Microsystème dédié à l'étude de la polarisation diélectrique de micro-particules dans le cadre de formation master recherche : application au micro-positionnement 3D de cellules par force de diélectrophorèse

Rémi Sieskind, Claudia Trainito, Olivier Français, Bruno Le Pioufle
bruno.le-pioufle@satie.ens-cachan.fr
ENS de Cachan, département EEA, 61 avenue du président Wilson, 94230 Cachan
SATIE, CNRS UMR 8029, Institut d'Alembert, ENS Cachan, France

RESUME :

A l'ENS de Cachan, le département E.E.A. a mis en place une série de travaux pratiques portant sur l'utilisation d'un microsystème « électro-fluidique », réalisé en salle blanche, pour le micro-positionnement par champ électrique d'objets inertes ou biologiques de dimension micrométrique. Cet enseignement est développé dans des formations de niveau Master.

Le principe physique, exploité au travers des séances pédagogiques, est la polarisation diélectrique de micro-objets soumis à des topologies de champs électriques induisant sur le dipôle la force de diélectrophorèse. Après avoir vu la théorie s'y rattachant, les étudiants utilisent et mettent en œuvre un microsystème contenant un ensemble de configurations d'électrodes et de motifs pouvant générer le champ électrique. Ils peuvent faire de la capture de micro-objets et du positionnement contrôlé suivant quatre degrés de liberté (translation tridimensionnelle + rotation selon un axe).

Pour cela, ils sont amenés à mettre en place un environnement d'instrumentation comprenant microscope, caméra, générateurs, oscilloscope, et synchroniser l'ensemble sous une interface Homme-Machine type LabVIEW[®]. Ils réalisent des expériences simples où ils contrôlent la position et/ou la rotation de microbilles de polystyrène (10 micromètres) et visualisent en temps réel ces expériences.

La démarche pédagogique mise en œuvre permet d'avoir une approche globale autour d'un microsystème. Les étudiants, de niveau Master, étudient non seulement la physique d'un phénomène à l'échelle du micron, mais participent à la conception et réalisation en micro-technologie d'une puce dédiée. Ils exploitent ensuite en travaux pratiques un environnement complet qui, dans le cadre de M2 recherche en biotechnologie, peut amener à des expériences sur des objets biologiques (cellules, levures, algues,...).

Mots clés : Microtechnologie, Diélectrophorèse, Micropositionnement, Instrumentation.

1. INTRODUCTION

L'enseignement des microtechnologies dans le cadre de formations en sciences appliquées (physique appliquée, EEA, biotechnologies, etc.) nécessite l'introduction d'exemples applicatifs concrets rencontrés dans la littérature scientifique ou dans l'industrie. Les cours sont généralement couplés à des travaux pratiques en salle blanche pour sensibiliser les étudiants aux contraintes et spécificités de l'utilisation de ces technologies de pointe. Les élèves assistent alors à la mise en œuvre des procédés (dépôts de couches minces, photolithographie UV, gravure humide et sèche). Il reste toutefois difficile de leur permettre de manipuler eux-mêmes lors des étapes de microfabrication et de leur faire réaliser leur propre microsystème.

A l'ENS de Cachan, le département EEA a mis en place une série de travaux pratiques portant sur la réalisation en salle blanche et l'utilisation d'un microsystème électrofluidique pour la micromanipulation d'objets inertes ou biologiques par champ électrique. Pour la fabrication du microsystème, on s'appuie sur les techniques de photolithographie, dépôts de couches minces métalliques et de polymères, dont les procédés

ont été vus lors de cours magistraux. Pour l'utilisation du microsystème, les étudiants doivent mettre en place tout un environnement d'instrumentation comprenant microscope, caméra, générateurs, oscilloscope, et l'ensemble est piloté sous un environnement type LabVIEW[®]. Nous avons choisi de construire ces séquences pédagogiques autour d'une application importante des microtechnologies, concernant l'utilisation du champ électrique pour la manipulation de cellules vivantes. Dans le cadre de ces travaux pratiques d'initiation, nous proposons ainsi aux étudiants de micropositionner un objet inerte (une microbille de polystyrène de 3 à 10 micromètres de diamètre) ou biologique (cellule, micro-algue, etc.) dans les trois dimensions. Le principe physique ici illustré est la polarisation diélectrique de microparticules soumises à un champ électrique.

Un microsystème spécifique (comprenant un réseau de micro-électrodes en or et un réseau micro-fluidique en résine photosensible SU8), associé à un packaging simple (connectique électrique) sont le support de plusieurs séries de travaux pratiques qui ont été mis en œuvre auprès d'étudiants. Les élèves ont à leur disposition une plateforme expérimentale leur permettant d'illustrer et de mettre en évidence des phéno-

mènes peu observables aux échelles macroscopiques, mais devenant cruciaux sur un système miniaturisé, du fait des lois d'échelle (forces de diélectrophorèse, forces électrothermiques, etc.).

Ces travaux pratiques ont été mis en œuvre au sein de Master Recherche de l'ENS de Cachan (Monabiphot) et de l'Université Paris Saclay (Nanosciences) sur les aspects fondamentaux du phénomène de polarisation et de manipulation de particules polarisables. Ils ont été étendus dans des formations sur de l'instrumentation (M1 IST et M2 FEPA) autour du pilotage de ce banc expérimental pouvant nécessiter l'utilisation de LabVIEW® et de fonctions Matlab (Cartes dSPACE) pour de la modulation des potentiels appliqués sur le microsystème. Ces enseignements pratiques ont été par ailleurs labélisés et financés par les LABEX LASIPS et NANO Ile de France (projets Bioélectrorotation et Prime).

L'utilisation du microsystème a été simplifiée et permet, au-delà de l'objet, de pouvoir proposer auprès de physiciens, biologistes et/ou électroniciens, des séances de travaux pratiques simples à mettre en place, ou encore de projets d'étude, répondant aux questionnements de chacun en étant adapté à leur niveau de formation. Ces travaux pratiques visent à montrer, par l'usage des microtechnologies, le phénomène physique de polarisation diélectrique de micro-objets par l'utilisation de la force de diélectrophorèse. Cette force est utilisée afin de micro-positionner ces objets dans des zones précises [1]. On l'utilise fréquemment dans le domaine des biopuces à cellules pour faire du tri cellulaire ou de la capture [2] [3]. Selon la configuration du champ électrique, il est aussi possible de faire du positionnement 3D (micro-robotique) [1], ou de l'électrorotation (dans le but d'extraire les caractéristiques diélectriques des micro-objets) [4].

2. POLARISATION D'UN MICRO-OBJET INERTE OU BIOLOGIQUE DANS UN CHAMP ELECTRIQUE NON-UNIFORME

Nous rappelons ici les lois régissant le comportement d'objets soumis à un champ électrique – polarisation, apparition d'une force de diélectrophorèse – et montrons pourquoi aux échelles microscopiques ces phénomènes deviennent prépondérants.

2.1 Polarisabilité et polarisation

Un atome soumis à un champ électrique, subit un déplacement opposé des barycentres de ses charges positives et négatives, menant à un moment dipolaire induit dont la valeur correspond au produit de la polarisabilité de l'atome, caractéristique de ce dernier, et de la valeur du champ. Dans le cas d'une particule neutre, le déplacement des charges électriques volumiques ou de surface sous l'action du champ électrique contribue à cette polarisation.

La polarisabilité de la particule est donc caractérisée par sa permittivité complexe ε_p^* , somme de ces deux contributions :

$$\varepsilon_p^* = \varepsilon_p - j \frac{\sigma_p}{\omega}$$

avec ε_p la permittivité de la particule et σ_p sa conductivité. La pulsation du champ électrique est représentée par ω .

2.2 Dipôle équivalent

Dans le cas d'une particule sphérique de rayon r , le moment dipolaire p créé par l'action du champ E s'écrit [1][5] :

$$\vec{p} = 4\pi\varepsilon_m f_{CM}[\omega] r^3 \vec{E}$$

avec : $f_{CM} = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}$ le coefficient de Clausius-Mossotti, ε_p^* étant la permittivité complexe de la particule et ε_m^* celle du milieu.

Le terme f_{CM} traduit la différence de polarisation entre la particule (définie par ε_p^*) et le milieu (défini par ε_m^*) dans lequel elle est placée et où le champ électrique E est appliquée. Si la particule est plus polarisable que le milieu ($\varepsilon_p > \varepsilon_m$), les lignes de champ pénètrent dans la particule. Dans le cas contraire ($\varepsilon_p < \varepsilon_m$), les lignes de champ contournent alors la particule [6]. Ainsi le coefficient de Clausius-Mossotti f_{CM} est directement relié à la polarisabilité α de la particule ($\vec{p} = \alpha \vec{E}$) avec $\alpha = 4\pi\varepsilon_m f_{CM}[\omega]$.

Cette modélisation peut être complétée par la notion de « doublet électrostatique » bien connue par nos élèves Physiciens-Appliqués. Elle permet également de mettre en œuvre la résolution de l'équation de Laplace en harmoniques sphériques. Une analogie peut aussi être faite avec le comportement d'un matériau magnétique et ainsi permet d'exploiter les équations de Maxwell dans ce cadre.

2.3 Force de diélectrophorèse – lois d'échelle

Dans un champ uniforme, le dipôle équivalent est soumis à un couple, l'amenant à s'aligner dans la direction du champ, mais ne subit pas de force résultante de translation s'il est neutre électriquement. Pour induire un tel mouvement de translation, un gradient de champ électrique est nécessaire.

2.3.1 Force subie par un dipôle dans un champ électrique non-uniforme

En présence d'un champ non-uniforme E , l'interaction entre le moment dipolaire p et le gradient de champ induit une force F telle que :

$$\vec{F} = (\vec{p} \cdot \nabla) \vec{E}$$

L'expression de la force induite F se développe, dans le cas d'un champ E d'excitation sinusoïdale, comme la somme de deux termes reflétant la présence d'une onde stationnaire de champ (premier terme) et la présence d'une onde progressive de champ (deuxième terme) :

$$\vec{F} = 2\pi\epsilon_m r^3 (\text{Re}(f_{CM}[\omega]) \vec{\nabla} E_{eff}^2 + \text{Im}(f_{CM}[\omega]) (E_x^2 \vec{\nabla} \phi_x + E_y^2 \vec{\nabla} \phi_y + E_z^2 \vec{\nabla} \phi_z))$$

On pourra approfondir la mise en œuvre du calcul dans la référence [6]. Cette force dépend du volume de la particule (coefficient pondérant de la force en r^3), de la pulsation ω du champ électrique (via le coefficient de Clausius-Mossotti f_{CM}), de sa valeur efficace E_{eff} et des phases instantanées des trois composantes (ϕ_x, ϕ_y, ϕ_z) .

Ainsi une onde de champ stationnaire crée une force proportionnelle à la partie réelle du facteur de Clausius-Mossotti (traduisant le contraste de polarisabilité entre la particule et le milieu), alors qu'une onde de champ progressive crée une force proportionnelle à la partie imaginaire de ce facteur.

De plus, la miniaturisation du dispositif électrofluidique met en exergue le phénomène. En effet, le rapprochement des électrodes permet d'atteindre des valeurs de champ électrique importantes tout en gardant des valeurs de tensions raisonnables. Le champ électrique $\vec{E}$ est inversement proportionnel à la dimension caractéristique d du système (espace inter-électrodes par exemple), le gradient de $\vec{E}^2$ évolue donc en $\frac{1}{d^3}$. La miniaturisation du microsysteme est

donc favorable à l'augmentation de la force, pour une particule de taille donnée. A noter que la force diminue avec la taille de particule (une microparticule sera plus aisée à manipuler avec cette force de DEP qu'une nanoparticule).

2.3.2 Influence du facteur de Clausius-Mossotti

La partie réelle du coefficient de Clausius-Mossotti ($\text{Re}(f_{CM}[\omega])$) est nécessairement comprise entre -0.5 et 1. Elle influe donc certes sur la norme de la force, mais aussi sur son sens. Ainsi, un objet dont la polarisabilité est supérieure à celle du milieu se voit appliquer une force orientée vers les régions de plus fort champ électrique (diélectrophorèse positive) tandis que dans le cas contraire, la force est orientée vers le minimum du champ.

On voit ici l'importance de ce coefficient et de l'interaction qui existe entre la différence de polarisation du milieu et de la particule. On amène en séance de travaux dirigés les élèves à réfléchir sur cette interaction.

Plus précisément, on examine avec les étudiants le cas d'une cellule biologique [7] placée dans un milieu liquide ayant des caractéristiques diélectriques données.

3. FABRICATION DE LA PUCE ET MISE EN PLACE DE L'INSTRUMENTATION

Après avoir introduit les notions précédentes auprès des étudiants sous la forme de cours et de travaux dirigés, nous leur proposons de mettre en œuvre certaines expériences clefs, mettant en évidence de manière tangible ces phénomènes. L'effet de ces forces étant d'autant plus important que l'échelle est réduite, nous avons développé un microsysteme « électrofluidique » dédié ainsi qu'un packaging adapté.

3.1 Micro-fabrication de la puce électrofluidique

La réalisation de la puce s'effectue en plusieurs étapes (niveau électrique, niveau fluidique, packaging), que l'on retrouve systématiquement lors de la fabrication d'un microsysteme en salle blanche. En premier lieu apparaît la conception des masques, dont on peut voir une esquisse *fig.1* avec deux exemples de motifs. La réalisation en salle blanche du niveau électrique nécessite le dépôt par évaporation sous vide sur un substrat en silicium d'une couche d'or de 150nm (ou de platine) sur une couche d'accroche en Chrome de 25nm (ou en titane), suivi de la gravure pour obtenir ainsi les électrodes (dépôt d'une couche de résine photosensible, photolithographie UV au travers d'un premier niveau de masque - en vert sur la figure 1). La réalisation du niveau fluidique nécessite le dépôt à la tournette d'une couche de résine épaisse SU8 (50µm) et sa gravure après photolithographie au travers d'un second masque (en rose sur la figure) correspondant au niveau microfluidique.

fig 1 : Motifs présents sur la puce électrofluidique (dimensions externes 23x23 mm, niveau électrique en vert, niveau fluidique en rouge) - zone 1 : réseaux de plots conducteurs ou isolants pour le positionnement par diélectrophorèse ; zone 2 : dédiée à la capture et l'électrorotation avec une distance inter-électrodes de 75 µm.

Ce procédé a été développé au sein de l'ENS de Cachan dans la salle blanche de l'Institut d'Alembert et fait l'objet de démonstration auprès des étudiants. Il a été externalisé en s'appuyant sur le Centrale Technologique Universitaire Minerve de manière à disposer d'un nombre significatif de puces.

De nombreux motifs ont été intégrés sur la puce et permettent de générer des gradients de champ électrique entre deux électrodes : soit par insertion de plots isolants (cas de la SU8) repoussant les lignes de champ ou de plots conducteurs attirant les lignes de champ (figure 1-zone1).

Les manipulations peuvent alors être réalisées en déposant une goutte (quelques μL) du liquide contenant les objets (billes de polystyrène, cellules végétales...) et une lamelle de verre afin de délimiter le niveau fluide.

3.2 Support de puce et instrumentation associée

Afin de simplifier la mise en œuvre de la puce, un support a été développé pour garantir l'application du champ électrique par des contacts souples (figure 2), via des générateurs de tension (GBF), au sein des différents motifs.

Quatre tensions différentes peuvent être appliquées simultanément, ce qui permet d'illustrer la force de diélectrophorèse dans le cas d'une onde stationnaire (1 GBF) ou dans le cas d'une onde progressive (4 GBF sont nécessaires dans ce cas). Afin d'observer les différents motifs, le support est positionné sous l'objectif $\times 20$ d'un microscope droit.

fig 2 : Photographie du support de la puce réalisant la connexion avec les générateurs.

4. ILLUSTRATION EXPERIMENTALE DE LA POLARISATION DIELECTRIQUE : CAPTURE, MISE EN ROTATION ET CONTROLE EN POSITION D'UNE PARTICULE POLARISABLE

4.1 Capture d'un micro-objet par diélectrophorèse

La première expérience menée par les étudiants consiste à analyser la présence d'obstacle (isolant ou conducteur) sur la topologie d'un champ électrique entre deux électrodes planaires. Les élèves doivent confronter les résultats expérimentaux à la simulation (calcul du champ électrique et du champ de forces en 3D), effectuée à l'aide d'un logiciel de simulation par éléments finis (ComsolTM). Des micro-billes de polystyrène ($10\mu\text{m}$, PolysciencesTM) sont ainsi capturées sur la surface supérieure des plots conducteurs, et sur les surfaces latérales des plots isolants.

fig 3 : Exemple de positionnement de billes de polystyrène sur des plots isolants ou conducteurs

4.2 Micropositionnement dans le plan (X,Y) d'un objet diélectrique

L'utilisation de plusieurs électrodes permet de créer des puits de champ qui sont des zones de capture. La microstructure que nous avons exploitée nécessite quatre électrodes (motif central de notre puce électro-fluidique, figure 1-zone 2). L'application de tensions sinusoïdales successivement en phase puis en opposition de phase sur ce système à quatre électrodes crée un puit de champ électrique permettant la capture en diélectrophorèse négative d'un objet polarisable (bille, cellule, etc.). La modulation en amplitude de ces tensions permet de contrôler la position XY de ce puits de champ, et donc de l'objet diélectrique (figure 4).

fig 4 : Cartographie du potentiel électrique dans le cas d'un déplacement selon X (échelle en V).

La modulation d'amplitude peut se faire par un pilotage sous Labview ou Matlab couplé à des cartes dSPACETM. Une fois la particule positionnée au centre des électrodes, il est ainsi possible de lui faire suivre une trajectoire dans le plan [X,Y] des électrodes en lien avec les tensions de modulation utilisées (figure 5).

fig 5 : Bille de polystyrène (10μm) suivant une trajectoire circulaire par modulation sinusoïdale des tensions

4.3 Electro-rotation

Il s'agit ici de créer un champ tournant (onde progressive tournante) qui induit un couple sur le dipôle piégé au centre de la microstructure évoquée ci-dessus (structure à quatre électrodes). Il faut cette fois appliquer des tensions sinusoïdales déphasées successivement de 90° sur ce système d'électrodes (figure 6). Le couple Γ exercé sur le micro-objet en rotation s'exprime :

$$\vec{\Gamma} = -4\pi\epsilon_m r^3 \text{Im}(f_{CM}[\omega]) E^2 \vec{z}$$

Il est particulièrement intéressant d'observer la vitesse de rotation Ω de l'objet en fonction de la fréquence du champ tournant ω . Cette caractéristique $\Omega = f(\omega)$ est en effet fonction de la partie imaginaire du facteur de Clausius-Mossotti, et permet l'extraction des caractéristiques diélectriques de l'objet en rotation (bille, cellule, etc...) [4].

fig 6 : Cellule B16 (mélanome de souris) entraînée par électrorotation

4.4 Micropositionnement en Z d'un objet diélectrique

Lorsqu'on augmente l'amplitude des tensions aux électrodes, on observe qu'un objet diélectrique (micro-bille ou cellule) s'élève au dessus du plan des électrodes. Ce comportement qui n'est pas prévu par l'expression de la force de diélectrophorèse, celle-ci

considérant que le dipôle induit est ponctuel (approximation qui mène à une force nulle quelle que soit l'altitude z au centre de la microstructure $x=y=0$).

Pour obtenir l'expression de cette force, il convient de modéliser le système électrique par quatre charges ponctuelles équivalentes aux électrodes et de développer le potentiel en harmoniques sphériques [8]. La bille n'est plus considérée comme un dipôle mais comme un quadripôle. L'expression de la force de lévitation, projetée selon l'axe z , devient alors [9] :

$$F_z \approx \frac{-3f_{CM,2} Q^2 R^5}{\pi\epsilon_m d^7} \frac{\frac{z}{d}}{(1 + (\frac{z}{d})^2)^6}$$

Avec $2d$ la distance entre deux électrodes opposées, R le rayon de l'objet, Q la charge ponctuelle équivalente et

$$f_{CM,2} = \text{Re}\left(\frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{2\epsilon_p^* + 3\epsilon_m^*}\right)$$

Il est alors possible d'étudier avec les étudiants l'allure de l'expression de F_z , pour en dégager ensuite les positions d'équilibre stable et instable (figure 7).

fig 7 : Force en fonction de l'altitude z pour $d=30\mu\text{m}$, $R=5\mu\text{m}$, $Q=4e-13\text{C}$.

Détection de la variation d'altitude :

Ainsi, lorsqu'on augmente l'amplitude de la tension d'entrée, on arrive à faire léviter la bille jusqu'à une altitude z qui correspond au point d'intersection de la courbe précédente avec la droite horizontale du poids (corrigé de la poussée d'Archimède) qui correspond à une position d'équilibre stable (il s'agit du point d'équilibre de plus haute altitude). Dès lors, on voit la bille sortir du focus (figure 8). Les élèves sont amenés à effectuer cette expérience et peuvent alors confronter les modélisations.

fig 8 : Photographie d'une bille de polystyrène (10μm) pour deux amplitudes différentes des signaux d'entrée 2V à gauche, 10V à droite (seule la bille de polystyrène centrale est hors focus du fait de son élévation en z).

5. CONCLUSION

Nous avons décrit dans cet article, la démarche pédagogique qui a consisté à développer un environnement matériel permettant de sensibiliser des étudiants (principalement de niveau Master) à l'utilisation du champ électrique comme vecteur de manipulation physique de micro-objets inertes (billes diélectriques micrométriques) ou biologiques (cellules, micro-algues, levures). En utilisant un système miniaturisé, c'est le phénomène de diélectrophorèse que l'on peut mettre ainsi en évidence avec les étudiants.

Un microdispositif électrofluidique de conception relativement simple, regroupant un grand nombre d'expériences possibles, et sa connectique ont été présentés.

Ces bancs expérimentaux sont déjà utilisés dans le cadre de formations pilotées par le département EEA de l'ENS de Cachan. Ils bénéficient d'un retour extrêmement positif des élèves qui peuvent ainsi relier les cours magistraux sur la physique associée, incluant les aspects de micro-fabrication, à des expérimentations concrètes sur un micro-circuit impliquant une démarche expérimentale.

Remerciements

Les bancs expérimentaux permettant la mise en œuvre des expériences pédagogiques présentées dans cet article ont été financés par l'ENS de Cachan dans le cadre de BQE, le département EEA, les Labex LASiPS (projets Bioélectrorotation et Prime) et NANO-Saclay (projet Bioélectrorotation). Nous remercions Patrice Vallade et Michel Lécrivain pour la réalisation des supports de puce et la centrale technologique Minerve pour la micro-fabrication des puces.

Bibliographie

- [1] Kharboutly, Mohamed. Modélisation, réalisation et commande d'un système de micro-manipulation sans contact par diélectrophorèse. Thèse de doctorat. Université de Franche-Comté, 2011.
- [2] E. Bisceglia, M. Cubizolles, F. Mallard, F. Vinet, O. Français, B. Le Pioufle, "Micro-organism extraction of biological samples using DEP forces enhanced by osmotic shock", *Lab on a chip*, 13, (5), 901-909, 2013
- [3] M. Frénéa, S.P. Faure, B. Le Pioufle, P. Coquet, H. Fujita, "Positioning living cell on a high-density electrode array by negative dielectrophoresis", *Materials Science and Engineering: C*, 23, (5), 597-603, 2003
- [4] S.I. Han, Y.D. Joo, K.H. Han, "An electrorotation technique for measuring the dielectric properties of cells with simultaneous use of negative quadrupolar dielectrophoresis and electrorotation", *Analyst*, 138, (5), 1529-1537, 2013
- [5] H.A. Pohl, "Dielectrophoresis", Cambridge university press, Cambridge, 1978
- [6] M. Frénéa "Thèse : Micromanipulation de particules par diélectrophorèse", 2003.
- [7] V.L. Sokhorukov, G. Meedt, M. Kürschner, U. Zimmermann, "A single-shell model for biological cells extended to account for the dielectric anisotropy of the plasma membrane", *Journal of Electrostatics*, 50, (3), 191-204, 2001
- [8] M. Washizu, T.B. Jones, "Multipolar dielectrophoretic force calculation", *Journal of Electrostatics*, 33, (2), 187-198, 1994
- [9] L.F. Hartley, K.V.I.S. Kaler, "Quadrupole levitation of microscopic dielectric particles", *Journal of Electrostatics*, 46, (4), 233-246, 1999