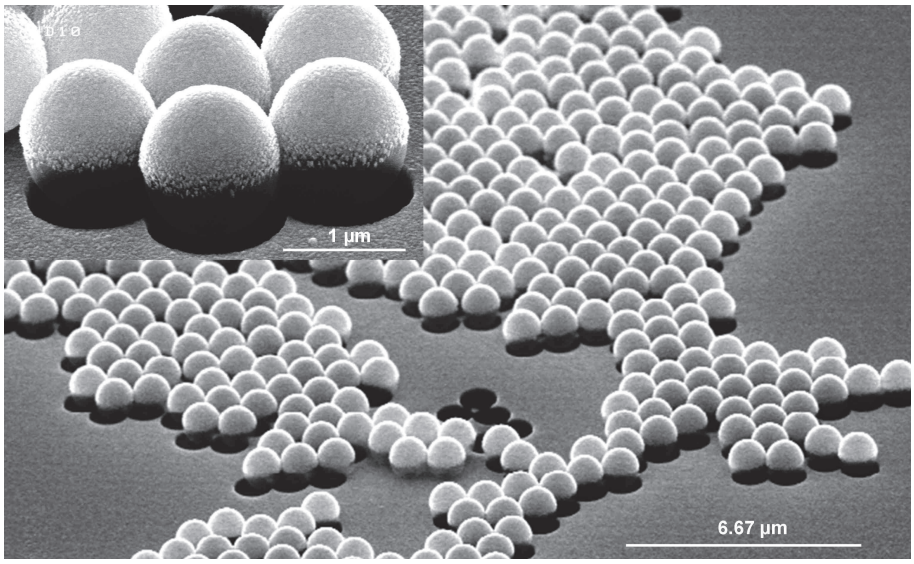
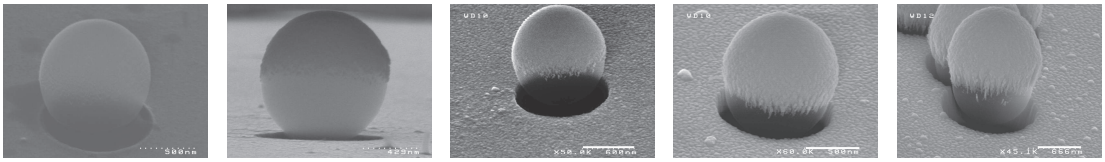


Figure 3.3 – Photographies de particules Janus 100 nm Au / 1 μ Polystyrène avant sonication [Honegger 2010b] déposées grâce a la technique d'évaporation.



(a) **(b)** **(c)** **(d)** **(e)**

Figure 3.4 – Photographies MEB de particules Janus Au/PS. (a) : 20 nm Au, (b) : 50 nm Au, (c) : 100 nm Au, (d) : 250 nm Au et (e) : 500 nm Au.

diffusée par les particules à l'aide d'un spectomètre.

Masquage de fluorescence des particules

A cette étape du procédé, lorsque les particules viennent d'être métallisées et sont encore sur le substrat de verre, toutes les particules sont orientées face Au vers le haut, ce qui permet d'évaluer la transparence des couches d'Au évaporées. La figure 3.5a présente les spectres pour les particules Janus d'épaisseur d'Au variables. Les photographies optiques montrent tout d'abord que la transparence des couches d'Au de faible épaisseur (20 et 50 nm) ne permet pas de cacher la fluorescence des particules Janus. L'intensité de lumière collectée et intégrée sur la gamme spectrale 500 - 550 nm met en évidence que pour ces épaisseur d'Au, cette intensité est inférieure à 30% de la lumière collecté par spectroscopie de fluorescence sur une particule de polystyrène standard. En revanche, les particules Janus de 100 nm cachent presque la totalité ($> 95\%$) de la fluorescence de la particule de PS. La couronne de lumière observée est probablement due à la diffraction de la lumière sur le substrat. La fluorescence est masquée par la demi-coquille métallique des particules Janus dont l'épaisseur d'Au est suffisante (> 100 nm).

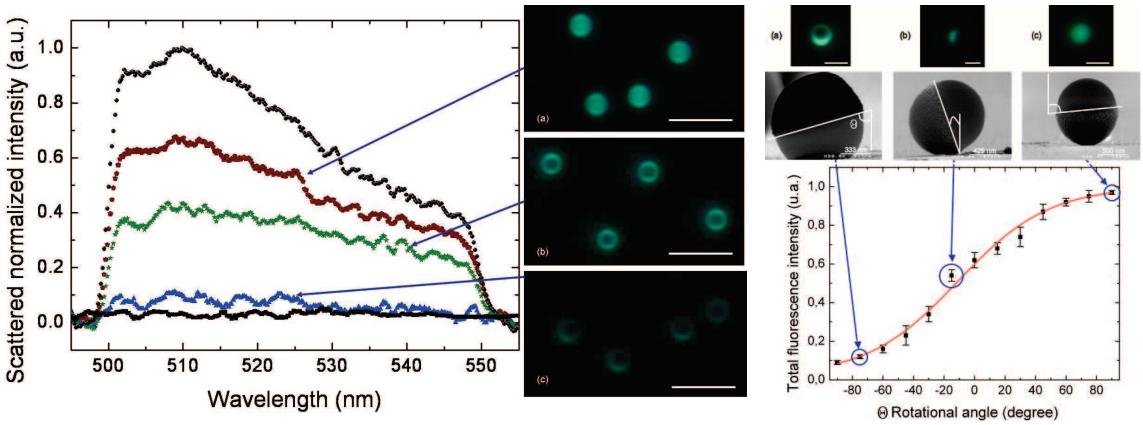


Figure 3.5 – (a) : Spectres optiques et photographies au microscope optique 100X de particules Janus Au/PS avec des épaisseur de (a) : 20, (b) : 50 et (c) : 100 nm d'Au. Les spectres enregistrés correspondent à une moyenne sur 3 particules de même épaisseur d'Au et sont normalisés par le spectre d'une particule de polystyrène fluorescente dans les mêmes conditions d'illumination et d'acquisition. (b) : Spectres optiques et photographies aux microscopes optique et à balayage 100X de particules Janus 100 nm Au/PS pour différentes orientations sur un substrat : (a) coté Au vers le haut ($\theta = -90^{\circ}$), (b) tournée sur le coté ($\theta = 15^{\circ}$) et (c) coté PS vers le haut ($\theta = 90^{\circ}$).

Observation de l'orientation des particules par fluorescence

Suite à la sonication de l'échantillon (Au 100 nm), l'évaporation d'une goutte de 10 μL sur un substrat de verre permet de déposer des particules Janus présentant des orientations différentes de la face métallique sur l'échantillon. La visualisation optique lors du procédé d'évaporation montre que les particules Au/PS ont une tendance générale à s'orienter face Au contre le substrat au début du processus d'évaporation. Lorsque qu'une goutte s'évapore, on observe une première phase pendant laquelle la goutte s'évapore à angle de contacte constant et à circonférence diminuant. Lorsque la goutte atteint une circonférence critique, l'évaporation se poursuit à circonférence constante et à angle de contacte diminuant jusqu'à effondrement de celle ci. Lors de la première phase, les particules sont entrainées vers le front d'évaporation et les particules Janus tendent à minimiser leurs énergies de surface en présentant leurs faces Au vers le substrat. Cependant, lors de la deuxième phase, il ne semble pas avoir de tendance d'orientation et les particules sont orientées de manière non-uniforme. Dans cette zone de la goutte évaporée, l'orientation des particules Janus est observée par microscopie électronique et corrélée à la quantification du signal de fluorescence intégré. Comme le montre la figure 3.5b, la quantité de fluorescence émise par les particules Janus est liée à leur orientation, ceci est confirmé par la littérature [Choi 2003]. Étant donné la réponse continue de la lumière émise par ces particules, leur orientation sur un substrat peut donc être déterminée à partir de la quantité de lumière qu'elles émettent pour des angles d'orientation compris entre $-40^{\circ} < \theta < 40^{\circ}$.

> Cette étude des propriétés optiques de particules Janus a mis en évidence que la spectroscopie de fluorescence permettait de déterminer l'orientation de la particule déposée sur un substrat pour une épaisseur métallique suffisante (100 nm Au). La rotation complète ($\theta > \pm 80^{\circ}$) d'une particule Janus peut également être observée car l'intensité lumineuse a une réponse binaire pour les orientations face polystyrène vers le haut ($I_{fluo} \sim 1$) ou vers le bas ($I_{fluo} \sim 0$).

3.1.2 Biofonctionnalisation de surface de particules colloïdales

De façon à créer une interaction locale entre des cellules et des particules colloïdales, ces dernières sont fonctionnalisées en contrôlant le greffage de molécules biologiques (protéines, anti-corps, ADN) sur leur surface. Des exemples dans la littérature montrent ainsi que les liaisons protéine-protéine mises en oeuvre lors du couplage anti-corps anti-gêne peuvent être quantifiées [Mansuy-Schlick 2006] de même que les interactions protéines-cellules [Mailänder 2009, Wu 2010]. L'intégration de ces particules dans des cultures cellulaires permet également d'organiser les cellules suivant des motifs définis [Gleason 2003, Yap 2007].
Deux principales stratégies sont possibles pour greffer des molécules biologiques sur la surface de colloïdes : **l'adsorption** et **le greffage par liaison covalente** [Rusmini 2007].

- **L'adsorption de molécules biologiques** consiste à créer des liaisons non spécifiques entre les molécules et la surface des colloïdes par minimisation des énergies enthalpiques des biomolécules à la surface des colloïdes. Dans ce cas, l'organisation surfacique des biomolécules n'est pas maitrisée et plusieurs couches peuvent se former.
- **Le greffage covalent** vise à créer une liaison covalente entre la biomolécule et la surface de la particule grâce à une molécule tierce, appelée liante ou *cross-linker*. Cette molécule possède les propriétés chimiques qui lui permettent de réagir d'un coté avec la surface de la particule (qui peut être activée elle aussi par une fonction chimique) et de l'autre coté avec le site de greffage actif de la biomolécule. L'organisation surfacique des biomolécules est alors maitrisée et leur densité est définie par **le nombre de site actif par angström carré** (*Parking Area*), greffés sur la surface de la particule.

Les deux stratégies de greffage ont été évaluée sur des particules colloïdales de 1 μm de diamètre de polystyrène (PS), de silice (SiO_2) et de 250 nm de diamètre d'or (Au). Chaque type de particule commerciale peut présenter une fonctionnalisation de surface différente : polystyrène nue ou fonctionnalisée carboxylate PS-COOH - SiO_2 nue ou $SiO_2 - COOH$ - Au nue ou fonctionnalisée -COOH en passant par une étape préalable de fonctionnalisation par des thiols. Dans le cas des particules d'Au, la fonctionnalisation thiol a été effectuée au laboratoire par adsorption spécifique d'un mélange de 0.1 M d'acide 16-mercapto-1-hexanedecanoic (MHA) et 0.9 M du thiol 11-mercapto-1-unadecanol (MuOH) dans de l'éthanol [Sott 2003] pendant une nuit entière. La biomolécule d'accrochage visée est de la fibronectine. Cette protéine de la matrice extracellulaire est bien connue pour ces propriétés d'adhésion avec la membrane cellulaire, grâce à des récepteurs spécifiques situés sur la membrane. L'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ reconnaît une séquence spécifique de trois acides aminés de la fibronectine, le domaine RGD (arginine-glycine-acide aspartique). Son domaine intracelluaire est relié à différentes protéines, qui forment un réseau jusqu'au cytosquelette d'actine. Le rayon de giration hydrodynamique de la fibronectine est de 8.9 nm [Sjöberg 1987]. La fibronectine commerciale n'étant pas fluorescente, elle est mélangée en volume 1 :1 avec du fibrinogène fluorescent rouge ($\lambda_{exc} = 650$ nm, $\lambda_{em} = 668$ nm) qui est un fragment de fibronectine rendu fluorescent. Ce mélange n'altère pas les propriétés biologiques de la fibronectine.

3.1.2.1 Adsorption de biomolécules sur les particules colloïdales

L'adsorption de biomolécule sur des surfaces est principalement régie par l'énergie surfacique de la particule colloïdale. Cette énergie dépend de la nature du matériau, de son activation de surface et de la solution dans laquelle la particule est suspendue. Ainsi en fonction des caractéristiques de cette dernière (salinité, pH, viscosité...) l'adsorption de biomolécule peut être atténuée ou favorisée. De façon à quantifier ces différences, nous avons choisi d'étudier l'adsorption de fibronectine sur les particules ciblées dans des solutions tampons de culture cellulaire : PBS (Phosphate Buffer Solution 1X), MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid 1X) et DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium).
Le processus d'adsorption se divise en trois étapes :

1. 3 centrifugations et resuspensions de particules dans la solution tampon visée.
2. Mélange à température ambiante (environ 25°C) des particules et des protéines pendant 1 heure.
3. Lavage de la solution par 3 centrifugations pour supprimer les protéines restées en solutions et resuspensions dans la solution tampon.

Tous les échantillons réalisés présentent des concentrations en particules identiques fixées à $7.10^7 part/mL$. La quantité de protéines à été calculée de façon à ce que la totalité des surfaces cumulées des particules colloïdale soit recouverte de protéines étant donné le rayon de giration hydrodynamique de la protéine. La concentration initiale de protéines étant de 20 $\mu g/mL$, le volume de protéines à mélanger est alors ajusté.
Les 3 étapes du processus d'adsorption effectuées, la quantité de protéines adsorbée en surface est quantifiée par spectroscopie en solution. La solution est ainsi placée entre une diode illuminant à 650 nm ±10 nm qui permet d'excité la fluorescence rouge des protéines et la lumière diffusée est récoltée à travers une fibre par un spectromètre USB comme le montre la figure 3.6a. Les spectres ainsi obtenus sont tous normalisés avec le spectre de la diode comme le montre la figure 3.6b. Les pics d'intensité à 668 nm sont alors extraits des spectres pour toutes les particules dans les différents tampons et sont comparés sur la figure 3.6c.

Il apparait alors 3 comportements d'adsorption :

- **La fonctionnalisation de surface favorise l'adsorption de protéines.** C'est le cas pour les particules de PS-COOH ou de silice nues. Les intensités de fluorescences mesurées montrent une forte ($> 20\%$ de l'excitation) présence de protéines sur ces particules pour l'ensemble des solutions tampon étudiées.
- **La fonctionnalisation de surface limite l'adsorption de protéines.** Dans le cas des particules de polystyrène et de $SiO_2 - COOH$, la quantité de fluorescence mesurée est faible ($< 10\%$ de l'excitation) et montre la présence de protéines en moindre quantité sur les particules par rapport au cas précédent.
- **La fonctionnalisation de surface ne permet pas l'adsorption de protéines.** Les particules d'Au nues ou thiolées présentent une adsorption faible ($< 10\%$ de l'excitation) dans toutes les solutions tampon étudiées.

Pour ces trois types de configurations et au vue des valeurs des intensités de fluorescence des protéines, l'adsorption de protéines demeure moins importante dans du MES.

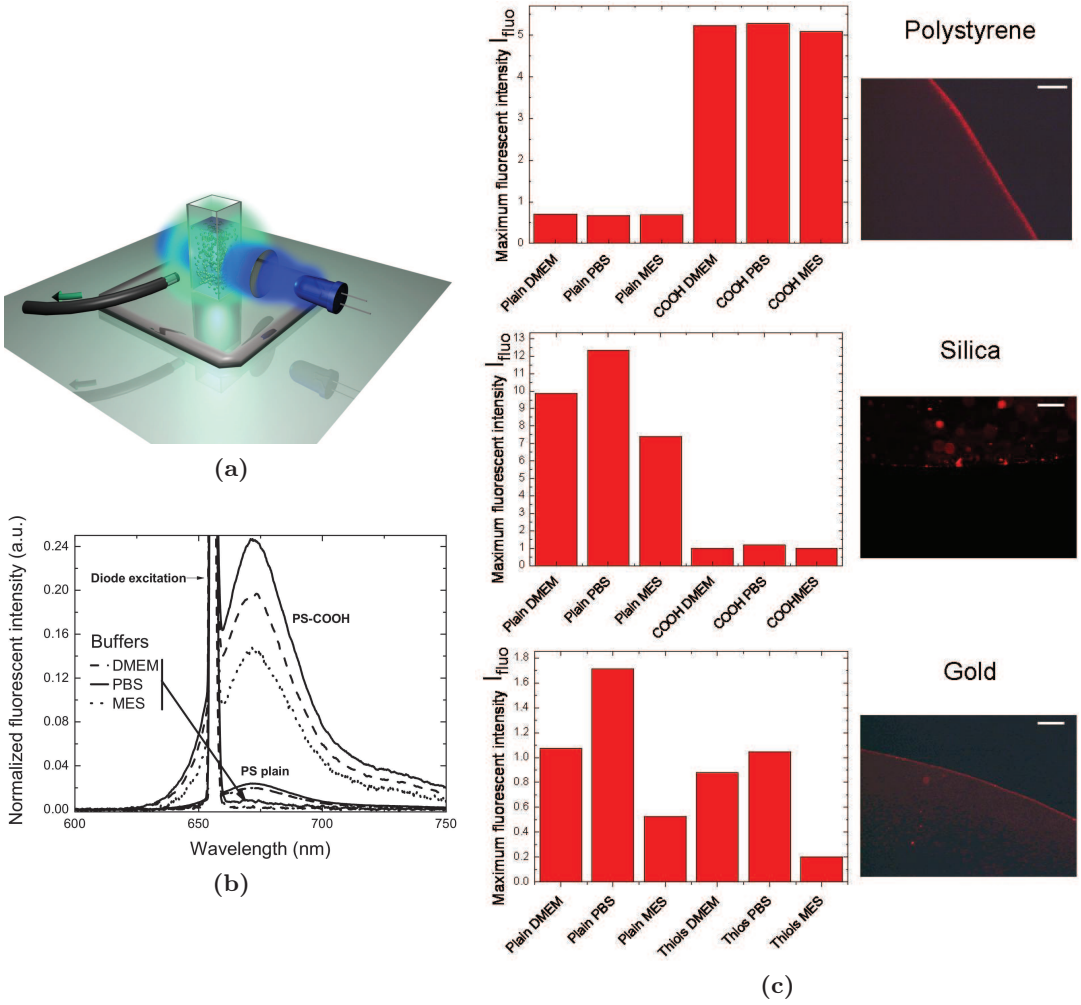


Figure 3.6 – (a) : Principe de la spectroscopie en solution. La fluorescence des protéines est excitée par une diode laser et la lumière diffusée est récoltée à travers une fibre vers un spectromètre. (b) : Exemple de spectres émis par le fibrinogène adsorbé sur la surface de colloïdes de PS nus ou fonctionnalisés. L'auto-fluorescence des solutions tampons est aussi mesurée. (c) : Intensité maximale de fluorescence à $\lambda = 688$ nm des protéines adsorbées sur des particules colloïdales dans différentes solutions tampons. [Honegger 2011f]

Suite à ces résultats préliminaires sur l'adsorption de protéines sur les particules, la solution tampon MES, qui limite l'adsorption, sera utilisée pour favoriser uniquement le greffage covalent de protéine.

3.1.2.2 Liaisons covalentes de biomolécules sur des particules colloïdales

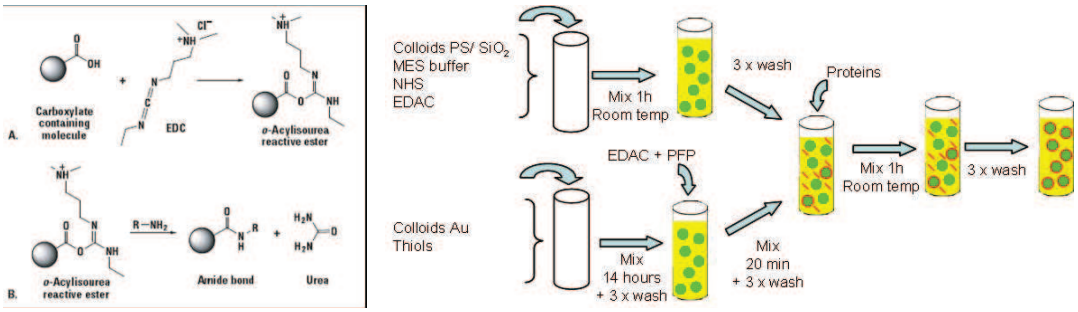
Le greffage covalent est moins conditionné par le choix de la solution tampon puisque la réaction est sélective par rapport à la molécule liante. Nous choisissons néanmoins de conduire les réactions dans la solution tampon qui limite l'adsorption, soit le MES. Le choix de la molécule liante se base sur la chimie de surface présentée sur les particules colloïdales.

Dans le cas d'une chimie de surface carboxylate sur des particules diélectriques (PS ou SiO_2), l'utilisation d'un carbodiimide est préconisée [Staros 1986]. Le 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide, couramment dénommé EDAC, est réactif aux fonctions

carboxylate d'un coté et aux fonctions amines présentes sur les protéines. La liaison finale particule-protéine reposera sur un pont hydrazone. L'EDAC est une molécule homobifonctionnelle, c'est à dire qu'il est possible qu'elle puisse coupler 2 protéines ensemble ou 2 particules ensemble. Pour éviter ce cas, une procédure en 2 étapes est réalisée qui consiste à préactiver la partie "protéine" de l'EDAC grâce à du sulfo-N-hydroxysuccinimide (NHS). En présence de NHS, l'EDAC réagit avec la fonction carboxylate présente sur la surface des colloïdes pour former un réactif intermédiaire instable ester o-acyl, qui une fois couplé avec du NHS forme un intermédiaire semi-stable NHS-ester. Ce dernier est toujours actif même après 3 lavages de telle sorte que les molécules non liées aux colloïdes peuvent être supprimées de la solution. En présence de protéines, ces intermédiaires vont réagir avec les groupements aminés présents sur les protéines, formant ainsi des ponts amine entre les protéines et les particules. La figure 3.7a montre une illustration de cette réaction.

Le même principe est appliqué aux colloïdes d'Au thiolés. Un procédé en 2 étapes basé sur l'EDAC peut aussi être appliqué en remplaçant le NHS par du Pentafluor phenol (PFP) [Sott 2003]. Les groupements carboxylate du MHA sont convertis en groupements réactifs pentafluorphenyl esters après réaction avec du PFP en présence d'EDAC. Ces esters réagissent avec le groupement amine des protéines.
Les deux procédés sont illustrés sur la figure 3.7b.

L'objectif du greffage covalent contrôlé est de *lier un groupement carboxylate présent sur la*



(a) **(b)**

Figure 3.7 – (a) : Illustration de la réaction chimique de couplage covalent entre une fonction carboxylate et une fonction amine par activation EDAC. Adapté du manuel du distributeur (Thermo Fisher). (b) : Procédés de couplage covalent de fribrinogène et de fibronectine développés sur des particules présentant des fonctions carboxylates en surface. [Honegger 2011f]

particule à une et une seul protéine. Pour réaliser cet objectif, le choix de la concentration en EDAC et en protéines (fibronectine et fibrinogène) est conditionné par la quantité de groupements carboxylates présents en surface de la particule. Cette quantité est définit par le *Parking Area*. Dans le cas des particules diélectriques, cette quantité est donnée par le distributeur (50 molécules/A^2). Pour les particules d'Au, le *Parking Area* est calculé à partir de la concentration du thiol employé (MHA) lors de leur adsorption préalable sur les particules d'Au nues (PA=27 molécules/A^2).
La même quantité de colloïdes est diluée dans la solution tampon MES avec de l'EDAC, du NHS ou du PFP. En supposant que tous les groupements carboxylate présents sur les particules seront liés avec une seule molécule d'EDAC et en tenant compte du *Parking Area*, on peut

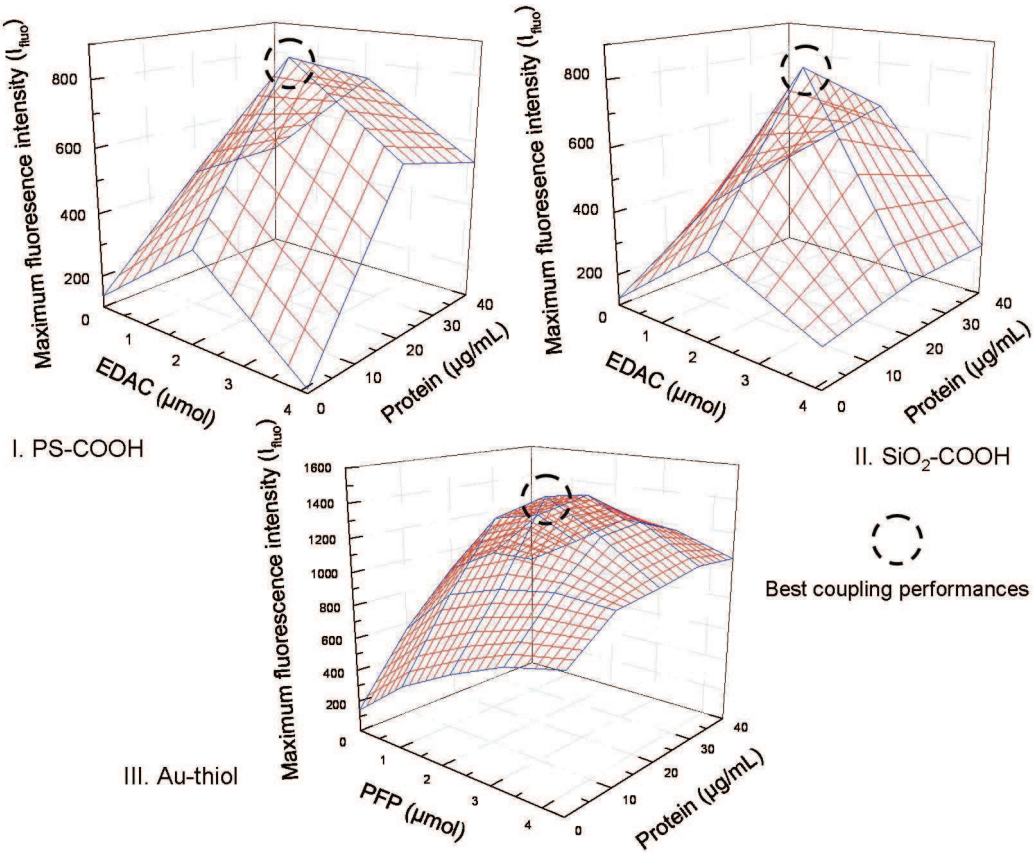


Figure 3.8 – Intensités maximales de fluorescence à $\lambda = 688$ nm pour un plan d'expérience de couplage covalent dans les cas suivants I : Particules de polystyrène fonctionnalisées COOH, II : Particules de $SiO_2 - COOH$ fonctionnalisées COOH et III : Particules de Au fonctionnalisées avec des thiols. [Honegger 2011f]

déterminer une concentration optimum d'EDAC (2.05 μmol) ainsi que celle de NHS (10 μmol) associée à cette hypothèse. Ces concentrations sont dénommées concentrations de base. [1] Nous avons donc réalisé un plan d'expérience faisant varier la quantité d'EDAC ainsi que celle de protéines autour des concentrations de base pour valider cette hypothèse. Une fois les réactions faites, la quantité de protéines greffée est évaluée par spectroscopie optique en solution dans du tampon MES. La figure 3.8 présente les intensités maximales de fluorescence des protéines normalisées par l'excitation de la diode laser pour les 3 types de particules.
Il apparait alors des courbes de type cloche où les meilleures performances de greffage sont obtenues lorsque les intensités de fluorescences sont maximales (indiquées en pointillées sur les graphiques). Ces meilleures performances correspondent aux quantités d'EDAC et de protéines de base précédemment définies. Lorsque la quantité d'EDAC est fixe, la concentration surfacique de protéine augmente avec la concentration initiale de protéines. A l'inverse, lorsque la quantité de protéine est fixe, une augmentation de la quantité d'EDAC présente tend à diminuer la concentration surfacique de protéines. Ces observations montrent que présent en quantité

1. Nombre de groupement COOH par particule : $N_{1COOH} = 4\pi R^2 PA$
Nombre total de groupement COOH à greffer : $N_{2COOH} = N_{1COOH} N_{Particules}$
Quantité de groupement de COOH équivalent : $N_{COOH} = N_{2COOH}/N_A$
Volume d'EDAC à mélanger avec une solution mère concentrée à $M_{EDAC} mol/mL$: $V_{EDAC} = \frac{N_{COOH}}{M_{EDAC}}$.

surabondante, l'EDAC tend à lier les protéines ensemble, malgré la procédure en 2 étapes. En revanche, si la quantité d'EDAC est insuffisante, tous les groupements carboxylate ne seront pas activés et les protéines non greffées.

L'hypothèse d'un couplage stoechiométrique carboxylate-EDAC-protéine est alors confirmée par l'expérience. Les valeurs maximales des intensités de fluorescence émises par les protéines correspondent en effet aux concentrations d'EDAC et de protéines de bases calculées à selon cette hypothèse, dans la gamme des concentrations étudiées. Les quantités optimales de greffage sont résumées dans le tableau 3.1.

Molécule	$PS-COOH$	SiO_2-COOH	$Au-thiols$
EDAC	2.05 μmol	2.05 μmol	1.02 μmol
NHS	10 μmol	10 μmol	X
PFP	X	X	2.2 μmol
Protéines	20 $\mu g/mL$	20 $\mu g/mL$	20 $\mu g/mL$

Table 3.1 – Valeurs des concentrations optimales de couplage covalent de protéines sur les particules de polystyrène, silice et Au fonctionnalisées.

3.1.2.3 Liaisons covalentes sélectives de biomolécules sur des particules Janus

Les procédés de greffage covalents précédemment démontrés peuvent être adaptés pour créer des liaisons covalentes de manière sélective sur une seule face des particules Janus. Ainsi, en fonction du côté sur lequel les protéines seront fixées, il est nécessaire d'utiliser des particules différentes lors de la fabrication des particules Janus.
Pour greffer des protéines sur la partie Au, il faut utiliser de particules nues puis activer la partie Au avec des thiols. Ainsi, comme montré au paragraphe 3.1.2.1, les protéines ne seront que très peu adsorbées sur les partie nue de la particule Janus alors que greffée de manière covalente sur la partie Au-thiolée.
Pour greffer des protéines sur la partie diélectrique, il est nécessaire d'utiliser des particules activées carboxylate lors de la fabrication de ces particules Janus. L'utilisation de la solution tampon de MES permet de limiter l'adsorption de protéines sur la partie Au alors que les procédés en 2 étapes permettent alors de greffer les protéines sur la partie carboxylate.
Les particules Janus resuspendues dans de l'eau DI sont alors centrifugées puis resuspendues dans du tampon MES pour réaliser les réactions.

La figure 3.9 présente les particules Janus nues ou carboxylate ayant subi les deux procédés de fonctionnalisation. Les observations de ces particules Janus montrent la capacité à greffer de manière sélective des protéines sur ces particules. Les propriétés diélectrophorétiques de ces colloïdes dissymétriques seront étudiées au chapitre suivant.

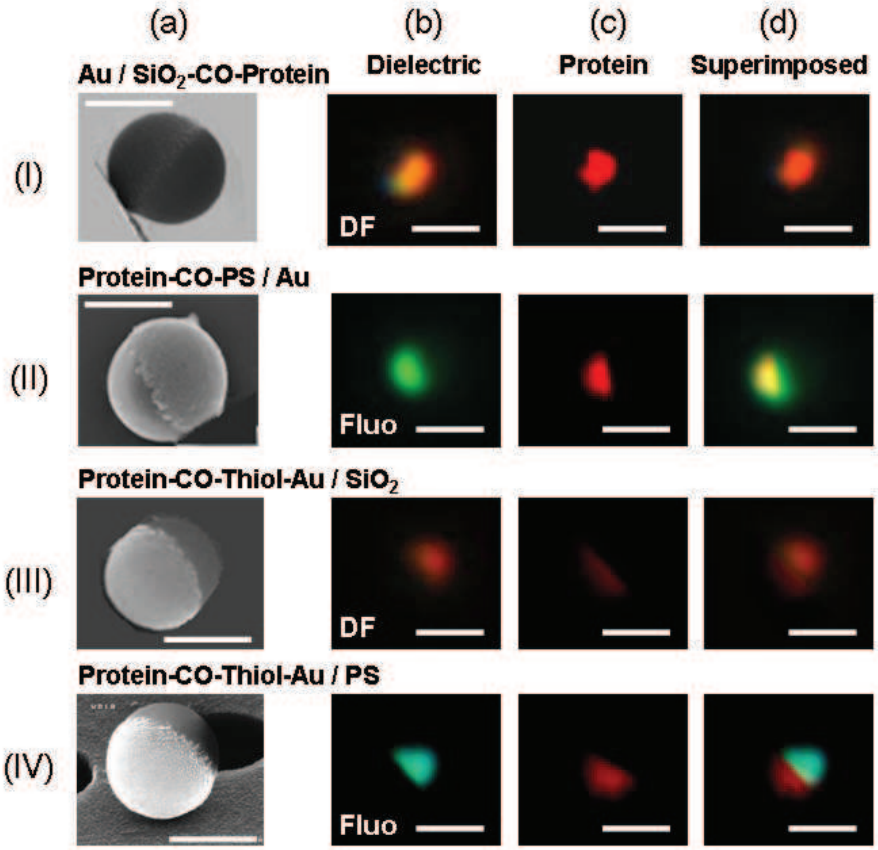


Figure 3.9 – Images des particules Janus fonctionnalisées sélectivement sur une face avec de la fibronectine : (a) réalisée au microscope électronique à balayage de particules Janus orientées - (b,c) Microscopie de fluorescence ou champ sombre (Objectif X100) -(d) Superposition des images champ sombre/fluorescence. Les particules Janus de SiO_2-COOH (I), PS-COOH (II) ont permis un greffage covalent sur la partie diélectrique alors que les particules Janus nue SiO_2 (III) et nue PS (IV) ont permis un greffage covalent sur la partie Au. La barre d'échelle représente 1 μm. [Honegger 2011f]

3.2 Conclusion

Ce chapitre a permis de montrer qu'en associant la synthèse chimique de particules colloïdales, les procédés de la microélectronique ainsi qu'une chimie adaptée de fonctionnalisation, il devient possible de construire une ingénierie des particules colloïdales afin de fabriquer des particules multifonctionnelles.
Nous avons tout d'abord détaillé les procédés de fabrication en masse de particules Janus. Deux méthodes (évaporation et centrifugation) ont été explorées pour fabriquer des monocouches de particules fluorescentes. La méthode par évaporation s'est avérée être la plus efficace pour obtenir des densités de particules jusqu'à 3.10^3 particules par mm^2, soit au total 2.10^7 particules Janus par millilitre une fois le processus complet de fabrication effectué.
Les propriétés optiques des particules Janus ainsi fabriquées ont montrés qu'il est possible d'observer leur rotation selon leur axe radial en mesurant la quantité de fluorescence émise par la partie non couverte d'Au.
Une étude a ensuite été réalisée sur la fonctionnalisation de surface de particules selon deux méthodes : adsorption et liaison covalente de fibronectine. La première stratégie par adsorption montre que les particules nues ou chargées par des groupements carboxylate peuvent adsorber sur leur surface des protéines dans des proportions qui dépendent de la solution tampon utilisée. Il a donc été choisi de réaliser les greffages covalents dans du tampon MES pour limiter l'adsorption non-désirée de protéines. La deuxième stratégie consiste à utiliser une molécule de liaison, l'EDAC, entre les groupements carboxylate présents à la surface des particules et les protéines. Un plan d'expérience a été réalisé pour déterminer les meilleures quantités d'EDAC et de protéines à utiliser pour réaliser le greffage covalent de fibronectine sur des particules de polystyrène, de silice et d'Au.
Enfin, nous avons utilisé ces conditions pour greffer de la fibronectine sur une face seulement des particules Janus. Il est donc possible de fabriquer des particules Janus PS-Au ou SiO_2-Au présentant des protéines sur leur face Au ou leur face diélectrique uniquement.
Les particules colloïdales multifonctionnelles fabriquées dans ce chapitre présentent les propriétés suivantes :

- Dissymétrisation de la forme et des matériaux,
- Contrôle optique de leur rotation sur elle-même,
- Greffage sélectif de protéines impliquées dans les processus d'adhésion cellulaire d'un coté ou de l'autre d'une particule par adsorption ou liaisons covalentes.

Nous avons également exploré deux autres stratégies de réalisation de colloïdes multifonctionnels basées sur la polymérisation directe de résines photosensibles fonctionnelles : en 2D grâce à la lithographie par vidéo-projecteur et en 3D grâce à la lithographie 2 photons. Ces travaux préliminaires ont pu montrer la faisabilité de construire de nouveaux types de particules colloïdales. L'étude de ces dernières sortent de la problématique principale de cette thèse et le détail des réalisations obtenues avec ces 2 méthodes sont présentés en annexe.

Chapitre 4

Propriétés diélectrophorétiques de particules colloïdales

Sommaire

4.1 Introduction au Facteur de Clausius-Mossotti 79
4.2 Méthode de détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti 82
4.3 Détermination du Facteur de Clausius-Mossotti de particules diélectriques et métalliques 85
4.3.1 Détermination des Facteurs de Clausius-Mossotti 85
4.3.2 Détermination des conductances surfaciques 86
4.3.3 Comparaison de la méthode avec celles de la littérature 87
4.4 Détermination du Facteur de Clausius-Mossotti de particules biofonctionnalisés 88
4.4.1 Particules présentant des charges surfaciques 88
4.4.2 Particules présentant des protéines en surface 89
4.4.3 Particules Janus nues ou présentant des protéines en surface 95
4.5 Conclusion 98

Ce chapitre présente une méthode originale de mesure directe du Facteur de Clausius-Mossotti de différentes particules colloïdales dans de l'eau désionisée.
Suite à un état de l'art des méthodes de détermination du Facteur de Clausius-Mossotti, nous présenterons une nouvelle méthode dont le principe est basé sur l'application d'une séquence définie de champs électriques, couplée à la mesure des vitesses des particules dans une solution colloïdale. Elle sera ensuite validée sur des particules de différents matériaux, de différentes tailles, de différentes propriétés surfaciques ainsi qu'aux particules Janus.
Enfin, une modélisation adéquate sera proposée pour extraire les paramètres intrinsèques des particules étudiées que sont les conductances surfaciques et les épaisseurs des couches de fonctionnalisation.

4.1 Introduction au Facteur de Clausius-Mossotti

La force diélectrophorétique dépend spatialement de $\nabla|E^2|$ et fréquentiellement du Facteur de Clausius-Mossotti (équation [Eq. 4.1] et [Eq. 4.2]). Ce facteur traduit la différence de *polarisabilité* entre la particule et son milieu de suspension à une fréquence définie du champ électrique non-uniforme appliqué. Comme le montre l'équation [Eq. 4.2], le Facteur de Clausius-Mossotti est calculé à partir des permittivités et conductivités du matériau massif

des particules et du milieu de suspension. La connaissance des valeurs (positives ou négatives) du Facteur de Clausius-Mossotti permet de déterminer le sens et la magnitude de la force diélectrophorétique qui s'exerce sur une particule.

$$< F_{DEP} >= \pi \varepsilon_m R^3 Re(\omega) \nabla |E|^2 \text{ où } |E|^2 = E \cdot E^* \quad \text{[Eq. 4.1]}$$

$$Re(\omega) = \frac{\tilde{\varepsilon}_p - \tilde{\varepsilon}_m}{\tilde{\varepsilon}_p + 2\tilde{\varepsilon}_m} \text{ où } \tilde{\varepsilon}_{m/p} = \varepsilon_{m/p} - i\frac{\sigma_{m/p}}{\omega} \quad \text{[Eq. 4.2]}$$

La mesure directe de la partie réelle du Facteur de Clausius-Mossotti est expérimentalement difficile à obtenir. Toutefois, une donnée importante demeure la fréquence de coupure f_0 à laquelle $Re(\omega) = 0$ et donc $F_{DEP} = 0$. Il y a alors une inversion du signe du Facteur de Clausius-Mossotti et la force diélectrophorétique passe, par exemple, de positive (attraction) à négative (répulsion). Expérimentalement, à la fréquence de coupure, les particules ne sont ni attirées, ni repoussées vers les électrodes. Par nature, les particules colloïdales ont un mouvement Brownien et la détermination précise de ces fréquences de coupure est difficile à obtenir. Le tableau 4.1 donne quelques exemples de fréquences de coupure pour différentes solutions colloïdales trouvées dans la littérature.

	polystyrène	Latex	Silice
$f_{Re(FCM)=0}$ (MHz)	1.1 ± 0.1	0.2 ± 0.1	3.8 ± 0.4
Réference	[Green 1999]	[Wei 2009]	[Hughes 2002]

Table 4.1 – Fréquences de coupure de solutions colloïdales de 1 μm de diamètre suspendues dans de l'eau désionisées.

De plus, la littérature montre que pour des particules de diamètres inférieurs à 10 μm, les fréquences de coupure ne sont pas constantes sur l'ensemble des tailles des particules. En effet, il a été prouvé qu'à ces échelles, la contribution de leur conductivité surfacique $\sigma_{surface}$ domine celle du matériau massif [Hughes 1999, Green 1999]. La conductivité de la particule dans cette gamme de taille dépend donc de sa conductance surfacique K_s. Ainsi, la conductivité globale de la particule est conditionnée par sa conductance surfacique et son rayon, comme le montre l'équation [Eq. 4.3].

$$\sigma_p = \sigma_{surface} \text{ où } \sigma_{surface} = 2\frac{K_s}{R} \quad \text{[Eq. 4.3]}$$

La figure 4.1 présente l'ensemble des paramètres à connaitre pour déterminer le Facteur de Clausius-Mossotti d'une particule de diamètre inférieur à 10 μm dans son milieu de suspension.

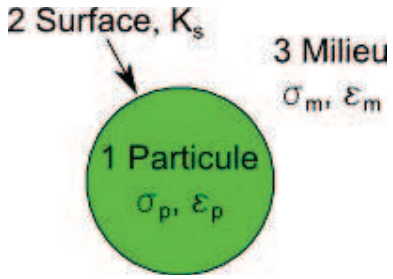


Figure 4.1 – Schéma des éléments constitutifs d'une particule colloïdale modélisée pour déterminer son Facteur de Clausius-Mossotti dans un milieu de suspension.

Pour mesurer cette conductance surfacique, deux méthodes constituent l'état de l'art :

- **Méthode des fréquences de coupure**. Proposées par Green [Green 1999], la mesure systématique des fréquences de coupure de particules colloïdales est faite dans des milieux dont la conductivité ou les tailles des particules varient. L'expression [Eq. 4.4] des fréquences de coupure en fonction de ces paramètres est utilisée pour retrouver les valeurs expérimentales des capacités surfaciques.

$$f_{Re(CMF)=0} = \frac{1}{2\pi}\sqrt{-\frac{(2\frac{K_s}{R} - \sigma_m)(2\frac{K_s}{R} + 2\sigma_m)}{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)}} \qquad \text{[Eq. 4.4]}$$

  Cette méthode a permis de mettre en évidence l'influence de la taille des particules sur leurs fréquences de coupure et ainsi de mesurer les premières conductances surfaciques de particules colloïdales. Un des principaux inconvénients de cette méthode est la mesure précise des fréquences de coupure étant donné qu'elles sont par définition des fréquences auxquelles le mouvement s'arrête. Elles sont donc difficiles à quantifier précisément.
- **Méthode d'électro-rotation**. Proposée par Wei [Wei 2009] dix ans après Green, cette méthode se base sur le calcul de la partie imaginaire du Facteur de Clausius-Mossotti qui intervient lorsque le champ alternatif est déphasé entre plusieurs électrodes consécutives. Couplé avec le piégeage optique d'une particule unique et l'utilisation de 2 lasers focalisés, la mesure de la vitesse de rotation de la particule permet de quantifier précisément le Facteur de Clausius-Mossotti. Wei a ainsi mesuré de manière très fine les fréquences de coupure de particules de polystyrène de 10 μm dans de l'eau désionisée sur lesquelles étaient greffées des particules d'Au de manière anisotropes, affinant donc les mesures faites par Green. L'inconvénient majeur de cette technique, selon Wei, étant les difficultés à mesurer les vitesses de rotation de particules de tailles inférieures à quelques micromètres.

La détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti ne dépend ni de la géométrie microfluidique ni de celle des électrodes utilisées. C'est un paramètre intrinsèque au système colloïdal : particule - milieu de suspension. Il permet d'extraire la conductance surfacique des particules. L'établissement des valeurs du Facteur de Clausius-Mossotti et de la conductance surfacique de particules colloïdales permet d'envisager leur manipulation par diélectrophorèse.

4.2 Méthode de détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti

Une particule colloïdale en solution est principalement soumise à la gravité et à la poussée d'Archimède qui se contrebalancent dans le milieu. Pour des particules de diamètres supérieurs à 5 nm [Ramos 1999], la diélectrophorèse peut surpasser les autres forces électro-hydrodynamiques (chapitre 1) comme l'électro-osmose ou l'effet électrothermique. La force de poussée hydrodynamique, F_{drag}, exercée par le liquide sur une particule sphérique animée d'une vitesses U_{part} est donnée par l'équation [Eq. 4.5]. Lors de l'application d'un champ électrique alternatif non-uniforme induisant la diélectrophorèse, le mouvement de la particule induit un mouvement de liquide autour d'elle-même, d'où l'équation 4.6. Jusqu'à ce que la particule soit hors de la portée de la diélectrophorèse, c'est à dire où $\nabla|E|^2$ est nul, le mouvement de la particule est purement diélectrophorétique. Pendant cette période de transition, l'observation de la vitesse instantanée de la particule permet d'établir une corrélation direct entre celle-ci et le Facteur de Clausius-Mossotti comme présenté dans l'équation 4.7.

$$F_{drag} = 6\pi R\eta U_{part} \quad \text{[Eq. 4.5]}$$

$$< F_{DEP} >= F_{drag} \quad \text{[Eq. 4.6]}$$

$$Re(\omega) = \alpha U_{part} \text{ où } \alpha = \frac{3\eta}{R^2\varepsilon_m\nabla|E|^2} \quad \text{[Eq. 4.7]}$$

Ce principe est appliqué dans un système coplanaire d'électrodes (figure 4.2.(a)). Pour accéder à un régime purement diélectrophorétique, c'est à dire au plus proche du bord de l'électrode activée, les particules sont pré-concentrées au centre des électrodes par électro-osmose AC (figure 4.2.c1 ACEO). L'électro-osmose est obtenue dans de l'eau désionisée pour des fréquence du champ E de quelques kilo-Hertz. Le régime purement diélectrophorétique est ensuite établi en modifiant la fréquence du champ électrique. Les particules préalablement concentrées sur l'électrode se déplacent alors dans le plan horizontal d'observation par diélectrophorèse (figure 4.2.c2 pDEP ou nDEP). La composante U_X de la vitesse des particules est mesurée pendant cette phase de déplacement. $Re(FCM)$ est alors déterminé en multipliant cette vitesse par le facteur α (équation [Eq. 4.7]).

Les particules colloïdales sont placées dans une puce microfluidique embarquant des électrodes coplanaires (Annexe A pour la fabrication) comme indiqué sur la figure 4.2.(b). Le potentiel électrique est appliqué entre des paires d'électrodes de 10 μm de large de façon à ce que la distance inter-électrodes soit 10 fois supérieure à la taille des particules à observer.

La figure 4.2.(c) présente les séquences d'application des potentiels électriques pour déterminer les vitesses de particules soumises aux régimes de pDEP ou nDEP. Ces 2 régimes fréquentiels sont préalablement obtenus en appliquant un balayage en fréquence de 1 kHz à 10 MHz. Ainsi la fréquences de coupure est grossièrement observée.

Par exemple, pour des particules de polystyrène, la fréquence de coupure est observée autour de 1 MHz avec un régime pDEP (attraction vers le bords des électrodes) pour des fréquences inférieures et un régime nDEP (répulsion depuis le bords des électrodes) pour des fréquences supérieures.

Les séquences suivantes sont ensuite appliquées en fonction du régime que l'on désire sonder :

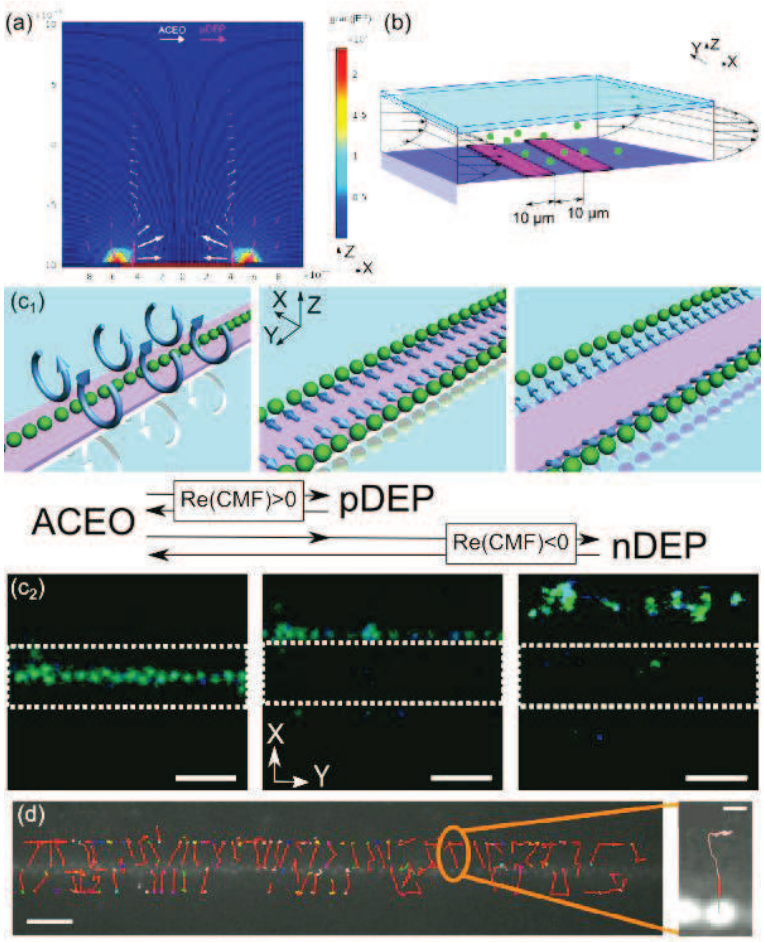


Figure 4.2 – **(a)** : Modélisation du champs électrique généré par une potentiel AC de 2V. $\nabla|E|^2(V^2m^{-3})$ est quantifié en couleur d'arrière plan. Les équipotentielles sont tracées en noir. Les forces induites par électro-osmose et diélectrophorèse sont respectivement représentées par les flèches blanche et violette.**(b)** : Représentation schématique du dispositif électro-microfluidique. **(c)** Représentation schématique et images optiques des particules fluorescente de polystyrène de 1 μm PS assujetties aux différents potentiels AC. Les particules sont tout d'abord centrées sur les électrodes par électro-osmose (f=1 kHz, V_{p-p}=2 V). Ensuite les particules sont positionnées sur les bords des électrodes par pDEP (f=100 kHz, V_{p-p}=2 V). Finalement, les particules sont repoussées des bords des électrodes par nDEP (f=1.5 MHz, V_{p-p}=2V). La barre d'échelle indique 10 μm. **(d)** : Détection et suivi des particules de polystyrène 1 μm. Tracé général des trajectoires des particules issu d'un film enregistré au dessus des électrodes. L'image insérée montre la trajectoire d'une seule particule, la barre d'échelle représentant 1 μm. [Honegger 2011a]

- **Régime pDEP**. Les particules sont tout d'abord concentrées au centre des électrodes par électro-osmose, typiquement à $f = 1kHz$. La fréquence du régime pDEP est ensuite appliquée. Les vitesses de déplacement latérales des particules sont alors extraites durant le temps de transition du centre aux bords des électrodes. Cette séquence est alors reproduite dans toute la gamme de diélectrophorèse positive identifiée auparavant.
  Dans notre exemple, les particules de polystyrène sont concentrées à $f = 1kHz$ puis chaque fréquence de pDEP choisie est appliquée jusqu'à 1 MHz (intervalle de mesure de $\Delta f = 50$ kHz).
- **Régime nDEP**. De façon à ce que les particules soient soumises au gradient du champ le plus élevé, les particules doivent être localisées au bord des électrodes pour quantifier

la nDEP. Cette localisation spatiale des particules est réalisée par l'application d'une fréquence de pDEP. Ainsi deux étapes sont nécessaires dans ce régime. Les particules sont tout d'abord concentrées par électro-osmose au centre des électrodes puis par pDEP sur les bords des électrodes. Ensuite, une fréquence nDEP est appliquée et les vitesses des particules sont évaluées jusqu'à ce que leurs mouvements soient à nouveau browniens. Cette séquence est alors reproduite dans toute la gamme de diélectrophorèse négative identifiée auparavant.

Dans notre exemple, les particules de polystyrène sont concentrées au centre des électrodes à $f = 1kHz$, puis aux bords des électrodes par pDEP à $f = 100kHz$. Les fréquences de nDEP supérieures à 1 MHz sont ensuite appliquées (typiquement tous les 500 kHz).

Les vitesses selon l'axe des X des particules sont déterminées grâce aux logiciels de détection et de suivi de particules présentés au chapitre 2. Les particules de diamètres inférieur à 400 nm ne pouvant être détectées de manière individuelle, ce sont les déplacements de groupe de particules qui ont été évalués. Les vitesses ainsi mesurées sont moyennées sur 50 particules au moins et sont ensuite multipliées par α dans lequel les valeurs de $\nabla|E|^2$ sont extraites des modélisations réalisées sous Comsol 4.0a.

Lorsque l'ensemble des valeurs expérimentales du Facteur de Clausius-Mossotti d'une particule colloïdale sont déterminées, il devient alors possible d'extraire la valeur de sa conductance surfacique à partir de l'expression développée de son Facteur de Clausius-Mossotti (équation [Eq. 4.8]).

$$Re(w) = \frac{(\varepsilon_p - \varepsilon_m)(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m) - \frac{(\sigma_m - \sigma_p)(\sigma_m + \frac{K_s}{R})}{(\omega/2)^2}}{(\varepsilon_p + 2\varepsilon_m)^2 + \frac{(\sigma_m + \frac{K_s}{R})^2}{(\omega/2)^2}} \qquad \text{[Eq. 4.8]}$$

Cette méthode permet de déterminer expérimentalement et directement les valeurs du Facteur de Clausius-Mossotti pour un couple particule-milieu de suspension donné sur une gamme de fréquences choisie. Elle est basée sur le positionnement précis des particules étudiées et l'application de séquences de fréquences du champ électrique alternatif. Une fois les valeurs expérimentales du Facteur de Clausius-Mossotti mesurées, il est possible de déterminer les conductances surfaciques de ces particules colloïdales. On peut donc en déduire le Facteur de Clausius-Mossotti de ces particules dans n'importe quel milieu de suspension de conductivité connue.

4.3 Détermination du Facteur de Clausius-Mossotti de particules diélectriques et métalliques

4.3.1 Détermination des Facteurs de Clausius-Mossotti

Les Facteurs de Clausius-Mossotti de particules commerciales d'Au (BB International), de Polystyrène (Duke) et de Silice (Duke) sont expérimentalement mesurés (figure 4.3) en diluant chaque type de particule dans de l'eau désionisée à une concentration de 1 % en masse. La conductivité de l'eau est mesurée avec un conductimètre ($\sigma_m = 2.10^{-4}\ S/m$).
Les particules de polystyrène et de silice expriment des comportements diélectrophorétiques positifs et négatifs respectivement à basses fréquences et à hautes fréquences (figures 4.3.(a) et (b)). On peut observer une chute des fréquences de coupure avec l'augmentation des tailles des particules. Cette chute confirme l'influence de la taille des particules sur leur capacité à être polarisées par le champ électrique alternatif.
A l'inverse, les particules d'Au étant toujours plus polarisables que le milieu, celles-ci présentent un comportement pDEP homogène (figure 4.3.(c)). Les particules métalliques ayant par nature un nuage électronique mobile, l'établissement de la polarisation du dipôle dans de telles particules est plus rapide que celui du milieu de suspension pour des fréquences inférieures à sa fréquence de claquage (typiquement 1 GHz dans de l'eau DI) [Gierhart 2007]. Ainsi, les particules métalliques seront toujours plus polarisables que le milieu de suspension et donc auront une réponse diélectrophorétique positives dans la gamme de fréquences étudiée ($f < 10$ MHz).

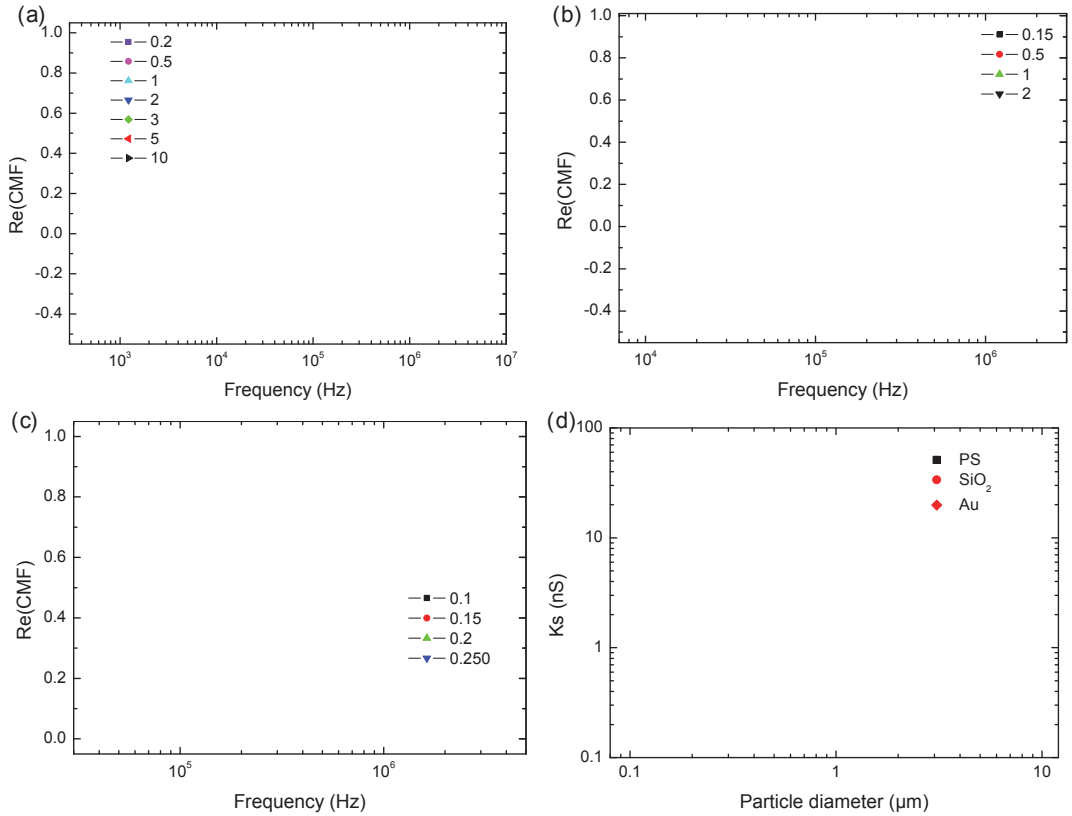


Figure 4.3 – Facteur de Clausius-Mossotti des particules : **a** : de polystyrène, **b** : de silice et **c** : d'Au, pour différentes tailles de particules. Les courbes d'ajustement obtenues sont présentées en lignes pointillées sur le graphique. **d** : conductances surfaciques moyennes de ces particules. [Honegger 2011a]

4.3.2 Détermination des conductances surfaciques

A partir de l'expression [Eq. 4.8] qui relie $Re[\omega]$ à K_s, on effectue un ajustement des valeurs théoriques aux valeurs expérimentales sur chaque courbe $Re[\omega]$ dans toute la gamme fréquentielle étudiée pour chaque type de particule (les courbes issues des ajustements sont indiquées en lignes pointillées sur la figure 4.3). Il est ainsi possible de calculer les valeurs expérimentales des K_s. Les valeurs des conductances surfaciques pour chaque matériau et chaque taille sont présentées sur la figure 4.3.(d). Le tableau 4.2 donne les valeurs moyennes de l'ensemble des capacités surfaciques ainsi obtenues pour chaque matériau.

Matériau	Polystyrene	Silica	Au
K_s (nS)	$2.56 \pm 0,09$	0.51 ± 0.10	61.21 ± 9.47

Table 4.2 – Détermination expérimentale des K_s de particules diélectriques et métalliques. [Honegger 2011a]

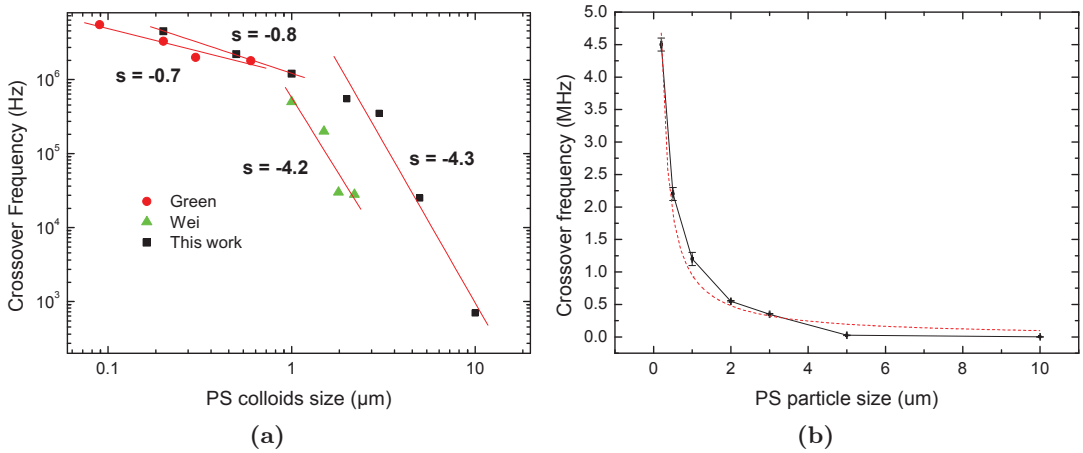
Pour les particules de polystyrène ($\varepsilon_{PS} = 2.55$), les valeurs des conductances surfaciques observées sont quasi-identiques pour toutes les tailles des particules avec une dérive pour les particules de 10 μm de diamètre. La littérature [Hughes 1999, Green 1999] montre que la conductivité du matériau redevient prédominante par rapport à la conductivité surfacique pour

les particules de diamètre supérieur à 10 μm.

Pour les particules de silice ($\varepsilon_{SiO_2} = 3.8$) et **d'Au** ($\varepsilon_{Au} = 6.9$ [Zhang 2010]), on observe une dispersion relativement importante autour des valeurs des K_s (respectivement 20% et 15%) qui émanent des particules dont les diamètres sont inférieurs à 200 nm. Ces marges d'erreur proviennent très probablement des imprécisions de mesure de vitesse pour de telles tailles de particules. La méthode de détermination du Facteur de Clausius-Mossotti trouve alors une limitation avec l'observation précise du mouvement des particules.

4.3.3 Comparaison de la méthode avec celles de la littérature

Afin de vérifier la robustesse de la méthode présentée, les valeurs des fréquences de coupure obtenues à partir des Facteurs de Clausius-Mossotti établis expérimentalement sont comparés avec celles de la littérature. Ainsi, les valeurs des fréquences de coupure obtenues par les méthodes optiques directes, par électro-rotation et par la méthode de détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti sont présentées dans la figure 4.4a. On observe que les valeurs des fréquences de coupure sont relativement proches et que la gamme d'application de notre méthode est plus large (200 nm à 10 μm) que les autres méthodes (respectivement 100 à 800 nm et 1 à 3 μm). Les valeurs des pentes marquées par un s sont indiquées et sont voisines de celles mesurées par les autres méthodes.
De même, les valeurs des K_s sont calculées par la méthode de Green. Cette méthode utilise les fréquences de coupure des particules pour obtenir les valeurs des conductances surfaciques à partir de l'expression développée (équation [Eq. 4.4]). Ainsi, les fréquences de coupure du polystyrène sont reportées sur le graphique 4.4b en fonction de la taille des particules. Un ajustement à l'équation [Eq. 4.4] selon K_s est réalisé sur toute la courbe expérimentale pour extraire la conductance surfacique K_s du matériau. La courbe d'ajustement ainsi obtenue est présentée en ligne pointillée rouge sur le graphique.
Comme présenté dans le tableau 4.3, les valeurs obtenues par les deux méthodes sont proches



(a) (b)

Figure 4.4 – (a) : Valeurs des fréquences de coupure obtenues par les méthodes optiques (Green), d'électro-rotation (Wei) et par la méthode de détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti. (b) : Valeurs des fréquences de coupure obtenues expérimentalement par la méthode présentée. La courbe d'ajustement au modèle obtenue est présentée en ligne pointillée rouge sur le graphique. [Honegger 2011a]

(< 10% d'erreur relatives) mais il apparaît des différences importantes de valeurs de marges d'erreur. La détermination de la valeur des K_s semble plus précise lorsque celle-ci se base sur un ajustement à l'ensemble des valeurs d'un Facteur de Clausius-Mossotti plutôt que sur les fréquences de coupure uniquement.

		Polystyrene	Silica	Au
K_s (nS)	Green method	2.85 ± 1.11	0.82 ± 1.30	X
	This work	$2.56 \pm 0,09$	0.51 ± 0.10	61.21 ± 9.47

Table 4.3 – Détermination expérimentale des K_s de particules diélectriques et métalliques par la méthode des fréquences de coupure de Green et par la méthode présentée ici. [Honegger 2011a].

La méthode proposée et validée expérimentalement permet de déterminer le Facteur de Clausius-Mossotti d'une particule colloïdale dans un milieu de suspension de conductivité donnée pour un large spectre de tailles de particules, allant de 200 nm à 10 μm de diamètre. La quantification expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti permet d'extraire les conductances surfaciques des particules par un ajustement au modèle proposé. Cette méthode donne des résultats quantitatifs plus précis que ceux présentés dans la littérature.

4.4 Détermination du Facteur de Clausius-Mossotti de particules bio-fonctionnalisés

4.4.1 Particules présentant des charges surfaciques

Détermination des Facteurs de Clausius-Mossotti

Nous avons appliqué la méthode de détermination du Facteur de Clausius-Mossotti à des particules fonctionnalisées en surface. Ces dernières sont des particules commerciales (Duke) de 400 nm de polystyrène dont les surfaces ont été modifiées pour présenter des fonctions aldéhyde, carboxyl, carboxylate et sulfate comme montré dans la figure 4.5a. La principale différence de fonctionnalisation entre les particules carboxyl et carboxylate vient de la quantité de groupements greffés, avec moins de groupements présents pour les particules carboxylate.

Les Facteurs de Clausius-Mossotti des particules fonctionnalisées en surface présentent les mêmes comportements que les particules de polystyrène : positif à basses fréquences et négatif à hautes fréquences. Toutefois, bien que de même matériau et de même taille, il apparaît des chutes de fréquences de coupure pour chaque chimie de surface. Ainsi, les particules fonctionnalisées par des groupements aldéhydes, nues, sulfates, carboxylates et carboxyls présentent respectivement des fréquences de coupure de 1.61, 1.45, 1.37, 1.25 et 1.05 MHz. Ces valeurs sont extraites directement des courbes expérimentales.

Détermination des capacitances surfaciques

De même que précédemment, les conductances surfaciques des particules fonctionnalisées sont extraites sur l'ensemble de chacun des Facteur de Clausius-Mossotti et les valeurs sont données dans le tableau 4.4. Les courbes issues de la modélisation sont superposées aux résultats expérimentaux sur la figure 4.5b. Les différentes fonctionnalisations induisent un déplacement des

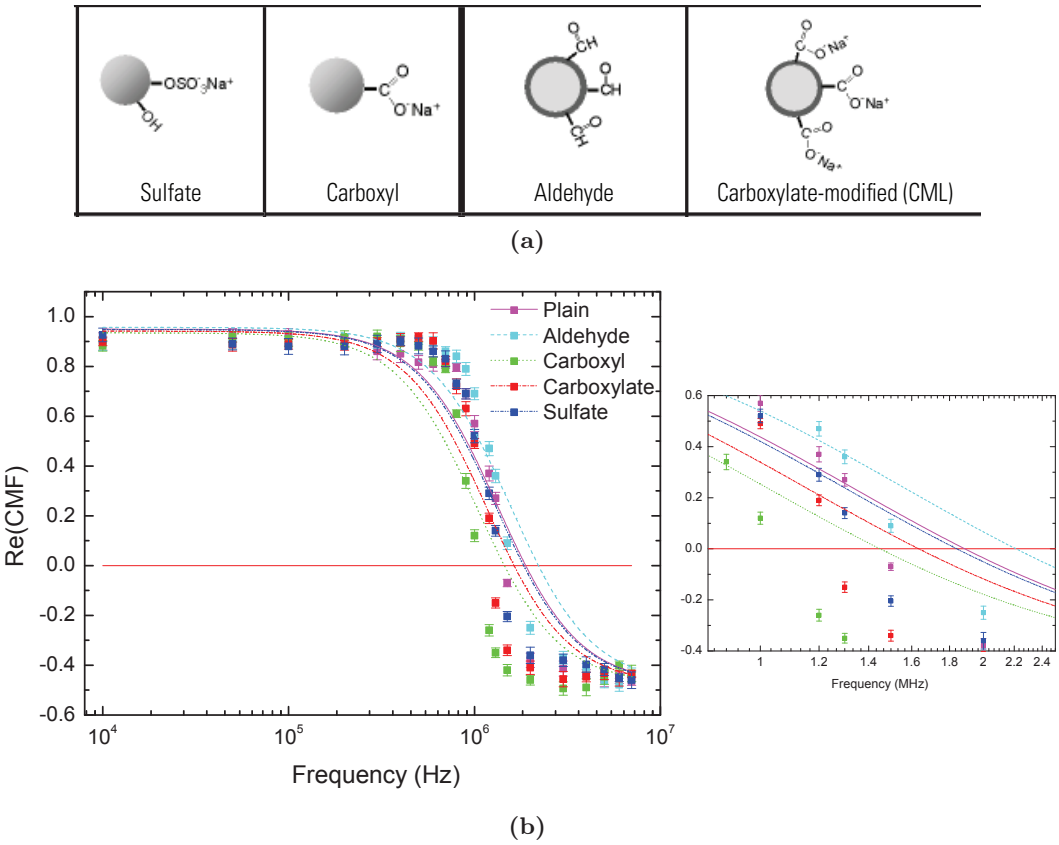


Figure 4.5 – (a) : Fonctions chimiques présentes en surface des particules fonctionnalisés. (b) : Facteur de Clausius-Mossotti de particules de polystyrène de 400 nm de diamètre présentant différentes fonctionnalités de surface. Les courbes d'ajustement obtenue sont présentées en lignes pointillées sur le graphique. [Honegger 2011c]

Functionalization	Sulfate	Carboxyl	Aldehyde	Carboxylate
K_s (nS)	2.23 ± 0.16	1.75 ± 0.18	2.69 ± 0.19	1.98 ± 0.18

Table 4.4 – Valeurs des conductances surfaciques K_s des particules fonctionnalisées. [Honegger 2011c]

fréquences de coupure jusqu'à la centaine de kilo-Hertz et des variations dans les conductances surfaciques. Nous observons expérimentalement que plus les groupements présents en surface des particules sont chargés négativement, plus les valeurs de leurs conductances surfaciques sont faibles.

4.4.2 Particules présentant des protéines en surface

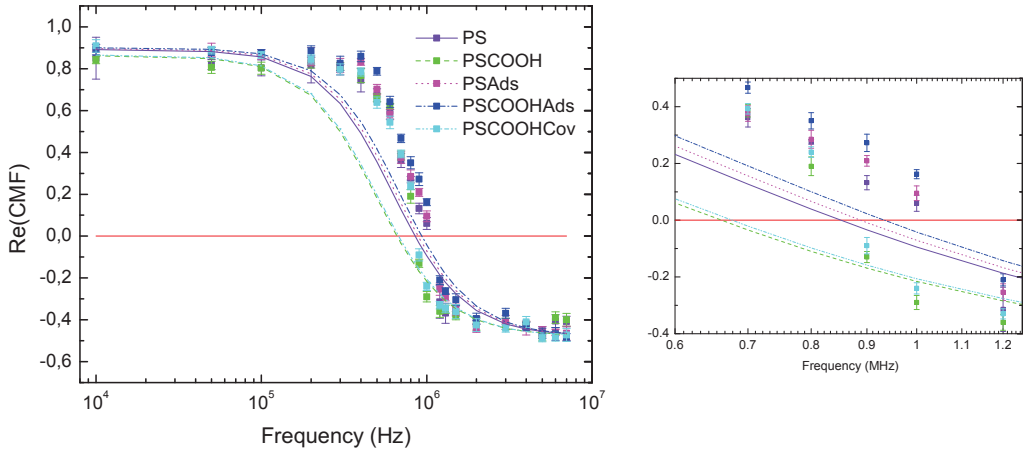
La méthode de détermination du Facteur de Clausius-Mossotti est ensuite appliquée aux particules colloïdales multifonctionnelles (chapitre 3) de : polystyrène, SiO_2, Au et Janus qui ont été greffées par adsorption ou liaisons covalentes avec de la fibronectine.

4.4.2.1 Particules diélectriques présentant des protéines en surface

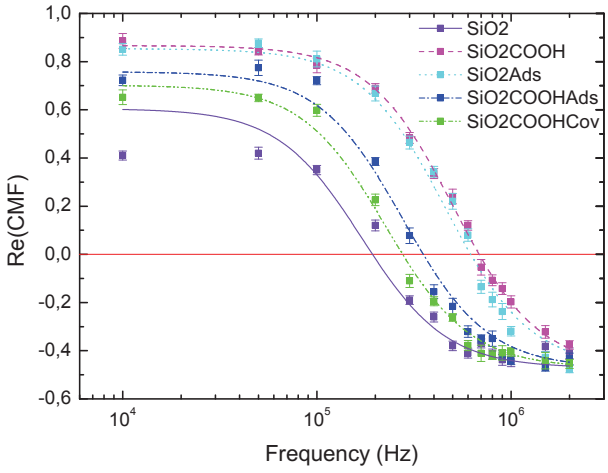
Détermination des Facteurs de Clausius-Mossotti

Les Facteur de Clausius-Mossotti des particules nues greffées avec des protéines, par adsorption ou par liaisons covalentes sont évaluées expérimentalement et sont présentés sur la figure 4.6.

Bien que toutes de même taille et de même matériau, les particules présentent des Facteur



(a)



(b)

Figure 4.6 – Facteur de Clausius-Mossotti expérimentaux pour les particules fonctionnalisées de (a) : polystyrène et (b) : de SiO_2. Les courbes d'ajustement obtenues sont présentées en lignes pointillées sur le graphique. [Honegger 2011c]

de Clausius-Mossotti ayant des fréquences de coupure différentes selon les fonctionnalisations de surface réalisées. Les fréquences de coupure sont directement extraites à partir des mesures expérimentales des Facteurs de Clausius-Mossotti.

Pour les particules de polystyrène , les particules ayant des protéines adsorbées en surface ont des fréquences de coupure supérieures (respectivement 1.05 et 1.08 MHz pour les particules PS-COOH et PS) à celle des particules nues (1.03 MHz). A l'inverse, les particules fonctionnalisées carboxylate, avec ou sans protéines, ont des fréquences de coupure inférieures

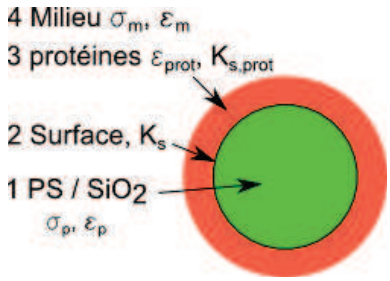


Figure 4.7 – Modèle coeur-coquille des particules bio-fonctionnalisées avec des protéines.

(respectivement 857 et 871 kHz pour les particules PS-COOH pures et PS-COOH liées de manière covalente à des protéines).

Pour les particules de silice, on observe une chute des fréquences de coupure qui suit un ordre différent : Les particules de $SiO_2 - COOH$ et SiO_2 sans protéines ont les fréquences de coupure respectivement la plus haute (667 kHz) et la plus basse (237 kHz). Les particules ayant des protéines en surface ont des fréquences de coupure qui diminuent vers les basses fréquences dans le sens : SiO_2 pures (635 kHz), $SiO_2 - COOH$ adsorbées de protéines (330 kHz) et $SiO_2 - COOH$ ayant des protéines greffées de manière covalente (262 kHz).

Détermination des capacitances surfaciques

Il n'est pas possible d'utiliser la même expression du Facteur de Clausius-Mossotti que précédemment (équation [Eq. 4.8]) pour modéliser les particules. Il est en effet indispensable de prendre en considération la couche de protéines qui écrante le champ électrique vu par la particule elle-même. Ainsi un modèle de type coeur-coquille est adopté pour décrire les particules fonctionnalisées avec des protéines, comme présenté figure 4.7 :

- le coeur étant la particule (1, rayon R_1) de polystyrène ou de silice avec une conductance surfacique (2) K_s,
- la coquille la couche de protéines (3, rayon total R_3, nombre de couches n),
- le milieu (4, eau de-ionisée)

Le Facteur de Clausius-Mossotti $Re(\omega)_{p+prot}$ d'une telle particule est donné par l'équation 4.9 [Pohl 1950]. Ce facteur intègre l'épaisseur de la couche de protéines donnée par $n.d_{prot}$ où $d_{prot} = 8$ nm [Sjöberg 1987] est le rayon de giration hydrodynamique de la fibronectine. L'interface particule-protéines donne naissance à une permittivité complexe virtuelle $\tilde{\varepsilon}_{1,3}$ (équation [Eq. 4.10]) qui est utilisée pour calculer le Facteur de Clausius-Mossotti intermédiaire de l'interface particule-protéines (équation [Eq. 4.11]).

$$Re(\omega)_{p+prot} = Re\left(\frac{\tilde{\varepsilon}_{1,3} - \tilde{\varepsilon}_m}{\tilde{\varepsilon}_{1,3} + 2\tilde{\varepsilon}_m}\right) \qquad \text{[Eq. 4.9]}$$

$$\tilde{\varepsilon}_{1,3} = \tilde{\varepsilon}_{prot}\frac{\gamma_{13}^3 + 2Re(\omega)_{1,3}}{\gamma_{13}^3 - 2Re(\omega)_{1,3}} \text{ avec } \gamma_{13} = R_1/R_3 \qquad \text{[Eq. 4.10]}$$

$$Re(\omega)_{1,3} = \frac{\tilde{\varepsilon}_p - \tilde{\varepsilon}_{prot}}{\tilde{\varepsilon}_p + 2\tilde{\varepsilon}_{prot}} \text{ avec } \tilde{\varepsilon}_{prot} = \varepsilon_{prot} + i\frac{2K_{s,prot}}{\omega R_3},\ R_3 = R_1 + n.d_{prot} \qquad \text{[Eq. 4.11]}$$

Le tableau 4.5 regroupe les paramètres utilisés pour modéliser un tel système. Les conductances surfaciques des particules (K_s) sont tirées du paragraphe précédent (nue ou carboxylate) alors

que celle de la fibronectine a quant à elle été mesurée dans la littérature par d'autres méthodes [Osaki 2006] et vaut $K_{s,prot} = 4.4$ nS.

On cherche à déterminer les permittivités relatives des protéines ε_{prot} ainsi que le nombre de

Particule	$R_1(\mu m)$	ε_1	K_s (nS)	d_{prot} (nm)	$K_{s,prot}$ (nS)
PS	0.5	2.55	2.56 (tableau 4.2)	8 [Sjöberg 1987]	4.4 [Osaki 2006]
PS-COOH	0.5	2.55	1.98 (tableau 4.4)	8 [Sjöberg 1987]	4.4 [Osaki 2006]
SiO_2	0.5	3.8	0.51 (tableau 4.2)	8 [Sjöberg 1987]	4.4 [Osaki 2006]
SiO_2-COOH	0.5	3.8	1.98 (tableau 4.4)	8 [Sjöberg 1987]	4.4 [Osaki 2006]

Table 4.5 – Paramètres utilisés pour la modélisation coeur-coquille des particules entourées de protéines. [Honegger 2011c]

couches n pour chaque type de particule par les deux techniques de greffage : adsorption ou liaison covalente.

A partir de l'expression développée du Facteur de Clausius-Mossotti de la particule avec des protéines ($Re(\omega)_{p+prot}$, équation [Eq. 4.9]) qui relie $Re(\omega)_{p+prot}$ à ε_{prot} et n, on effectue un ajustement des valeurs expérimentales aux valeurs théoriques sur chaque courbe $Re[\omega]$ dans toute la gamme fréquentielle étudiée pour chaque méthode de liaison et chaque type de particule. Le nombre de couches n extrait est systématiquement arrondi au nombre inférieure. Les résultats obtenus sont présentes dans le tableau 4.6 et les courbes issues de la modélisation sont superposées aux résultats expérimentaux sur la figure 4.6.

	Coupling method	PS	PS-COOH	SiO_2	SiO_2-COOH
n layers of proteins	Adsorption	4	29	38	7
	Covalent	X	1	X	1
ε_{prot}		1.98 ± 0.05	1.96 ± 0.04	2.01 ± 0.05	1.97 ± 0.08

Table 4.6 – Nombres de couches de protéines greffées en fonction de la méthode de greffage et permittivités relatives des protéines selon l'ajustement aux résultats expérimentaux des Facteur de Clausius-Mossotti. [Honegger 2011c]

On observe que la permittivité des protéines est quasi constante et est moyennée à $\varepsilon_{prot} = 1.98$ sur l'ensemble des particules.
De plus, le nombre de couches de protéines diminue de manière significative lorsque la méthode de liaison passe de l'adsorption à la liaison covalente qui, dans ce dernier cas, correspond bien à une mono-couche de protéines.
La méthode présentée ici ainsi que la modélisation coeur-coquille choisie permet donc de mesurer à la fois la permittivité relative de la fibronectine ainsi que le nombre de couches de protéines présentes sur une particule micrométrique.

4.4.2.2 Particules d'Au présentant des protéines en surface

Détermination des Facteurs de Clausius-Mossotti

La même méthode est appliquée aux particules d'Au bio-fonctionnalisées grâce à des thiols (chapitre 3). Les mesures expérimentales ont été conduites sur des particules thiolées, absorbées avec des protéines ou liées de manière covalente et sont présentées sur la figure 4.8. Vykoukal [Vykoukal 2003] a pu montrer que la couche de thiol, notamment par son épaisseur, modifie drastiquement la réponse globale des particules d'Au. Il mesure expérimentalement l'augmentation des fréquences de coupure proportionnellement à l'épaisseur de thiol greffés sur les surfaces des particules d'Au. De plus, Vykoukal observe une diminution des valeurs positives de leur Facteur de Clausius-Mossotti toujours de manière proportionnelle avec l'épaisseur de thiols greffés. Zhang a mis en évidence que la mono-couche de thiols répartie de manière homogène

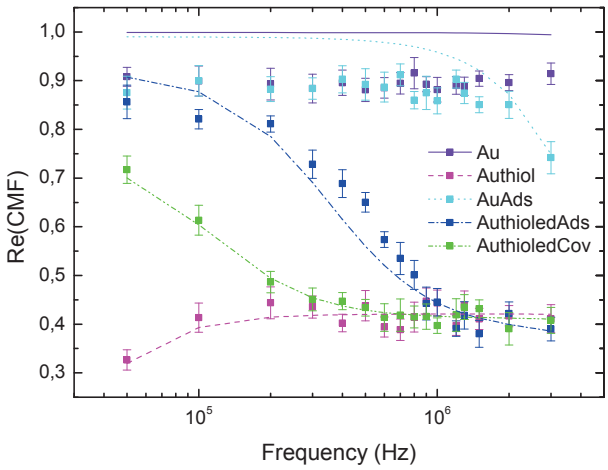


Figure 4.8 – Facteur de Clausius-Mossotti expérimentaux des particules d'Au greffées avec des protéines. Les courbes d'ajustement obtenue sont présentées en lignes pointillées sur le graphique. [Honegger 2011c]

induisait un écrantage important du champ électrique vu par la particule d'Au [Zhang 2010]. Ainsi et comme le montre la figure 4.8, le Facteur de Clausius-Mossotti de telles particules est toujours positif mais de valeur moyenne fortement diminuée (environ 0.4 contrairement à 0.9 pour des particules nues). Lorsque les particules métalliques sont couplées avec des protéines, les comportements diélectrophorétiques de ces particules changent : il apparaît une chute du Facteur de Clausius-Mossotti allant des comportements limites de 0.9 à 0.4. Pour les liaisons cova-

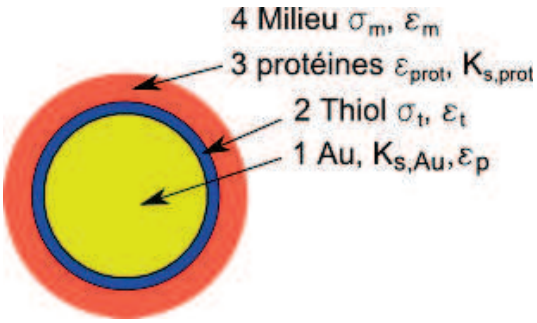


Figure 4.9 – Modèle coeur-coquille des particules d'Au bio-fonctionnalisées avec des protéines.

Layer	R (nm)	ε	K_s (nS)	σ (S/m)
Au	250	6.9 [Zhang 2010]	61.21 (Tableau 4.2)	X
Thiol	252	2 [Zhang 2010]	X	10^{-18} [Zhang 2010]
Protein	252+8n	1.98 (Tableau 4.6)	4.4 [Osaki 2006]	X

Table 4.7 – Paramètres utilisés pour la modélisation coeur-coquille des particules d'Au greffées avec des protéines. [Honegger 2011c]

lentes, les valeurs pour les régions de basses fréquences ($f < 200$ kHz) n'atteignent même pas 0.8.

Détermination des capacitances surfaciques

Pour expliquer de tels comportements, un modèle coeur-coquille est aussi appliqué à ces particules. Dans ce cas, ce sont 2 coquilles qui doivent être prises en compte puisque la particule est à la fois enveloppée par des thiols puis par des protéines. Comme présenté sur la figure 4.9, le système est alors composé de :

- la particule d'Au (1, rayon R_1),
- la mono-couche de thiol (2, rayon total R_2),
- la couche de protéines (3, rayon total R_3, nombre de couches n),
- le milieu (4).

Le couple particule-couche de thiol est modélisé de la même manière que précédemment (équation [Eq. 4.9]) où $R_2 = R_1 + d_{thiol}$. L'ajout de l'interface thiol-protéine crée alors une nouvelle permittivité virtuelle $\tilde{\varepsilon}_{2,3}$ (équation [Eq. 4.13]) qui rentre en compte dans l'expression du Facteur de Clausius-Mossotti final donné par l'équation [Eq. 4.12].

$$Re(\omega)_{p+thiol+prot} = Re\left(\frac{\tilde{\varepsilon}_{2,3} - \tilde{\varepsilon}_m}{\tilde{\varepsilon}_{2,3} + 2\tilde{\varepsilon}_m}\right) \qquad \text{[Eq. 4.12]}$$

$$\tilde{\varepsilon}_{2,3} = \tilde{\varepsilon}_{prot}\frac{\gamma_{2,3}^3 + 2Re(\omega)_{2,3}}{\gamma_{2,3}^3 - 2Re(\omega)_{2,3}},\ \gamma_{2,3} = R_2/R_3 \qquad \text{[Eq. 4.13]}$$

$$Re(\omega)_{2,3} = \frac{\tilde{\varepsilon}_t - \tilde{\varepsilon}_{prot}}{\tilde{\varepsilon}_t + 2\tilde{\varepsilon}_{prot}} \text{ où } \tilde{\varepsilon}_{prot} = \varepsilon_{prot} + i\frac{2K_{s,prot}}{R_3\omega},\ R_3 = R_2 + n.d_{prot} \qquad \text{[Eq. 4.14]}$$

Les valeurs des paramètres utilisés pour cette modélisation sont donnés dans le tableau 4.7 où celles des particules d'Au sont extraites des travaux de Zhang [Zhang 2010].

Étant donné que la permittivité des protéines à été déterminée dans le paragraphe précédent, ($\varepsilon_{prot} = 1.98$), on cherche à déterminer n le nombre de couches de protéines greffées sur les particules d'Au pour chaque méthode de greffage (adsorption ou liaison covalente).

A partir de l'expression développée du Facteur de Clausius-Mossotti de la particule greffée avec des thiols et des protéines ($Re(\omega)_{p+thiol+prot}$, équation [Eq. 4.12]) qui relie $Re(\omega)_{p+thiol+prot}$ à n, on effectue un ajustement des valeurs expérimentales aux valeurs théoriques sur chaque courbe $Re[\omega]$ dans toute la gamme fréquentielle étudiée pour chaque méthode de liaison. Les courbes issues de la modélisation sont superposées aux résultats expérimentaux sur la figure 4.8 et le nombre de couches de protéines est présenté dans le tableau 4.8.

	Coupling method	Au	Au-thioled
n layers of proteins	Adsorption	12	4
	Covalent	X	1

Table 4.8 – Nombre de couches de protéines sur les particules d'Au pour différentes techniques de greffage. [Honegger 2011c]

Le nombre de couches greffées semble influer directement la chute fréquentielle observée sur les Facteurs de Clausius-Mossotti. Ainsi, plus le nombre de couches diminue, plus la chute apparaît tôt en fréquence. A basses fréquences ($f < 200$ kHz), les protéines semblent atténuer l'écrantage du champ électrique alors qu'à hautes fréquences ($f > 1$ MHz), toutes les particules ont le même comportement positif tendant vers la valeur plateau de 0.4.

> La détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti couplée à une modélisation coeur-coquille permet d'extraire le nombre de couches de fonctionnalisation par différentes techniques de greffage. Il apparaît une greffage covalent par les thiols de mono-couche de protéines alors que leur adsorption conduit à des multicouches sur des particules d'Au.

4.4.3 Particules Janus nues ou présentant des protéines en surface

Détermination des Facteurs de Clausius-Mossotti

Enfin, la méthode de détermination du Facteur de Clausius-Mossotti est appliquée aux particules Janus dont la fabrication est présentée au chapitre 3 :

- Particules Janus nues : 100 nm Au / 1μm PS et 100 nm Au / 1μm SiO_2,
- Particules Janus thiolées : thiols-Au / PS et thiols-Au / SiO_2,
- Particules Janus carboxylate : Au / PS-COOH et Au / SiO_2-COOH,
- Particule Janus liaison covalente fibronectine (FN) sur la partie diélectrique : Au / PS-FN et Au / SiO_2-FN,
- Particule Janus liaison covalente fibronectine (FN) sur la partie Au : FN-Au / PS et FN-Au / SiO_2.

Comme le montre la figure 4.10, les Facteurs de Clausius-Mossotti de ces particules présentent des comportements toujours positifs dans de l'eau désionisée. Les formes générales de ces Facteurs de Clausius-Mossotti sont identiques à celles des particules de polystyrène, étant toujours positifs toutefois. Ils présentent un maximum aux basses fréquences ($f < 100$ kHz) et un minimum aux hautes fréquences ($f > 1$ MHz). Il apparaît toutefois une chute aux basses fréquences pour les particules qui comportent des thiols, probablement du à l'écrantage fort des thiols mis en évidence sur les particules d'Au.

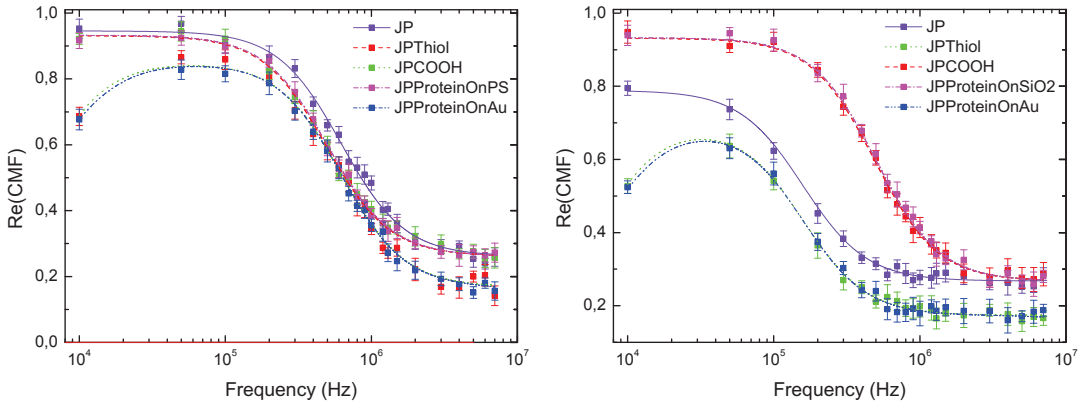


Figure 4.10 – Facteur de Clausius-Mossotti expérimentaux de particules Janus bio-fonctionnalisées pour (a) polystyrène et (b) SiO_2. Les courbes d'ajustement obtenues sont présentées en lignes pointillées sur le graphique. [Honegger 2011c]

Détermination des capacitances surfaciques

Les particules Janus, qu'elles soient greffées ou non avec des protéines, sont des particules anisotropes dont les propriétés de polarisation sont difficile à comprendre et à modéliser. D'autant plus lorsque celles-ci présentent des couches stratifiées de thiols ou de protéines. Zhang [Zhang 2010] propose d'ajouter les demi-contributions de la particule nue et de la particule coeur-coquille. Ainsi, la figure 4.11 présente les stratégies adoptées pour modéliser les particules Janus nues ou bio-fonctionnalisées sur leurs différents cotés.

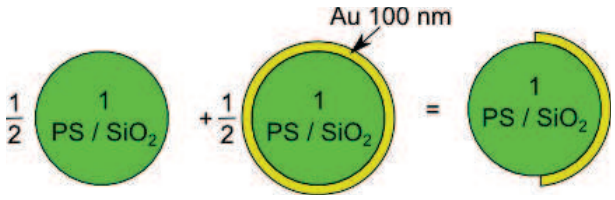
On cherche à déterminer n le nombre de couches de protéines greffées sur chaque coté d'un type de particule Janus (adsorption ou liaison covalente).

Les propriétés diélectriques de chaque couche sont extraites des valeurs déterminées dans les paragraphes précédentes.

A partir de l'expression développée du Facteur de Clausius-Mossotti de chaque type de particule Janus greffée avec des protéines qui relie les $Re(\omega)_{p+thiol+prot}$ à n, on effectue un ajustement des valeurs expérimentales aux valeurs théoriques pour les différents types de particule Janus (nues, greffées sur le coté Au ou diélectrique). Les courbes issues de la modélisation sont superposées aux résultats expérimentaux sur la figure 4.10 et les nombres de couche de protéines déterminées par les ajustements des valeurs des modélisations coeur-coquilles aux valeurs expérimentales sont donnés dans le tableau 4.9.

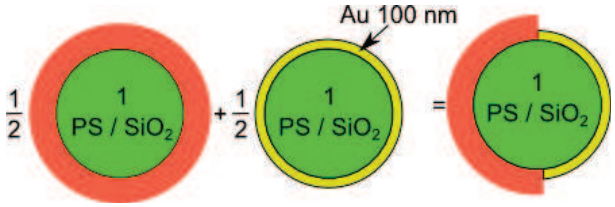
Side of grafting	n layers of proteins
Au/PS-COOH-Prot	1
Prot-thiol-Au/PS	1
Au/SiO_2-COOH-Prot	1
Prot-thiol-Au/SiO_2	1

Table 4.9 – Nombre n de couche de protéines sur les particules Janus. [Honegger 2011c]



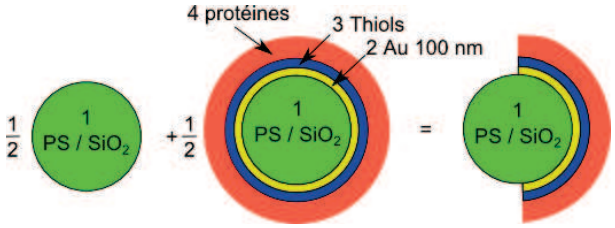
$$\frac{1}{2}Re(\omega)_p + \frac{1}{2}Re(\omega)_{p+Au} = Re(\omega)_{JP}$$

(a)



$$\frac{1}{2}Re(\omega)_{p+prot} + \frac{1}{2}Re(\omega)_{p+Au} = Re(\omega)_{JP,p+Prot}$$

(b)



$$\frac{1}{2}Re(\omega)_{p+prot} + \frac{1}{2}Re(\omega)_{p+Au+thiol+prot} = Re(\omega)_{JP,Au+thiol+Prot}$$

(c)

Figure 4.11 – Modèle et expressions utilisés pour les Facteur de Clausius-Mossotti des particules Janus bio-fonctionnalisées. (a) Particule Janus nue, (b) Particule Janus dont les protéines ont été greffées sur la partie diélectrique (PS ou SiO_2) et (c) Particule Janus dont les protéines ont été greffées sur la partie or.[Honegger 2011c]

L'utilisation des méthodes de greffage covalent sur les particules Janus, que ce soit pour greffer les protéines sur les parties diélectrique ou Au, permet donc de réaliser un greffage de monocouche de protéines. De plus, il semble que la modélisation des Facteurs de Clausius-Mossotti des particules Janus proposés par Zhang [Zhang 2010] qui consiste en l'ajout des demi-contributions de particules pleines représentant chaque coté d'une particule Janus décrit correctement le comportement de polarisation de telles particules.

4.5 Conclusion

Nous avons présenté une méthode originale de détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti pour des particules colloïdales de diamètre variables (200 nm - 10 μm) dans un milieu de suspension de conductivité connue. Cette méthode se base sur l'application successive de fréquences d'un potentiel électrique dans une gamme de fréquences donnée (1 kHz - 10 MHz). Ces fréquences du potentiel permettent de localiser les particules relativement aux électrodes (au centre, au bord ou en dehors). Couplé avec des techniques de mesures de vitesses de particules, il devient alors possible de mesurer de manière robuste les valeurs du Facteur de Clausius-Mossotti dans la gamme fréquentielle choisie.

Nous avons ainsi mis en évidence les chutes des fréquences de coupure induites par l'effet des tailles de particules d'un même matériau ou induites par différentes fonctionnalisations de surfaces pour des particules de mêmes tailles et de même matériau. Nous avons aussi montré l'influence de l'écrantage des couches de thiols et de protéines greffés sur les particules de polystyrène, silice et d'Au qui peuvent présenter des comportements positif à négatif ou positifs purs. Enfin, la mesure directe du Facteur de Clausius-Mossotti de particules Janus montre une réponse toujours positive dans de l'eau désionisée.

Grâce à des modèles mono-sphere ou coeur-coquille adaptés à chacun des types de particules étudiés, nous avons extrait les paramètres constitutifs de chaque particule. Les capacités surfaciques des particules de polystyrène et de silice nues ou fonctionnalisées par des groupements chimiques ont pu être mesurées. De même, le nombre de couches n greffées sur les particules par les méthodes présentées au chapitre 3 a pu être mesuré. Il apparaît clairement que la méthode de greffage par adsorption dépose sur une particule un nombre élevé ($4 < n < 38$) de couches de protéines alors que la méthode par liaison covalente n'en dépose qu'une seule. Ce résultat a pu être confirmé pour toutes les particules greffées de manière covalente.

Le tableau 4.10 synthétise l'ensemble des paramètres diélectriques intrinsèques à chaque type de particules étudié dans ce chapitre à partir de la mesure de leur Facteur de Clausius-Mossotti.

Vers l'ingénierie de particules colloïdales pour la diélectrophorèse

La capacité à mesurer les paramètres intrinsèques de ces particules colloïdales multifonctionnelles permet de créer une véritable ingénierie de particules colloïdales orientée pour des applications de diélectrophorèse dans des milieux de conductivités variables. Ainsi, en fixant ces paramètres dans les équations des Facteurs de Clausius-Mossotti de chaque particule, il devient possible de les calculer pour chaque type de particule en faisant varier la conductivité du milieu de suspension (figure 4.12). **Le comportement des particules dans les milieux de culture cellulaires, qui sont des milieux très conducteurs ($\sigma = 1.42$ S/m pour le PBS ou $\sigma = 1.38$ S/m pour le DMEM), peut donc être prédit pour développer des interactions particules - cellule.**

Comme le montre la figure 4.12, les Facteurs de Clausius-Mossotti des particules de polystyrène et de silice ont tendance à diminuer en valeurs maximales vers des valeurs négatives pour des conductivités $\sigma_m > 10^{-3} s/m$. Les comportements associées seront donc purement diélectrophorétiques négatifs dans ces milieux conducteurs.

Particule	K_s (nS)	n layers of proteins		ε_r
		Adsorption	Covalent	
polystyrène	$2.56 \pm 0,09$	4	x	2.55
PS-Sulfate	2.23 ± 0.16	x	x	2.55
PS-Carboxyl	1.75 ± 0.18	x	x	2.55
PS-Aldehyde	2.69 ± 0.19	x	x	2.55
PS-Carboxylate	1.98 ± 0.18	29	1	2.55
SiO_2	0.51 ± 0.10	38	x	3.8
SiO_2-CCOH	1.87 ± 0.18	7	1	3.8
Au	61.21 ± 9.47	12	x	61.21
Au-thiol	61.21 ± 9.47	4	1	2
Fibronectine	4.4	x	x	1.98
Au/PS-COOH-Prot	x	x	1	x
Prot-thiol-Au/PS	x	x	1	x
Au/SiO_2-COOH-Prot	x	x	1	x
Prot-thiol-Au/SiO_2	x	x	1	x

Table 4.10 – Ensemble des paramètres obtenus par la méthode de détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti

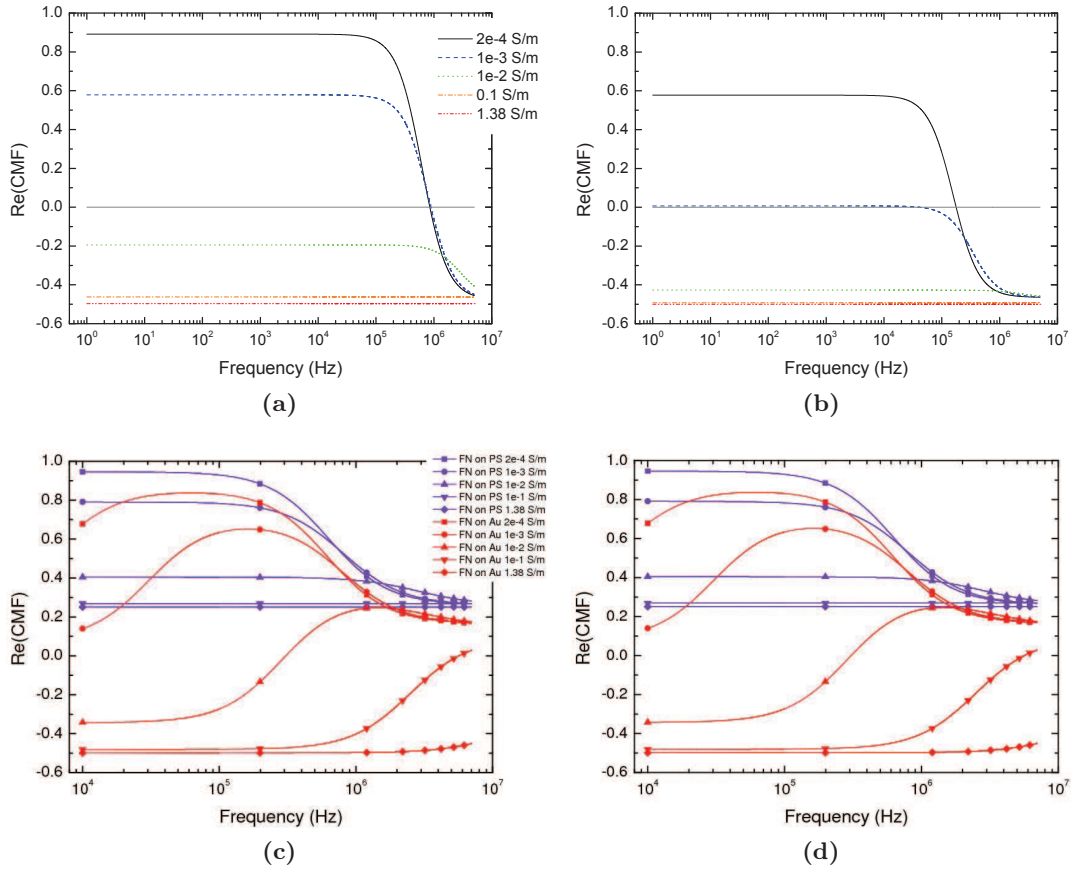


Figure 4.12 – Facteurs de Clausius-Mossotti simulés des particules de (a) polystyrène et (b) silice dans des milieux de conductivités croissantes [Honegger 2011c]. Facteur de Clausius-Mossotti de particules Janus bio-fonctionnalisées dans des milieu de conductivités croissantes pour (c) 100nmAu/PS et (d) 100nmAu/SiO_2. FN symbolise la Fibronectine.

A l'inverse, les Facteur de Clausius-Mossotti des particules Janus dans des milieux de conductivités croissantes présenteront des comportements duaux en fonction du coté de greffage :

- **Fibronectine (symbolisé par FN) sur le coté diélectrique.** Le Facteur de Clausius-Mossotti de telles particules tend à diminuer en valeur tout en restant positif,
- **Fibronectine (symbolisé par FN) sur le coté Au.** Le Facteur de Clausius-Mossotti tend vers les valeurs négatives avec présence d'une fréquence de coupure pour des conductivités de milieux $\sigma_m > 10^{-3}$ S/m.

La versatilité de ces réponses montre qu'en connaissant les paramètres intrinsèques des particules colloïdales, il devient possible de moduler leur réponse diélectrophorétique en fonction de la conductivité du milieu de suspension. Greffés sur leur partie Au, des particules Janus présentent alors des réponses à la fois positives et négatives dans des milieux de suspension de conductivité élevée, ce qui est impossibles à obtenir avec des particules greffées sur la totalité de leur surface. Le choix du côté sur lequel seront greffées les protéines permet donc d'envisager divers types d'applications diélectrophorétiques dans des les milieux à fortes conductivités comme les milieux de culture cellulaires.

Chapitre 5

Manipulation tridimensionnelle de particules colloïdales

Sommaire

5.1 Positionnement tridimensionnel de colloïdes en géométrie d'électrodes tridimensionnelles 102
5.1.1 Géométrie d'électrodes 102
5.1.2 Modélisation des forces électro-hydrodynamiques et diélectrophorétiques induites par des champs électriques 3D 103
5.1.3 Localisation tridimensionnelle expérimentale de particules soumises à des champs électriques 3D 113
5.2 Manipulation tridimensionnelle collective - Fonctions clés 121
5.2.1 Fonction Stop / Séparation 121
5.2.2 Fonction Focalisation 123
5.2.3 Fonction Piège 127
5.3 Manipulation tridimensionnelle individuelle 131
5.3.1 Observation de particules uniques 131
5.3.2 Rotation de particules Janus 132
5.3.3 Diélectrophorèse impulsée mobile 136
5.4 Conclusion 145

Le chapitre précédent a permis de déterminer les propriétés diélectrophorétiques des particules colloïdales. Ce chapitre exploite ces propriétés et présente une étude complète de la manipulation de particules colloïdales fonctionnelles, soumises à des champs électriques alternatifs dans des puces microfluidiques tridimensionnelles.
L'accès à une nouvelle technologie de puces microfluidiques embarquant des électrodes biplanaires et non plus co-planaire permet de créer des champs électriques qui se propagent à la verticale dans le fluide. Ainsi, nous présentons tout d'abord une modélisation par éléments finis des forces électrothermiques, électro-osmotiques et diélectrophorétiques génératrices de mouvements de particules pour ces géométries d'électrodes. Les résultats de ces modélisations permettent à la fois d'anticiper les trajectoires des particules pour chacune des forces en présence mais aussi de déterminer la force prédominante suivant le régime de tension alternative appliquée. Des particules colloïdales sont ensuite injectées dans les puces microfluidiques comportant ces électrodes et les localisations expérimentales des particules soumises à de tels couples fréquence - tension seront observées dans des milieux de conductivités croissantes.
Par la suite, nous détaillerons l'utilisation de ces géométries d'électrodes en les assemblant en matrice ou en les associant à une variation temporelle du champ électrique. Nous introduirons

des fonctions clés qui créent une modulation spatiale du champ électrique alternatif dans la puce microfluidique. Cette modulation permet de réaliser une manipulation collective des particules colloïdales injectées dans une puce.
Enfin, nous présenterons la manipulation individuelle de particules colloïdales grâce à une modulation spatio-temporelle du champ électrique alternatif. Nous montrerons l'effet flip-flop des particules Janus lors du changement de fréquence du champ électrique. La manipulation tridimensionnelle d'une particule micronique unique sera ensuite introduite par diélectrophorèse impulsée mobile.

5.1 Positionnement tridimensionnel de colloïdes en géométrie d'électrodes tridimensionnelles

De façon à comprendre le positionnement et les trajectoires des particules soumises à des champs électriques alternatifs parcourant un canal microfluidique, la compétition des forces électro-hydrodynamiques et diélectrophorétiques est étudiée pour 3 géométries d'électrodes différentes (voir figure 5.1). Dans ce sous chapitre, nous utiliserons des particules de polystyrène de 1, 5 et 10 μm de rayon suspendues respectivement dans des milieux de conductivités σ_m croissantes ((eau desionisé : 2.10^{-4} S/m, milieu salin NaCl 10^{-2} S/m et milieu de culture cellulaire DMEM avec sérum : 1.38 S/m).

5.1.1 Géométrie d'électrodes

Les électrodes sont intégrées dans les puces microfluidiques conformément à la technologie présentée au chapitre 2. Ainsi, 3 types de puces sont fabriquées avec des géométries d'électrodes différentes :

- **Barres verticales** (BV). Deux électrodes alignées verticalement et perpendiculairement au microcanal constituent une paire d'électrodes (figure 5.1a). Les électrodes de largeur 10 μm sont espacées de la hauteur du canal microfluidique (10 μm). Les utilisations de ces dernières seront détaillées dans la section 5.2.1 et peuvent constituer des fonctions de manipulation collective d'arrêt ou de séparation des particules.
- **Pièges circulaires** (PC). Deux électrodes sont alignées verticalement et représentent chacune des couronnes de 10 μm de large dont le diamètre intérieur est de 15 μm (figure 5.1b). Ces pièges sont disposés au centre d'une puce microfluidique en damier de 53x53. En amont et en aval de cette matrice sont intégrés 3 paires d'électrodes BV. La configuration multi-piège sera détaillée dans la section 5.2.3 pour la manipulation collective ou individuelle de particules.
- **Barres perpendiculaires** (BP). Deux électrodes sont alignées perpendiculairement de part et d'autre du canal microfluidique (figure 5.1c). De même que précédemment, une matrice de 53x53 pièges est disposée au centre d'une puce microfluidique avec en amont 2 BV et en aval 1 BV. L'utilisation de cette matrice sera détaillée dans la section 5.3.3 pour la manipulation individuelle ou collective des particules.

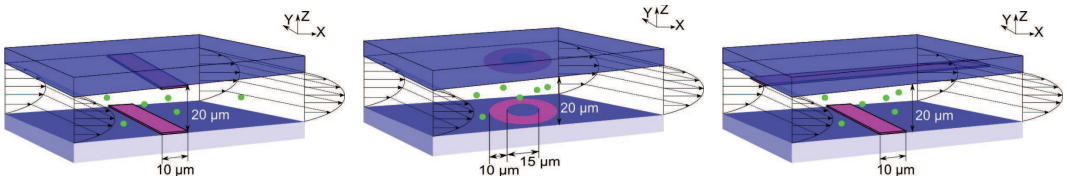


Figure 5.1 – Schémas des paires d'électrodes : (a) Barres verticales (BV), (b) Pièges circulaires (PC), (c) Barres perpendiculaires (BP). Les électrodes supérieures sont reliées au potentiel électrique et les électrodes inférieures à la masse. Le flux hydrodynamique d'entrainement va de la gauche vers la droite.

5.1.2 Modélisation des forces électro-hydrodynamiques et diélectrophorétiques induites par des champs électriques 3D

La compréhension des contributions de chacune des forces, électro-hydrodynamique et diélectrophorétique, pour chaque configuration d'électrodes permet de prévoir la trajectoire et la localisation des particules colloïdales soumises à un couple fréquence / tension du potentiel électrique appliqué sur les électrodes.

5.1.2.1 Présentation des forces électrocinétiques.

1. **Force électro-hydrodynamiques** (F_{EHD}). Ces forces agissent sur le fluide lui même, imposant une vitesse de déplacement d'un élément de fluide. Les particules soumises à de telles forces sont donc entrainées par le fluide. La force électro-hydrodynamique se décompose en 2 contributions :
   - **Force électro-osmotique alternative** (F_{ACEO}). Contrairement au système coplanaire, la géométrie tridimensionnelle d'électrodes ne comporte pas de champs tangent (E_t) constant sur la totalité de l'électrode mais uniquement sur ses pointes. Ainsi, les equations régissant les vitesses de glissement induites par le mouvement de la double couche électronique en géométrie coplanaire (voir chapitre 1.3.2.1) ne peuvent s'appliquer à de telles configurations. En revanche, la double couche électronique étant spontanément présente sur les électrodes, son interaction avec le champ électrique tangent présent sur les bords des électrodes implique une vitesse de glissement sur les électrodes elle-même. De plus, le signe de E_t change d'une électrode à une autre, ce qui implique que les directions des vitesses de glissement seront opposées d'où la création de rouleaux de convection de sens opposés. La vitesse du fluide sur les électrodes est donnée par la vitesse de Helmholtz-Smoluchowski [Eq. 5.1] et du potentiel zêta [Eq. 5.2] sur les électrodes où la charge de la couche de diffusion pour le verre est fixée à $\sigma_{qd} = -0.32$ $mC.m^{-2}$ [Micheletto 1995].
     Par sa nature même, l'électroosmose dépend de E_t et de la densité d'ions chargés en surface de l'électrode, il existe donc une fréquence optimale à laquelle le produit de E_t et du potentiel zêta est maximum. Cette dépendance fréquentielle est introduite par une fréquence adimensionnelle Ω_{ACEO} [Eq. 5.3] qui est fonction de L la distance inter électrode, λ_d l'épaisseur de la double couche électronique, σ_m la conductivité du milieu

et ε_m sa permittivité. La vitesse de glissement moyenne est alors donnée par $< u_{ACEO} >$ [Eq. 5.4].

$$u_{ACEO} = \frac{\varepsilon_m}{\eta_m}\zeta E_t \qquad \text{[Eq. 5.1]}$$

$$\zeta = -\frac{\sigma_{qd}\lambda_d}{\varepsilon_m} \qquad \text{[Eq. 5.2]}$$

$$\Omega_{ACEO} = \frac{\pi}{2}\frac{L}{\lambda_d}\frac{\varepsilon_m}{\sigma_m}\omega \qquad \text{[Eq. 5.3]}$$

$$< u_{ACEO} >= \frac{\varepsilon_m}{\eta_m}\zeta\frac{\Omega^2_{ACEO}}{(1+\Omega^2_{ACEO})^2}E_t \qquad \text{[Eq. 5.4]}$$

La figure 5.2a présente les vitesses de glissement induites par l'ACEO pour 3 conductivités de milieux lorsque le champs tangent vaut $E_t = 10^6$ V/m. Étant donné que

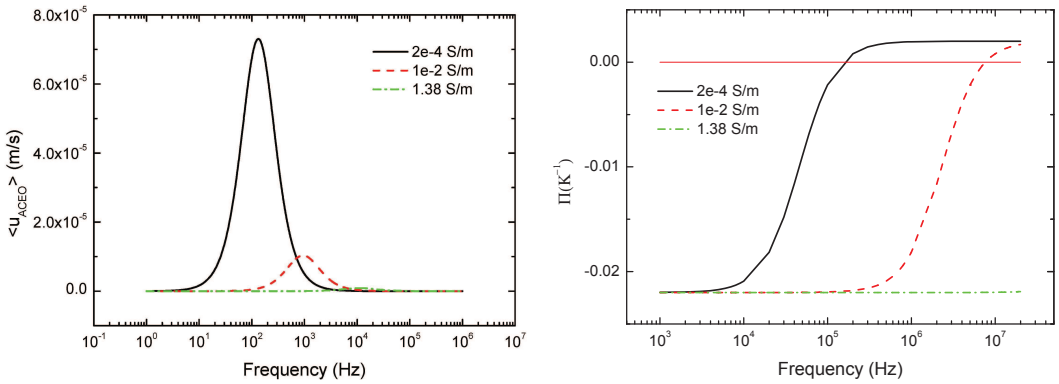


Figure 5.2 – (a) : $< u_{ACEO} >$ induit par ACEO en fonction de la fréquence du champ électrique pour différentes conductivités lorsque $E_t = 10^6$ V/m. (b) : Facteur Π en fonction de la fréquence du signal électrique appliqué et de la conductivité du milieu.[Honegger 2011d]

l'épaisseur de la double couche électronique diminue de manière inversement proportionnelle à la conductivité du milieu, les valeurs des potentiels zêta et des vitesses de glissement induites par l'ACEO chutent lorsque la conductivité du milieu augmente. On observe également un décalage fréquentiel de la vitesse de glissement moyenne en fonction de la conductivité. Cette dernière est maximale à 200 Hz pour $\sigma_m = 2.10^{-4}$ S/m, à 1 kHz pour $\sigma_m = 10^{-2}$ S/m et à 10 kHz pour $\sigma_m = 1.38$ S/m.

– **Force électrothermique** (F_{ETE}). Comme présenté au chapitre 1, l'effet Joule induit par le potentiel électrique crée des gradients de conductivité et de permittivité au sein de la solution colloïdale. La moyenne temporelle de la force électrothermique est rappelée par l'équation [Eq. 5.5]. Le facteur Π (équation [Eq. 5.6]) joue un rôle crucial dans l'intensité et le sens de cette force, comme le montre la figure 5.2b. Cette force s'applique en volume au fluide et crée des déplacements de liquide induisant des vitesses u_{ETE} en tout point de la solution confinée.

$$< \overrightarrow{F_{ETE}} >= 0.5\varepsilon_m \nabla T \overrightarrow{E}^2 \Pi(\omega) \quad \text{[Eq. 5.5]}$$

$$\Pi(\omega) = \left(\frac{\alpha - \beta}{1 + (\omega\varepsilon_m/\sigma_m)^2} - \frac{\alpha}{2}\right) \quad \text{[Eq. 5.6]}$$

Les forces électro-hydrodynamiques induisent des mouvements de liquide, soit sur la surface des électrodes par électroosmose, soit en volume par électrothermie. On a donc un mouvement globale de liquide $u_{fluid} = u_{ACEO} + u_{ETE}$ qui crée sur les particules une force hydrodynamique d'entrainement qui vaut $F_{EHD} = 6\pi\eta_m R(v_p - u_{fluid})$ lorsqu'une particule sphérique a une vitesse initiale v_p non nulle [Ramos 1998]. Dans notre cas, la particule est supposée être au repos ($v_p = 0$) lorsque la force apparait dans les modélisations. La force électro-hydrodynamique agissant sur la particule est donnée par l'équation [Eq. 5.7].

$$F_{EHD} = -6\pi\eta_m R(u_{ACEO} + u_{ETE}) \quad \text{[Eq. 5.7]}$$

2. **Force diélectrophorétique** (F_{DEP}).
   La force diélectrophorétique est une force agissant sur la particule elle même et non sur le fluide. Comme présenté au chapitre précédent, cette force dépend des paramètres intrinsèques du système colloïdale et de $\nabla|E|^2$ fixé par la géométrie des électrodes (équations [Eq. 5.8] et [Eq. 5.9]).

$$< F_{DEP} >= \pi\varepsilon_m R^3 Re(\omega) \nabla|E|^2 \text{ où } |E|^2 = E \cdot E^* \quad \text{[Eq. 5.8]}$$

$$Re(\omega) = \frac{\tilde{\varepsilon}_p - \tilde{\varepsilon}_m}{\tilde{\varepsilon}_p + 2\tilde{\varepsilon}_m} \text{ où } \tilde{\varepsilon}_{m/p} = \varepsilon_{m/p} - i\frac{\sigma_{m/p}}{\omega} \quad \text{[Eq. 5.9]}$$

5.1.2.2 Méthode de modélisation des forces.

Nous avons réalisé une modélisation numérique des géométries et résolus les équations régissant les forces par la méthode des éléments finis (Comsol 4.0a).
Chaque paire d'électrodes est modélisée par une épaisseur nulle (condition de contrainte électrostatique aux limites du canal) et non comme ayant une épaisseur finie. En effet, la différence de taille entre la hauteur des électrodes (170 nm) et celle du canal (20 μm) permet d'approximer une non-perturbation de l'écoulement laminaire dans le canal et n'altère que très peu la distribution spatiale du champ électrique dans le canal [Loucaides 2011]. Le maillage est raffiné au voisinage des électrodes (à 1 μm).

Une étude paramétrique est réalisée suivant 4 paramètres :
- fréquence f [1 kHz-5 MHz],
- tension V_{p-p} [0-10 V],
- conductivité du milieu σ_m [eau desionisé : 2.10^{-4}, milieu salin NaCl 10^{-2}, milieu de culture cellulaire DMEM avec sérum : 1.38 S/m],
- rayon de la particule R [1, 5, 10 μm].

La démarche de résolution adoptée pour chaque valeurs des paramètres est la suivante :

– **Calcul des facteurs** $Re(\omega)$, Π et Ω_{ACEO} à une fréquence f.

– **Électrostatique**. Les distributions spatiales du potentiel électrique et du champ électrique sont calculées comme présenté dans la figure 5.3. $\nabla|E^2|$ est alors intégré dans

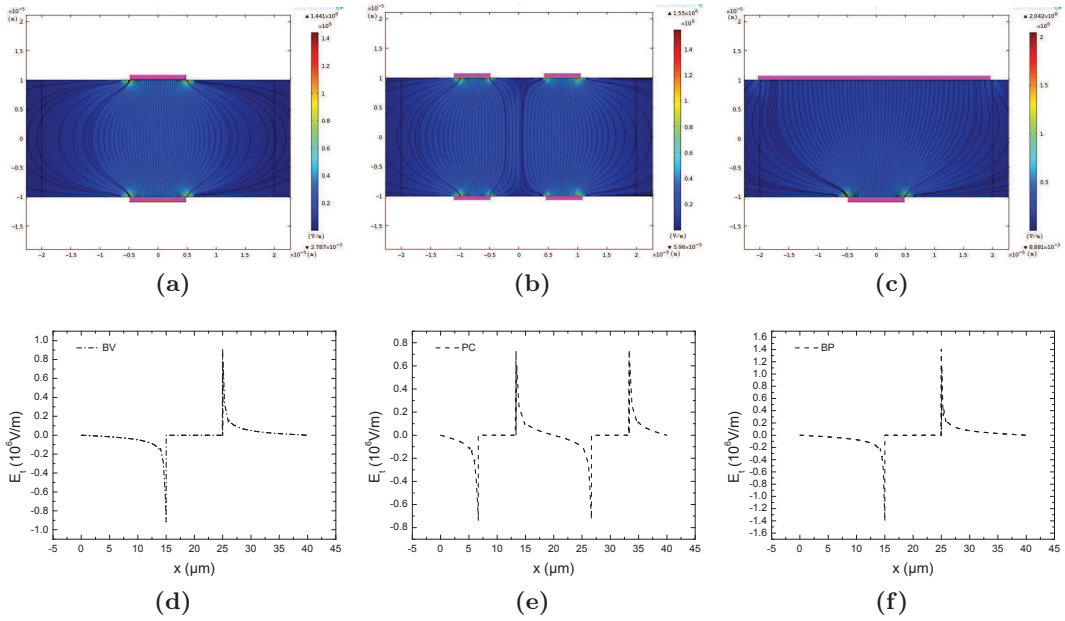


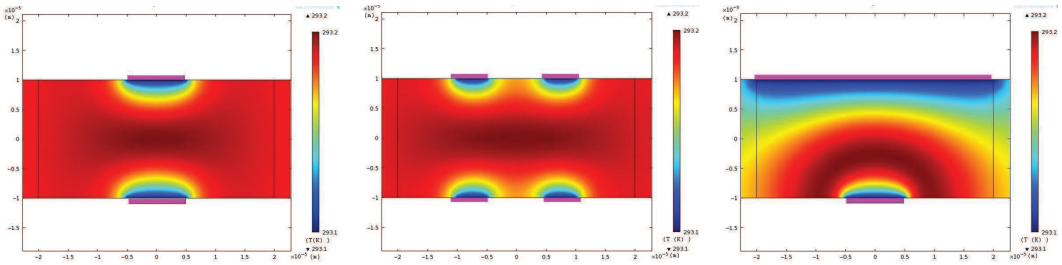
Figure 5.3 – Modélisations numériques des distributions spatiales de $|E|$ (V/m) et des équipotentiels pour (a) : Barres parallèles, (b) : Pièges circulaires et (c) : Barres perpendiculaires lorsque $\sigma_m = 2.10^{-4}$ S/m, f = 1 kHz, $V_{pp} = 10$ V. Les électrodes sont rajoutées en violet sur les figures. Modélisation du champ électrique tangent selon les paires d'électrodes étudiées : (d) : Barres parallèles, (e) : Pièges circulaires et (f) : Barres perpendiculaires dans les mêmes conditions que précédemment.

la force diélectrophorétique et le champ tangent E_t est intégré au calcul de la vitesse de glissement induite par l'ACEO u_{ACEO}. Les figures 5.3d, 5.3e et 5.3e montrent que les champs électriques tangents peuvent atteindre des valeurs allant jusqu'à $1MV/m$ et décroissent par rapport à la distance aux électrodes.

– **Diffusion thermique.** La distribution spatiale de la température induite par le champ électrique est calculée pour les 3 géométries comme présentées dans la figure 5.4. Le ∇T est intégré dans la force électrothermique.

– **Écoulement incompressible de Navier-Stokes**. La force électrothermique agit comme une force volumique sur le liquide. L'électroosmose est appliquée comme une condition aux limites avec une vitesse de glissement $< u_{ACEO} >$ sur les électrodes.

Une fois résolues en chaque point du maillage, les contributions en vitesse de chacune des forces hydrodynamiques (u_{ETE} et u_{ACEO}) sont converties indépendamment en force hydrodynamique d'entrainement, F_{ACEO} et F_{ETE}, agissant sur une particule. De plus, la force de gravité, F_{grav} (équation [Eq. 5.10]) est ajoutée à F_{EHD} (équation [Eq. 5.11]). Finalement, les deux forces diélectrophorétiques F_{DEP} et électro-hydrodynamiques F_{EHD} sont sommées en F_{Tot} comme le



(a) (b) (c)

Figure 5.4 – Modélisations numériques des distributions spatiales de T (K) pour (a) : barres parallèles, (b) : Pièges circulaires et (c) : barres perpendiculaires lorsque $\sigma_m = 2.10^{-4}$ S/m, f = 1 kHz, $V_{pp} = 10$ V.

montre l'équation 5.12.

$$F_{grav} = \frac{4}{3}\pi R^3(\rho_p - \rho_m)g \qquad \text{[Eq. 5.10]}$$

$$F_{EHD} = -6\pi\eta_m R(u_{ACEO} + u_{ETE}) + F_{grav} \qquad \text{[Eq. 5.11]}$$

$$F_{Tot} = F_{EHD} + F_{DEP} \qquad \text{[Eq. 5.12]}$$

5.1.2.3 Résultats des modélisations.

Visualisation tridimensionnelle

Les 3 géométries d'électrodes sont modélisées en 3D comme le montre la figure 5.5. Ces simulations montrent des exemples en vue isométrique et en coupe lorsque le Facteur de Clausius-Mossotti est négatif ($Re(\omega) = -0.5$).

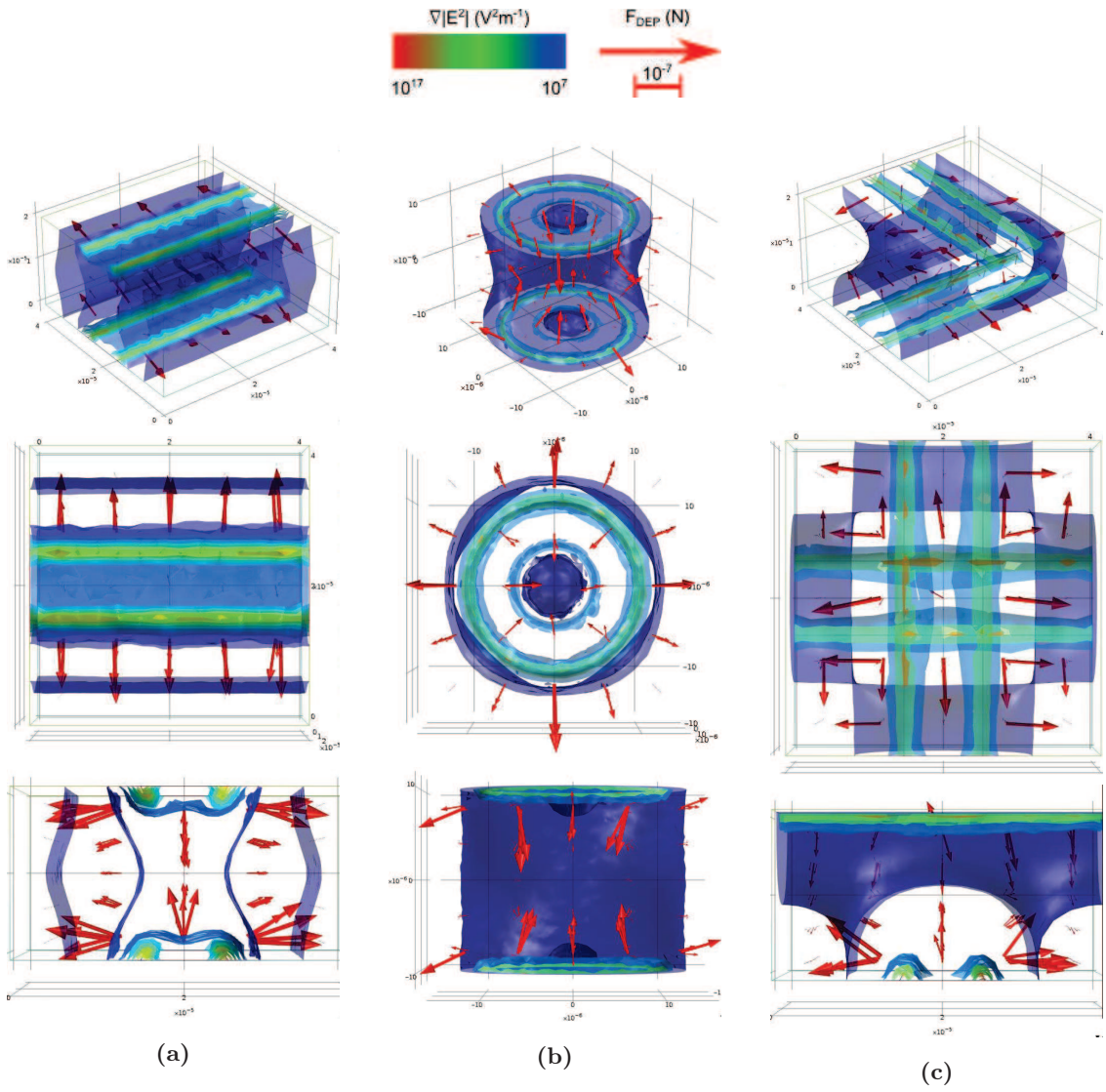


Figure 5.5 – Simulation 3D des $\nabla|E|^2$ (V^2m^{-1}) (isosurfaces) et de la force diélectrophorétique négative (Newton) (flèches) pour les configurations d'électrodes (a) : 2 barres parallèles, (b) : pièges circulaires et (c) 2 barres perpendiculaires (Hauteur du canal L= 20 μm, potentiel appliqué V=2 V_{p-p}).

Dans les 3 géométries, la force diélectrophorétique impose un confinement tridimensionnel des particules, que ce soit devant les électrodes pour les 2 barres parallèles, au centre des pièges ou dans les coins des électrodes perpendiculaires.

Visualisation en coupe dans le microcanal

De façon à prévoir le comportement de particules soumises à chacune des forces, les équipotentiels des forces F_{ACEO}, F_{ETE}, F_{DEP} et F_{Tot} sont visualisées dans les plans de coupe symétriques pour chaque géométrie. F_{Tot} permet ainsi de constater la forces dominante.
La figure 5.6 présente les résultats des modélisations pour les forces électro-hydrodynamiques, la force diélectrophorétique et la force totale F_{Tot}. On peut observer que ces effets électrocinétiques induisent 3 comportements pour les particules suivant les tensions et les fréquences appliquées ainsi que les conductivités choisies :

- **Rouleaux de convection attractifs** (RCA). Lorsque l'électroosmose est maximum et l'effet électrothermique négatif, les rouleaux de convection sont dirigés vers l'intérieur des électrodes. Dues aux contre-rouleaux de convection attractifs, les particules colloïdales "loin" des électrodes seront attirées vers elle. Proche des électrodes, les particules pourront suivre les lignes de courant.
- **Rouleaux de convection dispersifs** (RCD). Lorsque l'effet électrothermique est positif, les rouleaux de convection sont dirigés vers l'extérieur des électrodes. Les particules seront donc repoussées des électrodes.
- **Attraction ou répulsion des bords des électrodes** (ARE). Lorsque la diélectrophorèse est positive, les particules seront attirées vers les bords des électrodes alors qu'elles seront repoussées au centre du canal microfluidique et devant les électrodes.

Nous avons montré que la forme géométrique des électrodes impose les distributions spatiales de $\nabla|E|^2$ et de ∇T, donc les directions des différentes forces et des trajectoires des particules colloïdales. En revanche, les magnitudes et sens des forces F_{ACEO}, F_{ETE}, F_{DEP} sont aussi déterminées par les valeurs des facteurs clés Ω_{ACEO}, Π, et $Re(\omega)$ en fonction de la fréquence et de la tension du potentiel électrique appliqué, de la conductivité σ_m du milieu et de la taille R de la particule.
Nous avons alors pu visualiser les trajectoires des particules colloïdales soumises aux différents effets électrocinétiques. Il apparait alors 3 comportements prédominants d'attraction ou de répulsion des particules vers les électrodes, soit par un mouvement de liquide en rouleaux, soit directement par diélectrophorèse.

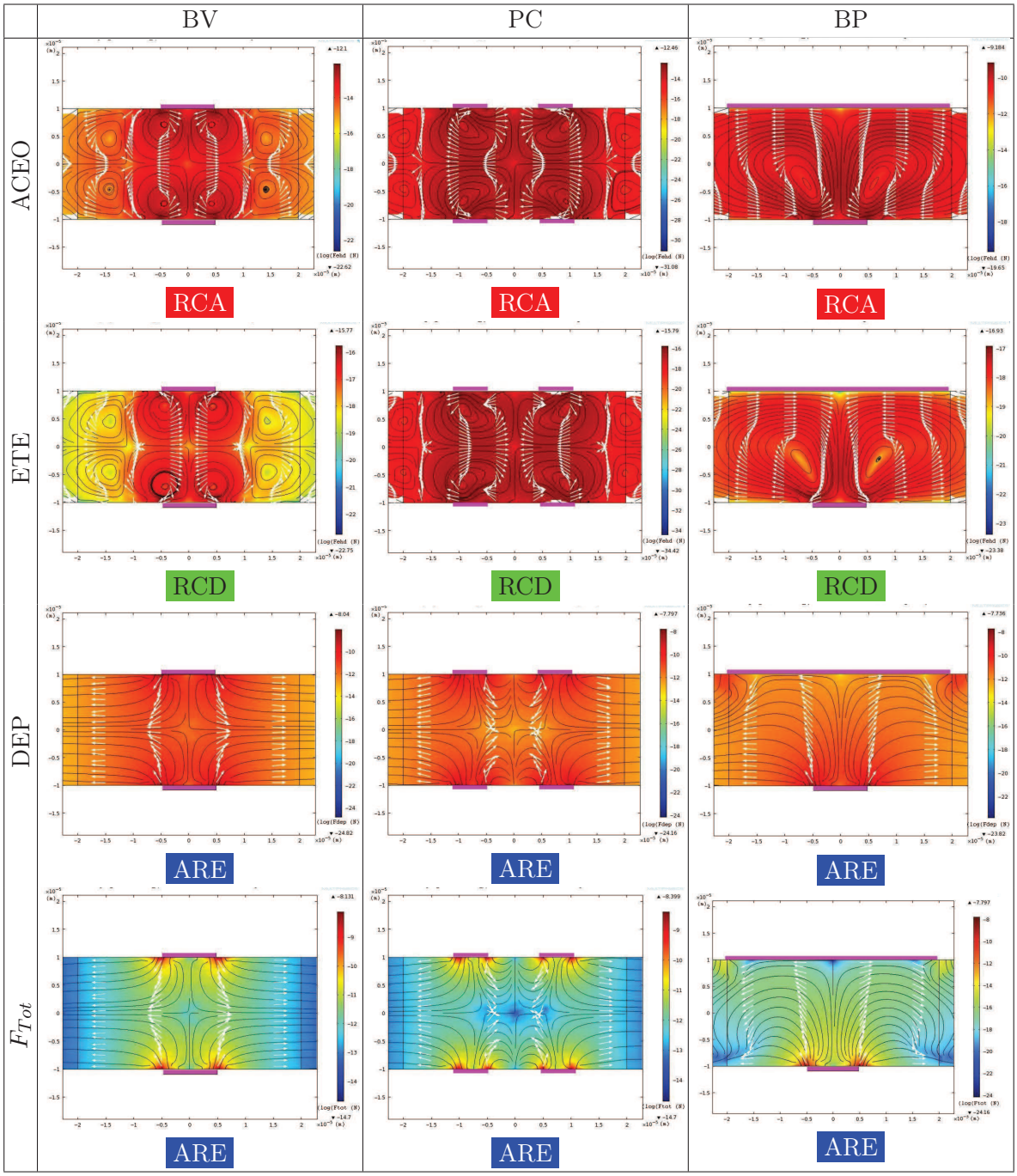


Figure 5.6 – Vecteurs et équipotentiels des forces (tracé logarithmique) pour des particules de polystyrène de 1 μm de diamètre pour les barres verticales, les pièges circulaires et les barres perpendiculaires. De haut en bas : F_{EHD} en régime ACEO dominant ($\sigma_m = 2.10^{-4}$ S/m, f = 1 kHz, $V_{pp} = 10$ V), F_{EHD} en régime ETE dominant($\sigma_m = 10^{-2}$ S/m, f = 100 kHz, $V_{pp} = 10$ V), F_{DEP} en régime diélectrophorétique négative dominant ($\sigma_m = 2.10^{-4}$ S/m, f = 2 MHz, $V_{pp} = 10$ V) et F_{Tot} en régime diélectrophorétique négative ($\sigma_m = 2.10^{-4}$ S/m, f = 2 MHz, $V_{pp} = 10$ V).

La force totale F_{Tot} est tracée en intensité sur une carte fréquence-tension suivant les conductivités et les diamètres des particules de polystyrène utilisées comme le montre la figure 5.7. Il apparait des zones de travail pour favoriser une force par rapport à l'autre.

- **Pour** $\sigma_m = 2.10^{-4}$ **S/m** (eau desionisée) et pour tous les diamètres, la diélectrophorèse positive ou négative est toujours présente avec une augmentation de ces régimes lorsque le diamètre des particules augmente. Ce comportement est due à la relation directe entre la force diélectrophorétique et le volume de la particule. F_{DEP} domine alors F_{EHD} à faibles fréquences ($f < 5$ kHz) lorsque le rayon de la particule est suffisamment grand ($R > 5\mu$m). Suivant le tableau 5.6, les particules seront donc majoritairement dans le régime ARE avec possibilité de suivre le régime RCA à faible fréquence.
- **Pour** $\sigma_m = 10^{-2}$ **S/m** (eau saline), la diélectrophorèse positive disparait et l'effet électrothermique est dominant à forts voltages ($V > 5$ V) pour tous les diamètres. Il demeure toutefois une zone de travail de diélectrophorèse négative à hautes fréquences ($f > 2$ MHz) pour des particules de 1 μm de diamètre ou à toutes les fréquences pour les plus grosses particules. Suivant le tableau 5.6, les particules seront donc majoritairement dans le régime RCD avec possibilité d'être repoussées juste par diélectrophorèse à faibles tensions (V<5 V).
- **Pour** $\sigma_m = 1.38$ **S/m**, il existe une démarcation nette entre l'effet électrothermique qui est dominants dès que la tension dépasse 3 V et la diélectrophorèse. On observe une diminution de cette tension critique avec l'augmentation du diamètre puisque la force diélectrophorétique est liée directement au volume de la particule. Suivant le tableau 5.6, les particules seront donc majoritairement dans le régime RCD avec possibilité d'être repoussés juste par diélectrophorèse à faibles tensions ($V < 3$ V).

Les cartographies fréquences-tensions et les simulations des équipotentielles de forces montrent qu'il est possible d'anticiper la trajectoire de particules colloïdales soumises aux forces électrocinétiques dans les puces microfluidiques tridimensionnelles. En fonction de la conductivité du milieu et de la taille des particules à manipuler, il existe alors des conditions limites en terme de fréquences et de tensions à respecter de façon à leur imposer un régime qui permettra de les localiser relativement aux électrodes.

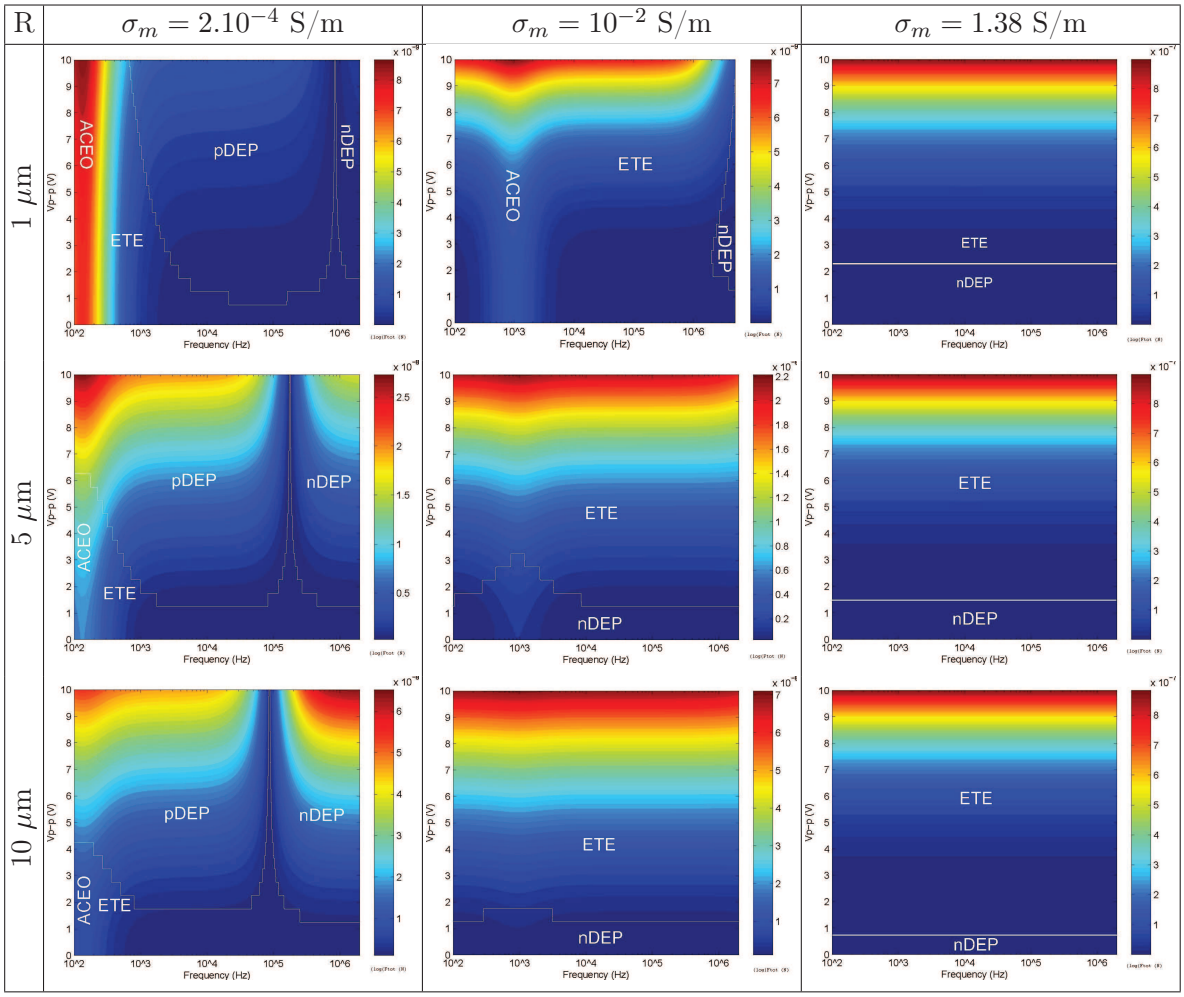
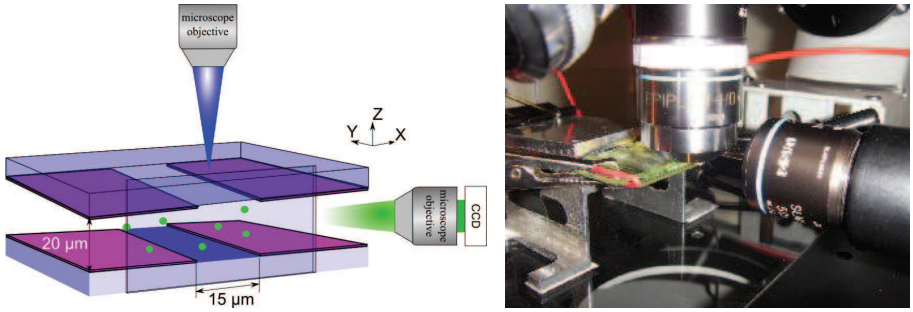


Figure 5.7 – Cartographies fréquence/tension des différentes forces en présence lors de l'application de champs électriques en géométrie barres verticales à conductivités du milieu et tailles croissantes de particules de polystyrène.

5.1.3 Localisation tridimensionnelle expérimentale de particules soumises à des champs électriques 3D

L'objectif ici est de visualiser expérimentalement les trajectoires de particules colloïdales dans les géométries d'électrodes étudiées dans les puces microfluidiques tridimensionnelles.
Les mouvements des particules sont observés proche de paires électrodes en vue de dessus. De plus, les trajectoires et mouvements des particules sont observés également en coupe dans le canal microfluidique. Pour ce faire, une camera est montée sur le coté de la puce microfluidique comme présenté dans la figure 5.8.



(a) (b)

Figure 5.8 – Schéma et photographie du montage d'observation des trajectoires des particules colloïdales vue en coupe dans le canal microfluidique.

Un ensemble de couples fréquence/tension est appliqué aux 3 géométries d'électrodes sur des particules de polystyrène de 1 μm de diamètre dans des milieux de conductivités croissantes : eau desionisé : $\sigma_m = 2.10^{-4}$ S/m, milieu salin NaCl $\sigma_m = 10^{-2}$ S/m, milieu de culture cellulaire DMEM avec sérum : $\sigma_m = 1.38$ S/m.
Les fréquences choisies sont telles que chaque effet est à priori dominant (ACEO pour $f = 1$ kHz, pDEP et ETE négative pour $f = 50$ kHz, ETE positive pour $f = 500$ kHz et nDEP et ETE positive pour $f = 1MHz$) et les tensions sont croissantes (2,5 et 10 Volts crête à crête). Les fortes tensions (> 10 V) ne sont pas appliquées pour les hautes conductivités (DMEM) et à basses fréquences ($f < 500$ kHz) pour éviter l'électrolyse de l'eau et la destruction des électrodes (voir chapitre 2).

Les tableaux 5.1, 5.2 and 5.3 présentent des photos prises lors de l'application du champs électrique à différentes fréquences, tensions et conductivités.
De manière générale, à une fréquence et une conductivité donnée, l'effet prédominant obtenu grâce aux modélisations est observé. L'augmentation de la tension accroit la vitesse des particules selon les lignes de trajectoires associées à cet effet. Cependant, il apparait des comportements hybrides dues aux compétitions de forces lorsque le couple fréquence-tension se situe dans une zone de transition. Pour toutes les géométries, les comportements des particules sont similaires et leurs positions par rapport aux électrodes changent avec la fréquence et la tension. Globalement 6 régimes sont observés :

1. Régime 1 **Collection des particules au centre des électrodes (ACEO et pDEP).** A faibles fréquences ($f < 10$ kHz) et faibles conductivités (eau déionisée), les particules sont concentrées au milieu des électrodes supérieure et inférieure. Les particules sont soumises à un fort régime ACEO. L'augmentation de la tension accroit la concentration de particules et la création d'une traînée de particules suivant les lignes de courant perpendiculaires aux électrodes. Que ce soit pour les barres verticales ou les pièges circulaires, les particules sont placées au centre des électrodes et restent dans cette position aussi longtemps que le potentiel est appliqué. Comme pour les électrodes coplanaires, les particules sont également sous le régime de pDEP ce qui les maintient juste au dessus de l'électrode. A faible tension, la pDEP semble suffisamment forte sur ces particules pour éviter qu'elles ne soit éjectées de l'électrode et entrainées dans les mouvements de rouleaux convectifs. Dans le cas des électrodes perpendiculaires, l'accumulation des particules semblent seulement apparaître à l'intersection entre les électrodes supérieures et inférieures. Les trainées de convection à longue portée sont toujours présentes. On ne peut remarquer de mouvements à ces fréquences pour les conductivités élevées, probablement dû au fait que l'ACEO est très fortement atténuée et ne peut induire de mouvement de liquide (voir figure 5.2a). Les rouleaux de convection et les contre-rouleaux entrainant les particules sur les bords des électrodes peuvent être visualisés sur le coté comme le montre la figure 5.9.

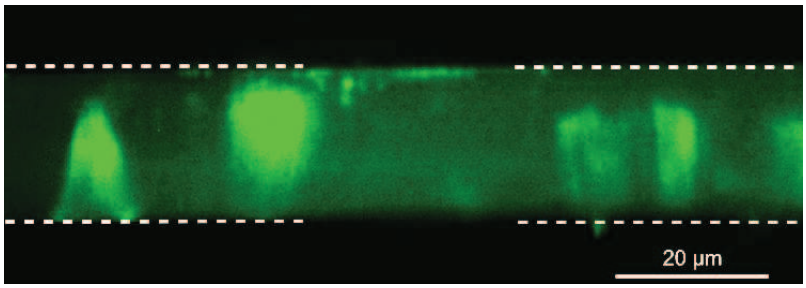


Figure 5.9 – Comportement à dominance ACEO et pDEP pour $\sigma_p = 2.10^{-4}$ S/m, $f = 200Hz$ et $V_{p-p} = 5$ V.

2. Régime 2 **Collection sur les bords des électrodes avec position stable (ACEO et nDEP).** À conductivité intermédiaire (eau saline) et à basses fréquences ($f < 100$ kHz), les particules semblent s'accumuler à la fois au centre et sur les bords des électrodes. Ces comportements peuvent être expliqués par la présence d'ACEO à cette gamme de fréquence. L'accumulation aux bords pourrait suggérer une réponse de pDEP, qui n'est pourtant pas présente à ces conductivités. Ainsi, ce comportement pourrait résulter d'une compétition de force entre la convection induite par l'ACEO et un comportement de nDEP présent uniquement aux bords des électrodes. Contrairement au cas précédent où les particules stagnent au centre des électrodes, les particules ici se déplacent le long du centre des électrodes. Ce dernier comportement met l'accent sur la concurrence entre l'ACEO et la diélectrophorèse. Vu sur le côté, les particules sont situées sur les bords des électrodes et les rouleaux de convection peuvent être observés sur le coin inférieur droit de la figure 5.10.

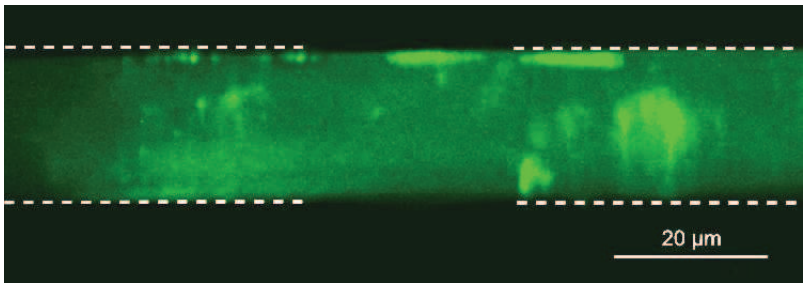


Figure 5.10 – Comportement à dominance ACEO et nDEP pour $\sigma_p = 10^{-2}$ S/m, $f = 1$ kHz et $V_{p-p} = 5$ V.

3. Régime 3 **Collection sur les bords des électrodes avec présence de rouleaux convectifs (pDEP et ETE).** A $f = 50$ kHz, $f = 500$ kHz et à faible conductivité (eau déionisée), les particules sont positionnées sur les bords des électrodes avec des mouvements de convection clairs comme le montre la figure 5.11. A ces fréquences, les particules sont sous le régime de pDEP mais l'ETE entraîne les particules dans des rouleaux convectifs. Cet effet peut être vu quand la tension augmente. A fréquences plus élevées, le signe de Π change et les rouleaux convectifs tendent à repousser les particules à partir des bords.

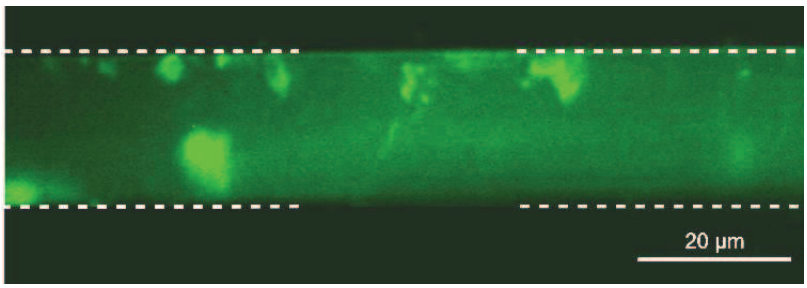


Figure 5.11 – Comportement à dominance ETE et pDEP pour $\sigma_p = 2.10^{-4}$ S/m, $f = 50$ kHz et $V_{p-p} = 5$ V.

4. Régime 4 **Collection sur les bords des électrodes avec rouleaux convectifs et formation de chaines de particules (nDEP faible et ETE).** Pour $f = 50$ kHz et à conductivité saline, les particules sont attirées vers les bords des électrodes et forment des chaînes de particules. Ce comportement a été observé dans la littérature [Yuan 2004, Arnold 2007] mais dans une configuration d'électrodes coplanaires. En configuration tridimensionnelle, les chaînes de particules apparaissent à la fois dans le plan des électrodes inférieure et supérieure, mais également entre électrodes verticales elles-mêmes. Dans le cas de la diélectrophorèse négative, le chaînage des particules est le résultat de faible intensité de champ électrique entre les particules qui s'attirent les unes aux autres [Oh 2009]. A noter qu'il n'y a pas de chaînes dans les géométries pièges circulaires et barres perpendiculaires mais les particules semblent attirées par les bords extérieurs des électrodes. Ces comportements peuvent résulter d'une compétition entre l'ACEO et la force ETE [Oh 2009]. Dans la géométrie barres verticales, les forces électrocinétiques sont symétriques et ont les mêmes schémas de rouleaux de convection comme ont montré les modélisations. Dans le cas des autres géométries, les lignes de courant ne sont pas nécessairement symétriques, ce qui annihile les comportements de chainage pour les particules qui sont "loin" des zones de forts gradients. Au final, certaines particules sont attirées par

les bords des électrodes. Les chaînes de particules peuvent être vues dans le plan XZ en coupe comme le montre la figure 5.12 où les chaînes se trouvent le long de l'axe z.

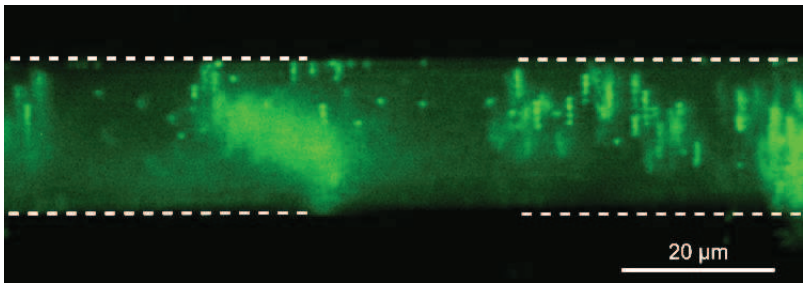


Figure 5.12 – Comportement à dominance ETE et nDEP pour $\sigma_p = 1.38$ S/m, $f = 50$ kHz et $V_{p-p} = 5$ V.

5. Régime 5 **Collection devant les électrodes avec position stable (nDEP fort).** Aux fréquences élevées, les particules sont repoussées devant les électrodes. Un alignement en ligne unique peut être observé pour les barres verticales. Les particules sont concentrées au centre des pièges circulaires et repoussées de sa limite extérieure. Pour les barres perpendiculaires, les particules sont placées entre les électrodes alignées verticalement. Tous ces comportements suggèrent un régime diélectrophorétique sans rouleaux convectifs. Il apparaît une tension limite supérieure où l'ETE redevient dominant et impose un régime convectif. Les particules sont repoussées des électrodes et situées dans un plan moyen comme le montre la figure 5.13.

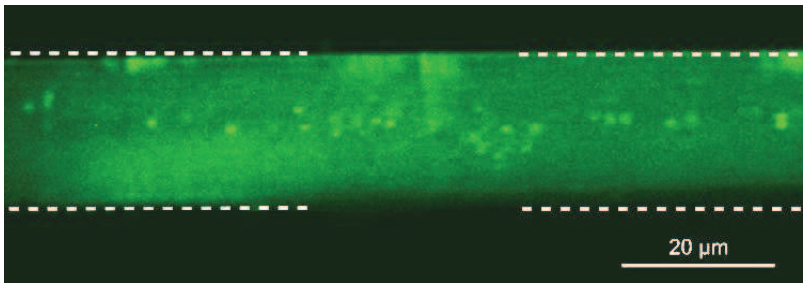


Figure 5.13 – Comportement à dominance nDEP pour $\sigma_p = 2.10^{-42}$ S/m, $f = 2$ MHz et $V_{p-p} = 10$ V.

6. Régime 6 **Collection devant les électrodes avec rouleaux convectifs (nDEP forte et ETE).** Les particules sont repoussées des électrodes à hautes fréquences, mais lorsque la tension augmente, des rouleaux de convection induits par l'ETE entrainent et accumulent les particules vers les bords des électrodes. Dû aux contre rouleaux de convection ce phénomène est aussi observé pour les particules qui ne sont pas à proximité des électrodes. Proches des électrodes, les particules sont repoussées par nDEP puis de nouveau entrainées par convection vers les bords des électrodes. Ces rouleaux de convection contribuent avec la nDEP à créer une barrière infranchissable pour les particules dans le cas des barres verticales et ce malgré un flux hydrodynamique d'entrainement. Les particules semblent plus centrées et repoussées à la fois pour les pièges circulaires. Pour les barres perpendiculaires, les particules sont encore repoussées des électrodes et se positionnent entre les électrodes verticales. Cependant dans ce dernier cas, il est fort probable que l'électrode voisine doit

être active afin de maintenir une position stable puisque les rouleaux convectifs ont tendance à pousser les particules loin des bords de l'électrode où elles ne sont plus soumises à la nDEP comme le montre la figure 5.14.

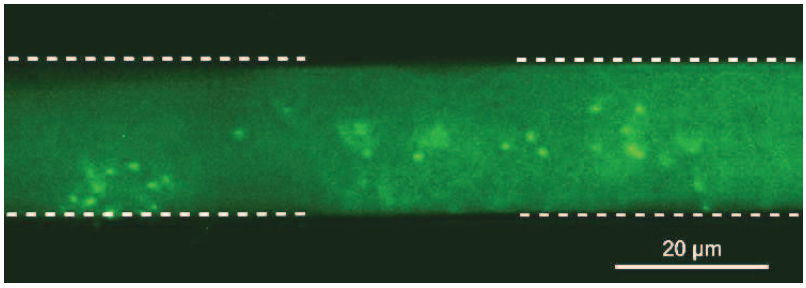


Figure 5.14 – Comportement à dominance ETE et nDEP pour $\sigma_p = 1.38$ S/m, $f = 2$ MHz et $V_{p-p} = 10$ V.

La détermination expérimentale des localisations des particules colloïdales pour un couple fréquence/tension et à une conductivité donnée montre que le comportement des particules est rarement soumis à une seule force. Nous avons identifié 6 régimes principaux de déplacement des particules relativement aux électrodes selon la conductivité du milieu et le couple fréquence - tension appliqué.

Les tableaux 5.1, 5.2 and 5.3 synthétisent l'ensemble des situations présentées pour ces régimes pour chaque géométrie d'électrode et avec des particules de polystyrène de 1 μm de diamètre.

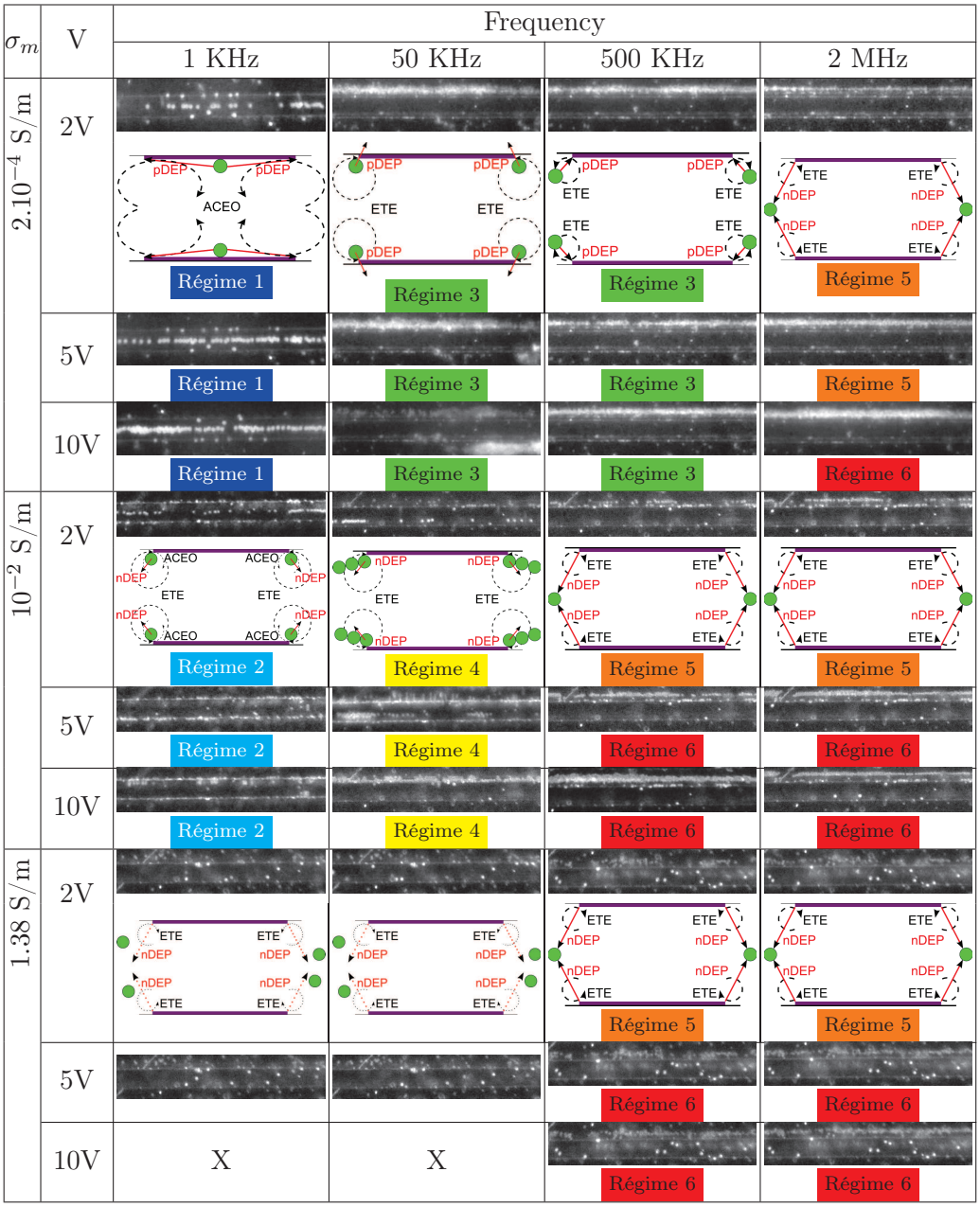


Table 5.1 – Localisation spatiale des particules de 1 μm de polystyrène dans la géométrie barres verticales aux couples fréquence/tension sélectionnés et à conductivités du milieu croissantes.

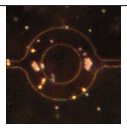
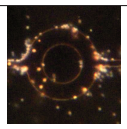
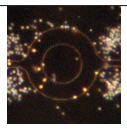
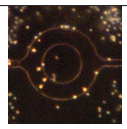
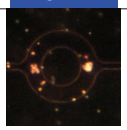
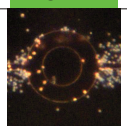
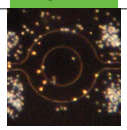
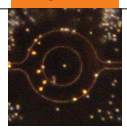
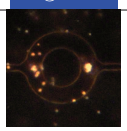
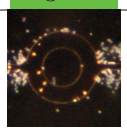
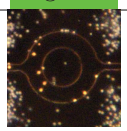
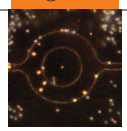
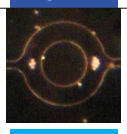
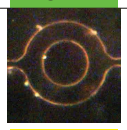
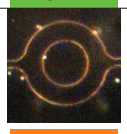
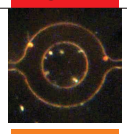
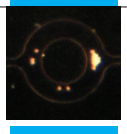
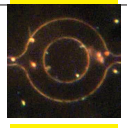
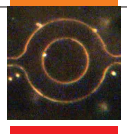
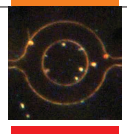
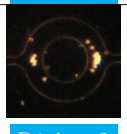
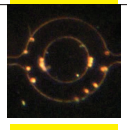
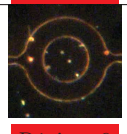
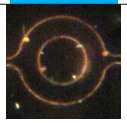
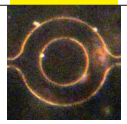
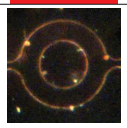
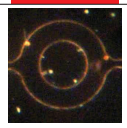
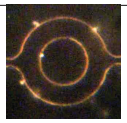
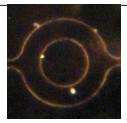
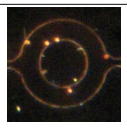
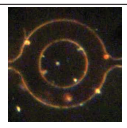
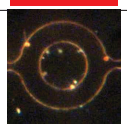
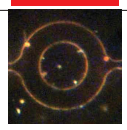
σ_m	V	Frequency			
		1 KHz	50 kHz	500 kHz	2 MHz
2.10^{-4} S/m	2V	 Régime 1	 Régime 3	 Régime 3	 Régime 5
	5V	 Régime 1	 Régime 3	 Régime 3	 Régime 5
	10V	 Régime 1	 Régime 3	 Régime 3	 Régime 6
10^{-2} S/m	2V	 Régime 2	 Régime 4	 Régime 5	 Régime 5
	5V	 Régime 2	 Régime 4	 Régime 6	 Régime 6
	10V	 Régime 2	 Régime 4	Régime 6	 Régime 6
1.38 S/m	2V			 Régime 5	 Régime 5
	5V			 Régime 6	 Régime 6
	10V	X	X	 Régime 6	 Régime 6

Table 5.2 – Localisation spatiale des particules de 1 μm de polystyrène dans la géométrie pièges circulaires aux couples fréquence/tension sélectionnés et à conductivités du milieu croissantes.

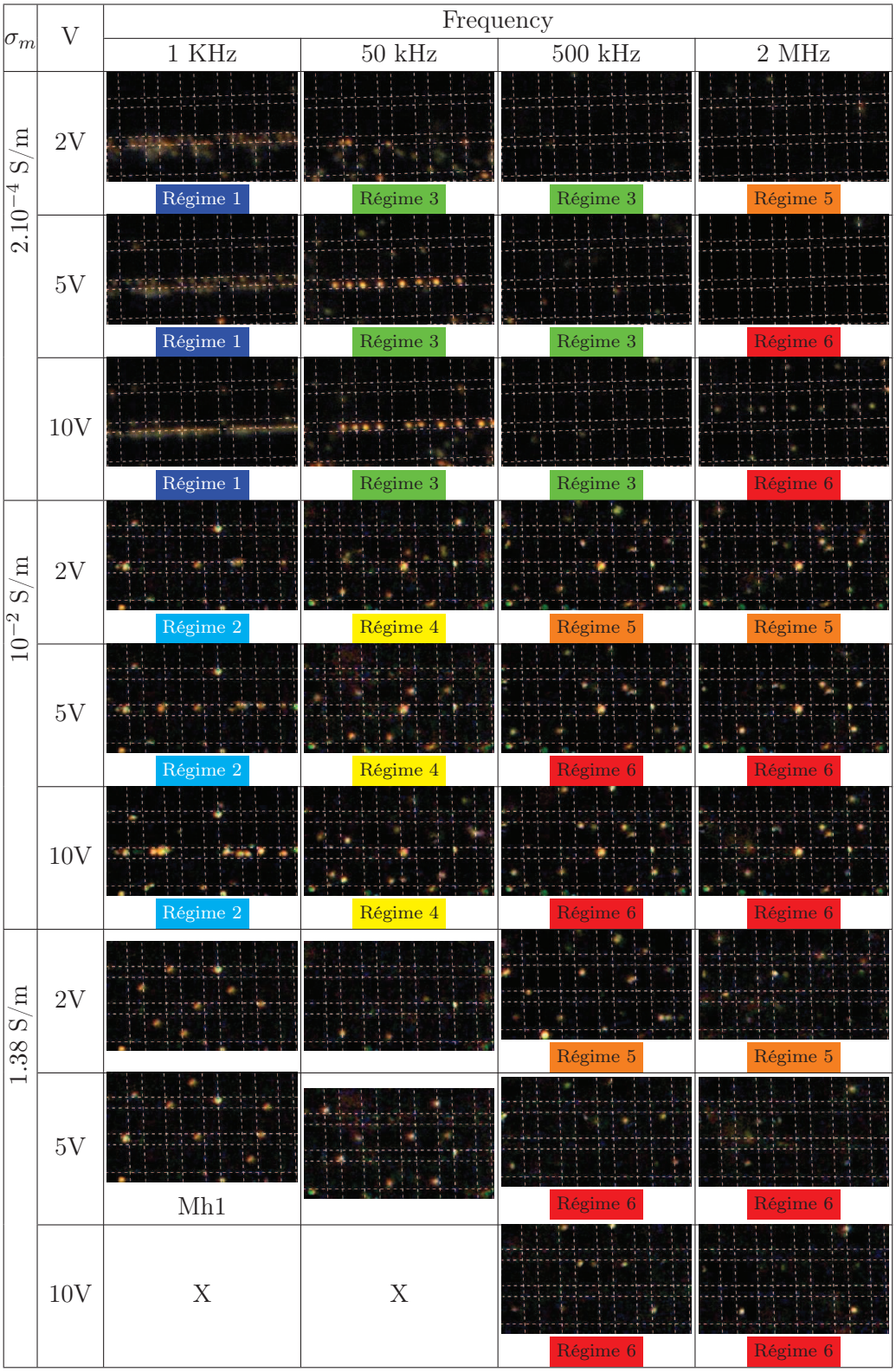


Table 5.3 – Localisation spatiale des particules de 1 μm de polystyrène dans la géométrie barres perpendiculaire aux couples fréquence/tension sélectionnés et à conductivités du milieu croissantes.

5.2 Manipulation tridimensionnelle collective - Fonctions clés

Nous avons déterminé la localisation de particules colloïdales relativement aux 3 géométries d'électrodes pour différentes conductivités de milieu, tailles de particules, fréquences et tensions appliquées. De façon à créer un mouvement de particules, ces géométries peuvent être modifiées, assemblées en matrice ou associées à une variation temporelle du champ électrique. Ainsi, en fonction des formes des paires d'électrode ou des paramètres du champ électrique appliqué, il est possible de définir des fonctions clés pour la manipulation de particules colloïdales. Ces fonctions créent des déplacements déterministes de particules relativement aux électrodes. De plus, en utilisant la force hydrodynamique d'entrainement qui *pousse* les particules le long du canal microfluidique, il devient possible d'effectuer du tri, du piégeage ou de la localisation tridimensionnelle de ces particules. On peut alors distinguer les fonctions clés qui peuvent manipuler en masse un ensemble de particules colloïdales ou celles qui peuvent manipuler des particules à l'échelle individuelle.

La géométrie tridimensionnelle de la puce microfluidique permet de créer des $\nabla|E|^2$ dans l'ensemble du canal microfluidique. De cette manière, l'ensemble des particules injectées dans le canal microfluidique est soumis aux forces électrocinétiques à contrario des géométries co-planaires où demeurent une répartition spatiale de $\nabla|E|^2$ localisée au niveau des électrodes seulement. Ainsi, il devient possible d'effectuer une manipulation sur l'ensemble des particules injectées dans le canal microfluidique.

5.2.1 Fonction Stop / Séparation

Principe

En utilisant les barres verticales de part et d'autre du canal microfluidique sur toute sa largeur et perpendiculaire à celui-ci, l'ensemble des particules injectées dans le canal sont soumises à $\nabla|E|^2$. Conformément au paragraphe précédent, en induisant un comportement de nDEP (avec ou sans ETE), les particules peuvent être arrêtées devant les électrodes sans pouvoir passer à travers, et ce malgré un flux hydrodynamique d'entrainement. Cette fonction est dite fonction *Stop* et est schématisée sur la figure 5.15.

Efficacité d'arrêt et performances

On définit alors l'efficacité d'arrêt par le ratio du nombre de particules passant à travers les électrodes sur le nombre total de particules en amont des électrodes.
Pour un débit donné $Q = 500$ pL/s et en condition de nDEP à $f = 2$ MHz, on évalue cette efficacité en fonction de la tension pour les 3 conductivités étudiées.

Comme le montre la figure 5.16a, il apparait un palier au dessous duquel les particules sont faiblement piégées (typiquement Efficacité $< 5\%$ pour $3V_{p-p}$ dans de l'eau déionisée) où la force diélectrophorétique n'est pas assez puissante pour contrer le flux hydrodynamique d'entrainement et à l'inverse un palier supérieur arbitrairement placé à 95 % de l'efficacité au dessus duquel les particules sont toutes piégées.
A ce débit et pour toutes les conductivités, les particules sont arrêtées lorsque la tension est maximale. Ainsi, à fréquence de nDEP et à tension maximale, la capacité de positionner les particule en amont des barres verticales et des maintenir dans cette position malgré un flux

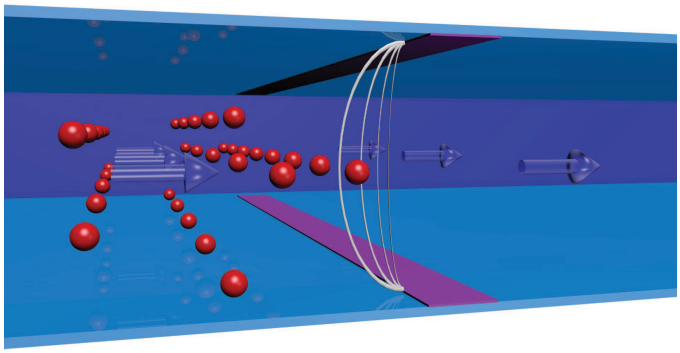
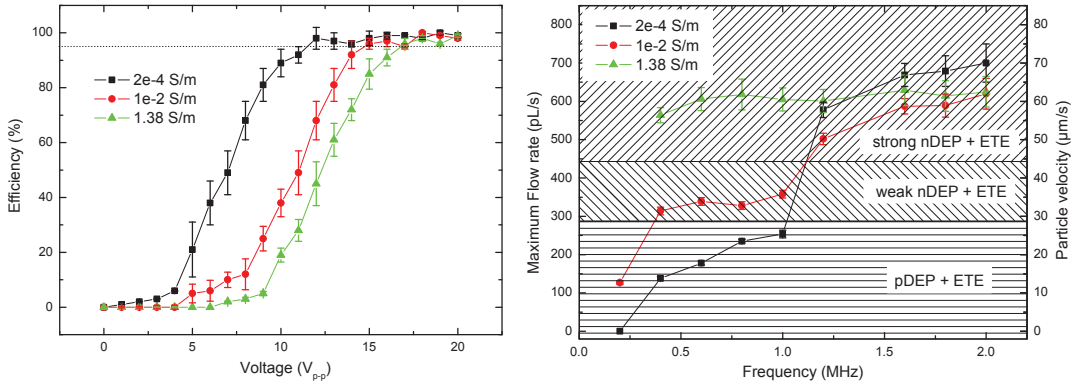


Figure 5.15 – Schéma de la fonction stop. Les particules sont injectées dans le canal microfluidique et les particules sont repoussées par diélectrophorèse négative devant les électrodes et ce malgré le flux hydrodynamique d'entrainement.



(a) **(b)**

Figure 5.16 – (a) : Efficacité d'arret de la fonction stop pour des particules de 1 μm de polystyrène à conductivités croissantes. La fréquence d'arret est fixée à $f = 2$ MHz. La ligne pointillée représente une éfficacité de 95%. (b) : Débits maximaux d'arret des particules colloïdales à différentes fréquences et aux conductivités croissantes pour des particules de polystyrène de 1 μm. Les débits maximums sont évalués lorsque au moins 10 particules traversent les barres verticales.

hydrodynamique d'entrainement est donc principalement conditionnée par le débit imposé, donc la vitesse des particules colloïdales arrivant sur le front d'électrodes.
Cependant, il est aussi possible d'arrêter les particules grâce à l'utilisation conjointe de la force diélectrophorétique et de la force électrothermique comme présenté dans le paragraphe précédent (tableau 5.1). Les performances de la fonction stop à soutenir un débit donné sont donc évaluées en se plaçant dans les différents régimes identifiés précédemment (forte tension ($V_{p-p} = 20$ V) et fréquences variables) et en augmentant progressivement le débit. La figure 5.16b montre les débits maximaux d'arrêt des particules colloïdales en fonction des conductivités étudiées et des fréquences imposées. On peut observer alors un débit au delà duquel les particules ne sont plus arrêtées mais entrainées malgré les forces électrocinétiques. Ce débit est quantifié lorsque au moins 10 particules passent à travers les barres verticales.
Il apparait alors 3 types de régimes identifiés selon les fréquences imposées :

– **Régime pDEP et ETE.** En régime diélectrophorétique positive et à fort tension (20 V),

les particules sont à la fois attirées proches des électrodes par diélectrophorèse mais aussi repoussés par ETE. L'ETE étant relativement grand à ces tensions (voir les modélisations numériques), les particules sont repoussées devant les électrodes mais la contribution de la pDEP tend au contraire à les attirer vers les électrodes. Si les particules sont trop proche du bord des électrodes, elles sont éjectées du piège et sont ensuite entrainées par le flux hydrodynamique.

- **Régime nDEP faible et ETE.** Proche de la fréquence de coupure des particules, le régime diélectrophorétique négatif est faible et les particules sont faiblement repoussées devant les électrodes. A ces fréquences, l'ETE est prédominant et les particules sont repoussées et les deux contributions permettent de maintenir les particules pour des débits allant jusqu'à 350 pL/s.
- **Régime nDEP forte et ETE.** Lorsque la diélectrophorèse est fortement négative ($Re(\omega) = -0.5$), les deux forces contribuent à repousser les particules et maintenir des débits allant jusqu'à 650 pL/s, ce qui correspond à des vitesses d'arrivée de particule en front d'électrode jusqu'à 70 μm/s.

Pour une conductivité, une taille et un matériau donnés, il est alors possible d'accumuler des particules à un emplacement du canal microfluidique tout en continuant à injecter du liquide.

Tri de particules

Il est également possible de réaliser de la séparation continue d'une solution colloïdale binaire A et B grâce à l'exploitation de la fonction stop en fonctionnement continue et en connaissant les fréquences de coupure des particules A et B. Alors que les particules A seraient piégées par diélectrophorèse à la fréquence de coupure des particules B, ces dernières et uniquement celles-ci passeraient à travers le piège. En parallélisant les fonction stop et en appliquant un couple fréquence/tension différent sur chacune d'elle, il devient alors possible de faire de la séparation de taille et de matériau d'une solution colloïdale mixte .

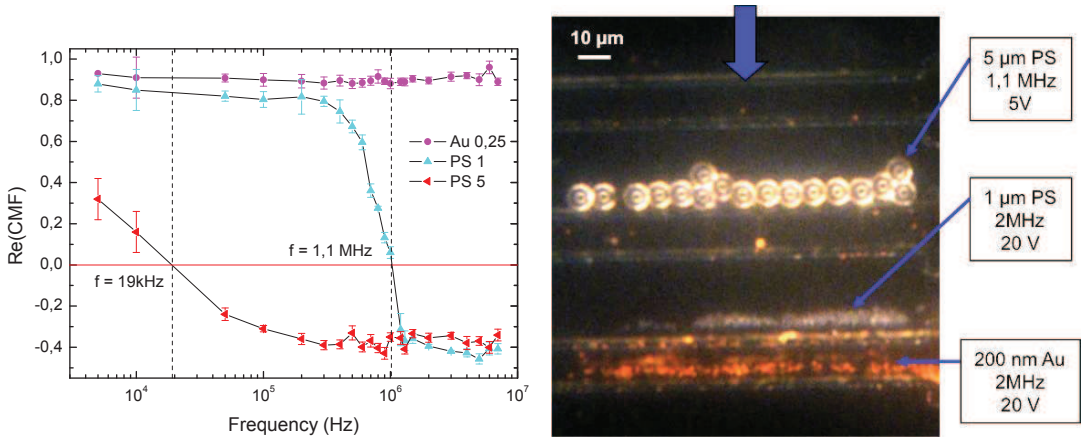
La figure 5.17 montre un exemple de séparation de particules de polystyrène de 5 et 1 μm et d'Au de 250 nm. La fréquence de coupure des particules de polystyrène 1 μm est appliquée à la première électrode à faible tension, ce qui permet de piéger les particules de 5 μm car leur réponse est négative et 25 fois plus importante que celle des particules de 1 μm et de 250 nm d'Au. La seconde électrode est placée à haute fréquence et forte tension pour piéger respectivement négativement et positivement les particules de polystyrène 1 μm et d'Au.

> La fonction stop permet d'accumuler des particules colloïdales jusqu'à une efficacité de d'arrêt supérieure à 95 % et sous débit continu jusqu'à 650 pL/s. De plus, la fonction stop peut être utilisée pour effectuer une séparation de taille ou de matériau sous flux continue d'une solution colloïdale mixte.

5.2.2 Fonction Focalisation

Principe

La focalisation de particules en canal microfluidique doit permettre d'aligner une à une les particules dans le sens d'écoulement du liquide de façon à effectuer des analyses séquentiels sur chacune des particules parmi l'ensemble injecté. Il serait alors possible de réaliser du comptage continu, de l'analyse optique en fluorescence en continu ou de la spectroscopie localisée à un



(a) (b)

Figure 5.17 – (a) : Facteur de Clausius-Mossotti des particules de polystyrène 5 et 1 μm et d'Au 250 nm. (b) : Les fréquences de coupure identifiées et appliquées successivement aux fonctions stop permettent de trier les particules sous flux incident à Q=500 pL/s.

endroit donnée.

Les électrodes coplanaires ne pouvant pas contrer le flux hydrodynamique d'entrainement puisque les particules s'échappent nécessairement de la zone d'action de la diélectrophorèse, une géométrie tridimensionnelle d'électrode est requise. Ainsi, des géométries bi-planaires en forme d'entonnoir et à base de diélectrophorèse négative ont été proposées et modélisées [Sun 2008], comme par exemple des électrodes en "V" [Fiedler 1998, Holmes 2006]. La forme d'entonnoir superposés semble être la plus efficace parmi les géométries proposées [Morgan 2003b].

Cette géométrie d'électrodes en entonnoir crée la fonction focalisation et utilise 4 barres verticales alignées 2 à 2 verticalement. En appliquant un couple fréquence/tension qui permet de repousser les particules devant les électrodes, celles-ci sont contraintes de circuler dans le canal virtuel ainsi crée comme le montre la figure 5.18a.

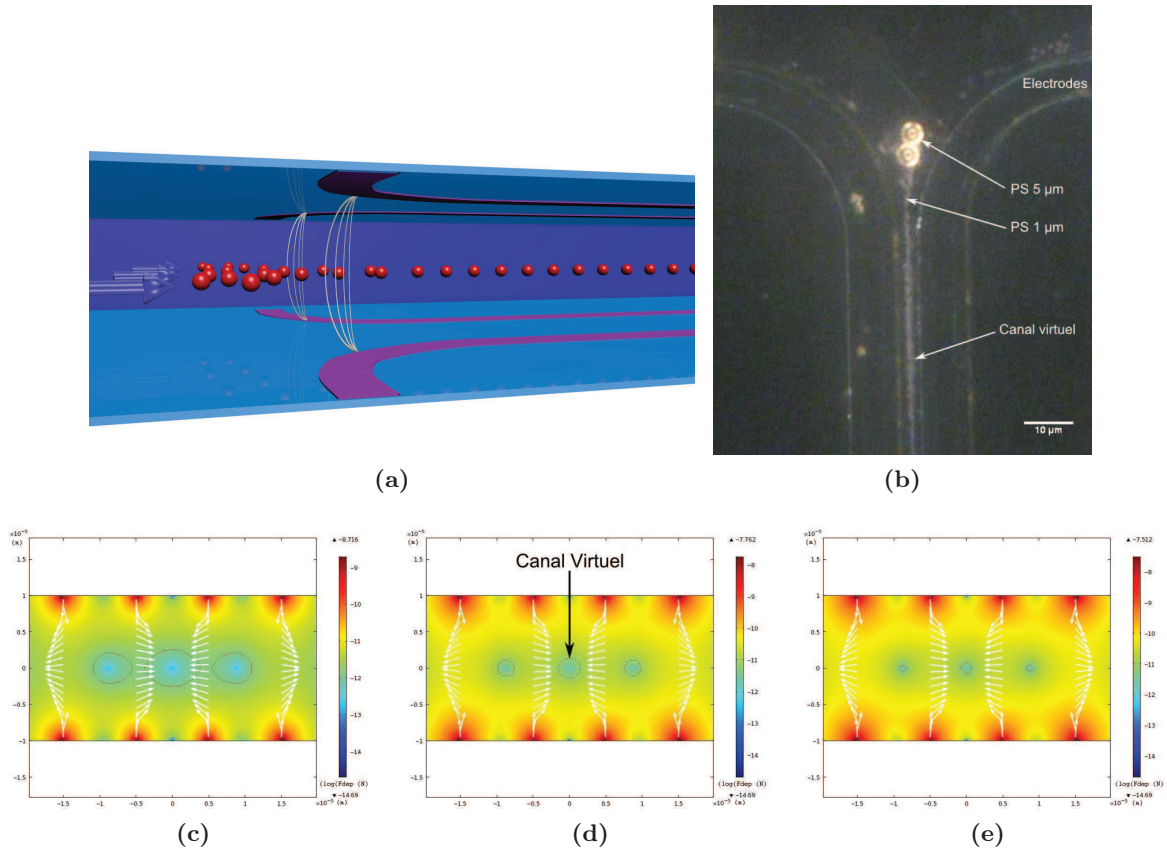


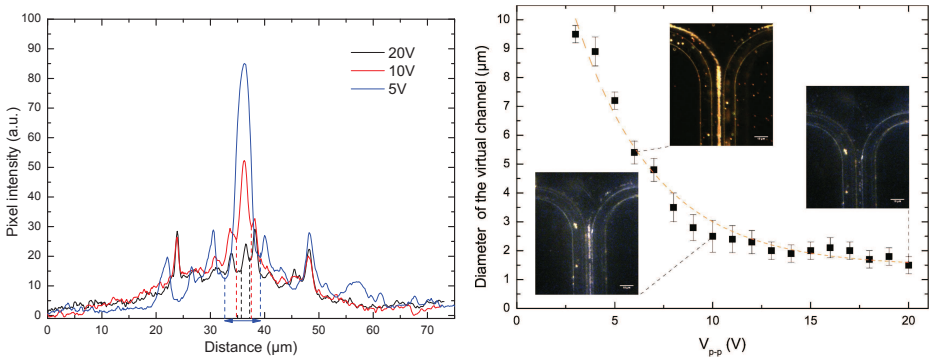
Figure 5.18 – (a) : Schéma de principe de la fonction focalisation où les particules sont injectées et focalisées sous flux. (b) : Photographie vue de dessus de particules de polystyrène de 1 μm focalisées sous flux à Q=500 pL/s, f=2MHz et $V_{p-p} = 10$ V. Modélisation en vue de coupe du diamètre du canal virtuel lorsque (c) : $V_{p-p} = 5$ V, (d) : $V_{p-p} = 15$ V et (e) : $V_{p-p} = 20$ V.

Les électrodes sont placées au centre du canal microfluidique et la partie haute de l'entonnoir fait que les particules sont accumulées devant les électrodes comme pour la fonction stop et "tombent" ensuite dans le canal virtuel imposée par la forme d'entonnoir.

Diamètre du canal virtuel

Le diamètre du canal virtuel dépend de la tension imposée entre les électrodes. Il est alors possible de faire passer des particules dans le piège avec un diamètre de focalisation contrôlée. Comme le montre la figure 5.18b où des particules de polystyrène de 5 et de 1 μm de diamètre sont insérées dans le piège de focalisation, la taille du canal virtuel imposée par les conditions de piégeage permettent aux particules de 1 μm de passer et d'être focalisées alors que celles de 5 μm stagnent devant l'entrée du canal virtuel.
Une modélisation en vue de coupe permet de quantifier la taille de ce canal comme le montrent les figures 5.18c, 5.18d et 5.18e. La valeur de la force limite de piégeage est fixée à partir des cartographies de rapport de force présentées au chapitre précédent (figure 5.7) dans les conditions de diélectrophorèse négative (f = 2MHz).
Les diamètres du canal virtuel sont quantifiés expérimentalement en fonction du potentiel électrique en mesurant la moyenne de la largeur d'un faisceau de particules de polystyrène

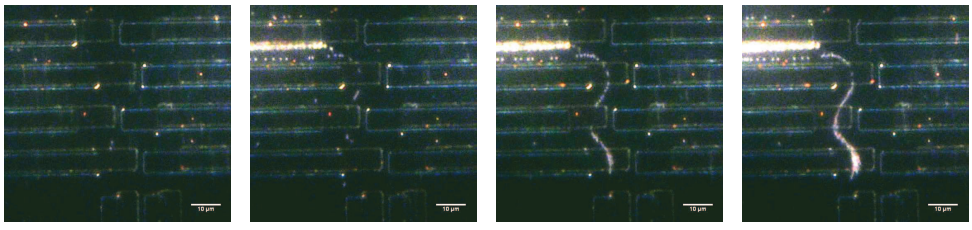
de 1 μ de diamètre. En régime stationnaire, l'histogramme d'une ligne de 50 μm de large perpendiculaire au canal virtuel est tracée (figure 5.19a). Les pics d'intensités représentent la présence de particules et les largeurs sont évaluées aux pieds des pics centraux. La figure 5.19b montre que la fonction focalisation permet de focaliser des particules de 9 à 1 μm de diamètre (l'espace inter-électrodes dans le plan est de 10 μm). Les résultats issus des modélisations représentés en ligne pointillés rouges montrent que seule la diélectrophorèse est responsable de ce comportement de focalisation assistée par flux hydrodynamique d'entrainement.



(a) (b)

Figure 5.19 – 5.19a : Histogramme d'une image de focalisation à différents tension. Le diamètre du canal virtuel est mesurée au pieds des pics centraux. 5.19b : Évolution expérimentale du diamètre du canal virtuel en fonction de la tension appliquée et en ligne pointillée rouge le diamètre du canal issus des modélisation.

Basée le même principe de cette fonction focalisation, il est possible de discrétiser le chemin virtuel en plaçant des paires d'électrodes de type barres verticales les unes en face des autres et décalées 2 à 2, comme le montre la figure 5.20. Il est alors possible de faire varier le diamètre du canal virtuel en cours de focalisation en appliquant des tensions différentes sur les paires d'électrodes. De plus, en fin de parcours, une fonction stop est générée et les particules peuvent être accumulées.



(a) (b) (c) (d)

Figure 5.20

La fonction focalisation, continue ou discontinue, permet de maintenir un flux de particules en un emplacement donné du canal microfluidique par un choix judicieux de la géométrie d'électrode en entonnoir couplée à un régime de diélectrophorèse négative.

5.2.3 Fonction Piège

Principe et étude d'un piège unique

La fonction pièges circulaires a été présentée au chapitre 5.1 et les effets des tensions, fréquences et conductivités ont été préalablement observées (tableau 5.2). En régime diélectrophorétique négatif, assisté ou non par ETE, il existe alors un piège virtuel tridimensionnel dont le diamètre semble être déterminé par la valeur de la tension appliquée. Comme pour la fonction focalisation, les particules sont piégées dans une sphère virtuelle qui les confine dans les 3 dimensions de l'espace. Au sein de ce piège, les particules peuvent se mouvoir librement et conservent leur mouvement Brownien. En augmentant la tension, le diamètre du piège virtuel se réduit et le mouvement de la (des) particule(s) piégée(s) sont de plus en plus confinés.

Ainsi, non seulement les particules sont situées au centre des cercles concentriques mais aussi au centre du canal microfluidique, comme le montre la figure 5.21 où la position des particules est observée en vue de dessus et en vue de coupe du canal. On observe alors plusieurs particules de polystyrène dans de l'eau déionisée de différentes tailles soumises à une régime diélectrophorétique négatif (f = 2 MHz et $V_{p-p} = 15$ V).

Lorsque les particules sont plus volumineuses que les sphères de confinement, celles ci se figent

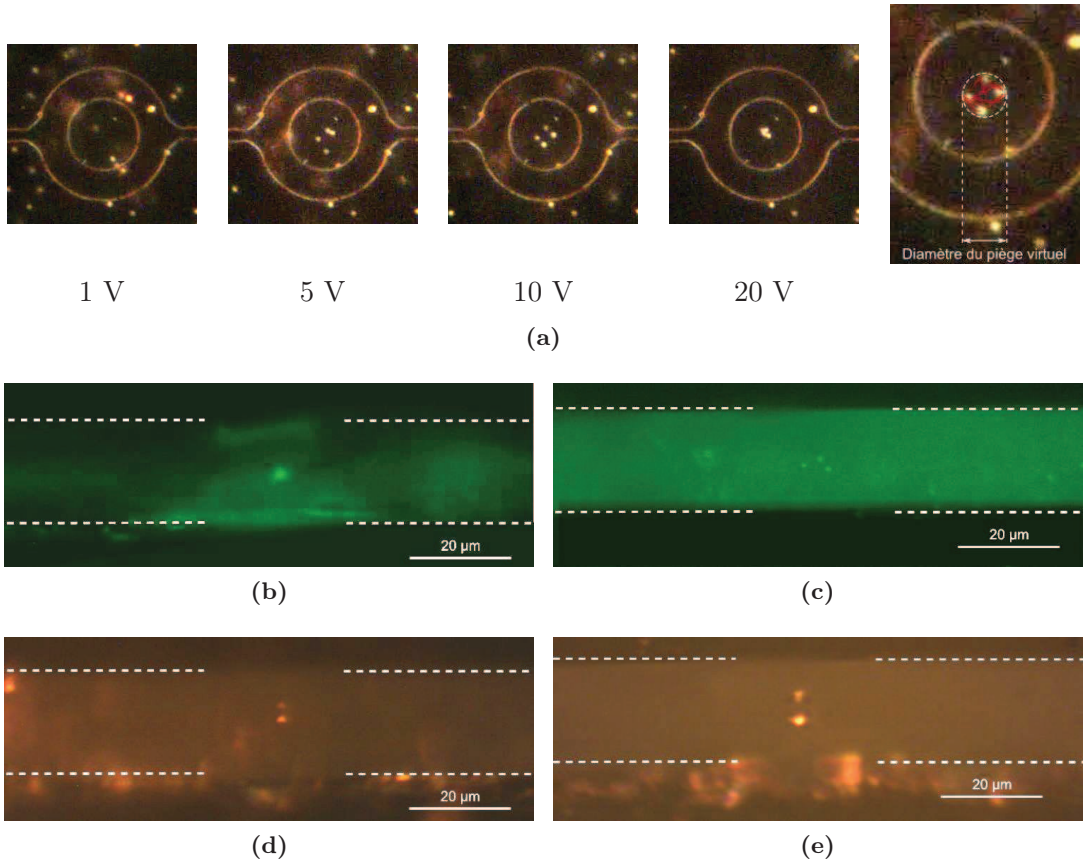


Figure 5.21 – Vue du dessus de particules de polystyrène de 1 μ de diametre piegées dans un piege unique à f=2 MHz et à tensions appliquées croissantes. La derniere image représente la trajectoire d'une particule à 10 V délimitant ainsi le diamètre du piège virtuel. Vues de coupe perpendiculaire au canal microfluidique de particules de polystyrène piégées à f = 2 MHz et $V_{p-p} = 15$ V avec différents diamètres : (b) 200 nm, (c) 1 μm, (d) 5 μm et (e) 10 μm.

à des tensions plus faibles comme le montre la figure 5.22 pour des particules de polystyrène de 5 et 10 μm de diamètre. Les diamètres des pièges virtuels sont quantifiés grâce au déplacement

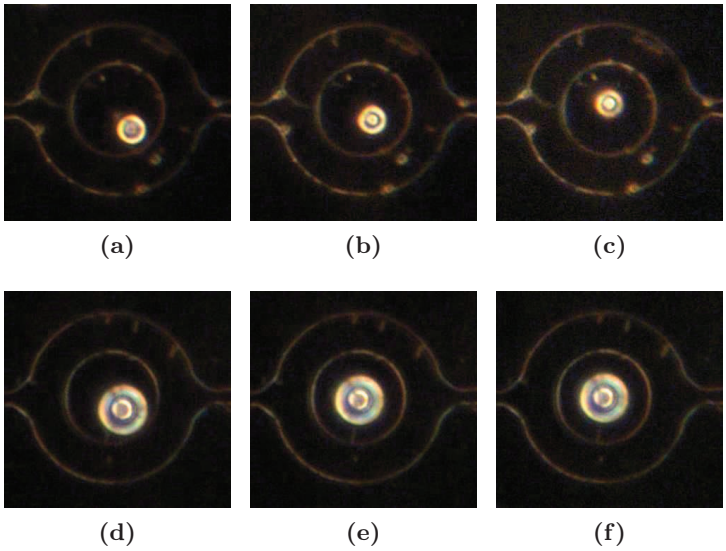
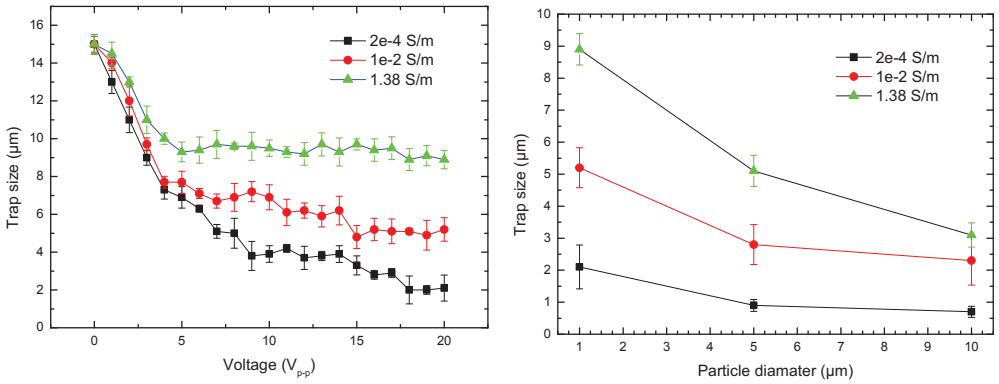


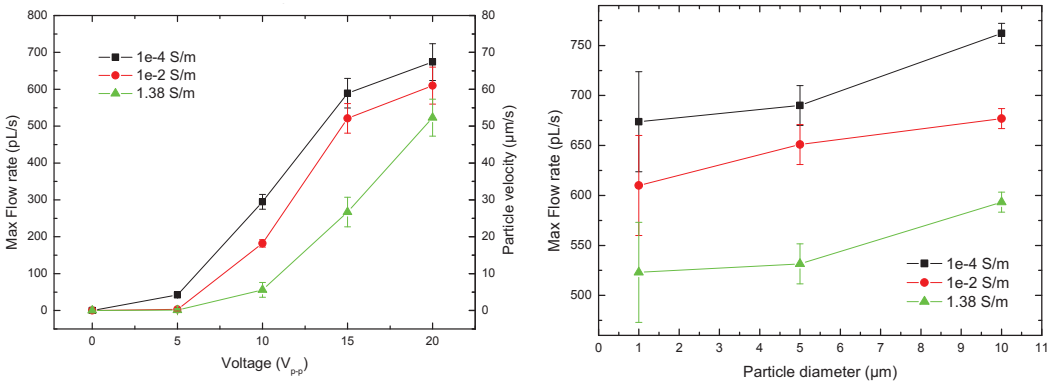
Figure 5.22 – Images de particules de polystyrène de 5 μm et 10 μm piégées à 2 MHz, 1V :(a) et (d), 5V :(b) et (e), 20V :(c) et (f)

maximaux des particules dans les pièges virtuels. Ainsi, les trajectoires des particules sont déterminées par le logiciel de détection et suivies pendant 10 secondes. Un cercle de mouvement est ensuite calculé dont le diamètre établie celui des pièges virtuels. Ce processus est répété pour chacune des particules étudiées dans les différents milieux.
La figure 5.23a montre un exemple d'évolution du diamètre d'un piège virtuel pour des particules de 1 μm de polystyrène. Sont mises en évidence la présence de paliers de saturation en dessous desquels les diamètres des pièges ne peuvent diminuer. Les valeurs de ces paliers sont nommées **taille maximum de piégeage** et traduisent la capacité d'un piège à piéger des particules. Ces maximas sont établis pour les particules de 5 et de 10 μm de diamètre comme le montre la figure 5.23b.
La capacité à créer de tels pièges centrés à la fois dans le plan d'observation du dessus mais aussi dans le plan normal à l'écoulement permet d'assurer une localisation constante dans le temps et ce malgré un flux hydrodynamique qui "pousse" la particule à s'échapper du piège. Ainsi, tant que la force diélectrophorétique est plus importante que celle d'entrainement hydrodynamique, la particule demeure à la même position. Dès lors, les particules sont placées dans les pièges à une tension de piégeage donnée puis le débit d'injection est augmenté progressivement jusqu'à ce que les particules soient éjectées du piège. A ce moment précis, le débit est référé comme débit de piégeage. Ce procédé est répété pour les conductivités croissantes comme le montre la figure 5.24a. Les débits obtenus à forte tension (20 V), sont référés comme débits maximums de piégeage et établis pour les différentes particules comme le montre la figure 5.24b.



(a) (b)

Figure 5.23 – (a) : Taille effectives des pièges virtuels pour les particules de 1 μm de polystyrène à f=2MHz. (b) : Tailles maximales des diamètres virtuels pour l'ensemble des particules aux différentes conductivités.



(a) (b)

Figure 5.24 – (a) : Évolution des débits de piégeage pour les particules de polystyrène de 1 μm en fonction de la tension appliquée à différentes conductivités. (b) : Débits maximum de piégeage des particules de polystyrène de 1 μm, 5 and 10 μm.

En résumé, la fonction piège permet pour les 3 conductivités étudiées de :
- **Localiser** les particules en 3D au centre des pièges et du canal microfluidique,
- **Confiner** les particules au centre des pièges en augmentant la tension imposée sur les électrodes. Les mouvements Brownien des particules peuvent être limités pour les particules de 1 μm voir supprimé pour les plus grosses particules.
- **Maintenir** les particules au centre des pièges sous flux hydrodynamiques. En fonction de la tension imposée, les particules peuvent soutenir des flux allant jusqu'à 750 pL/s.

Piégeage collectif

Les pièges sont parallélisés sur la puce microfluidique pour créer une matrice 53 x 53 pièges. En plaçant toutes les électrodes du haut au potentiel électrique et celles du bas à la masse, 2809 pièges sont activés au total. En injectant une quantité suffisante de particule ($> 10^5$ $part/mL$), l'ensemble des pièges peuvent être pourvus comme le montre la figure 5.25.a. avec des particules de 1 μm de diamètre. la matrice présente un taux de piégeage global supérieure à 95 % (au

moins 2660 pièges pourvus sur 2809).
Les particules étant uniformément réparties dans la matrice avant l'activation des pièges, celles ci se positionnent aussi bien dans les pièges qu'entre ceux-ci. En effet, les puits de potentiels sont aussi présents entre les pièges. Une manière de s'affranchir de ces particules consiste à utiliser la puissance de la fonction piège à maintenir les particules malgré un flux hydrodynamique. En effet, les particules entre les pièges ne sont que partiellement piégées puisque ce piège virtuel comporte des sorties entre les pièges 2 à 2. En utilisant une fonction stop en amont du canal microfluidique pour arrêter l'alimentation en particule de la matrice de piège, les particules partiellement piégées sont entrainées par le flux jusqu'à ce qu'elles soient toutes évacuées de la matrice. La figure 5.25.b montre un exemple de particules piégées uniquement dans les pièges concentriques après évacuation des particules non désirées.

La parallélisation de la fonction piège permet de créer un réseau de particules localisées en 3D pouvant résister à des flux hydrodynamiques. De plus, la fonction piège est aussi utilisable dans ses conditions de diélectrophorèse négative à forte conductivité.

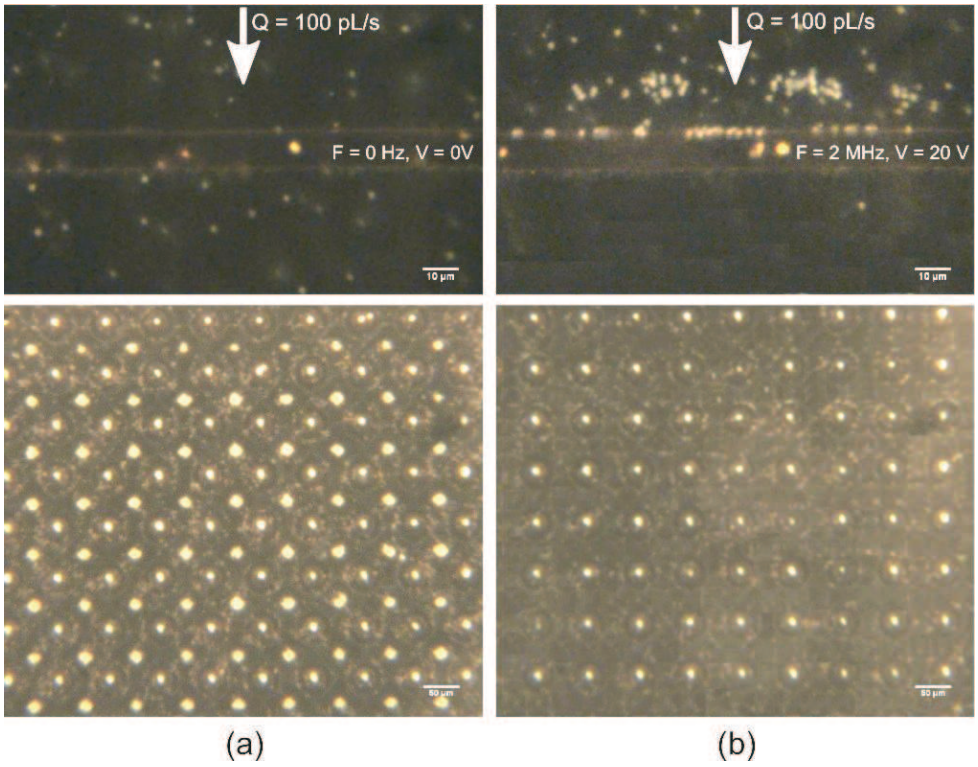


Figure 5.25 – Photographie de particules de polystyrène de 1 μm piégées dans une matrice d'électrode circulaires concentriques. (a) : les particules sont localisées dans les pièges et entre les pièges et (b) : les particules ne sont piégées que dans les pièges concentriques après blocage des particules en amont de la matrice et application d'un flux de Q=500 pL/s.

5.3 Manipulation tridimensionnelle individuelle

Les fonctions clés offrent la possibilité de manipuler collectivement les particules colloïdales pour les localiser dans un fluide dans les 3 dimensions de l'espace. L'utilisation conjointe d'un flux hydrodynamiques d'entrainement et de pièges diélectrophorétiques basés sur les géométries d'électrodes en 3D permet de manipuler toutes les particules injectées dans le canal microfluidique.

5.3.1 Observation de particules uniques

En diminuant la concentration de particules injectées dans le canal microfluidique, il devient alors possible de manipuler les particules de manière individuelle. Il est toutefois nécessaire d'injecter des particules en quantité suffisante pour qu'elles puissent être détectable dans le canal microfluidique et qu'elles puissent arriver dans la zone d'intérêt où sont localisées les électrodes sans qu'elles ne soient "perdues" avant. En effet, les particules peuvent s'absorber le long du canal microfluidique avant qu'elles n'arrivent dans la zone où sont situées les électrodes. Elles peuvent s'adsorber dans les capillaires d'injection, dans le réservoir de la puce ou sur les parois du canal microfluidique.
L'éloignement de la zone d'intérêt au réservoir constitue une surface d'adsorption pour les particules et est fixée à 2.5 cm dans les puces microfluidiques fabriquées. La quantité de particules effectivement présentes à l'arrivée dans la zone d'intérêt est mesurée en injectant une concentration connue de particules dans le canal microfluidique et en comptant les particules sur une surface rectangulaire (20 μm x 100 μm) perpendiculaire au canal microfluidique sous flux constant. Les particules de 1 μm de polystyrène sont injectées avec un débit de 100 pL/s soit des vitesses de 10 μm/s et comptées sur la surface rectangulaire pendant 2 minutes. La figure 5.26 montre la tendance suivante : plus les particules sont petites, plus elles sont adsorbées le long du canal microfluidique. De plus, à forte concentration ($> 10^6$ part/mL), la quantité de particules perdues devient négligeable par rapport à celle injectée puisque les concentrations observées dans les microcanaux sont voisines des celles injectées. Enfin, on fixe arbitrairement la quantité minimale de particules effectivement présente dans la zone d'intérêt à 1 part / 100 pL. Cette limite traduit la possibilité de voir au moins une particule dans un volume de 100 pL du canal microfluidique à un débit minimal de 100 pL/s, c'est à dire sur une longueur de canal de 25 μm=100 pL/(200 μm x 20 μm) qui correspond à la surface du champ observé à travers l'objectif 20x du microscope.

> Dès lors, il est nécessaire d'injecter 10^5 $part/mL$ pour visualiser au moins toutes les secondes une particule ayant une vitesse de 10 μm/s. De cette façon, il devient possible d'adresser des particules injectées de manière unique une fois arrivées dans la zone d'intérêt où sont placées les électrodes.

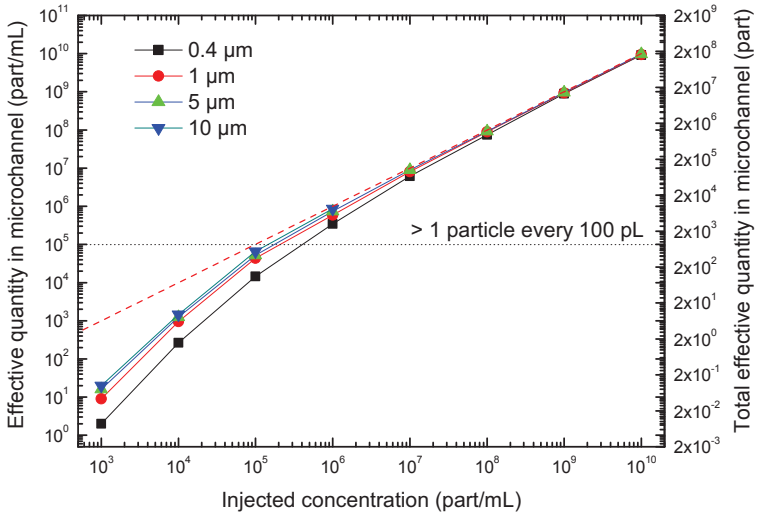


Figure 5.26 – Quantité effective de particules dans un canal microfluidique par rapport à la quantité injectée. La ligne pointillée rouge représente la quantité égale de particules effective et injectée. La limite acceptable de travail est arbitrairement fixée à 1 particule tous les 100 pL de liquide injecté.

5.3.2 Rotation de particules Janus

Les particules Janus présentées au chapitre 3.1 sont donc injectées en faible quantité (environ 5.10^5 $part/mL$). Une fois arrivées dans la zone d'intérêt, une particule est piégée entre 2 paires d'électrodes de type barres parallèles. Les particules Janus présentent un comportement diélectrophorétique positif fréquentiellement constant (voir chapitre 4). Toutefois, placées dans des pièges tridimensionnels, il apparait deux comportements distincts :

- **à basses fréquences** ($f < 200$ kHz), globalement les particules Janus sont situées au milieu des pièges, face polystyrène vers le haut,
- **à hautes fréquences** (f1.5 MHz), les particules sont toujours situées au centre des pièges mais face polystyrène vers le bas, cachant ainsi la fluorescence.

Ce comportement de rotation de la particule sur elle même est appelé "**flip-flop**", le flip correspondant à la partie Au vers le haut et le flop à la partie fluorescente vers le haut, comme le montre la figure 5.27.

Caractérisation du phénomène de flip-flop

Les fréquences de flip et de flop sont quantifiées sur les particules Janus de 100, 250 et de 500 nm d'épaisseur d'Au. Une fois une particule piégée, son intensité de fluorescence est enregistrée par un photo-spectrometre dont la zone de collection est centrée sur la particule pour un spectre de fréquence de 1 Hz à 3 MHz.

Comme le montre la figure 5.28, il apparait une rotation des particules avec des fréquences de flip communes aux 3 types de particules Janus alors que les fréquences de flop sont décalées vers les basses fréquences lorsque l'épaisseur d'Au augmente. La limite d'acceptation d'un flip est arbitrairement fixée lorsque l'intensité de fluorescence est inférieure à 20 % alors que celle d'un flop est fixée à 80 %. On peut alors définir des zones de flip et des zones de flop ainsi que des fréquences f_{flip} de flip et f_{flop} de flop pour chacune des particules Janus. A très basse fréquence ($f < 100Hz$), les particules de 100 nm et de 250 nm d'épaisseur d'Au présentent des

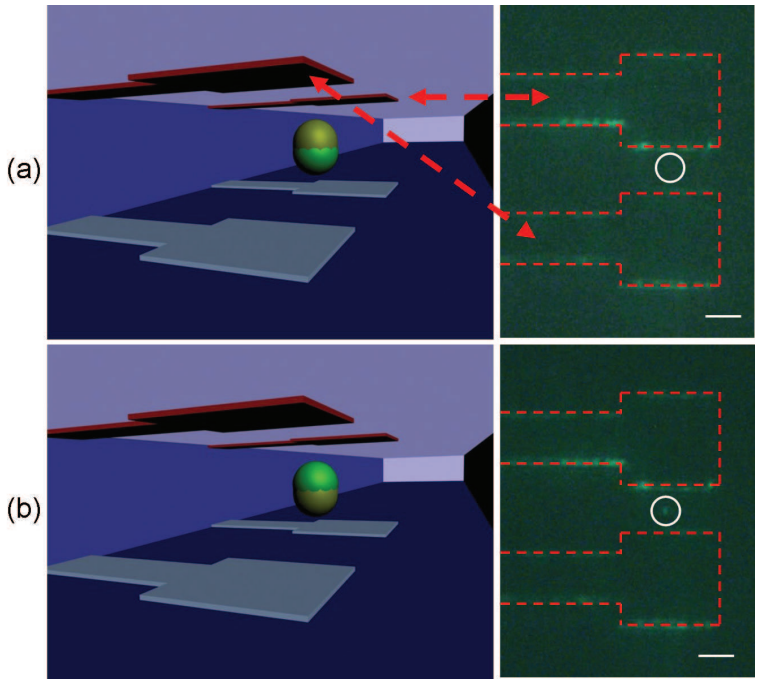


Figure 5.27 – Principe de la localisation et de la rotation des particules Janus. Les particules sont piégées en 3D par diélectrophorèse puis les fréquences de piégeage sont commutées entre les fréquence de (a) *flip* (partie Au vers le haut, pas de fluorescence) ou de (b) *flop* (partie fluorescente vers le haut et visible).

trajectoires de rotation à la fois sur elle même et à la fois suivant les vortex d'electro-osmose, ce qui induit un lissage de leur intensité de fluorescence et un comportement faussé de flop.
Les fréquences de flip et de flop sont extraites et présentées dans le tableau 5.4.

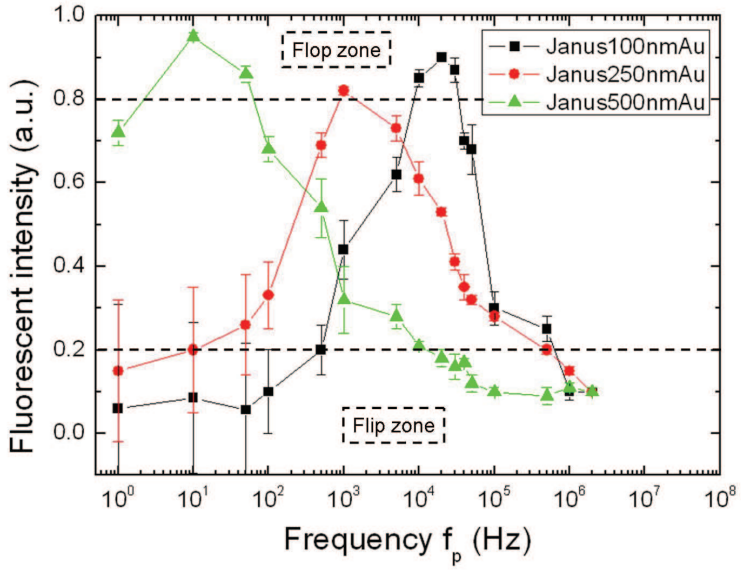


Figure 5.28 – Évolution de l'intensité de fluorescence émise par les particules Janus d'épaisseur d'Au croissante sous champs électrique alternatif. Les fréquences limites de flip et de flop sont arbitrairement fixées à 20 % et 80 % respectivement.

Performances du flip-flop

JPs Au/PS	100 nm Au	250 nm Au	250 nm Au
f_{flip}	1 MHz	1 MHz	1 MHz
f_{flop}	20 kHz	1 kHz	10 Hz

Table 5.4 – Fréquences de flip et de flop des différentes particules Janus.

Une fois piégées à une fréquence de flip ou de flop, les particules demeurent dans cette position stable jusqu'à relâchement, soit total en coupant la tension, soit en imposant une commutation inverse de celle imposée. La capacité à subir des commutation répétitive peut être quantifiée en faisant alterner successivement les fréquences f_{flip} et f_{flop} à une fréquence appelée fréquence de commutation f_c. Le signal électrique ainsi transmis à l'électrode est montré sur la figure 5.29.I. Ainsi, pendant chaque commutation, l'intensité de fluorescence est quantifiée à un taux d'échantillonnage maximale fixé par le nombre d'image acquise par la camera (20 images par secondes). La figure 5.29 montre 4 exemples d'intensités de fluorescence enregistrées pour des particules Janus d'épaisseur différentes et à des fréquences de commutations f_c croissantes. 3

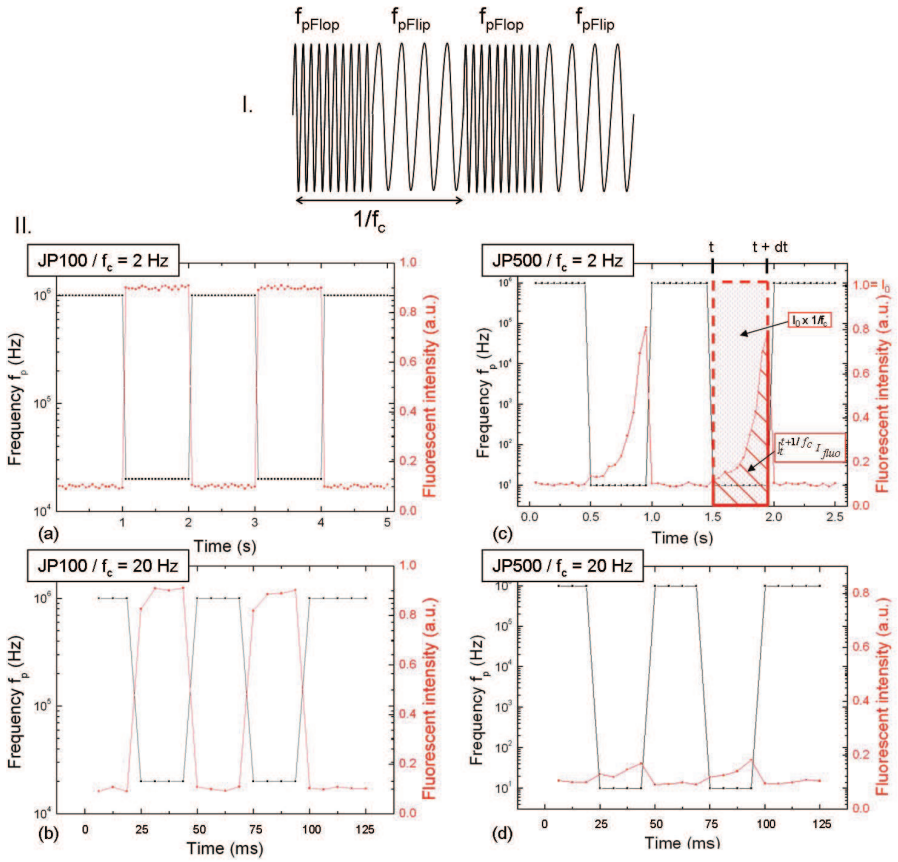


Figure 5.29 – (I). Potentiel électrique final imposée sur l'électrode de piégeage pour imposer un flip-flop continue à une fréquence de commutation f_c. (II). Graphiques temporels des fréquences f_p appliquées, successivement f_{flip} et f_{flop} en noir, et des intensités de fluorescence des particules Janus, en rouge, de 100nm d'Au pour des fréquences f_c de (a) : 2Hz, (b) : 20 Hz, et de 500nm d'Au pour des fréquences de (c) : 1Hz et (d) : 20 Hz.

types de commutation peuvent être distingués :

- **Commutation directe** (cas (a) et (b)). Les particules Janus ont une réponse directe au potentiel électrique imposé et commutent aussitôt que la fréquence de flip ou de flop est activée. Pour des commutations à haute fréquence ($f_c = 20Hz$, cas (b)), les particules Janus ont une réponse instantanée mais semblent être en retard sur le graphique, ce qui est due à une fréquence d'échantillonnage égale à la fréquence de commutation.
- **Commutation limite** (cas (c)). Les particules Janus ont tout juste le temps de finir leur rotation avant qu'une prochaine rotation soit imposée. La réponse des particules Janus à de telles fréquences de commutation est de type exponentielle croissante, ce qui peut supposer l'existence d'un temps de réponse des particules Janus pour engranger une rotation.
- **Commutation impossible** (cas (d)). La fréquence de commutation est tellement rapide que les particules n'ont pas le temps d'engranger une rotation.

On appelle la capacité de flip-flop des particules Janus la $Performance_{flip-flop}$ et est définie comme la capacité d'une particule à commuter d'une état de flip/flop à l'autre et à maintenir cet état stable jusqu'à la prochaine commutation. La performance est mathématiquement définit selon l'équation [Eq. 5.13], ce qui traduit le ratio entre l'aire couverte par l'intensité de fluorescence pendant une période de flop et l'intensité maximale de fluorescence émise par cette particule pendant une période de flop, comme le montre la figure 5.29.

$$Performance_{flip-flop} = I_0 \int_{t}^{t+1/f_c} \frac{I_{fluo}}{1/f_c}\, dt \qquad \text{[Eq. 5.13]}$$

Cette performance est évaluée pour les particules Janus de 100, 250 et 500 nm d'Au grâce à l'analyse de leurs réponses temporelles aux différentes fréquences de commutation f_c comme le montre la figure 5.30.

3 zones peuvent être distinguées selon les performances du flip-flop délimitées par 50 % et 90 %. Les performances des particules Janus à effectuer le flip-flop semblent diminuer lorsque l'épaisseur d'Au augmente : les particules Janus de 500 nm d'Au sont capable de tourner correctement ($> 90\%$) sur elle même jusqu'à une fréquence de 1 Hz et leur performance se dégrade fortement jusqu'à 2 Hz. En revanche, les particules de 100 et de 250 nm peuvent commuter jusqu'à 20 Hz avec une légère décroissance des performances des dernières.

D'un point de vue phénoménologique sur l'origine du flip-flop, la réponse diélectrophorétique positive des particules Janus devrait être suffisamment forte pour induire un mouvement attractif prédominant vers les électrodes lorsque leur Facteur de Clausius-Mossotti est maximal ($f < 10^5 Hz$). Expérimentalement, les particules sont piégées entre les électrodes, ce qui indique plutôt un comportement de répulsion depuis les électrodes, et les performances du flip-flop semblent fortement influencées par l'épaisseur d'Au sur les particules Janus. Le phénomène de flip-flop ne peut être expliqué que par la diélectrophorèse. Comme présenté au chapitre 1, l'effet d'électroosmose par induction de charge permet de mettre en mouvement des particules Janus à faible fréquence de champ électrique (inférieures à 500 Hz).

A des fréquences supérieures à 100 kHz, la réponse diélectrophorétique des particules Janus est positive et minimale ($Re(\omega) \sim 0.2$)) mais présente. De plus, grâce aux géométries tridimensionnelles des électrodes, les forces électrocinétiques piègent les particules dans une cage virtuelle tridimensionnelle à contrario des géométries co-planaires. Ainsi, et comme le montre le phéno-

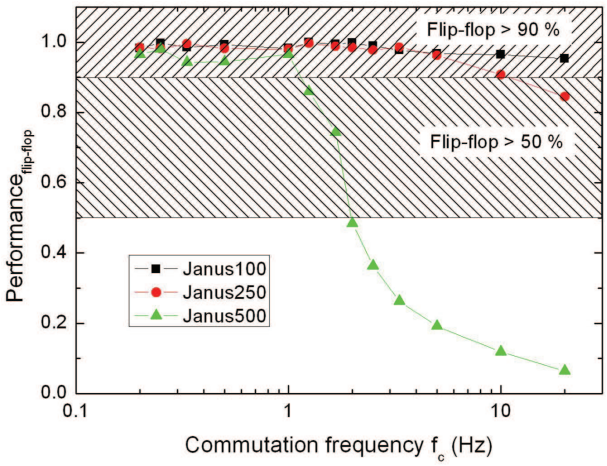


Figure 5.30 – Performances du flip-flop des particules Janus d'épaisseur d'Au croissantes. Le flip-flop est considéré comme effectif lorsqu'il est supérieur à 90 % de commutations complètes réussies.

mène du flip-flop, il semble exister une compétition entre la force diélectrophorétique et la force d'électro-osmose par induction de charge. Cette compétition de force donne naissance à une nouvelle force appelée dans la littérature "dipolophoresis" [Miloh 2008b, Miloh 2008a, Miloh 2009]. Cette force représente l'interaction conjointe de la diélectrophorèse et de l'électro-osmose par induction de charge sur une particule et peut donner un mouvement complexe dépendant du champ électrique imposé et de sa fréquence. Le phénomène de flip-flop semble être une manifestation de cette force, mais des modélisations théoriques plus poussées sont nécessaires et sortent du cadre de cette thèse.

> Nous avons pu mettre en évidence l'effet de la variation temporelle de la fréquence du champ électrique alternatif imposé sur une unique particule Janus dans une puce microfluidique comportant des électrodes bi-planaires. Nous avons ainsi caractérisé l'effet "flip-flop" de particules Janus Au / PS fluorescentes qui consiste en une rotation de la particule sur elle même relativement à la fréquence du champ électrique appliqué. La commutation répétitive de ce flip-flop montre les performances croissantes de particules Janus ayant des épaisseurs d'Au décroissantes de 500 nm à 100 nm. Ainsi, les particules Janus de 100 nm Au et 1 μm de polystyrène peuvent successivement effectuer jusqu'à 20 rotations par secondes.

5.3.3 Diélectrophorèse impulsée mobile

Diélectrophorèse impulsée.

Lorsque injectées en faibles concentrations, les particules colloïdales peuvent être isolées et identifiées à l'échelle individuelle. Le positionnement déterministe tridimensionnel d'une seule particule peut alors être réalisée lorsque celle ci est capturée par un piège diélectrophorétique tridimensionnel. Idéalement, il suffirait de faire bouger ce piège pour obtenir une manipulation spatiale déterministe de la particule colloïdale. Étant donnée la nature figée des électrodes embarquées dans les puces microfluidiques, le mouvement des pièges peut s'effectuer en déplaçant le champ électrique qui induit la diélectrophorèse.

Technologiquement, cela consiste à appliquer un potentiel électrique entre 2 électrodes puis à le déplacer sur les 2 électrodes suivantes, ce qui implique un adressage unique de chacune des

électrodes dans une matrice donnée et donc des réseaux de connexions électriques complexes. Les puces microfluidiques utilisées dans cette thèse présentent des matrices d'électrodes reliées linéairement entre elles. Ainsi, les électrodes en dessous du canal microfluidiques sont reliées verticalement entre elles alors que celles en dessus sont reliées horizontalement. Comme présenté au chapitre 2.2.2, par défaut, toutes les électrodes sont mises à la masse. Ainsi, dans une telle configuration matricielle 3D d'électrodes, si une ligne d'électrode est placée à un potentiel électrique, il s'établira des champs électriques sur toutes la longueur de cette ligne, comme le montre les figures 5.31a et 5.31b dans le cas de puces microfluidique de type pièges circulaires, localisant ainsi des particules sur toute la longueur de la ligne.

En appliquant successivement un potentiel électrique alternatif de fréquence f_t à une ligne

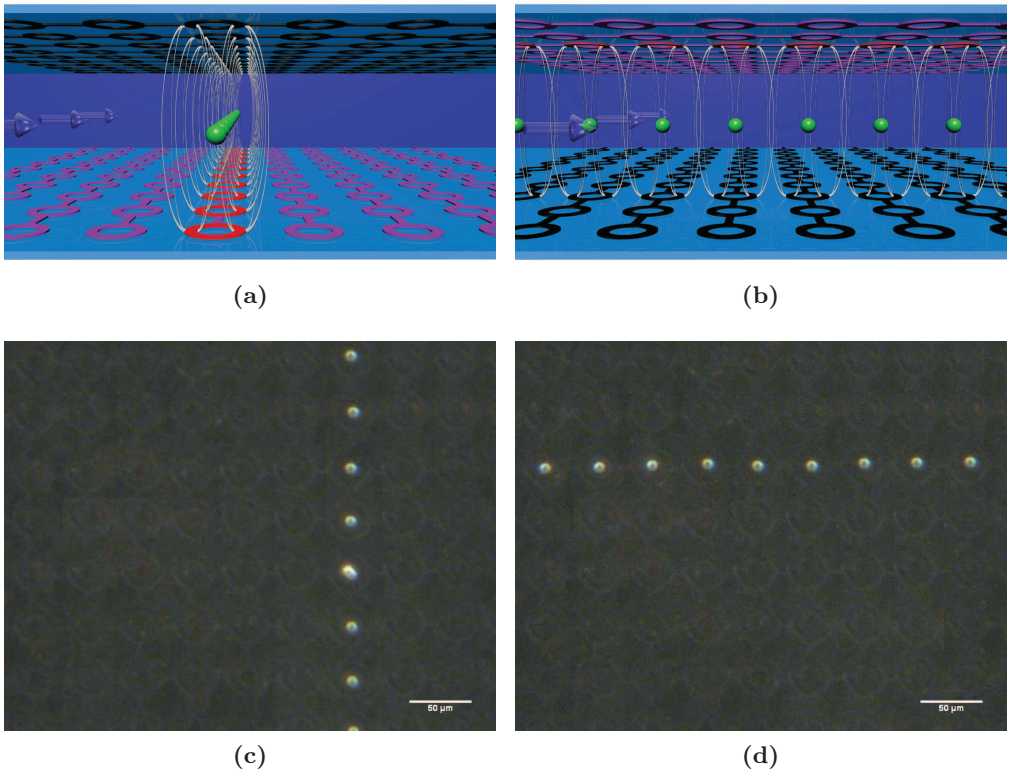


Figure 5.31 – Schéma de piégeage de particules colloïdales sur une ligne (a) : verticale et (b) : horizontale et les photographies au microscope x5 de particules de polystyrène de 10 μm piégées verticalement (c) ou horizontalement (d) à $f = 2MHz, Vp-p = 20$ V.

verticale puis le même potentiel inversé à une ligne horizontale, et ce à une fréquence de commutation nommée fréquence d'impulsion f_p ("pulsed frequency" en anglais), le champ électrique restera continu à l'intersection des deux lignes seulement et discontinu sur le reste de la ligne, comme le montre la figure 5.32 sous flux hydrodynamique à Q=200 pL/s.

La fréquence d'impulsion crée un hachage de la fréquence de travail f_t. Pendant une demi période de hachage, $T = \frac{1}{2f_p}$, l'électrode du haut est, par exemple, mise à un potentiel positif induisant un dipôle dans la particule. Lors de la demi période suivante, cette même électrode est mise à la masse et l'électrode du bas est mise à un potentiel négatif continu au précédent, créant ainsi le même dipôle dans la particule. Au final, sur l'ensemble d'une période de f_t,

le dipôle induit dans la particule est imposé par la fréquence de diélectrophorèse f_t. En optimisant la fréquence d'impulsion, il devient alors possible de ne piéger qu'une seule particule à l'intersection des deux lignes. Ce type d'application de champ électrique impulsé induisant la diélectrophorèse est appelé diélectrophorèse impulsée ("pulsed dielectrophoresis" en anglais).

Techniquement, la mise en oeuvre de la diélectrophorèse impulsée se base sur le module électronique présenté au chapitre 2.2.2. Les 2 lignes d'électrodes à activer sont reliées aux potentiels V1 et V2. Le signal électrique sinusoïdal de fréquence f_t est haché par un générateur externe produisant un signal binaire carré de fréquence f_p, produisant le signal alternatif V1 d'une électrode. Le hachage est réalisé par un transistor mis en série avec la sortie du générateur. Le deuxième signal V2 est haché à l'inverse du signal de f_p par un transistor dont la base est montée sur une porte logique NON par rapport au premier signal de hachage. La sortie du signal haché est de plus mise en série avec un montage à base d'amplificateur opérationnel type suiveur inverseur.

La diélectrophorèse impulsée a été introduite par Voldman [Cui 2009b] pour faire de la séparation diélectrophorétique de cellule assistée par un flux hydrodynamique. Kumemura [Kumemura 2011] l'a aussi utilisé pour focaliser de manière continu des brins d'ADN en minimisant les effets électrothermiques induits par les fortes tensions. Dans ces deux cas, le signal de hachage est de l'ordre de grandeur du Hertz et ne hache pas le signal de diélectrophorèse qui induit un dipôle. Dans notre cas, l'application de la diélectrophorèse impulsée impacte directement le phénomène d'induction de dipôle dans la particule tout en minimisant les effets électro-hydrodynamiques.

La capacité à maintenir une ou plusieurs particules colloïdales dans un piège unique, sans

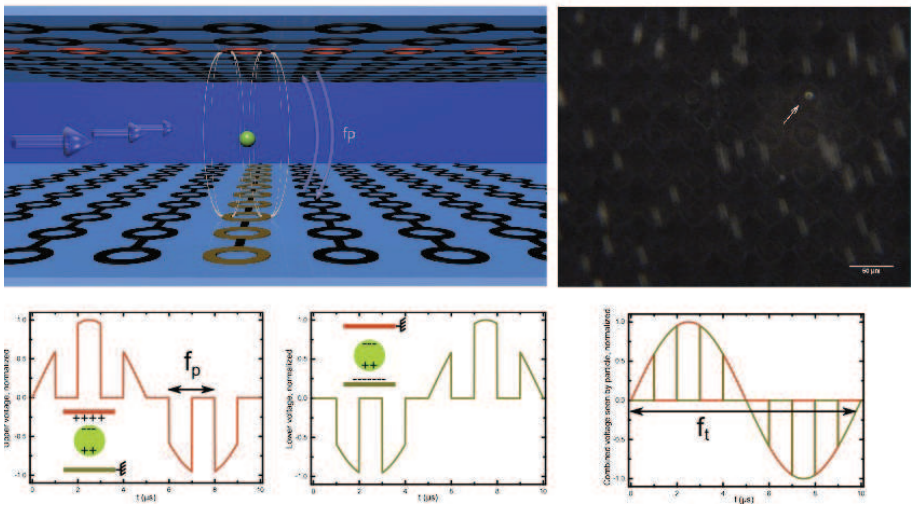


Figure 5.32 – Schéma de principe de la diélectrophorèse impulsée

que d'autres particules ne soient piégées sur les lignes concernées, réside dans une compétition temporelle d'établissement des forces électrocinétiques (ACEO, ETE, DEP) et de la fréquence de commutation imposée. Ainsi, pour que la diélectrophorèse soit effectivement induite dans une particule, il est nécessaire que le champ électrique extérieur soit imposé suffisamment longtemps pour induire un moment dipolaire dans la particule. La durée minimale d'application d'un champ électrique pour qu'un dipôle soit induit dans une particule détermine les temps

minimaux des fréquences d'impulsion. Le temps de réponse des porteurs de charge dans un milieu isolant est liée à leur mobilité μ_0 dans ce milieu. Cette dernière a pu être mesurée expérimentalement pour le polystyrène par Watson [Watson 1995] et à pour valeur $2.5.10^{-9}$ $m^2V^{-1}s^{-1}$. Ainsi, pour une particule de diamètre d, un champ électrique E, le temps de réponse caractéristique des porteurs de charge est donné par l'équation [Eq. 5.14].

$$\tau = \frac{d}{\mu_0 E} \qquad \text{[Eq. 5.14]}$$

Numériquement, pour des particules de 1 μm de diamètre piégées dans la configuration d'électrode pièges circulaires avec un tension de 10 V, ce temps vaut $4.10^{-4}s$.
Pour valider ce temps critique en fonction de la période de hachage $1/f_p$, et ainsi établir les fréquences d'impulsion optimales, les expériences suivantes sont réalisées : Les particules sont piégées sous flux (Q=200 pL/s) dans les lignes verticales et horizontales en même temps à une fréquence f_t de piégeage donnée. Les impulsions sont ensuite appliquées à des fréquences de commutation f_p ayant pour valeur un pourcentage de la fréquence f_t. Les 4 pièges adjacents les plus proches du piège cible sont observés et les particules dans ces pièges sont alors comptées. Étant sous flux, si les particules dans les voisins du piège cible sont effectivement piégées, c'est à dire qu'un dipôle est effectivement induit dans ces particules, la fréquence f_p est alors trop faible pour piéger une particule par diélectrophorèse impulsée dans le piège cible.

Ces expériences sont réalisées avec des conditions de piégeages limitant l'effet électrothermique (f varie et V_{p-p} = 10 V) avec des particules de polystyrène de 1 μm dans de l'eau desionisée sous flux moyen (Q=200 pL/s) de façon à minimiser l'impact du flux hydrodynamique d'entrainement.

La figure 5.33a montre des exemples de potentiels appliqués sur l'électrode du haut avec un hachage de la fréquence effective de diélectrophorèse $f_t = 2$ MHz par la fréquence d'impulsion f_p variant de 0.1 à 5 fois f_t. Étant donné que f_t varie, f_p est exprimé comme le ratio de ce dernier et ne peut excéder 10 MHz, limite supérieure du générateur d'impulsion.
Comme le montre la figure 5.33b, il apparait des comportements binaires en fonction des fréquences f_p appliquées. Soit les particules des 4 pièges adjacents sont quasiment toutes piégées aux endroits attendus, c'est à dire que l'effet du hachage n'est pas perçu par les particules, ou soit peu de particules sont piégées, signifiant que le hachage du signal f_t empêche les particules de répondre à la stimulation électrocinétique. Plus particulièrement, la diélectrophorèse pulsée ne fonctionne pas à basses fréquences ($f = 1$ kHz) auxquelles l'électro-osmose est prédominante. De même, et ce malgré la tension appliquée, lorsque l'effet électrothermique est prédominant, la diélectrophorèse pulsée ne semble pas fonctionner pour des impulsions faibles ($f = 50kHz, f_p/f_p < 1.5$ et $f = 500Khz, f_p/ft = 0.1$). A ces fréquences, les effets électro-hydrodynamiques ont en effet des réponses beaucoup plus fortes en intensité que celles de la diélectrophorèse (voir chapitre 5.1.2). A plus haute fréquence et fort ratio, ($f \geq 50$ kHz et ($f_p/f_t > 1.5$), la diélectrophorèse pulsée devient effective, la limite étant fixée arbitrairement à 20% de particules piégées et correspond à moins de 2 particules présentes dans les 4 pièges adjacents (particules adsorbées à la surface par exemple). Les ratio f_p/f_t pour lesquels la diélectrophorèse impulsée est effectivement observée sont reportés sur la figure 5.33c où les durées d'application des trains d'impulsions sont tracées en fonction du ratio et des fréquences f_t étudiées. Le temps de réponse des porteurs de charge précédemment calculé par leur mobilité

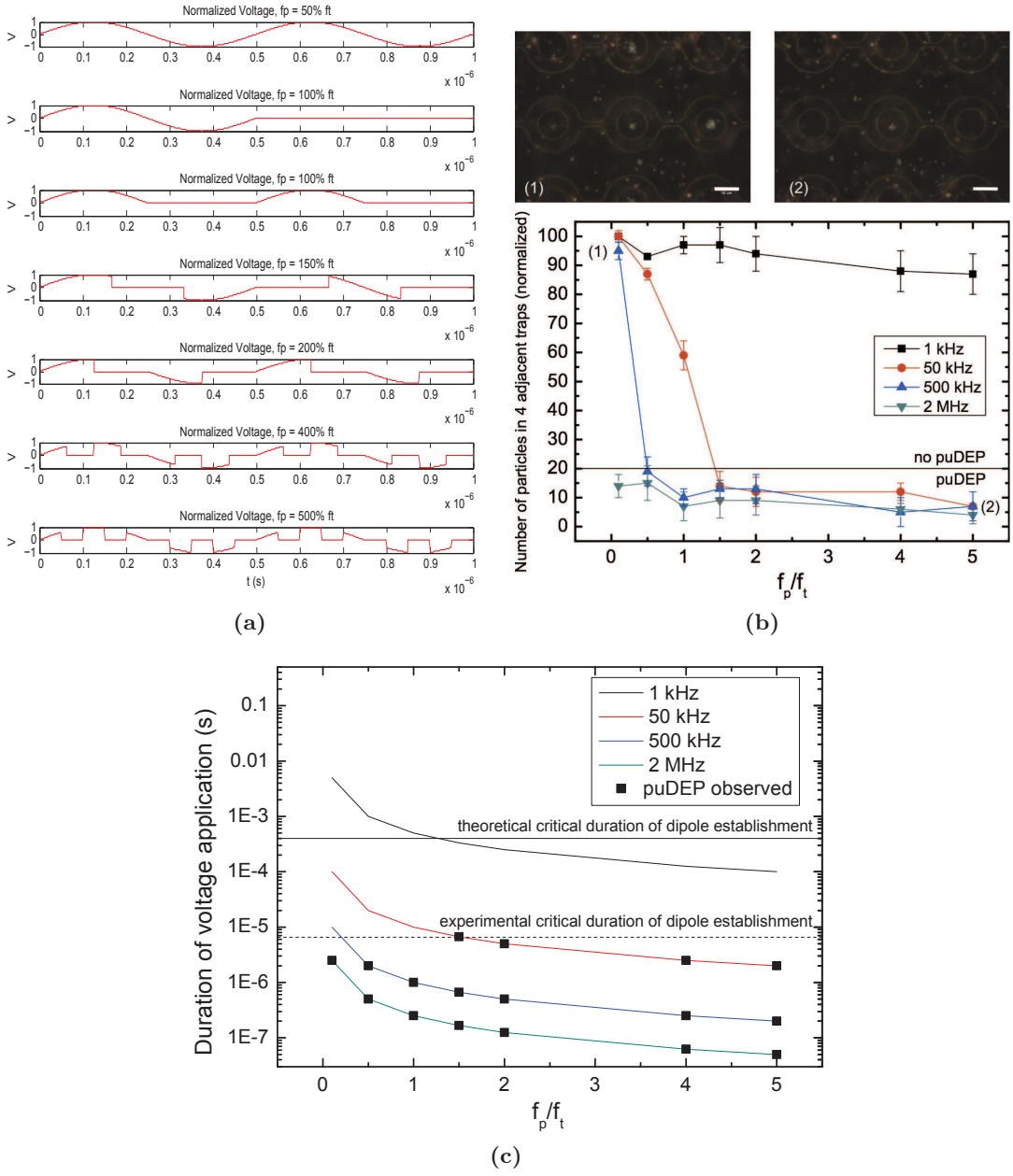


Figure 5.33 – (a) : Évolution temporelle de la tension normalisée appliquée sur l'électrode du haut en fonction de la fréquence d'impulsion f_p exprimé en ratio de la fréquence effective de diélectrophorèse $f_t = 2$ MHz. (b) : Quantité de particules dans les 4 plus proches voisins, normalisée selon le montant totale de particules piégées. (c) : Temps d'application d'une impulsion en fonction du ration de hachage. Les valeurs du hachage pour lesquels la diélectrophorèse pulsée est expérimentalement observée sont indiquées en noir. Sont aussi indiquées les valeurs critiques d'établissement d'un dipôle, théorique et expérimentales.

est reporté sur le graphique et ne correspond pas à la limite observée expérimentalement. Les effets électro-hydrodynamiques agissant sur les fluides imposent des déplacements beaucoup plus forts en norme que la diélectrophorèse et la diélectrophorèse impulsée de fonctionner à ces fréquences.

Ainsi, il est possible de piéger de manière isolée des particules à hauts ratio de fréquence d'impulsion, que ce soit pour la diélectrophorèse positive (f=50 Khz) ou pour la diélectrophorèse négative (f=2 MHz).

Diélectrophorèse mobile.

Cette dualité de piégeage permet donc d'attirer une ou des particules vers un piège unique ou de les repousser au centre de ce même piège. Ainsi, en changeant la ligne activée, verticale ou horizontale, les particules peuvent être successivement attirées ou repoussées d'un piège vers un autre. Ce concept de changement de localisation de l'application du champ électrique a été introduit par Kua [Kua 2007] en appliquant des potentiels successivement sur plusieurs lignes d'électrodes. Ce type de diélectrophorèse est appelée diélectrophorèse mobile ("moving dielectrophoresis" en anglais). Comme le montre la figure 5.34 avec des particules de 10 μm de polystyrène, l'enchainement pour qu'une particule puisse être déplacée d'un piège à l'autre est :

1. Activation du piège cible (t=0). La particule est piégée au centre du piège source par diélectrophorèse négative (f=2 MHz, $V_{p-p} = 10$ V)
2. Activation de l'électrode ciblée en diélectrophorèse positive ($t = t_1$). L'électrode cible est mise à un potentiel électrique induisant de la diélectrophorèse positive (f=50 kHz, $V_{p-p} = 10$ V).
3. **Libération** du piège source ($t = t_1$). Le piège dans lequel se trouve la particule est coupée, impliquant un mouvement de la particule vers le piège cible
4. **Répulsion** du piège source($t = t_2$). Le piège cible est coupé et la particule est repoussée du piège source jusqu'à ce que celle ci soit proche du centre du piège cible (f=2 MHz, $V_{p-p} = 10$ V).
5. **Piégeage** par activation du piège cible($t = t_3$). Le piège cible est réactivé en diélectrophorèse négative, la particule redevient piégée dans ce dernier (f=2MHz, $V_{p-p} = 10$ V).

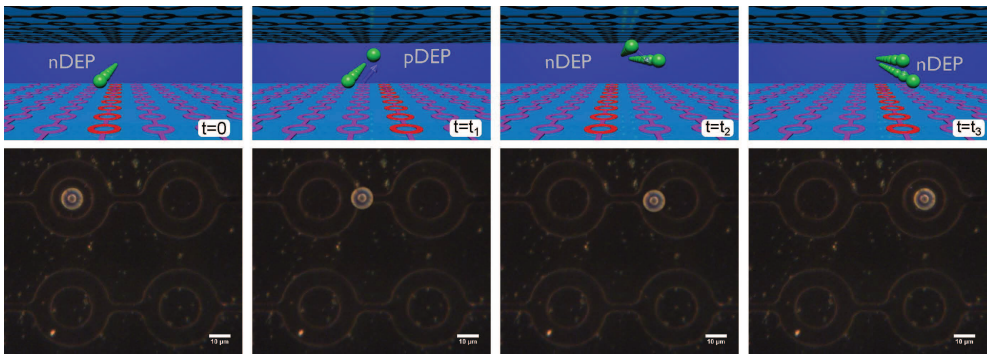
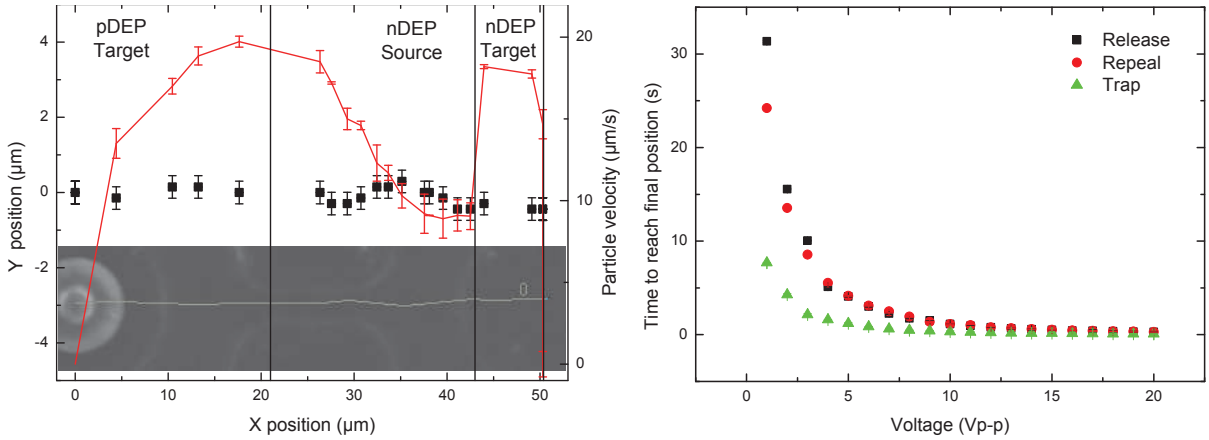


Figure 5.34 – Schéma de principe de l'application de la diélectrophorèse mobile et photographie du procédé appliqué à une particule de polystyrène de 10 μm de diamètre. La particule est piégée dans le piège source par diélectrophorèse négative (f=2MHz, $V = 10$ V). Le piège cible est activée pour induire de la diélectrophorèse positive (f=50kHz, $V_{p-p} = 10$ V) puis le piège source est libéré : la particule est attirée vers le piège cible. Lorsque celle-ci sort du piège source, celui ci est mis à un potentiel induisant de la diélectrophorèse négative et le piège cible est mis à la masse. Lorsque la particule rentre dans le piège cible, celui-ci est activé en mode diélectrophorèse négative et le piège source mis à la masse. La particule est enfin piégée dans le piège cible.

Le point clé de l'application de la diélectrophorèse mobile est l'application du signal électrique voulu (en terme de fréquence et de tension) lorsque la particule est localisée à l'endroit voulu,

ce qui revient à maitriser le temps d'application d'un potentiel d'attraction puis d'un potentiel de répulsion en des localisations précises par rapport aux bords des électrodes. Ainsi, pour chacune des phases (libération, répulsion et piégeage), la position et la vitesse d'une particule sont enregistrées par le module de détection et de suivie de particule. Comme le montre la figure 5.35a, la vitesse d'une particule de 10 μm de polystyrène est suivie pour chacune des phases.

Lors de la phase de libération du piège, la particule est soumise à la diélectrophorèse positive,



(a) (b)

Figure 5.35 – (a) : Détection et suivie d'une particule de polystyrène de 10 μm de diamètre lors de son mouvement sous diélectrophorèse mobile. La trajectoire de la particule est insérée en arrière plan du module de la vitesse. (b) : Évolution du temps mis par cette particule pour arriver en position finale de chacune des phase en fonction de la tension du signal électrique appliqué.

sa vitesse augmentant au fur et à mesure que la particule se rapproche du bord de l'électrode cible. Il faut alors empêcher la particule de toucher ce bord sous peine de la voir adsorbée sur le verre. La phase de répulsion, au contraire, permet de positionner la particule proche du bord interne de l'électrode cible pour que cette dernière soit repoussée au centre du piège cible et non repoussée à l'extérieure de ce dernier, comme montré dans le chapitre 5.1. Lors de cette phase, la vitesse de la particule est décroissante étant donné qu'elle s'éloigne du gradient du champ électrique du piège source. Enfin, la particule est piégée dans le piège cible classiquement par diélectrophorèse négative. Les temps de déplacement de la particule jusqu'à la localisation désirée sont alors reportés sur le graphique 5.35b pour différentes tensions. Ces temps de réponses sont de type exponentiels décroissants allant de plusieurs secondes pour quelques volts ($V < 4$ V) à la centaine de milliseconde à forte tension ($V > 10$ V).

L'utilisation du mode séquence du module électrique présenté au chapitre 2, permet de programmer l'application de 2 signaux électriques pendant un temps donné allant jusqu'à 1 ms de commutation, permettant ainsi de déplacer les particules d'une rangée de piège à l'autre suivant une sens donné.

> La diélectrophorèse mobile permet de déplacer des particules d'un piège à l'autre en moins d'une seconde en appliquant des potentiels supérieurs à 10 V et une séquence définie de potentiels électriques à des fréquences induisant une réponse diélectrophorétique positive ou négative.

Diélectrophorèse impulsée mobile.
En appliquant conjointement la diélectrophorèse impulsée et la diélectrophorèse mobile, il devient possible de piéger une ou des particules et de les déplacer d'un piège à l'autre, comme le montre le schéma 5.36.

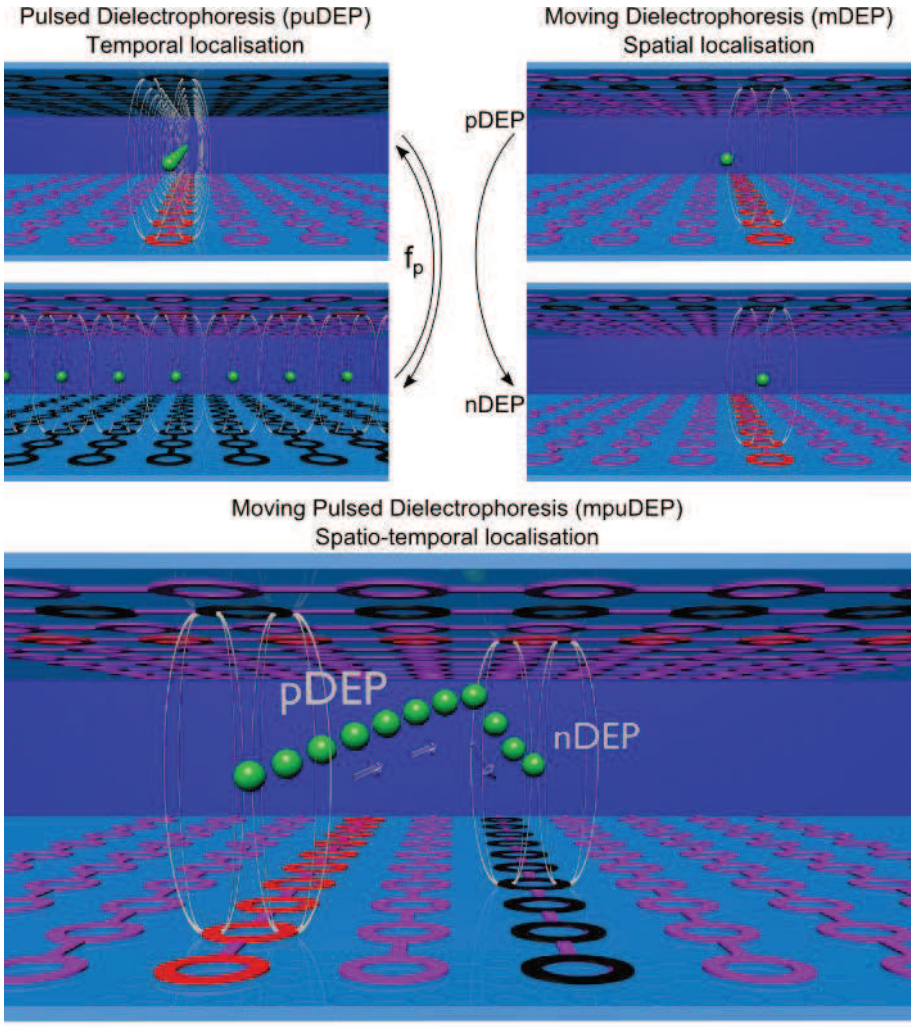


Figure 5.36 – Schéma de principe de la diélectrophorèse impulsée mobile.

En utilisant le mode séquence ou joystick du module électronique d'une part, et le hachage des signaux d'entrées d'autre part, il est possible de créer une modulation spatio-temporelle de l'application de champ électrique et donc une modulation de l'induction de la diélectrophorèse dans les particules ainsi piégées. La procédure de déplacement consiste donc à effectuer :

- **Un positionnement initial**. Une particule est piégée dans le premier piège par diélectrophorèse négative impulsée.
- **Un déplacement**. Le déplacement s'effectue en hachant les signaux électriques permettant d'utiliser la diélectrophorèse mobile. Typiquement pour des particules de polystyrène, les fréquences utilisées sont 50 kHz pour la diélectrophorèse positive et 2 MHz pour la diélectrophorèse négative. L'extension à d'autres type de particules ou cellules est possible

dans la mesure où leur Facteur de Clausius-Mossotti peut être déterminé par la méthode présentée au chapitre 4.

– **Une libération**. Une fois arrivée à destination, la particule est relâchée en coupant les potentiels électriques.

La figure 5.37 présente un exemple de trajectoire d'une particule de polystyrène de 10 μm de diamètre soumise à la diélectrophorèse impulsée mobile. La particule est successivement déplacée de piège en piège par une séquence pré-enregistrée et sa trajectoire est suivie par le module de suivie et détection de particule. La particule peut alors être aussi déplacée manuellement en utilisant le joystick de contrôle lorsque celle ci est initialement piégée dans un piège dont les coordonnées initiales sont connues.

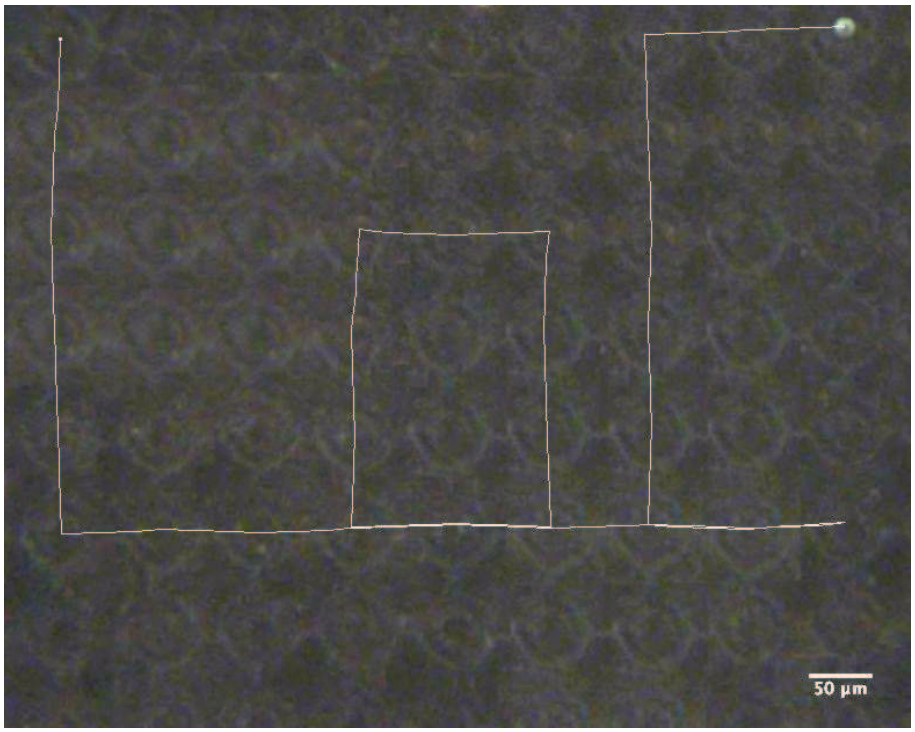


Figure 5.37 – Trajectoire d'une particule de polystyrène de 10 μm de diamètre soumise à la diélectrophorèse impulsée mobile. La trajectoire de la particule décrit l'acronyme "LoC" pour "Lab-on-Chip".

5.4 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord proposé une modélisation numérique par éléments finis des forces électro-hydrodynamiques et diélectrophorétique présentes dans les puces microfluidiques contenant des électrodes bi-planaires autour du canal microfluidique. Nous avons proposé un modèle pour établir la vitesse de glissement induite par l'électroosmose alternative dans cette configuration d'électrodes. Ces modélisations ont pu être réalisées dans 3 géométries de paires d'électrodes : barres verticales, pièges circulaires et barres perpendiculaires, en faisant varier les conductivités de la solution colloïdale (eau déionisée, milieu salin et milieux de culture cellulaire), la taille des particules (de 1 à 10 μm), la fréquence (1 kHz à 5 MHz) et la tension (1 à 10 V_{p-p}) du champ électrique appliqué sur ces électrodes. Les résultats de ces modélisations montrent 3 types de comportements des particules distincts, à savoir des rouleaux de convection attractifs, des rouleaux de convection dispersifs ou une attraction / répulsion du bords des électrodes en fonction des valeurs des paramètres étudiés. La quantification des normes des forces électrocinétiques permet de réaliser des cartes fréquence-tension suivant les conductivités des solutions et les tailles des particules. Ces cartes permettent de trouver des zones de force dominante pour un couple fréquence-tension donné.
Ainsi, nous avons mis en valeur 12 couples (f,V) qui induisent des localisations distinctes de particules. Ces couples ont alors été appliqués à des solutions colloïdales injectées dans les puces microfluidiques incorporant les 3 configurations de géométries d'électrodes. Nous avons alors observé et mis en évidence 6 localisations majeures des particules colloïdales relativement aux électrodes. Il nous est apparu que le comportement des particules est le plus souvent dû à la juxtaposition, additive ou soustractive, de deux effets. Il devient alors possible de positionner les particules colloïdales relativement aux électrodes en des lieux déterminés en appliquant un couple fréquence - tension à une conductivité connue.
Nous avons ensuite proposer de modifier la forme des électrodes, de les aligner en matrice ou d'effectuer une variation temporelle du champ électrique, introduisant ainsi le concept de fonction clé pour la manipulation collective ou individuelle de particules colloïdales :
La fonction stop est capable d'accumuler des particules colloïdales jusqu'à une efficacité de d'arrêt supérieure à 95 % sous flux continu jusqu'à 650 pL/s. Conjointement à la bonne connaissance des Facteurs de Clausius-Mossotti, la fonction stop peut être utilisée pour la séparation sous flux constant de particules colloïdales.
La fonction focalisation permet d'imposer une trajectoire continue à des particules sous flux en créant un canal virtuel dans lequel les trajectoires des particules sont confinées. Il peut alors être envisagé d'effectuer du comptage de particule sous flux jusqu'à 650 pL/s.
La fonction piège permet de localiser des particules colloïdales en trois dimensions en leur centre, de limiter leurs mouvements brownien en diminuant la cage virtuelle ainsi crée et de les maintenir en cette position sous flux continu jusqu'à 750 pL/s. De plus, en parallélisant la fonction piège et en ajoutant une fonction stop en amont, nous avons créé avec succès une matrice de 53x53 particules colloïdales piégées en trois dimensions avec un fort taux de piégeage (supérieur à 95 %) résistant à un flux continu.

Rotation de particule Janus. Lorsque piégées en trois dimensions, les particules Janus présentent des comportements de rotation sur elle même lors de la variation de la fréquence de piégeage. Nous avons ainsi pu mettre en évidence et caractériser cet effet flip-flop sur des particules Janus d'épaisseur d'Au croissantes (100 - 500 nm). L'étude de la commutation répétitive du flip-flop montre que les performances du flip-flop des particules de 100 nm Au et 1 μm polystyrène peuvent aller jusqu'à 20 rotations par secondes.

Diélectrophorèse impulsée mobile. La manipulation unique de particules colloïdales est observée en utilisant une modulation spatio-temporelle du champ électrique alternatif imposé sur les électrodes tridimensionnelles. Nous avons ainsi montré que la diélectrophorèse impulsée permet de maintenir une particule unique en un piège circulaire de la matrice 53x53 adressée ligne par ligne pour des fréquences de diélectrophorèse positive et négative. De plus, par diélectrophorèse mobile, le déplacement de l'application du champ électrique d'un piège à l'autre suivant une séquence de fréquence définie, permet de déplacer des particules colloïdales d'un piège à l'autre. Enfin, en couplant ces deux modulations, nous avons montré que la diélectrophorèse impulsée mobile permet de contrôler de manière déterministe la position et trajectoire d'une particule unique.

Chapitre 6

Électrocinétique cellulaire et interaction colloïdale

Sommaire

6.1 Introduction aux interactions particules - cellules 148
6.2 Électrocinétique de cellule 151
6.2.1 Visualisation et milieu de suspension 151
6.2.2 Détermination du Facteur Clausius-Mossotti de cellules 153
6.2.3 Rotation de cellules en configuration co-planaire 158
6.3 Interaction particules fonctionnalisées et cellules 159
6.3.1 Internalisation de particules colloïdales 159
6.3.2 Accroche surfacique de particules colloïdales 163
6.4 Réponse diélectrophorétique d'un complexe cellule / particules colloïdales 165
6.4.1 Particules internalisées 165
6.4.2 Particules externalisées 171
6.5 Conclusion 174

Ce chapitre présente une étude sur les interactions entre les particules colloïdales multi-fonctionnelles fabriquées au chapitre 2 et des lignées cellulaires. Deux types de complexe colloide-cellule seront mis en évidence en fonction du choix des cellules utilisées. Les propriétés électrocinétiques de ces complexes seront ensuite étudiées en détail. Après une introduction aux études des interactions particules-cellules, nous présenterons les méthodes de visualisation, de re-suspension et d'injection de cellules dans la puce microfluidique.
Nous déterminerons ensuite les réponses électrocinétiques des cellules de façon à extraire leurs Facteurs de Clausius-Mossotti et leurs paramètres diélectriques intrinsèques.
Par la suite, seront présentées les interactions entre les particules colloïdales fonctionnalisées et les différents types cellulaires étudiés, que ce soit pour les cellules compétentes pour la phagocytose (*Dictyostelium discoideum* ou des lymphocytes T (Jurkat)) ou pour permettre une décoration de la membrane cellulaire par des colloïdes sur des cellules adhérentes (des cellules humaines de rein HEK (Human Embryonic Kidney)).
Enfin, nous présenterons les stratégies de manipulation d'un complexe cellule - particules dans des géométries d'électrodes co-planaires.

6.1 Introduction aux interactions particules - cellules

L'étude des interactions entre des particules colloïdales et des cellules trouve de nombreuses applications dans le domaine de la biologie à la fois in-vivo pour la délivrance médicalisée d'agents thérapeutiques ou in-vitro par la discrétisation des motifs d'adhérence cellulaire comme le montre la figure 6.1.

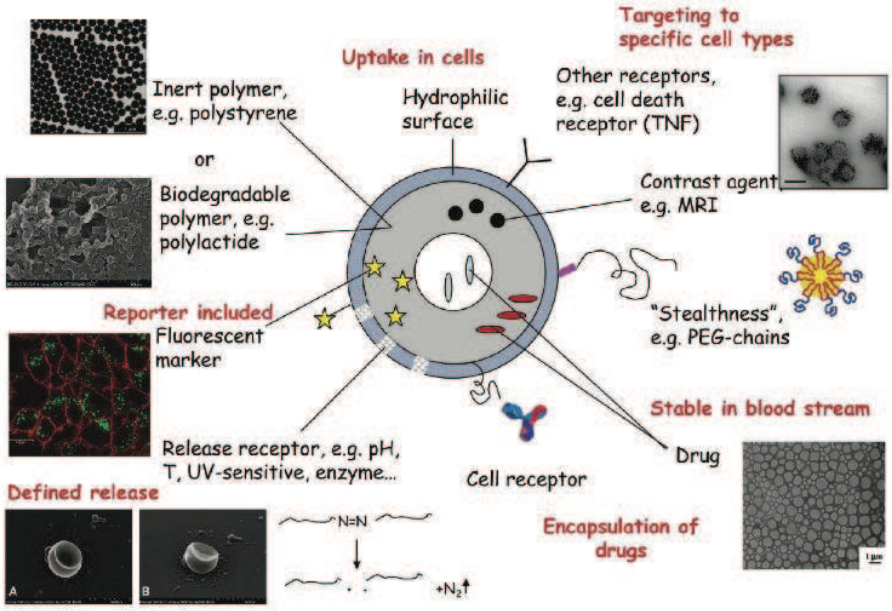
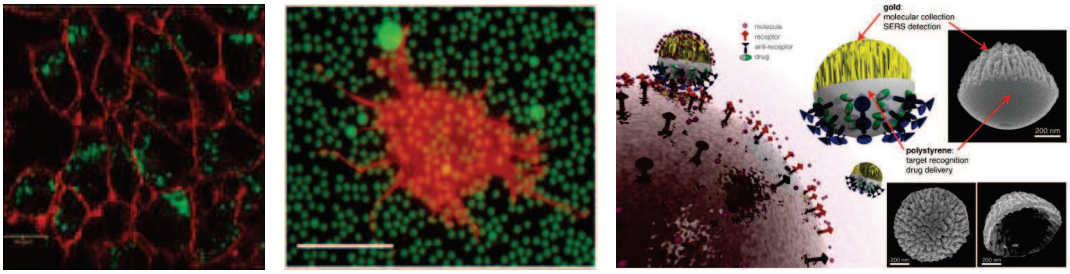


Figure 6.1 – Applications possibles de nanoparticules et des nanocapsules [Mailänder 2009].

– De nombreuses études récentes utilisent des **nanoparticules** pour délivrer des molécules anti-cancéreuses spécifiquement à des cellules tumorales [Heath 008, Doshi 2009, Chaffer 011, Davis 008], évitant ainsi la délivrance globale de médicaments ayant des effets secondaires sur les cellules saines. De plus, ces nanoparticules peuvent aussi être utilisées dans le développement de délivrance de macromolécules comme des acides aminés (ADN, ARN messagés...) ou des protéines qui peuvent être difficilement internalisées par des cellules [Davis 009]. Enfin, les nanoparticules fonctionnalisées en surface peuvent cibler des cellules spécifiques ou des compartiments intracellulaires grâce aux protéines extra-cellulaires (figure 6.2a). D'une manière générale, les nanoparticules ont des tailles tellement inférieures à celles des cellules qu'elles ont la faculté de traverser les membranes cellulaires par diffusion et d'être internalisées par les cellules lorsque celles-ci ont la capacité de phagocyter leur milieu de suspension.
– A l'inverse, les **microparticules**, peuvent être "ressenties" par les cellules. Il apparait alors différents comportements qui dépendent du type de cellule étudiée, de leur taille, de leur forme et de leur chimie de surface [Decuzzi 010, Lee 009b, Lee 009a, Serda 009]. Ainsi, une monocouche de microparticules fonctionnalisées en surface avec de la fibronectine peut former des motifs d'adhésion cellulaire comme le montre la figure 6.2b. De plus, l'anisotropie de telles microparticules peut jouer un rôle déterminant dans le ciblage des cellules et leur détection par des méthodes optiques. les travaux de Wu montrent ainsi que des

particules Janus couplées à des fonctionnalisations de surface peuvent cibler des cellules cancéreuses de sein et être quantifiées par SERS [Wu 2010], comme le montre la figure 6.2c.



(a) (b) (c)

Figure 6.2 – (a) : Internalisation de nanoparticules fluorescentes dans des cellules cancéreuses humaines[Mailänder 2009], (b) : Adhérence de cellules épithéliales sur une surface discrétisée de micro particules de polystyrène de 5 μm de diamètre fonctionnalisées en surface par de la fibronectine [Gleason 2003] et (c) : Particules Janus de polystyrène et d'or fonctionnalisées en surface par des anticorps spécifiques adsorbés et ciblant des cellules cancéreuses [Wu 2010].

Les capacités de manipuler en 3D des microparticules au sein de puces microfluidiques, couplées aux techniques de fabrication de colloïdes multi-fonctionnels, ouvrent la voie au développement de nouveaux outils permettant d'interagir localement avec des cellules via des microparticules. Dépendant de la capacité des cellules à internaliser des microparticules, ces interactions peuvent être intracellulaires (pour l'application de force sur le cytosquelette *in cellulo* ou la délivrance contrôlée d'agents thérapeutiques) ou extra-cellulaires pour l'application de forces locales sur des cellules.

Il est donc possible d'orienter les interactions entre micro/nano particules et cellules vers deux grands axes : l'internalisation des nanoparticules ou leur accroche sur la membrane cellulaire.

– Pour **l'internalisation**, il existe différentes voies pour faire entrer des particules, plus ou moins spécifiques et consommatrices d'énergie [Zhao 2011] dans les cellules, comme le montre la figure 6.3. Pour les particules de "petits" diamètres (< 500 nm), l'entrée se fait

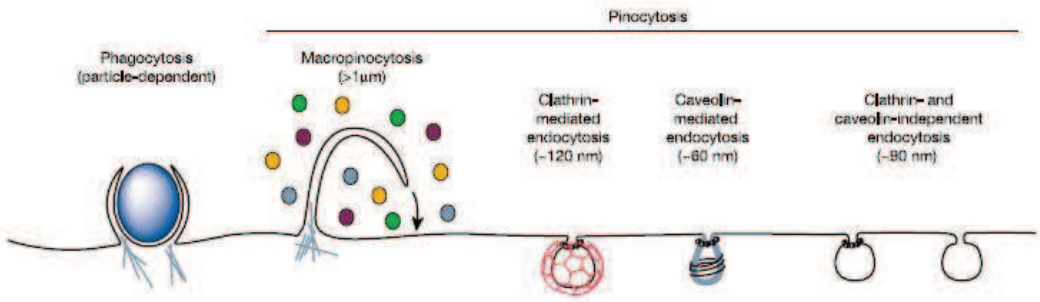


Figure 6.3 – Voies d'internalisation pour les cellules de mammifères. La voie endocytique dépend de la taille de la vésicule endocytique, de la nature des récepteurs et ligands et du mécanisme de formation de la vésicule [Conner 2003].

principalement par endocytose, via des récepteurs spécifiques (voie "caveolae-dépendante" ou des vésicules à clathrine, suivant la taille des particules). Si le diamètre excède 700 nm, c'est par phagocytose que les particules entrent dans la cellule. Mais la phagocytose est une compétence que peu de cellules possèdent, c'est pourquoi l'internalisation de particules est une voie dédiée à un certain type cellulaire, compétent pour la phagocytose. Nous avons choisi d'étudier l'internalisation de particules chez *Dictyostelium discoideum* et des lymphocytes T de type Jurkat.

– Concernant **l'accroche surfacique de particules**, l'objectif est inverse et le type cellulaire utilisé est donc choisi en fonction. On s'orientera plus vers des cellules adhérentes, et non compétentes pour la phagocytose. Pour cette approche, nous étudierons des lignées de cellules humaines adhérentes de rein HEK (Human Embryonic Kidney). Nous avons aussi étudié le comportement diélectrophorétique de cellule de prostate PC-3.

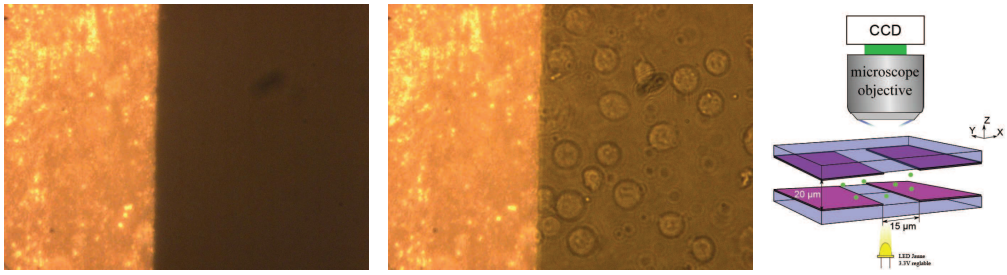
Dictyostelium discoideum a été cultivée au Laboratoire des Matériaux et du Génie Physique à Grenoble et les cellules de lignées humaines au Laboratoire d'Exploration Fonctionnelle des Génomes au CEA de Grenoble. Nous avons fait le choix d'utiliser des lignées de cellules, et non des cultures primaires. Les premières sont en effet moins contraignantes à cultiver car les lignées sont immortalisées et présentent en théorie un nombre infini de divisions.

6.2 Électrocinétique de cellule

6.2.1 Visualisation et milieu de suspension

Visualisation des cellules

L'illumination en champ clair ou en champ sombre du microscope permet d'observer les particules colloïdales. Cependant, les cellules généralement réfringentes qui diffusent peu la lumière sont difficiles à observer avec ce type d'illumination (6.4a). Une diode jaune a donc été montée sur le microscope, en-dessous de l'échantillon, pour permettre d'illuminer l'échantillon par transmission et d'observer les particules fluorescentes en même temps (voir schéma 6.4c). Il est alors possible de voir les cellules comme le montre la figure 6.4b.



(a) (b) (c)

Figure 6.4 – (a) : Illumination en champ sombre, les cellules situées dans la partie noire ne sont pas visualisables : (b) Illumination en champ sombre et en transmission, collection en champ sombre. Les parties dorées sont des électrodes en or. (c) : Chemin Optique, l'illumination champ sombre classique est maintenue alors qu'une LED est placée sous l'échantillon.

Choix du milieu de suspension

Le milieu de suspension des cellules doit d'une part permettre la survie des cellules mais d'autre part autoriser leur manipulations par diélectrophorèse. Enfin, la conductivité du milieu de suspension doit rester inférieure à $\sigma < 10^{-2} S/m$ afin de ne pas privilégier les effets électrothermiques qui entraîneraient une élévation de la température non viable pour les cellules. Par exemple, pour un milieu ayant une conductivité entre 0,1-1 S/m, si on applique un courant de 20 V, la température peut augmenter jusqu'à 100°C [Tay 2007]. Pour une conductivité de $\sigma = 10^{-2}$ S/m, pour la même tension la température augmente jusqu'à 6°C, augmentation qui reste viable pour les cellules sur la durée de l'expérience (jusqu'à 2 heures).

Le milieu de culture classique des cellules HEK est du DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium), dont la conductivité vaut $\sigma = 1,38$ S/m, donc peu recommandé pour effectuer de la diélectrophorèse sur des cellules à forte tension (voir chapitre 5). Ainsi, pour une tension de 10 Volts dans du DMEM, les cellules sont détruites comme le montre la figure 6.5. Hors de leur milieu de culture, les cellules doivent cependant se trouver dans un milieu avec une pression osmotique suffisante pour ne pas éclater.

– **Le milieu tampon de base pour la conservation des cellules, le PBS** (Phosphate Buffered Saline solution) est très conducteur ($\sigma = 1,6 S/m$). Différentes dilutions du PBS ont été testées, afin de diminuer sa conductivité tout en conservant la survie cellulaire

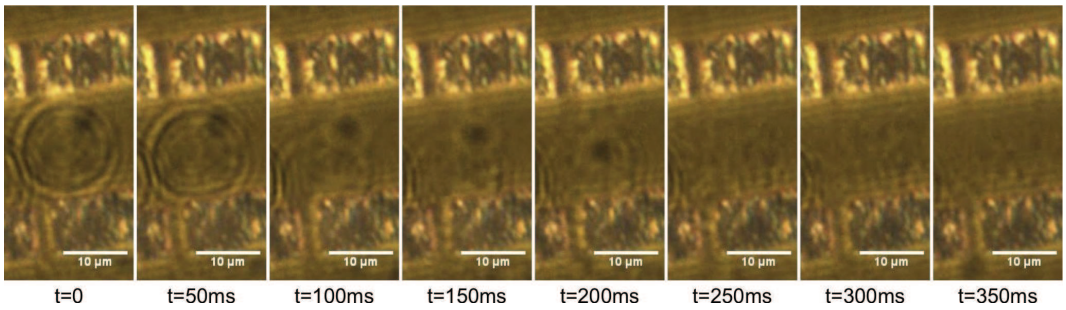


Figure 6.5 – Lyse d'une cellule HEK sous l'effet d'un champ électrique coplanaire ($f = 45kHz, V_{p-p} = 20V$)

(jusqu'à une dilution au 1/100^{e}), comme le montre la figure 6.6a. A partir d'une dilution au 1/5^{e}, les cellules gonflent, et en 2 heures, la population a diminué de 25%. Dans du PBS dilué (même au 1/5^{e}), les cellules se remplissent d'eau pour compenser la différence de pression osmotique, (figure 6.6). De plus, la conductivité est encore trop élevée pour une utilisation optimale de la diélectrophorèse ($\sigma_m < 10^{-2} S/m$).

– **Le tampon saccharose - glucose (8.5% - 0,3%) [Ho 2006]** a donc été choisi comme milieu de suspension. Dans ce tampon d'une part, les cellules survivent, sans gonfler, même s'il y a une décroissance temporelle de la population (-15% en 2h). D'autre part, ce tampon présente une conductivité de $\sigma = 2.10^{-4}$ S/m convenable pour les expériences de diélectrophorèse et la perte de quelques cellules est négligeable par rapport au temps d'expérience.

Injection de cellules dans des canaux microfluidiques

Contrairement aux colloïdes, les cellules sont fragiles et ne peuvent pas être soumises à des contraintes mécaniques lors de leur injection dans la puce microfluidique qui risqueraient de les endommager. De plus, les cellules peuvent s'adsorber aux surfaces des capillaires fluidiques et du réservoir d'entrée. Malgré des sections de canal microfluidique supérieures au diamètre moyen des cellules (x2), l'injection classique par le pousse seringue ne permet pas de remplir le canal avec une population de cellules suffisantes.

La technique choisie pour injecter avec succès une population de cellules dans la puce est une méthode inverse. Cette dernière consiste à déposer une goutte de solution à la sortie du canal et à aspirer le liquide. L'étude du pourcentage de cellules qui atteignent le canal microfluidique par rapport au nombre de cellules injectées est présentée sur la figure 6.7. Cette étude montre que 80% des cellules préalablement en solution sont présentes dans la puce grâce à cette méthode d'injection.

> Nous avons adapté la plateforme électro-microfluidique pour visualiser des cellules biréfringentes en intégrant un système d'éclairage couplant une illumination en transmission de la puce microfluidique à une collection en champ sombre. De plus, nous avons choisi une solution tampon convenant parfaitement à l'étude des phénomènes électrocinétiques sur des cellules tout en conservant la survie des cellules. Enfin, les cellules ont pu être injectées avec succès dans les puces microfluidiques par une méthode originale d'aspiration. Le pourcentage d'injection des cellules dans les canaux de la puce microfluidique est de l'ordre de 80 %.

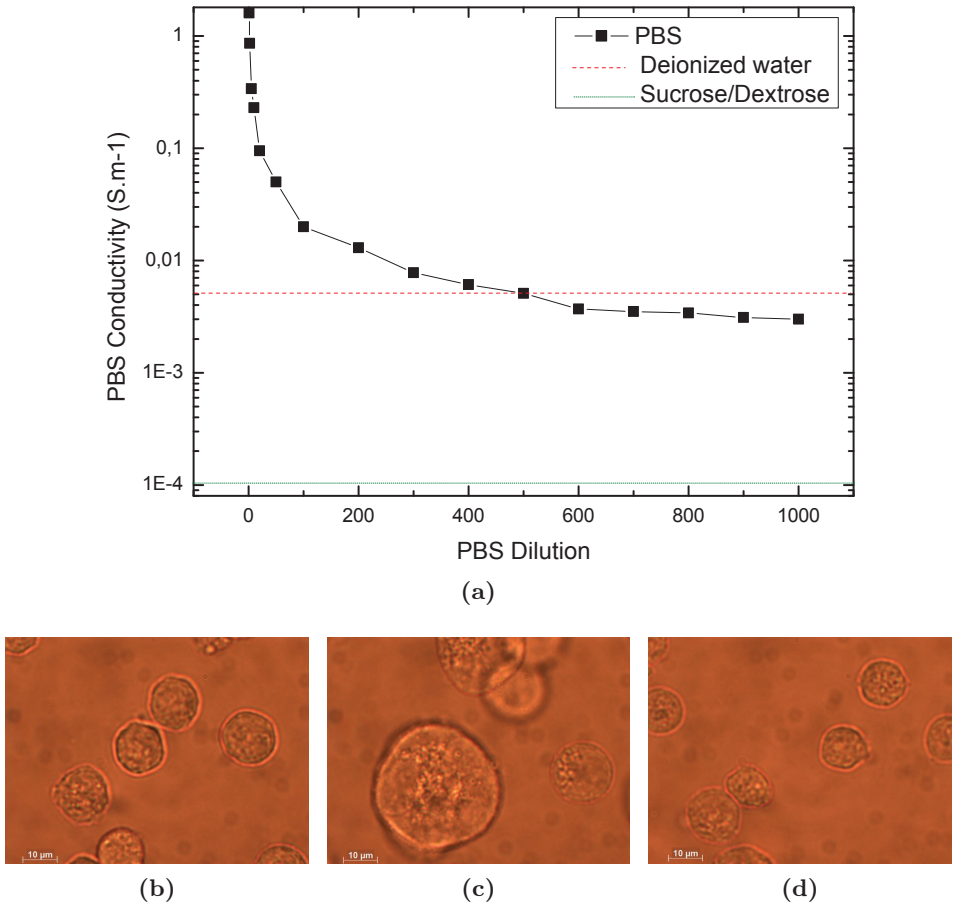


Figure 6.6 – (a) : Conductivité des milieux tampon et du PBS en fonction de la dilution ($S.m^{-1}$), (b) : Évolution des cellules dans du PBS pur, (c) : Dans du PBS dilué 5 fois et (d) : Dans du Saccharose-Glucose, après 1 minute.

6.2.2 Détermination du Facteur Clausius-Mossotti de cellules

Une cellule eucaryote est constituée d'une membrane cellulaire et d'un milieu intra-cellulaire qui présente de nombreux compartiments qui lui permettent d'assurer sa survie et ses fonctions vitales. Chaque compartiment, comme illustré sur la figure 6.8 présente des propriétés physico-chimiques qui lui sont propres et qui lui permettent d'assurer une fonction biologique au sein de l'entité cellulaire. Le milieu intracellulaire est composé principalement du cytoplasme et du noyau. Le cytoplasme est formé du cytosol (eau, ions, protéines) et d'organites cellulaires (ribosomes, vacuoles, mitochondries...).
L'application d'un champ électrique sur la cellule va entrainer différents effets à la fois sur le milieu intra-cellulaire mais également sur la membrane cellulaire. Sous l'action du champ, le milieu intra-cellulaire qui comporte des charges libres que sont les ions (Na+, K+, Cl-...) va se polariser. La membrane cellulaire qui assure la séparation entre le milieu extra-cellulaire et intracellulaire est constituée essentiellement d'une bi-couche de phospholipides. Ces phospholipides sont des longues molécules ayant une partie polaire et une partie apolaire. La membrane se comporte alors comme un isolant comportant des fuites (dues principalement aux canaux protéiques). Sous l'effet d'un champ électrique, la membrane va également ressentir la polarisation électronique.

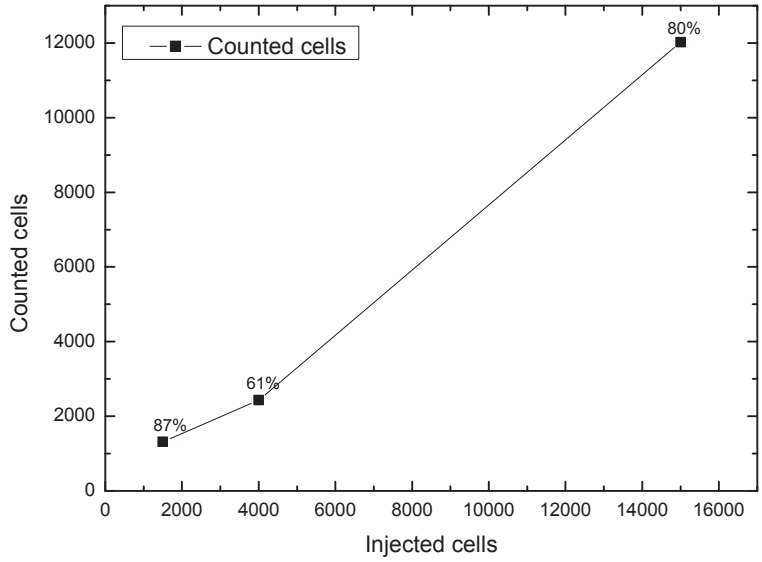


Figure 6.7 – Nombre de cellules effectivement observées dans le canal de la puce microfluidique (50 μm de haut et 200 μm de large) par rapport au nombre de cellules injectées dans le module fluidique à débit d'aspiration Q=300 pL/s.

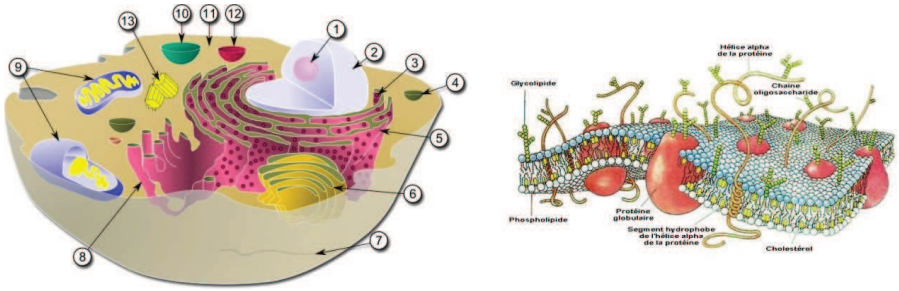


Figure 6.8 – A gauche, organisation d'une cellule animale eucaryote : 1.Nucléole, 2.Noyau, 3. Ribosome, 4.Vésicule, 5.Réticulum endoplasmique rugueux, 6.Appareil de Golgi, 7.Microtubule, 8.Réticulum endoplasmique lisse, 9.Mitochondrie, 10.Vacuole, 11.Cytoplasme, 12. Lysosome, 13.Centrosome. A droite, image de la section d'une membrane cellulaire [Morgan 2003a].

En sommant tous ces effets de polarisation, la cellule se comporte comme un dipôle en présence d'un champ électrique et a donc une réponse diélectrophorétique.

Facteur de Clausius-Mossotti d'une cellule

Pour chaque type cellulaire, la membrane et le cytoplasme étant différents (concentration en ions, tailles, perméabilité..) la signature diélectrophorétique sera également différente : Pour un milieu tampon donné, chaque type de cellule peut ainsi être caractérisé par un Facteur de Clausius-Mossotti qui lui est propre. La fréquence de coupure, pour laquelle $Re(\omega) = 0$, va également dépendre du type cellulaire. Ainsi, sa détermination peut par exemple constituer un moyen de suivre l'évolution d'une infection de la cellule par un virus à travers sa mesure à intervalles de temps réguliers. Quelques méthodes de mesure des propriétés diélectriques de cellules ont été effectuées dans la littérature, notamment par détermination des fréquences de coupure à conductivité du milieu variable [Green 1999] ou par électro-rotation

[Falokun 2007, Wei 2009]. Plusieurs études dans la littérature utilisent ces méthodes pour déterminer les propriétés électriques (permittivité et conductivité) des différents composants (membrane et cytoplasme) pour les types cellulaires suivants suspendus dans leurs milieux de culture respectifs : levures [Talary 1996], bactéries comme *Escherishia Coli* [Castellarnau 2006], cellules humaines HELA-60 [Huang 1997], lymphocytes T [Yang 1999], fibroblastes [Kaler 1990] ou neurones [Heida 2001].

Il existe deux modèles pour représenter le Facteur de Clausius-Mossotti des cellules :

- **Modèle sphère monocouche**. La cellule modélisée par un modèle monocouche est le cas le plus couramment utilisé et fait référence à la structure présentée sur la figure 6.9a. La cellule est alors composée par le cytoplasme (3, rayon R, conductivité σ_3, permittivité ε_3) entourée de sa membrane (2, épaisseur δ, conductivité σ_2, permittivité ε_2) et suspendue dans un milieu (1, conductivité σ_1, permittivité ε_1). Étant donné les faibles épaisseurs des membranes ($2nm < \delta < 8nm$) [Gascoyne 2004], leurs propriétés diélectriques sont généralement exprimées en capacitance C_{mem} et conductance surfaciques G_{mem} définies respectivement par les équations [Eq. 6.1]. De plus, dans le cas des cellules animales, la membrane étant très faiblement conductrice par nature, G_{mem} est souvent négligeable par rapport à la capacitance [Gascoyne 2004]. En considérant $\delta \ll R$, l'expression du Facteur de Clausius-Mossotti d'une cellule animale est alors donnée [Kaler 1990] par l'équation [Eq. 6.3] où les taux de relaxation des éléments constitutifs sont donnés par [Eq. 6.2].

$$C_{mem} = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon_2}{\delta},\ G_{mem} = \frac{\sigma_2}{\delta} \qquad \text{[Eq. 6.1]}$$

$$\tau_3 = \frac{\varepsilon_3}{\sigma_3},\ \tau_1 = \frac{\varepsilon_1}{\sigma_1},\ \tau_m = \frac{RC_{mem}}{\sigma_3},\ \tau_m^* = \frac{RC_{mem}}{\sigma_1} \qquad \text{[Eq. 6.2]}$$

$$Re(\omega)_{cell} = Re\left(\frac{\omega^2(\tau_1\tau_m - \tau_3\tau_m^*) - 1 + i\omega(\tau_m^* - \tau_1 - \tau_m)}{2 - \omega^2(\tau_3\tau_m^* + 2\tau_1\tau_m) + i\omega(\tau_m^* + 2\tau_1 + \tau_m)}\right) \qquad \text{[Eq. 6.3]}$$

- **Modèle à deux compartiments**. Si le modèle précédent est souvent adopté pour décrire les cellules, un modèle à deux compartiments est parfois plus représentatif de la structure cellulaire [Raicu 1996]. On peut prendre l'exemple de cellules végétales ou les amibes dont une paroi entoure la membrane plasmique, comme c'est le cas chez *Dicty*. Un modèle analytique a été développé par Irimajiri [Irimajiri 1979] considérant les différents compartiments de la cellule comme une succession de couches concentriques [Falokun 2007]. Ce modèle n'est pas détaillé ici.

Différents types de cellules étudiées par électro-rotation ont pu être caractérisées [Gascoyne 2004, Cen 2004] et pour la plupart des cellules mammifères, les paramètres des différents compartiments varient dans les plages suivantes :

- pour la membrane : $1.2 < C_{mem} < 4\ \mu F.cm^{-2}$ et G_{mem} est négligeable
- pour le cytoplasme : $50 < \varepsilon_3 < 150$ et $0.1 < \sigma_3 < 1.3$ S/m

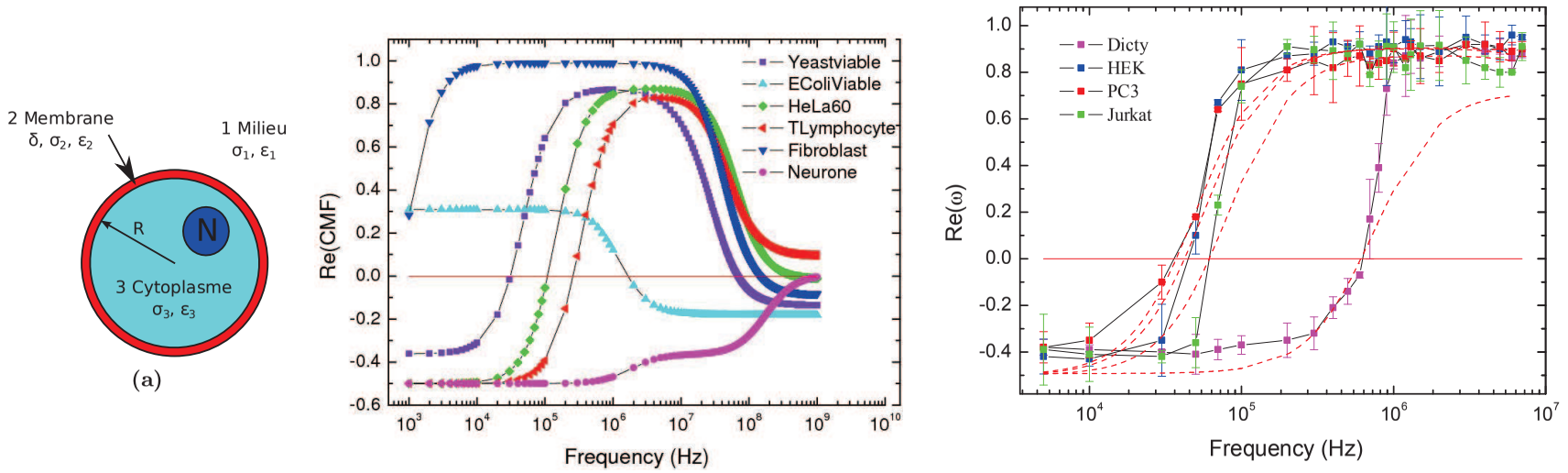
Comportement des cellules soumises à la diélectrophorèse

La figure 6.9b présente la modélisation des Facteurs de Clausius-Mossotti pour différentes lignées cellulaires dans du tampon saccharose-glucose en utilisant le modèle sphère monocouche. Les valeurs des paramètres ont été expérimentalement observées par d'autres méthodes et sont issues des travaux sur les lignées cellulaires précédemment citées.

De manière générale, à faibles fréquences ($f < 100$ kHz), la membrane de la cellule se comporte

comme un diélectrique ayant de faibles pertes et donc une conductivité complexe faible. La membrane se comporte alors comme une barrière limitant fortement la polarisation du milieu intracellulaire. A l'inverse, le milieu extérieur à la cellule n'expose pour sa part qu'une résistance relativement faible. Le champ diélectrique reste donc en basses fréquences principalement cantonné au milieu extra-cellulaire, la cellule est donc moins polarisable que le milieu induisant un comportement de diélectrophorèse négative.
En augmentant la fréquence, la membrane devient progressivement perméable au champ électrique. Ceci a pour conséquence d'augmenter l'action du champ sur le milieu intracellulaire. Dès lors, si le milieu intracellulaire est plus conducteur que le milieu extra-cellulaire, alors le champ électrique se propagera de préférence dans la cellule. Dans ce cas, la cellule est plus polarisable que le milieu, induisant un comportement de diélectrophorèse positive. Au contraire, si la cellule se révèle moins conductrice que le milieu, dans ce cas, le champ restera essentiellement cantonné au milieu induisant un comportement de diélectrophorèse négative.
A haute fréquence ($f > 10$ MHz), la permittivité devient prépondérante dans l'expression de la conductivité complexe. Or, le milieu a une permittivité (semblable à l'eau) bien plus élevée que celle de la cellule constituée d'eau mais aussi de protéines et d'autres grosses molécules moins polarisables. Le milieu redevient plus polarisable que la cellule, laissant à nouveau un comportement de diélectrophorèse négative prédominer.

Détermination expérimentale des Facteurs de Clausius-Mossotti des types cellulaires étudiés.
La méthode de détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti présentée au chapitre 4 est appliquée sur les lignées cellulaires étudiées.
Comme le montre la figure 6.9c, les cellules expriment bien les comportements attendus dans les limites fréquentielles imposées par les générateurs. Les valeurs théoriques issues de la formule explicite du Facteur de Clausius-Mossotti (équation 6.3) permettent d'extraire les valeurs des conductivités des cytoplasmes σ_3, des capacités et permittivités membranaires C_{mem} et ε_3 (et C_{mem2} chez *Dicty*).
On remarque que les cellules de lignées humaines (PC-3, HEK, Jurkat) ont une fréquence de coupure similaire, alors que *Dictyostelium* a une fréquence de coupure bien plus élevée. La différence se situe au niveau de la membrane cellulaire, qui n'a pas la même composition pour les deux catégories. En effet, pour *Dictyostelium*, la membrane est similaire à la membrane externe des bactéries de type Gram négatif [Ryter 1980]. Même si la composition globale est assez similaire à celle des cellules eucaryotes, c'est-à-dire une bi-couche de phospholipides, la composition en protéines est différente. On dénombre 84 protéines connues dans la membrane externe des bactéries gram-négatif, contre 277 protéines dans les membranes de cellules eucaryotes. Ce changement peut expliquer la différence de fréquence de coupure lors de la mesure du Facteur de Clausius-Mossotti.
De plus, les valeurs des paramètres mesurés par d'autres méthodes, trouvées dans la littérature, ont été intégrées au tableau. On remarque les valeurs très proches dans le cas des cellules Jurkat. Le modèle utilisé ici semble donc donner une description cohérente des cellules humaines. En revanche, les valeurs des propriétés diélectriques pour Dicty diffèrent, particulièrement dans le cas de C_{mem2}. Nous expliquons cette différence par l'épaisseur de la membrane plasmique chez Dicty qui n'a pu être mesurée avec précision et à été fixée dans nos modèle à 100 nm comme suggéré par [Aldaeus 2005].



(a) (b) (c)

Nom de lignée	Type de cellule	Diamètre 2R (μm)	σ_3(S/m)	ε_3	$C_{mem}(mF/m^2)$	$C_{mem2}(mF/m^2)$	Littérature
HEK	Adhérente	15	0.52±0.04	60±2.2	4.5±0.06	x	x
PC3	Adhérente	14	0.38±0.07	53±1.2	5.13±0.02	x	x
Jurkat	Non-adhérente	14	0.4±0.02	45±2.2	3.08±0.04	x	$\sigma_3 = 0.4$ $\varepsilon_3 = 45$ $C_{mem} = 6.6$ [Whitesides 1983]
Dicty	Amibe	15	0.9±0.09	70±3.5	8.9±0.4	1.1±0.2	$\sigma_3 = 0.19$ $\varepsilon_3 = 61$ $C_{mem} = 9.5$ $C_{mem2} = 13.3$ [Aldaeus 2005]

(d)

Figure 6.9 – (a) : Modèle coeur-coquille d'une cellule eucaryote, (b) Facteurs de Clausius-Mossotti théoriques et (c) expérimentaux des types cellulaires étudiés. (d) : Propriétés diélectriques des lignées cellulaires étudiées, extraites de l'ajustement des Facteur de Clausius-Mossotti expérimentaux au modèle coeur-coquille avec $\sigma_m = 2.10^{-4} S/m$.

6.2.3 Rotation de cellules en configuration co-planaire

Lorsque les cellules HEK sont soumises à un champ électrique non uniforme par des électrodes co-planaires, un phénomène de rotation des cellules apparaît, pour des fréquences de l'ordre de 30 à 50 kHz comme le montre les figures 6.10a. D'après la figure 6.10b, la rotation

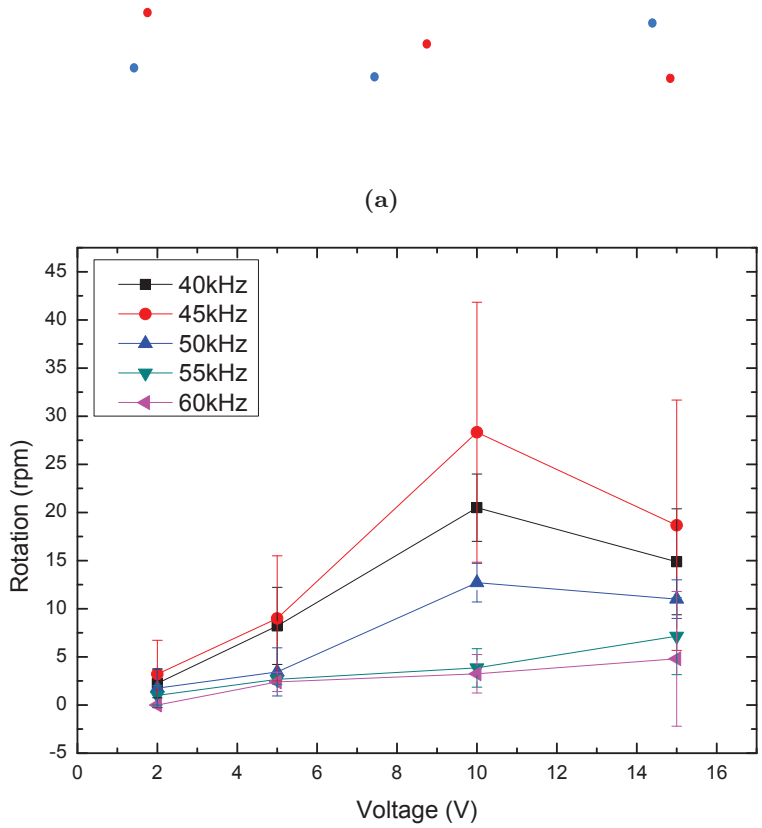


Figure 6.10 – (a) : Rotation d'une cellule HEK sous l'effet d'un champ électrique co-planaire ($f = 45kHz, V_{p-p} = 10V$) et (b) : Effet de la fréquence et du tension sur la vitesse de rotation des cellules HEK.

est maximale pour une fréquence de 45kHz, fréquence pour laquelle $Re(\omega)_{HEK} \sim 0$ et donc lorsque la diélectrophorèse est la plus faible. Lorsque le tension augmente, la vitesse de rotation augmente. Pour des tensions élevées (à partir de 15 V), les vitesses de rotations chutent. Ce phénomène semble donc résulter d'une compétition entre les forces diélectrophorétique positive et électrothermique. En effet, la première positionne les cellules aux bords des électrodes mais n'est pas suffisamment forte comparée à l'effet électrothermique qui impose des mouvements de convection de fluide aux bords des électrodes. Dès lors, les cellules sont entraînées par ces vortex locaux tout en étant maintenues par la diélectrophorèse, comme le montre la figure 6.11.

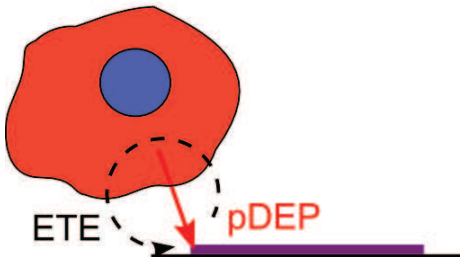


Figure 6.11 – Modélisation de la rotation des cellules sous l'effet d'un champ électrique alternatif en géométrie d'électrodes co-planaires

Notre méthode de détermination expérimentale du Facteur de Clausius-Mossotti à été appliquée aux cellules de lignée humaine et à Dicty. Nous avons pu mesurer les valeurs des Facteurs de Clausius-Mossotti dans la gamme de fréquence 1 kHz - 10 MHz. Les fréquences de coupure obtenues pour ces lignées sont résumées dans le tableau 6.1.

Lignée cellulaire	Dicty	Jurkat	HEK	PC3
Compétence	Phagocytose	Phagocytose	Adhérente	Adhérente
f_0 (kHz)	622	60	45	35

Table 6.1 – Fréquences de coupure f_0 des différentes lignées de cellules étudiées.

Nous avons ensuite proposé un modèle coeur-coquille qui permet d'extraire des Facteurs de Clausius-Mossotti les paramètres constitutifs des cellules étudiées. Les valeurs obtenues sont en accord avec celles obtenues par d'autres méthodes dans la littérature pour les cellules humaines mais diffèrent pour Dicty (figure 6.9d).
Nous avons aussi observé un phénomène de rotation de la cellule sur elle même autour de sa fréquence de coupure. Cette rotation semble être issue de la compétition entre les forces diélectrophorétique et électrothermique.

6.3 Interaction particules fonctionnalisées et cellules

Les interactions particules cellules peuvent être de deux types : internalisation ou greffage sur la membrane cellulaire. Dans un premier temps, nous étudierons l'internalisation de particules chez *Dictyostelium discoideum* (Dicty), et dans les cellules de lignées humaines lymphocyte T de type Jurkat. Dans un second temps, nous détaillerons le greffage de particules fonctionnalisées sur les membrane des cellules de lignées humaines HEK.

6.3.1 Internalisation de particules colloïdales

L'internalisation des particules a été étudiée chez *Dictyostelium discoideum*, et dans les cellules de lignées humaines lymphocyte T de type Jurkat. Ces deux types cellulaires sont compétents pour la phagocytose.

Les cellules ont été mélangées avec une quantité fixe de particules colloïdales fluorescentes avec un ratio (1 :100),

laissé à température ambiante sous agitation légère pendant 30 minutes. Lorsque prélevés, les complexes particules-cellules sont mélangés en ratio (1 :1) en volume avec de l'azide de sodium (0.5% au final). L'azide empêche la phagocytose de particules et permet de détacher les particules qui sont en surface. On n'observe ainsi que les particules internalisées. Les complexes ont été observés sous microscope en fluorescence x20.
Différentes particules colloïdales ont été testées : nous nous sommes intéressés à l'effet de la taille, de la fonctionnalisation, et au cas des particules Janus par rapport à leur efficacité d'internalisation par les cellules.

Étude de l'internalisation chez *Dictyostelium discoideum*.

– **En fonction de la taille**

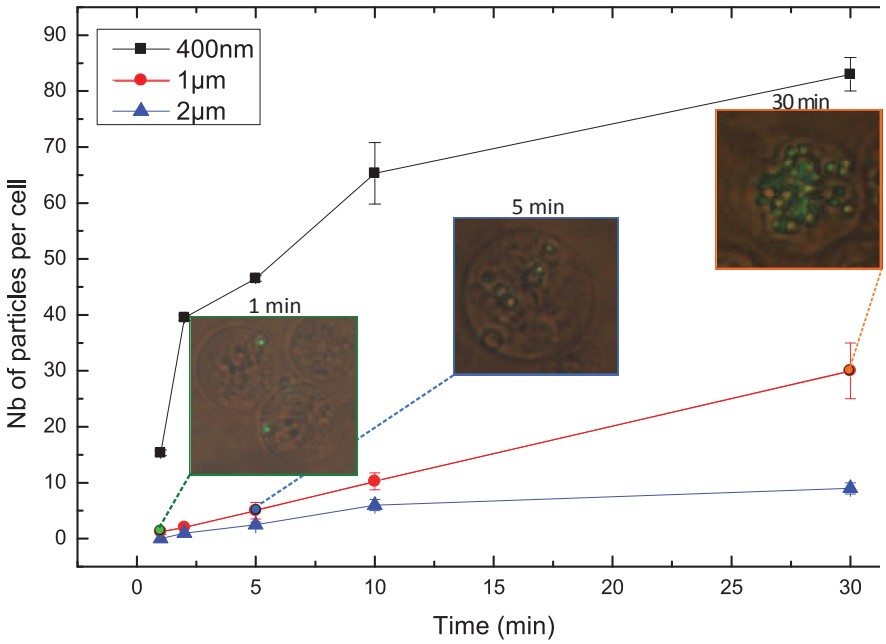


Figure 6.12 – Phagocytose de particules de polystyrène nues de différentes tailles. La barre d'échelle représente 5μm

La figure 6.12 montre que plus les particules sont petites, plus elles sont internalisées en grand nombre : l'énergie requise pour phagocyter des particules de grand diamètre est plus élevée que pour des particules plus petites, la taille du phagosome étant plus grande. De plus, le temps qu'il faut à la membrane pour se replier autour de la particule et former le phagosome est plus long pour les particules plus grandes [Chithrani 2007].
De plus en plus de cellules internalisent des particules avec le temps. A 30 minutes, on a donc 100% des cellules qui ont phagocyté des particules (excepté pour les particules de 2 μm de diamètre, 80%). Mais au début de la réaction (jusqu'à 10 minutes), le pourcentage de cellules qui ont des particules internalisées est plus important pour des particules de plus petit diamètre.

– **En fonction de la fonctionnalisation**

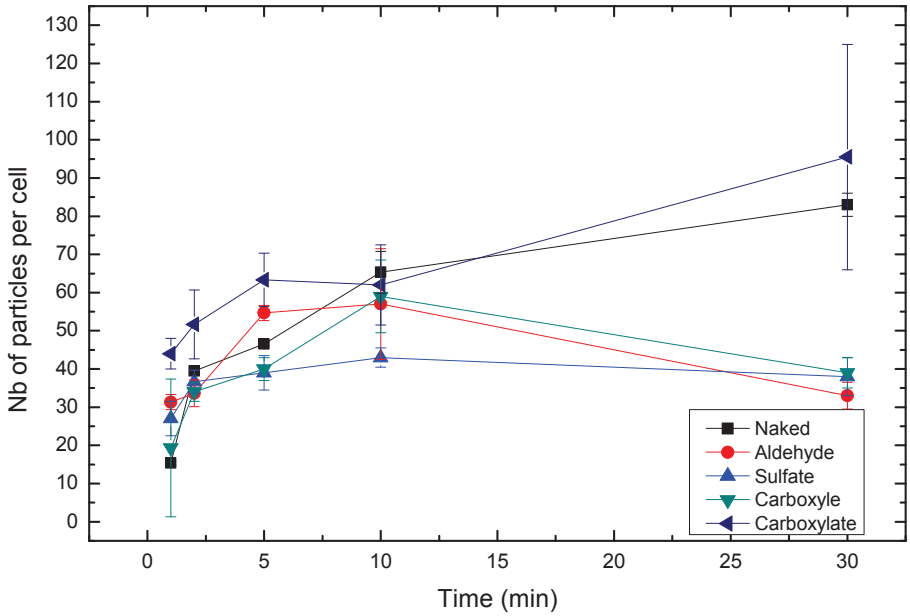
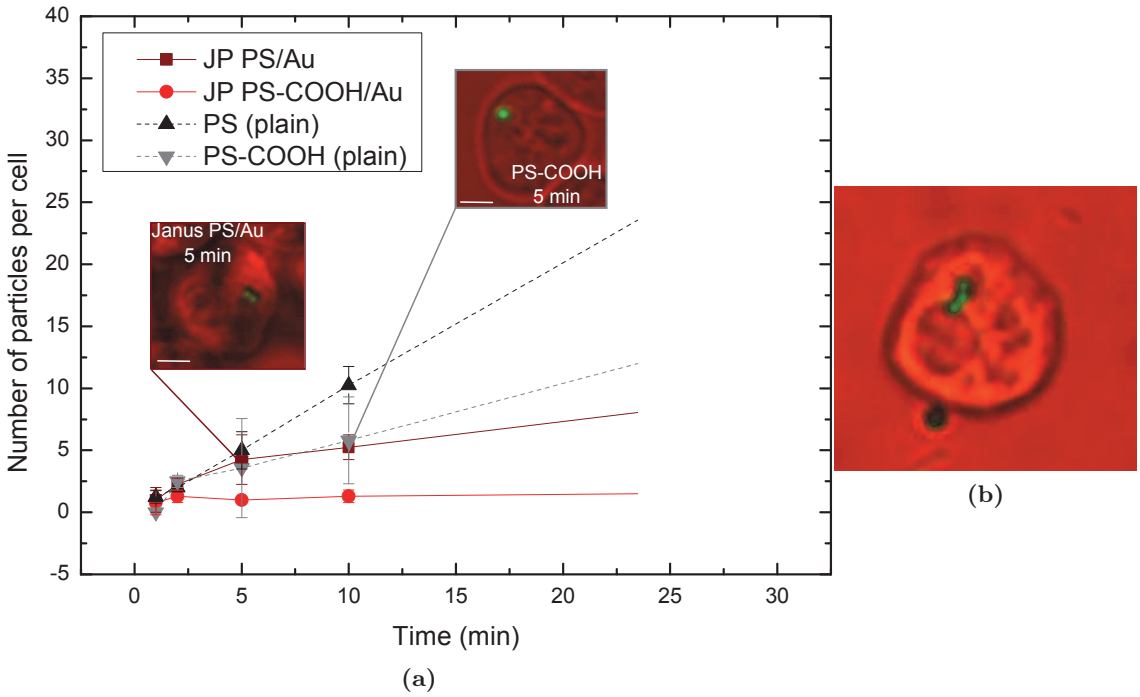


Figure 6.13 – Phagocytose de particules de polystyrène de 400 nm avec différentes fonctionnalisations de surface.

Lorsqu'une particule chargée se fixe sur la membrane plasmique, la charge globale de la cellule est modifiée. L'équilibre se rétablit en internalisant la particule [Cho 2009, Chithrani 2006]. La membrane plasmique étant chargée négativement, la répulsion électrostatique entre celle-ci et les nanoparticules entraîne un déséquilibre moindre qu'avec des particules chargées positivement, et donc une internalisation moins efficace. On retrouve bien ce phénomène sur la figure 6.13, puisque toutes les fonctionnalisations apportent une charge négative et dans tous les cas on a une internalisation diminuée, excepté pour la fonction carboxylate. Celle-ci diffère de la fonction carboxyle par le procédé chimique employé pour synthétiser le groupement. La fonction carboxylate est au final moins chargée que les autres fonctions, ce qui concorde avec les résultats observés.

– **Cas des particules Janus**
Les figures 6.14a et 6.14b montrent que les particules Janus sont peu internalisées par la cellule, par rapport à des particules de polystyrène nues. Une des hypothèses serait que le polystyrène absorbe les protéines secrétées par la cellule pour phagocyter la particule alors que celles-ci ne sont pas adsorbées par l'Au présent sur l'autre face des particules Janus. Il est donc plus difficile pour la cellule de phagocyter la totalité de la particule. Par contre, la même tendance que précédemment est retrouvée, à savoir que le groupement carboxylate entraîne une plus faible internalisation, que ce soit pour des particules pleines, ou Janus.



(a) (b)

Figure 6.14 – (a) : Phagocytose de particules de polystyrène de 1 μm de différents types chez *Dictyostelium*. La barre d'échelle représente 5μm. (b) : Internalisation de particules Janus chez *Dictyostelium*

On peut aussi remarquer que les particules Janus sont orientées en "lune" dans la cellule : on aperçoit une moitié de la face Au et une moitié de la face polystyrène (fluo). Il est donc possible que le processus d'internalisation soit favorisé lorsque les particules sont orientées face polystyrène vers la membrane. A l'inverse, les particules ne sont pas internalisées lorsque leur face Au est orientée vers la cellule.

Étude de l'internalisation dans les lymphocytes T.
L'internalisation a aussi été quantifiée dans les lymphocytes T. On retrouve les mêmes résultats que chez *Dictyostelium*, avec cependant une phagocytose légèrement moins efficace comme le montre la figure 6.15.

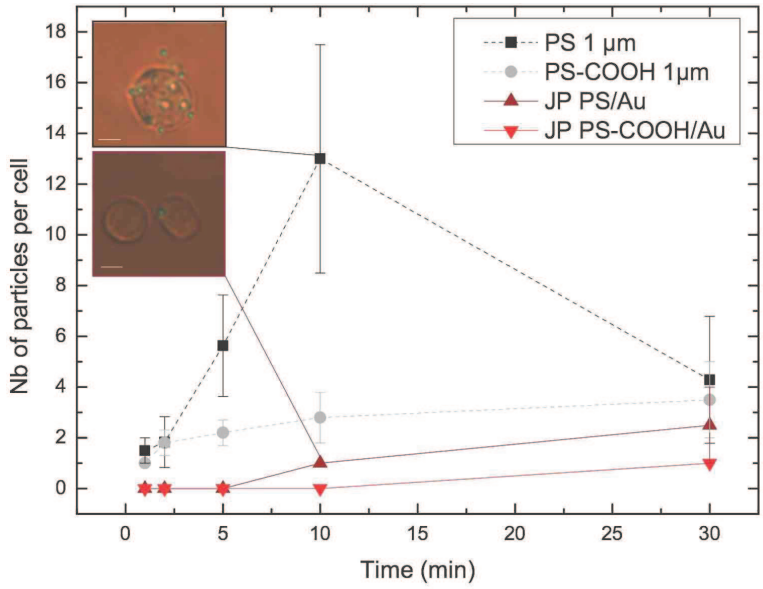


Figure 6.15 – Phagocytose de particules de polystyrène de 1 μm de différents types dans la lignée Jurkat.

Un mécanisme important préalable à la phagocytose n'est pas présent ici, l'opsonisation [Hillaireau 2009], processus qui se fait dans la circulation sanguine humaine. Des molécules (principalement des immunoglobulines et des protéines sériques) viennent recouvrir le corps étranger, et permettent leur reconnaissance spécifique par les lymphocytes. Elles ne sont pas présentes dans le tampon, et leur absence explique la faible internalisation dans les lymphocytes par rapport à *Dictyostelium*.

6.3.2 Accroche surfacique de particules colloïdales

Les particules colloïdales de polystyrène peuvent s'adsorber à la membrane d'une cellule avec des liaisons qui restent faibles : ce sont des interactions hydrogènes qui sont mises en jeu, de part les propriétés hydrophiles des deux parties [ichi Ogawara 1999]. Afin de pouvoir manipuler les cellules grâce aux particules en surface, la liaison doit être plus forte, pour éviter que les particules se déplacent sans la cellule. Pour cela, les particules de polystyrène ont été rendues fonctionnelles vis-à-vis de la membrane cellulaire, par greffage de fibronectine (voir chapitre 2). La liaison covalente entre les intégrines et la fibronectine permet une interaction forte entre les microparticules fonctionnalisées et la membrane cellulaire.

Les cellules utilisées ici sont de la lignée HEK. Ce sont des cellules épithéliales, d'un diamètre moyen de 13 μm. Elles ne sont pas compétentes pour la phagocytose, mais l'endocytose de particules se fait via des récepteurs spécifiques, et par macropinocytose (non spécifique)

[Sahay 2010]. Ces voies sont peu efficaces, et on n'observe seulement 3 particules au maximum dans quelques rares cellules ce qui est un avantage pour l'accroche surfacique de particules.

L'objectif ici est d'obtenir le meilleur taux de recouvrement de la cellule par les particules.

Le protocole de réaction se basant sur un simple mélange homogène ne permet pas, sous l'effet seul de la probabilité de rencontre d'une particule et d'une cellule, de réaliser une interaction forte entre une particule fonctionnalisée et une cellule. Le protocole est alors modifié en ajoutant une étape de centrifugation des cellules sur un tamis de particules sédimentées comme le montre la figure 6.16a. De fait, la probabilité de rencontre est augmentée en fonction du ratio N : nombre de particules sur le nombre de cellules. Ainsi, pour des particules de polystyrène fonctionnalisées en surface avec de la fibronectine, le taux de greffage peut aller jusqu'à plusieurs dizaines de particules par cellule comme le montre la figure 6.16b. Il faut noter le caractère croissant du nombre de particules présentes sur les cellules lorsque N augmente. Toutefois, le taux de recouvrement maximal calculé à partir de la surface totale présentée par la cellule et de la surface projetée par une particule de 1 μm de diamètre n'est pas atteint.

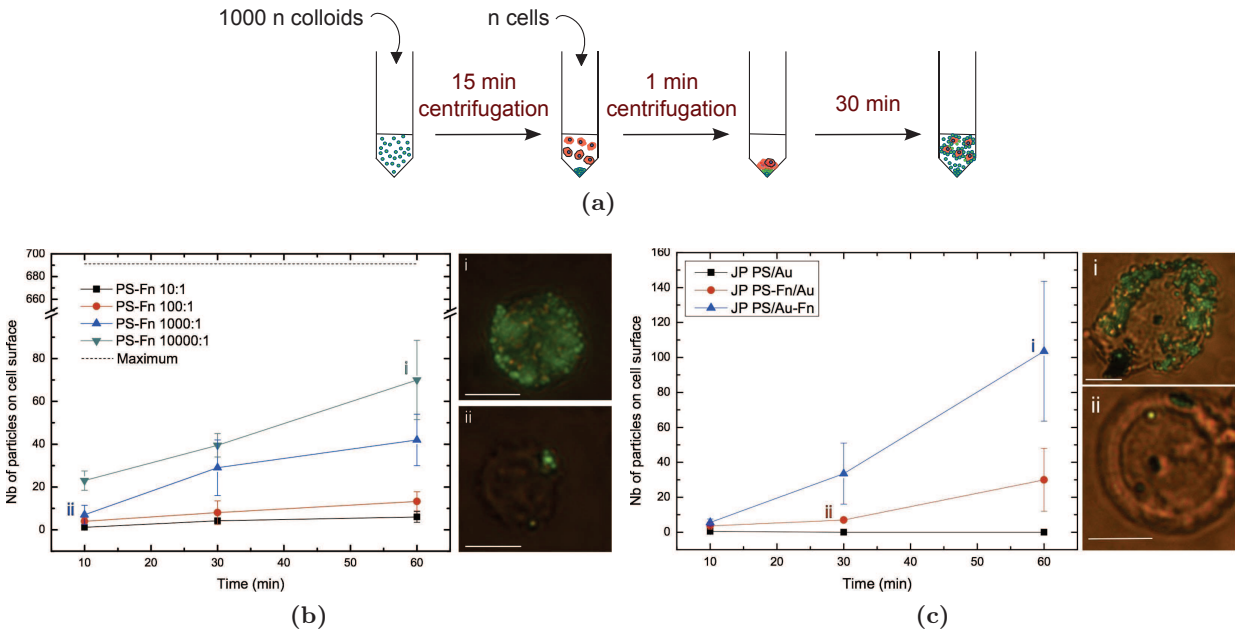


Figure 6.16 – (a) : Protocole d'accroche surfacique de particules colloïdales, (b) : Quantité de particules greffées en surface de cellules HEK en fonction du temps à ratios particules/ cellules croissants. (c) : Quantité de particules Janus greffées en surface de cellules HEK en fonction du temps à ratio particules :cellules 1000 :1 et pour différentes fonctionnalisations de surface.

Nous avons étudié l'internalisation de particules fonctionnalisées par des cellules compétentes pour la phagocytose : Dicty et des lymphocytes T de lignée Jurkat. Nous avons pu mettre en évidence que la taille et la fonctionnalisation de surface des particules jouent un rôle déterminant sur leur internalisation par Dicty. Ainsi, plus les particules sont petites, plus elles sont internalisées. De même, une charge surfacique négative limite l'internalisation de particules. Nous avons aussi remarqué que les particules Janus de type Au / PS sont très faiblement internalisées (< 5 part / cellule) par Dicty avec une préférence d'internalisation coté polystyrène. Des résultats similaires sont observés pour les lignées Jurkat avec une efficacité d'internalisation moindre due à l'absence d'oponisation. Nous avons pu internaliser avec succès, chez Dicty ou les lignées Jurkat, jusqu'à une dizaine de particules par ailleurs de manière durable.
Nous avons de même proposé un protocole répétable d'accroche surfacique de particules fonctionnalisées. Ainsi il est possible de recouvrir de particules de polystyrène fonctionnalisées avec de la fibronectine des cellules de lignées HEK jusqu'à 80 particules par cellules. On observe aussi des réponses duales dans le cas des particules Janus en fonction du coté de fonctionnalisation. Les particules Janus ayant une fonctionnalisation sur leur coté polystyrène sont bien moins accrochées (< 20 %) que celles présentant les protéines sur leur coté Au. Il semble que le coté Au des particules Janus limite leur internalisation ou leur accroche en surface.

6.4 Réponse diélectrophorétique d'un complexe cellule / particules colloïdales

Une fois les particules internalisées ou accrochées en surface et en quantité suffisante, les complexes particules-cellules sont soumis à des champs électriques non-uniformes dans un canal microfluidique. Ce dernier comporte des électrodes en configurations co-planaires uniquement. L'objectif étant d'observer les comportements des cellules et des particules lorsqu'elles sont soumises ensemble à des fréquences particulières du champ électrique. Ces fréquences sont déterminées à partir de la superposition des Facteurs de Clausius-Mossotti expérimentaux des particules et des cellules étudiées. Nous appelons alors **scénario**, l'application d'un champ électrique alternatif non-uniforme au complexe cellule-particules ayant une fréquence déterminée à partir des valeurs de leurs Facteurs de Clausius-Mossotti superposés. Chaque scénario est alors indiqué sur les Facteurs de Clausius-Mossotti par un numéro. L'électrode activée est indiquée par une étoile dans les figures suivantes.

6.4.1 Particules internalisées

Chez Dictyostelium.
Sur la figure 6.17, on retrouve les Facteurs de Clausius-Mossotti expérimentaux des particules de polystyrène 1 μm et de *Dictyostelium*. Les deux réponses sont totalement opposées, et 5 scénarios peuvent être extraits. Les comportements observés sont résumés dans le tableau 6.3 pour les différentes fréquences avec un tension constant à 2 V_{p-p}. Une modélisation est aussi proposée qui peut expliquer les comportements duaux observés.

- **Scénario 1 :** A 1 kHz, les cellules sont sous diélectrophorèse négative et repoussées du bord des électrodes. L'électroosmose est prédominante pour les particules qui sont centrées sur les électrodes.

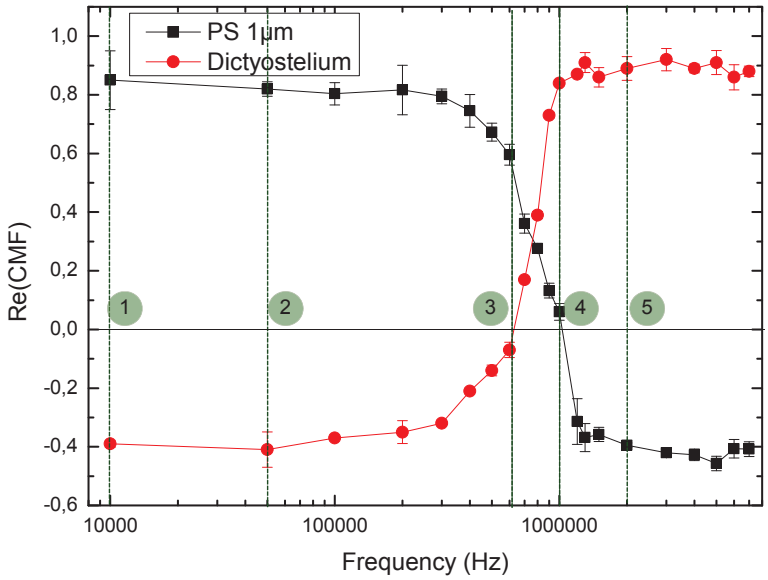


Figure 6.17 – Facteurs Clausius-Mossotti de *Dictyostelium* (rouge) et des sphères de polystyrène 1 μm (noir)

- **Scénario 2 :** A 50 kHz, les particules sont sous diélectrophorèse positive alors que les cellules sous diélectrophorèse négative. Il apparait un comportement d'agglutination des particules sur le coté intérieur de la cellule alors que celle-ci est repoussée des électrodes. Lorsque les particules ne sont plus sous l'effet de la diélectrophorèse parce que entrainées dans le mouvement de la cellule, elles se redistribuent dans l'ensemble de la cellule en moins de 2 secondes. Il est alors possible que le cytosquelette de la cellule soit mis sous contrainte mécanique et reprenne sa conformation initiale lorsque les particules ne sont plus attirées par la diélectrophorèse.
- **Scénario 3 :** Autour de 600 KHz, les particules sont sous diélectrophorèse positive alors que les cellules ne démontrent plus de réponse diélectrophorétique. Les particules internalisées sont alors concentrées faiblement proche des bords des électrodes.
- **Scénario 4 :** A 1.1 MHz, les particules colloïdales n'ont plus de réponse diélectrophorétiques alors que les cellules sont attirées vers les bords des électrodes.
- **Scénario 5 :** A 2 MHz, les cellules sont attirées vers les bords des électrodes alors que les particules colloïdales en sont repoussées. On observe alors la défocalisation des particules colloïdales qu'elles soient internalisées par les cellules ou libres en suspension.

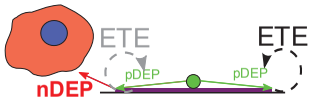
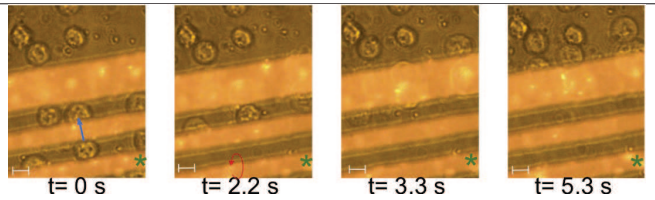
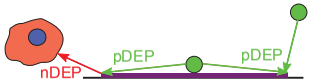
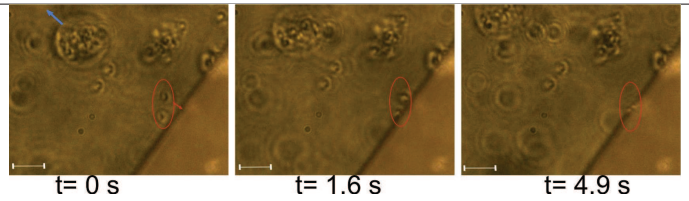
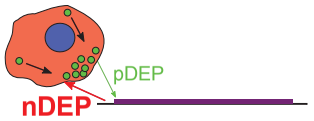
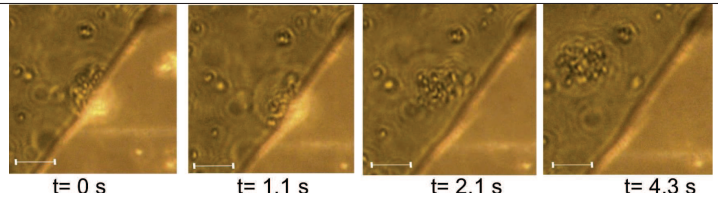
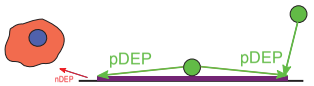
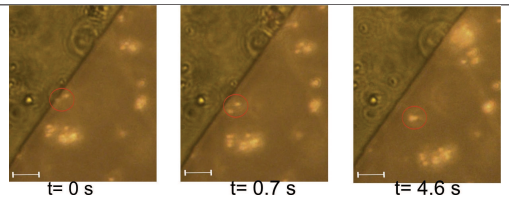
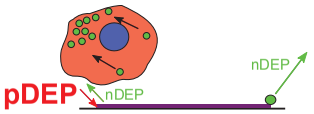
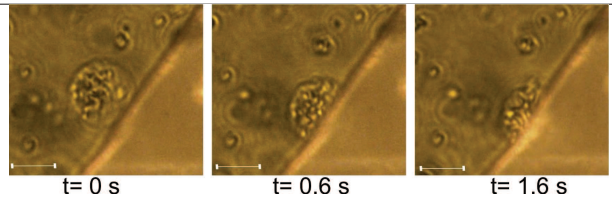
Scén.	f	$Re(\omega)$	Modélisation	Résultats Expérimentaux
1	1 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0,85$ $Re(\omega)_{cell} = -0,39$		
2	50 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0,82$ $Re(\omega)_{cell} = -0,41$		
2	100 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0,80$ $Re(\omega)_{cell} = -0,37$		
4	500 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0,67$ $Re(\omega)_{cell} = -0,14$		
5	2 MHz	$Re(\omega)_{part} = -0,39$ $Re(\omega)_{cell} = +0,89$		

Table 6.3 – Scénarios théoriques et expérimentaux le complexe pour le complexe *Dictyostelium*- particules de polystyrène 1 μm internalisées, en diélectrophorèse coplanaire. La barre d'échelle représente 10 μm.

Chez les lymphocytes T Jurkat.
Les Facteurs de Clausius-Mossotti des particules de polystyrène de 1 μm et des lymphocytes T Jurkat sont superposés sur la figure 6.18 et les scénarios correspondants sont présentés dans le tableau 6.4 pourun tension constant à 2 V_{p-p}. Les modélisations correspondantes sont insérées dans le tableau.

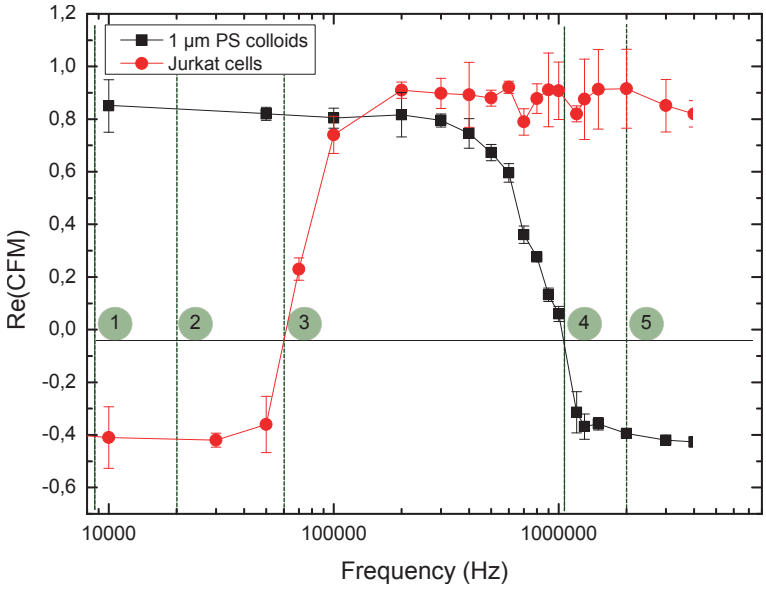


Figure 6.18 – Facteurs Clausius-Mossotti de cellules de lignées Jurkat (rouge) et des sphères de polystyrène 1 μm (noir). La barre d'échelle représente 10 μm.

- **Scénario 1 :** Les cellules sont sous diélectrophorèse négative et les particules sous diélectrophorèse positive avec l'électroosmose (ACEO) qui prédomine. Ainsi, les particules libres en solution sont centrées au milieu des électrodes par ACEO alors que les cellules comportant des particules sont repoussées des électrodes.
- **Scénario 2 :** A 20 kHz, les cellules sont toujours sous diélectrophorèse négative et les particules sous diélectrophorèse positive. A cette fréquence, l'ACEO est inexistante. On observe alors un mouvement des cellules qui sont repoussées du bord des électrodes. En même temps, les particules sont fortement attirées vers ces zones de forts gradients. La cellule tourne alors sur elle-même et on observe une concentration des particules vers le bord des électrodes.
- **Scénario 3 :** Autour de 60 kHz, les cellules ne sont plus soumises à la diélectrophorèse. On observe alors que les cellules sans particule sont plus repoussées (vitesse 4 fois plus importante en norme) que les cellules ayant internalisées des particules. Bien qu'étant proche de la fréquence de coupure, les cellules conservent leur comportement de diélectrophorèse négative probablement dû au fait que la fréquence de coupure ait été sous évaluée. On note néanmoins que les particules étant sous diélectrophorèse positive retiennent les cellules vers les électrodes.
- **Scénario 4 :** A 1.1 MHz, les cellules sont sous diélectrophorèse positive alors que les particules ne sont plus soumises à la diélectrophorèse. Bien que les cellules soient attirées vers les électrodes, l'organisation interne des particules n'est pas modifiée, voir même conservée le long du mouvement de la cellule.

– **Scénario 5 :** A 2 Mhz, les cellules sont toujours attirées vers les électrodes mais les particules, sous diélectrophorèse négative, sont fortement repoussées du bords des électrodes. On observe alors un mouvement soudain des particules du coté opposé de la cellule à celui de l'électrode .

Ces expériences montrent que l'organisation des particules colloïdales internalisées par les cellules Jurkat peut être modifiée selon la fréquence du champ électrique imposé. Cependant les particules colloïdales sont maintenues à l'intérieur de la cellule par le cytosquelette de cette dernière. Il est formé de différents types de filaments d'actine, intermédiaires et de microtubules. Selon la littérature, les filaments d'actine sont les plus rapides à se réorganiser et nécessitent de 20 secondes à 15 minutes pour obtenir une réorganisation totale [Zhelev 1995, Birukov 2002, Stossel 2006]. Hors les mouvements imposés par diélectrophorèse sont presque instantanés (moins de 2 secondes maximum). Lorsque imposés dans de telles conditions (typiquement scénarios 2 et 5), les mouvements des particules à l'intérieur des cellules imposent donc des contraintes mécaniques fortes sur son cytosquelette.

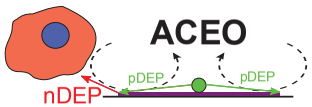
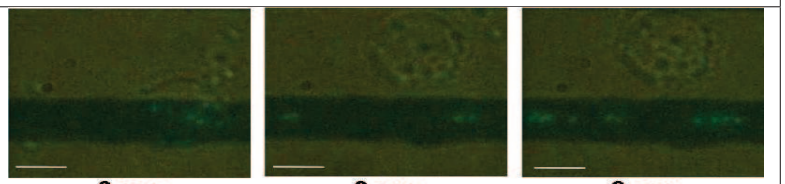
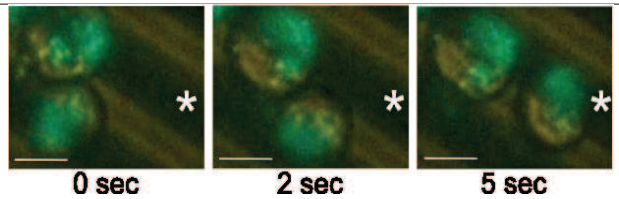
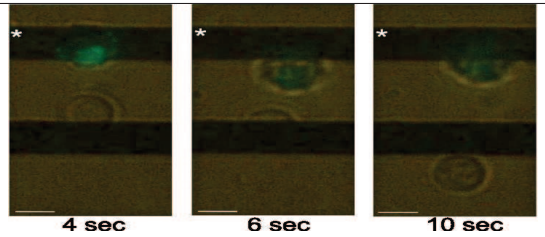
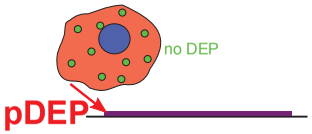
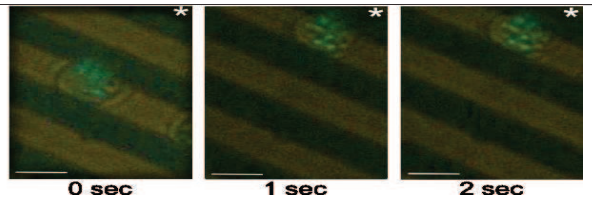
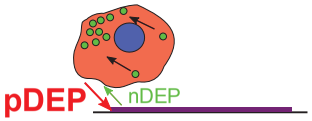
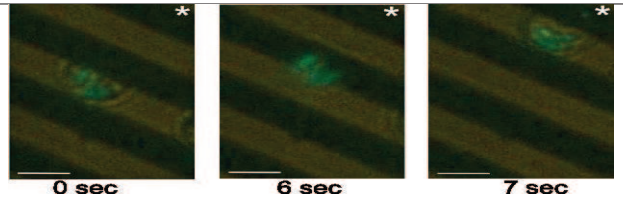
Scén.	f	$Re(\omega)$	Modélisation	Résultats Expérimentaux
1	5 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0,85$ $Re(\omega)_{cell} = -0,39$		
2	20 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0,82$ $Re(\omega)_{cell} = -0,42$		
3	60 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0.82$ $Re(\omega)_{cell} = 0$		
4	1.1 MHz	$Re(\omega)_{part} = 0$ $Re(\omega)_{cell} = 0.85$		
5	2 MHz	$Re(\omega)_{part} = -0,39$ $Re(\omega)_{cell} = +0.92$		

Table 6.4 – Scénarios théoriques et expérimentaux pour la lignée JURKAT et des particules de polystyrène 1 μm, en diélectrophorèse coplanaire

6.4.2 Particules externalisées

Les cellules de lignée HEK sont greffées sur leur surface avec des particules de polystyrène fonctionnalisées avec des protéines d'adhésion cellulaire avec un ratio de mélange de 1 :1000. Nous n'avons pas choisi d'avoir un fort taux de recouvrement de particules sur la cellule de façon à pouvoir observer les éventuelles rotations de la cellule sur elle-même.
Les Facteurs de Clausius-Mossotti des cellules et des particules sont superposés sur la figure 6.19. Il est possible d'extraire alors 4 scénarios principaux. Les expériences menées et modélisations

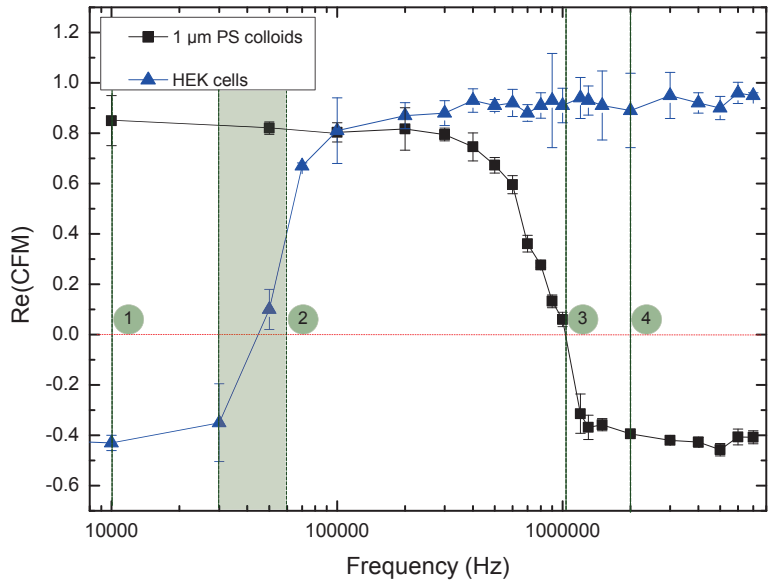


Figure 6.19 – Facteurs Clausius-Mossotti de cellules de lignées HEK (bleu) et des sphères de polystyrène 1 μm (noir). La barre d'échelle représente 10 μm.

correspondantes sont présentées dans le tableau 6.5.

- **Scénario 1 :** A 10 kHz, les cellules étant sous diélectrophorèse négative et les particules sous diélectrophorèse positive, les cellules sont repoussées des électrodes (comme confirmées par celles qui ne présentent pas de particules en surface) mais les particules greffées en surface restent sur le bord des électrodes. La réponse diélectrophorétique des particules est donc suffisamment forte pour maintenir la cellule en place alors qu'une pression électrostatique s'exerce sur elle pour la repousser des électrodes. Dans cette configuration, la cellule entière est alors stressée mécaniquement.
- **Scénario 2 :** Autour de la fréquence de coupure des cellules (f=45 kHz), on peut observer 3 comportements distincts : à 30 kHz, la cellule est repoussée des électrodes. à 40 kHz, la cellule est tout d'abord repoussée par diélectrophorèse négative puis ré-attirée vers les électrodes par diélectrophorèse positive des particules colloïdales. En effet, étant proche de la fréquence de coupure des cellules, la réponse des particules devient prédominante lorsque la cellule ne ressent plus le champ électrique et n'est plus soumise à la diélectrophorèse. Enfin, à 50 kHz, la cellule n'est plus repoussée et on peut observer le phénomène de rotation de cellule mis en évidence au chapitre 6.2.3 au dessus des électrodes.
- **Scénario 3 :** A 1.1 MHz, les cellules, greffées ou non, sont attirées de manière identique vers les électrodes. Les particules n'influencent pas la diélectrophorèse positive des cellules

car la fréquence du champ électrique est égale à leur fréquence de coupure.
- **Scénario 4 :** A 2 MHz, la cellule est attirée (pDEP) vers les électrodes alors que les particules en sont repoussées (nDEP). On observe alors une orientation de la cellule côté particules opposé aux électrodes. Dans cette configuration, les particules tirent sur la cellule par diélectrophorèse négative alors que la cellule demeure sur le bord de l'électrode par diélectrophorèse positive.

De même que précédemment, on observe 2 scénarios où la cellule est soumise à un stress mécanique local. Les cas 1 et 5 montrent qu'il est possible de fixer la membrane cellulaire au bord d'une électrode et tirer sur la cellule de manière globale par pression électrostatique. A l'inverse, il est possible de fixer la cellule sur le bord d'une électrode et de tirer localement sur la membrane par diélectrophorèse négative des particules sur cette membrane.

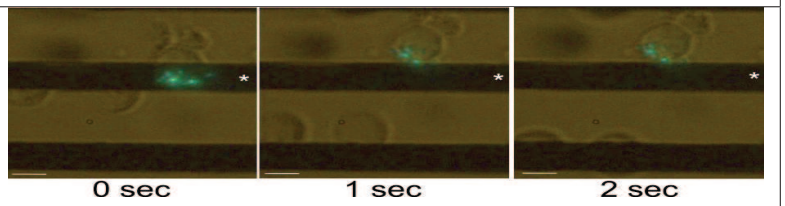
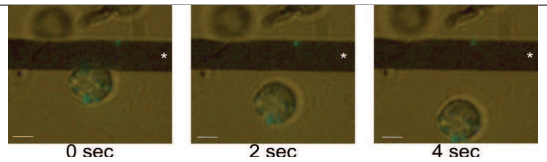
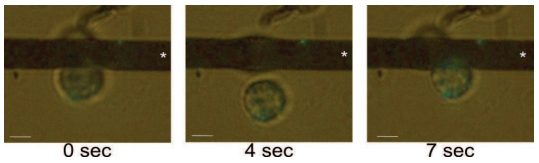
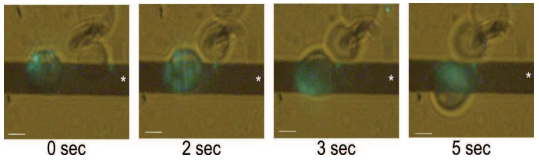
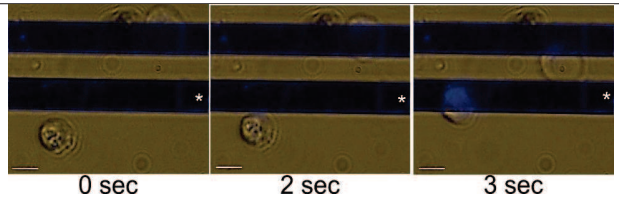
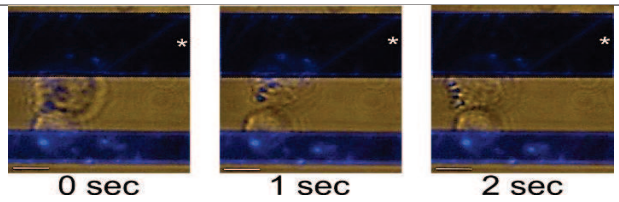
Scén.	f	$Re(\omega)$	Modélisation	Résultats Expérimentaux
1	10 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0,85$ $Re(\omega)_{cell} = -0,43$		
2	30 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0,84$ $Re(\omega)_{cell} = -0,35$		
	40 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0,83$ $Re(\omega)_{cell} = -0,1$		
	50 kHz	$Re(\omega)_{part} = +0,82$ $Re(\omega)_{cell} = +0.1$		
3	1.1 MHz	$Re(\omega)_{part} = 0$ $Re(\omega)_{cell} = 0.92$		
4	2 MHz	$Re(\omega)_{part} = -0,39$ $Re(\omega)_{cell} = +0.89$		

Table 6.5 – Scénarios théoriques et expérimentaux pour la lignée HEK et des particules de polystyrène 1 μm greffées avec de la fibronectine, en diélectrophorèse coplanaire. La barre d'échelle représente 10 μm. La barre d'échelle représente 10 μm.

6.5 Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'il était possible de visualiser des cellules de lignées humaines et Dicty à travers les puces microfluidiques par transmission. Nous les avons suspendues dans des milieux de conductivité faibles ($\sigma_m = 2\ 10^{-4}$ S/m) pendant plusieurs heures sans que la population cellulaire ne présente de perte importante (pertes inférieures à 20 %).

L'accès à de telles conductivités nous a permis d'étudier l'électrocinétique de ces cellules. Nous avons en effet mesuré expérimentalement leurs Facteurs de Clausius-Mossotti par la méthode présentée au chapitre 2. Nous avons de même extrait leurs propriétés diélectriques en proposant des modèles coeur-coquilles prenant en compte les capacités des membranes cellulaires. Les valeurs obtenues sont en accord avec celles de la littérature pour les lignées humaines mais des différences sont observées pour Dicty. Nous avons aussi observé le phénomène de rotation d'une cellule HEK sur elle-même lorsqu'elle est soumise à un champ électrique alternatif dont la fréquence se situe autour de sa fréquence de coupure diélectrophorétique.

Ensuite nous avons proposé une étude sur l'internalisation de particules colloïdales dans les cellules compétentes pour la phagocytose : Dicty et lymphocyte T Jurkat. Ainsi, chez Dicty, nous avons observé les effets de la taille et de la fonctionnalisation de surface de particules de polystyrène sur leur capacité à être internalisées. Il apparait que les petites particules ($< 1\ \mu$m) sont deux fois plus internalisées que les particules de plus gros diamètre. De plus, les particules présentant des charges négatives sont 4 fois moins internalisées que les autres particules. Nous avons aussi constaté que l'internalisation des particules Janus, orientée coté polystyrène par rapport au coté Au, est très limitée (moins de 10 particules en 30 minutes de réaction). L'internalisation de particules dans les lymphocyte T de type Jurkat donne des résultats similaires à ceux obtenus avec Dicty. Ces cellules peuvent internaliser jusqu'à 14 particules en 10 minutes.

Enfin, nous avons soumis les différents complexes particules-cellules (les particules de polystyrène de 1 μm étaient internalisées par Dicty et par les cellules Jurkat alors que greffées en surface sur les cellules HEK) à des champs électriques alternatifs non-uniformes. En superposant les Facteurs de Clausius-Mossotti expérimentaux des cellules et des particules, nous avons défini plusieurs scénarios possibles lorsque l'ensemble est soumis à la diélectrophorèse. Nous avons montré qu'il est possible, en choisissant les fréquences du champ électrique, de localiser les particules relativement aux cellules, que ce soit à l'intérieur ou à l'extérieur de celle-ci. Il semble que, par ce moyen, la cellule soit contrainte mécaniquement, ouvrant ainsi la voie à l'application locale de forces directement sur le cytosquelette ou sur la membrane de la cellule.

Conclusion générale

Les travaux présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la volonté de créer une nouvelle technologie de manipulation en trois dimensions de particules colloïdales en suspension dans l'objectif d'appliquer des forces locales à des cellules via ces particules.

Parmi les forces sans contact, nous avons fait le choix d'utiliser la diélectrophorèse pour adresser des particules colloïdales. Cette force présente les avantages suivants : elle peut être induite dans toutes les particules polarisables, présenter des intensités de l'ordre du nanoNewton et être fortement intégrable. Ainsi, grâce à l'émergence des techniques de microfabrication, il est possible de créer des laboratoires sur puce embarquant des électrodes pouvant créer des champs alternatifs non-uniformes dans la profondeur de canaux microfluidiques.

Nous avons proposé une nouvelle technologie de fabrication d'électrodes de part et d'autre d'un canal microfluidique. Elle permet d'appliquer des forces diélectrophorétiques sur l'ensemble des particules présentes dans une solution colloïdale confinée en géométrie microfluidique. Cette technologie de puce microfluidique se base sur l'utilisation d'une résine photosensible et bio-compatible créant ainsi le canal microfluidique directement sur les électrodes sans étape supplémentaire de gravure d'une couche résiduelle. L'utilisation de lames de verre comportant une couche d'ITO permet d'obtenir une puce microfluidique tridimensionnelle à 2 niveaux d'électrodes alignés et transparents. Ses performances fluidiques, électriques et optiques lui confèrent la capacité d'exercer les champs électriques requis pour effectuer et visualiser la manipulation tridimensionnelle de particules colloïdales.

Le développement d'une plateforme électro-microfluidique permet alors d'injecter des solutions colloïdales dans ces puces. Cette plateforme se compose de 3 modules : un module électrique permet d'appliquer deux différences de potentiels distinctes sur une ou plusieurs électrodes parmi les 112 intégrées dans les puces microfluidiques. Le module fluidique permet de contrôler le débit d'injection des particules et donc leur vitesses hydrodynamiques d'entrainement. Le module optique permet d'effectuer de la détection et du suivie de particules en temps réel et de relier leurs positions avec l'application des champs électriques sur les électrodes concernées. Cette plateforme permet alors de créer une modulation spatio-temporelle des champs électriques dans la puce.

Parallèlement au développement de la puce microfluidique, nous avons fabriqué un nouveau type de colloïde multi-fonctionnels. Ainsi, la combinaison des techniques dites ascendantes et descentes nous a permis d'ouvrir la voie à la dissymétrisation des particules et à créer de nouveaux types de particules fonctionnelles. Les particules Janus fabriquées ont montré des propriétés optiques singulières permettant d'observer de manière précise leur rotation sur elles-mêmes. De plus, la capacité à greffer sélectivement des protéines sur chacune des faces de ces particules leur autorise l'accroche sur des cellules.

Nous avons proposé une méthode de mesure expérimentale des Facteurs de Clausius-Mossotti

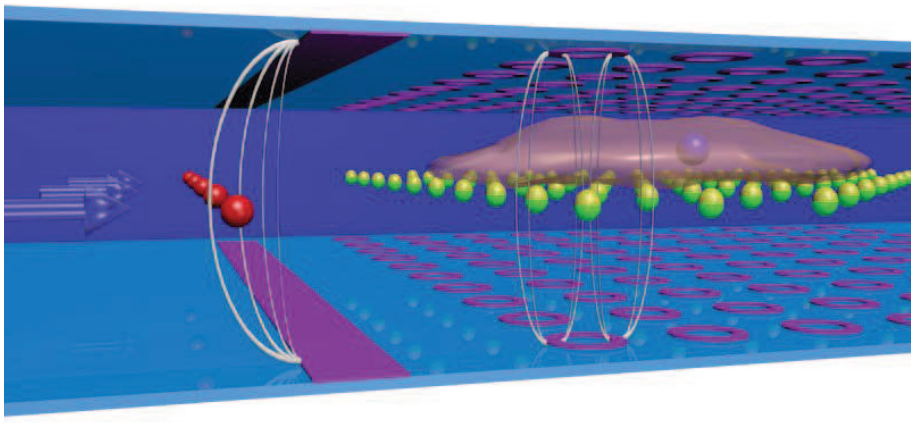
qui donne accès à des mesures indirectes des propriétés diélectriques des particules et des protéines greffées. De plus, la méthode proposée couvre une large gamme de taille de particules et permet de déterminer avec precision leurs paramètres diélectriques intrinsèques en fonction de leur taille, de leur matériau ou de leur chimie de surface. Couplée avec les techniques de fabrication de particules anisotropes, cette méthode ouvre la voie à l'ingénierie de particules colloïdales optimisées pour la diélectrophorèse.

Trois géométries d'électrodes ont été implémentées dans les puces : barres verticales, piège circulaire et barres perpendiculaires. La compréhension des phénomènes électrocinétiques présents lorsqu'une différence de potentiel électrique est appliquée sur ces paires d'électrodes de part et d'autre du canal microfluidique a permis de mettre en évidence la compétition entre les forces électro-osmotiques, électrothermiques et diélectrophorétiques. En fonction des couples fréquence-tension appliqués et à des conductivités de milieu connues, il a été possible d'établir des cartographies de forces dominantes. Nous avons observé expérimentalement les localisations spatiales de particules colloïdales dans ces pièges.

La disposition et la mise en parallèle de ces géométries de base dans un canal microfluidique a ouvert la voie à la réalisation de fonctions clés pour la manipulation collective de particules colloïdales : La fonction stop, qui peut effectuer de la séparation en flux continu ; la fonction focalisation, qui permet de concentrer l'ensemble des particules dans un canal microfluidique dans un canal virtuel de confinement ; et la fonction piège, qui peut maintenir une ou plusieurs particules sous flux hydrodynamique dans une localisation déterminée. Ajoutées à une modulation temporelle du champ électrique alternatif, ces fonctions permettent une manipulation des particules à l'échelle individuelle. L'effet flip-flop des particules Janus montre que la diélectrophorèse peut non seulement piéger des particules Janus en 3 dimensions mais aussi leur imposer un nouveau degré de liberté de rotation sur elle même. Enfin, la diélectrophorèse impulsée mobile démontre la manipulation ultime de particules colloïdales à l'échelle individuelle par une discrétisation du mouvement dans une matrice d'électrodes.

Dans la perspective de créer une véritable interaction entre les particules colloïdales structurées et des cellules, deux voies ont pu être explorées : l'internalisation de particules dans des cellules compétentes pour la phagocytose ou l'accroche en surface sur des cellules adhérentes. Les effets de la taille, de la chimie de surface et de l'anisotropie des particules dans le processus d'internalisation ont pu être quantifiés. La connaissance expérimentale des Facteur de Clausius-Mossotti des particules et des cellules a permis d'extraire différents scénarios fréquentiels où les réponses diélectrophorétiques des particules d'une part et des cellules d'autre part peuvent induire des comportements duaux. Ainsi, il a pu être observé des accumulations de particules sur le coté d'une cellule lorsque celle-ci est repoussé d'une électrode.
Ces travaux multidisciplinaires à l'interface entre la technologie, la physique et la biologie ouvrent de nombreuses perspectives dans le domaine des laboratoires sur puce. La capacité à manipuler des cellules en configuration d'électrodes tridimensionnelles permet d'ouvrir la voie à la création de nouveaux outils pour créer des interactions locales entre particules et cellules. Ainsi, qu'elles soient internalisées ou accrochées en surface, les particules colloïdales peuvent être des vecteurs d'application de forces locales. Il devrait être alors possible par exemple de localiser une cellule dans un piège circulaire et d'amener une particule colloïdale par diélectrophorèse impulsée

mobile proche de celle-ci. Il deviendrait envisageable de venir tirer localement sur la cellule par accroche surfacique ou de pénétrer sa membrane pour effectuer une transfection. Par exemple, l'extinction d'un gène cellule par cellule. Et en visant plus loin, pourquoi ne pas tenter de greffer un siARN, et éteindre spécifiquement l'activité d'un gène ?
De même, il pourrait aussi être envisageable de créer un substrat cellulaire dynamique constitué d'un tapi de particules Janus en lévitation dans une matrice de pièges circulaires. Fonctionnalisées sur une face seulement, ces particules pourraient être ressenties par une cellule comme un substrat discret où les points focaux d'adhérence seraient situés sur les colloïdes. Par diélectrophorèse impulsée, il pourrait être possible d'adresser l'effet flip-flop de chacune des particules pour créer un véritable substrat dynamique ressenti par la cellule. Si cette cellule est pluripotente, ajoutant des facteurs de différentiation et des succession de motifs d'adhérence, cet outil pourrait devenir une plateforme d'ingénierie de tissu.



Publications

1. **T. Honegger**, K. Berton, T. Pinedo-Rivera et D. Peyrade. Design and realization of a microfluidic system for dielectrophoretic colloidal handling. Microelectron. Eng., vol. 86, no. 4-6, pages 1401-1403, 2009.
2. **T. Honegger**, K. Berton, O. Lecarme, L. Latu-Romain et D. Peyrade. Transparent multilevel aligned electrode microfluidic chip for dielectrophoretic colloidal handling. Micro and Nanosystems, vol. 2, pages 239-248, 2010.
3. **T. Honegger**, O. Lecarme, K. Berton et D. Peyrade. 4-D dielectrophoretic handling of Janus particles in a microfluidic chip. Microelectron. Eng., vol. 87, no. 5-8, pages 756-759, 2010.
4. **T. Honegger**, O. Lecarme, K. Berton et D. Peyrade. Rotation speed control of Janus particles by dielectrophoresis in a microfluidic channel. J. Vac. Sci. Technol. B, vol. 28, no. 6, pages C6I14-C6I19, 2010.
5. O. Lecarme, T. Pinedo Rivera, L. Arbez, **T. Honegger**, K. Berton et D. Peyrade. Colloidal optical waveguides with integrated local light sources built by capillary force assembly. J. Vac. Sci. Technol. B, vol. 28, no. 6, pages C6O11-C6O15, 2010.
6. P. Kauffmann, P. Pham, A. Masse, M. Kustov, **T. Honegger**, D. Peyrade, V. Haguet et G. Reyne. Contactless Dielectrophoretic Handling of Diamagnetic Levitating Water Droplets in Air. Magnetics, IEEE Transactions on, vol. 46, no. 8, pages 3293-3296, aug. 2010.
7. **T. Honegger**, K. Berton, E. Picard et D. Peyrade. Determination of Clausius-Mossotti factors and surface capacitances for colloidal particles. Appl. Phys. Lett., vol. 98, no. 18, page 181906, 2011.
8. **T. Honegger**, T. Elmberg, K. Berton et D. Peyrade. Visible microlaser twophoton polymerization in a microfludic cell : A resist study. Microelectronic Engineering, vol. 88, no. 8, pages 2725 - 2728, 2011.
9. **T. Honegger**, S. Sarla, O. Lecarme, K. Berton, A. Nicolas et D. Peyrade. Selective grafting of proteins on Janus particles : Adsorption and covalent coupling strategies. Microelectronic Engineering, vol. 88, no. 8, pages 1852 - 1855, 2011.
10. **T. Honegger**, E. Picard, Dispositif de maintien par capillarité d'un élément comportant au moins une face plane , brevet en cours de dépôt (INPI : 10 57264)
11. **T. Honegger** et D. Peyrade. AC electrokinetics for dielectrophoresis of functionalized colloids. en cours de publication 2011.
12. **T. Honegger** et D. Peyrade. Comprehensive analysis of particle motion under 3D non-uniform AC electric fields in a microchannel. en cours de publication, 2011.
13. **T. Honegger** et D. Peyrade, Moving pulsed dielectrophoresis. en cours de publication, 2011.
14. C. Benoit, **T. Honegger**, F. Bruckert, X. Gidrol et D. Peyrade. Colloidal particles and cells complexes for dielectrophoretic handling. en cours de publication, 2011.

Annexe A

Technologies de puces microfluidiques

La réalisation technologique de canaux microfluidiques a été rendue possible grâce au développement des techniques de la microéléctronique. Les classiques étapes de lithographie optique et de gravure permettent en effet de fabriquer des canaux rectangulaires en silicium, silice ou verre dont au moins une dimension est micronique. Une fois scellée, une telle puce microfluidique est ainsi fabriquée à l'échelle du prototype. De façon à porter l'ensemble de ce processus hors salle blanche et dans une perspective de fabrication de masse et de réduction de coût, les canaux microfluidiques ont été depuis 10 ans fabriqués en polymères thermoréticulables sur des moules microniques. Ainsi, le PolyDiMethylSiloxane, couramment appelé PDMS, est utilisés pour fabriquer des canaux microflduiques [Ng 2002]. Les propriétés du PDMS font que les canaux ainsi crées ont de vastes domaines d'applications : mécaniquement il peut être rendu dur ou souple, optiquemment il est transparent[Schneider 2009], chimiquement il résiste à de nombreux solvants (éthanol, méthanol, acétone...)[Wong 2009] et il est biocompatible[Mata 2005].

A.1 Utilisation du PDMS

L'utilisation classique du PDMS consiste en la réalisation d'un moule avec une résine (typiquement Su-8 de Rhoom and Haas ou AZ de Microchem) ou en silicium, mouler le PDMS sur le moule, et enfin recuire l'ensemble. Le schéma A.1 résume les procédés de mise en oeuvre du PDMS. L'utilisation de substrat rigide sur lequel le PDMS recuit sera scellé permet à la fois de fermer le canal microfluidique mais aussi d'assurer à la structure final la rigidité nécessaire à sa manipulation. Classiquement, ce substrat est en silice ou en verre.

A.1.1 PDMS

Le choix du PDMS est celui de Dow Corning, le Sylgard 184. Ce kit est constitué de deux parties, les monomère de DimethylSiloxane et l'agent réticulent. Le mélange typique est un ratio de 10 pour 1 en masse et les variation de ce ratio ou du temps de recuit peuvent altérer les propriétés mécaniques (rigidité) du PDMS[Lisensky 1999]. Le mélange doit être dégazé dans une chambre à vide. L'utilisation de bêcher ou de boite de pétri augmente le temps de dégazage (typiquement 20 minutes). Le PDMS ainsi obtenu peut être utilisé dans les 10 heures suivantes avec une augmentation de sa viscosité au fur et à mesure du temps.

A.1.2 Moulage

Le PDMS comme élastomère est connu pour sa facilité de démoulage et sa capacité à répliquer des structures nanometriques. Les moules utilisés peuvent ainsi être issus de processus de photolithographie optique ou électroniques selon la résolution souhaitée. Les masques utilisés peuvent être dessinés avec des logiciels libres (Inkscape) ou commerciaux (L-Edit ou Kadence) et imprimés sur transparents (transparents spéciaux pour la lithographie) ou sur masque sodalime (qui absorbent les UV jusqu'à 200 nm) ou quartz (qui absorbent les UV jusqu'a 100 nm) déposés avec du chrome filtrant les UV (fabriqués par le Toppan photomask). Le moule est typiquement de tonalité négative, avec le PDMS déposé par dessus et remplissant les régions laissées ouvertes. Ce moule peut être réalisé avec différents types de matériaux en fonction des dimensions souhaitées :

- Dimensions $>$ 100 μm. Le moule peut être fabriqué par des techniques de fraisage sur un matériau mou (plexiglas...) ou dur (Aluminium). Il est important alors de polir la face à du moule qui sera la face haute du canal de façon à pouvoir voir à travers le canal. La figure A.2 présente une photographie d'un telle moule. Ces types de moules peuvent être aussi fabriqués par lithographie optique avec des résines épaisses ou par multiple étalement.
- Dimensions comprises entre 100 μm et 1 μm. Le moule peut être fabriqués par lithographie optique avec des résines positives (type AZ) ou négatives (type Su-8) dont les hauteurs peuvent varier de 1 μm à 100 μm en fonction des déclinaisons de ces résines (AZ 1512HS, AZ 9270 HZ, Su8 2002 ou Su8-50) et des vitesses de

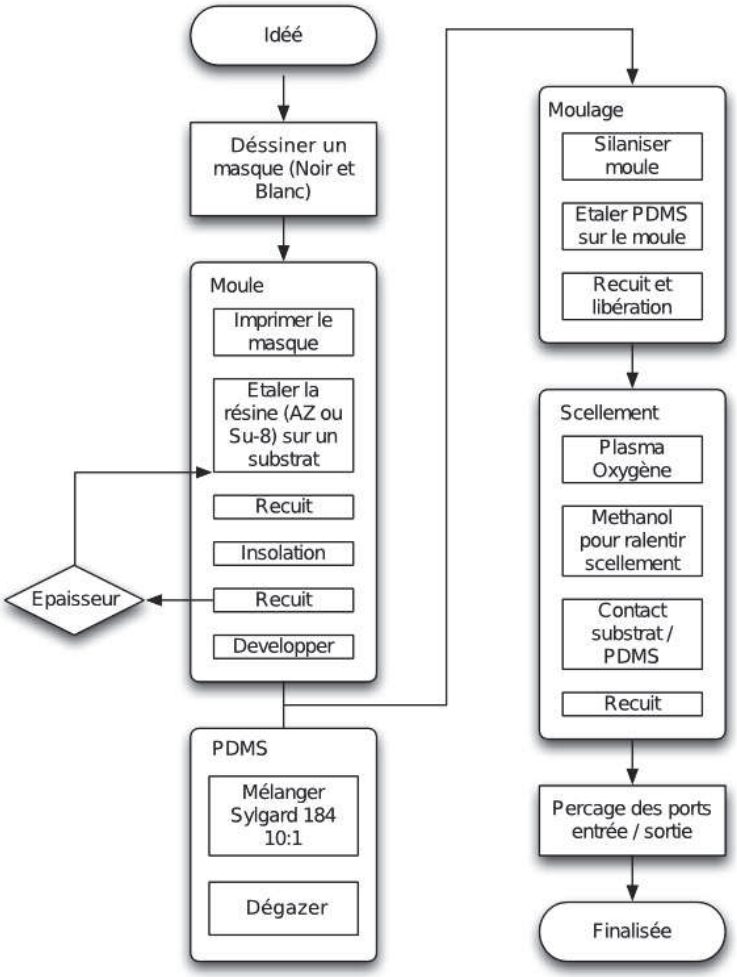
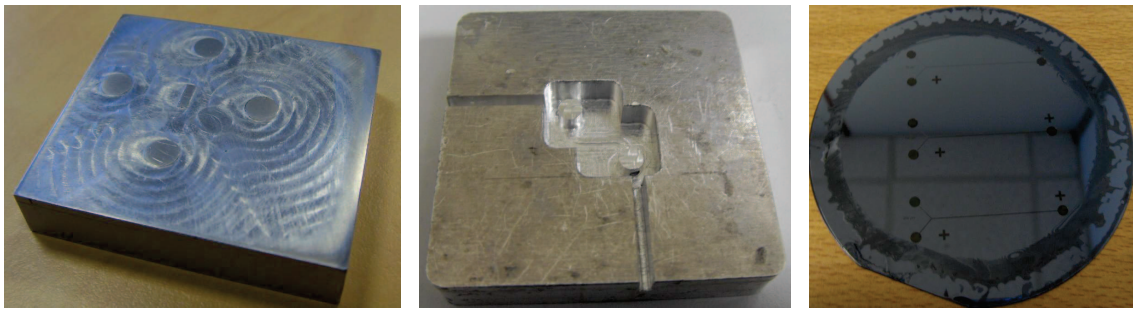


Figure A.1 – Schéma d'utilisation du PDMS. Adaptée de [Friend 2010].



(a) **(b)** **(c)**

Figure A.2 – Photographies de moules en aluminium fabriqués par fraisage numérique. (a) La hauteur total du canal est de 150 μm et la face supérieure a été polie. (b) Le canal est crée sur dans la structure qui comprend les réservoirs, la possibilité de coulé le PDMS avec des capillaires fluidiques et une hauteur totale supérieure a celle des réservoirs. (c) : Photographie d'un moule en résine AZ-9260 de 18 μm de hauteur. Les canaux microfluidiques font respectivement de haut en bas 50, 100 et 200 μm de large.

rotation de l'étalement par centrifugation. Dans ces cas, l'utilisation de ces résines consistent en l'étalement par centrifugation, recuit, insolation et développement. La figure A.2c montre une photographie d'un moule en résine.

– Dimensions < 1 μm. Le moule doit être fabriqué par lithographie E-UV ou électronique. A ces échelles, les canaux ainsi crées imposeront alors un écoulement nanofluidique qui sort du cadre ce cette thèse.

L'étape de moulage consiste à étaler le PDMS dégazé sur le moule. Le contrôle de l'épaisseur résiduelle de PDMS, celle qui demeure au dessus du canal ainsi formé, réside dans le contrôle de l'épaisseur total de PDMS une fois coulé. Trois stratégies peuvent être alors appliquées :

– Contrôle spatiale et volumique. Le moule peut être délimité en ses extrémités par des bords plus élevés que la hauteur du canal. Ainsi en limitant en volume la quantité de PDMS versée sur le canal à la hauteur des murs, la hauteur totale du film de PDMS réticulé sera limité à celle choisie par la hauteur des murs.
– Contrôle par pesanteur. Une fois versée, un poids est appliqué sur le PDMS frais via un substrat en silicium de façon à réduire la hauteur globale du film. Un substrat de silicium est préalablement étalé avec du PMMA ce qui a pour effet de réduire l'énergie de contact entre le PDMS et le silicium et éviter l'adhésion du PDMS au substrat servant de poids. Un poids typique de 1 kg est appliqué sur l'ensemble du PDMS.
– Contrôle par étalement par centrifugation. Le PDMS frais est placé sur le moule et l'ensemble est centrifugé. Le PDMS étant très visqueux, il est difficile de pouvoir obtenir par cette méthode des épaisseurs inférieurs à 20 μm. Pour descendre en hauteur, le PDMS est préalablement dilué dans son solvant, le toluène, et étalé par centrifugation[Mata 2005]. La figure A.3 montre les courbes d'étalement en fonction de la vitesse de centrifugation. Les épaisseurs des films ont été mesurés par microscopie confocale.

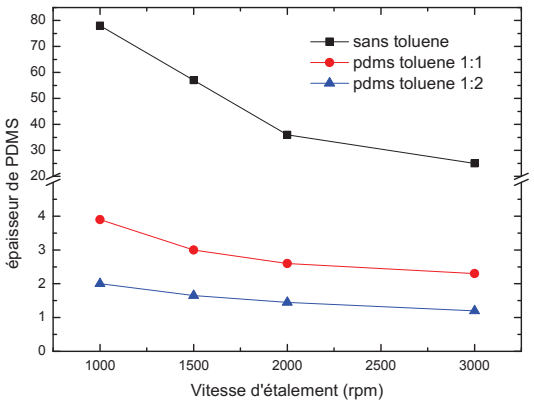


Figure A.3 – Épaisseur de PDMS en fonction de la vitesse par centrifugation.

Un des inconvénients du PDMS ainsi réalisé est la présence systématique d'une couche résiduelle sur la partie supérieure du moule. Cette couche peut être minimisée par pesanteur ou centrifugation mais demeurera présente. La gravure de cette couche est possible [Plecis 2007], mais ajoute un étape lors de la fabrication. La gravure chimique de la couche résiduelle peut être réalisée par une attaque du PDMS par un mélange 1 :9 de Tetra-n-butylammonium fluoride (TBAF) et de N-méthylpyrrolidone (NMP)[Plecis 2007].
Le recuit du PDMS se fait en plaçant l'ensemble PDMS frais et moule sur une plaque chauffante. Les températures et temps de recuit varient en fonction des propriétés mécaniques souhaitées pour le PDMS. En effet, le module d'Young du PDMS recuit varie en fonction de la longueur des chaines de PDMS crées et celle ci est directement reliée à la température et durée du recuit[Mata 2005]. Ainsi, un recuit à forte température empêche la formation de longue chaines et le PDMS sera plus souple. Typiquement pour un canal microfluidique, la rigidité mécanique influe peu sur l'écoulement du liquide dans le canal mais peu jouer sur la rigidité de la structure finale. Le tableau A.1 donne des températures et durées typiques de recuit du PDMS. Pour les canaux microfluidiques, il est utilisé une température de 100°C pendant 1 heure. Le démoulage du film de PDMS peut se faire manuellement dans le cas de films d'épaisseurs supérieurs à 100 μm. En revanche pour des films inférieurs en épaisseurs, il est difficile de les maintenir manuellement car ces films sont très électrostatiques et ont tendance à se replier sur eux même. Il est dans ce cas préférable de les maintenir grâce à un substrat solide directement ou par un autre morceau de PDMS souple comme présenté par Wu [Wu 2005]. Si le démoulage du film est difficile, c'est à dire que l'énergie

Température de recuit (°C)	Durée de recuit (min)
60	120
100	60
150	10

Table A.1 – Température et temps de recuit du PDMS

de liaison moule-PDMS est trop importante, celle ci peut être diminuée par une silanisation du moule avant l'étape de moulage (par exemple en exposant celui ci à des vapeurs de dimethyloctadecylchlorosilane dans un déssicateur pour 15 minutes[Liu 2006]) ou en refroidissant le moule et le PDMS recuit à -4°C (typiquement dans un congélateur). Dans ce dernier cas, les déformations engendrées par le froid seront différentes pour le PDMS ou pour le moule et le film de PDMS sera plus facile à enlever du moule.

A.1.3 Scellement

Les PDMS fraichement recuit est fortement hydrophobe et peut adhérer de manière réversible au verre. Ce scellement peut suffire dans le cas d'adhésion partielle pour confiner un liquide. Cependant si la face d'adhésion du PDMS rentre en contact avec du liquide ce dernier n'adhérera plus parce que rendu partiellement hydrophile. Il existe plusieurs méthodes chimique pour réduire l'hydrophobicité du PDMS frais[Zhang 2004, Zhang 2005, Wong 2009] mais la méthode la plus utilisée est celle du plasma oxygène[Jo 2000]. L'opération consiste à exposer les surface à sceller à un faible plasma oxygène pendant 2 minutes environ et immédiatement contacter ces surfaces. Le fait d'exposer les surface modifie localement les liaisons oxygène et permet de créer une liaison covalente oxygène entre les surface. Le scellement est alors irréversible. Il est possible de délayer la création de la liaison en immergeant les surface dans du méthanol[Jo 2000]. Cette étape permet par exemple de conserver l'activation de surface pendant plusieurs heures ou de rendre possible une éventuelle étape d'alignement.
Enfin, les connexions d'entrée / sortie de liquide peuvent être crées en perçant le PDMS de part et d'autre avec une aiguille dont le diamètre sera suffisamment important (typiquement $> 1mm$) pour pouvoir déposer une goutte ou pour maintenir un capillaire. Dans ce dernier cas, la dureté du PDMS est suffisamment importante pour permettre la pénétration du capillaire dans le PDMS et d'assurer un serrage imperméable autour de celui-ci pour éviter les éventuelles fuite de liquide[Li 2003].

A.2 Puce microfluidique verre-PDMS

La classique puce en PDMS consiste en canal microfluidique formé dans un film de PDMS avec un épaisseur résiduelle au dessus du canal et un substrat rigide (typiquement du verre) qui scellera le canal dans sa partie inférieure. Deux déclinaisons peuvent alors être possibles en fonction de la méthode d'injection du liquide dans le canal. Dans le cas où la hauteur totale du PDMS est suffisamment élevée (typiquement plusieurs millimètres) pour pouvoir insérer des capillaires dans les connexions d'entrée / sortie de liquide, la procédure du fabrication est détaillée dans la figure A.4 et présente une photo d'une telle puce. Les capillaires sont insérés directement dans le PDMS pour injecter le liquide dans le canal. Cependant, les contraintes mécaniques imposées par ces capillaires peuvent imposer des déformations du PDMS au niveau des réservoirs d'injections, pouvant créer ainsi des fuites le liquide lors de l'injection. Ces fuites peuvent être diminuées ou éviter par l'ajout de "stickers" [Bartolo 2007] qui consistent en d'épais ($> 1cm$) morceaux de PDMS rajoutés au niveaux des connexions pour limiter les contraintes mécaniques. Les contraintes mécaniques imposées par les capillaires peuvent être tellement importantes que l'injection de liquide devient impossible lorsque l'épaisseur de PDMS devient inférieure à 1 mm. Une des solutions possibles consiste à remplacer les connexions fluidiques par un système rigide de connexion comme présenté au chapitre 2. Cependant, l'utilisation d'une telle connexion nécessite une surface rigide, typiquement du verre, qui ne peut pas être du PDMS. Nous avons donc développé la méthode présentée en figure A.5 pour ajouter une lame de verre de microscope standard (76 x 26 x 1.1 mm) qui se scelle sur la partie résiduelle du PDMS et n'altère pas les possibilités d'observation à travers le canal microfluidique. De plus, cette stratégie verre-PDMS-verre confère à la structure la rigidité nécessaire dans le cas ou le substrat du bas est une lamelle de microscope. De façon à pouvoir appliquer un champ électrique au sein d'une solution colloïdale, des électrodes conductrices sont implémentées sur un substrat de verre. La solution colloïdale est alors être placée au dessus des électrodes

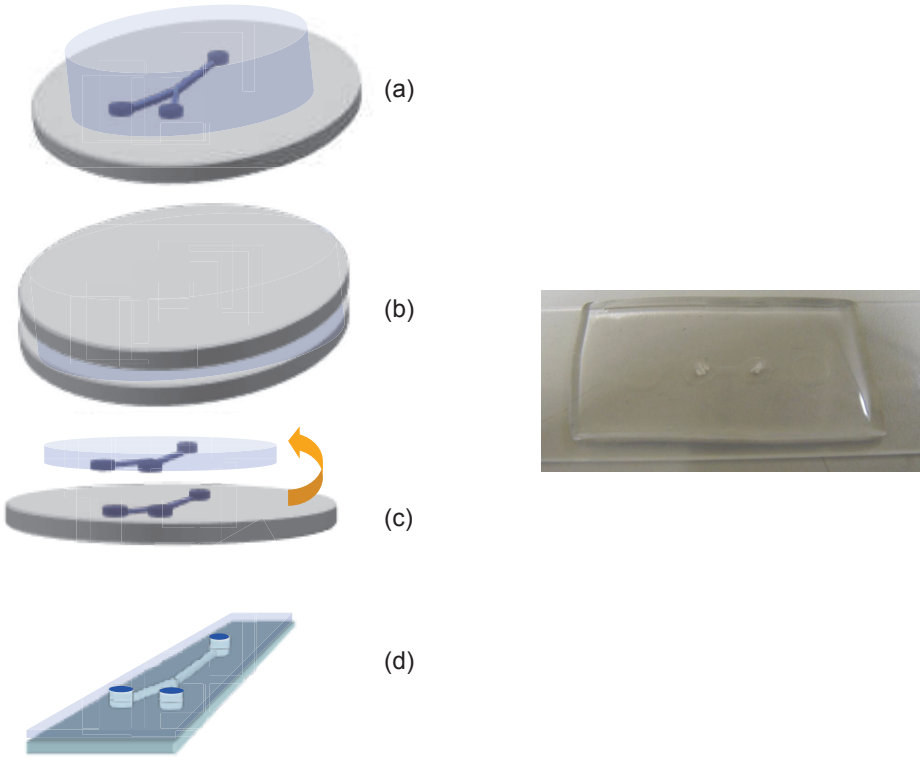


Figure A.4 – Processus de fabrication d'une puce verre-PDMS et photographie d'une puce microfluidique verre-PDMS scellée sur substrat de verre.. (a) Étalement du PDMS sur le moule. (b) Réduction de l'épaisseur du PDMS par appuie ou moulage. (c) Découpe et libération du canal en PDMS. (c) Création des ports d'entrée / sortie et scellement avec le substrat par plasma oxygène.

et l'application d'un potentiel électrique crée un champ au sein de cette solution. La disposition spatiale des électrodes permet de contrôler la forme du champ électrique ainsi que sa norme. L'utilisation de technologies issues de la micro-électronique offre la possibilité d'atteindre des résolution spatiales micrométriques, permettant ainsi l'accès a des champs électriques dont les normes sont supérieures à $10^5 V/m$ lorsque les électrodes sont séparées de 10 μm et lorsqu'un potentiel électrique de 1V est appliqué entre ces deux électrodes.

A.3 Puce microfluidique verre-PDMS-verre avec électrodes co-planaires

Les électrodes peuvent être placées de manière co-planaires sur un même substrat. Les champs électriques ainsi créés auront une forme demi-circulaires d'électrode à électrode (voir chapitre précédent). Ce type de configuration permet d'obtenir des gradient de champs localisés au niveau des arêtes de électrodes qui peuvent être dirigés vers l'intérieur de la solution colloïdale. Lorsque les condition nécessaires à diélectrophorèses sont remplies, les particules seront alors soit attirées, soit repoussées selon cette direction.
La réalisation technologique d'une puce avec électrode coplanaire reprend les mêmes procédés qu'une puce verre-PDMS-verre en remplaçant le substrat scellant le bas du canal avec un substrat préalablement structurés avec des électrodes. Ainsi le schéma présenté sur la figure A.6 montre les étapes de réalisation d'une telle puce. Dans cette configuration, les électrodes sont en or. Le procédé de fabrication des électrodes réside sur un procédé de lithographie standard. Une lame de verre (76 x 26 x 1.1 mm Borosilica, TheroBrand) uniformément recouverte d'une résine photosensible (AZ1512-HS, Microchemicals) par dépôt par centrifugation est alignée sur le masque puis insolée (MJB4, SUSS MicroTec). Une fois développée, la lame est placée dans un évaporateur métallique (Evaporateur PLASSYS) et une bi-couche de titan et d'or de 15nm / 150 nm est déposée. La couche de titane sert de couche d'adhésion de la couche d'or sur le verre. La lame est ensuite déposée dans un bain d'acétone

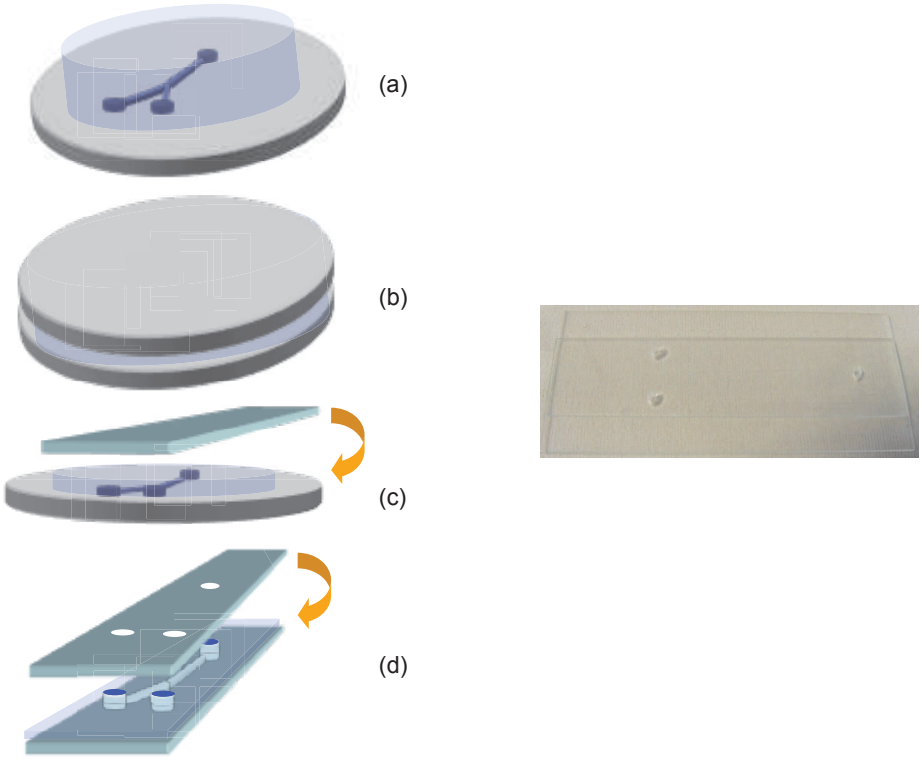
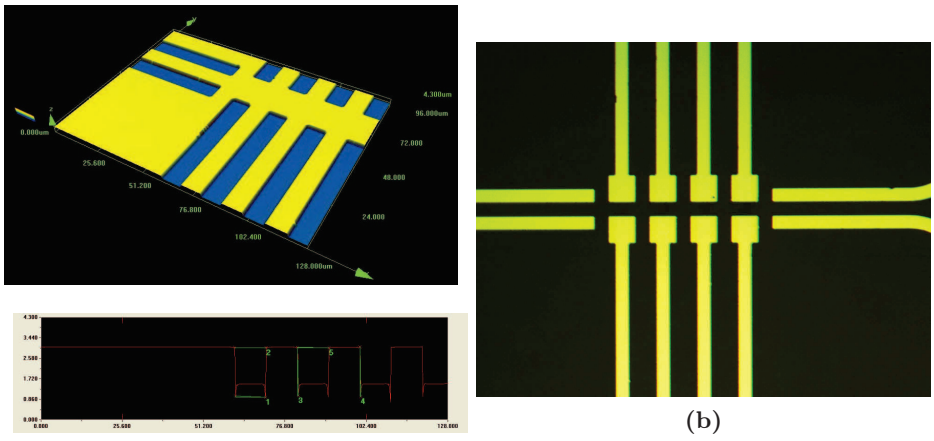


Figure A.5 – Processus de fabrication d'une puce verre-PDMS-verre avec injecteurs. (a) Étalement du PDMS sur le moule. (b) Réduction de l'épaisseur du PDMS par appuie ou moulage. (c) Découpe du PDMS, scellement avec le substrat du bas et libération du canal. (c) Création des ports d'entrée / sortie et scellement avec le substrat du haut par plasma oxygène.

sous ultra-son de façon à ce que la résine soit dissoute, libérant ainsi les électrodes d'or (Lift-off). Les différentes caractérisations de ces étapes sont présentées dans la figure A.7 ainsi que dans le tableau A.2.



(a) (b)

Figure A.7 – Photographie des étapes de fabrication d'électrode Or : (a) avant dépôt d'or et mesures confocales et (b) après lift-off

Une fois les électrodes crées, le canal microfluidique est aligné sur celles ci. Les faces à scellées sont activées par plasma oxygène. Les plaques sont ensuite mises dans un dispositif d'alignement puis scellées par contact.

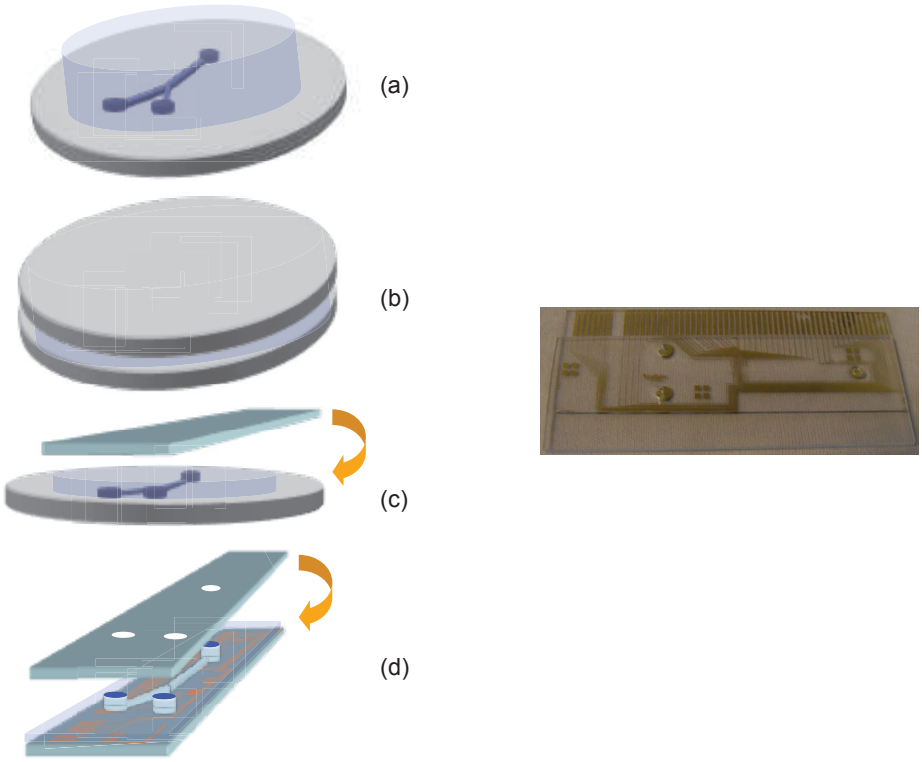


Figure A.6 – Processus de fabrication d'une puce verre-PDMS-verre avec électrodes coplanaires. (a) Étalement du PDMS sur le moule. (b) Réduction de l'épaisseur du PDMS par appuie ou moulage. (c) Découpe du PDMS, scellement avec le substrat du bas et libération du canal. (c) Création des ports d'entrée / sortie et scellement avec le substrat du haut préalablement structuré avec des électrodes.

Largeur électrode visée (μm)	Largeur électrode obtenue (μm)	Pente ($^\circ$)
10	10.54	86

Table A.2 – Mesures confocales des distances critiques des électrodes d'or obtenues par photolithographie

L'ensemble est alors portée à 100°C pendant 1 heure pour augmenter les forces d'adhésion irréversibles.

Annexe B

Performances du module de suivie de particules, analyse du mouvement Brownien

Le mouvement Brownien, exposé pour la première fois par le botaniste Robert Brown, est une description de la trajectoire aléatoire de particules immergées dans un fluide. Ce comportement s'explique par les collisions entre les colloïdes et les molécules formant le milieu de dispersion. Ces dernières, agitées grâce à l'énergie thermique k_bT, frappent les particules et leur donnent un mouvement dit Brownien. La grandeur permettant de caractériser un mouvement Brownien est le déplacement quadratique moyen $< x^2 >$. En effet, il a été démontré que cette grandeur est directement proportionnelle à la racine carrée du temps (équation d'Einstein-Smoluchowski) [Eq. B.2]

$$< x^2 >^{1/2} = (2Dt)^{1/2} \text{ où D est le coefficient de diffusion et t la variable temps} \quad \text{[Eq. B.1]}$$

$$D = \frac{RT}{6\pi\mu a N_a} \quad \text{[Eq. B.2]}$$

avec R la constante des gaz parfaits, T la température, μ la viscosité dynamique du milieu de dispersion, a le rayon de la particule et N_a le nombre d'Avogadro.
L'étude a été réalisée avec six tailles de colloïdes : 100 nm (Or), 200 nm (Or), 250 nm (Or), 500 nm (Polystyrène), 1 μm (Polystyrène) et 5 μm (Polystyrène). Les solutions colloïdales filles sont composées de 30 μL d'eau déionisée et 1 μL de solution colloïdale mère. Enfin une goutte de 2 μL est placée sur un substrat de verre. Le nombre d'images par seconde des vidéos est de 20. L'analyse des trajectoires est réalisée à l'aide du programme Labview. Un exemple de trajectoire visualisée par le module de suivi de particules est présenté figure B.1. Le déplacement quadratique moyen $< R^2 >=< x^2 > + < y^2 >$ de la particule considérée est tracée en fonction du temps sur cette même figure. Pour chaque particule, une régression linéaire est effectuée sur le déplacement quadratique moyen. Le coefficient directeur de cette droite correspond à 4D (deux dimensions sont considérées). La variation du coefficient de diffusion en fonction du rayon est tracée sur la figure L'écart à la courbe théorique peut s'expliquer par plusieurs facteurs : A faible rayon, les particules se déplacent très vite ($v > 100\mu/s$) et la vitesse d'acquisition maximale de la caméra est limitée. Il est donc probable que les vitesses récoltées soit inférieures aux vitesses réelles. De la même façon, à faible rayon, l'image de la particule observée ne correspond pas réellement à la particule mais plutôt à l'image de sa lumière diffusée, limitant ainsi l'accès au déplacement absolue de la particule. Cependant, l'accès aux trajectoires de particules allant jusqu'à 100 nm en temps réel ou à posteriori permettra un calcul précis des vitesses induites par les forces électrocinétiques

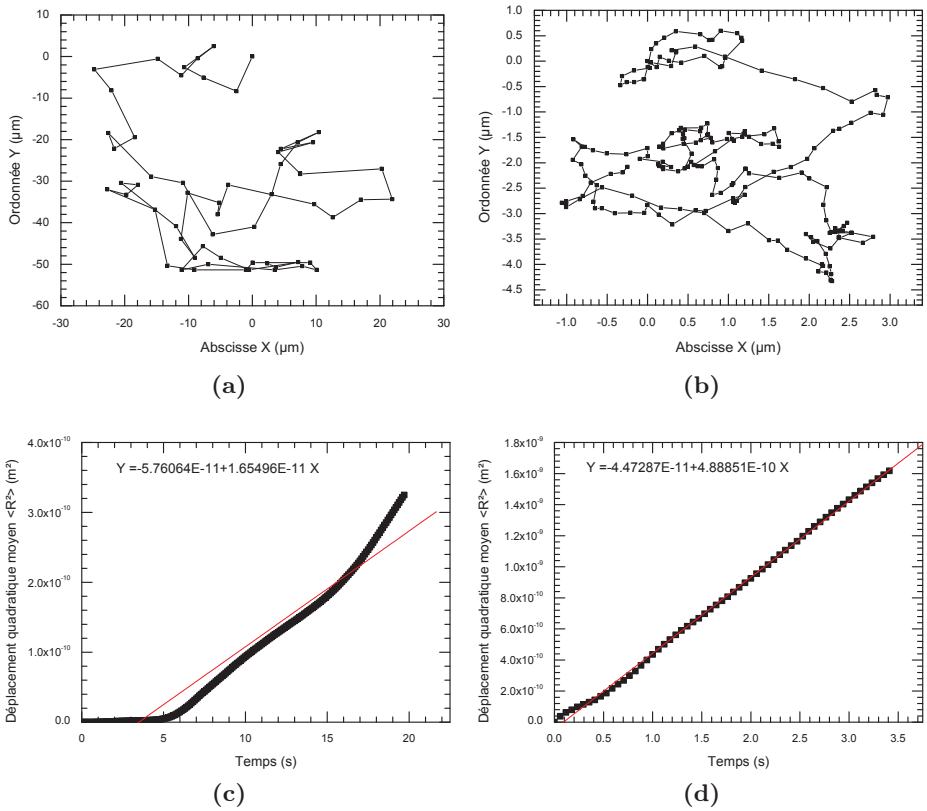


Figure B.1 – Trajectoires browniennes de particules colloïdales avec le module de visualisation et leurs déplacements quadratiques moyens, (a), (c) : 1 μm et (b),(d) : 100 nm.

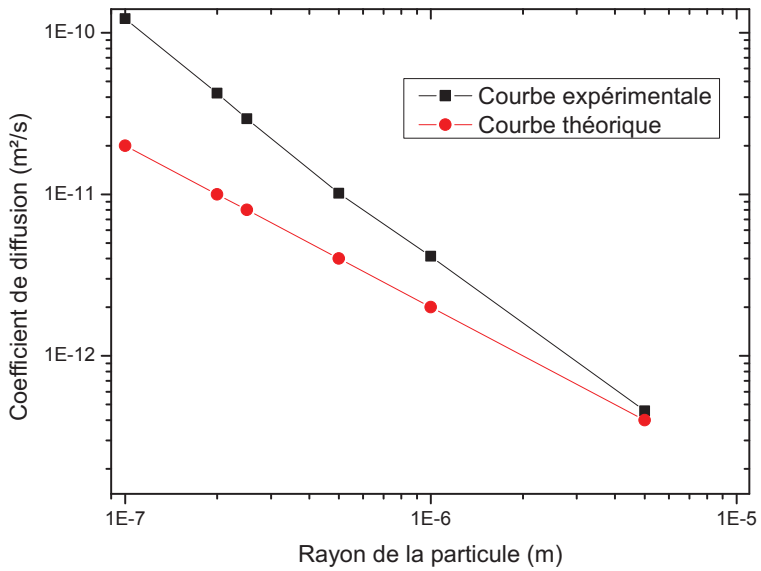


Figure B.2 – Évolution du coefficient de diffusion en fonction de la taille des particules.

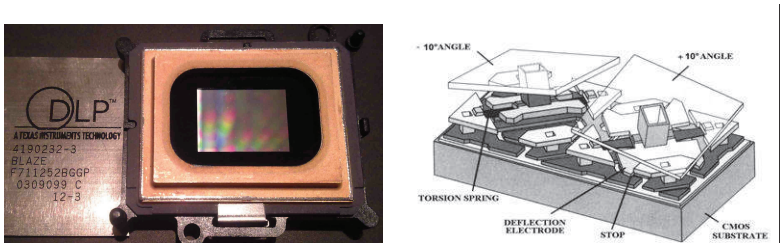
Annexe C

Photolithographie dynamique par vidéo-projecteur

La fabrication de particules colloïdales par des méthodes ascendantes permet d'accéder à des formes plus vastes que les méthodes descendantes décrites précédemment. La possibilité de dessiner puis de fabriquer directement les colloïdes dans une résine photosensible ouvre la voie vers la conception de colloïdes à fort facteur de forme dans les trois dimensions de l'espace. De plus, une telle fabrication en canaux microfluidiques permet d'associer la stabilité des flux laminaires et les faibles épaisseurs des canaux pour la fabrication de masse de colloïde.
Le recours aux canaux microfluidiques pour la fabrication de particules colloïdale permet d'insoler une résine photosensible dans une zone données tout en poussant les polymères ainsi fabriqués et en alimentant la zone avec de nouveaux monomères. Ainsi, la technologie dite *"stop-flow lithography"* [Shepherd 2008] permet de fabriquer des particules colloïdales de formes contrôlées en insolant une résine photosensible s'écoulant dans un canal microfluidique. L'insolation consiste à projeter l'image d'un masque en chrome à travers un microscope avec des ultraviolets. Le changement du masque permet de faire varier la forme des colloïdes ainsi fabriqués. Cette méthode permet d'obtenir un grand nombre de particules colloïdales (plus de 10^3 particules par heure) mais l'utilisation de masques dures limite les formes.

C.1 Dispositif de photolithographie par vidéoprojecteur

La volonté de soustraire la contrainte d'un masque dure a aboutie au système utilisant le principe de vidéoprojection utilisé par les vidéoprojecteurs commerciales. Ces derniers utilisent une puce de micro-miroirs digitaux (appellation *DMD* pour Digital Micro Mirrors Device, commercialisés par Texas Instruments). La figure C.1a montre une telle puce de micro-miroirs démontée à partir d'un vidéoprojecteur commercial. Constituée de



(a) **(b)**

Figure C.1 – (a) : Photographies d'une puce DMD de Texas Instruments, (b) : Schéma d'inclinaison des micro-miroirs en mode réflexion ou transmission des rayons lumineux

480 000 à 1.200.000 miroirs supportés par des transistors CMOS, la puce DMD permet de former une image en contrôlant l'inclinaison de chaque miroir pour qu'il transmettre ou non la lumière incidente au système optique. Ainsi, chaque micro-miroir peut constituer un pixel. Les degrés d'intensité de lumière transmise sont modulés par la fréquence de vibration des micro-miroirs entre leurs 2 états : transmission et réflexion de la lumière. Couplés avec une illumination ultraviolette et un système de réduction microscopique, les rayons lumineux réfléchis par le DMD sont renvoyés vers la résine qui polymérise selon l'image envoyée.

Une étude des différents fournisseurs de vidéoprojecteurs nous a mené au choix d'un vidéoprojecteur d'une technologie innovante : Le Samsung P400 a en effet la particularité d'inclure une source lumineuse composée de 3 LED plates très lumineuses fabriquées par la société Américaine Luminens Phlatlight. Les faibles émissions de chaleur et consommation électrique de ces LED nous ont semblé intéressantes pour nous affranchir des problèmes de sécurité électriques et thermiques rencontrés lorsque l'illumination est classiquement faite par une lampe halogène blanche extrêmement puissante (800V). De plus, grâce au faible encombrement des LED il est vendu comme vidéoprojecteur « de poche ». Enfin, la résolution proposée de 800*600 pixels VGA est suffisante pour notre application car les résolutions supérieures ne proposent pas de micro-miroirs plus petits (et donc un besoin de réduction plus faible) mais simplement des puces plus larges (et donc un champ plus important).

C.1.1 Parcours lumineux

Afin d'obtenir une image de la source lumineuse modulée par le DMD, le parcours des rayons lumineux résumés sur la figure C.2. La source lumineuse utilisée dépend des molécules photosensibles utilisés dans la résine

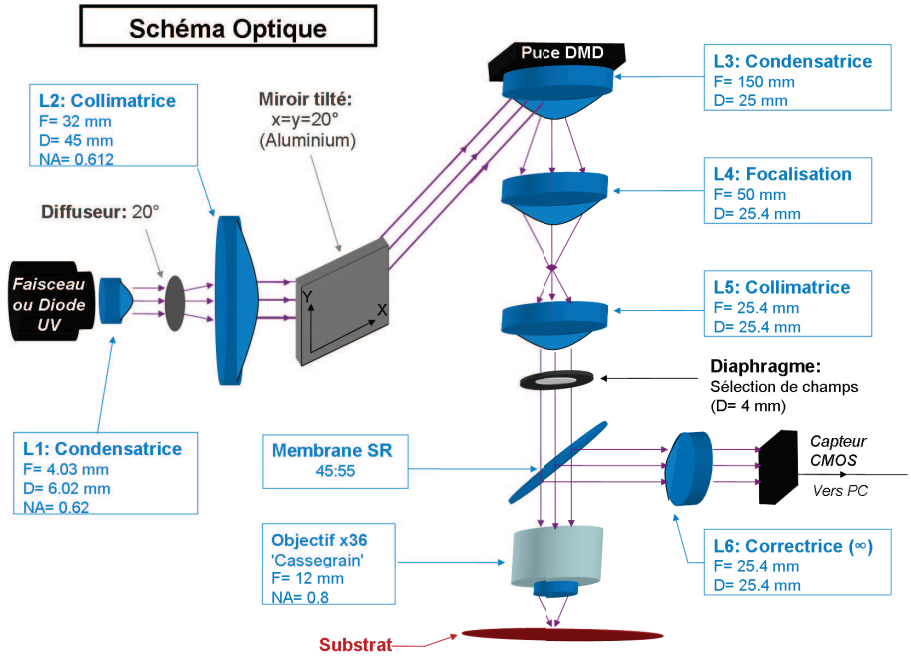


Figure C.2 – Schéma du parcours optique de la lithogrpahie par vidéoprojecteur

à insoler. En effet, ces molécules, appelées photoinitiateur, ont la capacité d'absorber les photos à des longueurs d'onde précises et de convertir cette énergie lumineuse en énergie chimique. Typiquement pour des résines i-line classiques, il est possible d'utiliser des DEL lasers à 400 nm alors que pour d'autres photoinitiateurs il faut utiliser des sources UV plus profondes comme des lampes fibrées. Dans les 2 cas, la source lumineuse doit éclairer la puce en respectant 2 critères :

- Les rayons lumineux doivent être le plus collimatés possibles c'est à dire qu'ils doivent être renvoyés à l'infini à l'aide d'une lentille convergente (lentille 1).
- L'angle d'admission des rayons incidents est particulier comme le montre la figure C.1b. En effet, les positions de réflexion des miroirs sont constituées par 2 angles de $\pm 10^{\circ}$ qui correspondent respectivement au renvoi du pixel dans ou hors du système de projection.

Afin de respecter ces 2 critères, on positionne un miroir réglable entre la source et la puce. Cela permet un réglage fin de l'angle d'admission grâce a 3 vis fixées sur son support qui viennent appuyer contre la surface arrière du miroir, en influent donc son angle d'inclinaison. On sélectionne un miroir réfléchissant les UV c'est à dire recouvert d'une couche d'aluminium.
La collection des rayons lumineux réfléchis par la puce se fait grâce à une lentille collectrice (lentille 2) large qui

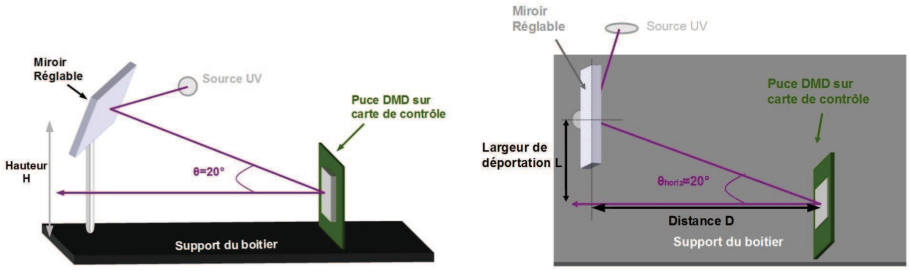
forme une image virtuelle des micro-miroirs à sa distance focale (f1= 5,4cm). Cette image du DMD est renvoyée à l'infini par une seconde lentille convergente (lentille 3) qui possède une distance focale plus courte. (f2=2,7cm) Ainsi on collecte l'image transmise par la puce et on la réduit de moitié (f2/f1 =1/2) pour qu'elle entre au mieux dans le champ d'entrée de l'objectif du microscope (d'environ 3mm de diamètre). Ainsi on a un champs d'image projetée correspondant à un cercle de diamètre 6mm sur la DMD, soit

$$\frac{Diamtre_au_champ}{Taille'_aun_mirroir} = 6000/14 = 428pixels \qquad \text{[Eq. C.1]}$$

La mise en place d'un diaphragme au niveau de l'image virtuelle du DMD constitue un filtrage spatial utilisant la diffraction de Fraunhoffer. On ne récupère ainsi que les rayons émis de manière bien parallèle pour créer notre image avec l'objectif du microscope.
La dernière étape du chemin optique est constituée d'une lame semi réfléchissante qui permet de renvoyer l'image de l'échantillon (substrat) sur le capteur CMOS d'une caméra USB.

C.1.2 Montage mécanique

Le montage du prototype nécessite la fabrication d'un support pour les optiques et les cartes graphiques du vidéoprojecteur. Car le boitier existant étant trop petit pour inclure des réglages fins et le système optique précédemment décrit. Dans un souci de sécurité, on opte pour l'utilisation d'un boitier optiquement étanche en matériau rigide de manière à éviter les jeux dans les réglages optiques et à protéger les connectiques rigides carte à carte. On adapte ce boitier sur une base de microscope afin d'utiliser la stabilité du bloc et une table motorisée. La position du miroir par rapport à la puce DMD qui doit satisfaire la loi de Descartes concernant la réflexion des rayons incidents sur les miroirs. Si on veut renvoyer les rayons perpendiculairement à la puce lorsque les miroirs sont inclinés de 10°, la source lumineuse devra être inclinée de 20°. Étant donné le fait que l'inclinaison soit diagonale, cet angle doit être respecté à la fois verticalement et horizontalement. Ainsi, on définit ainsi la hauteur H et la déportation L du miroir réglable comme montrées dans les figures C.3. Les distances L et H sont



(a) **(b)**

Figure C.3 – Déportation (a) : verticale de H et (b) :horizontale du miroir de L

calculées à partir d'une distance D estimée suffisante pour que le miroir ne gène pas la transmission de l'image entre la puce et l'axe du miroir avec les expressions trigonométriques tangentielles.
La figure C.4 présente le système complet. Le pilotage du système se fait par interfaçage avec Labview. Le programme permet d'insoler une image de type bitmap ou JPEG de 800x600 pixels sur fond noir pendant un temps d'insolation donnée. Il permet aussi de contrôler la table XYZ motorisé pour permette de multiples insolations et régler le focus de manière automatique. La figure C.5 présente l'ensemble des éléments contrôlés par le logiciel. L'objectif est donc d'aboutir sur un système performant permettant de réaliser des insolations dynamiques.

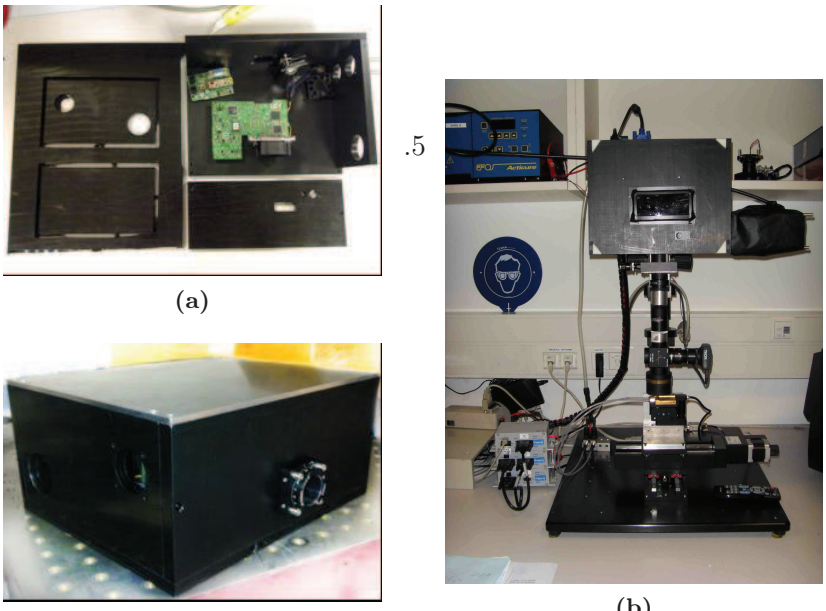


Figure C.4 – Photographie du système de lithographie par vidéoprojection, (a) : Système démonté, (c) : Système monté et (b) : Système complet avec objectif de microscope et table XY de déplacement.

C.2 Performances du système d'insolation statique

Le système est tout d'abord évalué en terme de performance de photolithographie statique sur des substrats. Ce mode d'insolation consiste à exposer la résine par la projection d'un masque sur celle-ci pendant un temps donné.
L'évaluation se fait par un ensemble de teste dose. La dose est la puissance nécessaire pour activer la réaction de polymérisation et se définit par le produit de l'énergie envoyée par la lampe, par le temps d'exposition.
Le système se caractérise par trois éléments critiques : La taille du champ, l'uniformité et la puissance transmise.

C.2.1 Performances optiques

C.2.1.1 Champ maximale

Le champ maximale est défini comme la surface maximale effectivement renvoyée par le DMD. Elle est déterminée principalement par le diamètre du faisceau de la source UV qui illumine le DMD.
La source UV que nous utilisons (Efos Acticure) est fibrée par une double fibre UV de diamètre 5mm. L'utilisation de la lentille initiale permet d'étendre le diamètre du faisceau mais réduit son intensité et uniformité. Nous avons donc essayé de remplacer la source fibrée par des LED UV (OSA Optolight serie 400 - 378 nm 2.2 mW) montées sur un circuit imprimé en étoile (5 LED au total). Les essais ont montré que cette source n'était pas suffisamment intense pour voir l'image en UV. Nous avons donc choisi de poursuivre avec la source UV initiale en supprimant la fibre de 5mm. On a adapté la sorti de la lampe UV Efos Actiruce à l'entrée du système. Malgré le diamètre de 15mm de la lampe, le champ ainsi obtenue ne recouvre pas totalement le DMD. Cependant, on a une augmentation du champ qui est passée de 250*350 à 400*350 Comme le montre la figure C.8, la présence du diffuseur réduit de manière peu important la taille du champ. Car un diffuseur permet de diffuser la lumière, ainsi cela permet d'obtenir un champ de taille plus grande, plus homogène.

C.2.1.2 Uniformité du champ

L'uniformité du champ est définie par la surface maximale renvoyée par le DMD dont l'intensité lumineuse de chaque pixel est constante. L'uniformité est directement déterminée par le diamètre de la source UV mais

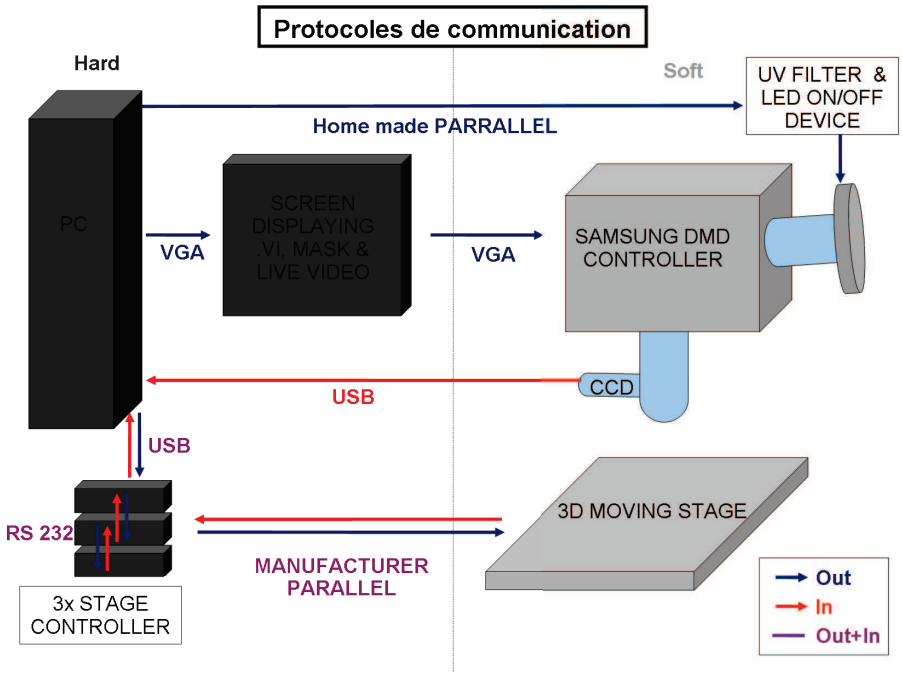


Figure C.5 – Ensemble des éléments de contrôle et protocoles de communication de la lithographie par vidéoprojecteur

aussi par la présence ou non d'un diffuseur. La qualité du diffuseur joue aussi un rôle important : le diffuseur actuellement utilisé absorbe les UV ($> 50\%$). Nous avons donc essayé de fabriquer notre propre diffuseur en rayant des plaques de verre, ce qui les rend opaque. Les figures ci-dessous nous montre les différents effets des diffuseurs testés. Les diffuseurs sont classés par rapport à l'intensité du polissage. Pour un diffuseur dit fort, on ne voit pas à travers, alors qu'un diffuseur dit léger on distingue les objets à travers. Les courbes C.9 représentent l'intensité lumineuse de chaque pixel de l'image associée. Cela nous permet de visualiser l'uniformité, la taille du champ et l'intensité des différentes configurations. La forme de la courbe nous montre l'uniformité, l'idéal serai un droite, nous avons donc chercher à avoir un écart entre la plus petite valeur et la plus grande le plus faible possible.
Nous avons donc choisi la solution sans diffuseur qui est un bon compromis entre uniformité, taille du champ et intensité lumineuse. A noter l'écart entre le centre de l'image et ses extrémités, qui est de 100 point d'intensité lumineuse (Gray Value sur les graph C.9).
La possibilité d'un diffuseur engendrant moins de perte, permettrait de minimiser cet écart.

C.2.1.3 Temps d'insolation

Le temps d'insolation est déterminé par l'intensité lumineuse de la source modulée par des pertes engendrées par le chemin optique jusqu'au substrat. Une source plus lumineuse permettrait d'avoir des temps d'insolation réduits. Ainsi, les temps d'insolation sans diffuseurs sont 2.5 fois moins important qu'avec. La figure C.10 montre les pertes dues au parcours lumineux mais aussi la puissance lumineuse de la source. Avec les pertes actuelles, la source doit avoir un puissance lumineuse d'au moins 150 mW/cm^2.
Les meilleurs temps d'insolation sont ceux où la résine est uniformément insolée et ce le plus rapidement possible. Dans ce cadre, nous avons évalué les performances en terme de temps d'insolation sur les résines classiquement utilisés en microfabrication.

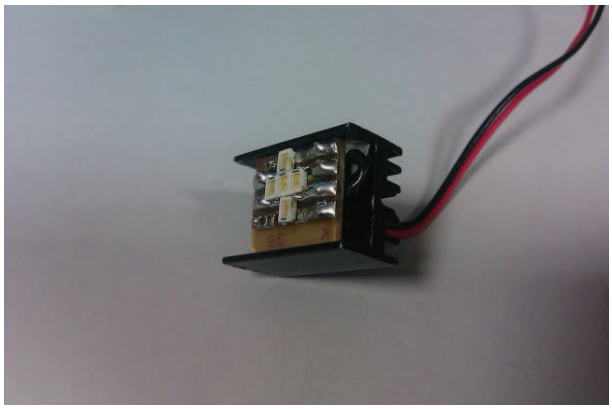


Figure C.6 – LED UV OSA Optolight serie 400 - 378 nm 2.2 mW

C.2.2 Performances lithographie sur résine

C.2.2.1 AZ résine positive

Nous avons effectué plusieurs teste dose sur un ensemble de masques dont les motifs avaient des tailles prédéfinis en pixel.

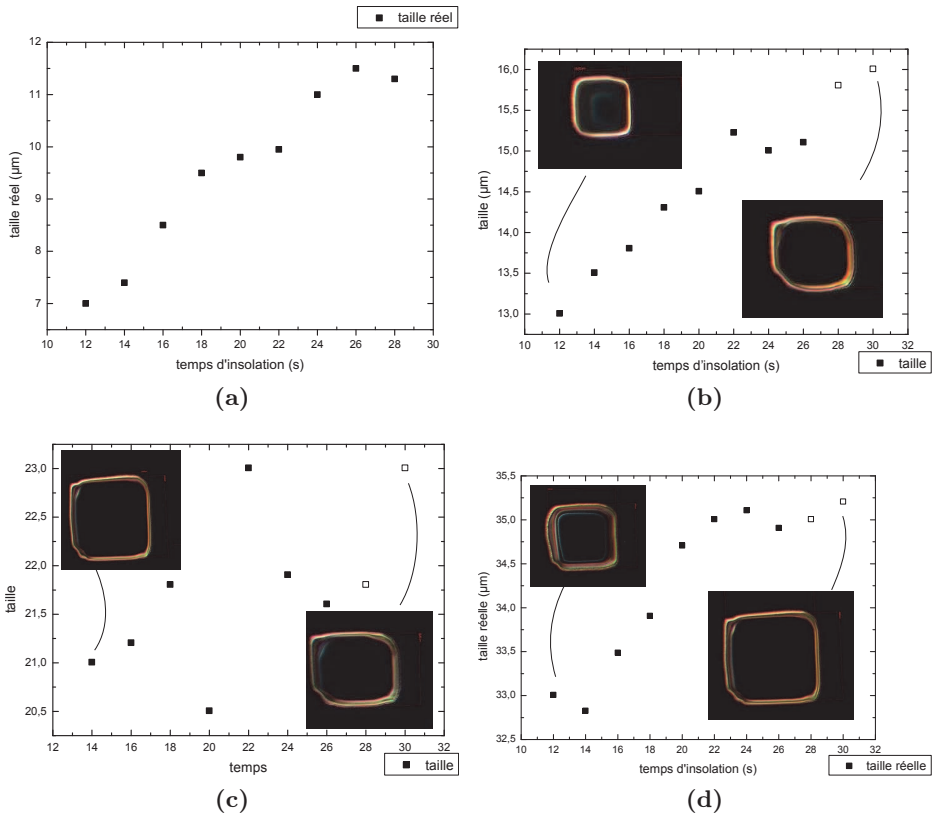
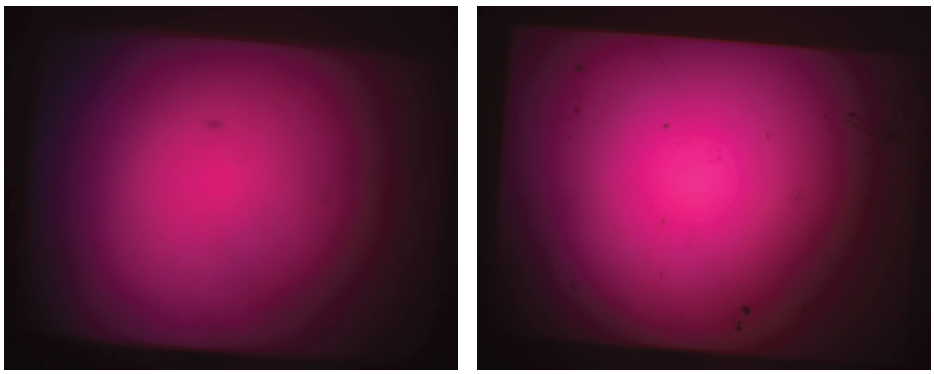


Figure C.11 – graphe exprimant la taille réelle en fonction du temps d'insolation, pour (a) 10 pixels, (b) 20 pixels, (c) 30 pixels, (d) 50 pixels

En repérant les paliers sur les courbes, on détermine les temps d'insolation optimum pour une taille de motifs donnée. On a ainsi pu trouver une valeur moyenne pour le temps d'insolation et la taille correspondante.

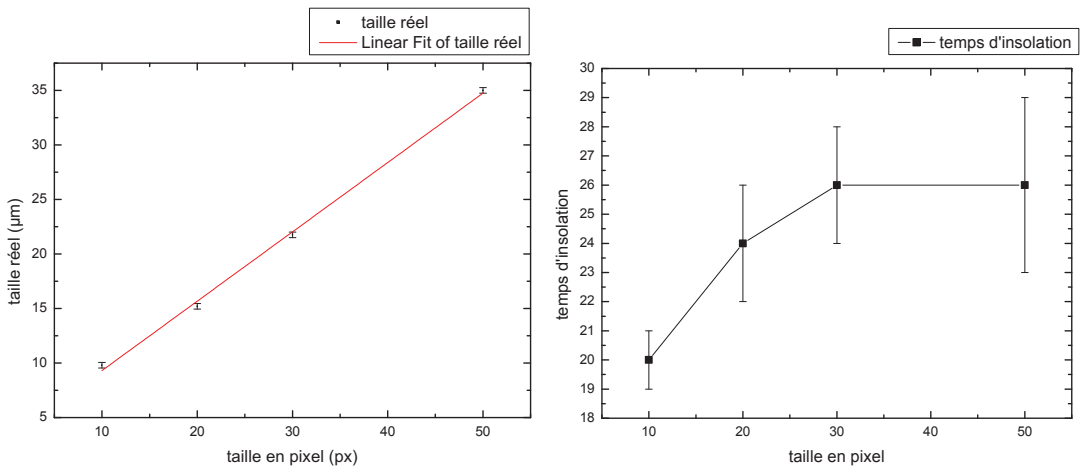
(a) (b)

Figure C.7 – Mise en place de la lampe UV



(a) (b)

Figure C.8 – image du masque projeter (a) avec diffuseur (b) sans diffuseur



(a) (b)

Figure C.12 – (a) Graphe donnant la taille réelle en fonction du nombre de pixel $y = 0.65 \pm 0.02x + 2.91 \pm 0.6$, (b) graphe donnant le temps d'insolation en fonction du nombre de pixel.

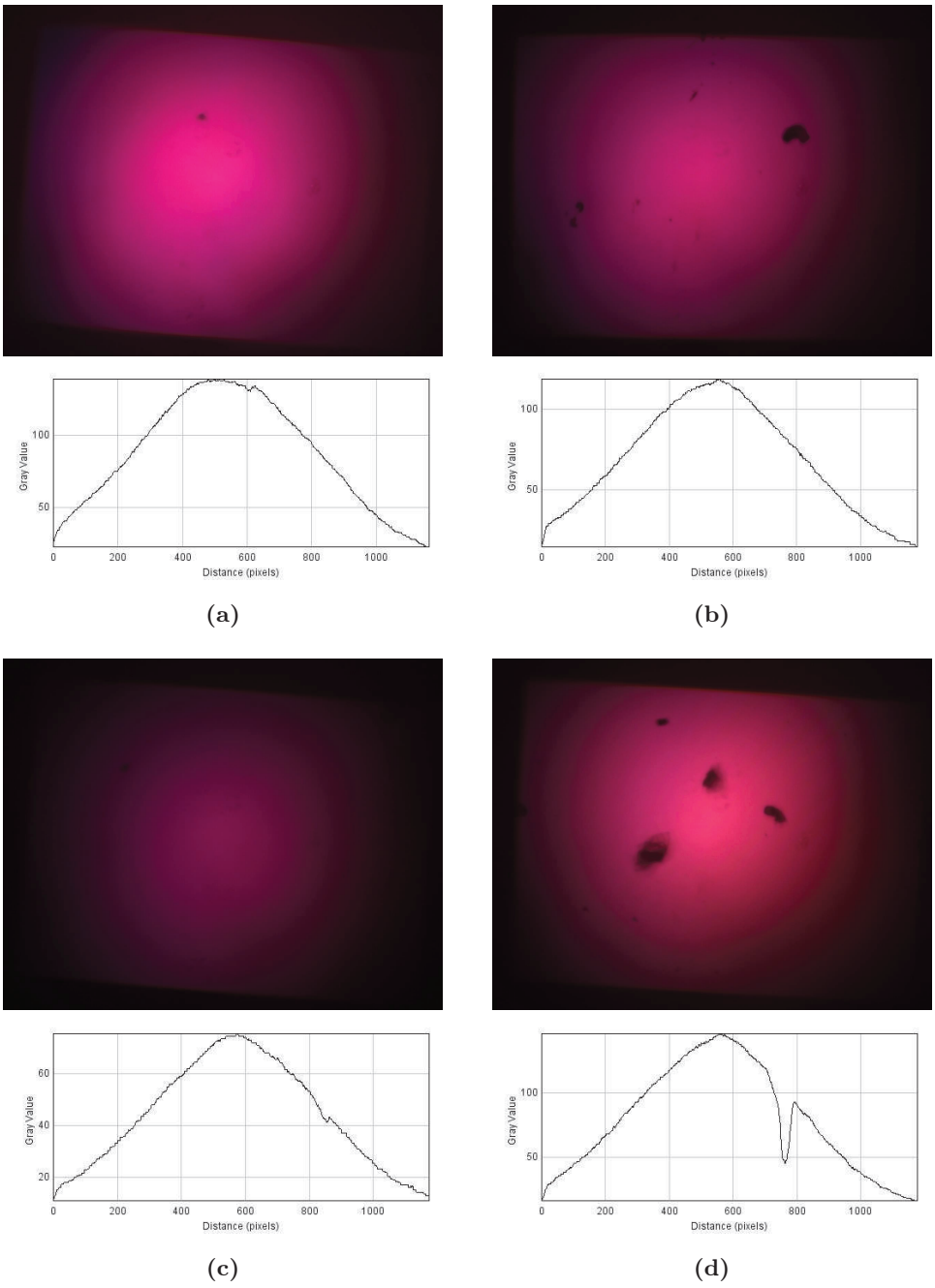
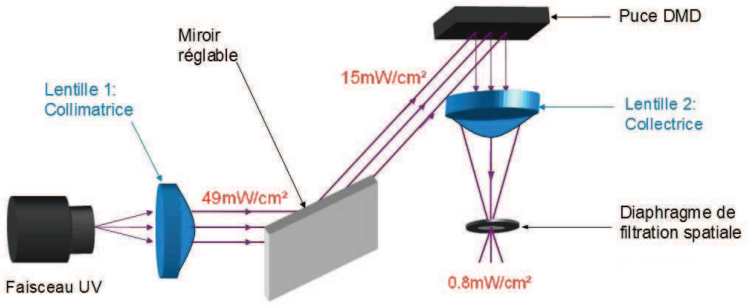
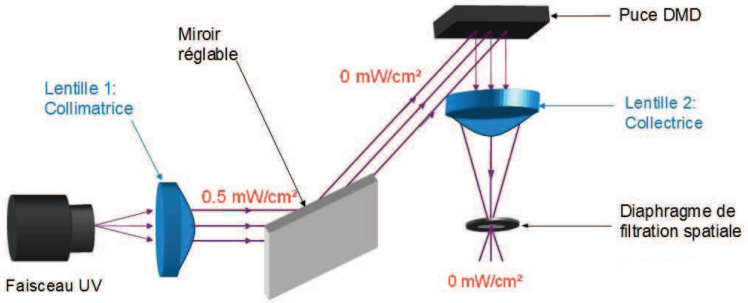


Figure C.9 – Image du masque projeté (a) sans diffuseur, (b) avec diffuseur moyen, (c) avec diffuseur fort, (d) avec diffuseur légère

Il existe une évolution linéaire de la taille du motifs en fonction du nombre de pixels utilisés. Le coefficient directeur de cette droite est de 0.8, ce qui correspond à la taille d'un pixel. Cependant, d'après l'équation caractéristique de la régression linéaire, il existe une taille de motifs minimum. Cela est du aux pentes sur les motifs, détaillé dans le paragraphe 5.3.
L'évolution du temps augmente en fonction du nombre de pixel mais tends à se stabiliser vers les 26 secondes. Le d'insolation reste cependant proches des 24 secondes.



(a)

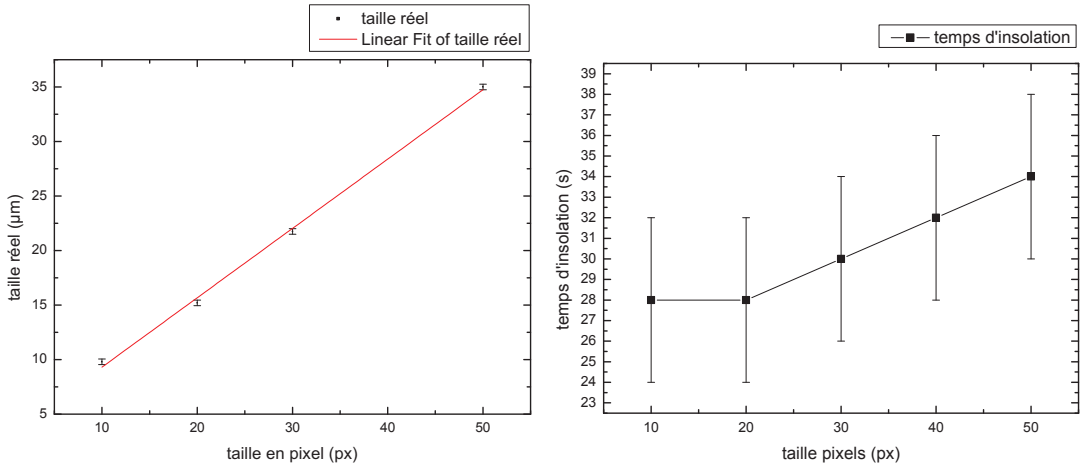


(b)

Figure C.10 – schéma donnant l'intensité lumineuse a 365nm dans le système avec (a) la lampe UV et avec (b) les LED UV

C.2.2.2 SU-8 résine négative

On constate que la courbe de correspondance entre le nombre de pixel et la taille réelle est identique à celle obtenu avec l'AZ. Ceci est cohérents, du faite que les dimensions sont propres au système. Cependant la résine SU-8 devait, conformément aux recommandations de doses fournies par les distributeurs, obtenir des temps d'insolation relativement court. Hors il apparait des temps d'insolation très élevés.



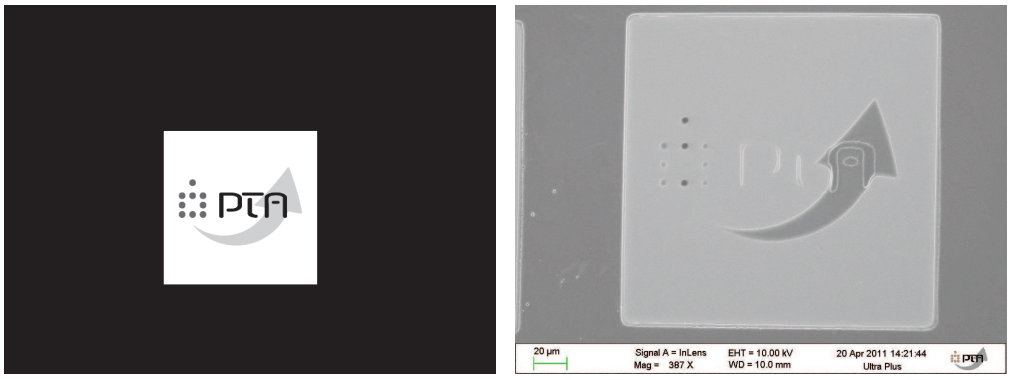
(a) (b)

Figure C.13 – (a) Graphe donnant la taille réelle en fonction du nombre de pixel $y = 0.65 \pm 0.02x + 2.91 \pm 0.6$, (b) graphe donnant le temps d'insolation en fonction du nombre de pixel.

L'évolution du temps d'insolation est des plus stable, mais tends à augmenter. Il s'avère que la dose nécessaire augmente avec la taille du motifs souhaités. Cela peut s'expliquer par la différence entre une résine positives et négative qui réside respectivement dans la destruction ou la création de chaîne de polymère. Cette dernière peut être plus ou moins sensible à la direction des faisceaux incidents.

C.2.3 Optimisation du masque

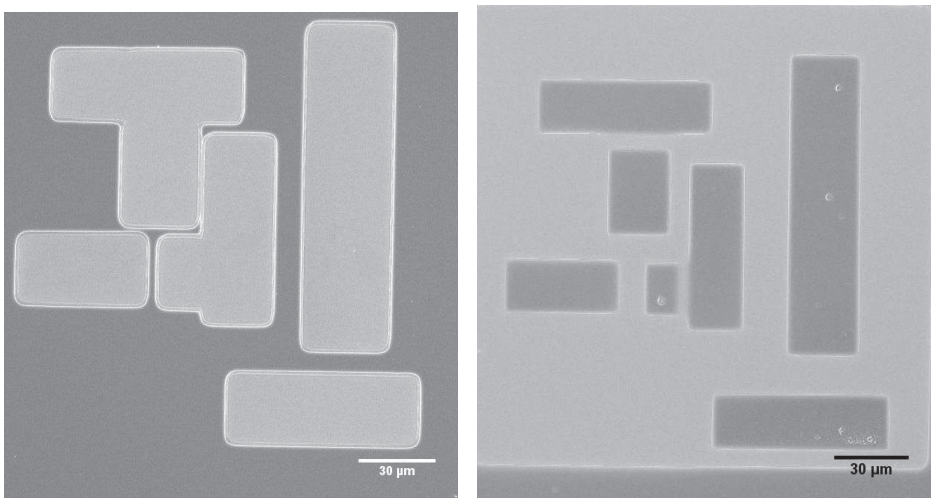
Les masques se présentent sous forme de fichier image, telle que présenté par la figure C.1. Les masques sont en noir et blanc car ils permettent de transmettre l'intégralité de la puissance lumineuse. La lumière est projetée totalement sur les parties blanches alors qu'elle est rejetée en dehors du système sur les parties noirs.
La possibilité d'avoir des niveaux de gris pour obtenir des reliefs dans les motifs insolées est envisageable, comme nous le montre l'image C.14. Le niveau de gris permet de faire varier la puissance transmise à la résine, il y aura donc des parties plus ou moins insolées.



(a) (b)

Figure C.14 – (a) Masque utilisé pour le niveau de gris, (b) Lithographie du masque pour le niveau de gris

Plusieurs testes de masque et de tonalité différentes ont rendu compte de l'apparition de pentes sur les motifs altérant ainsi la qualité des motifs.



(a) **(b)**

Figure C.15 – On observe ici deux images du même motifs mais avec une tonalité différente, insolé sur une résine positive AZ, C.15a image avec masque à tonalité positive, C.15b image d'un motifs à tonalité négative.

On constate donc que nos motifs ont des pentes non négligeables, comme le montre les images de la figure C.15 celle-ci sont mesurée constante à 1.5μm de long.

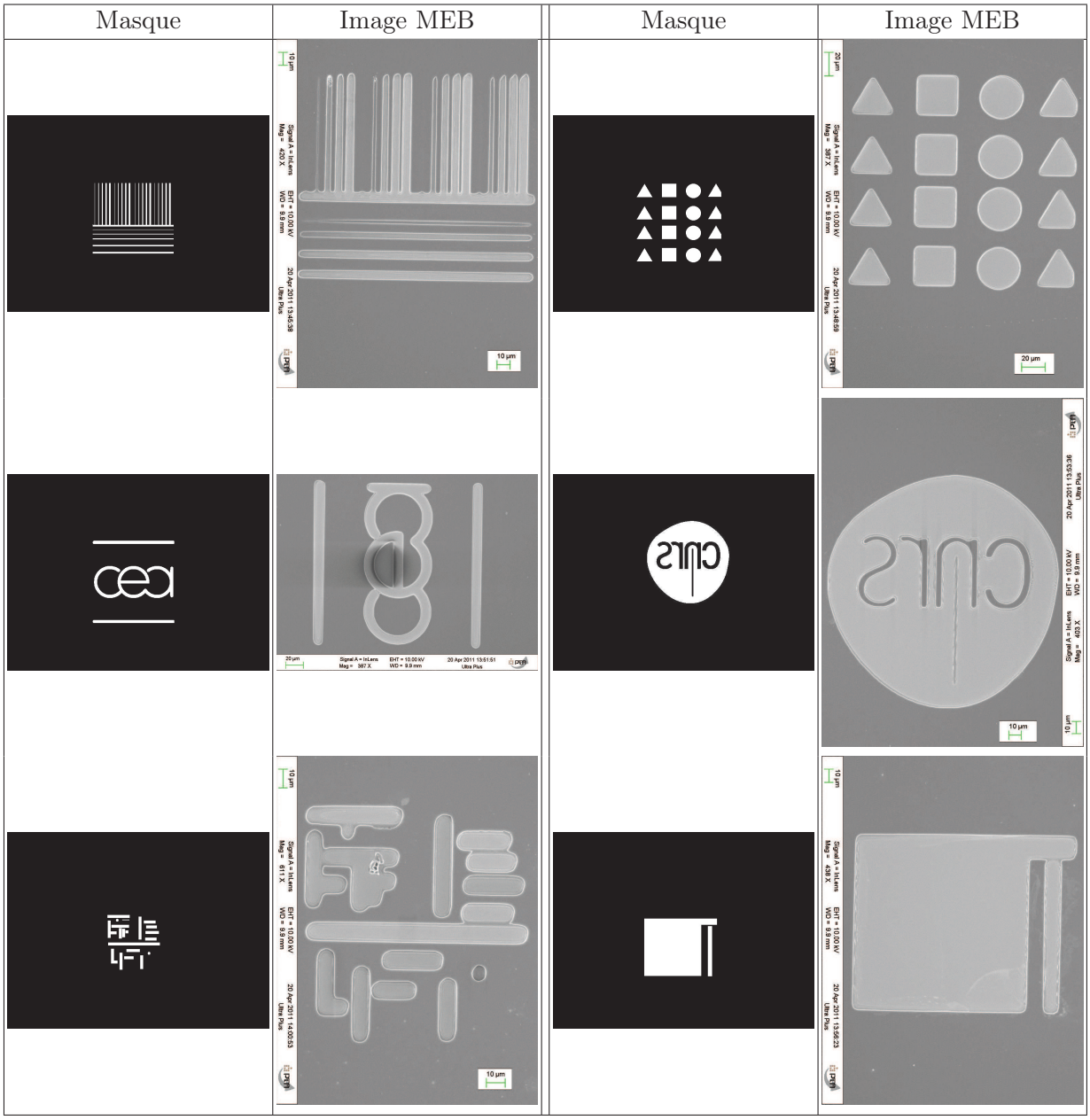
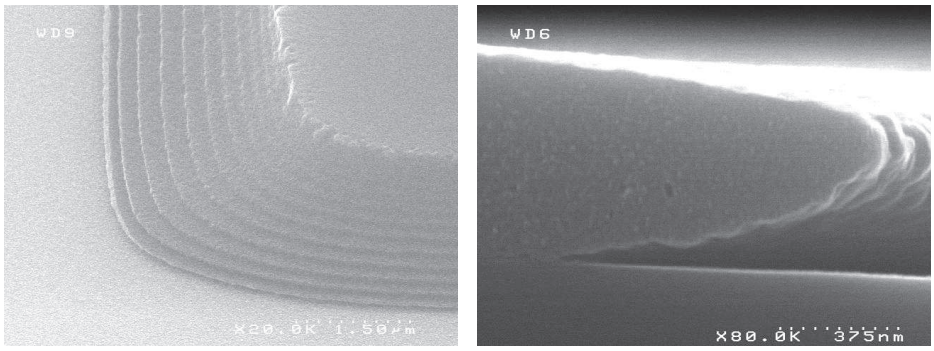


Table C.1 – Masques projetés et photographies MEB de différentes configurations

Pour pourvoir mettre en évidence ces pentes, celles-ci sont observées avec détails au MEB (Microscope Électronique à Balayage). Elles apparaissent comme des paliers qui correspond à la projection des micro-miroirs. Nous avons un phénomène d'anti-crénelage, qui lisse les contours au niveau des différentes frontière entre les couleurs(ici le noire et le blanc). Cela vient de la puce DMD et de sa carte de contrôle qui sont préprogrammées pour interpréter les images et les projeter avec une atténuation des bords, procurant un meilleur rendu visuel à l'utilisateur. Étant intégré dans une solution commerciale, nous ne pouvons pas interagir avec le procédé de traitement des images et de leurs interprétation par les micro-miroirs. La capacité de contrôler les pixels de manière indépendante sans anti-crénelage pourrait permettre a priori d'atteindre des résolutions de 300nm, taille des marches mesurées sur les pentes des images.



(a) (b)

Figure C.16 – Image MEB des pentes (a) résine positive AZ et (b) résine négative SU8

Pour mieux expliquer le phénomène de pentes, nous allons voir les différentes étapes du rendu de l'image.

(a) (b) (c)

Figure C.17 – (a) image du masque, (b) schéma grossier expliquant le rendu réelle, (c) courbe représentant l'intensité moyenne réfléchit pas chaque ligne verticale de micro-miroirs utilisé pour réaliser le masque

Pour cela nous projetons une ligne de 1px, par exemple. La projection de l'image par les micro-miroirs est celle de l'image C.17b, qui montre le dégradé d'intensité lumineuse qui est projeté. Chaque bandes de couleurs représentent un micro-miroir ou plutôt un ensemble de micro-miroir alignés verticalement. La courbe C.17c nous montre schématiquement l'utilisation des micro-miroirs, avec l'intensité moyenne que ceci renvoient, pour réaliser un ligne de 1 pixel.

C.3 Perspectives : vers un système dynamique

L'ouverture vers des lithographies dynamiques pourraient permettre d'insoler des motifs de manière précise autour d'élément. Un exemple est la mise en place d'électrodes au bornes de nano-fil. Un nano-fil est un tube de silicium ou de germanium, d'une longueur de 8μm et d'une centaine de nanomètre d'épaisseur. Les nano-fils sont fabriqués directement à la verticale du substrat. Une fois la taille desirée, ces derniers sont soniqués et déposés de manière aléatoire sur un substrat de silicium. La possibilité de pouvoir insoler avec précision les motifs autour des nano-fils permetterait de pouvoir prendre des contact électriques sur des fils uniques.
La figure C.18 nous montre le système avec les dispositifs misent en place pour permettre d'améliorer le dynamisme

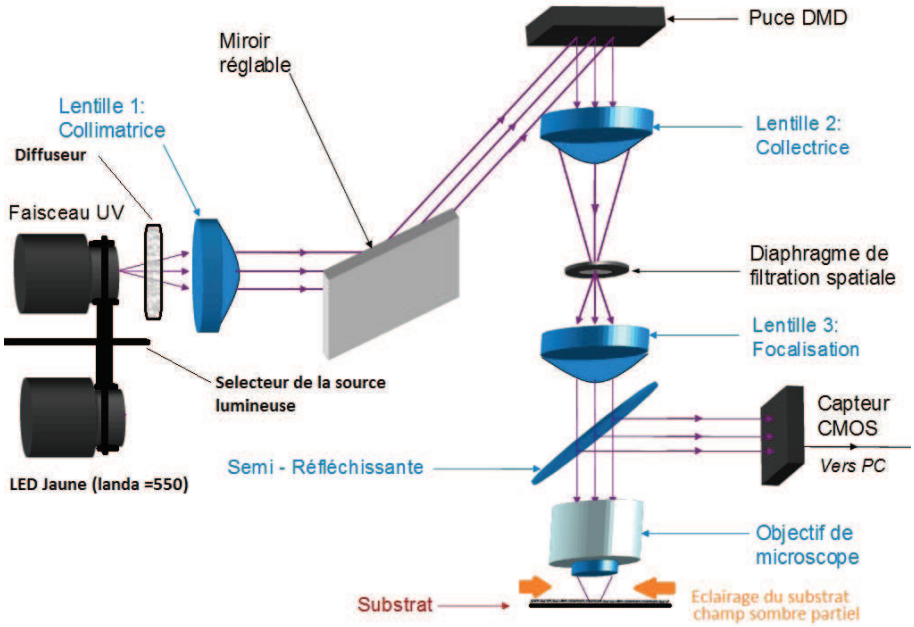


Figure C.18 – Les différentes partie rajouter au système initiale

C.3.1 Amélioration du chemin optique

Nous avons mis en place un éclairage du substrat en champ sombre à l'aide de quatre LED Megabrigth jaune (OVL-3326 3.0mm Round LED Lamp 589nm, 2.1V). Ces quatre LED sont alimentées en parallèle en 2.1 V par le biais du boitier de contrôle. Leurs contrôle se fait par la commutation d'un transistor, piloter par une sortie de l'ordinateur. Leur orientation est la plus inclinée possible pour pourvoir mettre en évidence les reliefs des différents motifs ou aspérité du substrat (voir figureC.19).

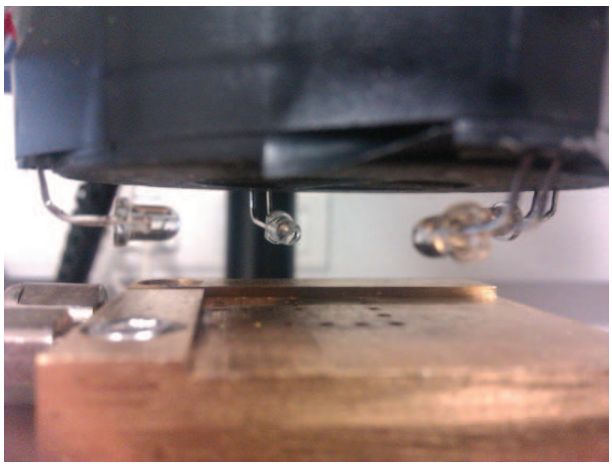
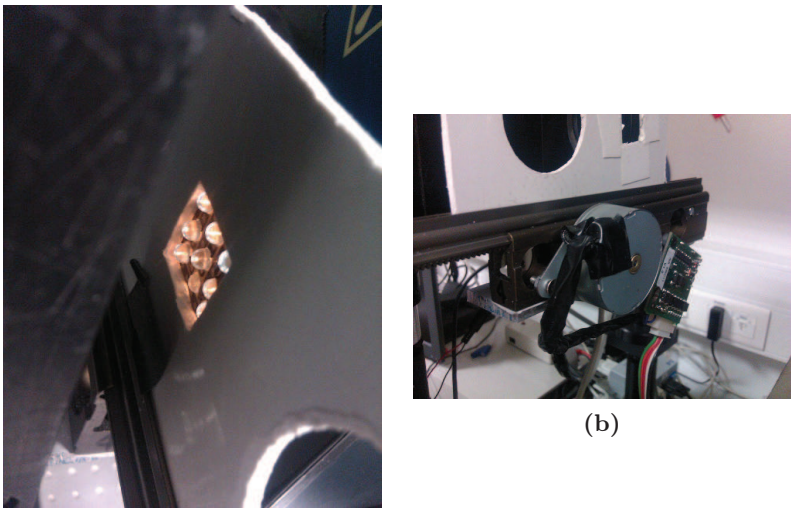


Figure C.19 – Images de l'éclairage semi-champ sombre

L'obtention d'une image du masque sans insoler la résine nécessite de pourvoir projet la même image mais avec une autre source lumineuse. Pour cela 9 LED Megabrigth jaune on été mis en parallèle afin d'obtenir un éclairage conséquent recouvrant une large zone. L'image C.20 nous montre le dispositif une fois mis en place dans le sélecteur. Ce dernier est le dispositif mis en place pour pouvoir choisir la source lumineuse. Ces LED sont

contrôlées de la même manière que celles du champ-sombre.



(a) (b)

Figure C.20 – (a) : Photographie du dispositif d'éclairage pour une pré-visualisation du masque. (b) : Photographie du moteur et de la glissière

La sélection de la source lumineuse se fait par une liaison glissière actionné par un moteur pas à pas. Ainsi le système de glissière permet le choix entre les deux sources et ne prenait pas trop de place, permettant ainsi de pouvoir régler au mieux la position de la source UV. Le moteur pas à pas mis en place a engendré une modification du programme LABVIEW afin de permettre son contrôle de manière automatique.

C.3.2 Evaluation du logiciel existant

Le logiciel de pilotage des différents éléments et de la projection a été développé par LABVIEW(National Instrument). Ceci ouvre une possibilité de piloter la position du masque par rapport à l'écran d'affichage. Car le programme créer une fenêtre de 800*600 qui comporte l'image du masque. Elle est mise en position pour être cadrée avec la fenêtre du vidéo-projecteur, comme nous le montre l'image C.21. La position du masque est déterminée par l'utilisateur. Grâce à l'extension NI Vision il est possible de réaliser un grand nombres d'analyse d'image, comme par exemple connaître des coordonnées d'un objet dans une image, ainsi qu'une reconnaissance de motifs. Le pilotage du masque se fait, pour le moment manuellement grâce à un ensemble de glissière, l'objectif serait d'automatiser le système en permettant de centrer le masque par rapport à un point sélectionné sur l'image filmée par la caméra.

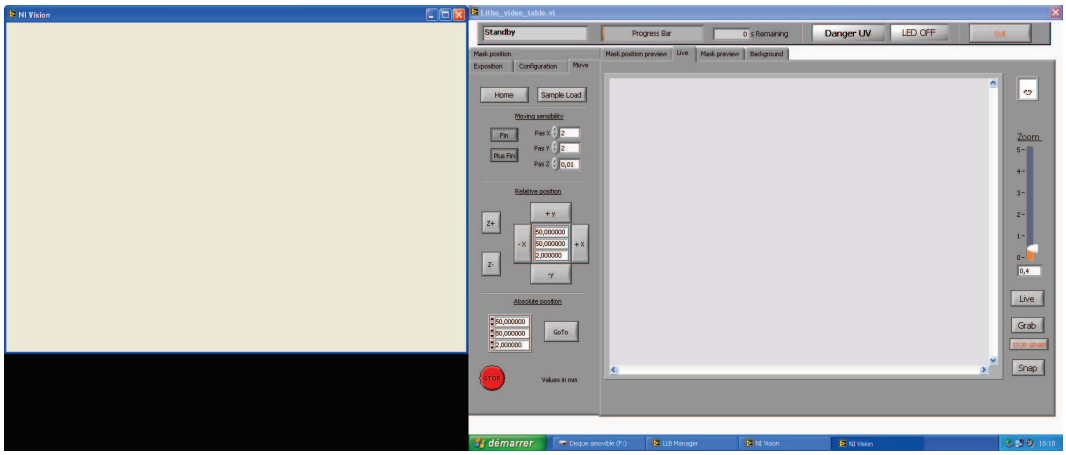
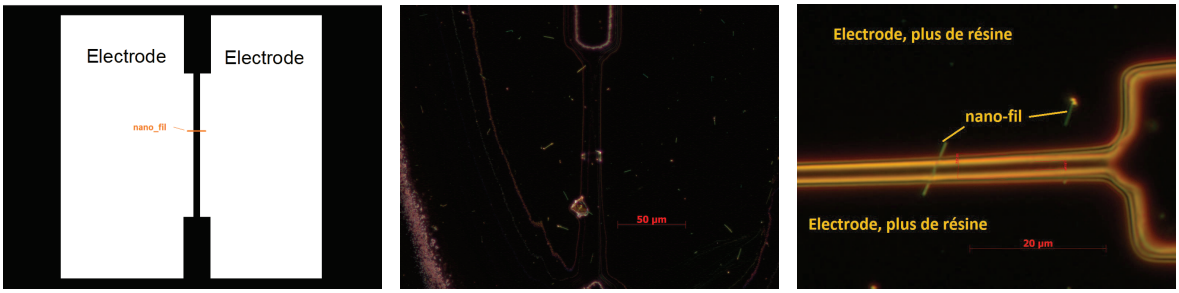


Figure C.21 – front panel du programme permettant de piloter le système

C.3.3 Application : Electrode pour nano-fil

Nous avons donc testé le système pour l'insolation d'une résine positive afin établir des électrodes de mesure en contacte avec des nano-fils. On enlève la résine à l'endroit précis ou l'on souhaite mettre les électrodes pour déposer du metal par un canon électronique de déposition.
L'objectif est donc, de pouvoir détecter les nano-fils grâce à la caméra et d'insoler un masque autour. Pour ce faire, la mise en place du champ-sombre permit de visualiser ces derniers dont la taille ne permettait pas de les voire avec un éclairage classique. Une fois localisé, nous positionnons le masque au mieux grâce à un système de LED projetant le masque sans insoler la résine. Cette substitutions de la lampe UV par les LED nous est apparu nécessaire après un premier test. Comme nous le montre l'image C.22b, où l'on peut apercevoir que le fil n'est pas au centre du masque comme nous le souhaitons. Une fois positionné, on insole pour obtenir le résultat présenté par l'image C.22c.



(a) (b) (c)

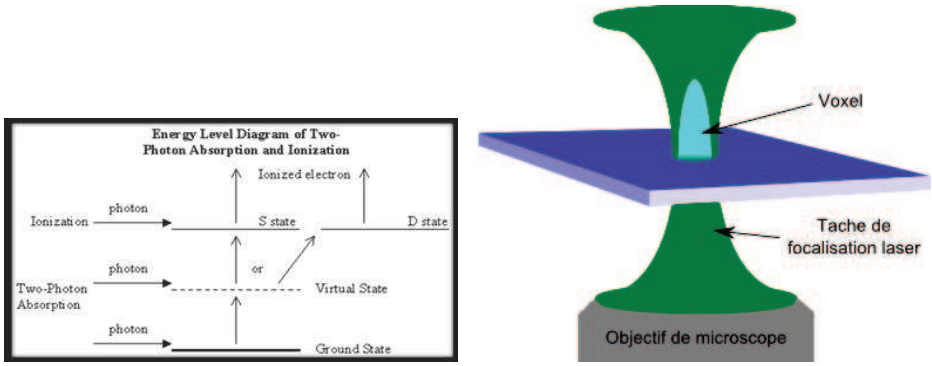
Figure C.22 – (a) : Schéma de principe, (b) : Première insolation pour connecter un nano-fil, (c) : images après insolation.

Comme on peux le constater sur l'image C.22c le nano-fils est correctement aligné avec les électrodes. Cependant, l'utilisation d'une résine positive impose des pentes beaucoup trop importantes. Elles ne vont pas faciliter le lift off. Le Lift off est le principe qui constitue à enlever la résine après avoir fait le dépôts de métal, pour créer les électrodes. Il est donc préférable d'utiliser une résine négative. Cette réussite ouvre la voie vers la photolithographie dynamique par repérage de forme prédéfini.

Annexe D

Photolithographie à 2 photons de particules colloïdales

La fabrication de structure polymérisées en 3D devient possible avec la lithographie à 2 photons. La polymérisation à 2 photons, présentée en 1931 par Maria Göppert-Mayer [Göppert-Mayer 1931] et démontrée en 1961 [Kaiser 1961], est un cas particulier du cas de polymérisation multi-photons présente dans les techniques de lithographie standard. Dans ce dernier cas, un atome ou une molécule peut interagir avec plusieurs photons simultanément. Ces atomes seront alors dans un état quantique excité de manière homogène. Dans le cas de l'absorption à 2 photons, si 2 ou plusieurs photons dont les niveaux d'énergie sont suffisamment élevés, percutent un électron pendant un temps suffisamment court, ce dernier sera mis dans un état excité en passant par un état virtuel comme le montre la figure D.1a. Ainsi, la polymérisation à 2 photons utilise l'absorption à 2 photons pour polymériser une résine photosensible. Afin d'amener suffisamment d'énergie pour initier la réaction de polymérisation, un laser est focalisé dans la résine à travers un objectif de microscope. La densité de photons nécessaire à initier le processus d'absorption à 2 photons devient alors suffisante au point focal du laser qui polymérise la résine dans une forme d'ovale ou de grain de riz appelée voxel pour "volume pixel" comme le montre la figure D.1b. La polymérisation 2 photons est classiquement réalisée avec un laser infrarouge pulsé femtoseconde



(a) (b)

Figure D.1 – (a) : Processus d'adsorption 2 photons, extrait de [Kaiser 1961] et (b) : Illustration de polymérisation 2 photons et création du voxel.

à haute énergie. Nous avons choisi d'utiliser le kit μFab commercialisé par Teemphotonics qui utilise un laser visible à 532 nm Nd :YAG pulsé à 0.5 ns et un taux de répétition de 6.5 kHz. Combiné avec un obturateur haute fréquence et une platine piezo électrique XYZ montée sur un microscope (objectifs 63X corrigé pour le verre et 100X à immersion), cette platine de microfabrication permet de polymériser des résines photosensible en 3D[Wang 2002, Martineau 2002] dans des gouttes de résines posées sur des susbtrats de verre. L'utilisation de ces gouttes nécessitent des résines visqueuses, sous peine de voir les flux Marangoni intrinsèques aux mouvement du liquide dans une goutte perturber la polymérisation, et impose que les structures fabriquées soient attachées sur le substrat après rinçage qui est typiquement effectué avec de l'eau déionisée, du PBS ou de l'éthanol. Nous avons donc choisi de fabriquer des structures dans un canal microfluidique. Ainsi, la résine à polymériser est injectée dans ce canal où le flux laminaire peut être arrêté et la résine polymérisée sans contraintes de mouvement de liquide. De plus, le produit de la polymérisation peut être récupéré en sortie de canal. La figure D.2 présente le banc expérimental ainsi monté. La fabrication de structures par la lithographie 2 photons a été évaluée sur

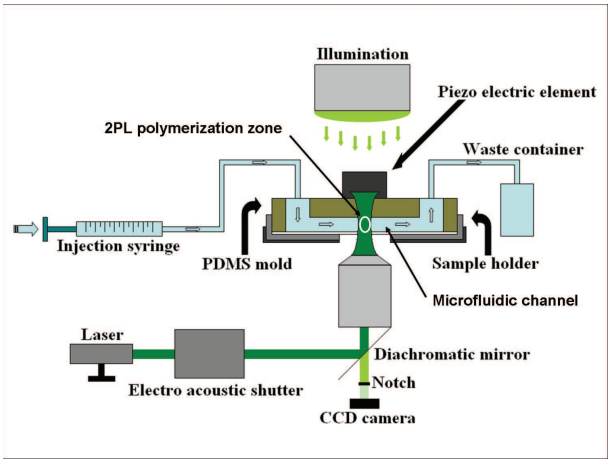


Figure D.2 – Banc expérimental de polymérisation à 2 photons[Honegger 2011b]

plusieurs types de résines :

- Résines classiques utilisées en microélectronique : résine négative SU-8 2002 (Microchemicals) et résine positive AZ1512-HZ (Chmitech).
- Colles optiques : Ces résines sont utilisés en tant que colle présentant des indices de réfractions élevés (> 2.5) et présentant de fortes absorption dans les ultraviolets. Le type de résine évaluée est basée sur du monomère 3015 (Henkel).
- Résines Biocompatibles : Ce sont des résines basées sur de la matiere molle dont les proprietés physico-chimiques une fois polymérisées peuvent être adaptées à leur utilisation[Kwon 2008]. Ces résines sont fabriquées à partir de mélange des monomères, de photoinitiateurs (PI) (2,2-Dimethoxy-2phenylacetophenone (DMPA)) et d'agent liant (CL) (ethylene glycol dimethacrylate (EGDMA)). Les monomères choisis sont du Poly ethylene glycol diacrylate (PEG-DA) pour des polymères de construction inertes ou du 4-Hydroxy butyl acrylate (4-HBA) pour des polymères pouvant répondre a un champ électrique [Kwon 2008]. Les proportions de mélange sont présentées dans le tableau D.1

Polymère	Composition et proportions
Construction	PEG-DA(96.16 wt.%) + PI(2.88 wt.%) + CL(0.96 wt.%)
Réponse électrique	4-HBA (84.48 wt.%) + Acide Acrylique (11.68 wt.%) + CL (0.96 wt.%) + PI (2.88 wt.%)

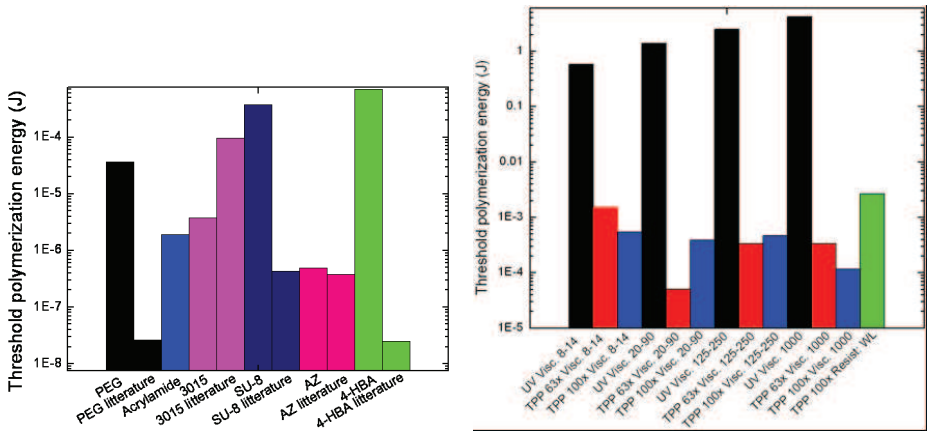
Table D.1 – Composition et proportions des résines en polymères actifs

- PDMS avec photoinitiateur. Du PDMS (Sylgard 184) est mélangé avec un photoinitiateur (TPO de Albermarle) qui permet de lier les monomères DMS ensemble. La polymérisation de ce type de PDMS est évalué comparativement avec le PDMS photosensible WL-5150 pour fabriquer des canaux microfluidiques mais ne sera pas étudié par la suite.

D.1 Étude des voxels en fonction de la dose utilisée

L'ensemble des résines sont évaluées en terme de faisabilité de polymérisation par la lithographie 2 photons. Ainsi, pour un temps d'exposition fixe, l'énergie du laser est augmenté progressivement jusqu'à obtenir un polymère. Lorsque les polymères ont un indice de réfraction différent de celui des monomères, il est possible d'observer directement les voxels crées et donc les énergies minimales de polymérisation. Dans le cas des résines AZ et SU-8, une étape de développement est nécessaire avant d'observer les polymère. Plusieurs insolations sont alors faites sur un échantillon qui est ensuite développé. La figure D.3 présente les énergies minimale de polymérisation pour les résines étudiée ainsi que les énergies nécessaires pour polymériser dans le cas d'insolation avec des lampes

ultraviolettes de recuit. La puissance du laser est calibrée par un wattmètre de puissance centré à 532 nm. Il est



(a) **(b)**

Figure D.3 – Comparaison des énergies minimales de polymérisation[Honegger 2011b]

donc possible de polymériser les résines étudiées par de l'absorption 2 photons, alors même que ces résines sont réticulées avec de l'absorption multiphotons dans les ultraviolets. Il convient de noter toutefois que les énergies de polymérisation sont plus importantes pour l'absorption 2 photons que pour le multiphotons étant donné que les photoinitiateurs dans les résines ont des bandes d'absorption larges dans les ultraviolets. De plus, l'énergie minimale de polymérisation est aussi directement liée à la densité de photons émise par l'objectif de microscope. Ainsi, le grossissement et l'ouverture numérique des objectifs impactent directement l'énergie minimale de polymérisation comme le montre la figure D.4 dans le cas du PEG. La répartition spatiale de la densité de photon

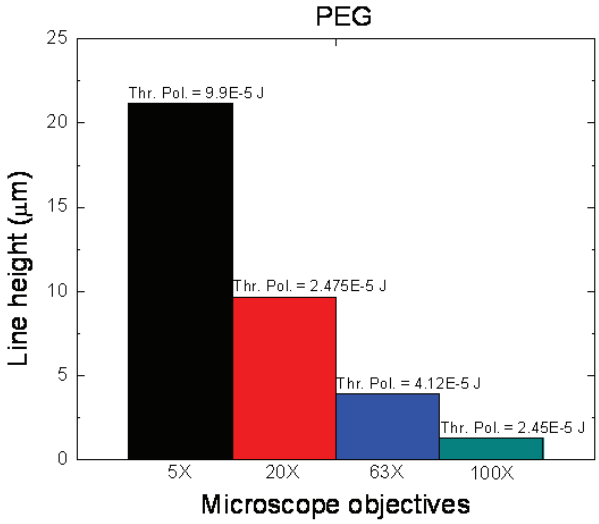


Figure D.4 – Comparaison des énergies minimales de polymérisation du PEG avec différents objectifs[Honegger 2011b]

émise par l'objectif définit alors la forme et les dimensions du voxel polymérisé. De manière générale, plus d'énergie conduit à des voxels plus volumineux. Toutefois, l'augmentation des dimensions est anisotrope verticalement et horizontalement. Outre l'objectif utilisé, la puissance laser et le temps d'exposition impactent directement ces dimensions. Pour déterminer les dimensions des voxels et leurs évolutions en fonction de ces paramètres, une matrice de voxels est réalisée dans les résine par une méthode dite de balayage ascendant. Le point focal du laser

est volontairement fixé dans le verre au début de la matrice et un décalage vertical est incrémenté sur toute la matrice de sorte que la totalité du voxel apparaisse au fur et à mesure que la position du point focal augmente. La figure D.5 présente un photographie MEB des voxels crée par cette méthode. Les dimensions, longueurs et

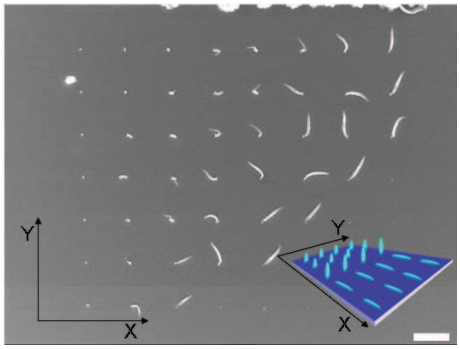


Figure D.5 – Méthode de balayage ascendant de création de voxels[Honegger 2011b]

largeur, sont alors mesurées au MEB sur l'ensemble des voxels. Les travaux de [Sun 2003] présentent des lois d'échelle pour ces dimensions en fonctions du temps d'exposition et de la puissance laser. Adaptées à la configuration 2 photons, la taille S (longueur ou largeur) est donnée par [Eq. D.1] où L est le paramètre de fit, E_{re} l'énergie appliquée et E_{th} l'énergie minimale de polymérisation.

$$S = L\sqrt{\frac{ln(E_{re}/E_{th})}{8ln(2)}} \qquad \text{[Eq. D.1]}$$

Les longueurs et largeurs des voxels sont mesurées par la méthode de balayage ascendant pour toutes les résines comme montrées dans la figure D.6. D'une manière générale, les longueurs des voxels augmentent conformément

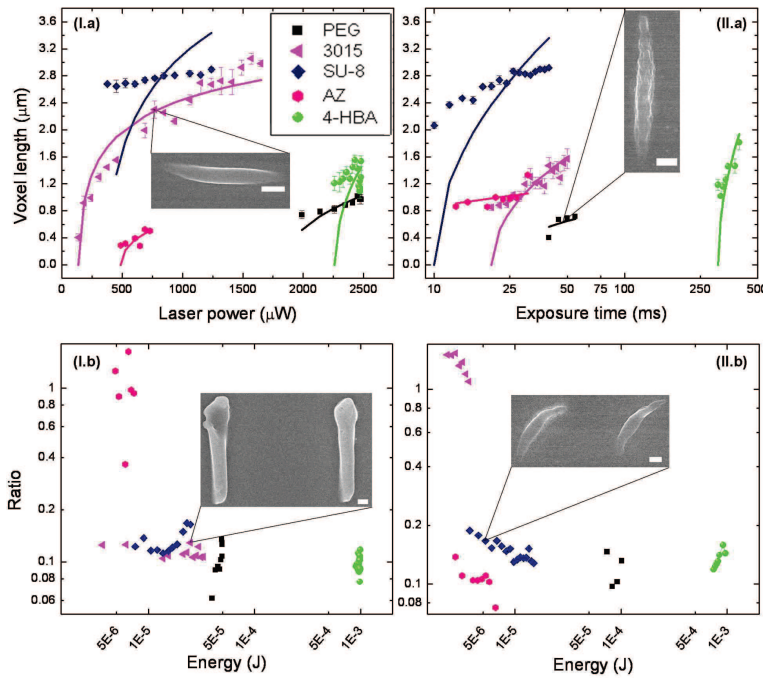


Figure D.6 – Largeurs des voxels et rapports d'aspect en fonction (I) de la puissance laser et (II) du temps d'exposition.

la loi d'échelle avec l'énergie du laser, que ce soit par l'augmentation de la durée d'insolation ou par la puissance

laser. Les résines de microélectronique ont toutefois des augmentations de voxels relativement faibles (< 50%) comparées aux augmentations massives des autres résines (> 500%). Les processus chimiques de polymérisation peuvent en être la raison : Ceux de la SU-8 (basé sur un générateur photoacide) et de l'AZ (basé sur un composé photo-actif) diffèrent de ceux des autres résines (basé sur une activation covalente directe du photoinitiateur). Les paramètres extraits des expériences pour ces résines sont présentés dans le tableau D.2 et peuvent permettent de prédire la taille des voxels generés pour une dose donnée. Les rapports d'aspect des voxel sont définis comme

Résine	L
PEG	2.51±0.01
4-HBA	25.45±0.04
3015	20.42±1.40
SU-8	37.03±26.7
AZ-1512	9.30±0.57

Table D.2 – Paramètres extraits de la modélisation de l'évolution des voxels en fonction des doses de polymérisation.

le rapport hauteur sur longueur et ne sont pas constants lorsque la dose de polymérisation augmente. En effet, pour un même objectif de microscope, la distribution de l'energie du laser augmente plus rapidement dans l'axe verticale que dans l'axe du plan focal. Ceci a pour effet d'alonger le voxel dans l'axe vertical. L'evolution des rapports d'aspect montre 3 differents cas, comme le montre la figure D.6 : La SU-8 présente un rapport d'aspect stable relativement a la dose de polymérisation alors que l'AZ ne présente pas de tendance particulière. En revanche, les résine à base de PEG et de 4-HBA voient leurs rapports d'aspect augmentés de manière significative (> 100%) avec la dose. Les performances de polymérisation pour l'obtention des plus petits voxels dans les résines à base de PEG, AZ et 3015 sont respectivement 300, 350 et 400 nm respectivement avec un objectif de 100X.

D.2 Fabrication de structures 3D

Le passage d'une dimension à plusieurs, c'est à dire du voxel à un volume de polymère, se traduit par une fusion de plusieurs voxels. Cette fusion s'opère par une polymérisation de 2 voxels, dans un plan horizontal ou vertical, dont le chevauchement contrôle la solidité de la structure ainsi crée. En déplaçant la platine piézo et l'obturateur du laser de manière synchrone, il est alors possible de fabriquer des structures tridimentionnelles mécaniquement solide, c'est à dire résistante au lavage des solutions de monomère et qui ne s'effondrent pas sur elle meme. Nous choisissons de poursuivre l'étude de telles structures avec les résines les plus performantes en terme de polymérisation : PEG et 4-HBA.
L'adhésion de structures complètes sur un substrat nécessite que ce dernier soit parfaitement plan pour que l'ensemble des voxels formant la couche d'accroche puissent maximiser leur surface d'attache. Il doivent donc être dans leur plan médian. Les substrats et sont supports n'étant pas parfaitement horizontaux, cette couche a tendance à être décalée spatialement. Afin d'augmenter l'énergie de liaison entre le substrat et les voxels, quoique leur surface d'accroche, une monocouche de 1% de 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) dissoute dans de l'éthanol est étalée par centrifugation sur le substrat. L'APTES présente une énergie de surface très importante aux hydrogels et permet de fixer les voxels, malgré leurs différentes surface d'accroches, séparés jusqu'à 100 μ. Ces derniers restent accrochés sur le substrat même après rinçage.
De façon à déterminer le taux de chevauchement optimal pour construire des structure à 2 et 3 dimensions, la méthode suivante est utilisée : Les voxels sont polymérisés en lignes, pour des structures ouvertes, et en carrés, pour des polygones fermés présentant des contraintes mécaniques, avec des taux de chevauchements variables puis la rugosité de ces structures sont analysées au MEB. La rugosité est définit comme la différence de marche entre l'extérieur et l'intérieur de la structure, comme présenté en figure D.7. Contrairement à ce qui peut être intuitivement attendu, plus les voxels sont rapprochés, plus la rugosité augmente. Cet effet provient probablement de l'effet de proximité de plusieurs voxels, induisant un encombrement stériques et des tensions mécaniques dans l'ensemble polymérisé. Ainsi, trop de chevauchement conduit à un éclatement local de la structure et à une augmentation de la rugosité. Pour les structures cubiques, les mêmes comportements sont observées et les

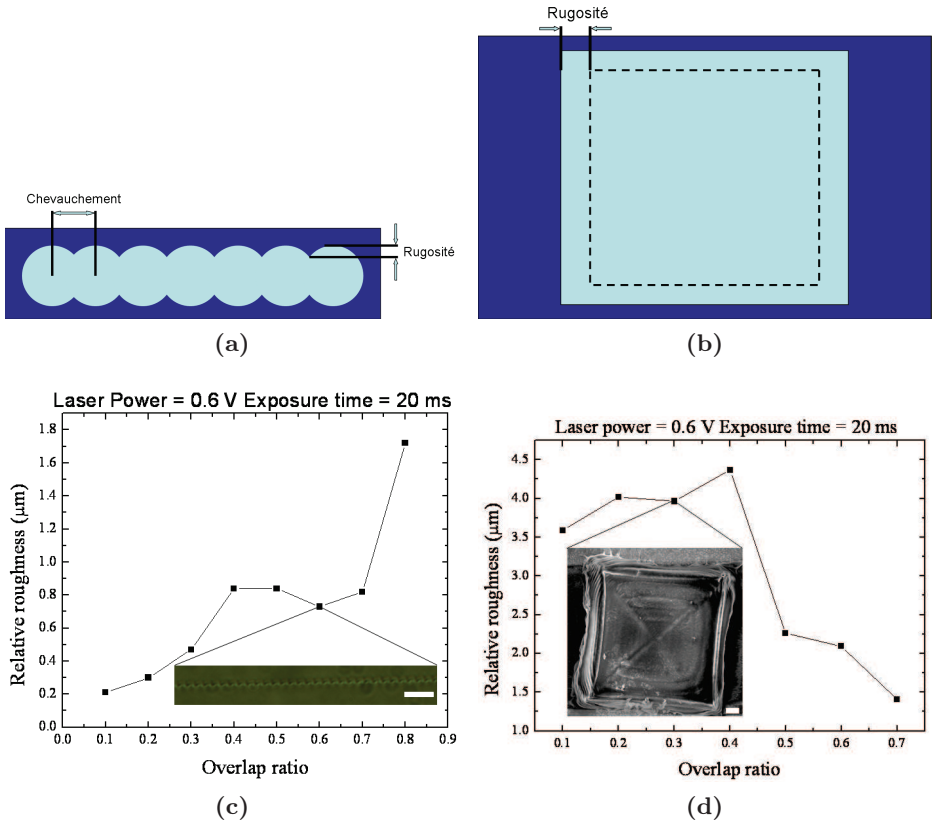
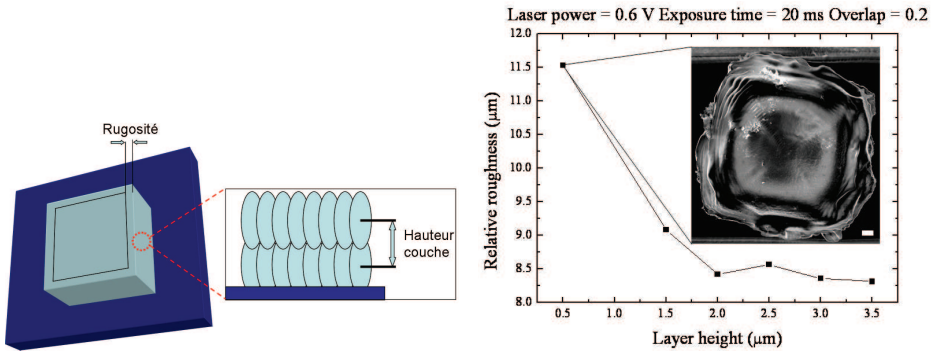


Figure D.7 – Méthode d'évaluation du taux de chevauchement des structures 2D ouverte (a) ou fermé (b). La bar d'echelle indique 10 μ.

structures ayant un taux de chevauchement supérieurs à 0.4 se sont détachées de la surface tellement les tensions mécaniques étaient fortes. Le taux de chevauchement maximal est alors choisi à 0.2 pour fabriquer des structures 2D viables.
Cette méthode est aussi appliquée au structures cubiques en 3D. Le taux de chevauchement est alors définit comme l'épaisseur entre chaque couche de voxel et la rugosité est mesurée sur des structures cubiques. La rugosité étant mesurée au microscope confocale de la même manière que précédemment. La figure D.8 présente la méthode pour les structure 3D. Comme dans le cas bidimentionnel, la rugosité de la structure diminue lorsque le taux de chevauchement diminue ou que l'espacement entre deux couches augmente. Ainsi l'encombrement stérique des voxels joue un rôle significatif, jusqu'a éclatement de la structure, dans la cohésion de la structure polymérisée, que ce soit en 2D ou en 3D. Pour un espacement optimal de 2 μm entre les couches de voxels, la rugosité obtenue est alors inférieure à 8.5 μm.
Il est à noter aussi que les structures nécessitant un fort maintient mécanique, c'est à dire pouvant résister à un séchage ou à des forces locales autres que fluidique, doivent etre polymérisées en leur intérieur. En effet, si tel n'est pas le cas, il peut être observé un effondrement des structures sur elles-mêmes lors du séchage ou lors d'application de champs électriques.

D.3 Fabrication de structures hétérogènes électro-sensibles

Des structures héterogènes peuvent etre fabriquées par polymérisation successive de deux ou plusieurs résines sur une même structure. Grâce à la polymérisation en canal microfluidique, une premiere résine à base de PEG est injectée, polymérisée puis remplacée par la résine 4-HBA. Ainsi, une structure cubique de 10 μm d'arette est réalisée en PEG puis un bras deporté de 50 μm de long est réalisé en 4-HBA. De même, un solution colloidale de



(a) (b)

Figure D.8 – Méthode d'évaluation du taux de chevauchement des structures 3D.

particules de 10 μm de diametre de polystyrene est préalablement mélangée avec de la résine 4-HBA puis inserée dans le canal microfluidique. On réalise alors des lignes superposées à partir d'un colloide pour obtenir un flagelle. Ces structures sont présentée sur la figure D.9. La structure cubique est fabriquée entre des electrodes d'or espacée

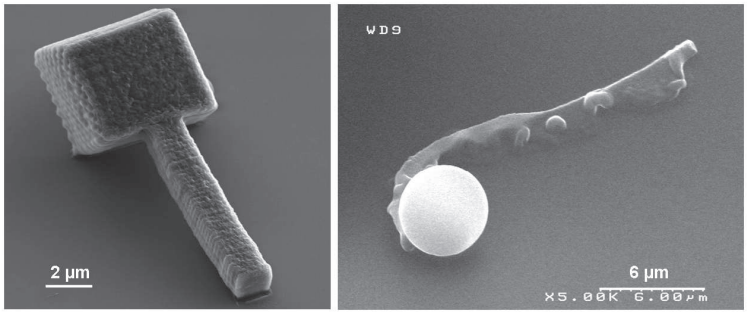
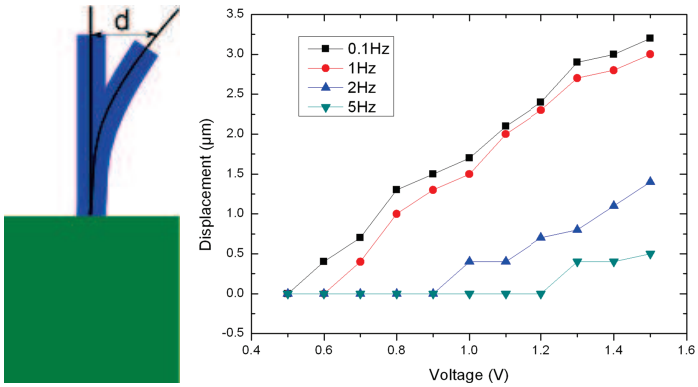


Figure D.9 – Structures hétérogènes fabriquées en lithographies 2 photons, base du cube en PEG et bras deporté en 4-HBA ou colloide de polystyrene de 10 μm de diametre avec un flagelle de 20 μm de long en 4-HBA.[Honegger 2011b]

de 20 μm. Ces electrodes peuvent etre fabriquées par ablation direct de l'or avec le laser (voir Annexe) ou par lithographie standard. Une fois fabriquée, la résine est remplacée par une solution à 0.9 % de NaCl et un potentiel électrique alternatif carré de 0.1 à 1.5 V_{p-p} est appliqué. L'utilisation d'un champ alternatif permet d'augmenter la visualisation du deplacement etant donné que ce dernier est au maximum de 3.2 μm comme présenté dans la figure D.10. Il existe une valeur limite du potentiel appliqué en dessous de laquelle le deplacement ne s'effectue pas. De plus, le deplacement du bras est linéaire pour des fréquences inférieures à 1 Hz, ce qui confirme la relation de proportion entre le deplacement et le module d'Young du polymère comme suggeré par [Kwon 2008]. Pour des plus hautes fréquences, il est nécessaire d'appliquer un potentiel plus important ($> 1V_{p-p}$) pour obtenir un deplacement linéaire. Le deplacement micrometrique du bras montre la possibilité de manipuler des colloides hétérogene par l'application de champs alternatif à basse frequences.

D.4 Ablation d'ITO par lithographie 2 photons

Il a été aussi possible d'effectuer une ablation locale de couche mince par le dispositif de lithographie à 2 photos. Ainsi, dans les conditions de focalisation maximales (objectif x100 en immersion avec de l'huile), nous avons réalisé une ablation locale de 150 nm d'ITO comme le montre la figure D.11.



(a) (b)

Figure D.10 – Mesure du déplacement du bras déporté dans la structure héterogène cubique 3D.

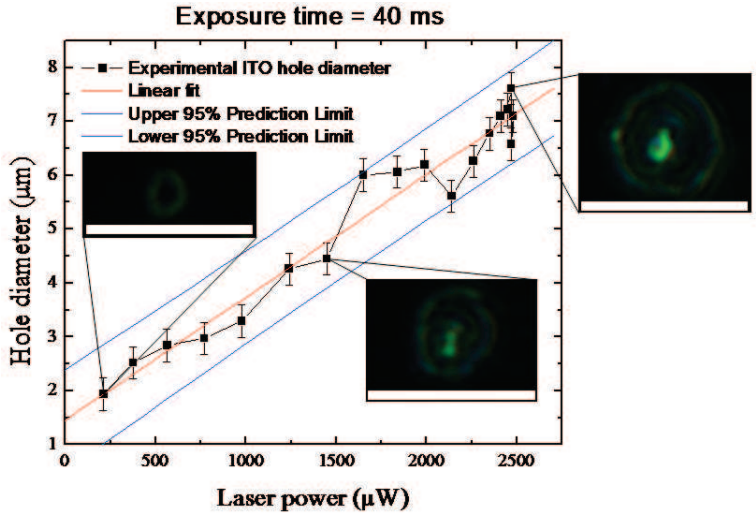


Figure D.11 – Ablation de structure ITO par lithographie 2 photons

Bibliographie

[Aldaeus 2005] F. Aldaeus, Y. Lin, J. Roeraade et G. Amberg. *Superpositioned dielectrophoresis for enhanced trapping efficiency.* Electrophoresis, vol. 26, no. 22, pages 4252–4259, 2005. 29, 31, 156, 157

[Arai 2006] F. Arai, T. Enod, R Yamuchi, et T. Fukuda. *3d 6dof manipulation of micro-object using laser trapped microtool.* In Proc. of the 2006 IEEE International Conference on Robotics and Automation, pages 1390 – 1395, 2006. 14

[Arai 2009] Fumihito Arai, Kazuhisa Onda, Ryo Iitsuka et Hisataka Maruyama. *Multi-beam laser micromanipulation of microtool by integrated optical tweezers.* In Proceedings of the 2009 IEEE international conference on Robotics and Automation, ICRA'09, pages 2779–2784, Piscataway, NJ, USA, 2009. IEEE Press. 14

[Arnold 2007] W. M. Arnold. *Particle Patterning Using Fluidics and Electric Field.* Industrial Research Limited, vol. 26, pages 2 – 5, 2007. 115

[Ashkin 1970] A. Ashkin. *Acceleration and Trapping of Particles by Radiation Pressure.* Phys. Rev. Lett., vol. 24, no. 4, pages 156–159, Jan 1970. 13

[Ashkin 1986] A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm et Steven Chu. *Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles.* Opt. Lett., vol. 11, no. 5, pages 288–290, May 1986. 13

[Ashkin 1997] Arthur Ashkin. *Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 94, no. 10, pages 4853–4860, 1997. 14

[Atten 1969] Pierre Atten. *Les forces en electrohydrodynamique.* PhD thesis, Université Joseph-Fourier - Grenoble I, 1969. 19

[Auerswald 2003] J. Auerswald et H.F. Knapp. *Quantitative assessment of dielectrophoresis as a micro fluidic retention and separation technique for beads and human blood erythrocytes.* Microelectron. Eng., vol. 67-68, pages 879–886, 2003. 29

[Bartolo 2007] D. Bartolo, G. Degre, P. Ngheb et V. Studer. *Microfluidic stickers.* Anal. Chem., vol. 2008, pages 13 – 15, 2007. 36, 184

[Bazant 2004] M. Z. Bazant et T. M. Squires. *Induced-Charge Electrokinetic Phenomena : Theory and Microfluidic Applications.* Phys. Rev. Lett., vol. 92, no. 6, page 066101, February 2004. 23

[Becker 1995] F.F. Becker, X.-B. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal et P.R.C. Gascoyne. *Separation of human breast cancer cells from blood by differential dielectric affinity.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 92, no. 3, pages 860–864, 1995. 29

[Besseling 2009] Rut Besseling, Lucio Isa, Eric R. Weeks et Wilson C.K. Poon. *Quantitative imaging of colloidal flows.* Adv. Colloid Interface Sci., vol. 146, no. 1-2, pages 1 – 17, 2009. 60

[Birukov 2002] Konstantin G. Birukov, Anna A. Birukova, Steven M. Dudek, Alexander D. Verin, Michael T. Crow, Xi Zhan, Natacha DePaola et Joe G. N. Garcia. *Shear Stress-Mediated Cytoskeletal Remodeling and Cortactin Translocation in Pulmonary Endothelial Cells.* Am. J. Respir. Cell Mol. Biol., vol. 26, no. 4, pages 453–464, 2002. 169

[Casagrande 1988] C. Casagrande et M. Veyssié. C.R. Acad. Sci. (Paris), vol. 306 II, page 1423, 1988. 7, 8

[Castellarnau 2006] M. Castellarnau, A. Errachid, C. Madrid, A. Ju·rez et J. Samitier. *Dielectrophoresis as a Tool to Characterize and Differentiate Isogenic Mutants of Escherichia coli.* Biophys. J., vol. 91, no. 10, pages 3937–3945, Novembre 2006. 155

[Cen 2004] E.G. Cen, C. Dalton, Y. Li, S. Adamia, L.M. Pilarski et K.V.I.S. Kaler. *A combined dielectrophoresis, traveling wave dielectrophoresis and electrorotation microchip for the manipulation and characterization of human malignant cells.* Journal of Microbiological Methods, vol. 58, no. 3, pages 387–401, 2004. 155

[Chaffer 011] Christine L. Chaffer et Robert A. Weinberg. *A Perspective on Cancer Cell Metastasis.* SCIENCE, vol. 331, no. 6024, pages 1559–1564, MAR 25 2011. 148

[Chapin 2006] Stephen C. Chapin, Vincent Germain et Eric R. Dufresne. *Automated trapping, assembly, and sorting with holographic optical tweezers.* Opt. Express, vol. 14, no. 26, pages 13095–13100, Dec 2006. 14

[Chen 2009] J.-L. Chen, W.-H. Shih et W.-H. Hsieh. *Three-dimensional non-linear AC electroosmotic flow induced by a face-to-face, asymmetric pair of planar electrodes.* Microfluid Nanofluid, 2009. 22

[Chetouani 2007] H. L. Chetouani. *Microsystemes et micromanipulation a levitation diamagnetique conception, realisation et application a la microfluidique.* phd thesis, 2007. 17

[Chithrani 2006] B. Devika Chithrani, Arezou A. Ghazani et Warren C. W. Chan. *Determining the Size and Shape Dependence of Gold Nanoparticle Uptake into Mammalian Cells.* Nano Letters, vol. 6, no. 4, pages 662–668, 2006. 161

[Chithrani 2007] B. Devika Chithrani et Warren C. W. Chan. *Elucidating the Mechanism of Cellular Uptake and Removal of Protein-Coated Gold Nanoparticles of Different Sizes and Shapes.* Nano Letters, vol. 7, no. 6, pages 1542–1550, 2007. 160

[Cho 2009] Y.-K. Cho, S. Kim, K. Lee, C. Park, J.-G. Lee et C. Ko. *Bacteria concentration using a membrane type insulator-based dielectrophoresis in a plastic chip.* Electrophoresis, vol. 30, no. 18, pages 3153–3159, 2009. 161

[Choi 2003] J. Choi, Y. Zhao, D. Zhang, S. Chien et Y.-H. Lo. *Patterned Fluorescent Particles as Nanoprobes for the Investigation of Molecular Interactions.* Nano Lett., vol. 14, no. 8, page 2003, 2003. 70

[Choi 2008] W. Choi, J.-S. Kim, D.-H. Lee, K.-K. Lee, D.-B. Koo et J.-K. Park. *Dielectrophoretic oocyte selection chip for in vitro fertilization.* Biomedical Microdevices, vol. 10, no. 3, pages 337–345, 2008. 29

[Choi 2009] E. Choi, B. Kim et J. Park. *High-throughput microparticle separation using gradient traveling wave dielectrophoresis.* Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 19, no. 12, pages –, 2009. 30

[Conner 2003] Sean D. Conner et Sandra L. Schmid. *Regulated portals of entry into the cell.* Nature, vol. 422, no. 6927, pages 37–44, Mars 2003. 149

[Crews 2007] N. Crews, J. Darabi, P. Voglewede, F. Guo et A. Bayoumi. *An analysis of interdigitated electrode geometry for dielectrophoretic particle transport in micro-fluidics.* Sens. Actuators, B, vol. 125, no. 2, pages 672–679, 2007. 29

[Cui 2009a] H.-H. Cui et K.-M. Lim. *Pillar array microtraps with negative dielectrophoresis.* Langmuir, vol. 25, no. 6, pages 3336–3339, 2009. 30

[Cui 2009b] Hai-Hang Cui, Joel Voldman, Xue-Fei He et Kian-Meng Lim. *Separation of particles by pulsed dielectrophoresis.* Lab Chip, vol. 9, no. 16, pages 2306–2312, 2009. 16, 30, 138

[Davis 008] Mark E. Davis, Zhuo (Georgia) Chen et Dong M. Shin. *Nanoparticle therapeutics : an emerging treatment modality for cancer.* NATURE REVIEWS DRUG DISCOVERY, vol. 7, no. 9, pages 771–782, SEP 2008. 148

[Davis 009] Mark E. Davis. *The First Targeted Delivery of siRNA in Humans via a Self-Assembling, Cyclodextrin Polymer-Based Nanoparticle : From Concept to Clinic.* MOLECULAR PHARMACEUTICS, vol. 6, no. 3, pages 659–668, MAY-JUN 2009. 148

[de Gennes 1992] P. G. de Gennes. *Soft matter.* Rev. Mod. Phys., vol. 64, no. 3, pages 645–648, Jul 1992. 7

[de Gennes 1998] P.-G. de Gennes. *Nanoparticles and Dendrimers : Hopes and Illusions.* Croat. Chem. Acta, vol. 71, no. 4, page 833, 1998. 6

[Decuzzi 010] P. Decuzzi, B. Godin, T. Tanaka, S. Y. Lee, C. Chiappini, X. Liu et M. Ferrari. *Size and shape effects in the biodistribution of intravascularly injected particles.* JOURNAL OF CONTROLLED RELEASE, vol. 141, no. 3, Sp. Iss. SI, pages 320–327, FEB 15 2010. 148

[Dionnet 2005] F. Dionnet. *Télémicromanipulation par adhésion.* PhD thesis, Université Pierre et Marie Curie, 2005. 10

[Dittrich 2006] Petra S. Dittrich et Andreas Manz. *Lab-on-a-chip : microfluidics in drug discovery.* Nat Rev Drug Discov, vol. 5, no. 3, pages 210–218, Mars 2006. 11, 12

[Doh 2005] I. Doh et Y.-H. Cho. *A continuous cell separation chip using hydrodynamic dielectrophoresis (DEP) process.* Sens. Actuators, A, vol. 121, no. 1, pages 59–65, 2005. 30

[Doshi 2009] Nishit Doshi et Samir Mitragotri. *Designer Biomaterials for Nanomedicine.* Advanced Functional Materials, vol. 19, no. 24, pages 3843–3854, 2009. 148

[Du 2008] E. Du et S. Manoochehri. *Electrohydrodynamic-mediated dielectrophoretic separation and transport based on asymmetric electrode pairs.* Electrophoresis, vol. 29, no. 24, pages 5017–5025, 2008. 30

[Dufresne 1998] Eric R. Dufresne et David G. Grier. *Optical tweezer arrays and optical substrates created with diffractive optics.* Rev. Sci. Instrum., vol. 69, no. 5, pages 1974–1977, 1998. 14

[Dürr 2003] M. Dürr, J. Kentsch, T. Müller, T. Schnelle et M. Stelzle. *Microdevices for manipulation and accumulation of micro- and nanoparticles by dielectrophoresis.* Electrophoresis, vol. 24, pages 722 – 731, 2003. 29, 31, 36, 43

[Emiliani 2004] Valentina Emiliani, Daniele Sanvitto, Morad Zahid, Fabien Gerbal et Maite Coppey-Moisan. *Multi force optical tweezers to generate gradients of forces.* Opt. Express, vol. 12, no. 17, pages 3906–3910, Aug 2004. 13, 14

[Falokun 2007] C.D. Falokun et G.H. Markx. *Electrorotation of beads of immobilized cells.* Journal of Electrostatics, vol. 65, no. 7, pages 475–482, 2007. 155

[Ferrari 2005] E. Ferrari, V. Emiliani, D. Cojoc, V. Garbin, M. Zahid, C. Durieux, M. Coppey-Moisan et E. Di Fabrizio. *Biological samples micro-manipulation by means of optical tweezers*. Microelectron. Eng., vol. 78-79, pages 575 – 581, 2005. Proceedings of the 30th International Conference on Micro- and Nano-Engineering. 13, 14

[Fiedler 1998] Stefan Fiedler, Stephen G. Shirley, Thomas Schnelle et GÃ$\frac{1}{4}$nter Fuhr. *Dielectrophoretic Sorting of Particles and Cells in a Microsystem*. Anal. Chem., vol. 70, no. 9, pages 1909–1915, Mai 1998. 16, 32, 124

[Friend 2010] J. Friend et L. Yeo. *Fabrication of microfluidic devices using polydimethylsiloxane*. BIOMICROFLUIDICS, vol. 4, page 026502, 2010. 182

[Fujimoto 1999] Keiji Fujimoto, Kazumichi Nakahama, Miwako Shidara et Haruma Kawaguchi. *Preparation of Unsymmetrical Microspheres at the Interfaces*. Langmuir, vol. 15, no. 13, pages 4630–4635, 1999. 7

[Furlani 2007] E P Furlani. *Magnetophoretic separation of blood cells at the microscale*. J. Phys. D : Appl. Phys., vol. 40, no. 5, page 1313, 2007. 11, 12

[Gangwal 2008a] S. Gangwal, O. J. Cayre, M. Z. Bazant et O. D. Velev. *Induced-charge electrophoresis of metallodielectric particles*. Phys. Rev. Lett., vol. 100, no. 5, page 058302, 2008. 23, 24

[Gangwal 2008b] S. Gangwal, O. J. Cayre et O. D. Velev. *Dielectrophoretic assembly of metallodielectric Janus particles in AC electric fields*. Langmuir : the ACS journal of surfaces and colloids, vol. 24, no. 23, pages 13312 – 13320, 2008. 23

[Garra 2001] J. Garra, T. Long, J. Currie, T. Schneider, R. White et M. Paranjape. *Dry etching of polydimethylsiloxane for microfluidic systems*. J. Vac. Sci. Technol., A, vol. 1, 2001. 36

[Gascoyne 1997] P.R.C. Gascoyne, X.-B. Wang, Y. Huang et R.F. Becker. *Dielectrophoretic separation of cancer cells from blood*. IEEE T. Ind. Appl., vol. 33, no. 3, pages 670–678, 1997. 29

[Gascoyne 2004] P.R.C. Gascoyne et J.V. Vykoukal. *Dielectrophoresis-based sample handling in general-purpose programmable diagnostic instruments*. Proceedings of the IEEE, vol. 92, no. 1, pages 22–42, 2004. 29, 155

[Gascoyne 2009] P.R.C. Gascoyne, J. Noshari, T.J. Anderson et F.F. Becker. *Isolation of rare cells from cell mixtures by dielectrophoresis*. Electrophoresis, vol. 30, no. 8, pages 1388–1398, 2009. 30

[Gierhart 2007] B. C. Gierhart, D. G. Howitt, S. J. Chen, R. L. Smith et S. D. Collins. *Frequency Dependence of Gold Nanoparticle Superassembly by Dielectrophoresis*. J. Vac. Sci. Technol., B, vol. 23, pages 12450 – 12456, 2007. 85

[Gleason 2003] N. J. Gleason, C. J. Nodes, E. M. Higham, N. Guckert, I. A. Aksay, J. E. Schwarzbauer et J. D. Carbeck. *Patterning Proteins and Cells Using Two-Dimensional Arrays of Colloids*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, vol. 19, pages 513 – 518, 2003. 71, 149

[Goia 1999] Dan V. Goia et Egon Matijevic. *Tailoring the particle size of monodispersed colloidal gold*. Colloids and Surfaces A : Physicochemical and Engineering Aspects, vol. 146, no. 1-3, pages 139 – 152, 1999. 6

[González 2000] A. González, A. Ramos, N. G. Green, A. Castellanos et H. Morgan. *Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. II. A linear double-layer analysis.* Phys. Rev. E, vol. 61, no. 4, pages 4019–4028, Apr 2000. 21

[Gonzalez 2005] C. F. Gonzalez et V. T. Remcho. *Harnessing dielectric forces for separations of cells, fine particles and macromolecules.* J. Chromatogr. A, vol. 1079, pages 59 – 68, 2005. 32

[Göppert-Mayer 1931] M. Göppert-Mayer. Annalen der Physik, vol. 9, page 273, 1931. 207

[Gray 2004] Darren S. Gray, John L. Tan, Joel Voldman et Christopher S. Chen. *Dielectrophoretic registration of living cells to a microelectrode array.* Biosensors and Bioelectronics, vol. 19, no. 7, pages 771 – 780, 2004. 29

[Green 1999] N. G. Green et H. Morgan. *Dielectrophoresis of Submicrometer Latex Spheres. 1. Experimental Results.* J. Phys. Chem. B, vol. 103, pages 41 – 50, 1999. 32, 80, 81, 86, 154

[Green 2000] N. G. Green, A. Ramos, A. González, H. Morgan et A. Castellanos. *Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. I. Experimental measurements.* Phys. Rev. E, vol. 61, no. 4, pages 4011–4018, Apr 2000. 21

[Green 2002] N. G. Green, A. Ramos, A. González, H. Morgan et A. Castellanos. *Fluid flow induced by nonuniform ac electric fields in electrolytes on microelectrodes. III. Observation of streamlines and numerical simulation.* Phys. Rev. E, vol. 66, no. 2, page 026305, Aug 2002. 21

[Grier 2006] David G. Grier et Yael Roichman. *Holographic optical trapping.* Appl. Opt., vol. 45, no. 5, pages 880–887, Feb 2006. 14

[Grom 2006] F. Grom, J. Kentsch, T. Müller, T. Schnelle et M. Stelzle. *Accumulaion and trapping of hepatitis A virus particles by electrohydrodynamic flow and dielectrophoresis.* Electrophoresis, vol. 27, no. 7, pages 1386–1393, 2006. 29, 30

[Heath 008] James R. Heath et Mark E. Davis. *Nanotechnology and cancer.* ANNUAL REVIEW OF MEDICINE, vol. 59, pages 251–265, 2008. 148

[Heida 2001] T. Heida, W.L.C. Rutten et E. Marani. *Dielectrophoretic trapping of dissociated fetal cortical rat neurons.* Biomedical Engineering, IEEE Transactions on, vol. 48, no. 8, pages 921 –930, aug. 2001. 155

[Hichem 2006] CHETOUANI Hichem, JEANDEY Christian, HAGUET Vincent, ROSTAING Hervé, DIEPPEDALE Christel et REYNE Gilbert. *Diamagnetic levitation with permanent magnets for contactless guiding and trapping of microdroplets and particles in air and liquids.* IEEE T. Magn., vol. 42-10, no. 10, page 3557, 2006. Anglais. 12, 17

[Hillaireau 2009] Hervé Hillaireau et Patrick Couvreur. *Nanocarriers' entry into the cell : relevance to drug delivery.* Cellular and Molecular Life Sciences, vol. 66, pages 2873–2896, 2009. 10.1007/s00018-009-0053-z. 163

[Ho 2006] Chen-Ta Ho, Ruei-Zeng Lin, Wen-Yu Chang, Hwan-You Chang et Cheng-Hsien Liu. *Rapid heterogeneous liver-cell on-chip patterning via the enhanced field-induced dielectrophoresis trap.* Lab Chip, vol. 6, no. 6, pages 724–734, 2006. 152

[Holmes 2005] D. Holmes, M. E. Sandison, N. G. Green et H. Morgan. *On-chip high-speed sorting of micron-sized particles for high-throughput analysis.* IEEE Proc.-Nanobiotechnology, vol. 11, no. 20050008, pages 5 – 10, 2005. 32, 33

[Holmes 2006] D. Holmes, H. Morgan et N. G. Green. *High throughput particle analysis : Combining dielectrophoretic particle focussing with confocal optical detection.* Biosens. Bioelectron., vol. 21, pages 1621 – 1630, 2006. 124

[Honegger 2009] T. Honegger, K. Berton, T. Pinedo-Rivera et D. Peyrade. *Design and realization of a microfluidic system for dielectrophoretic colloidal handling.* Microelectron. Eng., vol. 86, no. 4-6, pages 1401–1403, 2009. 36, 37

[Honegger 2010a] T. Honegger, K. Berton, O. Lecarme, L. Latu-Romain et D. Peyrade. *Transparent multilevel aligned electrode microfluidic chip for dielectrophoretic colloidal handling.* Micro and Nanosystems, vol. 2, pages 239–248, 2010. 45, 47, 48, 49

[Honegger 2010b] T. Honegger, O. Lecarme, K. Berton et D. Peyrade. *4-D dielectrophoretic handling of Janus particles in a microfluidic chip.* Microelectron. Eng., vol. 87, no. 5-8, pages 756–759, 2010. 43, 66, 69

[Honegger 2010c] T. Honegger, O. Lecarme, K. Berton et D. Peyrade. *Rotation speed control of Janus particles by dielectrophoresis in a microfluidic channel.* J. Vac. Sci. Technol. B, vol. 28, no. 6, pages C6I14–C6I19, 2010. 67

[Honegger 2011a] T. Honegger, K. Berton, E. Picard et D. Peyrade. *Determination of Clausius–Mossotti factors and surface capacitances for colloidal particles.* Appl. Phys. Lett., vol. 98, no. 18, page 181906, 2011. 83, 86, 87, 88

[Honegger 2011b] T. Honegger, T. Elmberg, K. Berton et D. Peyrade. *Visible microlaser two-photon polymerization in a microfludic cell : A resist study.* Microelectronic Engineering, vol. 88, no. 8, pages 2725 – 2728, 2011. 208, 209, 210, 213

[Honegger 2011c] T. Honegger et D. Peyrade. *AC electrokinetics for dielectrophoresis of functionalized colloids.* submitted to NanoLetters, 2011. 89, 90, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 100

[Honegger 2011d] T. Honegger et D. Peyrade. *Comprehensive analysis of particle motion under 3D non-uniform AC electric fields in a microchannel.* submitted to Lab. Chip, 2011. 104

[Honegger 2011e] T. Honegger et E. Picard. *Dispositif de maintien par capillarité d'un élément comportant au moins une face plane*, 2011. 42

[Honegger 2011f] T. Honegger, S. Sarla, O. Lecarme, K. Berton, A. Nicolas et D. Peyrade. *Selective grafting of proteins on Janus particles : Adsorption and covalent coupling strategies.* Microelectronic Engineering, vol. 88, no. 8, pages 1852 – 1855, 2011. 73, 74, 75, 77

[Hu 2005] X. Hu, P.H. Bessette, J. Qian, C.D. Meinhart, P.S. Daugherty et H.T. Soh. *Marker-specific sorting of rare cells using dielectrophoresis.* Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., vol. 102, no. 44, pages 15757–15761, 2005. 29, 30

[Huang 1997] Y. Huang, X.B. Wang, F.F. Becker et P.R. Gascoyne. *Introducing dielectrophoresis as a new force field for field-flow fractionation.* Biophys. J., vol. 73, no. 2, pages 1118–1129, Août 1997. 155

[Hughes 1997] M.P. Hughes, H. Morgan et F.J. Rixon. *Dielectrophoretic characterisation and separation of herpes simplex virus particles.* Biophys. J., vol. 72, no. 2, pages MP447–MP447, 1997. 29

[Hughes 1999] Michael P. Hughes, Hywel Morgan et Mary F. Flynn. *The Dielectrophoretic Behavior of Submicron Latex Spheres : Influence of Surface Conductance.* J. Colloid Interface Sci., vol. 220, no. 2, pages 454 – 457, 1999. 80, 86

[Hughes 2002] Michael Pycraft Hughes et Nicolas Gavin Green. *The Influence of Stern Layer Conductance on the Dielectrophoretic Behavior of Latex Nanospheres.* Journal of Colloid and Interface Science, vol. 250, no. 1, pages 266–268, Juin 2002. 80

[Hunt 2004] T. P. Hunt, H. Lee et R. M. Westervelt. *Addressable micropost array for the dielectrophoretic manipulation of particles in fluid.* Appl. Phys. Lett., vol. 85, no. 26, pages 1 – 5, 2004. 29

[Hunt 2008] T. P. Hunt, D. Issadoreb et R. M. Westervel. *Integrated circuit/microfluidic chip to programmably trap and move cells and droplets with dielectrophoresis.* Lab on chip, vol. 8, pages 81–89, 2008. 16

[ichi Ogawara 1999] Ken ichi Ogawara, Minoru Yoshida, Yoshinobu Takakura, Mitsuru Hashida, Kazutaka Higaki et Toshikiro Kimura. *Interaction of polystyrene microspheres with liver cells : roles of membrane receptors and serum proteins.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects, vol. 1472, no. 1-2, pages 165 – 172, 1999. 163

[Iliescu 2006] C. Iliescu, L. Yu, G. Xu et F. E. H. Tay. *A Dielectrophoretic Chip With a 3-D Electric Field Gradient.* IEEE/ASME Journal of Microelectromechanical Systems, vol. 20, no. 6, page 2006, 2006. 29, 36

[Irimajiri 1979] Akihiko Irimajiri, Tetsuya Hanai et Akira Inouye. *A dielectric theory of multistratified shell model with its application to a lymphoma cell.* Journal of Theoretical Biology, vol. 78, no. 2, pages 251 – 269, 1979. 155

[Ishikawa 1988] Tatsuo Ishikawa et Egon Matijevic. *Preparation and properties of uniform colloidal metal phosphates , : III. Cobalt(II) Phosphate.* J. Colloid Interface Sci., vol. 123, no. 1, pages 122 – 128, 1988. 6

[Jo 2000] B.-H. Jo, L. M. Van Lerberghe, K. M. Motsegood et D. J. Beebe. *Three-Dimensional Micro-Channel Fabrication in Polydimethylsiloxane (PDMS) Elastomer.* IEEE/ASME Journal of Microelectromechanical Systems, vol. 9, no. 1, pages 02010 – 02012, 2000. 184

[Kaiser 1961] W. Kaiser et C. G. B. Garrett. *Two-Photon Excitation in* $CaF_2 : Eu^{2+}$. Phys. Rev. Lett., vol. 7, no. 6, pages 229–231, Sep 1961. 207

[Kaler 1990] K.V. Kaler et T.B. Jones. *Dielectrophoretic spectra of single cells determined by feedback-controlled levitation.* Biophys. J., vol. 57, no. 2, pages 173–182, Février 1990. 155

[KHARBOUTLY 2011] Mohamed KHARBOUTLY. *Modélisation, réalisation et commande d'un système de micro-manipulation sans contact par diélectrophorèse.* PhD thesis, UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTE, 2011. 13

[Khoshmanesh 2009] K. Khoshmanesh, C. Zhang, F.J. Tovar-Lopez, S. Nahavandi, S. Baratchi, K. Kalantar-Zadeh et A. Mitchell. *Dielectrophoretic manipulation and separation of microparticles using curved microelectrodes.* Electrophoresis, vol. 30, no. 21, pages 3707–3717, 2009. 29

[Khoshmanesh 2010] K. Khoshmanesh, C. Zhang, F.J. Tovar-Lopez, S. Nahavandi, S. Baratchi, A. Mitchell et K. Kalantar-Zadeh. *Dielectrophoretic-activated cell sorter based on curved microelectrodes.* Microfluidics and Nanofluidics, vol. 9, no. 2-3, pages 411–426, 2010. 29

[Kim 2008] U. Kim, J. Qian, S.A. Kenrick, P.S. Daugherty et H.T. Soh. *Multitarget dielectrophoresis activated cell sorter.* Anal. Chem., vol. 80, no. 22, pages 8656–8661, 2008. 29

[König 1996] Karsten König, Yona Tadir, Pasqualle Patrizio, Michael W. Berns et Bruce J. Tromberg. *Andrology : Effects of ultraviolet exposure and near infrared laser tweezers on human spermatozoa.* Human Reproduction, vol. 11, no. 10, pages 2162–2164, 1996. 14

[Krishnan 2008] R. Krishnan, B.D. Sullivan, R.L. Mifflin, S.C. Esener et M.J. Heller. *Alternating current electrokinetic separation and detection of DNA nanoparticles in high-conductance solutions.* Electrophoresis, vol. 29, no. 9, pages 1765–1774, 2008. 29

[Kua 2007] C. H. Kua, Y. C. Lam, I. Rodriguez, C. Yang et K. Youcef-Toumi. *Dynamic cell fractionation and transportation using moving dielectrophoresis.* Anal. Chem., vol. 79, no. 18, pages 6975 – 6987, 2007. 30, 32, 141

[Kua 2008] C. H. Kua, Y. C. Lam, I. Rodriguez, C. Yang et K. Youcef-Toumi. *Cell Motion Model for Moving Dielectrophoresis.* Anal. Chem., vol. 80, no. 14, pages 5454 – 5461, 2008. 30, 32

[Kumemura 2011] Momoko Kumemura, Dominique Collard, Naoyoshi Sakaki, Christophe Yamahata, Maho Hosogi, Gen Hashiguchi et Hiroyuki Fujita. *Single-DNA-molecule trapping with silicon nanotweezers using pulsed dielectrophoresis.* Journal of Micromechanics and Microengineering, vol. 21, no. 5, page 054020, 2011. 138

[Kwon 2008] G. H. Kwon, J. Y. Park, J. Y. Kim, M. L. Frisk, D. J. Beebe et S.-H. Lee. *Smart minibots.* Small, vol. 10, no. 12, pages 15 – 19, 2008. 208, 213

[LaMer 1950] V. K. LaMer et R. H. Dinegar. J. Am. Chem. Soc., vol. 72, pages 4847–4854, 1950. 6

[Lan 2010] K.-C. Lan et L.-S. Jang. *Integration of single-cell trapping and impedance measurement utilizing microwell electrodes.* Biosens. Bioelectron., page 7, 2010. 32

[Laure 2009] SAIAS Laure, SALIBA Antoine-Emmanuel, VIOVY Jean-Louis, PIERGA Jean-Yves, VIELH Philippe et FARACE Francoise. *Microfluidic magnetic cell sorting system for cancer diagnosis.* Houille blanche, vol. 5, no. 5, page 105, 2009. Francais. 12

[Lecarme 2010] O. Lecarme, T. Pinedo Rivera, L. Arbez, T. Honegger, K. Berton et D. Peyrade. *Colloidal optical waveguides with integrated local light sources built by capillary force assembly.* J. Vac. Sci. Technol. B, vol. 28, no. 6, pages C6O11–C6O15, 2010. 66

[Lee 009a] Sei-Young Lee, Mauro Ferrari et Paolo Decuzzi. *Design of bio-mimetic particles with enhanced vascular interaction.* JOURNAL OF BIOMECHANICS, vol. 42, no. 12, pages 1885–1890, AUG 25 2009. 148

[Lee 009b] Sei-Young Lee, Mauro Ferrari et Paolo Decuzzi. *Shaping nano-/micro-particles for enhanced vascular interaction in laminar flows.* NANOTECHNOLOGY, vol. 20, no. 49, DEC 9 2009. 148

[Lee 2005] Philip J. Lee, Paul J. Hung, Robin Shaw, Lily Jan et Luke P. Lee. *Microfluidic application-specific integrated device for monitoring direct cell-cell communication via gap junctions between individual cell pairs.* Appl. Phys. Lett., vol. 86, no. 22, page 223902, 2005. 11, 12

[Li 2002] H. Li et R. Bashir. *Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of Listeria on microfabricated devices with interdigitated electrodes.* Sens. Actuators, B, vol. 86, no. 2-3, pages 215–221, 2002. 29

[Li 2003] S. Li et S. Chen. *Polydimethylsioxane Fluidic Interconnects for Microfluidic Systems.* IEEE Trans. Adv. Pack., vol. 1, no. 3, page 2003, 2003. 184

[Lisensky 1999] George C. Lisensky, Dean J. Campbell, Katie J. Beckman, Camilo E. Calderon, Patrick W. Doolan, Rebecca M. Ottosen et Arthur B. Ellis. *Replication and Compression of Surface Structures with Polydimethylsiloxane Elastomer.* J. Chem. Educ., vol. 76, no. 4, page 537, 1999. 181

[Liu 2006] Changchun Liu, Dafu Cui, Haoyuan Cai, Xing Chen et Zhaoxin Geng. *A rigid poly(dimethylsiloxane) sandwich electrophoresis microchip based on thin-casting method.* Electrophoresis, vol. 27, no. 14, pages 2917–2923, 2006. 184

[Liu 2007] H.-B. Liu, H.-Q. Gong, N. Ramalingam, Y. Jiang, C.-C. Dai et K. M. Hui. *Micro air bubble formation and its control during polymerase chain reaction (PCR) in polydimethylsiloxane (PDMS) microreactors.* JOURNAL OF MICROMECHANICS AND MICROENGINEERING, vol. 17, pages 2055 – 2064, 2007. 41

[Loucaides 2011] N.G. Loucaides, A. Ramos et G.E. Georghiou. *Dielectrophoretic and AC electroosmotic trapping of DNA : Numerical simulation incorporating fluid dynamics and steric particle effects.* Journal of Electrostatics, vol. 69, no. 2, pages 111–118, Avril 2011. 105

[Lyklema 1995] J. Lyklema. Fundamentals of interface and colloid science. vol. 2 - solid-liquid interfaces. Academic Press, 1995. 14

[Mailänder 2009] V. Mailänder et K. Landfester. *Interaction of nanoparticles with cells.* Biomacromolecules, vol. 10, no. 9, pages 2379 – 2400, 2009. bio and particles. 1, 71, 148, 149

[Manaresi 2003] N. Manaresi, A. Romani, G. Medoro, L. Altomare, A. Leonardi, M. Tartagni et R. Guerrieri. *A CMOS Chip for Individual Cell Manipulation and Detection.* IEEE J. Solid-St. Circ., vol. 7, no. 12, page 2003, 2003. 33

[Manoharan 2003] Vinothan N. Manoharan, Mark T. Elsesser et David J. Pine. *Dense Packing and Symmetry in Small Clusters of Microspheres.* Science, vol. 301, no. 5632, pages 483–487, Juillet 2003. 7

[Mansuy-Schlick 2006] V. Mansuy-Schlick, R. Delage-Mourroux, M. Jouvenot et W. Boireau. *Strategy of macromolecular grafting onto a gold substrate dedicated to protein-protein interaction measurements.* Biosens. Bioelectron., vol. 21, no. 9, pages 1830 – 1837, 2006. bio. 71

[Martineau 2002] C. Martineau, R. A. mian, C. Andraud, I. Wang, M. Bouriau et P. L. Baldeck. *Efficient initiators for two-photon induced polymerization in the visible range.* Chem. Phys., vol. 362, pages 291 – 295, 2002. 207

[Mata 2005] A. Mata, A. J. Fleischman et S. Roy. *Characterization of Polydimethylsiloxane (PDMS) Properties for Biomedical Micro/Nanosystems.* Biomed. Microdevices, vol. 4, pages 281 – 293, 2005. 181, 183

[Matijevic 1982] Egon Matijevic et Wilhelmy Deborah Murphy. *Preparation and properties of monodispersed spherical colloidal particles of cadmium sulfide.* J. Colloid Interface Sci., vol. 86, no. 2, pages 476 – 484, 1982. 6

[Micheletto 1995] R. Micheletto, H. Fukuda et M. Ohtsu. *A Simple Method for the Production of a Two-Dimensional, Ordered Array of Small Latex Particles.* Langmuir, vol. 11, no. 2, pages 3333 – 3336, 1995. monolayer by inclinaison. 66, 103

[Milne 2007] Graham Milne. *Optical Sorting and Manipulation of Microscopic Particles.* PhD thesis, St. Andrews, 2007. 60, 61

[Miloh 2008a] Touvia Miloh. *Dipolophoresis of nanoparticles.* Phys. Fluids, vol. 20, no. 6, page 063303, 2008. 136

[Miloh 2008b] Touvia Miloh. *A unified theory of dipolophoresis for nanoparticles.* Phys. Fluids, vol. 20, no. 10, page 107105, 2008. 136

[Miloh 2009] Touvia Miloh. *Nonlinear alternating electric field dipolophoresis of spherical nanoparticles.* Phys. Fluids, vol. 21, no. 7, page 072002, 2009. 136

[Mittal 2007] N. Mittal, A. Rosenthal et J. Voldman. *nDEP microwells for single-cell patterning in physiological media.* Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology, vol. 7, no. 9, pages 1146–1153, 2007. 29

[Morgan 1999] H. Morgan, M.P. Hughes et N.G. Green. *Separation of submicron bioparticles by dielectrophoresis.* Biophys. J., vol. 77, no. 1, pages 516–525, 1999. 29

[Morgan 2003a] H. Morgan et N.G. Green. Ac electrokinetics : Colloids and nanoparticles. Research Studies Press, 2003. 22, 25, 154

[Morgan 2003b] H. Morgan, D. Holmes et N. G. Green. *3D focusing of nanoparticles in microfluidic channels.* IEEE Proc.-Nanobiotechnology, vol. 150, no. 20031090, pages 1 – 10, 2003. 124

[Nagao 2008] D. Nagao, R. Kameyama, H. Matsumoto, Y. Kobayashi et M. Konno. *Single- and multi-layered patterns of polystyrene and silica particles assembled with a simple dip-coating.* Colloids Surf., A, vol. 317, pages 722 – 729, 2008. 66

[Ng 2002] Jessamine M. K. Ng, Irina Gitlin, Abraham D. Stroock et George M. Whitesides. *Components for integrated poly(dimethylsiloxane) microfluidic systems.* Electrophoresis, vol. 23, no. 20, pages 3461–3473, 2002. 181

[Ogi 2007] T. Ogi, L. B. Modesto-Lopez, F. Iskandar et K. Okuyama. *Fabrication of a large area monolayer of silica particles on a sapphire substrate by a spin coating method.* Colloids Surf., A, vol. 297, pages 71 – 78, 2007. 66, 67

[Oh 2009] Jonghyun Oh, Robert Hart, Jorge Capurro et Hongseok Noh. *Comprehensive analysis of particle motion under non-uniform AC electric fields in a microchannel.* Lab Chip, vol. 9, no. 1, pages 62–78, 2009. 16, 22, 26, 115

[Ohta 2007] A. T. Ohta, S., P.-Y. Chiou, T. H. Han, J. C. Liao, U. Bhardwaj, E. R. B. McCabe, F. Yu, R. Sun, M. C. Wu et Fellow. *Dynamic Cell and Microparticle Control via Optoelectronic Tweezers.* IEEE/ASME Journal of Microelectromechanical Systems, vol. 16, no. 3, 2007. 13

[Osaki 2006] T. Osaki, L. Renner, M. Herklotz et C. Werner. *Hydrophobic and electrostatic interactions in the adsorption of fibronectin at maleic acid copolymer films.* J. Phys. Chem. B, vol. 110, no. 24, pages 12119 – 12124, 2006. 92, 94

[Paunov 2004] V.N. Paunov et O. J. Cayre. *Supraparticles and Janus Particles Fabricated by Replication of Particle Monolayers at Liquid Surfaces Using a Gel Trapping Technique.* Advanced Materials, vol. 16, no. 9-10, pages 788–791, 2004. 7

[Pedersen 2006] C. M. Pedersen. *Cell Sorting Using AC Dielectrophoresis.* Master Thesis, 2006. 16

[Perro 2005a] A. Perro, a. S. Reculusa, S. Ravaine, E. Bourgeat-Lamic et E. Duguet. *Design and synthesis of Janus micro- and nanoparticles.* J. Mater. Chem., vol. 15, pages 3745 – 3760, 2005. 7

[Perro 2005b] Adeline Perro, Stephane Reculusa, Franck Pereira, Marie-Helene Delville, Christophe Mingotaud, Etienne Duguet, Elodie Bourgeat-Lami et Serge Ravaine. *Towards large amounts of Janus nanoparticles through a protection-deprotection route.* Chem. Commun., no. 44, pages 5542–5543, 2005. 8

[Pethig 1992] R Pethig, Ying Huang, Xiao bo Wang et J P H Burt. *Positive and negative dielectrophoretic collection of colloidal particles using interdigitated castellated microelectrodes.* J. Phys. D : Appl. Phys., vol. 25, no. 5, page 881, 1992. 29

[Pethig 2003] R. Pethig, M.S. Talary et R.S. Lee. *Enhancing Traveling-Wave Dielectrophoresis with Signal Superposition.* IEEE Eng. Med. Biol., vol. 22, no. 6, pages 43–50, 2003. 30

[Pinedo-Rivera 2009] T. Pinedo-Rivera. *Assemblage convectif de colloïdes par forces de capillarité en milieu confiné : Applications en plasmonique.* PhD thesis, Université Jospeh Fourrier, Grenoble, France, 2009. 1, 8, 9, 10

[Plecis 2007] A. Plecis et Y. Chen. *Fabrication of microfluidic devices based on glass-PDMS-glass technology.* Microelectron. Eng., vol. 84, pages 1265 – 1269, 2007. 36, 183

[Pohl 1950] H.A. Pohl. *The motion and precipitation of suspensoids in divergent electric fields.* Journal of App. Phy., vol. 22, no. 7, page 869, 1950. 14, 91

[Pommer 2008] M.S. Pommer, Y. Zhang, N. Keerthi, D. Chen, J.A. Thomson, C.D. Meinhart et H.T. Soh. *Dielectrophoretic separation of platelets from diluted whole blood in microfluidic channels.* Electrophoresis, vol. 29, no. 6, pages 1213–1218, 2008. 29

[Prevo 2004] B. G. Prevo et O. D. Velev. *Controlled, Rapid Deposition of Structured Coatings from Micro- and Nanoparticle Suspensions.* Appl. Phys. Lett., vol. 20, pages 2099 – 2107, 2004. 66

[Probstein 1994] Ronald F. Probstein. Physicochemical hydrodynamics : An introduction, 2nd edition. John Wiley & Sons, 1994. 19

[Raicu 1996] Valerica Raicu, Georgeta Raicu et Grigore Turcu. *Dielectric properties of yeast cells as simulated by the two-shell model.* Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, vol. 1274, no. 3, pages 143 – 148, 1996. 155

[Ramos 1998] A. Ramos, H. Morgan, N. G. Green et A. Castellanos. *Ac electrokinetics : A review of forces in microelectrode structures.* J. Phys. D : Appl. Phys., vol. 31, pages 2338 – 2353, 1998. 105

[Ramos 1999] A. Ramos, H. Morgan, N. G. Green et A. Castellanos. *The role of electrohydrodynamic forces in the dielectrophoretic manipulation and separation of particles.* Journal of ELECTROSTATICS, vol. 47, pages 71 – 81, 1999. 21, 82

[Ramos 2005] A. Ramos, H. Morgan, N. G. Green, A. Gonzalez et A. Castellanos. *Pumping of liquids with traveling-wave electroosmosis.* J. Appl. Phys., vol. 97, no. 8, page 084906, 2005. 19

[Rivera 2008] T. Pinedo Rivera, O. Lecarme, J. Hartmann, E. Rossitto, K. Berton et D. Peyrade. *Assisted convective-capillary force assembly of gold colloids in a microfluidic cell : Plasmonic properties of deterministic nanostructures.* J. Vac. Sci. Technol. B, vol. 26, no. 6, pages 2513–2519, 2008. 66

[Rosenthal 2005] A. Rosenthal et J. Voldman. *Dielectrophoretic Traps for Single-Particle Patterning.* Biophys. J., vol. 88, pages 2193 – 2205, 2005. 16, 29

[Rusmini 2007] Federica Rusmini, Zhiyuan Zhong et Jan Feijen. *Protein Immobilization Strategies for Protein Biochips.* Biomacromolecules, vol. 8, no. 6, pages 1775–1789, 2007. 71

[Ryter 1980] A. Ryter et R. Hellio. *Electron-microscope study of Dictyostelium discoideum plasma membrane and its modifications during and after phagocytosis.* Journal of Cell Science, vol. 41, no. 1, pages 75–88, 1980. 156

[Sahay 2010] Gaurav Sahay, Daria Y. Alakhova et Alexander V. Kabanov. *Endocytosis of nanomedicines.* Journal of Controlled Release, vol. 145, no. 3, pages 182 – 195, 2010. 164

[Sasaki 1991] Keiji Sasaki, Masanori Koshioka, Hiroaki Misawa, Noboru Kitamura et Hiroshi Masuhara. *Pattern formation and flow control of fine particles by laser-scanning micromanipulation.* Opt. Lett., vol. 16, no. 19, pages 1463–1465, Oct 1991. 14

[Schneider 2009] F. Schneider, J. Draheim, R. Kamberger et U. Wallrabe. *Process and material properties of polydimethylsiloxane (PDMS) for Optical MEMS.* Sens. Actuators, A, vol. 151, pages 95 – 99, 2009. 181

[Senez 2008] V. Senez, E. Lennon, S. Ostrovidov, T. Yamamoto, H. Fujita, Y. Sakai et T. Fujii. *Integrated 3-D silicon electrodes for electrochemical sensing in microfluidic environments : Application to single-cell characterization.* IEEE Sens. J., vol. 8, no. 5-6, pages 548–557, MAY-JUN 2008. 43

[Serda 009] Rita E. Serda, Jianhua Go, Rohan C. Bhavane, XueWu Liu, Ciro Chiappini, Paolo Decuzzi et Mauro Ferrari. *The association of silicon microparticles with endothelial cells in drug delivery to the vasculature.* BIOMATERIALS, vol. 30, no. 13, pages 2440–2448, MAY 2009. 148

[Shepherd 2008] R. F. Shepherd, P. Panda, Z. Bao, K. H. Sandhage, T. A. Hatton, J. A. Lewis et P. S. Doyle. *Stop-Flow Lithography of Colloidal, Glass, and Silicon Microcomponents.* Adv. Mater., vol. 20, pages 4734 – 4739, 2008. 191

[Sjöberg 1987] Bo Sjöberg, Sarolta Pap, Eija Österlund, Kaj Österlund, Matti Vuento et Jorgen Kjems. *Solution structure of human plasma fibronectin using small-angle X-ray and neutron scattering at physiological pH and ionic strength.* Arch. Biochem. Biophys., vol. 255, no. 2, pages 347 – 353, 1987. 71, 91, 92

[Smistrup 2006] Kristian Smistrup, Peter T. Tang, Ole Hansen et Mikkel F. Hansen. *Microelectromagnet for magnetic manipulation in lab-on-a-chip systems.* J. Magn. Magn. Mater., vol. 300, no. 2, pages 418 – 426, 2006. 12

[Smith 1948] W. V. Smith et R. H. Ewart. J. Chem. Phys., vol. 16, page 592, 1948. 6

[Sott 2003] Kristin Sott, Mattias Karlsson, Johan Pihl, Johan Hurtig, Tatsiana Lobovkina et Owe Orwar. *Micropipet Writing Technique for Production of Two-Dimensional Lipid Bilayer Nanotube-Vesicle Networks on Functionalized and Patterned Surfaces.* Langmuir, vol. 19, no. 9, pages 3904–3910, 2003. 71, 74

[SQUIRES 2004] TODD M. SQUIRES et MARTIN Z. BAZANT. *Induced-charge electro-osmosis.* Journal of Fluid Mechanics, vol. 509, pages 217–252, 2004. 23

[SQUIRES 2006] TODD M. SQUIRES et MARTIN Z. BAZANT. *Breaking symmetries in induced-charge electro-osmosis and electrophoresis.* Journal of Fluid Mechanics, vol. 560, pages 65–101, 2006. 23

[Staros 1986] James V. Staros, Rick W. Wright et Deborah M. Swingle. *Enhancement by N-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions.* Anal. Biochem., vol. 156, no. 1, pages 220 – 222, 1986. 73

[Stöber 1968] Werner Stöber, Arthur Fink et Ernst Bohn. *Controlled growth of monodisperse silica spheres in the micron size range.* J. Colloid Interface Sci., vol. 26, no. 1, pages 62 – 69, 1968. 6

[Stossel 2006] Thomas P. Stossel, Gabriel Fenteany et John H. Hartwig. *Cell surface actin remodeling.* Journal of Cell Science, vol. 119, no. 16, pages 3261–3264, 2006. 169

[Sukhorukov 2005] G. Sukhorukov, A. Fery et H. Möhwald. *Intelligent micro- and nanocapsules.* Prog. Polym. Sci., vol. 30, no. 8-9, pages 885 – 897, 2005. Plenary Lectures. 7

[Sun 2003] Hong-Bo Sun, Kenji Takada, Moon-Soo Kim, Kwang-Sup Lee et Satoshi Kawata. *Scaling laws of voxels in two-photon photopolymerization nanofabrication.* Appl. Phys. Lett., vol. 83, no. 6, pages 1104–1106, 2003. 210

[Sun 2008] T. Sun, N. G. Green et H. Morganb. *Analytical solutions for the electric field and dielectrophoretic force in a dielectrophoretic focusing electrode structure.* Appl. Phys. Lett., vol. 92, page 173901, 2008. 124

[Suzuki 2007] Daisuke Suzuki, Sakiko Tsuji et Haruma Kawaguchi. *Janus Microgels Prepared by Surfactant-Free Pickering Emulsion-Based Modification and Their Self-Assembly.* J. Am. Chem. Soc., vol. 129, no. 26, pages 8088–8089, 2007. 8

[Tabeling 2003] Patrick Tabeling. Introduction a la microfluidique. Belin, 2003. 18, 54

[Takayama 2001] S. Takayama, E. Ostuni, X. Qian, J. C. McDonald, X. Jiang, P. LeDuc, M.-H. Wu, D. E. Ingber et G. M. Whitesides. *Topographical Micropatterning of Poly(dimethylsiloxane) Using Laminar Flows of Liquids in Capillaries.* Adv. Mater., vol. 76, no. 8, page 2946, 2001. 36

[Takei 1997] H. Takei et N. Shimizu. *Gradient Sensitive Microscopic Probes Prepared by Gold Evaporation and Chemisorption on Latex Spheres.* J. Vac. Sci. Technol., A, vol. 13, no. 7, page 1553, 1997. fonctionnalisation colloids janus (Au) pour reponse champs electrique continu. 7

[Talary 1996] M S Talary, J P H Burt, J A Tame et R Pethig. *Electromanipulation and separation of cells using travelling electric fields.* J. Phys. D : Appl. Phys., vol. 29, no. 8, page 2198, 1996. 155

[Tan 2007] Wei-Heong Tan et Shoji Takeuchi. *A trap-and-release integrated microfluidic system for dynamic microarray applications.* Proceedings of the National Academy of Sciences, vol. 104, no. 4, pages 1146–1151, 2007. 11, 12

[Tay 2007] Francis E.H. Tay, Liming Yu, Ah Ju Pang et Ciprian Iliescu. *Electrical and thermal characterization of a dielectrophoretic chip with 3D electrodes for cells manipulation.* Electrochimica Acta, vol. 52, no. 8, pages 2862 – 2868, 2007. NANOSCALE ELECTROCHEMICAL MATERIALS SCIENCEFABRICATION, CHARACTERISATION AND APPLICATION - Selection of papers from the 4th ISE Spring MeetingSingapore, 17-20 April 2006. 29, 151

[Thomas 2009] Rupert S. Thomas, Hywel Morgan et Nicolas G. Green. *Negative DEP traps for single cell immobilisation.* Lab Chip, vol. 9, no. 11, pages 1534–1540, 2009. 16, 29

[Tichem 2004] Marcel Tichem, Defeng Lang et Bernhard Karpuschewski. *A classification scheme for quantitative analysis of micro-grip principles.* Assembly Automation, vol. 24-1, pages 88–93, 2004. 10

[Tixier-Mita 2003] Y. Tixier-Mita et H. Fujita. *A simple, robust and controllable nano-structures fabrication technique using standard silicon wafers.* In Transducers, 2003. 11, 12

[Urdaneta 2007] M. Urdaneta et E. Smela. *Multiple frequency dielectrophoresis.* Electrophoresis, vol. 28, no. 2, pages 3145 – 3155, 2007. 30

[Vaia 2004] Richard A. Vaia et H. Daniel Wagner. *Framework for nanocomposites.* Materials Today, vol. 7, no. 11, pages 32–37, Novembre 2004. 6

[Voldman 2001] J. Voldman, R. A. Braff, M. Toner, M. L. Gray et M. A. Schmidt. *Holding Forces of Single-Particle Dielectrophoretic Traps.* Biophys. J., vol. 80, pages 531 – 541, 2001. 31

[Voldman 2003] J. Voldman, M. Toner, M. L. Gray et M. A. Schmidt. *Design and analysis of extruded quadrupolar dielectrophoretic traps.* Journal of Electrostatics, vol. 57, pages 69 – 90, 2003. 16, 29

[Vykoukal 2003] J. Vykoukal, D.M. Vykoukal, S. Sharma, F.F. Becker et P.R.C. Gascoyne. *Dielectrically addressable microspheres engineered using self-assembled monolayers.* Langmuir, vol. 19, no. 6, pages 2425–2433, 2003. 93

[Vykoukal 2008] J. Vykoukal, D.M. Vykoukal, S. Freyberg, E.U. Alt et P.R.C. Gascoyne. *Enrichment of putative stem cells from adipose tissue using dielectrophoretic field-flow fractionation.* Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology, vol. 8, no. 8, pages 1386–1393, 2008. 30

[WALLE 2008] Beatriz Cristina LOPEZ WALLE. *Contribution à l'étude de la micromanipulation robotisée en milieu liquide : conception et modélisation d'un système de micromanipulation immergée par changement de phase.* PhD thesis, UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTE, 2008. 10

[Wang 1997] X.-B. Wang, Y. Huang, X. Wang, F.F. Becker et P.R.C. Gascoyne. *Dielectrophoretic manipulation of cells with spiral electrodes.* Biophys. J., vol. 72, no. 4, pages 1887–1899, 1997. 29

[Wang 1998] X.-B. Wang, J. Vykoukal, F. F. Becker et P. R. C. Gascoyne. *Separation of Polystyrene Microbeads Using Dielectrophoretic/Gravitational Field-Flow-Fractionation.* Biophys. J., vol. 74, no. 5, pages 2689 – 2701, 1998. 30

[Wang 2002] I. Wang, M. Bouriau, P. L. Baldeck, C. Martineau et C. Andraud. *Three-dimensional microfabrication by two-photon-initiatedpolymerizat ion with a low-cost microlaser.* Opt. Lett., vol. 27, no. 15, pages 1 – 9, 2002. 207

[Wang 2005] Y. Wang, W. P. Chen, K. C. Cheng, H. L. W. Chan et C. L. Choy. *Effect of AC-Powered Water Electrolysis on the Structural and Optical Properties of Indium Tin Oxide Thin Films.* J. Am. Ceram. Soc., vol. 17, no. 2, pages 1007 – 1009, 2005. 49

[Wang 2009] L. Wang, J. Lu, S.A. Marchenko, E.S. Monuki, L.A. Flanagan et A.P. Lee. *Dual frequency dielectrophoresis with interdigitated sidewall electrodes for microfluidic flow-through separation of beads and cells.* Electrophoresis, vol. 30, no. 5, pages 782–791, 2009. 30

[Watson 1995] P.K. Watson. *The transport and trapping of electrons in polymers.* Dielectrics and Electrical Insulation, IEEE Transactions on, vol. 2, no. 5, pages 915 –924, oct 1995. 139

[Wei 2009] M.-T. Wei, J. Junio et H. D. Ou-Yang. *Direct measurements of the frequency-dependent dielectrophoresis force.* BIOMICROFLUIDICS, vol. 3, page 012003, 2009. 80, 81, 155

[Whitesides 1983] George M. Whitesides, Romas J. Kazlauskas et Lee Josephson. *Magnetic separations in biotechnology.* Trends in Biotechnology, vol. 1, no. 5, pages 144 – 148, 1983. 157

[Wong 2009] I. Wong et C.-M. Ho. *Surface molecular property modifications for poly(dimethylsiloxane) (PDMS) based microfluidic devices.* Microfluid Nanofluid, 2009. 181, 184

[Wu 2005] H. Wu, B. Huang et R. N. Zare. *Construction of microfluidic chips using polydimethylsiloxane for adhesive bonding.* Lab Chip, vol. 5, pages 1393 – 1398, 2005. 41, 183

[Wu 2010] L. Y. Wu, B. M. Ross, S. Hong et L. P. Lee. *Bioinspired nanocorals with decoupled cellular targeting and sensing functionality.* Small, vol. 6, no. 4, pages 503 – 507, 2010. 71, 149

[Yang 1999] Jun Yang, Ying Huang, Xujing Wang, Xiao-Bo Wang, Frederick F. Becker et Peter R.C. Gascoyne. *Dielectric Properties of Human Leukocyte Subpopulations Determined by Electrorotation as a Cell Separation Criterion.* Biophys. J., vol. 76, no. 6, pages 3307–3314, Juin 1999. 155

[Yang 2006] L. Yang, P.P. Banada, M.R. Chatni, K. Seop Lim, A.K. Bhunia, M. Ladisch et R. Bashir. *A multifunctional micro-fluidic system for dielectrophoretic concentration coupled with immuno-capture of low numbers of Listeria monocytogenes.* Lab on a Chip - Miniaturisation for Chemistry and Biology, vol. 6, no. 7, pages 896–905, 2006. 29

[Yap 2007] F. L. Yap et Y. Zhang. *Protein and cell micropatterning and its integration with micro/nanoparticles assembly.* Biosens. Bioelectron., vol. 22, no. 6, pages 775 – 788, 2007. 71

[Yuan 2004] Y. J. Yuan, M. K. Andrews et B. K. Marlow. *Chaining and dendrite formation of gold particles.* Appl. Phys. Lett., vol. 85, no. 1, pages 7 – 9, 2004. 115

[Zborowski 2003] Maciej Zborowski, Graciela R. Ostera, Lee R. Moore, Sarah Milliron, Jeffrey J. Chalmers et Alan N. Schechter. *Red Blood Cell Magnetophoresis.* Biophys. J., vol. 84, no. 4, pages 2638–2645, Avril 2003. 12

[Zhang 2004] W. Y. Zhang, G. S. Ferguson et S. Tatic-Lucic. *Elastomer-supported cold welding for room temperature wafer-level bonding.* MEMS 2004 Technical Digest, vol. 29, no. 04, pages 25 – 29, 2004. 184

[Zhang 2005] W.-Y. Zhang, J. P. Labukas, S. Tatic-Lucic, L. Larson, T. Bannuru, R. P. Vinci et G. S. Ferguson. *Novel room-temperature first-level packaging process for microscale devices.* Sens. Actuators, A, vol. 2004, pages 741 – 744, 2005. 184

[Zhang 2010] L. Zhang et Y. Zhua. *Dielectrophoresis of Janus particles under high frequency ac-electric fields.* Appl. Phys. Lett., vol. 96, page 141902, 2010. 87, 93, 94, 96, 97

[Zhao 2011] Feng Zhao, Ying Zhao, Ying Liu, Xueling Chang, Chunying Chen et Yuliang Zhao. *Cellular Uptake, Intracellular Trafficking, and Cytotoxicity of Nanomaterials.* Small, vol. 7, no. 10, pages 1322–1337, 2011. 149

[Zhelev 1995] D.V. Zhelev et R.M. Hochmuth. *Mechanically stimulated cytoskeleton rearrangement and cortical contraction in human neutrophils*, Mai 1995. 169

Électrocinétique tridimensionnelle de particules colloïdales en géométrie microfluidique et application à la manipulation de cellules

Résumé : Les propriétés électrocinétiques de cellules ou de complexes colloïde-cellule visant leur manipulation individuelle dans une puce microfluidique devrait permettre de proposer de nouveaux types d'application dans le domaine des laboratoires-sur-puce et de la recherche biomédicale. Les travaux présentés dans ce manuscrit visent à créer une nouvelle technologie de puce microfluidique permettant la manipulation électrocinétique tridimensionnelle sans contact de particules colloïdales. Cette technologie innovante associée à la réalisation de particules colloïdales multifonctionnelles (Janus) permet d'étudier et de contrôler les interactions d'un complexe colloïde-cellule.

Une technologie originale de puce microfluidique tridimensionnelle transparente présentant des niveaux d'électrodes bi-planaires est développée sans couche résiduelle classiquement présente dans les technologies de scellement microfluidique. Parallèlement, de nouveaux types de colloïdes anisotropes (Janus) et multifonctionnels (fluorescents, fonctionnalisés avec des protéines) sont fabriqués en associant la synthèse colloïdale aux techniques de la micro-électronique et à la fonctionnalisation de surface.

La compréhension et l'exploitation des forces électrocinétiques créées par un champ électrique alternatif et non-uniforme sur la solution colloïdale confinée dans cette puce permettent de proposer une nouvelle méthode de détermination du Facteur de Clausius-Mossotti. Ce facteur est un paramètre intrinsèque à la solution colloïdale qui régit la force diélectrophorétique. La détermination expérimentale de ce facteur, combinée à une analyse théorique pour les solutions colloïdales étudiées, définit les paramètres du champ électrique à appliquer (fréquence, tension) pour localiser, séparer ou manipuler en trois dimensions des particules micrométriques de tout type (particules nu, fonctionnalisées, dissymétriques).

Le mélange de ces particules dans des milieux de culture cellulaire contenant des cellules de lignées humaines crée des complexes colloïde-cellule. En fonction du type cellulaire, ces complexes se caractérisent par une cellule ayant internalisée des colloïdes ou une cellule décoré par des colloïdes attachés sur sa membrane. Soumis à des forces électrocinétiques déterminées, ces complexes démontrent des réponses duales des particules et des cellules contrôlables indépendamment. En combinant l'ingénierie des particules colloïdales et la technologie microfluidique de manipulation électrocinétique sans contact, des forces locales peuvent être exercées sur les cellules par l'intermédiaire des particules.

Mots clés : microfluidique, électrocinétique, diélectrophorèse, particules colloïdales, cellules

3D electrokinetics of colloidal particles in microfluidic channels and application to cell handling

Abstract : The electrokinetics properties of cells or a particles-cell complex for their individual handling in a microfluidic chip open the way to new applications for lab-on-chip or biomedical research fields. The work presented in this thesis aims to create a new technology of microfluidic chips able to perform 3D electrokinetic contactless handling of colloidal particles. Combined with the microfabrication of multifunctional (Janus) colloidal particles this technological breakthrough allows the study and the control of colloidal particles and cells.
An innovative technology of a 3D transparent microfluidic chip that integrates two levels of bi-planar electrodes is developed without any residual layer commonly stacked in microfluidic sealing technology. At the same time, a new type of anisotropic particles (Janus) and multifunctional (fluorescence, functionalized with proteins) are microfabricated by combining colloidal synthesis, microelectronics process and surface functionalization techniques.
The understanding and the use of electrokinetic forces that are created by a non-uniform electric field in a colloidal solution confined in this chip enable the access to a new method of determination of the Claussius-Mossotti factor. It is an intrinsic parameter of a colloidal solution that rules the dielectrophoretic force. Its experimental determination, combined with a theoretical analysis of the colloidal solution, defines the parameters of the electric field to apply (frequency, applied voltage) in order to localize, separate or handle in 3D all types of micrometer sized particles (plain, functionalized, dissymmetric).
The mixing of particles in cell culture mediums that contain human lines cells creates a particle-cell complex. According to the cellular type, those complexes are characterized by a cell that has internalized particles or is decorated by particles attached on its membrane. Submitted to determined electrokinetic forces, those complexes show dual responses that are controllable on both particles or cell independently. By associating the engineering of colloidal particles and this electrokinetic contactless handling microfluidic technology, local forces can be exerted on cells via those particles.

Keywords : Microfluidics, electrokinetics, colloids, cells