

# THÈSE

présentée à

**L'U.F.R. DES SCIENCES ET TECHNIQUES  
DE L'UNIVERSITÉ DE FRANCHE-COMTÉ**

pour obtenir le

**GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ  
DE FRANCHE-COMTÉ**

**Spécialité : Sciences pour Ingénieur**

## **MICROSYSTÈMES ET MICROCAPTEURS POUR LES SCIENCES DU VIVANT**

par

**Rabah ZEGGARI**

Soutenue le 24 avril 2008 devant la commission d'Examen

Président du Jury

H. MAILLOTTE Directeur de Recherche CNRS, Université de Franche-Comté

Directeur de thèse

T. GHARBI Professeur, Université de Franche-Comté

Rapporteurs

D. FELBACQ Professeur à l'université de Montpellier II

M.L HAJI Professeur à l'université de Rennes 1

Examineurs

D. BARCHIESI Professeur, Université de Technologie de Troyes

G. HERLEM Maître de conférence (HDR), Université de Franche-Comté

V. LAPIERRE Docteur en Medecine, Institut de cancérologie Gustave Roussy

B. WACOGNE Chargé de Recherche CNRS (HDR), Université de Franche-Comté



# Remerciements

Le travail qui est résumé dans le présent manuscrit a été effectué au sein du Département d'Optique P.M. Duffieux de l'Institut FEMTO-ST (U.M.R. 6174) à l'Université de Franche-Comté.

Tout d'abord, je tiens à remercier profondément Monsieur le Professeur Tijani Gharbi, directeur de thèse, de m'avoir guidé, suivi et soutenu scientifiquement ainsi que moralement, tout au long de ce travail.

Je tiens à remercier Guillaume Herlem, Maître de Conférences et Bruno Wacogne, Chargé de Recherche CNRS, pour leurs suivi et leurs conseils qui m'a permis de mener ces travaux.

J'adresse mes remerciements à Monsieur Hervé Maillotte directeur de recherche CNRS et directeur de notre département d'avoir accepté de présider le jury de ma thèse.

J'exprime ma profonde gratitude à Monsieur Daniel Felbaq, Professeur à l'Université de Montpellier II, Monsieur Mohamed-lazhar Haji, Professeur à l'Université de Rennes I, pour m'avoir fait l'honneur de rapporter ce travail.

Je tiens à m'adresser mes remerciements à Madame, Valérie Lapierre Docteur en Médecine pour avoir accepté de juger ce travail.

Egalement mes remerciements à M. Dominique BARCHIESI Professeur à l'Université de Troyes pour avoir accepté de juger ce travail.

Ma profonde reconnaissance à Monsieur Nacer-Eddine Demagh, Maître de Conférences (HDR) à l'université de Sétif (Algérie), de ses précieuses aides scientifiques ainsi que pour son esprit de collaboration. Mes remerciements s'adressent aussi au Professeur Brahim Guizal pour sa gentillesse et sa disponibilité pour la relecture du manuscrit, à Christian Pieralli, Chargé de Recherche CNRS, qui m'a aidé à interpréter les résultats relatifs à la fécondation *in vitro*. Je dis un grand merci à Monsieur Christophe Roux, Professeur à l'Université de Franche-Comté, de m'avoir donné la possibilité d'expérimenter

sur des ovocytes le dispositif réalisé dans cette thèse, et à Monsieur Pierre Tiberghien, Directeur de l'EFS de m'avoir permis de mener les expérimentations relatives aux cornées au sein de son établissement. Je remercié également, le staff scientifique et technique de l'EFS qui ont mis à ma disposition les moyens nécessaires pour travailler sur des greffons de cornées. Je cite, le Docteur S. Maddens, J. Pizzotto et N. Pouthier.

Un grand merci au personnel de la centrale technologique MIMENTO, dont certains, qui se reconnaîtront, m'auront plus d'une fois dépanné là où rien ne les y obligeait.

J'adresse mes remerciements également à la Fondation Transplantation pour avoir assuré une partie du financement de cette thèse.

Enfin, je n'oublierai jamais la sympathie de tous les membres de l'équipe et du Laboratoire, ainsi que tous les collègues et les amis qui m'ont accompagné pendant cette thèse : je cite Abder, Rabah, Reda, Malha, Nabiha, Vincent, Kamal, Hicham, Hakim, Nestor, Jaime . . .

# Introduction générale

**L**es microsystemes peuvent être définis comme des systèmes miniaturisés incorporant de manière monolithique des capteurs, des actionneurs et des dispositifs de traitement de l'information. Leurs dimensions sont comprises entre quelques micromètres et quelques millimètres. La multidisciplinarité est une caractéristique forte des activités de développement des microsystemes. Aujourd'hui, la quasi-totalité des disciplines scientifiques ou techniques sont impliquées (médecine, biologie, physique, chimie, optique, mécanique . . .). L'intérêt grandissant pour les microsystemes en terme de recherche et de marché réside dans le fait qu'au-delà de la diminution des tailles et des coûts de fabrication des dispositifs, la miniaturisation permet de multiplier les fonctionnalités intégrées aux systèmes et de répondre à de nouveaux besoins.

Le domaine biomédical, est l'un des domaines où l'intérêt pour les microsystemes est capital et surtout pour tout ce qui relève de l'analyse biomédicale (analyses sanguines, analyses d'ovules...). Ces analyses peuvent poser un problème de coût, de lourdeur de mise en oeuvre et parfois même de précision. Construire un microsysteme pour le biomédical ne va pas sans difficultés. En effet, un tel microsysteme doit répondre aux mêmes critères que les systèmes traditionnels, tel que la biocompatibilité des matériaux utilisés, la manipulation des micro-objets biologiques (cellules, ADN. . .), le contrôle des paramètres biologiques (température, pH, pression sanguine. . .). C'est dans ce contexte de recherche que s'inscrit l'objectif de cette thèse.

Le travail de thèse présenté dans ce manuscrit est scindé en deux parties principales :

La première partie est consacrée au développement d'un Lab On Chip pour la fécondation *in vitro* qui utilise la microfluidique pour le transport et le positionnement des ovocytes dans des sites bien précis afin de les analyser ou de les féconder. Ce Lab On Chip est constitué d'une plateforme et d'un ensemble de sondes. La plateforme assure le maintien en vie de l'ovocyte en formant un réservoir pour le milieu biologique approprié.

Un système de microfluidique assure le déplacement et l'immobilisation de l'ovocyte. L'ensemble des sondes permet d'opérer une analyse objective de l'ovocyte, c'est donc une aide à la décision dans le choix de la fécondation ou non de l'ovocyte.

Dans un premier temps, nous décrivons les différentes techniques utilisées dans le domaine de la micromanipulation biologique et nous mettrons en évidence leurs limites par rapport à notre application.

Dans un deuxième temps, nous exposerons les choix technologiques que nous avons retenu pour réaliser cette plateforme. Nous décrivons les méthodes de micro-usinage du silicium que nous avons mis en œuvre pour cette réalisation. Enfin, nous démontrerons qu'un réseau de microcanaux peut assurer le transport de l'ovocyte et son immobilisation dans des sites bien précis. Aussi, en vue d'une analyse spectrale deux fibres optiques ont été intégrées à la plateforme pour constituer un atelier d'analyse.

La deuxième partie est consacrée au développement d'un Lab On Chip pour le transport et le contrôle qualité d'un greffon cornéen. Il s'agit d'apporter des solutions aux problèmes de transport et de conservation des greffons cornéens, posés aux banques de cornées. En effet, les techniques actuelles de conservation et de contrôle de la qualité d'un greffon cornéen sont loin d'être satisfaisantes. Le critère déterminant de la qualité des cornées est le nombre des cellules endothéliales vivantes présentes dans la cornée. Le comptage de ces cellules est effectué, par un opérateur sous microscope, après coloration de la cornée par le bleu trypan qui s'infiltré uniquement dans les cellules mortes. Or ce dernier produit s'est avéré cancérigène et il sera sans doute interdit dans l'avenir. Notre but a été de remplacer cette méthode par une méthode optique qui a l'avantage (i) d'être non invasive et (ii) d'éviter une manipulation de la cornée qui est source d'infections et/ou de dégradation. Pour ce faire, nous avons mis au point un système de mesure de la transmittance optique de la cornée à examiner. Nous avons trouvé une corrélation étroite entre le nombre de cellules vivantes et cette transmittance.

Cette partie est organisée en deux chapitres, dans le premier nous décrivons la physiologie de la cornée et nous rappelons son rôle prépondérant dans la vision. Nous citons les étapes suivies du prélèvement jusqu'à la greffe, en insistant sur les précautions de manipulation très rigoureuses. Ensuite, nous détaillons les étapes expérimentales et théoriques qui nous ont amené à déterminer le spectre de transmittance de la cornée. Enfin, nous donnons des résultats préliminaires obtenus sur des cornées non-conformes (i.e. rejetées par la technique habituelle de sélection).

Le deuxième chapitre est consacré au développement de microcapteurs pour l'analyse bactériologique des cornées pendant leur conservation. En effet, les cornées destinées à la greffe sont préservées dans un milieu de conservation à  $31^{\circ}\text{C}$ , un contrôle bactériologique est effectué quotidiennement par une mesure de son pH par colorimétrie. La variation du pH, traduit une infection bactérienne et induit un virage de la couleur du milieu du rouge au jaune ou conduit à une turbidité. L'inconvénient majeur de cette méthode est qu'elle est peu précise et opérateur dépendante. Afin, de pallier à ces problèmes nous avons développé des microcapteurs potentiométriques capables d'effectuer des mesures locales du

pH et en temps réel pour prévoir toute infection. Nous décrirons tout d'abord les différentes méthodes et techniques utilisées pour la mesure du pH et nous montrerons, par la suite, les avantages offerts par notre méthode. Nous préciserons les étapes technologiques entrant dans l'élaboration et la caractérisation de nos microcapteurs.

Enfin nous montrons que le microsystème qui répond à la problématique posée dans cette deuxième partie se concrétise sous la forme d'un support moulé dans une résine biocompatible et doté d'un système de fluide pour assurer en toute sécurité l'analyse optique et bactériologique de la cornée.

Nous terminerons par une conclusion générale avec des remarques qui ouvrent la voie à de nouvelles recherches dans ce domaine.



# Sommaire

<b>I</b>	<b>Lab On Chip pour la fécondation <i>in vitro</i></b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Plateforme pour la FIV</b>	<b>3</b>
1.1	État de l'art . . . . .	4
1.2	Schéma de principe . . . . .	11
1.3	Choix de la technologie silicium . . . . .	12
1.4	Techniques d'usinage du silicium . . . . .	12
1.5	Usinage de la face inférieure . . . . .	13
1.6	Usinage de la face supérieure . . . . .	27
1.7	La partie verre . . . . .	31
1.8	Assemblage du microsysteme . . . . .	33
1.9	Résultats Expérimentaux . . . . .	37
1.10	Mesure des propriétés optiques . . . . .	40
1.11	Conclusion . . . . .	44
<b>II</b>	<b>Lab On Chip pour le transport et le contrôle qualité du greffon cornéen.<i>in vitro</i></b>	<b>47</b>
<b>2</b>	<b>Etude du spectre de Transmittance de la cornée</b>	<b>49</b>
2.1	Généralités . . . . .	49
2.2	La greffe de la cornée . . . . .	52
2.3	Comportement optique de la cornée . . . . .	56
2.4	Dispositif expérimental . . . . .	58
2.5	Tests sur site . . . . .	73

2.6	Conclusion . . . . .	77
<b>3</b>	<b>Microcapteurs pour la détection de bactéries</b>	<b>79</b>
3.1	État de l'art . . . . .	79
3.2	Approche conceptuelle . . . . .	87
3.3	Réalisation de microcapteurs . . . . .	88
3.4	Caractérisation des capteurs . . . . .	94
3.5	Etude des capteurs microsystemes . . . . .	100
3.6	Intégration des capteurs . . . . .	108
3.7	Conclusion . . . . .	110
<b>III</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>115</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>117</b>
<b>IV</b>	<b>Index</b>	<b>123</b>
	<b>Index</b>	<b>125</b>



**Lab On Chip pour la fécondation**  
*in vitro*



- 1.1 État de l'art
- 1.2 Schéma de principe
- 1.3 Choix de la technologie silicium
- 1.4 Techniques d'usinage du silicium
- 1.5 Usinage de la face inférieure
- 1.6 Usinage de la face supérieure
- 1.7 La partie verre
- 1.8 Assemblage du microsystème
- 1.9 Résultats Expérimentaux ...
- 1.10 Mesure des propriétés optiques...
- 1.11 Conclusion

## Plateforme pour la FIV

**L**a fécondation extra corporelle ou fécondation *in vitro* (FIV), consiste à reproduire en laboratoire ce qui se passe naturellement dans les trompes de Fallope : la fécondation et les premières étapes du développement embryonnaire. La fécondation *in vitro* proprement dite consiste à mettre en contact les ovocytes et les spermatozoïdes dans une éprouvette pour permettre à ces spermatozoïdes de féconder l'ovocyte. En cas d'échec, le médecin biologiste pratique la FIV avec ICSI (Intra Cytoplasmic Sperm Injection.), où il introduit lui-même, par micro-injection et sous contrôle microscopique, le spermatozoïde à l'intérieur de l'ovocyte. Les taux de succès de la FIV (Fécondation *in vitro*.) sont actuellement de l'ordre de 25% de grossesse. Ce faible taux de réussite peut être dû à plusieurs facteurs parmi lesquels :

- **Compétence de l'ovocyte (qualité)** : la qualité de l'ovocyte est évaluée sur des critères subjectifs. Essentiellement par observation au moyen d'un microscope, le praticien décide des ovocytes qui seront fécondés. La détermination des ovocytes satisfaisants est donc très fortement praticien-dépendante.
- **Les Conditions expérimentales** : actuellement, toutes les opérations nécessaires à une FIV se déroulent manuellement en salle grise, à une température de l'ordre de 35 °C. La salle grise est également enrichie en CO<sub>2</sub> pour augmenter le pH de l'atmosphère. De plus, l'atmosphère est quasi saturée en humidité.
- **Le savoir-faire du praticien** : l'expérience du praticien est une donnée importante du taux de réussite de la FIV.

C'est dans ce contexte que nous avons entrepris la conception d'un Lab On Chip dédié à la fécondation *in vitro*. Nous avons opté pour un Lab On Chip qui apporterait des réponses au premier point dans les bonnes conditions expérimentales. La réponse au dernier point consisterait en l'automatisation totale de la fécondation *in vitro*. Au vu de la complexité des tâches à assurer pour aboutir à cette automatisation nous n'avons pas retenu cette opération dans nos objectifs.

Nous avons donc entrepris la conception et la réalisation d'une plateforme de ce Lab On Chip qui accueillerait les ovocytes candidats à une fécondation, et les instruments de mesures qui vont assurer un choix objectifs des ovocytes pour un meilleur taux de succès de la FIV.

Ainsi cette plateforme doit remplir les fonctions suivantes :

- le maintien en vie des ovocytes ;
- le positionnement des ovocytes ;
- l'accueil des sondes de mesures et de caractérisation.

Pour la réalisation de cette plateforme nous avons retenu la technologie silicium. Nous nous sommes basés sur les techniques de microfabrication disponibles dans notre laboratoire. Premièrement, il s'agit de mettre au point un système de transport des cellules à la surface des microlaboratoires (plateformes d'accueil). Ceci doit permettre de déplacer la cellule d'un poste d'analyse à un autre. Deuxièmement, Il faut assurer un positionnement ultra précis de la cellule au niveau des postes d'analyse. Enfin, il faut mettre au point les différents microcapteurs d'analyse cellulaire ainsi que leur intégration sur les plateformes d'accueil.

Dans la première partie, nous présentons un schéma de principe de la plateforme, nous expliquons le choix des matériaux entrant dans la réalisation du microsystème et nous détaillons les différentes composantes du Lab On Chip. La deuxième partie est dédiée à la partie silicium du Lab On Chip. Nous y présentons les techniques de gravure du silicium mises en œuvre pour réaliser la plateforme. Dans la troisième partie nous montrons comment une plaque en verre soudée à la plateforme peut garantir l'étanchéité du microsystème, et assurer l'interface avec des systèmes de pompage externes. La quatrième partie, montre les moyens et les techniques utilisées pour l'assemblage des différentes composantes du microsystème. Nous présentons aussi un montage expérimental dédié à la validation de notre microsystème. Une cinquième partie est dédiée à un microsystème pour l'étude des propriétés optiques de l'ovocyte. Enfin, nous terminerons par une conclusion sur cette partie.

## 1.1 État de l'art

### *Introduction*

Dans cette partie nous présentons les techniques les plus courantes utilisées dans la micromanipulation des cellules biologiques.

Enfin nous fixons, au vu de cet état de l'art, les contraintes auxquelles doit satisfaire notre microsystème. L'élaboration de la solution technologique remplissant ce cahier des charges sera présentée au cours de ce chapitre.

### 1.1.1 Les pinces optiques

Les lasers trouvent de continuelles applications en biologie, tant dans le domaine de la recherche que dans celui du diagnostic et de la thérapeutique. L'utilisation de la force optique produite par les lasers a permis de créer une pince optique capable d'attraper une cellule ou un fragment d'organite cellulaire, de les fixer et de les transporter dans un autre site cellulaire.

Le principe de fonctionnement des pinces optiques est présenté sur le schéma ci-dessous (figure 1.1). Il décrit la force optique s'appliquant sur une sphère dans un gradient d'intensité lumineuse. Une bille de taille microscopique est placée dans un faisceau à fort gradient d'intensité lumineuse. Les rayons lumineux incidents ( $A$  et  $B$ ) qui traversent la bille changent de direction à leur entrée et leur sortie. Les modifications de quantité de mouvement qui en résultent produisent des forces optiques ( $\vec{F}_A$  et  $\vec{F}_B$ ) d'autant plus grandes que l'intensité lumineuse est forte ( $\vec{F}_B > \vec{F}_A$ ). La force résultante qui s'exerce sur la bille ( $\vec{F}_{res} = \vec{F}_A + \vec{F}_B$ ) tend à attirer la bille dans la direction où la lumière est la plus intense.

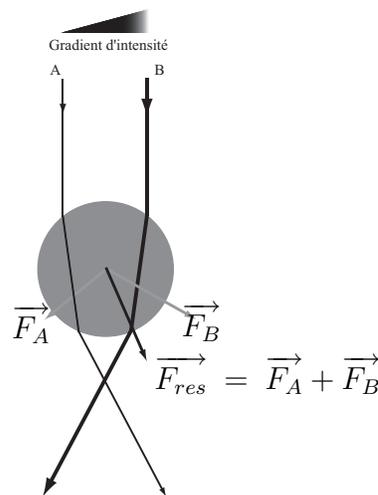


FIGURE 1.1 – Principe physique des pinces optiques

Les pinces optiques ont été utilisées pour capturer, sélectionner et déplacer de nombreux types cellulaires ou organismes unicellulaires : bactéries, virus, spermatozoïdes, globules rouges, cellules rétinienne en culture [1]. La sélection et la mise en contact de cellules photosensibles avec des cellules neuronales a permis d'étudier le développement des contacts intercellulaires et la régénération de synapses entre ces deux types cellulaires [2]. La manipulation optique de cellules mobiles comme les spermatozoïdes pour la mesure de leurs forces de propulsion flagellaire et d'échappement des pièges optiques constitue un outil de diagnostic de certaines stérilités [3].

### *Performances et inconvénients*

Les pinces optiques sont capables de manipuler des micro-objets en milieu fluide, mais plus particulièrement aqueux, dont la taille varie de  $25nm$  environ (taille critique pour réussir le piégeage) à  $32\mu m$  pour les forces de l'ordre de quelques dizaines de pN et pour un laser de  $100mW$  [4], les particules se déplaçant jusqu'à quelques  $220\mu m/s$  pour une particule de  $2,68\mu m$  environ et une puissance laser de  $128mW$  [5].

Cependant, la manipulation de cellules biologiques par laser trapping a des effets néfastes non négligeables. En effet, certaines cellules, en fonction de la longueur d'onde et de la puissance du laser, sont détruites lors de la manipulation [6, 7]. Morito propose, pour pallier à ce problème, d'utiliser les infra-rouges moins destructeurs que la lumière visible [8]. Arai, propose lui, de manipuler la cellule cible en la poussant, soit avec des cellules manipulées par laser qui, elles, seront détruites[9], soit avec un pousseur artificiel déplacé par laser trapping[10]. Ce risque de destruction de cellules reste le principal désavantage de ce type de manipulation.

#### 1.1.2 La manipulation mécanique

Les cellules biologiques peuvent être déplacées par une simple action mécanique. Deux grands modes de déplacement sont possibles : la poussée dans un plan et la saisie par pince.

Arai propose de pousser une cellule à l'aide d'un manipulateur déplacé par laser trapping[11]. Le laser trapping peut, par l'utilisation de laser trop puissant, détruire les cellules. En poussant une cellule à l'aide d'un pousseur manipulé par laser trapping, on ne détruit pas la cellule poussée, non exposée au laser.

Gauthier [12] a développé un micropousseur magnétique évoluant dans un milieu aqueux inséré entre deux lamelles de verre utilisées pour les observations au microscope. Le principe d'actionnement du pousseur repose sur l'utilisation d'un champ magnétique créé par un aimant. Cet aimant, contrôlé en position, est situé sous les lamelles. Le micropousseur est élaboré avec un matériau ferromagnétique. Le mouvement de l'aimant déplace le pousseur dans le milieu liquide. Grâce à ce dispositif, des particules, dont le diamètre minimum est vingt micromètres, sont guidées et positionnées avec une précision de l'ordre du micron.

Une autre idée est de réaliser une pince à cellules. Dans ce domaine, Jager[13] présente un microrobot articulé avec un bras et une pince, tous deux actionnés grâce à des polymères actifs. Ces polymères actifs ont la propriété de se déformer au sein d'un milieu aqueux sous l'effet d'un champ électrique. Ce robot travaillant en milieu aqueux permet la manipulation d'objets de  $100\mu m$  sur une plage de  $250\mu m$ .

Il existe également une alternative des pinces. Une structure rigide est montée sur un dispositif de déplacement. Cette structure fait office de cage pour emprisonner la cellule et ainsi la déplacer. Sadani [14] utilise ce principe pour manipuler un ovocyte. Il est constitué d'un bras monté sur un dispositif de translation. Le bras est percé à son extrémité pour

accueillir l'ovocyte.

### ***Performances et inconvénients***

Ces systèmes présentent des aspects très pratiques. Ils s'adaptent à différentes tailles de cellules dont la plus petite mesure une vingtaine de microns. Néanmoins, ces outils sont uniquement dédiés au positionnement des cellules, ils n'intègrent pas des systèmes d'analyses. Pour déplacer les cellules ces techniques nécessitent l'utilisation d'un champ magnétique ou électrique et/ou un contact mécanique ce qui risque d'endommager les cellules.

### 1.1.3 La diélectrophorèse

Parmi les techniques de manipulation, celles basées sur une approche utilisant un champ électrique sont particulièrement adaptées à la miniaturisation [15]. Elles combinent les avantages de la rapidité, la flexibilité, le contrôle et la facilité d'automatisation. Selon la nature des particules à manipuler, différents types de champs électriques peuvent être appliqués :

- Un champ de courant continu pour l'électrophorèse de particules chargées,
- Un champ non uniforme de courant alternatif pour la diélectrophorèse (DEP) de particules polarisables (chargées ou neutres).

La diélectrophorèse est un phénomène qui trouve son origine dans les propriétés diélectriques des matériaux qui, sous l'effet d'un champ électrique se polarisent [16]. Si le champ électrique appliqué est non uniforme à l'échelle d'une particule diélectrique, celle-ci va subir des forces diélectriques qui, de par cette non uniformité, vont l'entraîner soit du côté de la zone où le champ est le plus fort (diélectrophorèse positive) soit du côté où il est le plus faible (diélectrophorèse négative). La diélectrophorèse permet donc de manipuler des particules avec des champs électriques. Un intérêt premier est de pouvoir travailler avec des champs alternatifs, supprimant ainsi les réactions électrochimiques parasites dans les échantillons biologiques.

La manipulation de cellules biologiques par diélectrophorèse est une technique couramment utilisée aujourd'hui [17]. Les microsystèmes développés permettent de créer des champs électriques suffisamment intenses pour envisager de faire de la diélectrophorèse sur des cellules. Ainsi, le champ d'applications de la diélectrophorèse s'ouvre aux biotechnologies et notamment à celui de la manipulation de petits échantillons cellulaires [18].

Différents systèmes ont été mis au point pour manipuler et séparer des cellules biologiques. Outre les paramètres caractérisant le système (géométrie des électrodes, tension appliquée, fréquence ...), le comportement des cellules soumises au champ électrique est directement lié à leurs propriétés diélectriques qui par là même deviennent un critère de tri. Les cellules malades ont des caractéristiques diélectriques différentes des cellules saines. Elles se comporteront donc différemment lorsqu'elles sont soumises à un champ électrique. C'est en se basant sur cette particularité que des systèmes de différenciation

de cellules ont été conçus, notamment un dispositif permettant d'isoler et de collecter dans le sang des cellules infectées par la leucémie [19]. La diélectrophorèse a été utilisée pour séparer et caractériser des cellules normales ou cancéreuses [20]. Des applications de transport et de séparation de cellules et de particules dans des microréseaux d'électrodes ont ainsi été réalisées [15], notamment par Fuhret et al. qui ont utilisé la DEP dans un dispositif pour aiguiller et concentrer des particules avec des vitesses maximales d'environ  $10\text{mm}$  par seconde [21].

### *Performances et inconvénients*

Malgré les avantages offerts par cette méthode mentionnés ci-dessus des inconvénients persistent. En effet, les cellules manipulées sont soumises à des champs électriques très intenses (quelques dizaines de  $kV/m$ ) dont les effets physiologiques à long ou à court terme ne sont pas connus. En effet, certains organismes subcellulaires sont polaires, comme par exemple l'ADN. Il est donc, dans notre cas trop hasardeux d'utiliser cette technique. De plus pour certaines fréquences, le milieu cellulaire se met à bouillir ce qui entraîne d'une part l'érosion des électrodes du système [22] et d'autre part l'évaporation de la solution constituant le milieu.

## 1.1.4 Manipulation des cellules par ondes acoustiques

Une méthode originale basée sur l'utilisation d'un piège tridimensionnel non intrusif pour les particules microscopiques dans un liquide a également été utilisée. Ce piège est basé sur les forces acoustiques. La théorie de lévitation et du piégeage est bien comprise [23, 24]. La méthode est appliquée pour l'étude de la tension superficielle à la surface de gouttes de liquide de l'ordre du millimètre [25], des oscillations de forme et la déformation de gouttelettes et de cellules biologiques [26] et des propriétés mécaniques de matériel biologique, comme les globules rouges [27].

Hertz et al. [28] ont décrit un piège tridimensionnel non destructif basé sur les forces acoustiques dans une cavité ultrasonique. Les expériences à 11 mégahertz démontrent le concept et vérifient les forces théoriques. Les calculs théoriques pour des systèmes de plus haute fréquence indiquent un potentiel significatif pour le piégeage de particules submicrométriques.

### *Performances et inconvénients*

La différenciation entre les cellules et le sérum physiologique dans lequel baignent, implique de générer un champ acoustique de forte énergie. Il est important d'ajouter que ces champs d'ondes très énergétiques entraînant un phénomène de radicalisation de l'oxygène. Les radicaux libres étant nocifs pour les cellules vivantes, cette technique leur est donc préjudiciable [29]

#### 1.1.5 La microfluidique

La microfluidique étudie le transport de fluides souvent biologiques, de l'échelle de quelques microns à quelques centaines de microns. A cette échelle les effets inertiels (à l'origine de la turbulence) sont généralement négligeables. Ainsi les globules rouges transportées dans un capillaire sanguin (souvent plus étroit que le globule lui-même), un fluide de polymères circulant à travers un milieu poreux, constitue des systèmes microfluidiques. A cette échelle c'est la viscosité qui domine, les effets de tension de surface peuvent aussi être prépondérants.

La plupart des dispositifs microfluidiques sont composés de capillaires et de chambres de réactions. Pour les usiner, on part en général d'un matériau solide, plan, dans lequel nous allons formés des canaux et des cuvettes qui seront ensuite recouverts d'un couvercle. Pour réaliser ces motifs, nous utilisons la lithographie et la gravure d'un matériau solide comme le silicium, le verre ou le quartz. Ou procédons par moulage ou emboutissage de matériaux polymères. Les dimensions caractéristiques des canaux sont de l'ordre de la centaine de microns mais descendent parfois jusqu'à quelques dizaines de nanomètres. La nature du régime d'écoulement d'un fluide est déterminée par le nombre de Reynolds qui dépend de la vitesse d'écoulement, du diamètre du capillaire et de la viscosité du fluide. À ces dimensions et dans les régimes de vitesse habituels (inférieure au centimètre par seconde), pour l'eau ou une solution aqueuse plus visqueuse, le nombre de Reynolds est tel qu'il n'y a jamais apparition de turbulence. Le déplacement de fluide est effectué en utilisant notamment des micropompes (ou microvannes) ou encore les phénomènes d'électrocinétique ou électroosmose [30, 31].

Les applications majeures de la microfluidique portent sur le traitement de cellules : analyse, contrôle du développement, centrifugation, décoronisation, etc. L'analyse de l'ADN est un bon exemple d'utilisation des réseaux microfluidiques. Le prélèvement d'ADN circule dans le réseau et traverse différentes zones de traitement avant d'être analysé [32, 33].

### *Performances et inconvénients*

La microfluidique est une technique idéale pour le transport des cellules. Elle est non invasive puisqu'elle ne nécessite pas de lien matériel pour déplacer les corps et elle ne provoque pas de phénomènes susceptibles d'endommager les cellules tels que la radicalisation de l'oxygène ou des échauffements localisés. Toutefois, la microfluidique présente des limites pour la capture et le maintien de cellules. Elle est forcément associée à un autre système dont la fonction est d'immobiliser la cellule.

### *Conclusion*

Dans cette partie nous avons présenté les techniques couramment utilisées dans la manipulation des particules biologiques. En effet, des techniques utilisant des champs électriques, magnétiques ou acoustiques ont été mises en évidence. Bien que ces techniques soient utilisées dans plusieurs domaines avec efficacité, elles ne sont pas adaptées à notre application. Le caractère embryon-compatible de notre application interdit l'utilisation de ces différents champs. Ceci pouvant avoir des effets nocifs sur les ovocytes. Nous avons présenté également des techniques qui s'affranchissent du premier inconvénient. La manipulation par moyens mécanique, bien que présente un avantage évident par rapport aux techniques précédentes risque d'endommager les cellules. Enfin, nous avons présenté la technique de la microfluidique qui semble la plus appropriée. Il est évident que cette technique possède un caractère non invasif. Puisqu'elle utilise une turbulence dans le liquide de vie pour déplacer les cellules.

Dans la partie suivante, nous allons présenter les étapes de réalisation d'une plateforme microfluidique sur silicium. Elle sera dédiée au transport et au positionnement des ovocytes afin de les analyser ou de guider la pipette d'injection du sperme.

## 1.2 Schéma de principe

Notre but est de réaliser un « Lab On Chip » en silicium. Celui-ci comprend trois aspects. Le premier aspect est l'accueil et le maintien en vie des ovocytes. Le deuxième concerne un système de transport et d'immobilisation des ovocytes sur des sites bien précis. Enfin, le dernier consiste à mettre au point les différents microcapteurs d'analyse et de prévoir leur intégration sur le Lab On Chip. Avant de décrire ce système, il convient de préciser que les contraintes liées à la FIV interdisent l'utilisation de tout champ électrique, magnétique ou acoustique. Nous avons donc opté pour un système faisant appel aux techniques de la microfluidique pour le déplacement et le positionnement précis des cellules. Cet aspect constitue la contrainte principale de notre travail et conditionne toute la géométrie du système. Un schéma de principe est donné sur la figure 1.2.

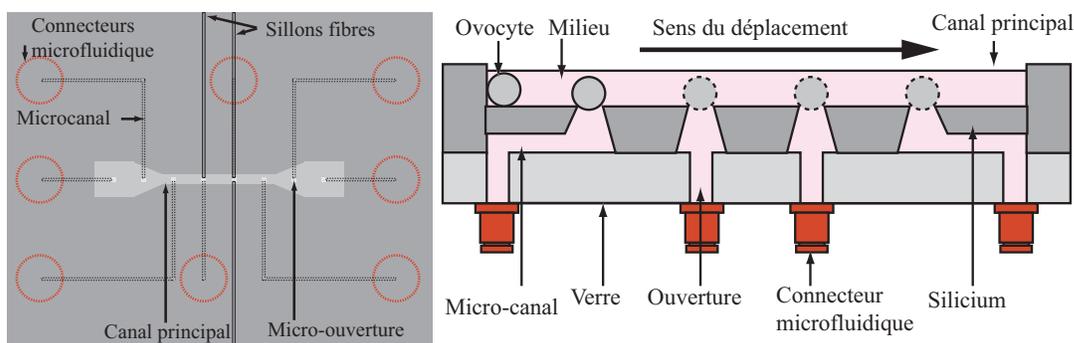


FIGURE 1.2 – Schéma de principe du "Lab On Chip".

Sur la face supérieure du microsystème, nous usinons un canal de  $200 \mu m$  de largeur. Les élargissements ménagés aux extrémités de ce canal principal sont les zones de dépôt et de collection des cellules. Une succession de microouvertures ( $40 \mu m$  espacées de  $2 mm$ ) connectées à des microcanaux usinés en face arrière du dispositif, permettent d'aspirer le liquide séquentiellement d'une ouverture à l'autre et de déplacer l'ovocyte. L'étanchéité des microcanaux est assurée par soudure anodique d'un wafer en verre. Ce dernier est percé pour permettre de connecter les microcanaux au système d'aspiration. Des connecteurs microfluidique, collés sur le verre, assurent la liaison entre les microcanaux et le système d'aspiration. Il faut noter que le diamètre des connecteurs microfluidique commerciaux ( $8 mm$ ), conduisent à une taille relativement importante du Lab On Chip ( $30 \times 40 mm$ ). De ce fait, nous ne pourrons fabriquer que quatre dispositifs par wafer de quatre pouces. Sur la face supérieure, nous avons également intégré des sillons pour fibres optiques. Ces dernières constituent deux postes d'analyse. Un système de deux fibres (premier atelier), est dédié à la mesure de l'absorption et de l'indice de réfraction de l'ovocyte. Une troisième fibre (deuxième atelier) permet la mesure du pH membranaire de la cellule. Dans ce qui suit nous allons détailler les différentes parties du microsystème ainsi que les techniques d'usinage utilisées.

### 1.3 Choix de la technologie silicium

Le choix du matériau de base de notre microsystème s'est porté sur le silicium [15, 34]. Ce dernier semble le meilleur candidat pour plusieurs raisons. Premièrement, nous maîtrisons bien toutes les techniques d'usinage nécessaires à la réalisation du microsystème. Deuxièmement, une simple oxydation thermique suffit à le rendre embryocompatible, ce qui est essentiel dans notre travail.

Nous utilisons un wafer de quatre pouces de diamètre, de  $525 \mu\text{m}$  d'épaisseur et de coupe  $\langle 100 \rangle$ . Deux masques lithographiques de 5 pouces sont nécessaires pour la réalisation de la partie silicium de notre microsystème. Le premier masque (face supérieure) définit les motifs de la face supérieure : le canal principal, les zones de dépôt et de collection et les sillons pour fibres optiques. Le deuxième masque (face inférieure), définit les ouvertures connectées aux microsillons. Les étapes de la photolithographie sur chaque face du wafer sont suivies par une étape de gravure sèche pour la face supérieure et humide pour la face inférieure. Dans ce qui suit nous allons détailler ces deux techniques.

### 1.4 Techniques d'usinage du silicium

Deux types d'usinages du silicium sont nécessaires à la réalisation du microsystème. Le premier est l'usinage chimique par voie humide qui consiste à usiner des échantillons par trempage dans des bains d'attaque chimique. Dans notre cas nous utilisons la potasse (KOH) qui est probablement le bain d'attaque le plus couramment employé [35, 36]. Le second type d'usinage, dit usinage par voie sèche, consiste en un bombardement de l'échantillon par un plasma. Dans notre cas nous utilisons la DRIE (Deep Reaction Ion Etching.) [37]. Chaque technique intervient jusqu'à une profondeur bien définie comme le montre le schéma de principe (figure 1.3).

Il faut noter que nous avons utilisé deux techniques pour la gravure du silicium, dans le souci de réduire le nombre d'étapes technologiques nécessaires à la réalisation du microsystème. A l'aide de la DRIE la face inférieure nécessiterait deux étapes de masquage avec alignement. Dans un travail précédent [14] a mis au point une technique de gravure KOH pour cette face.

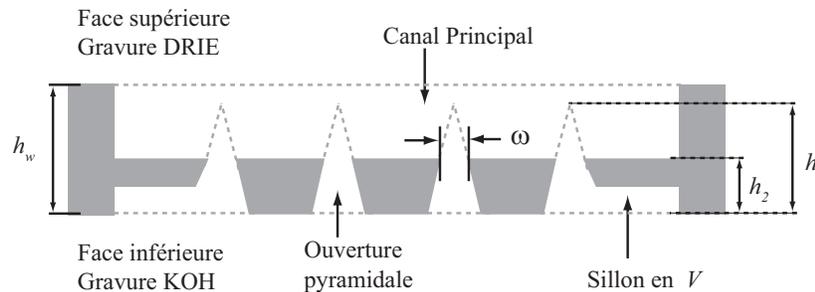


FIGURE 1.3 – Schéma de principe des sites d'immobilisation.

La figure 1.3 montre les deux faces du wafer après usinages. En fait, chaque face est gravée à l'aide d'une technique spécifique. Dans un premier temps, nous gravons la face inférieure du wafer silicium dans un bain de KOH, jusqu'à ce que les ouvertures pyramidales connectées aux sillons en V soient formées. Dans un deuxième temps, nous gravons la face supérieure par DRIE jusqu'à une profondeur qui permet l'obtention d'ouvertures à la dimension désirée. En fait, au cours de cette dernière gravure nous arrêtons le processus de gravure à plusieurs reprises pour mesurer la profondeur des structures ainsi que la taille des ouvertures. Le processus de gravure prend fin une fois la taille des ouvertures souhaitée est atteinte. Il faut noter, que pour cette raison la gravure DRIE est effectuée après la gravure KOH. Au niveau dimensionnel, les données de base sont :

$h_w$  : épaisseur du wafer ( $525 \mu m$ ).  
 $w = 40 \mu m$  : côté de l'ouverture.

Ensuite il reste à calculer :

$h_2$  : profondeur à laquelle l'ouverture fera  $40 \mu m$  de côté ;  
 $h_1$  : profondeur à laquelle se forme l'ouverture pyramidale.

La largeur de  $40 \mu m$  pour la micro-ouverture d'aspiration n'a pas été choisie au hasard. Sadani [14], a montré que cette dimension était bien adaptée à la fois pour le déplacement et pour le piégeage de la cellule. Dans ce qui suit nous détaillons la méthode suivie pour graver chaque face du wafer.

## 1.5 Usinage de la face inférieure

Sur cette face nous allons usiner des ouvertures pyramidales connectées à des microsillons. La technique de gravure du silicium retenue pour atteindre ce but, est la gravure KOH. Le choix de cette méthode se justifie par la résolution géométrique des structures qu'elle offre d'une part, de la possibilité d'obtenir cet usinage en une seule étape d'autre part [14, 38]. Toutefois, bien que nous obtenions facilement des structures à géométries complexes parfaitement dessinées à l'aide de ce type de gravure, quelques architectures simples impliquent la mise au point de structures de compensation parfois complexes. Par exemple la fabrication de sillons en V formant un angle droit convexe [39, 40] ou concave [41] nécessite l'utilisation de motifs supplémentaires insérés au niveau des coins proprement dit.

La technique de compensation utilisée pour obtenir des microsillons formant des angles droits parfaitement définis est décrite en référence [14, 42]. Nous n'y reviendrons donc pas. Un autre motif qui nécessite des structures de compensation est constitué par les ouvertures pyramidales connectées à des microsillons. Une technique de compensation a déjà été proposée pour un cas particulier [38]. Cependant, notre système nécessite une adaptation particulière de cette technique. Dans ce qui suit, nous présentons en détail la structure que nous avons mise au point.

### 1.5.1 Gravure sans structure de compensation

Lorsqu'aucune compensation n'est utilisée, le motif du masque (figure 1.4) est composé d'un sillon défini par une barre de largeur  $2a$  orientée suivant la direction  $\langle 110 \rangle$ . Nous rappelons que le but est d'obtenir une ouverture carrée de côté  $w$  située à une profondeur  $h_2$  (voir figure 1.3). Dans ce cas, nous attendons à que la relation entre  $w$  et la dimension  $2h$  du masque soit donnée par :

$$2h = w + 2h_2 \left[ \frac{1}{\tan \theta} - \frac{V_{\langle 110 \rangle}}{V_{(100)}} \right] \quad (1.1)$$

Où :

---

$\theta = 54.7^\circ$  : est l'angle entre les plans  $\{111\}$  et la surface du wafer.

$V_{\langle 110 \rangle}$  : vitesse de gravure des arêtes  $\langle 110 \rangle$ .

$V_{(100)}$  : vitesse de gravure des plans  $\{100\}$ .

$h_2$  : profondeur à laquelle l'ouverture mesurera  $w$  de côté.

---

Il se trouve que cette relation n'est jamais vérifiée en raison de la sous gravure des plans  $\{411\}$  qui tendent à allonger l'ouverture suivant la direction du sillon. Ces plans prennent naissance aux points  $A$  dès le début de la gravure (voir référence [14] pour une description détaillée de ce phénomène). La conséquence principale est qu'on aboutit à la formation d'ouvertures très allongées dans le sens des microsillons.

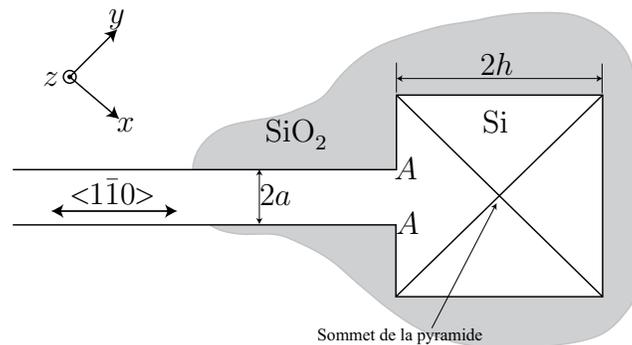


FIGURE 1.4 – Motif du masque non compensé.

### 1.5.2 Étude théorique de la structure de compensation

Cette section est divisée en deux parties. Dans la première, nous présenterons la technique de compensation que nous proposons et nous détaillerons le processus de gravure

qui mène à des sillons connectés à des ouvertures pyramidales. La seconde partie est dédiée à des considérations théoriques et à l'établissement des règles de compensation. Nous rappelons que, le but est d'obtenir des ouvertures pyramidales de profondeur  $h_1$  (voir figure 1.3). Ces dernières débouchent dans le canal principal (profondeur  $h_2$ ) donnant naissance à des ouvertures carrées de côté  $w$ . Il faut noter que, la gravure pourrait être stoppée à la profondeur  $h_2$ . Nous avons préféré poursuivre la gravure jusqu'à une profondeur  $h_1$  pour être sûrs que les ouvertures débouchent dans le canal principal.

### Présentation de l'architecture de la compensation

Afin d'obtenir des ouvertures pyramidales connectées à des sillons avec une bonne définition géométrique, nous proposons la technique de compensation présentée en figure 1.5. Elle consiste à déconnecter le motif du sillon du motif de l'ouverture sur le masque de lithographie. Le masque correspondant à l'ouverture n'est plus un carré mais une sorte de 'C' à l'envers de côté  $2h$ .

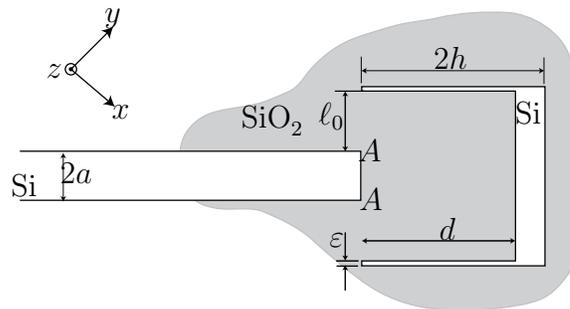


FIGURE 1.5 – Motif du masque compensé.

L'objectif est de retarder l'instant où les plans  $\{411\}$  commencent à se développer depuis les points  $A$ . La structure de compensation est définie comme suit. La dimension latérale est  $2h$ , la largeur des segments en haut et en bas de la compensation est  $\varepsilon$ . Ainsi, la distance entre ces segments et le sillon est  $\ell_0 = h - a - \varepsilon$ . Dans ce qui suit, les termes 'paramètres de compensation', ou CP feront référence à  $d$ , c'est-à-dire la distance entre les points  $A$  et la partie verticale de la structure de compensation. En étudiant la figure 1.5, il est clair que pour une dimension  $\ell_0$  donnée,  $d$  est le paramètre crucial de la compensation. En effet, il détermine l'intervalle de temps entre le début de la gravure et le moment où les plans  $\{411\}$  commencent à se développer depuis les points  $A$ . Au début de la gravure, des sillons en V commencent à se développer dans les ouvertures du masque, de même que des plans  $\{411\}$  depuis les coins convexes de la structure [43]. Lorsque le sillon en V principal est entièrement usiné (figure 1.6), l'ouverture pyramidale commence à se former.

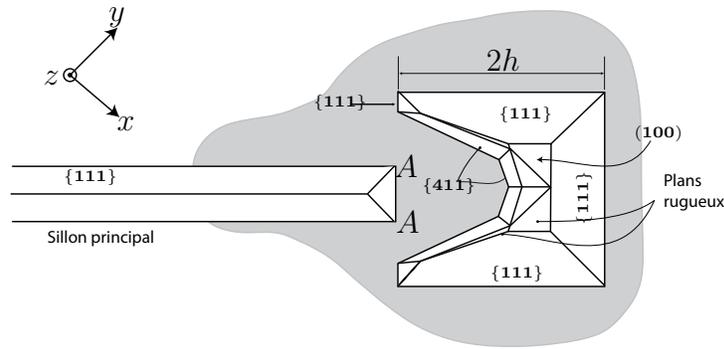


FIGURE 1.6 – Apparition de la future ouverture pyramidale.

Des plans  $\{111\}$  apparaissent depuis les côtés de dimension  $2h$ . Ils conduisent aux surfaces usinées  $\{100\}$ . Dans le même temps, les plans  $\{411\}$  se sont déplacés en direction du sillon. Des surfaces rugueuses relient les plans  $\{411\}$  aux surfaces usinées  $\{100\}$  [39, 44]. Progressivement, et comme il peut être observé sur la figure 1.7, les arêtes  $\langle 410 \rangle$  rejoignent le sillon aux points  $A$ . La surface usinée  $\{100\}$  voit sa dimension diminuer.

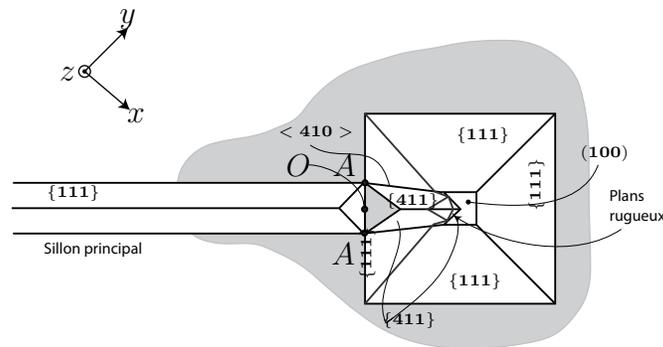


FIGURE 1.7 – Evolution des plans lors de la gravure.

Dès lors, plusieurs processus de gravure ont lieu simultanément (figure 1.8). Certains plans  $\{411\}$  se développent vers l'extérieur de la structure pendant que des plans  $\{771\}$  se forment. Le plan  $\{771\}$ , le plus important est celui de droite (figure 1.8) car il commande la géométrie de l'ouverture qui apparaîtra dans le canal principal à la suite de la gravure DRIE de l'autre face.

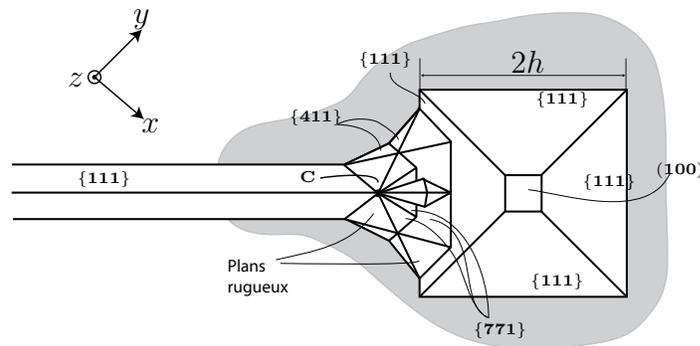


FIGURE 1.8 – Connexion du canal avant la formation de l'ouverture.

Notons que de nouvelles surfaces rugueuses se développent pendant cette phase de la gravure. Ensuite certains des plans  $\{771\}$  se rejoignent au point  $C$  dans le fond du sillon. Au niveau du point  $C$ , une surface  $(100)$  apparaît et se développe vers le bas du wafer. Lorsque la gravure est complètement terminée (figure 1.9) les plans  $\{111\}$  se rejoignent au sommet de la pyramide au point  $(D)$ . Le point  $(D)$  est centré par rapport aux motifs initiaux «  $2h$  » du masque.

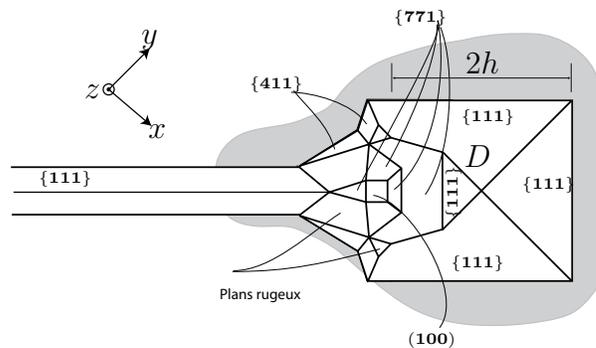


FIGURE 1.9 – Formation de l'ouverture pyramidale.

En conclusion de cette partie, trois principales étapes se distinguent dans le processus de gravure. La première étape correspond à la période entre le début de la gravure et le moment où les arêtes  $\langle 410 \rangle$  rejoignent les points  $A$  (en fait quand les plans  $\{771\}$  apparaissent). La deuxième étape s'étend de la fin de la première étape jusqu'à l'instant où le sillon est connecté (quand les arêtes convergent vers le point  $O$ ). Enfin, la troisième étape dure jusqu'au moment où la pyramide est formée.

### 1.5.3 Règles de définition de la structure de compensation

La partie précédente met en évidence l'existence de limites pour la dimension  $d$  de la compensation. La dimension maximale pour  $d$  est dictée par le fait que le sillon doit être

connecté quand la pyramide est formée. En d'autres termes, la fin de la deuxième étape doit correspondre à la fin de la gravure. Cela fixe une valeur maximum pour  $d$ . En effet, si  $d$  est plus grand que cette valeur, la gravure ne dure pas assez longtemps pour que le sillon soit connecté. Remarquons que le plan  $\{771\}$  se développe suffisamment tôt pour lui permettre d'atteindre la profondeur  $h_2$  avant la fin de la gravure, l'ouverture finale, au niveau du canal principal sera rectangulaire [38]. Cela fixe une valeur minimale pour  $d$ . Dans cette partie nous calculerons les valeurs limites acceptables pour le paramètre de compensation.

### Calcul des valeurs maximales pour $d$

Comme nous l'avons précisé précédemment, la valeur maximale  $d$  est régie par le temps nécessaire pour que les arêtes rejoignent le point  $O$ . A ce stade, il nous faut déterminer laquelle des arêtes nous devons considérer. Pour expliquer ceci, nous nous référons à la figure 1.10, où les proportions ont été intentionnellement exagérées et où nous représentons que la partie supérieure de la compensation. Pendant le processus de gravure les arêtes convergent vers le point  $O$ . La question est de savoir laquelle des deux arêtes arrive en premier au point  $O$ . Comme nous pouvons le voir sur la figure 1.10, la réponse dépend de l'inconnue  $d$ .

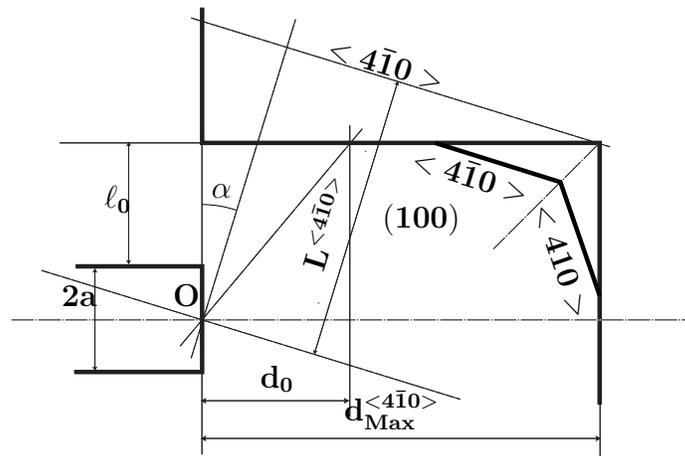


FIGURE 1.10 – : L'arête  $\langle 4\bar{1}0 \rangle$  arrive la première au point  $O$ .

Un élément de réponse consiste à remarquer que l'intersection entre les arêtes  $\langle 4\bar{1}0 \rangle$  et  $\langle 410 \rangle$  se déplace selon la direction avec un angle de  $45^\circ$  par rapport à l'axe du sillon. Ici, nous percevons un cas particulier pour lequel les deux arêtes arrivent au point  $O$  en même temps. Ce cas particulier correspond à une valeur de  $d$  donnée par :

$$d_0 = l_0 + a \quad (1.2)$$

Maintenant, pour chacune des arêtes nous calculons la valeur correspondante de  $d_{Max}$ . Nous appellerons ces valeurs  $d_{Max}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle}$  et  $d_{Max}^{\langle 410 \rangle}$  (figure 1.10). Enfin, nous comparerons les

valeurs calculées avec  $d_0$ . Si c'est l'arête  $\langle 4\bar{1}0 \rangle$  qui rejoint le point  $O$  en premier,  $d_{Max}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle}$  doit être supérieure à  $d_0$ . Par contre, si c'est l'arête  $\langle 410 \rangle$  qui arrive en premier au point  $O$ ,  $d_{Max}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle}$  doit être inférieure à  $d_0$ . Nous nous référons à la figure 1.10 pour calculer  $d_{Max}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle}$ . La distance que l'arête  $\langle 4\bar{1}0 \rangle$  doit parcourir est donnée par :

$$L^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} = (\cos \alpha) \times \left[ \ell_0 + a + d_{Max}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} \times \tan \alpha \right] \quad (1.3)$$

Le temps nécessaire à ce parcours est :

$$\tau^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} = \frac{L^{\langle 4\bar{1}0 \rangle}}{V_{\langle 4\bar{1}0 \rangle}} = \frac{\cos \alpha}{V_{\langle 4\bar{1}0 \rangle}} \left[ \ell_0 + a + d_{Max}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} \times \tan \alpha \right] \quad (1.4)$$

Rappelons que  $\tau^{\langle 4\bar{1}0 \rangle}$  doit être inférieur ou égal à  $T = h_1/V_{(100)}$  le temps requis pour former la pyramide. Dans le cas contraire le sillon ne sera pas connecté. Nous aurons alors :

$$d_{Max}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} = \frac{1}{\tan \alpha} \left[ \frac{h_1 V_{\langle 4\bar{1}0 \rangle}}{V_{(100)} \cos \alpha} - (\ell_0 + a) \right] \quad (1.5)$$

Intéressons nous, maintenant, au cas où l'arête  $\langle 410 \rangle$  arrive en premier au point  $O$  (figure 1.11). Un calcul similaire au premier calcul nous donne la valeur :

$$d_{Max}^{\langle 410 \rangle} = \left[ \frac{h_1 V_{\langle 410 \rangle}}{V_{(100)} \cos \alpha} - (\ell_0 + a) \tan \alpha \right] \quad (1.6)$$

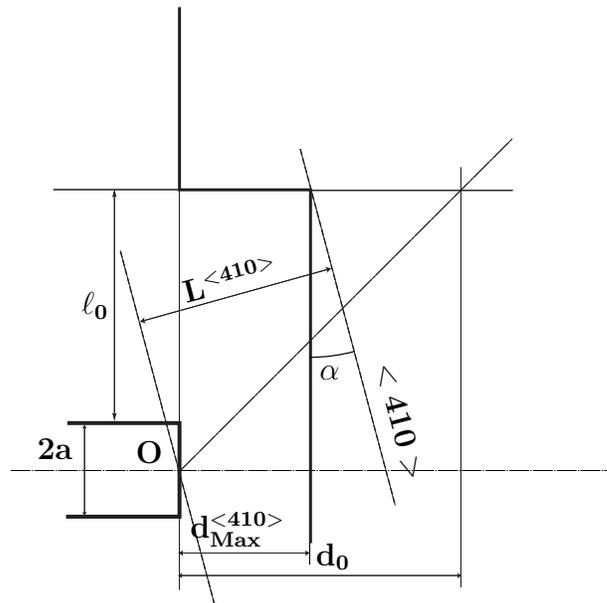
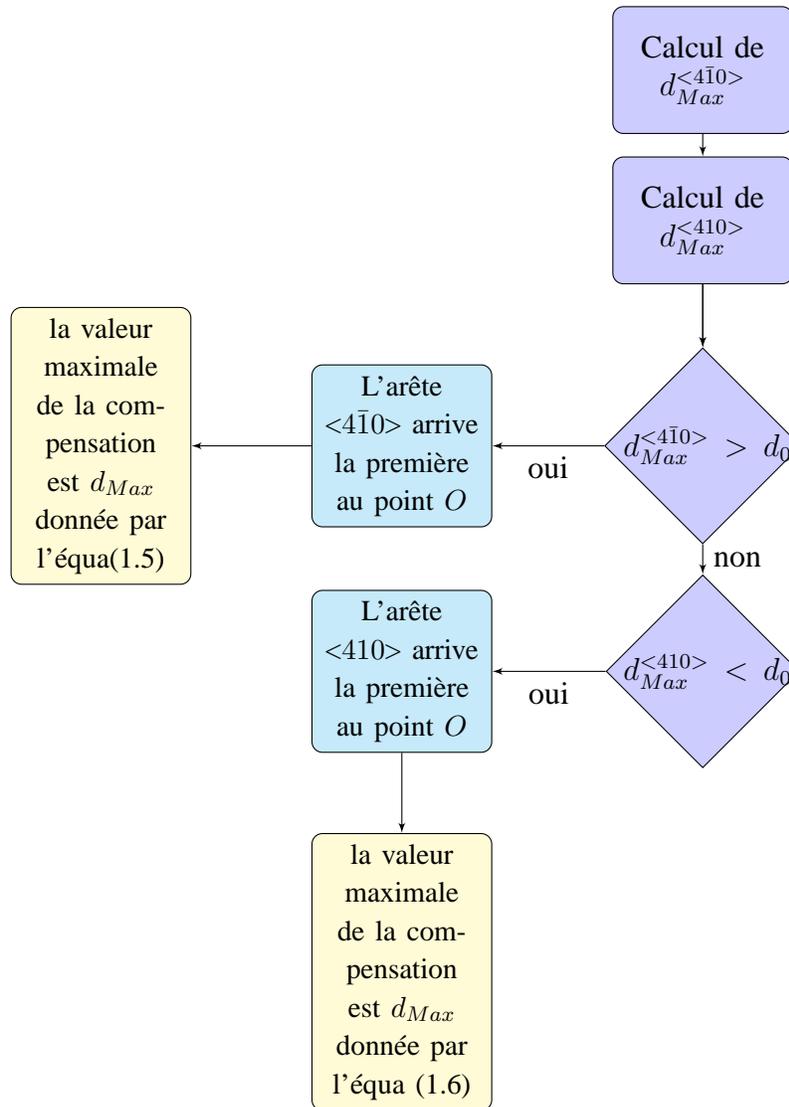


FIGURE 1.11 – : L'arête  $\langle 410 \rangle$  arrive la première au point  $O$ .

Nous venons d'établir les expressions des paramètres  $d_{Max}$  concernant chacune des arêtes  $\langle 4\bar{1}0 \rangle$  et  $\langle 410 \rangle$ . Les conditions définissant l'ordre d'arrivée des arêtes au point  $O$  en fonction du paramètre  $d$  sont les suivantes :

L'arête  $\langle 4\bar{1}0 \rangle$  arrive la première au point  $O$  si :  $d_{Max}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} > d_0$ .  
 L'arête  $\langle 410 \rangle$  arrive la première au point  $O$  si :  $d_{Max}^{\langle 410 \rangle} < d_0$ .

Dans la pratique nous procédons comme suit :



Maintenant que nous avons déterminé les conditions pour lesquelles la connexion est établie au moment où l'ouverture pyramidale est formée à une profondeur  $h_1$ , nous allons

calculer les valeurs minimales du paramètre  $d$  pour obtenir des ouvertures carrées à la profondeur  $h_2$ .

Calcul des valeurs minimales pour  $d$

Avant de calculer la valeur minimum acceptable pour  $d$ , nous rappelons que le plan  $\{771\}$  ne doit pas avoir atteint la profondeur  $h_2$  lorsque la gravure est terminée. Il nous faut donc évaluer le temps  $\tau$  nécessaire pour que ce plan  $\{771\}$  atteigne la profondeur  $h_2$ . Sachant que cette durée  $\tau$  doit être inférieure au temps de gravure total, nous calculons la valeur minimum admise pour  $d$ .

Le temps  $\tau$  peut s'écrire sous la forme :

$$\tau = \tau_1 + \tau_2$$

$\tau_1$  : le temps nécessaire pour qu'une des arêtes  $\langle 410 \rangle$  atteigne un des point  $A$  (naissance du plan  $\{771\}$ );

$\tau_2$  : représente le temps mis par le plan  $\{771\}$  pour évoluer à travers le wafer jusqu'à la profondeur  $h_2$ .

L'idée du calcul est la suivante :

- Calcul des temps  $\tau_1^{\langle 410 \rangle}$  et  $\tau_1^{\langle 4\bar{1}0 \rangle}$  nécessaires pour que les arêtes  $\langle 410 \rangle$  ou  $\langle 4\bar{1}0 \rangle$  arrivent au point  $A$ .
- Calcul du temps  $\tau_2$  nécessaire pour que le plan  $\{771\}$  parvienne à la profondeur  $h_2$ .
- Détermination de  $\tau^{\langle 410 \rangle} = \tau_1^{\langle 410 \rangle} + \tau_2$  et  $\tau^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} = \tau_1^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} + \tau_2$ .
- Introduction des contraintes :  $\tau^{\langle 410 \rangle}$  ou  $\tau^{\langle 4\bar{1}0 \rangle}$  doivent être supérieurs au temps de gravure totale, c'est-à-dire  $\tau^{\langle 410 \rangle}$  ou  $\tau^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} \geq h_1/V_{(100)}$ .
- Déduction des expressions correspondantes de  $d_{Min}^{\langle 410 \rangle}$  et  $d_{Min}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle}$  que nous comparerons à  $d_0$  (de manière analogue à ce qui a été fait pour  $d_{Max}$ ).

L'expression de  $\tau_1$  s'établit de la même manière que celle de  $d_{Max}$ . Seulement cette fois, c'est l'arête qui arrive au point  $A$  en premier qu'il faut déterminer. Pour cela, nous devons considérer un cas particulier légèrement différent de celui pris en compte précédemment. Puisque c'est le point  $A$  et non plus le point  $O$  qu'il faut considérer,  $d_0$  est simplement donné par :

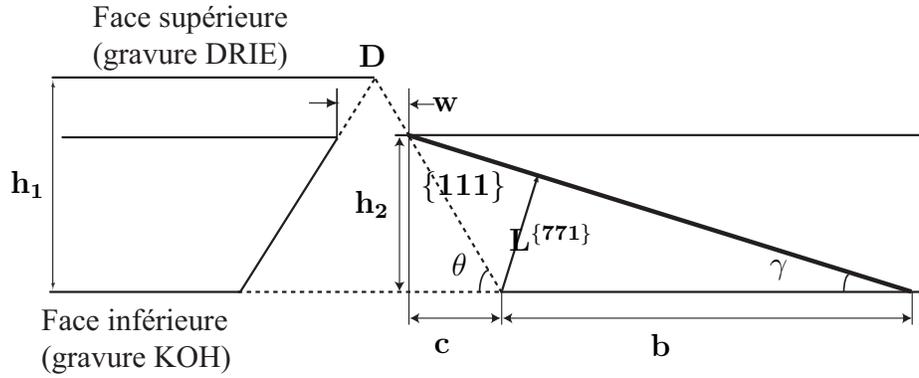
$$d_0 = \ell_0 \quad (1.7)$$

Dans ce cas, nous obtenons les expressions suivantes :

$$\tau_1^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} = \frac{\cos \alpha}{V_{\langle 4\bar{1}0 \rangle}} \left( \ell_0 + d_{Min}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} \tan \alpha \right) \quad (1.8)$$

$$\tau_1^{\langle 410 \rangle} = \frac{\cos \alpha}{V_{\langle 410 \rangle}} \left( \ell_0 \tan \alpha + d_{Min}^{\langle 410 \rangle} \right) \quad (1.9)$$

Pour calculer  $\tau_2$  nous considérerons la figure 1.12, qui représente une vue en coupe de ce qui se passe en dessous du point  $A$ .

FIGURE 1.12 – : Parcours du plan  $\{771\}$ .

De cette figure nous déduisons les expressions suivantes :

$$\tan \theta = \frac{h_2}{c} \quad (1.10)$$

$$\tan \gamma = \frac{h_2}{b+c} \quad (1.11)$$

$$\sin \gamma = \frac{L^{\{771\}}}{b} \quad (1.12)$$

avec  $L^{\{771\}} = V_{\{771\}} \tau_2$

Desquelles nous obtenons :

$$\tau_2 = \frac{h_2}{V_{\{771\}}} \sin \gamma \left[ \frac{1}{\tan \gamma} - \frac{1}{\tan \theta} \right] \quad (1.13)$$

En combinant les relations 1.8 et 1.13, nous obtenons les expressions de  $\tau^{\langle 4\bar{1}0 \rangle}$  et  $\tau^{\langle 410 \rangle}$ . Rappelons que  $\tau$  doit être supérieur ou égale au temps total de la gravure  $T$ . Nous en déduisons alors :

$$d_{Min}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} = \frac{V_{\langle 4\bar{1}0 \rangle}}{\sin \alpha} \left[ \frac{h_1}{V_{(100)}} - \frac{h_2}{V_{\{771\}}} \sin \gamma \left( \frac{1}{\tan \gamma} - \frac{1}{\tan \theta} \right) \right] - \frac{\ell_0}{\tan \alpha}$$

$$d_{Min}^{\langle 410 \rangle} = \frac{V_{\langle 410 \rangle}}{\cos \alpha} \left[ \frac{h_1}{V_{(100)}} - \frac{h_2}{V_{\{771\}}} \sin \gamma \left( \frac{1}{\tan \gamma} - \frac{1}{\tan \theta} \right) \right] - \ell_0 \tan \alpha$$

En ce qui concerne le paramètre  $d_{Min}$ , le raisonnement sur l'ordre d'arrivée des arêtes en fonction du paramètre de compensation est similaire au précédent, à la différence que  $d_0 = \ell_0$ , ce qui conduit à :

L'arête  $\langle 4\bar{1}0 \rangle$  arrive la première au point  $O$  si :  $d_{Min}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} > d_0$ .  
 L'arête  $\langle 410 \rangle$  arrive la première au point  $O$  si :  $d_{Min}^{\langle 410 \rangle} < d_0$ .

Dans la pratique, nous procédons suivant le même principe pour la détermination de  $d_{Max}$ . Les inégalités établies ci-dessus définissent un domaine réunissant l'ensemble des valeurs des paramètres de compensation pour lesquelles nous obtenons un microcanal correctement connecté à une ouverture carrée non déformée au niveau du canal principal (profondeur  $h_2$ ). Les valeurs numériques des angles et des vitesses de gravure peuvent être trouvées en référence [38].

#### 1.5.4 Influence des sous gravures des plans $\{111\}$

Dans ce qui précède, nous n'avons pas tenu compte de l'évolution des plans  $\{111\}$  pendant la gravure. En réalité ces plans subissent une sous gravure. Cette dernière tend à translater le point  $A$  vers le haut suivant la direction  $\langle 110 \rangle$  (figure 1.13). Cette sous gravure des plans  $\{111\}$  se traduit par une augmentation des dimensions des microsillons d'une valeur :

$$\delta = \text{temps de gravure} \times V_{\langle 110 \rangle}$$

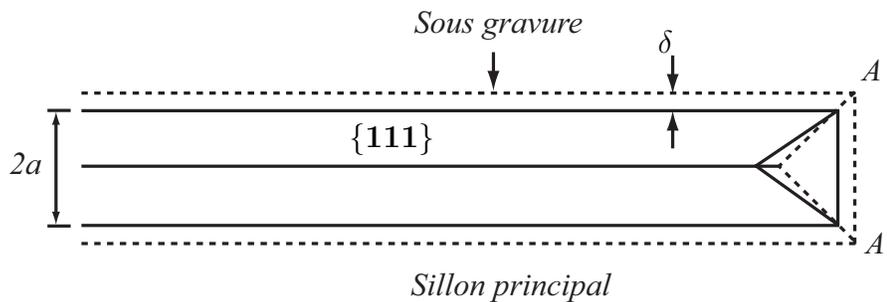


FIGURE 1.13 – Schéma de la sous gravure.

La durée  $\tau_1$  réelle est donc plus petite que celle exprimée précédemment. Cependant, la manière de conduire les calculs reste la même. Les paramètres de  $d$  prennent alors les formes suivantes :

Les valeurs maximales pour  $d$  sont données par :

$$d_{Max}^{\langle 4\bar{1}0 \rangle} = \frac{1}{\tan \alpha} \left[ \frac{h_1 V_{\langle 4\bar{1}0 \rangle}}{V_{(100)} \cos \alpha} - \left( \ell_0 + a - h_1 \frac{V_{\langle 110 \rangle}}{V_{(100)}} \right) \right] + h_1 \frac{V_{\langle 110 \rangle}}{V_{(100)}}$$

$$d_{Max}^{\langle 410 \rangle} = \frac{h_1 V_{\langle 410 \rangle}}{\cos \alpha V_{\langle 100 \rangle}} - \left( \ell_0 + a - h_1 \frac{V_{\langle 110 \rangle}}{V_{(100)}} \right) \tan \alpha + h_1 \frac{V_{\langle 110 \rangle}}{V_{(100)}}$$

Valeurs à comparer avec  $d_0 = \left( \ell_0 + a - h_1 \frac{V_{\langle 110 \rangle}}{V_{(100)}} \right)$ .

Les valeurs minimales pour  $d$  sont données par :

$$d_{Min}^{<4\bar{1}0>} = \frac{1}{\tan \alpha} \left\{ \frac{1}{\eta} \left[ \frac{h_1}{V_{(100)}} - \frac{h_2}{V_{\{771\}}} \sin \gamma \left( \frac{1}{\tan \gamma} - \frac{1}{\tan \theta} \right) \right] - \ell_0 \right\}$$

$$d_{Min}^{<410>} = \frac{1}{\eta} \left[ \frac{h_1}{V_{(100)}} - \frac{h_2}{V_{\{771\}}} \sin \gamma \left( \frac{1}{\tan \gamma} - \frac{1}{\tan \theta} \right) \right] - \ell_0 \tan \alpha$$

Ces dernières valeurs sont à comparer avec  $d_0 = \ell_0 - \tau_1 \times V_{<110>}$  et  $\tau_1^{<4\bar{1}0>} = \tau - \tau_2$ .  
avec :

$$\eta = \frac{\cos \alpha}{V_{<4\bar{1}0>} + V_{<110>} (\cos \alpha + \sin \alpha)}$$

$$\tau_1^{<4\bar{1}0>} = \eta \left[ \ell_0 + d_{Min}^{<4\bar{1}0>} \tan \alpha \right]$$

$$\tau_1^{<410>} = \eta \left[ \ell_0 \tan \alpha + d_{Min}^{<410>} \right]$$

### 1.5.5 Calcul des différents paramètres

Pour obtenir une ouverture de  $40 \mu m$  de côté et une profondeur  $h_2 = 325 \mu m$  :

Les données	
$\alpha$	$30.96^\circ$
$\theta$	$54.7^\circ$
$\gamma$	$25.2^\circ$
$h_w$	$525 \mu m$
$h_2$	$325 \mu m$
$w$	$40 \mu m$
$V_{<110>}$	$0.006 \mu m/min$
$V_{<410>}$	$0.343 \mu m/min$
$V_{(100)}$	$0.26 \mu m/min$
$V_{\{771\}}$	$0.38 \mu m/min$

TABLE 1.1 – Usinage : tableau des données.

À partir de la relation (1.1) nous trouvons :

$$h = 242.62 \mu m$$

Et par conséquent (en prenant pour  $\varepsilon$  la valeur  $3\%(2h)^1$ ) :

1. Valeur choisie arbitrairement.

$h_1$	$= h \times \tan \theta = 342.66 \mu m$
$\varepsilon$	$3\%(2h) = 14.55 \mu m$
$\delta$	$6.49 \mu m$
$2a$	$145 \mu m$
<b>Les valeurs maximales</b>	
$\ell_0$	$= h - \varepsilon = 155.57 \mu m$
$d_0$	$= \ell_0 + a - \delta = 221.58 \mu m$
$d_{Max}^{<4\bar{1}0>}$	$= 518.43 \mu m$
$d_{Max}^{<410>}$	$= 387.29 \mu m$
<b>Les valeurs minimales</b>	
$\ell_0$	$= h - \varepsilon = 155.57 \mu m$
$d_0$	$= \ell_0 - V_{<110>} \times \tau_1 = 151.37 \mu m$
$d_{Min}^{<4\bar{1}0>}$	$= 296.46 \mu m$
$d_{Min}^{<410>}$	$= 240.83 \mu m$

TABLE 1.2 – Usinage : tableau des valeurs de  $d_{Max}$  et de  $d_{Min}$ .

Pour les valeur maximales comme  $d_{Max}^{<4\bar{1}0>} > d_0$  c'est l'arrête  $<4\bar{1}0>$  qui arrive la première au point  $O$ . Pour les valeurs minimales, comme  $d_{Min}^{<4\bar{1}0>} < d_0$  c'est l'arrête  $<4\bar{1}0>$  qui arrive la première au point  $A$ .

Donc, la valeur de  $d$  est située entre  $d_{Max}^{<4\bar{1}0>}$  et  $d_{Min}^{<4\bar{1}0>}$ , dans notre cas nous la choisirons telle que :

$$d = \frac{d_{Max}^{<4\bar{1}0>} + d_{Min}^{<4\bar{1}0>}}{2} = 407.44 \mu m$$

### 1.5.6 Résultats Expérimentaux

Sur la base des techniques de compensation décrites ci-dessus, nous avons réalisé un masque lithographique permettant d'obtenir les ouvertures pyramidales (huit au total) connectées à des sillons. La technique de photolithographie nous permet de transposer ce masque sur un wafer de silicium de taille 4 pouces. Ensuite nous procédons à la gravure KOH de la face arrière du wafer. La figure 1.14 montre une photo MEB de la face inférieure de la plateforme. Nous distinguons sur cette dernière face les microcanaux connectés aux micro-ouvertures qui débouchent sur l'autre face.

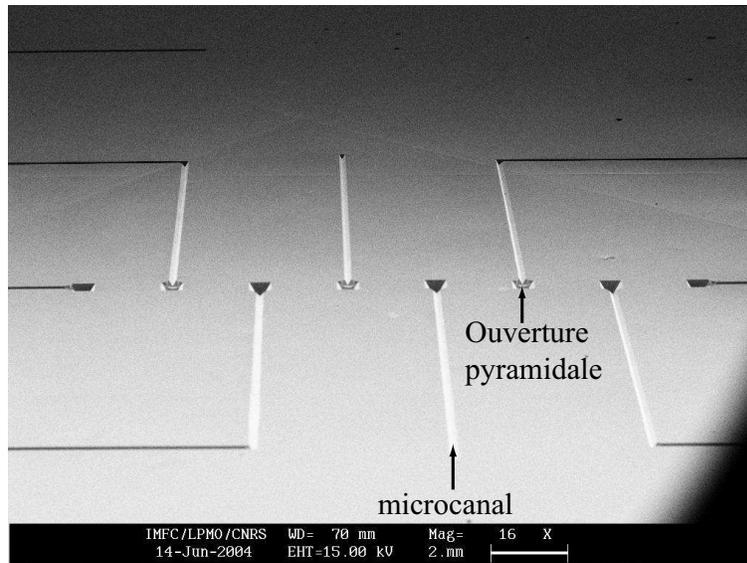
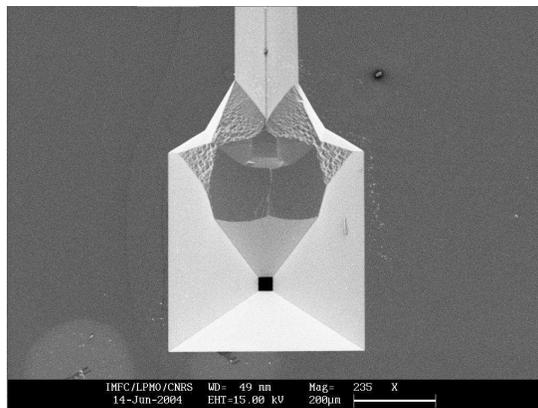
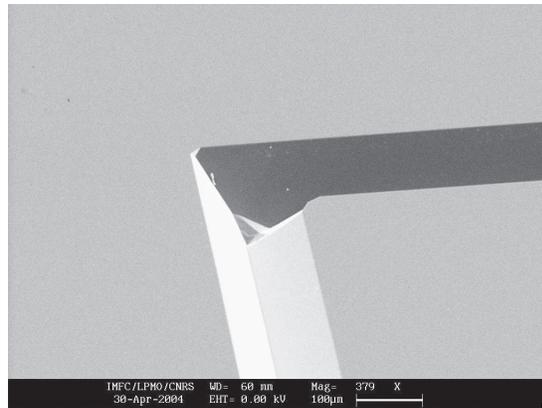


FIGURE 1.14 – Image MEB de la face inférieure.

La figure 1.15(a) montre une vue rapprochée de l'une des ouvertures, où nous pouvons voir clairement la connexion ouverture-canal. La figure 1.15(b), une vue rapprochée d'un angle droit parfaitement compensé.



(a) Image MEB d'une ouverture pyramidale.



(b) Image MEB d'un angle droit.

FIGURE 1.15 – Images MEB illustrant la technique de gravure utilisée.

## 1.6 Usinage de la face supérieure

Sur cette face nous usinons les ouvertures et les canaux nécessaires à l'accueil, au transport et à l'immobilisation de l'ovocyte, ainsi que les ateliers d'analyse. La technique de gravure retenue pour atteindre ce but, est la gravure RIE profonde (Deep Reaction Ion Etching) en raison de la facilité qu'elle nous offre pour obtenir des structures de géométrie variées [37].

### 1.6.1 Mise en œuvre expérimentale

La gravure sèche ou gravure ionique réactive profonde (DRIE) met en œuvre des plasmas. Elle consiste à bombarder la surface d'un substrat placé dans une enceinte sous vide avec un flux de gaz ionisé. Le mécanisme de la DRIE est physico-chimique. Il résulte de la combinaison d'une attaque chimique et d'un bombardement ionique. La superposition d'un bombardement ionique de faible énergie à une attaque chimique dans le plasma permet de contrôler l'anisotropie de la gravure en activant l'attaque sur les surfaces soumises au bombardement ionique. Le principe repose sur une décharge capacitive entre deux plateaux parallèles (électrodes) baignant dans un plasma réactif. Le wafer de silicium est placé dans une enceinte sous vide. Un flux gazeux de  $C_4F_8$  et  $SF_6$  mêlé à l'oxygène est ionisé en traversant un champ radiofréquence (RF) avant d'atteindre la surface du wafer à graver. La couche de protection de silice ( $SiO_2$ ) ouverte par une attaque chimique joue le rôle de masque.

Nous utilisons alternativement les gaz  $C_4F_8$  et  $SF_6$ . Le  $SF_6$  pour la gravure et le  $C_4F_8$  (polymère) pour protéger les flancs donnant naissance à des flancs verticaux. Un champ électrique vertical oriente le plasma vers le bas donnant une gravure profonde. Notons qu'à l'aide de cette technique nous pouvons obtenir des structures à facteur de forme élevée. Il faut noter que cette technique donne naissance à de micro-pics de silicium dus à une re-déposition du matériau dans les surfaces gravées. Ces micro-pics sont généralement appelés « herbe ». Pour les éliminer nous plongeons les échantillons dans un bain KOH pendant quelques secondes.

### 1.6.2 Résultats expérimentaux

#### Résultats expérimentaux concernant la plateforme

Les résultats expérimentaux obtenus à l'aide cette technique sont présentés sur la figure 1.16. Nous y reconnaissons notamment les zones de dépôt et de collection des cellules, les ouvertures qui servent à la fois de système d'aspiration et de sites d'immobilisation. Sur cette figure, nous observons également les sillons destinés à recevoir les fibres optiques (systèmes d'analyse) ainsi que le canal principal qui permet de canaliser le liquide de vie cellulaire et donc d'améliorer la manipulation des cellules.

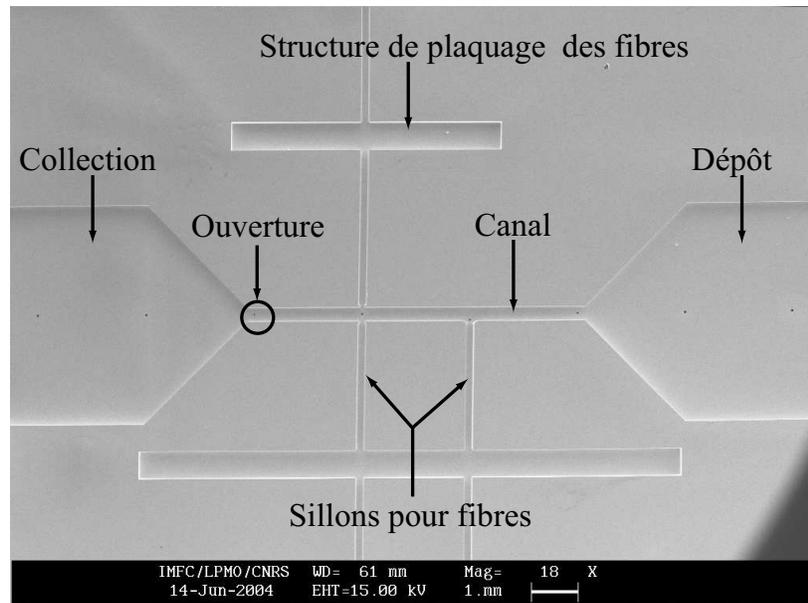


FIGURE 1.16 – Image MEB de la face supérieure.

Les autres structures qui apparaissent sur cette figure sont destinées au plaquage et au collage des fibres optiques. Il faut également noter que les fibres optiques doivent être parfaitement positionnées. Pour cela, des butées sont aménagées à proximité du canal principal. Cet aspect fait l'objet d'une autre partie qui traite des postes d'analyse optique des cellules.

Après la gravure le wafer est désoxydé, puis légèrement oxydé (thermiquement) pour obtenir une fine couche homogène de silice ( $\text{SiO}_2$ ) sur toute la surface ainsi qu'à l'intérieur des ouvertures. Les plateformes acquièrent ainsi une propriété primordiale pour notre application : la non-embryotoxicité.

## Résultats expérimentaux concernant les ouvertures

La plateforme contient huit ouvertures destinées d'une part à l'aspiration du milieu de vie, à piéger les ovocytes sur des sites d'analyses d'autre part. La figure 1.17 montre une vue rapprochée sur l'une des ouvertures. Nous constatons que sa dimension correspond au micromètre près à la taille désirée, ce qui montre l'efficacité des techniques de compensation utilisées mis au point.

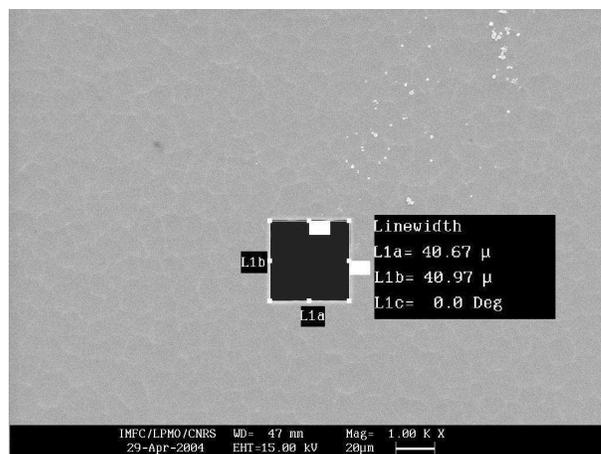


FIGURE 1.17 – Image MEB d’une ouverture.

## Résultats expérimentaux concernant les postes d’analyses

### Présentation schématique

Il est évident que toutes les analyses effectuées sur l’ovocyte doivent présenter un caractère non invasif. La cellule ne doit subir aucun traumatisme susceptible de détériorer son équilibre physiologique ou sa morphologie car après caractérisation, si la cellule est jugée apte, elle est destinée à être fécondée. C’est donc dans ce contexte que nous avons opté pour des systèmes d’analyse optique. Il s’agit ici de deux ateliers de mesures (figure 1.18).

Le premier est dédié à la mesure du spectre de transmission de l’ovocyte. La méthode consiste à bloquer un ovocyte entre deux fibres optiques. La lumière issue d’une fibre émettrice traverse la cellule puis elle est collectée par une fibre réceptrice (figure 1.18(a)).

L’analyse du spectre de transmission permet d’obtenir des informations pertinentes sur différentes caractéristiques des cellules, en particulier sur leur degré de maturité[45]. Cet aspect sera traité plus en détail dans la partie 1.10 de ce chapitre. Le deuxième atelier est dédié à la mesure du pH membranaire de l’ovocyte. La mesure repose sur l’utilisation d’une fibre clivée à l’extrémité de laquelle un fluorophore spécifique est déposé. La longueur d’onde de fluorescence varie avec le pH du milieu en contact avec la fibre. Une mesure du pH membranaire peut être effectuée si l’ovocyte est en contact avec la fibre (figure 1.18(b)), ce qui explique la forme triangulaire des butées, et la position excentrique de la micro-ouverture.

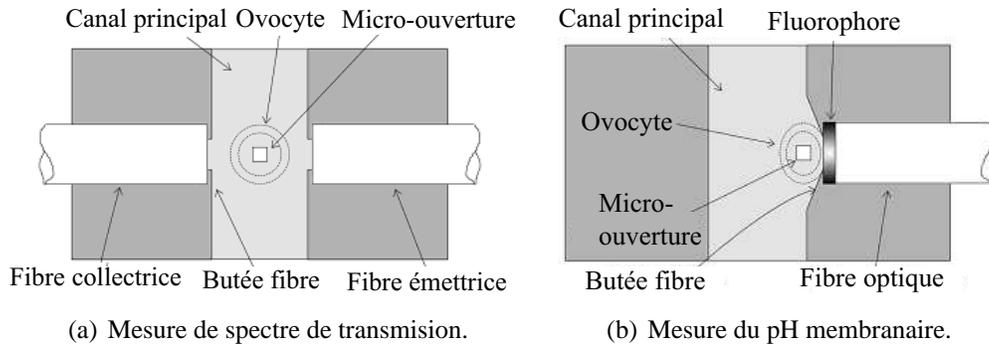


FIGURE 1.18 – Schéma de principe des ateliers de mesures.

## Résultats expérimentaux

La figure 1.19, montre des vues rapprochées. Sur la figure 1.19(a), nous reconnaissons les sillons pour les fibres destinées à la mesure du spectre de transmission de l'indice de réfraction de la cellule (à noter la bonne géométrie des butées de fibres ainsi que de l'ouverture d'aspiration). La figure 1.19(b), montre la butée pour la fibre de mesure du pH membranaire. Nous remarquons l'évasement du canal principal à cet endroit ainsi que le décalage de l'ouverture d'aspiration vers les butées. Ceci permet de positionner la cellule en contact avec la fibre sans risquer de l'endommager.

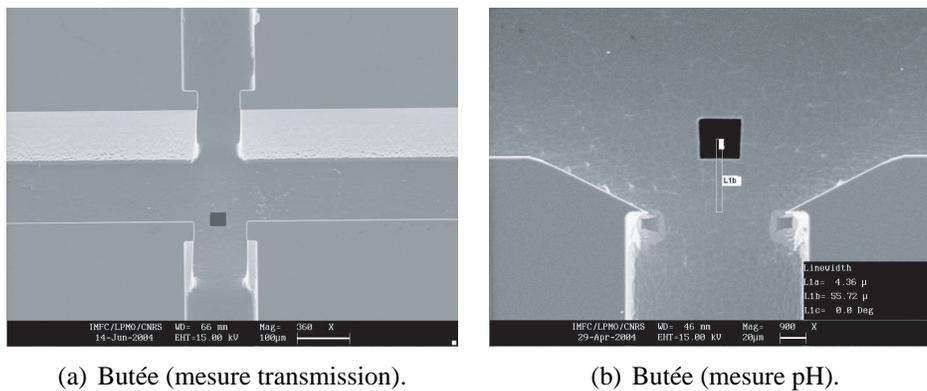


FIGURE 1.19 – Résultats expérimentaux ateliers d'analyses.

Il faut conclure de ces résultats que le procédé DRIE que nous avons utilisé est parfaitement adapté à la gravure de motifs de grandes dimensions (zones de dépôt et de collection des cellules), mais également à la définition de motifs beaucoup plus petits (butées carrées ou triangulaires).

### 1.6.3 Conclusion

Les études décrites dans cette partie concernent la réalisation de la partie silicium de notre microsysteme. Cette étape, nécessite l'utilisation de deux techniques différentes de gravure du silicium et l'exploitation de chacune des deux faces du wafer.

Dans un premier temps, nous avons décrit la face inférieure de cette partie silicium. Nous avons mis au point une structure de compensation spécifique nous permettant d'obtenir des microsillons connectés à des ouvertures pyramidales lors d'une gravure humide (bain KOH) qui s'effectue sur une épaisseur d'environ  $325 \mu m$ . Il est important de noter que notre méthode est simple et facile à mettre en œuvre. Elle nécessite une seule opération de lithographie et une seule étape de gravure.

Dans un deuxième temps, nous avons présenté la gravure de la face supérieure. Sur cette face nous avons utilisé la technique de gravure sèche (DRIE) qui nous a permis d'obtenir des structures de différentes géométries. Ce type de gravure ne nécessite aucune compensation particulière au niveau du masque de photolithographie. En revanche la qualité des flancs implique une adaptation des paramètres de gravure. Il faut noter la grande précision de cette technique ainsi que sa rapidité. Elle ne nécessite qu'une étape de lithographie et une quarantaine de minutes pour effectuer le processus de gravure. En fait, nous arrêtons le procédé dès que les ouvertures d'aspiration atteignent la dimension désirée (ici  $40 \mu m$  de côté). Cette gravure doit être suivie par une gravure KOH pendant quelques minutes pour éliminer l'herbe produite dans le fond des structures gravées.

## 1.7 La partie verre

Pour assurer l'étanchéité des microsillons usinés sur la face inférieure de la plateforme silicium, nous utilisons un wafer en verre (pyrex 7740). Dans ce wafer nous allons réaliser des ouvertures qui permettent la liaison entre le système d'aspiration et la plateforme silicium. Dans cette partie nous décrivons les techniques de réalisation des ouvertures.

### 1.7.1 Présentation schématique

La réalisation des ouvertures dans ce wafer nécessite la génération d'un masque lithographique.

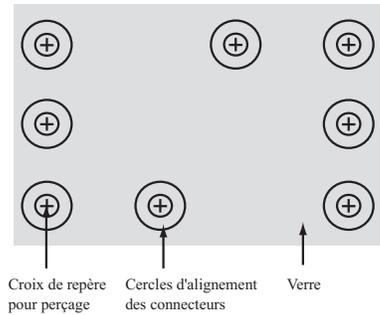


FIGURE 1.20 – Une partie du masque pour les ouvertures.

La figure 1.20 représente un schéma d'une partie du masque. Les croix sur le schéma représentent les endroits de perçage des ouvertures. Les petits cercles facilitent le repérage des ouvertures et les grands cercles facilitent le positionnement des connecteurs microfluidiques lors de leurs collages sur la plaquette de verre. La transposition du masque sur un wafer en pyrex demande l'utilisation d'une technique appelée Lift-off [46]. Cette dernière permet de réaliser des motifs en chrome-or sur le wafer en verre. Il faut noter que les croix représentent l'emplacement des futures ouvertures et que chacune d'elles doit être parfaitement positionnée par rapport à l'extrémité du canal qui lui correspond.

### 1.7.2 Résultats expérimentaux

L'usinage de la partie verre se décompose donc en deux parties : la lithographie et le perçage. La figure 1.21 (a) montre une vue du wafer de verre prêt pour le perçage. La figure 1.21 (b) montre les ouvertures dans le wafer réalisés par perçage mécanique (usinage diamant). Leur diamètre est de 1mm, dimension adaptée aux connecteurs microfluidiques commerciaux.

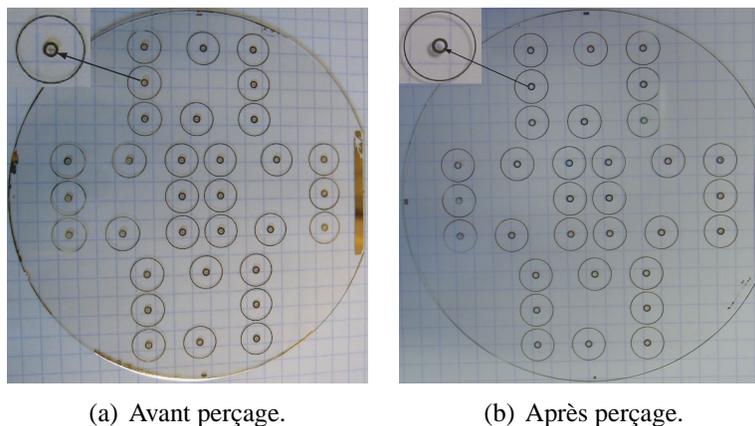


FIGURE 1.21 – Wafer de verre (4 pouces) après lift-off.

## 1.8 Assemblage du microsystème

A ce stade les principales parties du microsystème ont été réalisées. Il nous reste à les assembler pour obtenir un microsystème complet. Dans cette partie, nous allons décrire les techniques et les méthodes utilisées pour effectuer cet assemblage.

Nous commençons par la soudure de la partie inférieure du wafer silicium sur le wafer de verre, afin d'assurer l'étanchéité des microcanaux. Pour cela nous utilisons une technique appelée soudure anodique (anodic bonding). Cette dernière est utilisée pour souder hermétiquement du verre à du métal [47] ou des semi-conducteurs [48, 49]. Pour les soudures faisant intervenir du silicium, le verre pyrex 7740 est particulièrement bien adapté [50]. Dans notre cas il est important d'aligner les deux wafers, afin que les ouvertures du verre coïncident avec les extrémités des microcanaux de la partie silicium. Nous devons donc effectuer une soudure avec alignement. L'alignement des deux wafers est effectué sur un aligneur de type EVG. Les deux wafers (silicium-pyrex) alignés et plaqués l'un contre l'autre sont transportés dans le bâti de soudure anodique. Nous appliquons une certaine pression sur les deux wafers avant de créer un vide léger dans la chambre de soudure. Nous portons ensuite la température des wafers aux alentours de 400°C.

Dans ces conditions, les ions sodium présents dans le verre acquièrent une grande mobilité. Une tension élevée ( $>1$  kV) est alors appliquée entre le pyrex et le silicium. Les cations migrent en direction de la cathode tandis que les anions immobiles forment une couche de charges négatives au voisinage de l'interface verre-silicium. Ce phénomène génère des forces électrostatiques puissantes à l'interface qui plaquent les wafers l'un contre l'autre. La soudure est établie grâce à des interactions chimiques entre les atomes de silicium et les anions.

Nous avons ainsi réalisé avec succès une soudure totalement étanche et résistante. La résistance a d'ailleurs été mise à l'épreuve lors de la dernière étape constituée par le découpage des wafers à la scie diamant. Nous obtenons ainsi une plateforme finie dont une vue de dessous est présentée sur la figure 1.22.



FIGURE 1.22 – Face inférieure après la soudure anodique.

### 1.8.1 Montage des connecteurs microfluidiques

Afin, d'établir une connexion étanche entre la plateforme et le système d'aspiration, des connecteurs microfluidiques commerciaux ont été utilisés (figure 1.23).



FIGURE 1.23 – Montage des connecteurs microfluidiques.

Ces derniers sont collés sur la partie verre juste en face des ouvertures. Nous avons parfait ensuite le collage par une étape d'étuvage à 65°C pendant 90 minutes.

Un premier test d'étanchéité du système a été effectué avec de l'eau. Cet essai confirme la bonne tenue des différents assemblages comme l'illustre la figure 1.24.

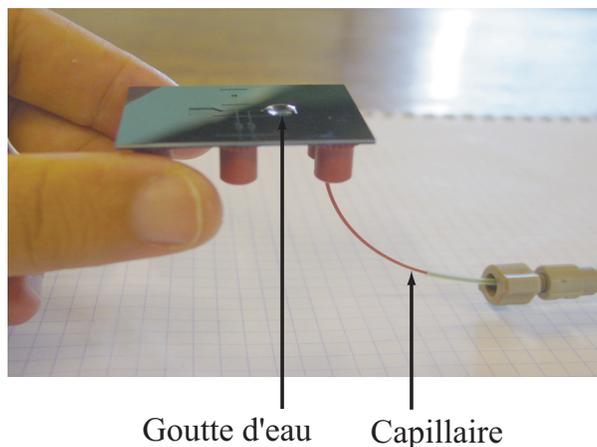


FIGURE 1.24 – Test des connecteurs.

### 1.8.2 Montage des fibres optiques et des capillaires microfluidiques

Il s'agit ici de fibrer le composant et d'établir la connexion entre la plateforme et le système d'aspiration. En ce qui concerne le fibrage du composant, la plateforme est placée sur un dispositif de fibrage spécialement conçu pour cette opération (figure 1.25). Pour le capteur pH membranaire, nous utilisons une fibre de 100  $\mu\text{m}$  de cœur. Pour le système de mesure de spectre de transmission, nous utilisons une fibre de 50  $\mu\text{m}$  de cœur pour l'émission et une autre de 100  $\mu\text{m}$  pour la collection. Les extrémités des fibres sont clivées.

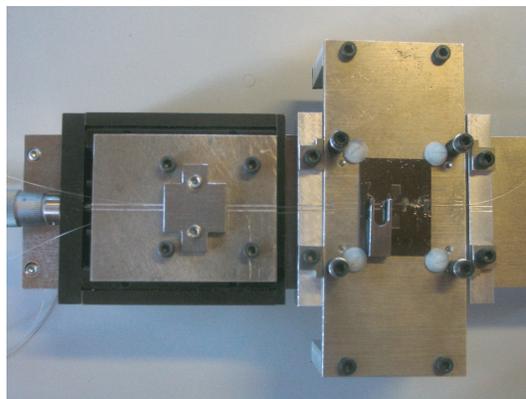
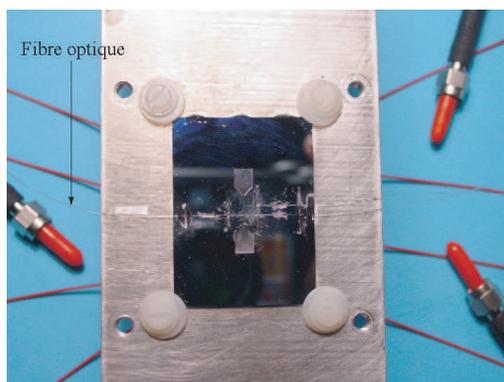


FIGURE 1.25 – Dispositif de fibrage de la plateforme.

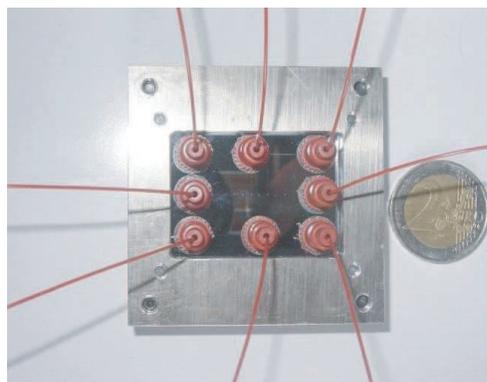
1

Sous binoculaire nous plaçons les fibres dans leurs sillons respectifs. Nous les faisons ensuite glisser dans les sillons (platine de translation) jusqu'à ce qu'elles arrivent en contact avec les butées de fibre (figure 1.19). Nous nous assurons que les fibres sont bien au fond des sillons, en utilisant une petite masse qui vient s'insérer dans des structures spécialement gravées sur la plateforme (figure 1.16). Le collage des fibres est assuré par le dépôt de petites quantités d'une colle biocompatible dans les endroits prévus pour cela sur la plateforme. Le résultat du montage des fibres est visible sur la figure 1.26(a).

En ce qui concerne la connexion de la plateforme à un système d'aspiration nous utilisons des capillaires de  $125\ \mu\text{m}$  de diamètre. Sur la figure 1.26(b), nous montrons la face inférieure de la plateforme après le montage des capillaires.



(a) Connexion des fibres optiques.



(b) Connexion des capillaires.

FIGURE 1.26 – Plateforme et les connexions associées.

### 1.8.3 Montage expérimental pour la manipulation et l'analyse de l'ovocyte

Le système utilisé pour la manipulation et l'analyse des ovocytes est présenté sur la figure 1.27. Il est composé de :

- Une binoculaire dotée d'une caméra CCD (Charge-Coupled Device), qui permet d'observer et d'enregistrer les manipulations en temps réel.
- Un système d'aspiration composé de micro-injecteurs et de capillaires reliés à la plateforme.
- Un système d'analyse composé, d'une source de lumière blanche connectée à la fibre émettrice, un spectromètre connecté d'un côté à la fibre réceptrice et de l'autre à un PC muni d'un logiciel d'analyse des spectres.

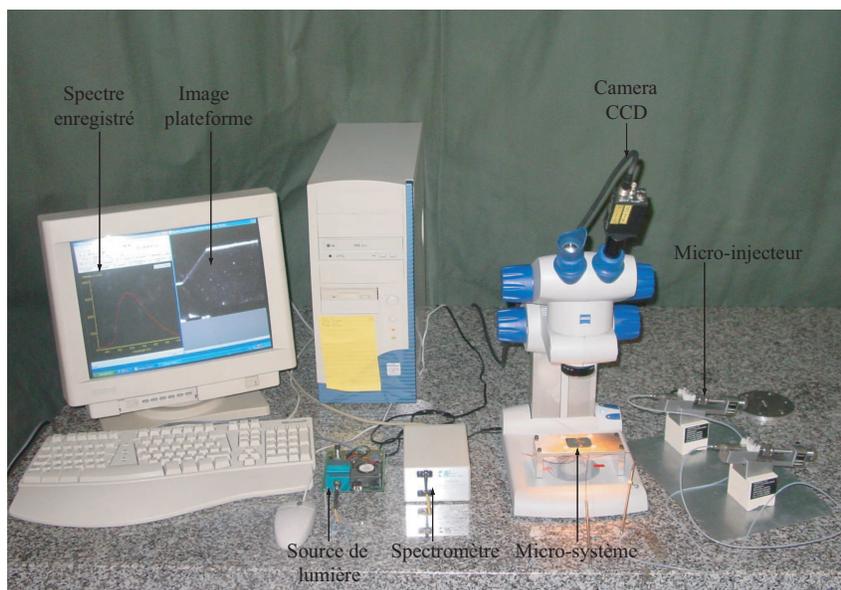


FIGURE 1.27 – Montage expérimental pour la manipulation et l'analyse d'un ovocyte.

Il faut noter que les résultats qui vont être présentés ne concernent que le déplacement, le piégeage d'ovocytes et la mesure du spectre de transmission. La mesure du pH membranaire a été reportée. En effet la mesure du pH nécessite de mettre l'ovocyte en contact avec un fluorophore. Ce dernier doit être incorporé à un polymère déposé en bout de fibre. La mise en point d'un tel polymère embryo-compatible et résistant (pas de contamination de la cellule) nécessite de longues études que nous n'avons pas pu inclure dans le travail présenté ici.

## 1.9 Résultats Expérimentaux des Manipulations de billes et d'ovocytes

Dans un premier temps, le microsysteme a été validé avec des billes en polystyrène qui présentent le même diamètre que les ovocytes. Dans un deuxième temps, une série d'expérimentations a été effectuée au CHU de Besançon sur des ovocytes surnuméraires.

### 1.9.1 Validation du microsysteme avec des billes en polystyrène

Les billes sont déposées dans l'un des deux réservoirs de la plateforme silicium dans un milieu liquide. Nous avons filmé le déplacement des billes d'une ouverture à une autre à l'aide de la caméra CCD. Au cours des expérimentations nous avons constaté que le déplacement des billes dans l'eau et avec des micro-injecteurs, s'est révélé impossible. Il semblerait que des effets de surface (non identifiés) provoquent l'adhérence des billes sur le silicium oxydé. La force de traînée nécessaire à la mise en mouvement des billes est alors importante. Nous avons donc utilisé un liquide plus visqueux (huile) et remplacé les micro-injecteurs par des seringues.

La figure 1.28 montre une bille dans différentes positions pendant son déplacement. Sur la figure 1.28(a) nous voyons la bille près de la première ouverture. L'aspiration du liquide à travers la première ouverture entraîne le déplacement de la bille et son positionnement sur l'ouverture (figure 1.28(b)). L'aspiration du liquide à travers la deuxième ouverture accompagné par son expulsion de la première ouverture permet le déplacement et le positionnement de la bille sur la deuxième ouverture (figure 1.28 (c)). La répétition de l'expulsion et de l'aspiration entraîne le déplacement de la bille d'une ouverture à une autre tout au long de la plateforme (voir les figures (d) (e), (f), (g), (h) et (i)). Enfin, il faut noter le parfait positionnement des billes sur les ouvertures ce qui démontre l'efficacité de notre technique.

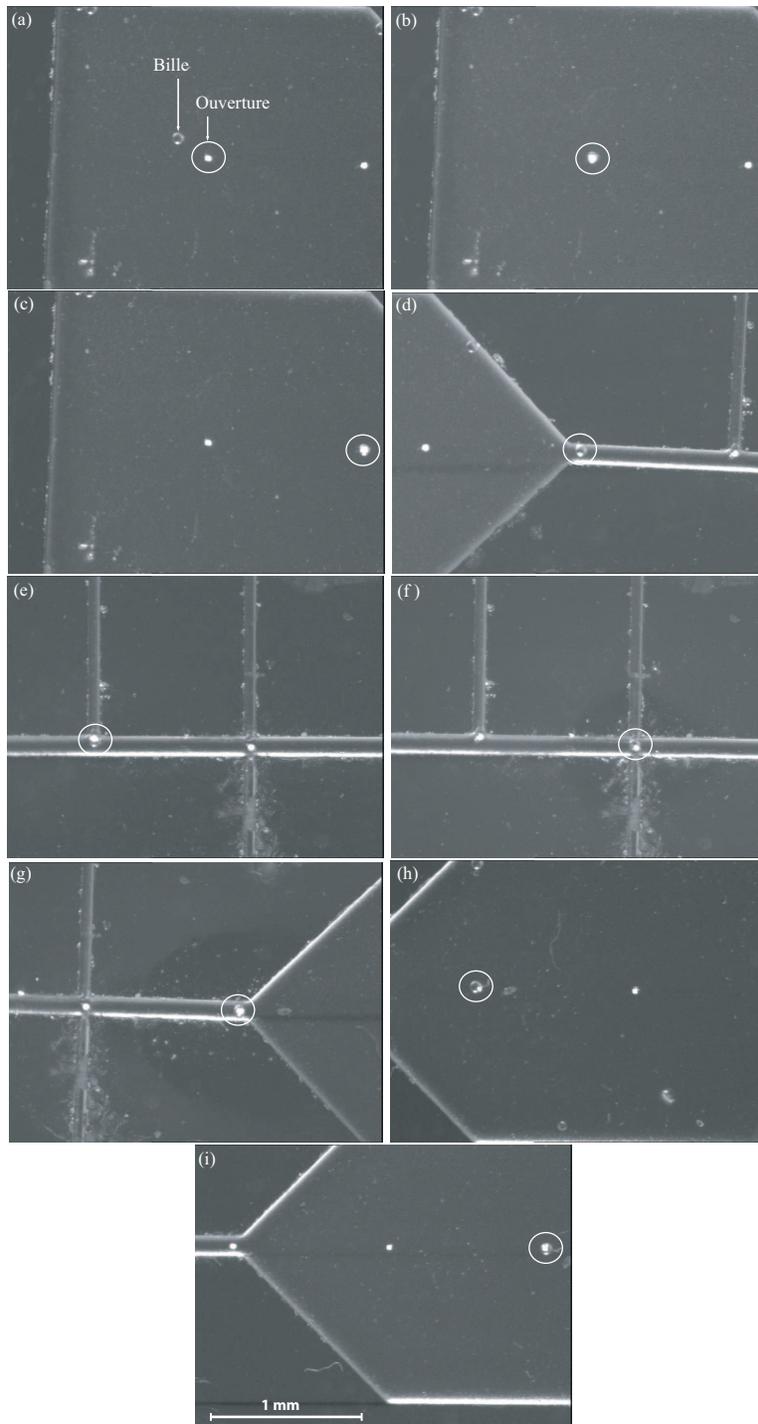


FIGURE 1.28 – Le déplacement et l’immobilisation d’une bille en polystyrène.

## 1.9.2 Validation du microsysteme avec des ovocytes surnuméraires

La manipulation et l'analyse des ovocytes sont effectuées à l'hôpital (CHU Saint Jacques de Besançon) dans un environnement spécifique à la FIV. Nous avons utilisé des ovocytes surnuméraires pour nos expérimentations. Nous respectons en cela les indications du comité d'éthique local.

Nous avons commencé par verser une quantité du milieu de vie cellulaire et puis nous avons purgé le système en faisant circuler le milieu de culture à travers les capillaires et les microcanaux. Ensuite, l'ovocyte est introduit manuellement dans le liquide à l'aide d'une micropipette dans l'un des deux réservoirs (figure 1.29(a)). Nous aspirons ensuite le milieu à travers la première ouverture à l'aide du micro-injecteur. L'ovocyte soumis au mouvement du fluide se déplace jusqu'au niveau de l'ouverture où il est immobilisé. Pour déplacer l'ovocyte vers l'ouverture suivante, nous aspirons le liquide depuis la deuxième ouverture et au même moment nous expulsions un peu de liquide de la première ouverture. La répétition de l'expulsion et de l'aspiration entraîne le déplacement de l'ovocyte d'une ouverture à une autre tout au long de la plateforme figure 1.29. Enfin, il faut noter le parfait positionnement de l'ovocyte sur les ouvertures ce qui démontre une deuxième fois l'efficacité de notre technique.

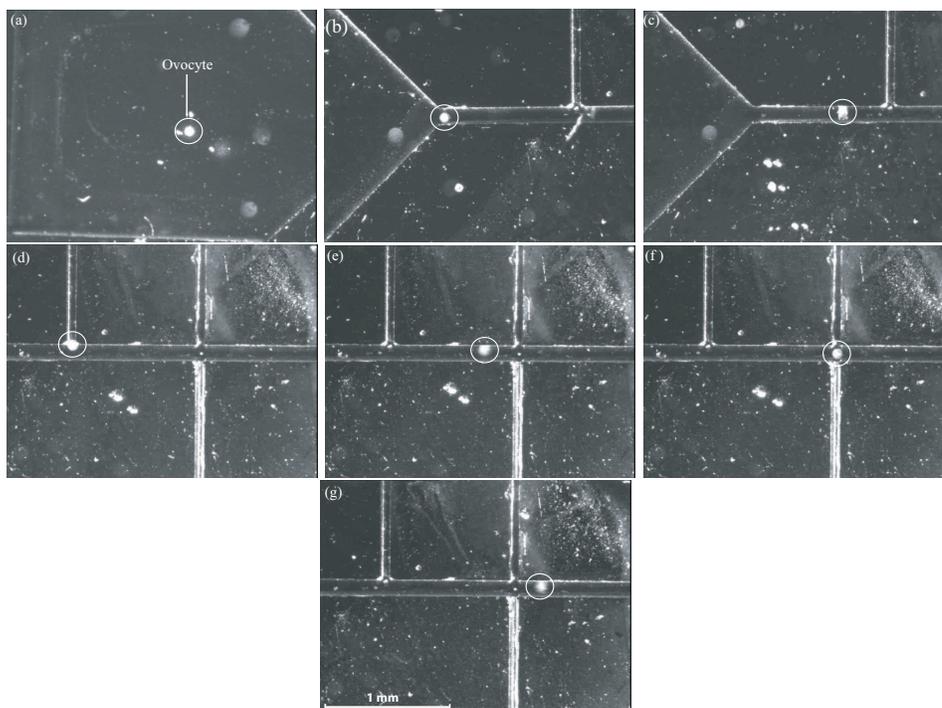


FIGURE 1.29 – Le déplacement et l'immobilisation de l'ovocyte.

La figure 1.30 représente deux vues rapprochées de l'ovocyte positionné dans les ate-

liers d'analyse. Sur la figure 1.30 (a) nous voyons l'ovocyte piégé au niveau de l'atelier de mesure du pH. Nous notons le bon contact entre la fibre et l'ovocyte. La figure 1.30 (b) montre l'immobilisation de l'ovocyte sur l'atelier de mesure du spectre de transmission. Là encore il faut noter la très grande précision d'immobilisation offerte par ce microsystème.

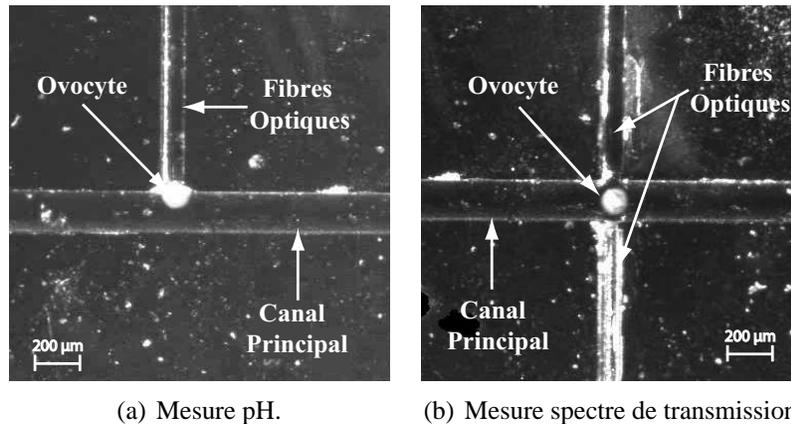


FIGURE 1.30 – Caractérisation de l'ovocyte.

## 1.10 Mesure des propriétés optiques des ovocytes avec un microsystème spécifique

### 1.10.1 Premier microsystème

Dans cette partie, nous présentons un nouveau microsystème dédié à la mesure des propriétés optiques des ovocytes. Ce dernier est constitué de deux parties, silicium et verre. La partie silicium est composée principalement d'une cuve et de deux sillons face à face (figure 1.31). Les mesures sont effectuées sur un ovocyte placé dans la cuve entre deux fibres optiques fixées dans les deux sillons. Le faisceau issu de la fibre émettrice ( $50 \mu\text{m}$  de cœur) est collecté par la fibre réceptrice ( $100 \mu\text{m}$  de cœur) après avoir traversé l'ovocyte. L'analyse de l'intensité lumineuse collectée permet de calculer l'indice de réfraction de la cellule. Par ailleurs, l'étude du spectre de transmission fournit des indications sur le degré de maturité des ovocytes.

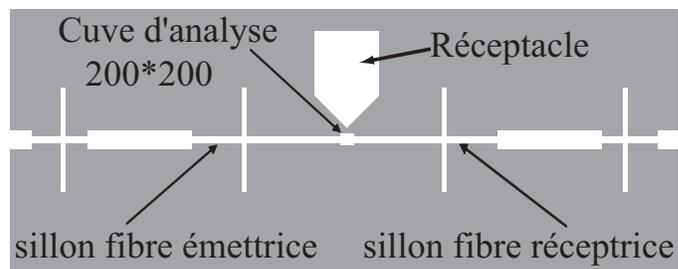
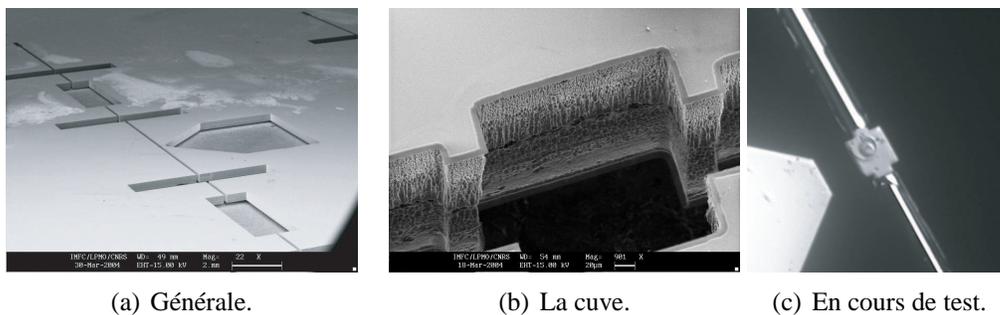


FIGURE 1.31 – Schéma de principe du système.

La partie silicium du microsystème est usinée par DRIE double face sur un wafer 3 pouces. Aux extrémités des sillons (côté cuve) nous avons usiné des butées pour maintenir les fibres à une distance constante de part et d'autre de la cuve. Aux autres extrémités (côté externe) nous avons réalisé des élargissements des sillons pour permettre de contenir la fibre avec sa gaine en plastique, ce qui empêche son clivage au contact avec l'arête du microsystème. Le réceptacle permet de prédéposer la cellule avant son transfert dans la cuve d'analyse. Les autres structures sur le schéma sont utilisées pour le plaquage et le collage des fibres. Sur la figure 1.32, nous montrons des vues rapprochées des composants du microsystème.



(a) Générale.

(b) La cuve.

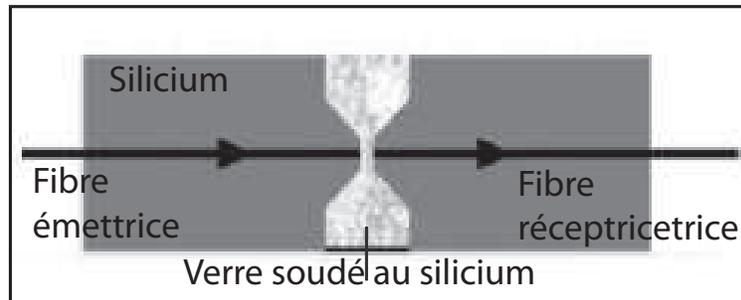
(c) En cours de test.

FIGURE 1.32 – Vues rapprochées du composant.

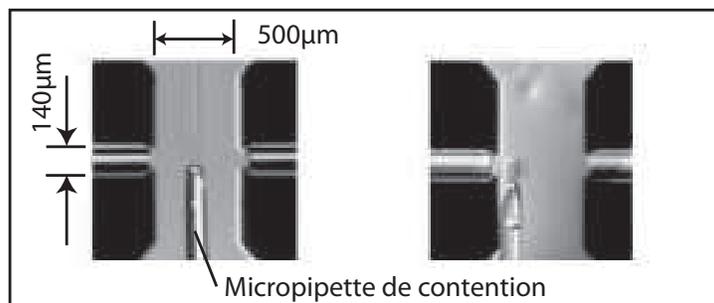
Nous distinguons bien les butées de positionnement des fibres optiques. Elle montre également une vue rapprochée de la cuve d'analyse ainsi qu'un ovocyte capturé dans cette dernière. Bien que ce microsystème nous ait permis d'améliorer nos connaissances des procédés DRIE, soudage anodique ..., il n'a pas permis un positionnement assez précis des cellules pour effectuer des mesures appropriées. Un deuxième système mieux adapté a donc été réalisé. Ce dernier sera utilisé sur le micromanipulateur utilisé en routine dans le centre de procréation médicalement assistée de Besançon.

### 1.10.2 Second microsysteme

En exploitant les techniques de gravure de silicium mises en œuvre pendant la réalisation du premier microsysteme, nous avons réalisé le deuxième systeme. Un schéma de principe de ce dernier est montré sur la figure 1.33 (a). La figure 1.33 (b) montre deux vues rapprochées sur le microsysteme, la partie de gauche montre une vue rapprochée sur le centre du systeme, nous distinguons les deux fibres (émettrice et réceptrice) et la micropipette pour positionner la cellule. Tant dis, que la partie de droite montre un ovocyte positionné près de la fibre émettrice.



(a) Système de mesure.



(b) Positionnement de l'ovocyte.

FIGURE 1.33 – Système de mesure des propriétés optiques des ovocytes.

### 1.10.3 Mesure de l'indice de réfraction des ovocytes

La méthode pour estimer l'indice de réfraction des cellules consiste à mesurer l'intensité lumineuse collectée pour différentes positions de l'ovocyte entre les fibres optiques [51]. Nous considérons que la cellule se comporte comme une micro-lentille. Dans ce cas, l'intensité lumineuse collectée dépend de la position de la cellule entre les fibres (figure 1.34 (a)). Dans notre cas, nous prendrons une mesure avec la cellule placée contre la fibre émettrice, une autre au centre et dernière avec l'ovocyte contre la fibre collectrice. Nous obtenons ainsi trois points expérimentaux (figure 1.34 (b)). Ensuite, nous utilisons un modèle informatique (tracé de rayon réalisé par C. Pieralli chargé de recherche au

laboratoire) qui permet de calculer des intensités lumineuses collectées pour chaque position et pour des valeurs variables de l'indice de réfraction (fitting sur l'indice). Nous considérons que nous avons calculé la bonne valeur de l'indice quand l'écart entre théorie et expérimentale est minimisé (au sens des moindres carrés). Dans notre cas, nous avons mesuré un indice de réfraction  $n = 1,36$ .

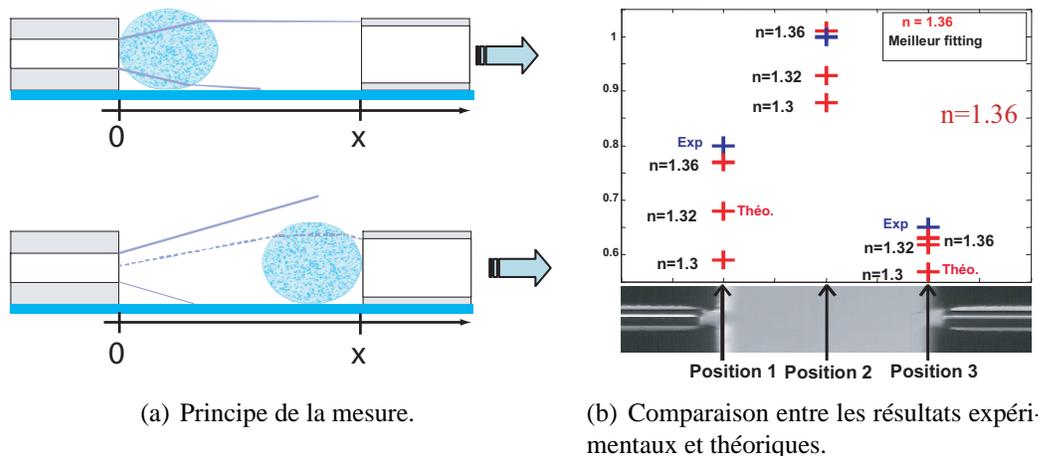


FIGURE 1.34 – Mesure de l'indice de réfraction des ovocytes.

nous apercevons, sur la figure 1.34(b), que la valeur d'indice  $n = 1.36$  ne permet pas une parfaite superposition des données expérimentales et numériques. Ceci est dû au fait que nous n'avons pas fait intervenir les pertes optiques dans la cellule. Un modèle numérique plus complet est en cours d'élaboration.

#### 1.10.4 Estimation de la maturité des cellules

Le degré de maturité des ovocytes est un élément essentiel de la cellule à féconder. Nous avons pu estimer ce dernier grâce à l'analyse du spectre de transmission avec notre système. Sur la figure 1.35 nous montrons une comparaison entre la forme du spectre de transmission d'un ovocyte mature et d'un ovocyte immature. La principale différence entre les deux spectres est visible dans la position du maximum et la largeur à mi-hauteur des spectres. Nous pouvons également noter la présence d'un épaulement dans le spectre correspondant à une cellule immature. Il faut noter que ces mesures ont été effectuées sur plusieurs ovocytes (matures et immatures) et le résultat était toujours présente le même aspect.

Nous noterons enfin qu'un tel système doit permettre la mesure simultanée de trois paramètres indépendants : indice, perte et maturité. Si nous restreignons l'étude à un seul point de mesure (cas du Lab On Chip microfluidique présenté plus haut), ce simple système peut se comporter comme un capteur de maturité (figure 1.35).

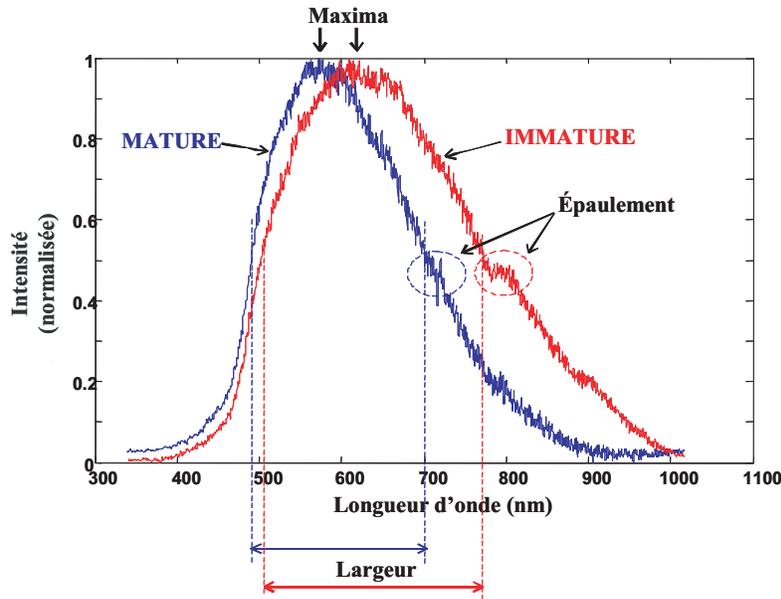


FIGURE 1.35 – Estimation de la maturité des cellules.

## 1.11 Conclusion

Dans ce chapitre nous avons réalisé un Lab On Chip dédié à l'accueil, le transport et l'immobilisation d'un ovocyte qui fera l'objet d'analyse par des systèmes d'analyse intégrés. En premier lieu nous avons présenté une configuration générale du Lab On Chip et de ses différents composants. Nous distinguons notamment, une partie silicium, une partie verre et une partie analyse. Nous avons commencé par présenter la partie silicium du microsystème, d'où une plateforme silicium pour l'accueil des cellules a été réalisée, en utilisant les techniques d'usinage d'un wafer de silicium de coupe <100>. Deux types d'usinage ont été utilisés sur les deux faces du wafer :

- La face inférieure : est dédiée au transport et l'immobilisation de l'ovocyte à travers un réseaux de microcanaux débouchant dans des ouvertures sur la face supérieure. L'obtention de ces derniers est atteint après usinage humide (KOH) où nous étions amener à présenter des techniques de compensation nous permettant d'usiner, des microsillons formant un angle droit et connectés à des ouvertures pyramidales.
- La face supérieure est dédiée pour l'accueil et l'analyse de l'ovocyte, où nous avons utilisé la technique de gravure sèche appelée DRIE.

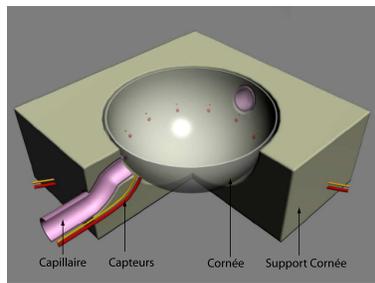
Il faut noter que seulement après cette gravure nous parvenions à déboucher les ouvertures pyramidales réalisées sur la face inférieure du wafer. Nous avons démontré aussi qu'un usinage de trois sillons sur cette face nous permettra d'intégrer des fibres optiques pour l'analyse des ovocytes. Après la description des deux techniques de réalisation, nous avons démontré la validité de ces techniques par les résultats expérimentaux.

L'autre partie du microsystème est constitué un wafer en verre, usiné dans des sites bien définis pour réaliser des ouvertures de 1mm de diamètre. Sur ce wafer également

nous avons réalisé des cercles en or pour faciliter le collage des connecteurs microfluidiques. Nous avons ainsi mis en évidence les techniques d'usinage du verre et la technique de dépôt de l'or.

La dernière partie a été destinée aux résultats expérimentaux obtenus par la manipulation de billes en polystyrène et des ovocytes. En premier lieu nous avons utilisé des billes en polystyrène, qui ont la même taille que celle des ovocytes. Les résultats de déplacement et d'immobilisation de ces derniers ont démontré l'efficacité de notre technique, ce qui nous a encouragé à faire des manipulations avec des ovocytes surnuméraires.

Nous avons réalisé une expérimentation de la plateforme à l'aide d'ovocyte surnuméraires. Ces derniers sont déposés dans l'un des deux réservoirs de la plateforme silicium, l'aspiration du milieu de vie par les ouvertures provoque le déplacement de l'ovocyte jusqu'au point d'aspiration. Ainsi le transport de l'ovocyte est accompli par des aspirations séquentielles réalisées à travers les ouvertures. Il faut noter la précision de l'immobilisation des ovocytes et cela notamment sur les sites d'analyses. Enfin, des analyses ont été effectuées sur les ovocytes notamment ceux du spectre de transmission et ils ont donné des résultats encourageants. Ces derniers vont nous permettre de se concentrer dans un avenir proche sur les systèmes d'analyse pour la caractérisation des ovocytes avant et après fécondation.





**Lab On Chip pour le transport et  
le contrôle qualité du greffon  
cornéen.*in vitro***



- 2.1 Généralités
- 2.2 La greffe de la cornée
- 2.3 Comportement optique de la cornée
- 2.4 Dispositif expérimental . . .
- 2.5 Tests sur site
- 2.6 Conclusion

## Etude du spectre de Transmittance de la cornée

**L**e contrôle de la qualité des cornées destinées à la greffe consiste en un examen microscopique après sa coloration par le bleu trypan 0,3 filtré. Il est impératif de trouver une nouvelle méthode de contrôle car le bleu trypan, produit que les biologistes utilisent actuellement dans le cadre du contrôle de la viabilité endothéliale, s'est avéré toxique et mutagène et sera sans doute interdit dans l'avenir.

Les cellules qui couvrent les surfaces, particulièrement les cellules endothéliales, sont intimement liées à la transparence de la cornée, puisqu'elles sont responsables de maintenir l'état de déturgescence du stroma. Issue de cette constatation, l'idée directrice du projet est de réaliser des mesures optiques de la transmittance lumineuse pour, ensuite, corrélérer cette transmittance au nombre de cellules endothéliales vivantes.

L'idée de caractériser les cornées par la mesure de leur transmittance n'est pas nouvelle. Parmi tant d'autres, des travaux [52] ont été réalisés à l'université de Sao Paulo au Brésil sur un système permettant la mesure de la transparence de cornées *in vitro*. Toutefois, le lien entre la transmittance et le nombre des cellules endothéliales n'a pas été expérimentalement mis en évidence.

### 2.1 Généralités

#### 2.1.1 Anatomie

La cornée est la partie transparente antérieure du globe oculaire, en forme de calotte sphérique légèrement saillante. C'est le premier élément réfractif de l'œil, comptant pour les deux tiers du dioptré oculaire.

Elle couvre environ un cinquième de la surface de l'œil. Elle mesure en moyenne, chez l'adulte, 1,1 cm de diamètre. Son épaisseur diminue de la périphérie (environ 600 μm)

vers le centre (environ  $500\mu m$ ). Le rayon de courbure de la face antérieure est de  $7,8mm$ ,  $6,8mm$  celui de la face postérieure et d'indice de réfraction de  $1,377$ . La cornée a besoin de larmes pour l'aider à éliminer les éléments indésirables. Elle reçoit son milieu nutritionnel à travers l'humeur aqueuse contenue dans la chambre antérieure. Grâce à la cornée et au cristallin, on peut voir les objets les plus éloignés comme les plus proches. Le rôle de la cornée se résume essentiellement à trois activités :

- la protection de l'œil des éléments indésirables comme les saletés et les germes ;
- la focalisation de la lumière sur la rétine de l'œil ;
- le filtrage des rayons UV provenant du soleil.

## 2.1.2 Histologie

La cornée est composée de trois couches de cellules et de deux membranes, on distingue dans l'ordre (figure 2.1) :

- l'épithélium cornéen ;
- la membrane de Bowman ;
- le stroma cornéen ;
- l'endothélium cornéen.

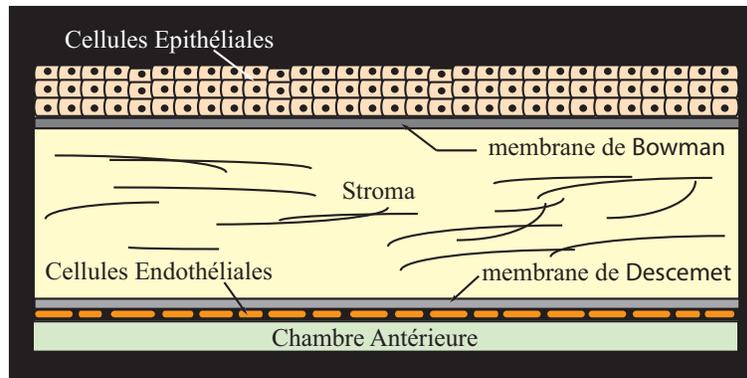


FIGURE 2.1 – Structure de la cornée.

### L'épithélium

L'épithélium cornéen est la couche qui couvre la surface de la cornée, elle est formée de 5 à 7 couches de cellules. La couche basale est formée de cellules cubiques reposant sur une lame basale, et, est accrochée très fortement au stroma par des complexes d'adhésion (hémidesmosomes). Il a un rôle de barrière et facilite la dispersion du film lacrymal à la surface de la cornée.

### La membrane de Bowman

La membrane de Bowman se situe entre la couche basale épithéliale et le stroma. Son épaisseur est de 8 à 14  $\mu m$  mesurée au centre de la cornée. Elle est composée de fibres collagènes, mesurant 24 à 27  $\mu m$  de long et 20 à 30  $\mu m$  de diamètre, réparties au hasard dans la substance fondamentale. Cette couche est dépourvue de cellules, hormis de fines expansions des cellules de schwann entourant les terminaisons nerveuses qui la traversent. Elle est difficile à percer et protège ainsi la cornée des blessures. Toute fois, elle ne se renouvelle jamais et par conséquent une lésion de celle-ci est définitive.

### Le stroma

Le stroma cornéen représente la majeure partie de l'épaisseur de la cornée. Il est constitué d'eau et de fibres Collagènes d'environ 36  $nm$  de diamètre, groupées en lamelles parallèles à la surface cornéenne. Le stroma contient plus de 200 lamelles de 1 à 2  $\mu m$  d'épaisseur chacune. L'arrangement des fibres dans une lamelle donnée est très ordonné formant des colonnes parfaitement parallèles. Cette formation donne à la cornée sa clarté, sa solidité et sa géométrie. Elle contient aussi des cellules appelées les kératocytes dispersées entre les lamelles formant un réseau de liaisons dans toute la cornée. Elles occupent 3 à 5 % du volume du stroma. Ce dernier a une forte tendance à absorber l'eau et gonfle en raison de la nature hydrophilique du proteoglycan qui compose la matrice entourant les fibres collagènes.

### La membrane de Descemet

Lame basale de l'endothélium d'une épaisseur de 10  $\mu m$  à 12  $\mu m$ . Elle est solide et très élastique tout en étant perméable à l'eau. La membrane de Descemet est une membrane collagénique acellulaire entre le stroma postérieur et la monocouche endothéliale. Elle est en continuité avec le réseau trabéculaire en périphérie de la cornée. La jonction Descemet-stroma est riche en fibronectine, qui joue un rôle dans l'adhésion des deux structures. Elle est synthétisée par les cellules endothéliales et s'épaissit avec l'âge.

### L'endothélium

L'endothélium cornéen est une monocouche cellulaire formant une mosaïque hexagonale. Ses cellules ne se régénèrent pas. Le nombre de ces cellules - et donc la densité cellulaire, en cellules par  $mm^2$  - reflète la bonne qualité de la cornée. Lors d'une greffe de cornée, ce critère est important pour le médecin, qui va l'implanter sur l'œil d'un patient. D'autres critères aussi importants lors de la greffe sont la transparence du greffon (qui à l'heure actuelle reste un critère subjectif) et la morphométrie cellulaire. Les cellules qui couvrent les surfaces, particulièrement les cellules endothéliales, sont intimement liées à la transparence de la cornée, elles sont responsables du maintien de l'état de déturgescence du stroma - c'est le mécanisme par lequel le stroma reste dans un état d'hydratation

équilibrée [53, 54, 55]. Elles pompent l'excès de fluide pour empêcher son gonflement [56], et par conséquent son endommagement. La dégradation de l'endothélium peut mener à œdème cornéen et entraîne un aveuglement. Actuellement la seule thérapie possible est la transplantation cornéenne.

## 2.2 La greffe de la cornée

### 2.2.1 Les maladies de la cornée

Lorsque la cornée devient opaque, l'œil devient non voyant (20 % des cécités). Le traitement ne peut alors être que chirurgical, on compte aujourd'hui en France, à peu près 7000 patients malvoyants en attente d'une greffe de cornée.

### 2.2.2 L'intervention chirurgicale

Le but de l'intervention est de remplacer la cornée malade par une cornée saine et transparente, prélevée plusieurs jours auparavant sur un donneur décédé. Au cours de cette intervention, le chirurgien peut associer d'autres gestes chirurgicaux : chirurgie de la cataracte, changement d'implant intraoculaire, vitrectomie, chirurgie du glaucome . . .

La greffe de la cornée est réalisée le plus souvent sous anesthésie locale et nécessite une hospitalisation de 2 à 6 jours suivant les habitudes des différentes équipes médicales. Les suites opératoires ne sont pas douloureuses et le traitement post-opératoire se résume le plus souvent à l'instillation de collyres antibiotiques, anti-inflammatoires et cicatrisants. La cicatrisation est cependant lente et nécessite 3 à 6 mois, voire parfois un an dans certains cas pour apprécier le résultat visuel définitif. Le pronostic de l'intervention est bon avec 90 % de greffons transparents, 5 ans après la chirurgie.

### 2.2.3 Le prélèvement et la conservation du greffon avant la greffe

Avant de pouvoir être greffée, la cornée est d'abord prélevée [57] sur un donneur décédé puis conservée obligatoirement dans le laboratoire d'une banque de cornées agréées. Ces différentes activités doivent respecter un certain nombre de grands principes prévus par les lois dites " bioéthiques " du 29 juillet 1994, à savoir : respect du corps humain, gratuité du don, anonymat donneur-receveur avec cependant traçabilité, consentement préalable et présumé du donneur, sécurité sanitaire.

#### Le prélèvement

Le prélèvement de la cornée est réalisé dans des conditions de stérilité chirurgicale soit dans un bloc au cours d'un prélèvement multi-organes (20 % des prélèvements), soit au dépôt mortuaire dans une salle stérile réservée aux prélèvements lorsqu'il s'agit d'un prélèvement à cœur arrêté (80 % des prélèvements). Dans ce dernier cas, le prélèvement

peut être réalisé dans les 24 heures suivant le décès. Seule la cornée est prélevée, le globe oculaire lui même reste en place et en particulier l'iris qui lui donne sa couleur. La restauration tégumentaire comprend la mise en place d'un couvre œil transparent afin de permettre au globe de conserver son galbe. Le respect anatomique du défunt est ainsi parfaitement conservé ce qui constitue un élément déterminant dans l'acceptation du prélèvement par les familles.

Un prélèvement sanguin, à posteriori, est réalisé pour les analyses sérologiques obligatoires.

#### La conservation du greffon dans la Banque des cornées

Une fois prélevée, la cornée est placée dans un flacon de milieu de conservation scellé et étiqueté puis transférée dans les 24 heures dans le laboratoire de culture pour y être évaluée puis conservée (figure 2.2). Le transport s'effectue à la température ambiante.

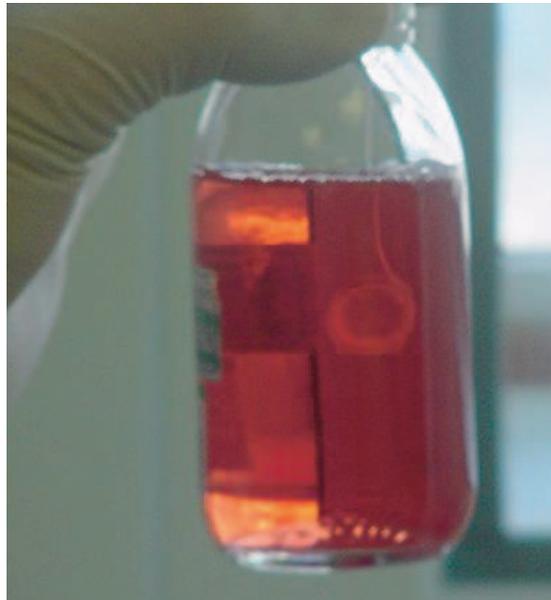


FIGURE 2.2 – Conservation de la cornée après prélèvement.

Le médecin responsable de la banque des cornées doit s'assurer de la parfaite exécution de l'ensemble des opérations de prélèvement (absence de contre indication au prélèvement, rencontre effective avec la famille, réalisation des Sérologies, bonne tenue des documents officiels). Il est ensuite chargé de valider le greffon sur le plan sanitaire (sécurité bactériologique, validation histologique) puis de l'attribuer à une équipe de greffe. Tous ces contrôles sont réalisés pendant la période de conservation du greffon.

## Le contrôle de la validité endothéliale

A son arrivée dans le laboratoire de la banque des cornées, le greffon bénéficie d'un premier contrôle avant sa mise en conservation proprement dite. Cette étape est indispensable afin d'éliminer les greffons déficients. Ce contrôle de qualité consiste en un examen microscopique après coloration de la cornée par le bleu trypan 0,3 filtré. Afin d'éviter toute contamination il doit être réalisé dans des conditions d'asepsie stricte sous hotte à flux laminaire. Un comptage cellulaire endothélial est réalisé dans la zone centrale à l'aide d'une grille millimétrique placée dans l'un des oculaires du microscope. Le nombre de cellules mortes (colorées en bleu) est compté sur  $1 \text{ mm}^2$ .

Un consensus existe sur les critères de non conformités imposant la mise à l'écart du greffon[58] :

- densité cellulaire endothéliale inférieure à  $2000 \text{ cellules/mm}^2$  ;
- pourcentage de cellules mortes supérieur à 2 % ;
- aspect irrégulier de la mosaïque cellulaire endothéliale ;
- plis transverses de cellules endothéliales mortes ;
- opacité stromale diffuse.

Les cornées déclarées conformes sont ensuite déposées dans un flacon de milieu de conservation.

### *Note :*

Les cornées sont conservées dans un milieu qui les fait gonfler pour faciliter le comptage des cellules endothéliales. Avant la greffe de 48 heures, les cornées sont déplacées dans un autre milieu de conservation pour qu'elles retrouvent leurs tailles initiales.

## La conservation de la cornée en organoculture à $+31^\circ\text{C}$

Les cornées sont conservées en organoculture. Cette technique initialement décrite par Doughman en 1974 [59] puis modifiée par Pels en 1983 [60], a été introduite en France en 1986 par Delbosc [61]. Cette technique est actuellement la plus utilisée en Europe. Son principe est de maintenir la viabilité du tissu cornéen, en particulier l'endothélium, en stimulant ses activités métaboliques. Les milieux de conservation est constitué essentiellement d'un milieu nutritif, de sérum de veau fœtal, d'antibiotiques, d'antifongiques, d'un indicateur coloré de pH et de substances tampon. L'anneau cornéoscléral est suspendu par un fil dans un flacon en verre contenant  $50 \text{ ml}$  de milieu de conservation. Le flacon est ensuite déposé dans un incubateur dont l'atmosphère est maintenue à une température constante de  $+31^\circ\text{C}$ . Le milieu est renouvelé de moitié après 15 jours.

La conservation en organoculture permet :

- une sécurité microbiologique bien supérieure à toutes les autres techniques de conservation [62] ;
- l'allongement du délai de conservation d'une semaine à un mois. Ce délai offre le temps suffisant pour la réalisation des sérologies sur le donneur et la possibilité d'examens plus complexes (PCR (Réaction en Chaîne de Polymérase.)). Il per-

met des échanges entre banques (à température ambiante). Il permet également la constitution d'un stock de greffons disponibles pour les situations d'urgence, ainsi qu'une meilleure planification des interventions.

Plusieurs contrôles sont réalisés au cours de la conservation du greffon cornéen.

### ***Le contrôle microbiologique***

Lors de la conservation en organoculture, la couleur du milieu est contrôlée tous les jours. Un virage au jaune ou une turbidité indique une infection. La cornée doit alors être détruite. Un contrôle bactériologique est réalisé sur le milieu de prélèvement puis sur le milieu de culture à la fin de la conservation.

### ***Le contrôle sérologique du donneur***

La période de conservation permet la recherche des différentes maladies infectieuses potentiellement transmissibles. Les examens obligatoires sont :

- Sérologie HIV1 et HIV2, recherche de l'antigène p24,
- Sérologie HTLV I, II,
- Sérologie des hépatites B et C,
- Sérologie syphilitique.

Un échantillon de sang est par ailleurs conservé pendant 30 ans dans une sérothèque.

### ***Le contrôle de viabilité endothéliale***

Un dernier contrôle de viabilité est systématiquement réalisé 24 à 48 heures avant la greffe lors de la conservation en organoculture.

La cornée est déclarée conforme si :

- Il n'y a pas d'antécédent contre-indiquant la greffe chez le donneur,
- les sérologies légales sont négatives chez le donneur,
- le contrôle microbiologique du milieu de conservation est négatif,
- la qualité de la cornée est satisfaisante lors des deux contrôles.

## 2.2.4 La cession de la cornée

Après conservation en organoculture, la cornée est placée, sans suture, dans un flacon de milieu dit de déturgescence contenant du dextran. Ce flacon de transport contenant le greffon peut être maintenu à température ambiante pendant 2 à 3 jours avant d'être greffé, ce qui permet un transport aisé vers un centre greffeur éloigné.

## 2.2.5 La greffe de la cornée à l'Établissement Français du Sang (EFS)

L'UTCG (Unité de Thérapie Cellulaire et Génique.) EFS-Bourgogne Franche Comté, est impliquée dans la greffe des cornées, avec les travaux de mise au point d'un mode de conservation des greffons cornéens par organoculture à  $+31^{\circ}C$ . Aujourd'hui, traitant plus de 1700 greffons par an, elle est la première banque de cornées en France. Le contrôle est très strict. En conséquence, il n'y a que 40 à 50% des greffons prélevés qui sont greffés.

## 2.3 Comportement optique de la cornée

La cornée, étant un tissu avasculaire, constitue une barrière anatomique et physiologique protectrice vis-à-vis des structures internes de l'œil. Optiquement, elle assure les deux tiers du pouvoir de réfraction de l'œil en transmettant un spectre de longueur d'onde compris entre 310 nm (ultraviolet) et 2500 nm (infrarouge).

### 2.3.1 Transmission de la lumière

Le taux de transmission de la lumière par la cornée augmente avec la longueur d'onde dans le spectre visible (environ 86 % à 400 nm et 94 % à 600 nm). Les longueurs d'onde ultraviolettes sont fortement absorbées par la cornée.

L'indice de réfraction des fibres collagènes est de 1,47 et celui de la substance fondamentale est de 1,34. Cette différence d'indice de réfraction crée une dispersion de la lumière au niveau de chaque fibre. Néanmoins, les effets des fibres s'annulent entre eux grâce à l'uniformité du diamètre et de la distance interfibrilles, et seule persiste la propagation dans le sens des rayons lumineux, permettant ainsi la transmission de la lumière à travers le stroma (théorie proposée par Maurice) [63]. Cette uniformité est cependant relative, et la transmission de la lumière à travers le stroma est favorisée par le fait que le diamètre des fibres et la distance interfibrilles sont plus petits que la longueur d'onde de la lumière.

### 2.3.2 Réfraction de la lumière

L'interface antérieure air-cornée à un pouvoir réfractif très élevé (48 D) qui représente 80 % du pouvoir réfractif total de l'œil (60 D). Cette interface est elle-même constituée de deux interfaces successives : air (indice de réfraction 1,000) / film lacrymal (1,336) puis film lacrymal (1,336) / cornée (1,376) ; le pouvoir réfractif de l'interface antérieure correspond à la somme du pouvoir réfractif de ces deux interfaces successives. L'interface postérieure humeur aqueuse-endothélium cornéenne à un pouvoir réfractif plus faible, car la différence d'indice des deux milieux cornée (1,376) et humeur aqueuse (1,336) est inférieur à celui de l'interface antérieure. Sa valeur est de  $-5 D$ . Le pouvoir réfractif total de la cornée est donc de 43 D en moyenne. L'interface antérieure air-film constitue

la première que traverse la lumière, par conséquent, la qualité de la vision dépend de la régularité surfacique de l'épithélium (figure 2.3).

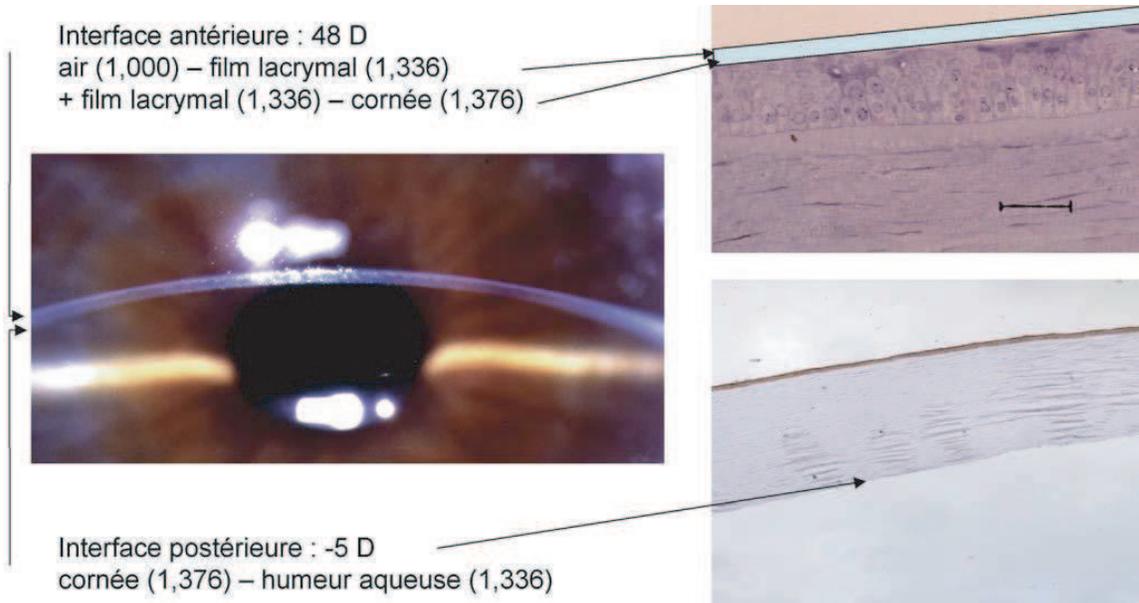


FIGURE 2.3 – Réfraction de la lumière par la cornée[56].

### 2.3.3 Réflexion de la lumière

La cornée se comporte également comme un miroir convexe. Une source lumineuse placée à 50 *cm* de la cornée donne une première image réfléchie par la face antérieure de la cornée, située à 6 – 7 *mm* en arrière de celle-ci, et une deuxième image réfléchie par la face postérieure, de plus petite taille (image de Purkinje). La taille de l'image réfléchie (reflet cornéen) est donc fonction du rayon de courbure cornéen.

Les surfaces antérieure et postérieure de la cornée et du cristallin constituent quatre surfaces de réflexion qui permettent l'obtention des quatre images de Purkinje. La première et la quatrième image de Purkinje sont en général utilisées pour l'enregistrement de la direction du regard dans la technique 'Dual-Purkinje Image' qui utilise la position relative de ces réflexions pour calculer la direction du regard (figure 2.4).

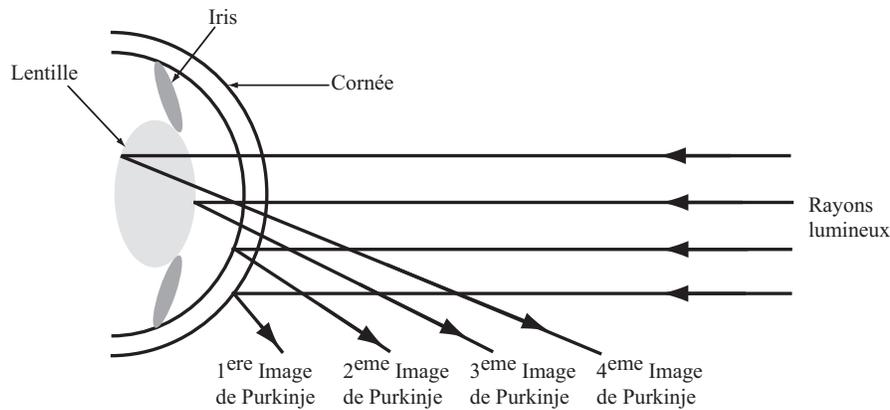


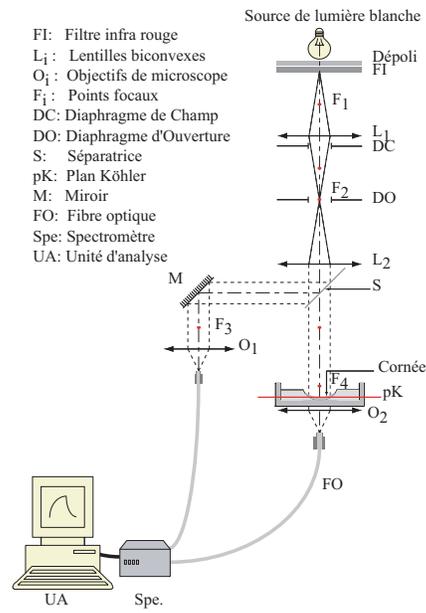
FIGURE 2.4 – Représentation de l'œil et des quatre images de Purkinje.

## 2.4 Dispositif expérimental pour la mesure de la transmittance de la cornée

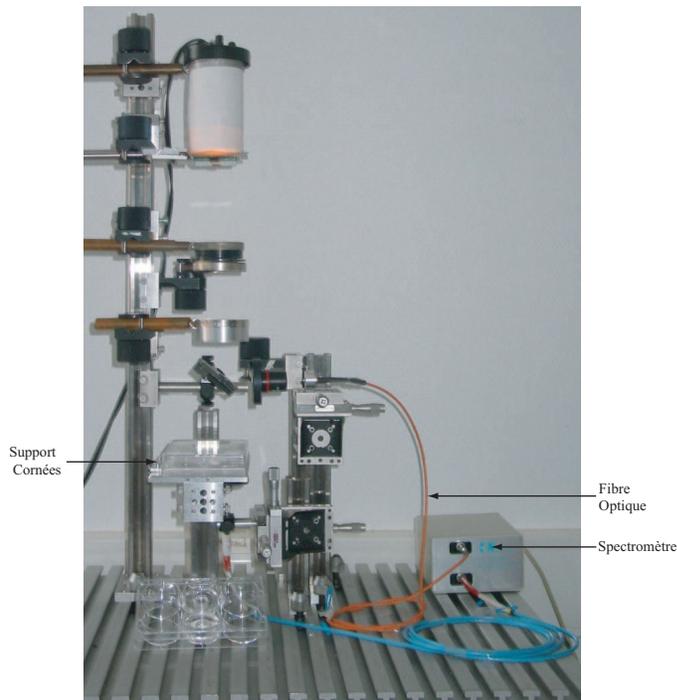
### 2.4.1 Description du dispositif de mesure

Nous avons, tout d'abord, mis en place un dispositif optique de mesure de transmission relativement classique doté d'un système d'éclairage de Köhler en lumière blanche, permettant une illumination optimale des échantillons. La lumière transmise est collectée par un objectif de microscope et injectée dans une fibre optique de  $100\ \mu\text{m}$  de diamètre de cœur reliée à un Spectromètre, de manière à visualiser le spectre en transmission de l'échantillon. Le montage expérimental est composé d'une source de lumière blanche, éclairant un filtre infrarouge ( $F_1$ ) à travers un verre dépoli. La lumière est ensuite projetée sur un diaphragme de champs (DC) à l'aide d'une lentille ( $L_1$ ), un diaphragme d'ouverture (DO) est placé au plan image. La lentille  $L_2$  collimate le faisceau issu de DO. Afin d'éliminer les effets de l'instabilité de la source nous réalisons des mesures relatives. Pour cela, une lame séparatrice divise le faisceau en deux, l'un constitue le faisceau de référence et l'autre le faisceau de mesure. Le faisceau de référence réfléchi par le miroir  $M$  est focalisé sur une fibre optique ( $100\ \mu\text{m}$  de cœur) à l'aide de l'objectif  $O_1$ . Le faisceau de mesure traversant la cornée est focalisé grâce à l'objectif  $O_2$  sur la deuxième fibre. Les signaux optiques guidés par les fibres sont injectés dans un Spectromètre (Ocean Optics 4000) à deux entrées. Ce dernier est relié à une unité d'analyse spectrale (figure 2.5(a)).

La figure 2.5(b) montre le dispositif expérimental mis en œuvre pour les mesures de la transmission.



(a) Schéma du dispositif.



(b) Montage expérimental du dispositif.

FIGURE 2.5 – Dispositif expérimental pour la mesure de la transmission.

## 2.4.2 Caractérisation du dispositif.

Dans le but de caractériser le dispositif expérimental, la transmittance est calculée à partir des mesures obtenues d'un échantillon de référence (filtre) dont les caractéristiques sont connues.

### *Définition de la transmittance*

Considérons un faisceau lumineux d'intensité  $I_0$  traversant un milieu absorbant d'épaisseur  $l$  et ressort avec une intensité  $I$  (figure 2.6).

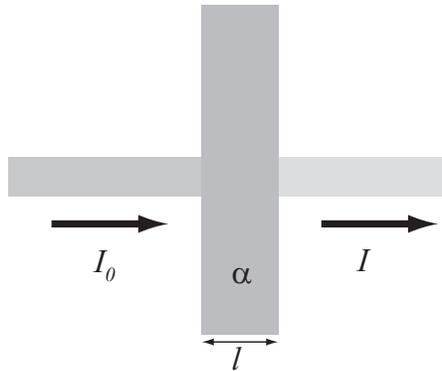


FIGURE 2.6 – Transmission de la lumière par un objet absorbant.

La transmittance  $T$  d'un milieu s'exprime comme étant le rapport :

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (2.1)$$

Où  $I$  et  $I_0$  sont reliées par la relation de Beer-Lambert,

$$I = I_0 e^{-\alpha l} \quad (2.2)$$

$\alpha$  : le coefficient d'absorption ;

$l$  : l'épaisseur traversé par la lumière ;

### *Calcul de la transmittance*

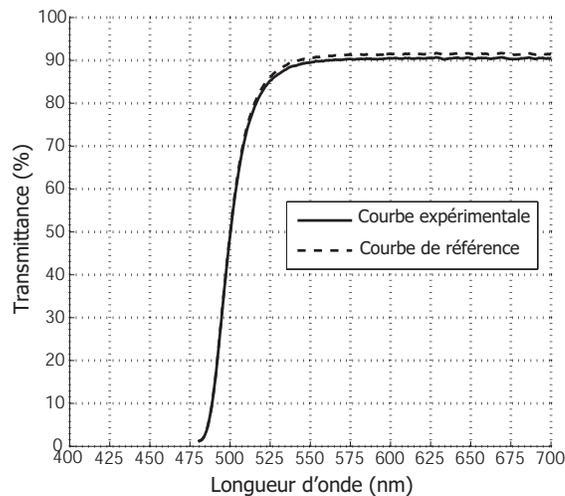
La lumière recueillie par le Spectromètre est convertie en données numériques, qui sont analysées par l'unité de calcul. La transmittance est calculée d'après l'équation (2.1) en tenant compte de l'intensité relative au courant d'obscurité  $I_b(\lambda)$ . On en déduit la relation :

$$T = \frac{I(\lambda) - I_b(\lambda)}{I_0(\lambda) - I_b(\lambda)} \quad (2.3)$$

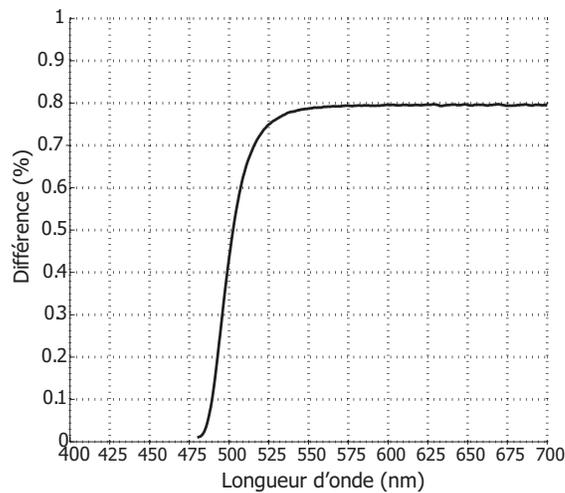
Où  $I(\lambda)$  et  $I_0(\lambda)$  sont respectivement les intensités transmises avec et sans échantillon.

### Résultat

Le résultat obtenu est comparé à celui donné par le document de référence. Les figures 2.7(a) et 2.7 (b) montrent un écart entre les deux spectres de moins de 8/1000. Le dispositif répond bien aux attentes de nos expériences.



(a) Courbes de transmittance expérimentale et de référence.



(b) Différences des courbes de transmittance.

FIGURE 2.7 – Transmittance spectrale.

### 2.4.3 Mesures effectuées sur des cornées en dehors du milieu de conservation

Dans ce cas, le filtre est remplacé par des cornées non-conformes - cornées mises à l'écart lors de la sélection des greffons. Le principe du calcul de la transmittance demeure identique, sauf qu'il est nécessaire de tenir compte de toutes les interfaces engendrées par le support de la cornée. Ce dernier doit remplir certaines exigences dont :

- la transparence pour permettre la mesure optique ;
- la biocompatibilité du matériau ;
- Centrage de la cornée par rapport au faisceau incident.

#### Réalisation du support

Dans une boîte de pétri, nous avons réalisé le support de cornées en PDMS (polydiméthylsiloxane  $((C_2H_6OSi)_n)$ ), matériau biocompatible rentrant, fréquemment, dans la fabrication des systèmes microfluidiques. Le support est de géométrie permettant un maintien physique de la cornée durant les mesures, et un repositionnement fidèlement répétitif sous le faisceau lumineux. Sa conception est illustrée dans la figure 2.8. Il est composé de :

- une partie sphérique concave pour que la cornée puisse y être logée ce qui permet son centrage ;
- un méplat. Celui-ci doit permettre à la cornée de présenter la surface à explorer durant les mesures.

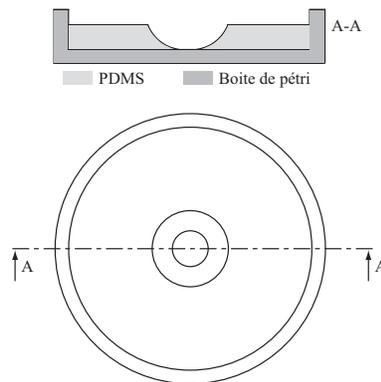


FIGURE 2.8 – Schéma du support.

Cette réalisation est obtenue par moulage d'un modèle (figure 2.9) conçu à cet effet en tenant compte du rayon de courbure moyen des cornées.

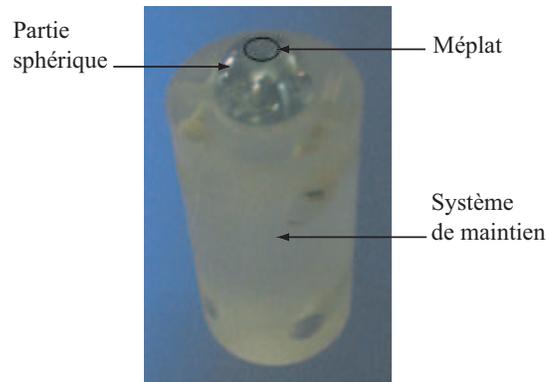


FIGURE 2.9 – Modèle servant à la réalisation du support.

### *Procédure du moulage*

Le PDMS est un élastomère transparent de type silicone. Il est obtenu à partir d'un mélange, au rapport de 10 : 1 en volume ou en poids, de DMS (Dimethylsiloxane) et un agent polymérisant. Après dégazage, le mélange est coulé dans une boîte de pétri où le modèle est posé pour en réaliser l'empreinte. Dans la figure 2.10, nous montrons l'injection de ce polymère.

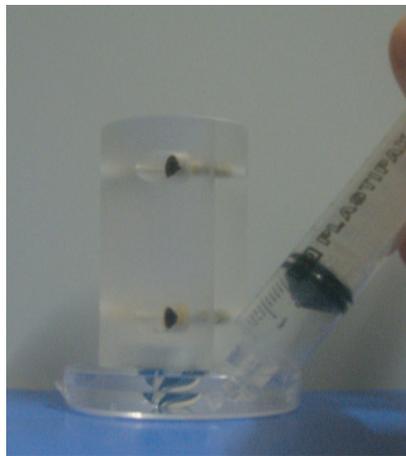


FIGURE 2.10 – Injection du PDMS dans la boîte de pétri.

Après polymérisation à l'air libre pendant 24 heures ou dans un four à ( $65^{\circ}C$ ) pendant 3h30, nous obtenons après démoulage, le support montré dans la figure 2.11(a). Dans la figure 2.11(b), on trouve l'image d'une cornée positionnée dans le support.

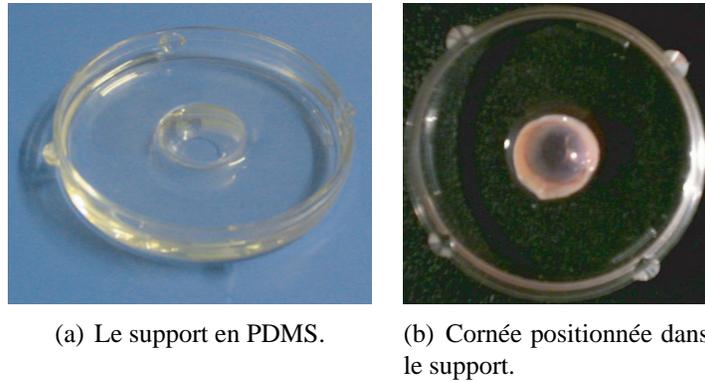


FIGURE 2.11 – Vue de dessus du support de cornées.

## Mesures et calcul de la transmittance

### *Procédure de mesure*

Avant d'effectuer les mesures, la source est mise en marche pendant 30 *min* environ pour la stabiliser.

Les mesures sont effectuées selon le protocole suivant :

- relever de l'intensité spectrale transmise de la source  $I_0(\lambda)$  ;
- relever de l'intensité spectrale transmise par le support de cornées  $I_s(\lambda)$  ;
- acquisition de dix spectres d'une même cornée dans son support  $I_t(\lambda)$ , de manière à limiter les erreurs ; calcul de l'écart type sur l'ensemble des mesures.

### *Calcul de la transmittance*

Les différentes interfaces intervenant dans le calcul de la transmittance de la cornée sont les interfaces air-cornée, cornée-support et support-air mentionnées dans la figure 2.12. Dans cette dernière on distingue plusieurs strates dont on calcul leurs intensités transmises séparément.

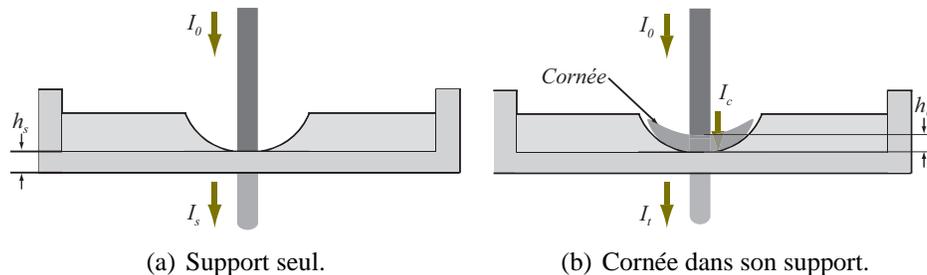


FIGURE 2.12 – Schéma représentant le principe de la mesure de la transmittance.

L'intensité transmise par le support est donnée par la relation :

$$I(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\alpha_s(\lambda).h_s} \quad (2.4)$$

L'intensité transmise par la cornée et son support est donnée par la relation :

$$I_t(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-(\alpha_c(\lambda).h_c + \alpha_s(\lambda).h_s)} \quad (2.5)$$

Avec  $\alpha_c$  et  $\alpha_s$  respectivement les coefficients d'absorption du support et de la cornée. D'après la figure 2.12(b),  $I_c(\lambda)$  s'écrit :

$$I_c(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\alpha_c(\lambda).h_c} \quad (2.6)$$

Où  $h_c$  représente l'épaisseur de la cornée. On en déduit la relation :

$$I_t(\lambda) = I_c(\lambda)e^{-\alpha_s(\lambda).h_s} \quad (2.7)$$

Sachant que la transmittance  $T_c(\lambda)$  de la cornée s'exprime par le rapport  $I_c(\lambda)/I_0(\lambda)$ , des relations précédentes (2.1), (2.2), (2.3), et (2.4), on en déduit la relation de la transmittance de la cornée

$$T_c(\lambda) = \frac{I_t(\lambda)}{I_s(\lambda)} \quad (2.8)$$

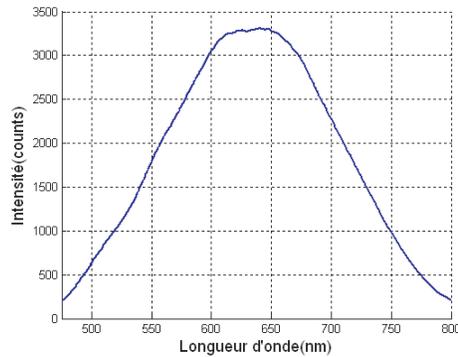
Donc, pour son calcul il suffit de mesurer uniquement  $I_t(\lambda)$  et  $I_s(\lambda)$ , valeurs données par le spectromètre.

**Nota :** l'intensité relative au courant d'obscurité  $I_b(\lambda)$  est déduite de toutes les valeurs mesurées.

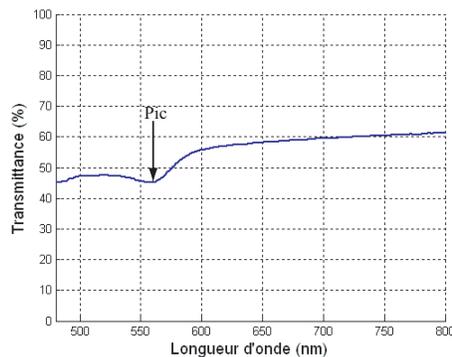
### **Résultats**

Les résultats obtenus après le calcul de la transmittance de la cornée sont les suivants. Nous distinguons dans la figure 2.13 respectivement le spectre d'émission de la source 2.13(a) et la courbe de transmittance de la cornée 2.13(b). Dans cette dernière nous observons un pic d'absorption que nous avons isolé. En effet, ce pic s'avère correspondre au pic d'absorption du milieu de conservation de la cornée qu'on se doit de corriger.

Nous pouvons donc en déduire que la mesure que nous faisons ne tient pas uniquement compte de la réponse de la cornée, mais également du milieu de conservation dont elle est imprégnée, qui se trouve à l'intérieur du tissu cornéen. Par conséquent, on s'est proposé de rincer les cornées dans un milieu de rinçage pour extraire le milieu de conservation de la cornée.



(a) Spectre de la source.

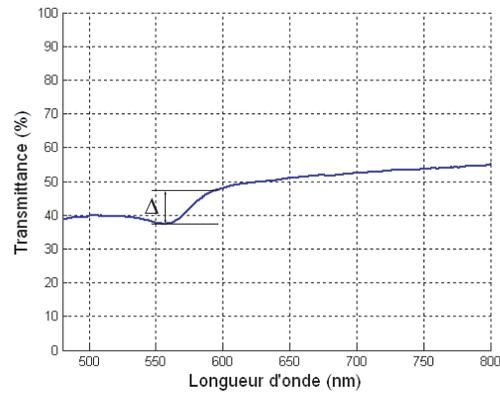


(b) Transmittance de la cornée.

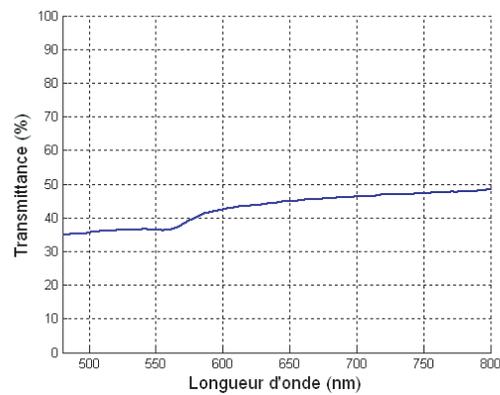
FIGURE 2.13 – Résultat des mesures de la cornée hors milieu.

### Élimination du milieu de conservation

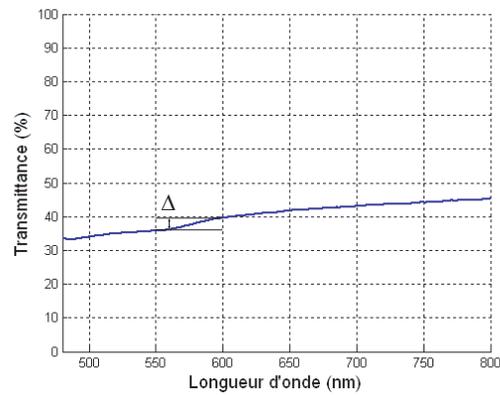
Le rinçage des cornées n'est pas instantané, par conséquent l'opération dure quelques fois plusieurs heures. De ce fait, afin de déterminer le temps de rinçage nécessaire à l'extraction du milieu, nous avons réalisé des mesures par intervalle de temps d'une heure. Il en ressort qu'il faut un rinçage d'au moins 4 heures pour que l'influence du milieu soit nettement réduite. Les figures 2.14 (a), (b) et (c), montrent la diminution du pic de la courbe de transmittance spectrale de la cornée en fonction du temps de rinçage. L'amplitude du pic  $\Delta T$ , mesurée entre le premier coude ( $\lambda = 600nm$ ) et le minimum la courbe ( $\lambda = 562,95nm$ ), passe de  $\Delta T = 12\%$  (figure 2.14(a)) à moins de 4% (figure 2.14(c)). Toutefois les mesures sur des cornées rincées ne sont pas commodes. En effet, elle représentent deux inconvénients majeurs : d'une part, un rinçage supérieur à 3 heures d'une cornée n'est pas pratique pour le praticien ou la personne qui s'occupe des mesures. D'autre part, nous constatons une translation de la courbe vers le bas (diminution de la transmittance) ceci est due à une opacification de la cornée au fil du temps.



(a) Cornée rincée une heure.



(b) Cornée rincée deux heures.



(c) Cornée rincée trois heures.

FIGURE 2.14 – Estimation du temps nécessaire à l'extraction du milieu de la cornée.

## Conclusion

Des mesures et constatations précédentes, il convient de maintenir les cornées dans leur milieu de conservation pour effectuer les mesures de transmittance. Ceci nous confronte à l'inconvénient de l'influence du milieu que nous essayons de relever dans ce qui suit.

### 2.4.4 Mesures effectuées sur des cornées dans le milieu de conservation

La méthode utilisée dans le cas des mesures dans le milieu de conservation est peu différente de celle utilisée dans le cas des mesures hors milieu, si ce n'est que le support précédent n'est pas adapté aux nouvelles mesures. Lorsque le milieu est ajouté, du fait de la différence de densité la cornée remonte en surface et rend son positionnement sous le faisceau lumineux plus délicat. Ainsi, des mesures ont été effectuées pour mettre en évidence les fluctuations du positionnement.

La figure 2.15, illustre le résultat de plusieurs mesures (10) de l'intensité spectrale de la cornée. L'écart en amplitude est relativement important de l'ordre de 4,3%.

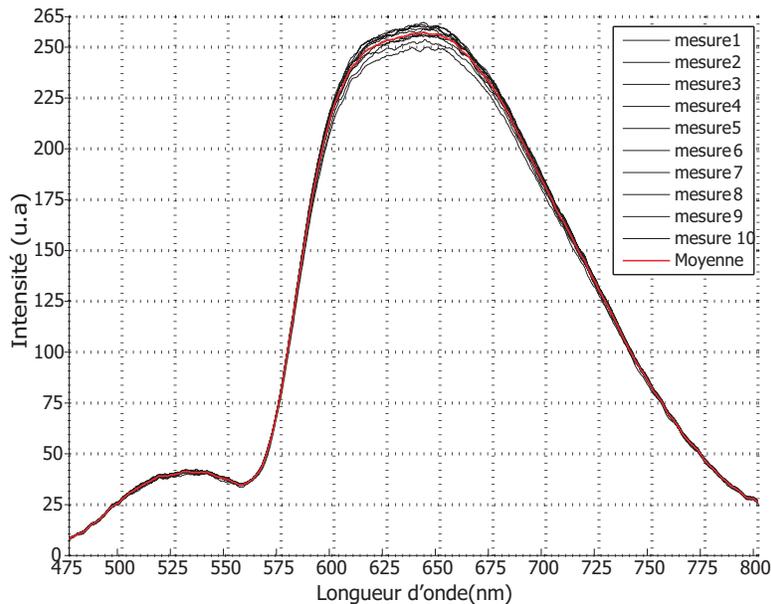


FIGURE 2.15 – Spectres des mesures effectuées dans le premier support.

Pour corriger ce problème, un nouveau support en PDMS mieux adapté a été mis au point conférant à la cornée un positionnement stable dans son milieu.

## Réalisation d'un nouveau support pour la cornée

Nous avons réalisé un autre support en PDMS, cette fois, dans des puits de rinçage qui, étant d'une part, plus profonds que les boîtes de pétri, permet de contenir une quantité suffisante du milieu. D'autre part, il permet de positionner la cornée avec précision sous le faisceau lumineux et l'empêche de flotter. La figure 2.16, montre la structure d'un tel support.

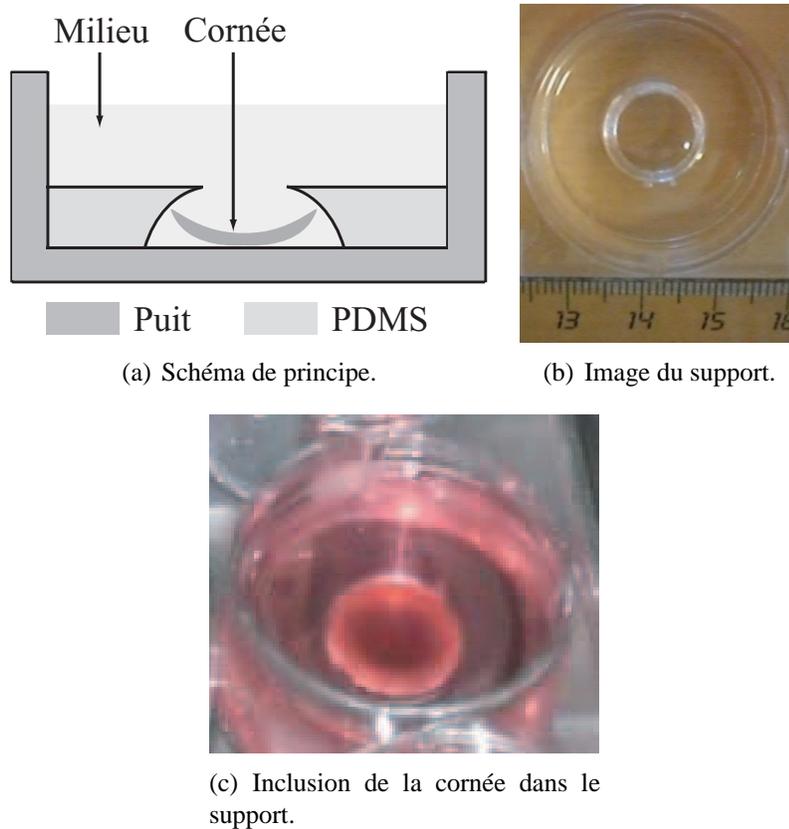


FIGURE 2.16 – Support pour le positionnement de la cornée sous le faisceau lumineux.

En coupe transversale, la figure 2.16(a) montre le positionnement, de la cornée par le support en PDMS (Polydiméthylsiloxane.). Les figures 2.16(b) et 2.16(c) représentent respectivement, le support à vide et le support contenant la cornée dans son milieu de conservation. Cette nouvelle conception a permis une stabilité évaluée dans les résultats obtenus.

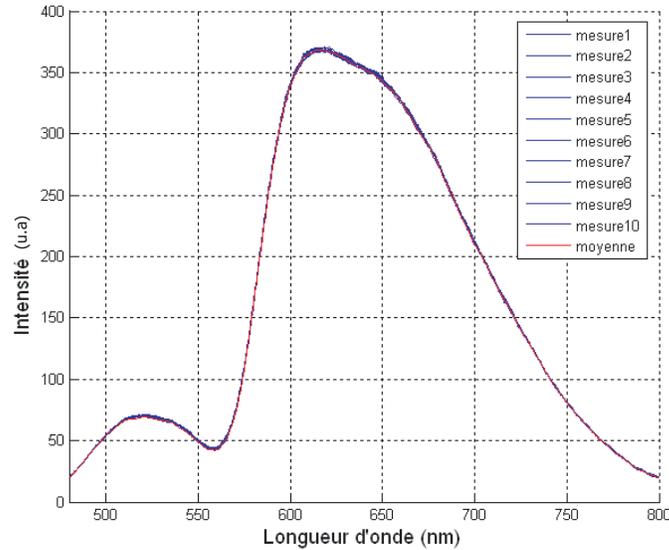


FIGURE 2.17 – Spectres des mesures obtenus à l'aide du nouveau support.

Ces derniers sont illustrés dans la figure 2.17 où l'écart mesuré est d'environ 1% soit, une amélioration d'environ 3%.

### Calcul de la transmittance

Le calcul est plus rigoureux en considérant tous les éléments influant sur la transmittance de la cornée. De ce fait, dans les calculs, une correction est faite sur l'effet du milieu contenu dans la cornée.

Lorsque le support est rempli d'une certaine quantité du milieu représenté par la hauteur  $h_{m_0}$  sur la figure 2.18(b), et, en introduisant une cornée d'épaisseur  $h_c$ , une variation de la hauteur du liquide de  $\Delta h$  est induite. La hauteur du milieu devient  $h_{m_2}$  représentée sur la figure 2.18(c).

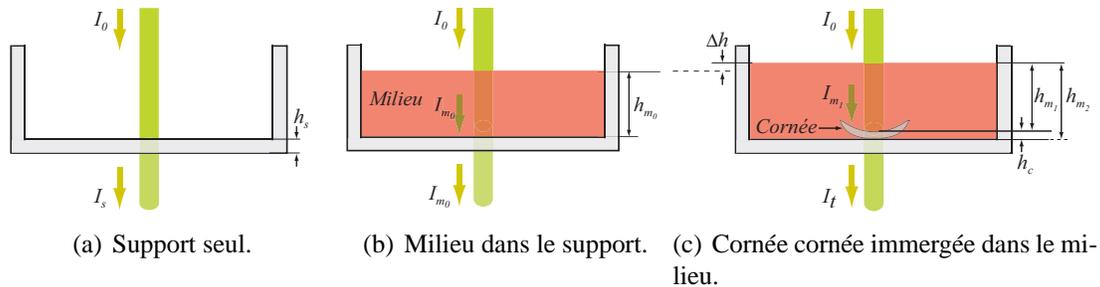


FIGURE 2.18 – Schéma représentant le principe de la mesure de la transmittance.

Pour se faire, trois mesures sont prises :

- Une mesure du support à vide (figure 2.18(a)).
- Une mesure du milieu dans le support (figure 2.18 (b)).
- Une mesure de la cornée dans le support immergée dans le milieu (figure 2.18(c)).

L'intensité  $I_s$  transmise par le support d'épaisseur  $h_s$  et de coefficient d'absorption  $\alpha_s$  est donc,

$$I_s(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\alpha_s(\lambda).h_s} \quad (2.9)$$

L'intensité  $I_{m_0}$  transmise par le milieu dans le support

$$I_s(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-(\alpha_s(\lambda).h_s + \alpha_m(\lambda).h_{m_0})} \quad (2.10)$$

$\alpha_m(\lambda)$  étant le coefficient d'absorption du milieu. D'où :

$$I_{m_0}(\lambda) = I_s(\lambda)e^{-\alpha_m(\lambda).h_{m_0}} \quad (2.11)$$

La mesure  $I_t$  de la cornée dans son milieu est,

$$I_t(\lambda) = I_0(\lambda)e^{-\alpha_s(\lambda).h_s} \times e^{-\alpha_m(\lambda).h_{m_1}} \times e^{-\alpha_{m_c}(\lambda).h_{m_c}} \quad (2.12)$$

Où,

$h_{m_c}$  est la hauteur de la cornée contenant le milieu.

$\alpha_{m_c}(\lambda)$  est le coefficient d'absorption de la cornée et du milieu absorbé. Ce coefficient peut-être dissocié en deux parties, en l'occurrence  $\alpha_c(\lambda)$  le coefficient d'absorption intrinsèque de la cornée et  $\alpha_m(\lambda)$  le coefficient d'absorption du milieu relatif à son volume. Dans une première approche considérant  $\delta h_m$  la hauteur du milieu équivalente, nous pouvons écrire :

$$h_{m_c}.\alpha_{m_c}(\lambda) = h_c.\alpha_c(\lambda) + \delta h_m.\alpha_m(\lambda) \quad (2.13)$$

$$h_{m_1} = h_{m_2} - h_{m_c} \text{ et } h_{m_2} = h_{m_0} + \Delta h$$

$$h_{m_1} = h_{m_0} + \Delta h - h_{m_c}$$

De l'équation 2.12, nous déduisons :

$$I_t(\lambda) = I_s(\lambda)e^{-\alpha_m(\lambda).(h_{m_0} + \Delta h - h_{m_c} + \delta h_m)} \times e^{-\alpha_c(\lambda).h_c} \quad (2.14)$$

La transmittance de la cornée est donnée par :  $T_c = e^{-\alpha_c(\lambda).h_c}$

$$I_t(\lambda) = I_s(\lambda) \times T_c \times e^{-\alpha_m(\lambda).(h_{m_0} + \Delta h - h_{m_c} + \delta h_m)} \quad (2.15)$$

D'après la relation (2.11), nous avons :

$$\alpha_m = -\frac{1}{h_{m_0}} \ln\left(\frac{I_{m_0}}{I_s}\right)$$

La relation (2.15) devient :

$$I_t(\lambda) = I_s(\lambda) \times T_c \times e^{\left(1 + \frac{\Delta h + \delta h_m - h_{m_c}}{h_{m_0}}\right) \ln\left(\frac{I_{m_0}}{I_s}\right)} \quad (2.16)$$

$$I_t(\lambda) = I_s(\lambda) \times T_c \times e^{(1+\eta) \ln\left(\frac{I_{m_0}}{I_s}\right)} \quad (2.17)$$

Où :  $\eta = \frac{\Delta h + \delta h_m - h_{m_c}}{h_{m_0}}$

$\eta$  : coefficient expérimental très inférieur à 1.

Nous déduisons la relation de la transmittance de la cornée :

$$T_c = \left(\frac{I_t(\lambda)}{I_s(\lambda)}\right) \times \left(\frac{I_s(\lambda)}{I_{m_0}(\lambda)}\right)^k \quad (2.18)$$

Où :  $k = 1 + \eta$

### **Conclusion**

La transmittance de la cornée est une fonction d'un coefficient  $k$ , très proche de 1, et qui dépend des éléments expérimentaux.

Comme c'est difficile de connaître exactement la valeur de  $k$ , nous le faisons varier par calcul pour éliminer le pic d'absorption (l'effet du milieu).

### Validation expérimentale

A partir de nouvelles mesures effectuées sur une cornée dans son milieu de conservation. Nous faisons varier le coefficient  $k$  afin d'optimiser les résultats pour permettre l'élimination totale de l'effet du milieu sur la transmittance de la cornée (extinction du pic d'absorption).

La figure 2.19, montre les courbes de variation de la transmittance pour quelques valeurs de  $k$  calculées. La valeur optimale est  $k = 1,04$ . Par conséquent, la transmittance de la cornée correspond à la courbe où  $k = 1,04$ .

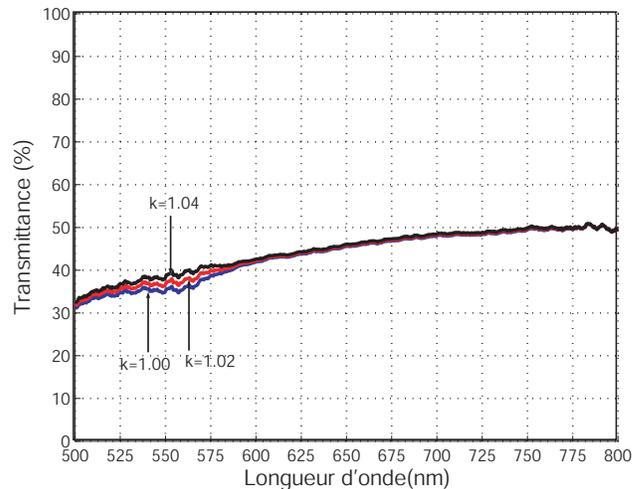


FIGURE 2.19 – Elimination de l'effet du milieu.

## 2.5 Tests sur site

Après la caractérisation du dispositif expérimental et les conditions de travail, en levant toutes les réserves relatives aux paramètres qui influencent la mesure de la transmittance, à savoir le calcul théorique, l'alignement du système optique et le positionnement des cornées.

Les mesures sont réalisées sur des cornées non-conformes, au sein de l'EFS (Etablissement Français du sang), selon le protocole que nous avons énoncé auparavant. Le but de ces mesures est de :

- corréler le nombre de cellules endothéliales et la transmittance des cornées,
- d'étudier l'évolution de la transmittance de la cornée en fonction du temps (plusieurs jours).

Après chaque série de mesures les cornées sont remises dans leurs milieux initiaux, et, sont conservées pour les mesures suivantes.

### 2.5.1 La transmittance en fonction du nombre de cellules endothéliales

Nous savons que le nombre des cellules endothéliales présent dans une cornée est lié à sa transparence. Une cornée contenant plus de cellules endothéliales transmet plus de lumière. Dans la figure 2.20, nous comparons la transmittance de trois cornées contenant un nombre différent de cellules.

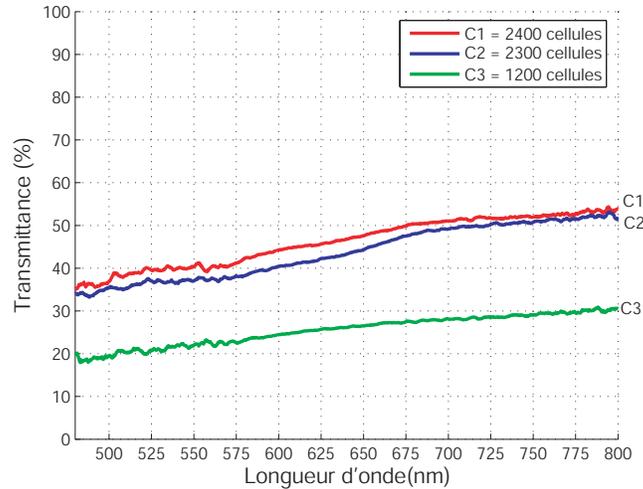


FIGURE 2.20 – Comparaison entre la transmittance de cornées contenant un nombre différent de cellules.

### *Discussions et interprétations*

Dans la figure 2.20, sont illustrées trois courbes de transmittance correspondant à trois cornées contenant un nombre différent de cellules endothéliales. Ces trois courbes sont décalées l'une de l'autre, dans le sens décroissant de la transmittance, en fonction du nombre de cellules qu'elles contiennent. Le résultat de la comparaison entre les transmittances de la cornée 1, 2 et 3 semble corroborer avec notre hypothèse de départ. En effet, le nombre de cellules  $C_{i=1,2,3}$  et les transmittances correspondantes  $T_{i=1,2,3}$  suivent une variation cohérente tel que,

$$C_1 \succ C_2 \succ C_3 \implies T_1 \succ T_2 \succ T_3$$

Les deux premières courbes (ordre décroissant) sont assez proches vu que le nombre de cellules  $C_1$  et  $C_2$  sont peu différents, tant dis que l'écart avec la troisième courbe est plus important au même titre que le nombre  $C_3$  par rapport aux autres. Leurs transmittances moyennes est faible de l'ordre de 44 %, 42 % et 24 % respectivement. Selon la bibliographie [52] la transmittance des cornées n'est pas dans la gamme des cornées susceptibles d'être greffées, malgré un nombre acceptable de cellules  $C_1$  et  $C_2$ . Ceci, a constitué probablement à la réserve, objet de leurs déclassement, en référence de la contre indication médicale.

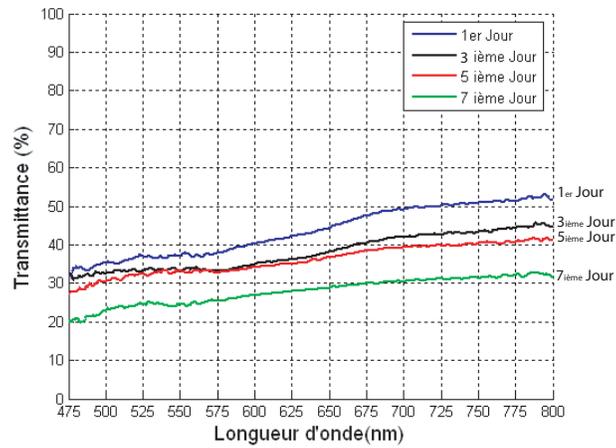
Cela reste vrai même après plusieurs jours où nous constatons une perte de cellules dans toutes les cornées.

## 2.5.2 Evolution de la transmittance de la cornée avec le temps

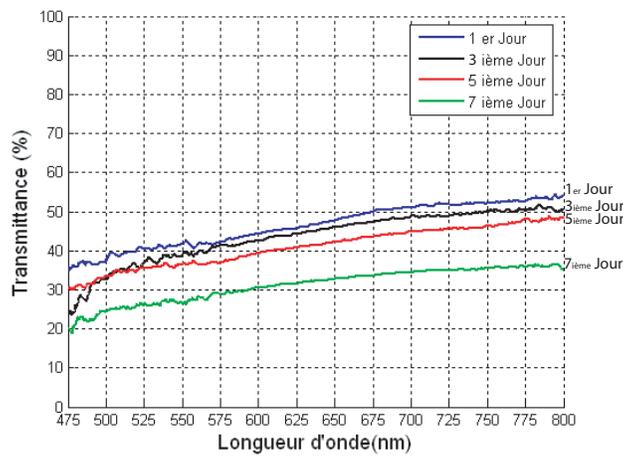
La durée entre le prélèvement des cornées et la greffe peut être plus au moins longue. De ce fait, il est important d'étudier l'évolution des caractéristiques des cornées en fonction du temps. Il est bien connu que les cornées dans leur milieu de transport perdent environ 3 % de leurs cellules endothéliales par jour. Le but est de chercher à trouver une relation entre la transmittance et la diminution du nombre de cellules pour définir un temps limite de conservation dans le milieu de transport (déturgescence). A ce titre, nous avons effectué des mesures sur les cornées précédentes pendant plusieurs jours, et nous avons tracé leurs transmittances.

### *Discussions et interprétations*

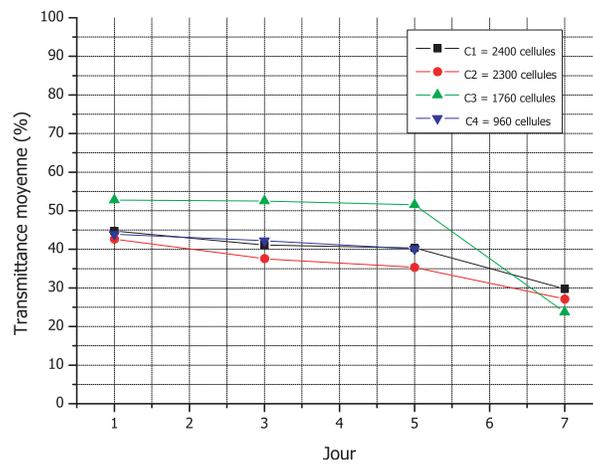
L'évolution de la transmittance des cornées dans le temps a été étudiée sur une durée de sept jours. Au préalable nous avons eu la confirmation que pendant les 48 heures de transport les cornées restent stables. Les mesures sont reprises après 72 heures (3ème jours). A partir de cette date les mesures sont prises a une intervalle de 48 heures. Les courbes représentées sur la figure 2.21, montrent la décroissance de la transmittance en fonction du temps. Nous constatons que la baisse de la transmittance est plus importante à partir du 7ème jour, figures 2.21(a) et 2.21(b). Les transmittances moyennées, de quelques cornées, en fonction du temps sont représentées dans la figure 2.21(C). Leurs sens de variation est décroissant avec une faible pente jusqu'au 5ème jour et une pente relativement rapide au-delà. Nous pouvons dire que la vitesse de dégradation des cornées s'accélère après quelques jours de conservation dans le milieu de déturgescence. Il semblerait contradictoire de constater (figure 2.21 (C)) qu'une cornée dotée d'un nombre réduit de cellules endothéliales ( $C_4 = 960$ ), transmet plus qu'une cornée contenant un nombre de cellules plus important ( $C_2 = 2300$ ). Ceci n'est pas faux, car au cours de nos manipulations nous avons constaté cette anomalie dans le cas de toutes les cornées non-conformes. En effet, pour cette catégorie de cornées, des fluctuations importantes sont enregistrées.



(a) Cornée contenant 2320 cellules.



(b) Cornée contenant 2400 cellules.



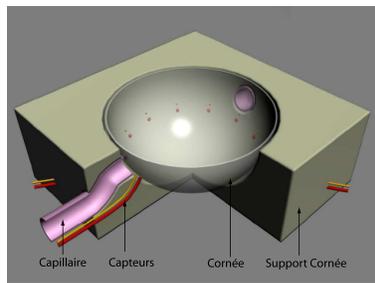
(c) Transmittance moyenne en fonction du temps.

FIGURE 2.21 – Evolution de la transmittance des cornées en fonction du temps.

## 2.6 Conclusion

En passant en revue ce chapitre, nous pouvons faire une synthèse qui a trait au dispositif de mesure, à ses caractéristiques et aux résultats obtenus. Par rapport au dispositif, nous avons conçu et réalisé un premier support de cornées adapté au dispositif qui nous a permis d'aborder des mesures préliminaires. Dans la procédure de mesures, le rinçage des cornées est un passage obligé pour éliminer l'effet du résidu du milieu restant dans la cornée. Mais ce rinçage présente un inconvénient majeur relatif aux délais importants des opérations. Par conséquent, nous avons contourné cela en effectuant des mesures sur des cornées dans leur milieu de conservation. Aussi, nous avons constaté des anomalies induites par les instabilités de positionnement des cornées. Ceci nous a conduit à la réalisation d'un deuxième support pour palier à cet inconvénient. Cette réalisation nous a permis de résoudre le problème de positionnement. Il reste à éliminer l'effet du milieu résiduel. A cet effet, dans nos calculs nous l'avons pris en compte, il se traduit par un facteur  $k$  qui est optimisé, pour chaque cornée. Dans les résultats présentés, contrairement à ceux obtenus par d'autres auteurs [52], le pic d'absorption est infiniment réduit, d'où une mesure plus rigoureuse est obtenue.

Une relation formelle entre le nombre de cellules endothéliales et la transmittance n'est pas encore établie, néanmoins nous avons mis en évidence une corrélation étroite entre ces deux paramètres. Malgré une étude exhaustive tant quantitative que qualitative, il n'en demeure pas moins que certains points restent à élucider. Cette constatation est sine qua non aux travaux menés sur des cornées conformes afin de mieux cerner la relation transmittance/nombre de cellules. Chose que nous n'avons pas obtenue en vertu de la réglementation en vigueur. Au demeurant, des cornées d'origine animales peuvent promouvoir ce travail.



- 3.1 État de l'art
- 3.2 Approche conceptuelle
- 3.3 Réalisation de microcapteurs ...
- 3.4 Caractérisation des capteurs
- 3.5 Etude des capteurs microsystèmes
- 3.6 Intégration des capteurs ...
- 3.7 Conclusion

## Microcapteurs pour la détection de bactéries

Une fois le prélèvement de la cornée effectué, pour une éventuelle greffe, celle-ci est conservée dans un milieu de conservation. Dans le but de prévoir tout risque de contamination bactériologique, la cornée est contrôlée quotidiennement par une mesure de son pH par colorimétrie. La variation de pH, traduit une infection bactérienne et induit un virage de la couleur du milieu du rouge au jaune ou conduit à une turbidité. Notre travail consiste à développer un capteur de pH potentiométrique de taille micrométrique afin de pouvoir suivre la variation de la concentration en protons, localement et en continu. L'originalité de notre démarche est de proposer un pH-mètre basé sur l'utilisation d'un polymère en guise de transducteur présentant une réponse linéaire du pH en fonction du potentiel variant entre 3 et 11 unités. Le capteur de pH repose sur un revêtement d'une surface métallique par électropolymérisation de monomères à la surface d'une électrode. Les polymères électrodéposés permettent la mesure du pH via les groupements amines primaires présents qui peuvent être protonés. C'est la variation de la densité de charge à la surface du polymère qui permet la transduction du signal chimique en signal électrique. Ce microcapteur potentiométrique, entièrement solide, offre la possibilité de mesurer des pH ou un gradient de pH dans des applications dont le suivi est primordial.

### 3.1 État de l'art

#### 3.1.1 Introduction

Un capteur est un dispositif électronique servant à transformer une grandeur physique, chimique ou biologique, appelée mesurande, en une autre grandeur (souvent un signal électrique) exploitable. Il comprend un élément transducteur qui fournit une grandeur, le plus souvent électrique, constituant le signal de sortie. Le capteur de pH est un capteur



chimique puisqu'il traduit la concentration d'une espèce en solution, en l'occurrence la concentration des ions  $H^+$ .

On caractérise un capteur selon plusieurs critères dont les plus courants sont : la grandeur physique mesurée, l'étendue de mesure, la reproductibilité, la sensibilité, la précision, la linéarité et la résolution (figure 3.1).

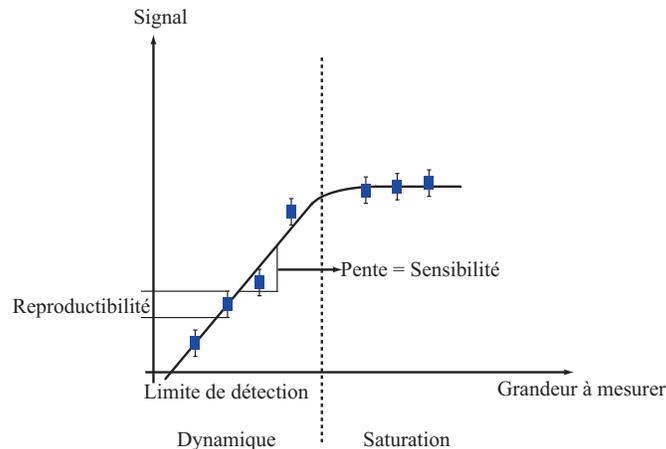


FIGURE 3.1 – Les critères de qualité d'un capteur chimique.

### 3.1.2 Définition du pH

Le pH, qui varie de 0 à 14 en solution aqueuse, traduit la concentration des protons en solution. En 1909 le biochimiste Danois Soren Sorensen a développé l'échelle des pH (figure 3.2) et introduit la définition du pH comme l'opposé du logarithme décimal de  $[H^+]$  :

$$pH = -\log([H^+]) \quad (3.1)$$

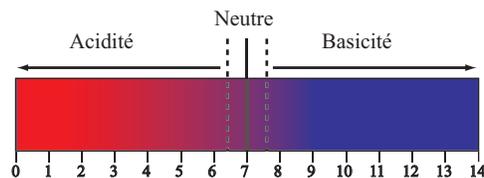


FIGURE 3.2 – Échelle du pH.

En réalité, le comportement des ions en solution ne dépend pas de leur concentration mais de leur activité. Dans le cas des solutions très diluées (inférieur à 0,001 M) on peut négliger la différence entre la concentration et l'activité. Donc, la définition la plus rigoureuse est :

$$\text{pH} = -\log([a_{\text{H}^+}]) \quad (3.2)$$

qui est parfois appelé le pH thermodynamique. En fait, tous les pH-mètres mesurent la valeur thermodynamique du pH, comme présentée dans l'équation de Nernst.

### L'équation de Nernst

Elle décrit la différence de potentiel, entre une électrode, dite de travail, immergée dans une solution contenant un couple redox *ox/red* et une électrode dite de référence, en fonction des concentrations des ions qui participent à la réaction.

$$E_{\text{ox/red}} = E_{\text{ox/red}}^0 + \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{a_{\text{ox}}}{a_{\text{red}}}\right) \quad (3.3)$$

$E^0$  : le potentiel standard de la réaction (mesuré dans les conditions standards) ;

$a_{\text{ox}}$  et  $a_{\text{red}}$  : les activités chimiques de l'oxydant et du réducteur ;

$R$  : la constante des gaz parfaits ( $8,31 \text{ J/mol/}^\circ\text{K}$ ) ;

$T$  : la température absolue mesurée en Kelvin ;

$F$  : le nombre de Faraday ( $96496 \text{ J/V}$ ) ;

$n$  : le nombre d'électrons échangés.

Pour mesurer une tension entre une électrode de travail et une électrode de référence, nous utilisons un voltmètre à haute impédance d'entrée (principe du pont wheatston) qui garantit qu'aucun courant ne passe à travers le circuit et donc qu'aucune réaction aux électrodes n'a lieu.

L'électrode de travail peut intervenir directement dans la réaction redox si elle est constituée d'un métal  $M$  oxydable. La demi-équation rédox s'écrit dans ce cas :



Si l'électrode est en métal pur, c'est-à-dire, si elle n'est pas constituée d'un alliage, alors l'activité de  $M$  solide est unitaire. L'équation de Nernst pour ce type de réaction redox est alors :

$$E_{\text{ox/red}} = E_{M^{n+}/M}^0 + \frac{RT}{nF} \ln(a_{M^{n+}}^s)$$

### Influence du pH

Les ions  $\text{H}^+$  en solution aqueuse sont des oxydants. Ils peuvent être réduits directement en dihydrogène  $\text{H}_2$ , ou participer à la réduction d'autres espèces pour permettre la formation de la molécule d'eau. Dans ce cas l'équation de Nernst permet de quantifier très aisément l'influence du pH sur le potentiel d'équilibre du système.

Dans les conditions standards ( $25^{\circ}\text{C}$ ,  $P = 1 \text{ bar}$ ) et pour  $n = 1$ , la relation de Nernst s'écrit :

$$E_{ox/red} = E_{M^{n+}/M}^0 + 0.059 \log \left( \frac{[H^+]}{[red]} \right) \quad (3.4)$$

d'où

$$E_{ox/red} = E_{M^{n+}/M}^{0'} + 0.059 \log(pH) \quad (3.5)$$

avec

$$E_{M^{n+}/M}^{0'} = E_{M^{n+}/M}^0 - 0.059 \log([red]) \quad (3.6)$$

L'unité de  $E$  est le Volt ( $V$ ).

### 3.1.3 La mesure du pH

Le pH peut être mesuré par différentes méthodes, dont deux sont largement utilisées. La première, la plus simple, est assez précise utilise le papier pH. La deuxième, plus onéreuse mais plus précise, qui repose sur une mesure potentiométrique, utilise les électrodes de pH en verre et les pH-mètres.

#### Les méthodes de détections communes

Généralement, les méthodes de mesure du pH peuvent être classées en quatre catégories : les indicateurs réactifs colorés, les bandes de pH (papier pH), les méthodes à électrodes métalliques (électrode d'hydrogène, électrode à la quinhydrone et électrode d'antimoine) et les méthodes d'électrodes de verre.

**Les indicateurs colorés** tel que le rouge phénol ou l'orange méthyle, sont des composés organiques qui changent de conformation avec l'activité des ions d'hydrogène, entraînant un changement du maximum d'absorbance du composé et par conséquent un changement de couleur.

**Les bandes de pH** sont des bandes de papier sur lesquelles sont fixés des indicateurs. Immergées dans le liquide d'essai, elles montrent une couleur particulière correspondant au pH de la solution. Une couleur standard est comparée pour donner la valeur du pH grossière. Cette méthode est simple mais peu précise : une concentration élevée en sel, la température ou des substances organiques dans le liquide d'essai induisent des erreurs.

**Electrode à l'hydrogène** est le moyen de référence pour toutes les méthodes de mesure de pH. L'activité des ions hydrogène est déterminée par mesures potentiométriques à l'aide d'une électrode standard à hydrogène et d'une électrode de référence. L'électrode standard à hydrogène se compose d'une électrode en platine dans une solution d'hydrogène

1M. Cependant, sa mise en œuvre est relativement complexe, peu pratique et dangereuse.

**Electrode à la quinhydrone** c'est une méthode potentiométrique pour la détermination du pH. Elle est utilisée avant l'introduction de l'électrode de verre. La quinhydrone est un mélange équimolaire cristallisé de benzoquinone (ou quinone) et d'hydroquinone. Quand on le dissout dans l'eau, la quinhydrone forme un couple oxydant/réducteur dépendant du pH. Le potentiel redox de l'équilibre résultant est proportionnel au pH de la solution. Une électrode de platine est utilisée pour mesurer ce potentiel redox. L'électrode à quinhydrone est souvent utilisée pour vérifier le bon fonctionnement d'un système de mesure redox ou pour équilibrer d'autre électrode de référence[64]. Cette méthode est peu utilisée à cause de sa mauvaise reproductibilité.

**Electrode d'antimoine** est similaire à l'électrode à la quinhydrone, les résultats obtenus avec cette méthode sont peu reproductibles ce qui limite son champ d'application [65].

**Electrode de verre**, à cause des difficultés rencontrées avec l'électrode d'hydrogène et les électrodes métalliques mentionnées ci-dessus, l'électrode de verre est utilisée couramment et considérée comme la méthode de référence de mesure du pH, en raison de sa réponse quasi-Nernstienne, de sa reproductibilité et de sa durée de vie. Elle est constituée d'une membrane de verre sous forme de bulbe qui permet le passage des ions  $H^+$  sélectivement, et une solution concentrée de HCl à l'intérieur en contact avec une électrode de référence (figure 3.3). Son principe de fonctionnement repose sur la différence de concentration en ions hydroniums  $H_3O^+$  existant de part et d'autre de la membrane de verre, qui génère un potentiel électrique, appelé potentiel de membrane.

Celui-ci est proportionnel au pH de la solution aqueuse dans laquelle l'électrode est plongée. Les mesures du pH de solutions aqueuses à l'aide d'une électrode de verre nécessitent au préalable une procédure de caractérisation avec des solutions tampons. Cependant, celle-ci est difficile à miniaturiser et ne peut être employée dans des applications *in vivo* en raison de sa nature fragile.

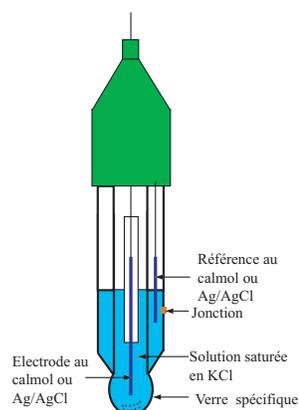


FIGURE 3.3 – Schéma d'une électrode de verre.

### Les capteurs de pH à base de fibres optiques

Leurs principes reposent sur des molécules dont les propriétés spectrales dépendent du pH : on mesure alors les changements spectraux. En voici quelques exemples :

- Une sonde de pH élaborée à partir de fibres optiques recouvertes de bleu de méthylène recueille les ondes évanescentes[66]. La réponse obtenue est linéaire de pH 3 à pH 9.

- Un indicateur coloré fluorescent immobilisé dans une matrice à hydrogel est polymérisé sur la fibre optique[67]. Les sondes fonctionnent dans la gamme de pH 6-8 et possèdent un temps de réponse de 500 secondes.
- Un colorant, le mérocyanine, déposé sur une fibre polie montre une variation de son absorption en fonction du pH et ainsi, un changement de son indice de réfraction à une longueur d'onde donnée[68]. En outre la gamme dynamique de la sonde est fonction de l'épaisseur du film du colorant déposé. La réponse obtenue est linéaire dans la gamme de 11,5 à 13.

### Mesure du pH par variation de masse

Une sonde de pH construite à partir d'un hydrogel sensible au pH est couplée à une sonde dont la fréquence de résonance correspond à la charge de masse appliquée [69]. Le changement moyen de la fréquence de résonance est de  $506\text{Hz}/\text{pH}$  pour une échelle de 4,4 à 8,5, et une résolution de 0.02 unité de pH.

### Les ISFETs

Un développement relativement récent dans la mesure de pH est l'introduction de la technologie des transistors à effet de champ (ISFET (Ion Sensitive Field Effect Transistor.)) comme alternative à l'électrode de verre puisqu'ils sont réalisés avec les technologies silicium, permettant la miniaturisation du capteur. De plus, ils peuvent être réalisés à partir de matériaux biocompatibles. Les plus courants pour les applications biomédicales comportent une membrane en oxyde de silicium recouverte de nitrure de silicium (figure 3.4).

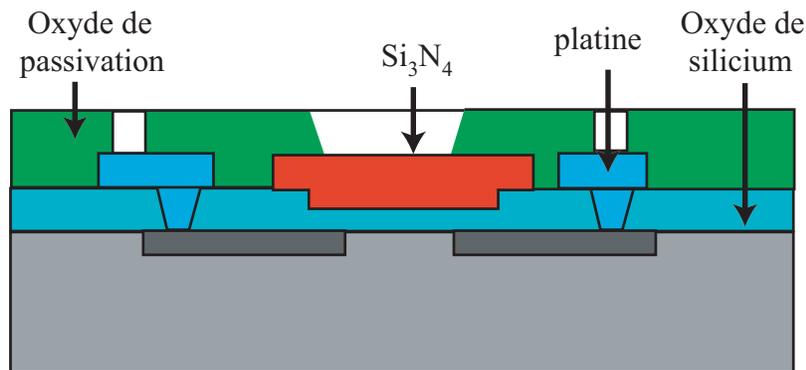


FIGURE 3.4 – Schéma d'un ISFET (reproduction de[70]).

Pour une surface active de l'ordre de la centaine de micromètre carré, ces capteurs fournissent une réponse présentant une sensibilité comprise entre  $45$  et  $55\text{mV}/\text{pH}$  [70, 71]. Certains l'utilisent également comme transducteur les oxydes de métaux de transition.

## Les oxydes de métaux

Les oxydes des métaux sont employés en tant que transducteur pour développer des électrodes de pH. Par exemple, nous pouvons citer les oxydes de platine (Pt/PtO<sub>2</sub>), de plomb (Pb/PbO<sub>2</sub>), d'antimoine (Sb/Sb<sub>2</sub>O<sub>3</sub>), d'iridium (Ir/IrO<sub>2</sub>), de ruthénium (Ru/RuO<sub>2</sub>) et des bronzes (W/W<sub>2</sub>O<sub>3</sub>). Les deux derniers semblent les plus appropriés pour être utilisés en tant que transducteur puisqu'ils permettent d'obtenir une réponse quasi-Nernstienne [72]. Cependant, ils s'avèrent toxiques.

## Les Capteurs imageurs de pH

Un capteur d'imagerie de pH basé sur les caractéristiques du courant photoélectriques dans les semi-conducteurs (silicium) est utilisé pour l'analyse de la surface des dentines cariées extrait des dents humaines [73]. La distribution de l'acide ou de la base sur la surface de dentine a été détectée comme une valeur de pH et considérée comme une image de pH. Le capteur fonctionne comme un réseau de plusieurs éléments de détection, qui est basé sur un capteur potentiométrique à lumière adressable, composé d'une structure de Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>/SiO<sub>2</sub>/Si. La surface sensible au proton est en contact avec un électrolyte, un faisceau de lumière est projeté sur le côté du silicium avec un potentiel de polarisation entre l'électrolyte et la face de silicium [74]. Les résolutions spatiales et de pH du capteur sont respectivement 100  $\mu\text{m}$  et 0.1 pH.

## Les Capteurs de pH basés sur un cantilever nano structuré

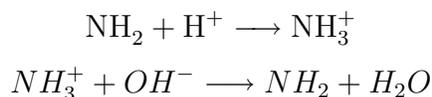
Un capteur de pH ultra sensible a été réalisé à l'aide d'un microcantilever [75]. Le microcantilever est fabriqué à partir de wafers de silicium sur isolant (SOI), ensuite un polymère composé de poly (acide méthacrylique) (PMAA) et poly (éthylène glycol) diméthacrylate est réticulé sur le microcantilever. Le changement du pH au dessus de pKa du PMAA provoque la dilatation du polymère, cela induit un stress réversible à la surface du cantilever, il en résulte un plissement du cantilever. La sensibilité obtenue est de  $5.10^{-5}$  pH pour une déviation de courbure de  $1\text{nm}$ .

## Utilisation des polymères

Plusieurs recherches ont permis d'étudier les polymères sensibles au pH, y compris polypyrrole, polyaniline, etc. [76, 77], dans le but de développer des capteurs de pH tout solide. La polyaniline montre une réponse potentiométrique linéaire en fonction du pH mais les résultats différents, et aucune explication sur le mécanisme de transduction n'est encore avancée. Ainsi, nous pouvons trouver dans la littérature des réponses linéaires de pH 1 à 7 avec une sensibilité de 62 mV/pH sur des électrodes de platine de 1 mm de diamètre [78] il y a aussi une réponse de 86 mV/pH de pH 2 à 9 sur des électrodes micrométriques en téflon [79].

Les récents travaux de Lakard et al. [80] ont montré une réponse linéaire pour les électrodes de platine (d'une surface de  $0,785\text{mm}^2$ ) modifiées par des films polymères de

polyéthylènediamine, de polyaniline et de polypyrole. Les sensibilités obtenues sont respectivement de 46 mV/pH, 52 mV/pH et 48 mV/pH pour des pH de 2 à 10 [80]. Le mécanisme de réponse au pH peut être représenté par la formule suivante :



### Les électrodes de référence

L'électrode de référence par excellence est l'électrode standard à hydrogène (SHE (Standard Hydrogen Electrode.)). Son inconvénient majeur est sa mise en œuvre qui s'avère compliquée. Il existe aussi l'électrode saturée au calomel qui est composée d'un fil de mercure recouvert de chlorure de mercure plongé dans une solution saturée de chlorure de potassium (KCl). Du fait de sa toxicité, elle est de plus en plus remplacée par l'électrode au chlorure d'argent (SRE (Silver Reference Electrode.) ). Cette dernière repose sur le même principe que la précédente, le mercure étant remplacé par l'argent. Toutes ces électrodes de référence ont un potentiel constant et connu quel que soit le pH de la solution dans laquelle elles sont plongées. L'utilisation de pseudo électrodes de référence est une alternative. Constituées simplement d'un fil de métal (platine ou argent par exemple), elles ont l'avantage de ne pas nécessiter de solution saturée et de posséder une faible impédance. Cependant, le potentiel n'est pas connu et dépend de la solution dans laquelle elles sont immergées.

### Conclusion

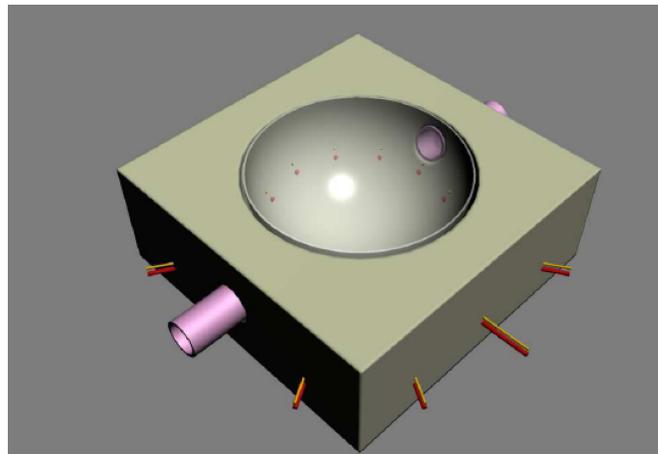
*Il y a un intérêt considérable à utiliser des polymères comme transducteurs puisqu'ils ont comme avantages leur faible coût, facile à synthétiser en couches minces. Ces caractéristiques leurs confèrent un grand champ d'application. De plus, la biocompatibilité de certains polymères offre la possibilité de les utiliser dans le domaine de la science du vivant. De plus notre savoir faire dans ce domaine était un précurseur de notre engagement dans cette voie.*

## 3.2 Approche conceptuelle

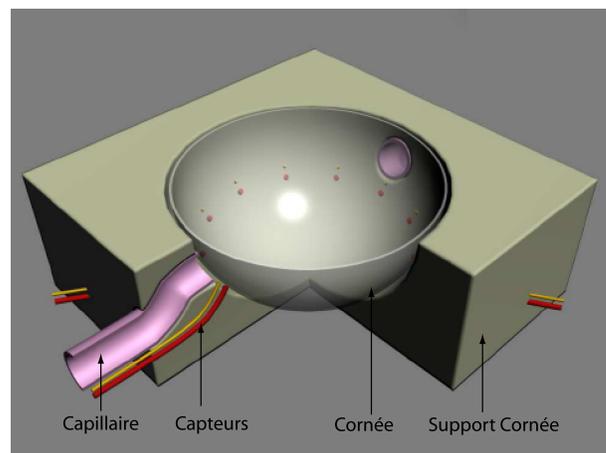
Le dispositif conçu sur lequel porte notre travail s'apparente à un « Lab On Chip » (figure 3.5). Ce dernier remplit plusieurs fonctions :

- contenir le milieu de conservation dans lequel est plongé le greffon ;
- jouer le rôle de support transparent permettant d'effectuer les mesures optiques ;
- mesurer localement le pH grâce à l'inclusion de fils micrométriques et de canaux permettant un renouvellement continu du milieu de conservation et le positionnement de la cornée par fluïdique.

L'ensemble doit être biocompatible, stérilisable et réutilisable.



(a) Vue générale.



(b) Vue en coupe.

FIGURE 3.5 – Schéma de principe de la mesure du pH de la cornée.

Ce dispositif répond particulièrement au besoin des mesures de pH avec une précision satisfaisante. En effet, le contrôle bactériologique du milieu est réalisé par observation de

la variation de la couleur du rouge phénol. Le capteur que nous avons développé apporte une mesure sur une plus grande gamme de pH que l'indicateur coloré (zone de virage entre pH 6,6 et 8,4). De plus, la disposition de microcapteurs de pH répartis autour de la cornée permet une mesure locale. Il est alors possible d'obtenir un gradient de pH et de détecter précocement toute infection.

### 3.3 Réalisation de microcapteurs chimiques de pH

#### 3.3.1 Le principe du capteur

##### Description

Le capteur que nous allons réaliser est de type potentiométrique et nécessite deux électrodes pour fonctionner. La première, l'électrode de mesure, est en platine recouvert par l'électrodéposition d'un film mince de polymère faisant office de transducteur. L'utilisation du platine se justifie par le fait qu'il s'agit d'un métal noble et qui possède un excellent état de surface. La deuxième, l'électrode de référence, quant à elle, est en argent complexé en surface par du chlorure d'argent. Cette complexation offre une stabilité satisfaisante et meilleure que celle obtenue avec une simple électrode d'argent. De plus, son élaboration est relativement simple à mettre en œuvre puisqu'il suffit de plonger l'argent dans une solution de chlorure de fer ( $\text{FeCl}_3$ ) pendant 50 s.

Grâce à un système d'isolation dont nous parlerons ultérieurement, seules les extrémités des capteurs, c'est-à-dire le chlorure d'argent et le polymère électrodéposé, entrent en contact avec la solution dont on souhaite déterminer le pH.

##### Principe de fonctionnement

Le polymère électrodéposé sur le platine, qui contient des fonctions aminées pouvant être protonées, est sensible aux changements de la concentration des protons  $\text{H}^+$ . Le polymère joue le rôle de transducteur. Le principe de fonctionnement repose sur la variation locale de la densité des charges au voisinage de l'électrode modifiée par le polymère qui engendre un potentiel proportionnel au pH du milieu étudié (figure 3.6). Cette valeur de différence de potentiel ddp (la différence de potentiel entre l'électrode de référence et l'électrode de mesure) est mesurée à différentes valeurs de pH et constitue la caractérisation du capteur. Une régression linéaire permet d'obtenir la relation :

$$E = A \times \text{pH} + B \quad (3.7)$$

Où  $A$  et  $B$  dépend du polymère déposé sur l'électrode de platine.

$A$  : la sensibilité du capteur ;

$B$  : le potentiel standard de la réaction.

Cette équation est calquée sur l'équation de Nernst défini auparavant.

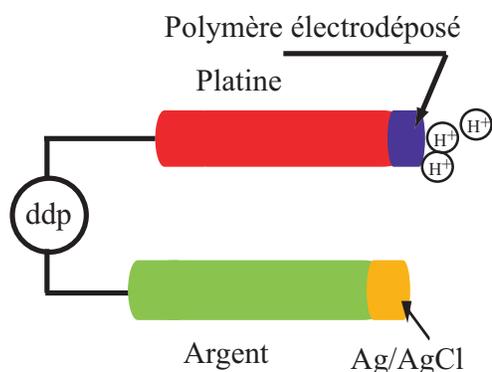


FIGURE 3.6 – Principe de la mesure potentiométrique.

### 3.3.2 Les polymères étudiés

Nous avons étendu notre étude à trois polymères dans le but de choisir parmi eux celui qui donne la meilleure sensibilité.

Chacun des polymères est préparé par oxydation électrochimique du monomère et donne lieu à la formation d'un film, qui peut être conducteur électronique ou non, à la surface de l'électrode de platine. Nous parlons également d'électropolymérisation. L'oxydation anodique des monomères électroactifs est suivie par voltampérométrie cyclique, mais peut être réalisée plus simplement par chronoampérométrie au-delà du potentiel d'oxydation anodique des composés aminés. L'oxydation de la molécule du monomère est caractérisée par un pic de courant faradique sur la courbe de la voltampérométrie cyclique.

Les monomères utilisés sont la glycine, l'éthylènediamine et l'aniline. Ils ont tous la particularité de contenir un groupement amine primaire permettant leur protonation (migration du H<sup>+</sup> sur le doublet de l'azote) nécessaire à la mesure du pH. Les polymères qui résultent de leur oxydation anodique donnent des réponses aux variations de pH. De plus ils sont fortement ancrés à la surface de l'électrode lors de l'électropolymérisation [76]. Ils sont bon marché, faciles à électrosynthétiser et biocompatibles.

#### L'éthylènediamine (EDA)

L'éthylènediamine est un solvant organique ainsi qu'une diamine primaire de formule chimique C<sub>2</sub>H<sub>8</sub>N<sub>2</sub>. Sa formule semi développée est H<sub>2</sub>N-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>. C'est un solvant non aqueux, irritant et difficile à manipuler ; il doit être manipulé en boîte à gants sous atmosphère contrôlée d'argon. En effet, il ne doit pas être pollué par la vapeur d'eau et l'oxygène contenu dans l'air ambiant car cela peut créer des réactions concurrentes indésirables lors de l'oxydation anodique. L'électropolymérisation de l'EDA, en milieu

anhydre, aboutit à la formation de polyéthylèneimine linéaire (notée PEI-L (Polyéthylèneimine Linéaire.)). C'est donc la PEI-L qui se retrouve déposée au niveau de l'électrode en platine.

### L'aniline

Connue également comme phénylamine ou aminobenzène. L'aniline est un composé organique renfermant une fonction amine primaire, aromatique (figure 3.7). Elle a pour formule :  $C_6H_5NH_2$ . C'est un liquide incolore, brunissant sous l'action de l'air et de la lumière, à l'odeur très désagréable ; peu soluble dans l'eau.

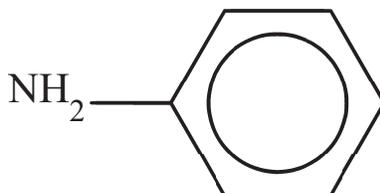


FIGURE 3.7 – Molécule de l'aniline.

L'électropolymérisation de l'aniline en polyaniline aboutit à un polymère conducteur électronique, stable dans l'air et insoluble dans la plupart des solvants organiques [81].

### La Glycine

Il s'agit du plus simple des acides aminés, sa formule chimique est  $HO_2CCH_2NH_2$ . Il contient à la fois une fonction acide carboxylique et une fonction amine (figure 3.8). Il est aussi ampholyte (peut se comporter comme un acide ou comme une base). Cet acide aminé peut être électropolymérisé en milieu aqueux en polyglycine.

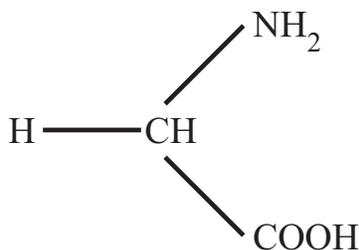


FIGURE 3.8 – Molécule de la glycine.

### 3.3.3 Electrodeposition des polymères sur le platine

Les dépôts de polymères sur le platine, quel que soit le support, ont été réalisés par voltampérométrie cyclique.

Les paramètres de l'électrodeposition, différents pour chaque polymère, sont ajustables via le logiciel de pilotage utilisé. Ainsi, il est indispensable de fixer la plage de balayage en potentiel, la vitesse de balayage et le nombre de cycles effectués pour ces électrodepositions.

Les électrodepositions sont en général effectuées dans une cellule électrochimique avec un montage tel qu'en figure 3.9. Nous pouvons y voir l'électrode de référence en argent (en haut), la contre-électrode en platine (à droite) et à gauche l'électrode de travail qui sera modifiée.

Le principe du montage reste le même quel que soit le support (microsystème ou fils inclus dans un milieu) et quel que soit le polymère.

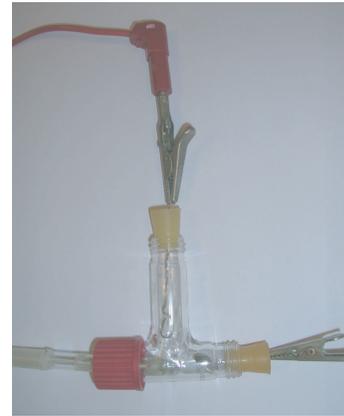


FIGURE 3.9 – Montage de voltampérométrie cyclique.

#### Electrodeposition de l'éthylènediamine

Nous avons réalisé nos dépôts de PEI-L par voltampérométrie cyclique, au contraire de la glycine et l'aniline, dans un milieu hermétique afin d'éviter toute pollution provenant de l'air (oxygène et eau) qui peuvent entraîner des réactions concurrentes. Les paramètres de dépôt sont : vitesse de balayage :  $20\text{mV/s}$ , potentiel variant entre 0 et 5 V/SRE (Silver Reference Electrode ou électrode de référence en argent), sur 7 cycles. Le sel du fond utilisé est du LiTFSi.

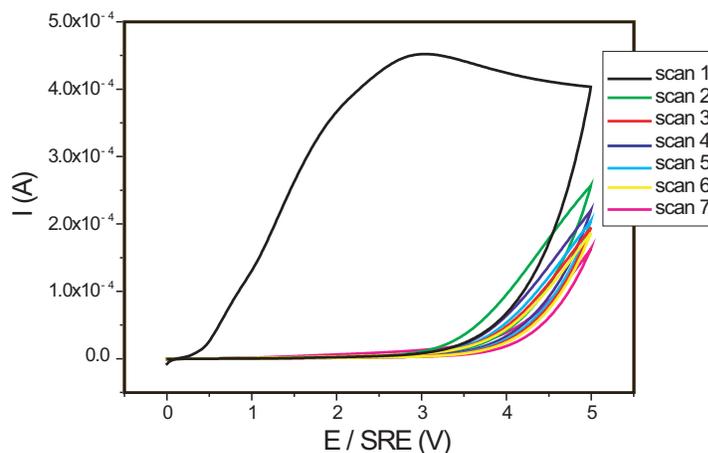


FIGURE 3.10 – Voltampérogramme d'une solution d'EDA.

Sur le voltampérogramme (figure 3.10), nous constatons que le pic d'oxydation de

l'EDA est à  $+2,6V/SRE$  lors du premier balayage. L'intensité anodique chute fortement lors des balayages suivants, ceci traduit le phénomène de passivation de l'électrode par le dépôt isolant du polymère. Ce phénomène est caractéristique de la formation d'un film polymérique non conducteur.

### Electrodéposition de l'aniline

Le dépôt de polyaniline par voltampérométrie cyclique a été réalisé à  $20mV/s$  entre 0 et  $1,9V/SRE$  sur 3 cycles.

L'avantage pratique du dépôt de la polyaniline par rapport aux dépôts de polyglycine ou de PEI-L est son aspect vert-noir visible à l'œil nu. Pour l'électrodéposition,  $2M$  d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) sont ajoutés à la solution de l'aniline ( $0,5M$ ).

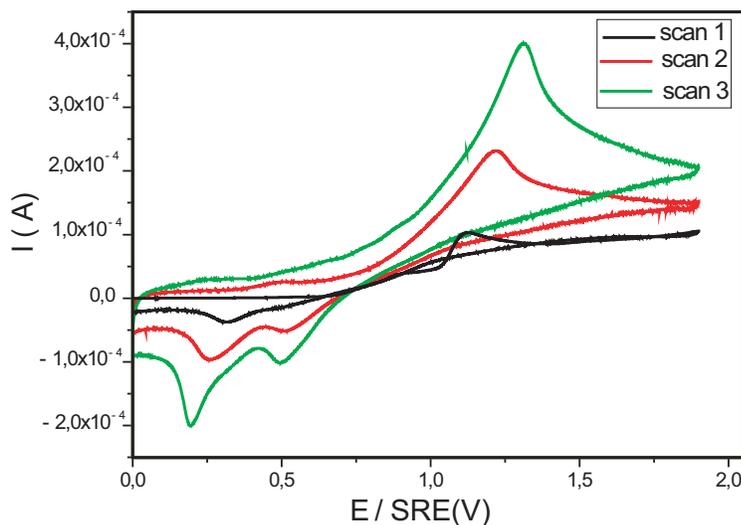


FIGURE 3.11 – Voltampérogramme d'une solution d'aniline.

Sur le voltampérogramme (figure 3.11), nous pouvons voir un pic d'oxydation à  $+1,1V/SRE$  lors du premier cycle. Ce pic, caractéristique de l'oxydation du groupement amine de l'aniline, est également visible lors des cycles suivants. Il indique que l'oxydation du groupement amine de l'aniline et des premiers oligomères de la polyaniline (notée PANI) se poursuit, mais aussi que la polyaniline est un polymère conducteur.

### Electrodéposition de la glycine

Pour le dépôt de polyglycine, un sel de fond a été ajouté à la solution de glycine utilisée ( $0,5M$ ) afin d'assurer une conductivité ionique entre les électrodes. Il s'agit ici de tétrafluoroborate de sodium ( $NaBF_4$ );  $0,3$  grammes ont été ajoutés dans  $100 mL$ . Les courbes de voltampérométrie cyclique obtenues lors de l'électrodéposition de la glycine sont représentées sur la figure 3.12 (la vitesse de balayage est de  $10 mV/s$  pendant 10 cycles entre  $1,4$  et  $1,9 V/SRE$ ).

Sur le voltampérogramme nous observons, lors du premier balayage, un pic d'oxydation à +1,75 V/SRE. Celui-ci témoigne de l'oxydation électrochimique de la glycine. Nous pouvons noter, comme pour l'EDA, le phénomène de passivation de l'électrode par le dépôt de polymère isolant, caractéristique de la formation d'un film de polymère non conducteur ; en effet, l'intensité anodique chute fortement. La surface de l'électrode est recouverte d'une couche mince de polymère essentiellement lors des premiers balayages puisque sa croissance est liée au passage du courant.

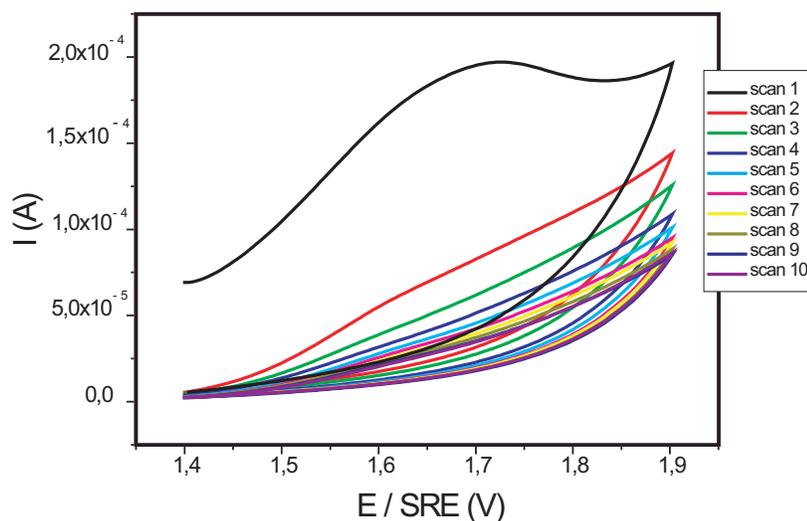


FIGURE 3.12 – Voltampérogramme d'une solution de glycine.

### Caractérisation des dépôts

La caractérisation des dépôts de polymères a été réalisée par microscope à force atomique (AFM) en mode contact. Dans un premier temps, nous avons réalisé une topographie de la surface de l'électrode de platine avant les dépôts électrochimiques (figure 3.13(a)). La surface apparaît homogène et uniforme avec une faible rugosité de surface et nodules.

La surface de l'électrode modifiée par oxydation anodique de l'EDA (figure 3.13(b)) présente une surface totalement différente de celle du platine vierge. Les nodules métalliques ont complètement disparus et l'image présente des stries dues au phénomène de stick-slipping (coller-glisser) de la pointe AFM engluée dans la matrice polymère.

En revanche, le dépôt de la PANI est tellement important qu'il modifie radicalement l'état de surface du platine et présente une topographie qui n'est plus aussi homogène que dans le cas des dépôts dus à l'oxydation anodique de l'EDA et de la glycine (figure 3.13(c)).

En ce qui concerne les électrodes électromodifiées par l'oxydation anodique de la glycine (figure 3.13(d)), nous pouvons remarquer que les nodules de platine ne sont pas aussi contrastés que dans le cas de la surface du platine vierge. Nous remarquons aussi

que le dépôt est moins épais que dans le cas de l'EDA mais existe et assure une enveloppe des billes de platine.

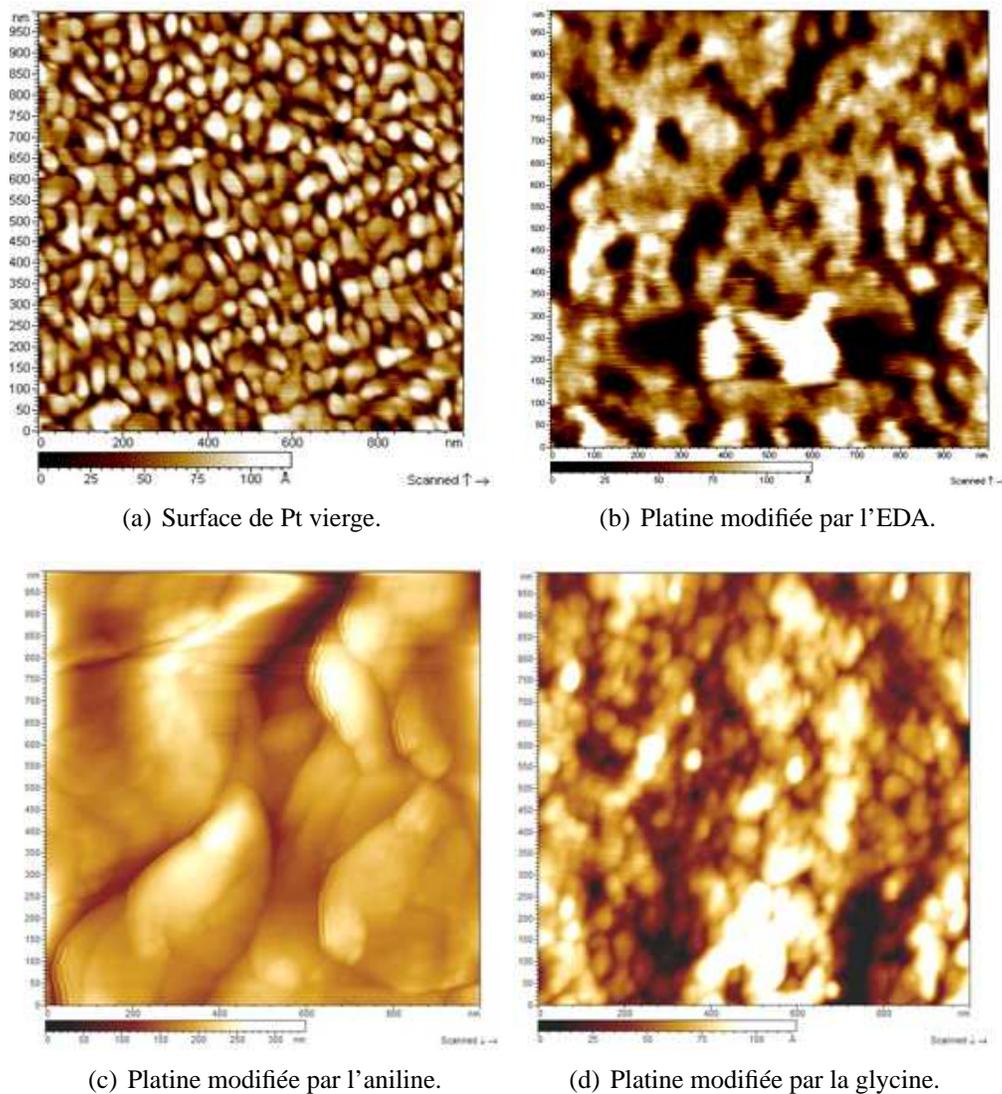


FIGURE 3.13 – Images AFM en mode contact sur platine  $1 \times 1 \mu\text{m}^2$ .

### 3.4 Caractérisation des capteurs

Cette partie concerne la caractérisation des capteurs, c'est-à-dire la réponse que nous obtenons en fonction du pH. L'objectif est d'obtenir une réponse linéaire du capteur sur une gamme de pH la plus étendue possible.

### 3.4.1 Etude des capteurs filaires

Nous avons tout d'abord commencé par l'étude du comportement des polymères sur des électrodes filaires de taille millimétrique, afin de s'assurer que nos résultats étaient cohérents et conformes à ceux de la littérature. Ensuite, nous avons étudié le comportement des électrodes filaires de taille micrométrique en vue de les intégrer dans le support des cornées.

#### Etude des électrodes de taille millimétriques

Les électrodes millimétriques de  $2\text{mm}$  de diamètre sont constituées d'un fil de platine piégé dans du verre (figure 3.14).

L'électrodéposition s'effectue au niveau de l'extrémité en platine de ces électrodes, préalablement polies. La caractérisation de ces électrodes consistait à plonger successivement chacune d'entre elles avec le fil d'argent complexé par  $\text{FeCl}_3$  (électrode de référence) dans différentes solutions de pH connu. La différence de potentiel entre les électrodes millimétriques (électrodes de mesures) et l'électrode de référence est mesurée à l'aide d'un pH-mètre en mode voltmètre de haute impédance d'entrée. Nous obtenons ainsi des points expérimentaux (pH, potentiel). En effectuant des régressions linéaires, nous pouvons calculer les différents coefficients des droites représentant la différence de potentiel en fonction du pH ( $E = f(\text{pH})$ ) ainsi que les coefficients de corrélation linéaire. Les coefficients directeurs correspondent à la sensibilité des capteurs de pH réalisés. Cette méthode est celle utilisée pour toutes les caractérisations effectuées sur l'ensemble des capteurs réalisés et testés.



FIGURE 3.14 – Electrode millimétrique en verre.

#### *Cas de la PEI-L*

Les résultats obtenus pour la caractérisation des électrodes millimétriques modifiées par l'oxydation anodique de l'éthylènediamine sont les suivants (figure 3.15) :

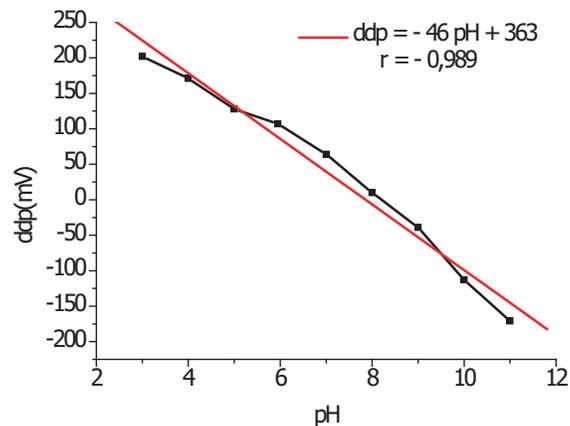


FIGURE 3.15 – Caractérisation d'électrodes millimétriques modifiées par l'EDA.

La sensibilité observée ici est d'environ 46 mV/pH, celle-ci est comparable aux résultats obtenus lors de précédentes études au laboratoire [80].

#### *Cas de l'aniline*

Les résultats obtenus pour la caractérisation des électrodes millimétriques recouvertes par la PANI par voie électrochimique sont les suivants (figure 3.16). Les résultats pris en compte ci-dessous pour la caractérisation ne vont que de pH 3 à 9 car, conformément aux résultats que l'on peut trouver dans la bibliographie, la linéarité pour l'aniline ne s'observe que jusqu'à pH 8 ou 9 [78].

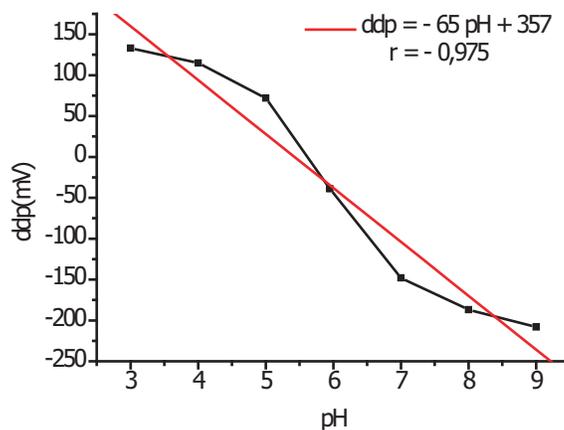


FIGURE 3.16 – Caractérisation d'électrodes millimétriques modifiées par l'aniline.

### *Cas de la glycine*

Les résultats obtenus pour la caractérisation des électrodes millimétriques recouvertes par la polyglycine par voie électrochimique sont les suivants (figure 3.17).

La sensibilité obtenue est quasi Nernstienne puisque proche de 59 mV/pH. Le coefficient de corrélation obtenu montre que la relation est linéaire.

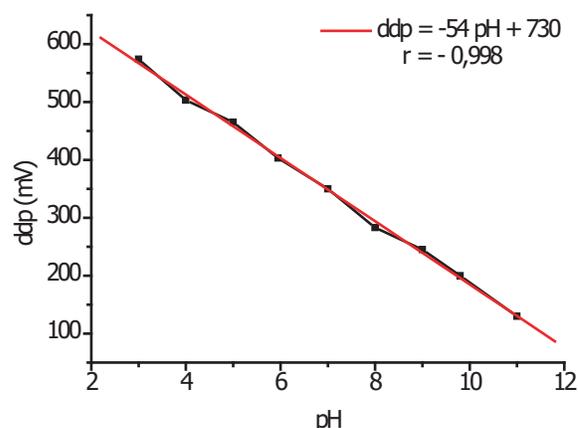


FIGURE 3.17 – Caractérisation d'électrodes millimétriques modifiées par la glycine.

### *Conclusion*

*Les résultats obtenus sur des électrodes millimétriques montrent des relations linéaires du pH en fonction du (ddp) dans une gamme qui s'étend de 3 à 11pH, dépendant du type de polymère. Les droites linéaires obtenues dans les trois cas étudiés montrent que le cas de la glycine se distingue par un coefficient de corrélation de 0.998. Aussi, nous constatons que la sensibilité obtenue dans le cas de la glycine est quasi Nernstienne, tandis que les sensibilités obtenues sur l'aniline et le PEI-L sont conformes à la bibliographie. Dans la partie qui suit, nous allons étudier des électrodes de taille micrométriques.*

### Étude de fils micrométriques piégés dans des milieux d'inclusion

Cette inclusion de fils dans un solide diélectrique facilement réalisable avait pour objectif de nous rapprocher au maximum du prototype final puisque des fils de platine y seront inclus. Dans un premier temps, nous parlerons des essais réalisés avec de la résine en milieu d'inclusion, puis, du verre dans un second temps.

### Fils de platine et d'argent piégés dans de la résine

Nous avons effectué des essais en incluant des fils métalliques (platine et argent) dans une résine (e 501). Les fils de Pt et d'Ag sont, d'un côté, reliés aux appareils de mesures et, de l'autre côté, plongés dans une solution après avoir été polis (Pt) et complexés (Ag par AgCl) (figure 3.18).

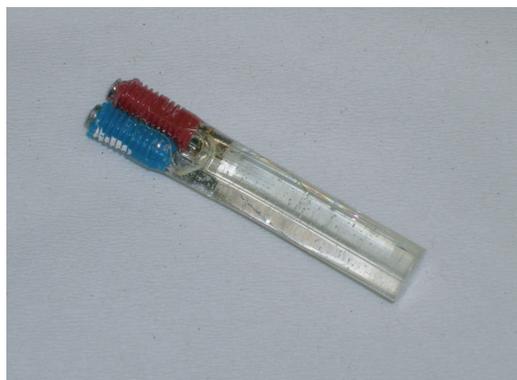


FIGURE 3.18 – Fils micrométriques de platine et d'argent pris dans de la résine.

Les premières caractérisations ont donné de bons résultats, mais au bout de cinq caractérisations, il nous était impossible d'obtenir des valeurs stables. Nous pensons que cette résine réagit chimiquement, empêchant ainsi d'avoir des résultats répétitifs sur de longues périodes. Par conséquent, nous avons opté pour un changement du milieu d'inclusion des électrodes.

### Fils de platine et d'argent piégés dans du verre

Nous avons utilisé le verre comme support de nos fils puisque celui-ci est couramment utilisé dans les électrodes traditionnelles et pratiquement inertes. Nous avons donc fabriqué de telles électrodes (figure 3.19) avec un fil de platine piégé dans un tube en verre ; le fil de platine utilisé est de  $76\mu m$  de diamètre. Nous n'avons pas pu y inclure de fil d'argent car celui-ci possède un point de fusion trop bas pour résister à la chaleur de la flamme nécessaire au façonnage de ces électrodes. La référence utilisée lors de nos caractérisations était donc un fil d'argent extérieur de  $2mm$  de diamètre à l'électrode complexée en surface par du  $FeCl_3$ .



FIGURE 3.19 – Électrode en verre fabriquée au laboratoire.

A chaque électrodéposition, une série de dix mesures ont été effectuées, afin d'évaluer la reproductibilité des mesures.

#### *Cas de la PEI-L*

Le potentiostat utilisé et ceux disponibles au laboratoire de chimie n'ayant pas une sensibilité inférieure au nanoampère, nous n'avons pas réussi à réaliser des dépôts électrochimiques sur nos électrodes de verre micrométriques. En effet l'enregistrement du voltammogramme est, pour nous, une assurance que le dépôt s'est déroulé correctement.

#### *Cas de l'aniline*

Les résultats obtenus lors de la caractérisation du système à électrodes micrométriques sont les suivants (figure 3.20).

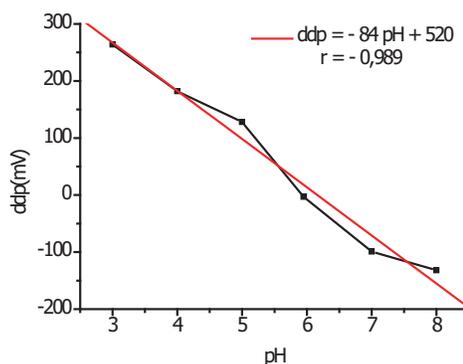


FIGURE 3.20 – Caractérisation d'électrodes micrométriques modifiées par l'aniline.

La sensibilité obtenue est supérieure de celle de l'électrode de verre (59 mV/pH). Cette réponse super-Nerstienne est due probablement au non équilibre du processus protonation / déprotonation de la chaîne azotée présente dans le polymère [79].

### *Cas de la glycine*

Les caractérisations réalisées avec de telles électrodes électromodifiées par de la glycine ont donné les résultats suivants (figure 3.21).

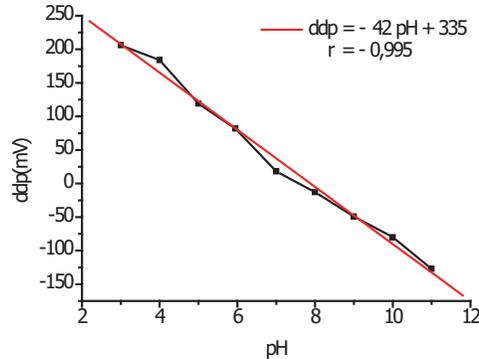


FIGURE 3.21 – Caractérisation d'électrodes micrométriques modifiées par la glycine.

Ces résultats montrent que la plage de mesures du pH s'étend de 3 à 11, avec une bonne linéarité (coefficient de corrélation 0,995). La sensibilité de telles électrodes est plus faible que pour des fils de taille millimétrique mais reste tout à fait acceptable puisqu'elle est de 42 contre 54.

## 3.5 Etude des capteurs microsystèmes

Parallèlement à la phase de validation des capteurs filaires, nous avons mené une étude sur la réalisation de ces capteurs sous une forme planaires : les microsystèmes. Ce choix était motivé par plusieurs facteurs, citons :

- la possibilité de les intégrer au support de la cornée ;
- étudier leur sensibilité en fonction de la taille ;
- la fabrication en série pour d'autres applications que la cornée.

Nous avons conduit une étude systématique sur la réponse de ces capteurs en fonction de leur taille. Pour caractériser notre capteur, nous avons réalisé plusieurs tailles d'électrodes : entre 1000, et 10  $\mu m$  de diamètre pour l'électrode de mesure.

Nous allons décrire dans ce qui suit les différentes étapes de la réalisation et de la caractérisation de ces capteurs miniatures.

### 3.5.1 Etude de microsystèmes sur substrat en silicium

#### Microsystèmes à électrodes linéaires

##### *Schéma et réalisation technologique*

Notre but est de réaliser un microsystème constitué de deux électrodes, une électrode en platine et une électrode en argent. Les électrodes sont reliées par des pistes à des terminaisons rectangulaires. Ces dernières assurent la connexion au circuit de mesure et/ou au potentiostat qui est un appareil utilisé dans l'électrodéposition. Ces architectures ont été choisies pour mettre en évidence l'effet de la géométrie et pour optimiser l'interaction entre les deux électrodes. Deux structures ont été retenues et représentées dans le schéma de principe (figure 3.22 (a)). Nous avons utilisé un wafer en silicium oxydé thermiquement de 4 pouces de diamètre, de  $525\mu\text{m}$  d'épaisseur. Deux masques lithographiques de 5 pouces sont nécessaires pour la réalisation de nos microsystèmes. Le premier masque définit les motifs de l'électrode de travail (en platine). Le deuxième masque définit les motifs de l'électrode de référence (en argent). La transposition du masque sur le wafer demande l'utilisation d'une technique appelée Lift-off .

Nous obtenons les microsystèmes par un dépôt d'une couche de  $150\text{nm}$  pour chaque électrode. Il faut noter, qu'une couche d'accroche en titane ( $10\text{nm}$ ) est déposée avant le dépôt du platine et d'argent. Cela nous a permis de réaliser les motifs en titane-platine et titane-argent sur le wafer (figure 3.22 (b)).

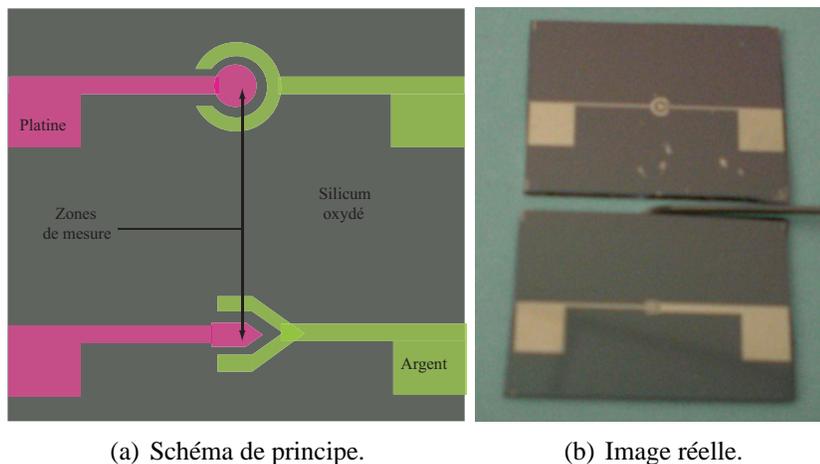


FIGURE 3.22 – Architectures retenues pour les microsystèmes.

### Discussion et Conclusion

Les électrodépositions réalisées par voltampérométrie cyclique sur l'électrode de Pt des microsystèmes s'effectuaient suivant le même principe que celles effectuées sur des électrodes de taille millimétrique. Nous avons toujours utilisé un fil d'argent en guise d'électrode de référence, du platine comme contre-électrode et, comme électrode de travail, la piste en platine des microsystèmes.

Pour caractériser nos capteurs, nous avons déposé la solution tampon de pH sur les électrodes du capteur. Les résultats obtenus n'étaient pas fiables (mesures non stables) en raison de l'étalement de la solution sur les microsystèmes. Nous avons tenté plusieurs solutions pour résoudre ce problème, en essayant d'isoler la partie de mesure du reste du microsystème pour contenir la solution de pH juste sur la partie de mesure. Mais nous n'avons pas réussi à trouver une méthode fiable et reproductible. Pour contourner ce problème nous avons changé notre approche de caractérisation, puisque nous avons décidé de plonger les microsystèmes dans le milieu pH et non plus d'amener la solution sur le capteur.

Comme nos microsystèmes actuels ne sont pas adaptés à cette approche, nous avons conçu et réalisé une nouvelle génération de microsystèmes plus adaptés.

### Microsystèmes à électrodes parallèles

#### Schéma et réalisation technologique

Dans cette version, la configuration des électrodes a été modifiée d'une structure où les contacts électriques sont placés de part et d'autre de la zone de mesures en une structure où les contacts sont du même côté. Dans ces conditions, les microcapteurs peuvent être immergés sans que les contacts électriques soient affectés (figure 3.23(a)).

La nouvelle architecture permet d'isoler tous les circuits du microsystème au moyen d'une couche de silice (isolant sur le schéma). Seules les zones de mesures (Pt et AgCl) sont en contact avec la solution. Différentes tailles d'électrode vont être testées

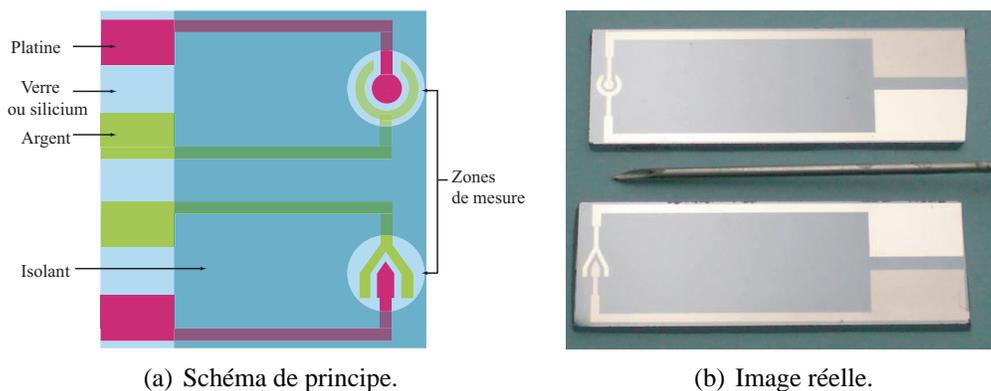


FIGURE 3.23 – Architecture et images des microsystèmes réalisés.

La réalisation des microsystèmes nécessite, en plus des 2 masques lithographiques pour titane-argent et titane-platine, deux autres masques. Le premier pour le dépôt de la couche d'accroche sur les endroits des électrodes où sera déposé la couche isolante et l'autre pour le dépôt de la silice (figure 3.23(b)).

### *Discussion et Conclusion*

*Les essais durant les mesures n'étaient pas concluantes. En effet, l'étape d'individualisation des capteurs a pour effet de mettre à jour la tranche du wafer. Cette tranche n'étant pas oxydée, nous sommes en présence d'un semi-conducteur (type N) qui réagit avec les électrodes.*

### 3.5.2 Etude des microsystèmes sur substrat en verre

Suite aux précédents résultats où la nature semi conductrice du silicium n'a pas été favorable, nous avons opté pour la réalisation des microsystèmes sur un substrat en verre vu ses qualités d'isolant. Les étapes technologiques restent les mêmes que pour les premiers microsystèmes. La figure 3.24 montre deux microsystèmes réalisés sur verre.

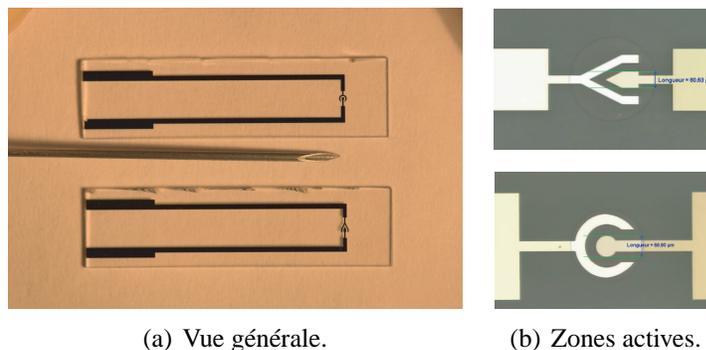
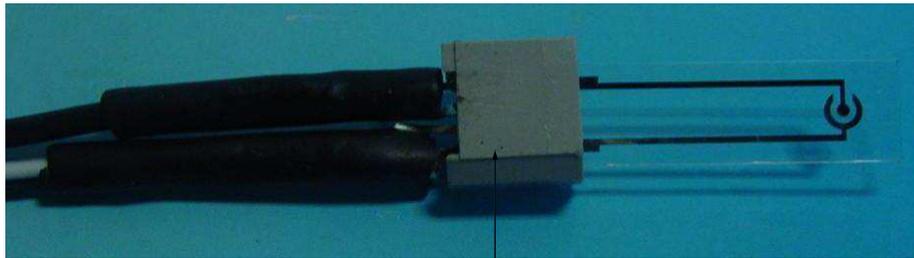


FIGURE 3.24 – Microsystèmes étudiés.

### *La connectique*

Un point important à améliorer était la connectique depuis le capteur jusqu'au voltmètre ou jusqu'au potentiostat. Nous avons commencé, par établir des connexions par la soudure directe des fils, qui relient les microcapteurs au potentiostat ou au voltmètre. Dans un premier temps nous avons utilisé la soudure chaude. Dans un deuxième temps nous avons utilisé la soudure à froid avec la pâte d'argent. Les résultats de tests des connecteurs ont montré la non fiabilité de ces deux méthodes. Enfin, nous avons utilisé une autre technique de connexion en utilisant des connecteurs commerciaux. Cette technique nous a obligé à adapter l'architecture de nos microcapteurs à celle des connecteurs

(figure 3.25). Les résultats obtenus avec cette technique étaient très satisfaisants, donc nous avons adopté cette dernière pour l'étude de nos microcapteurs.

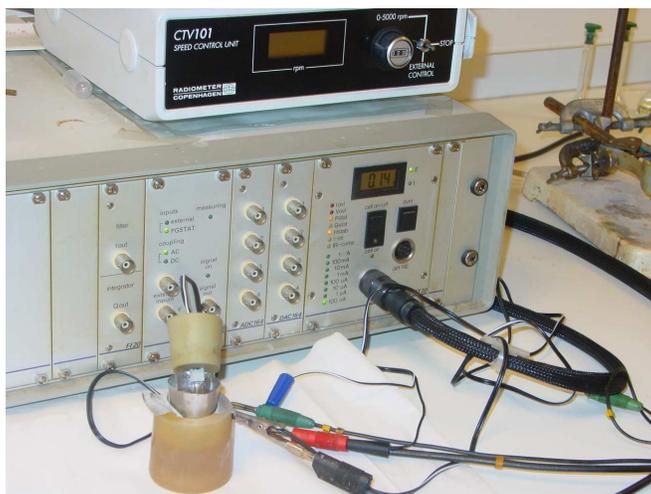


Connecteur

FIGURE 3.25 – Mode de connexion utilisé.

### *Électrodéposition des polymères*

Nous avons mis au point un nouveau système plus pratique et mieux adapté pour l'électrodéposition des polymères sur les nouveaux microsystèmes en verre. La solution du monomère est contenue dans un creuset en platine, qui joue le rôle de contre-électrode également. Le connecteur utilisé nous permet d'exploiter l'électrode d'argent du microsystème comme référence pour l'électrodéposition. La figure 3.26, montre une image du système relié au potentiostat.



(a) Vue d'ensemble.



(b) Vue rapprochée.

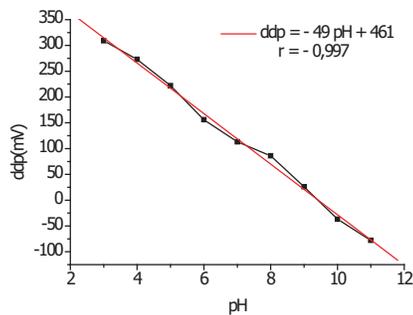
FIGURE 3.26 – Montage utilisé pour l'électrodéposition.

### 3.5.3 Caractérisation des microcapteurs réalisés

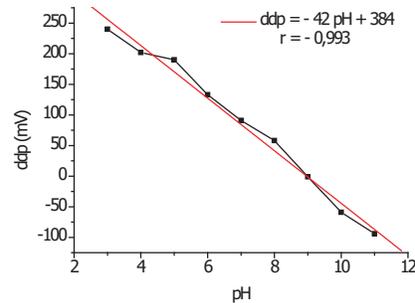
Nous sommes partis des capteurs de taille millimétrique ( $1\text{mm}$  de diamètre pour l'électrode de mesure) pour terminer avec des tailles micrométriques de  $10\mu\text{m}$ .

#### Cas de la PEI-L

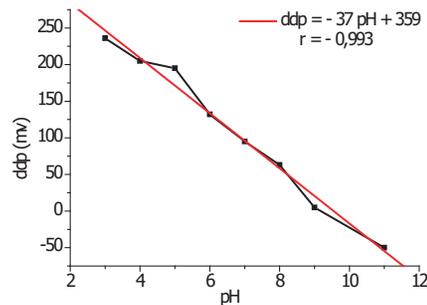
Pour la caractérisation de la PEI-L (figure 3.27), nous avons trouvé des sensibilités de  $46\text{mV/pH}$  pour  $1\text{mm}$  (figure 3.27 (a)) et de  $42\text{ mV/pH}$  pour  $500\mu\text{m}$  (figure 3.27 (b)) et de  $37\text{ mV/pH}$  à  $250\mu\text{m}$  (figure 3.27 (c)). La sensibilité est acceptable à ces tailles.



(a) Electrode de  $1\text{mm}$ .



(b) Electrode de  $500\mu\text{m}$ .



(c) Electrode de  $250\mu\text{m}$ .

FIGURE 3.27 – Réponse d'un microsystème en verre recouvert par l'EDA.

Le potentiostat utilisé et ceux disponibles au laboratoire de chimie n'ayant pas une sensibilité inférieure au nanoampère, nous n'avons pas réussi à réaliser des dépôts électrochimiques sur les électrodes de taille inférieure à  $250\mu\text{m}$ .

## Cas de l'aniline

En ce qui concerne la caractérisation de polyaniline (figure 3.28), contrairement aux résultats obtenus avec les électrodes de verre, nous avons trouvé une linéarité sur toute la gamme de pH étudiée. Ainsi, nous avons pu constater des sensibilités variant entre 68 mV/pH et 45 mV/pH.

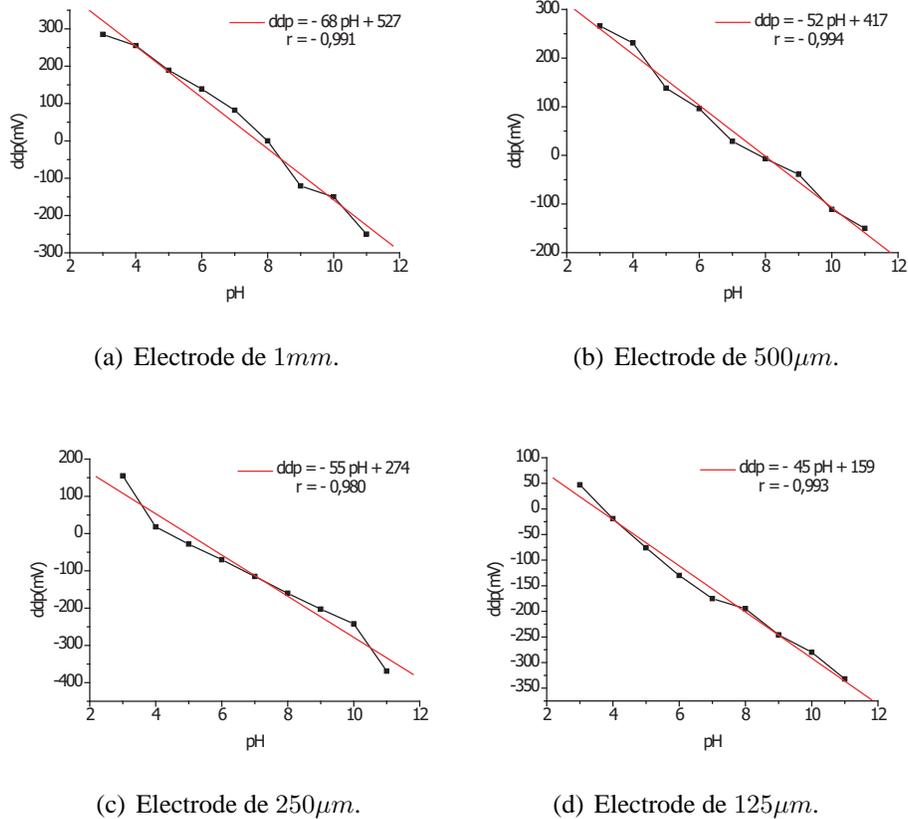
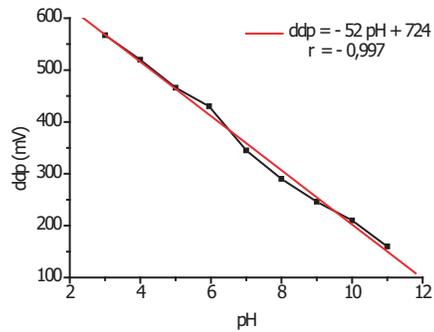


FIGURE 3.28 – Réponse d'un microsysteme en verre recouvert par de la polyaniline.

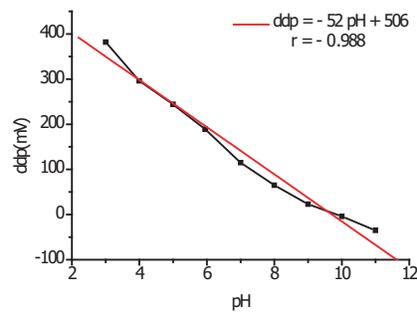
Nous n'avons pas pu caractériser des microcapteurs inférieurs à 125 $\mu\text{m}$  avec la PANI en raison de l'impossibilité d'effectuer les électrodépositions pour les mêmes raisons évoquées précédemment dans le cas de la PEI-L.

## Cas de la glycine

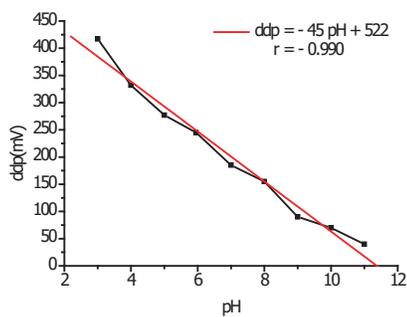
Pour la glycine (figure 3.29) nous avons obtenu des sensibilités décroissantes de 52 mV/pH pour 1mm à 39 mV/pH pour la taille de 10 $\mu\text{m}$ .



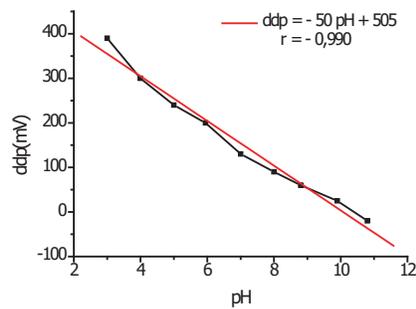
(a) Electrode de 1mm.



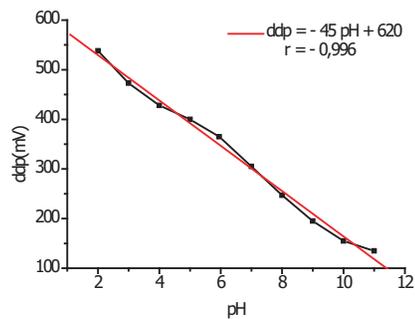
(b) Electrode de 500µm.



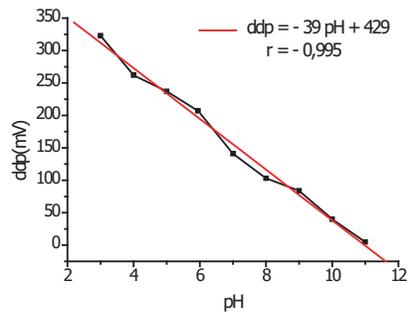
(c) Electrode de 250µm.



(d) Electrode de 125µm.



(e) Electrode de 60µm.



(f) Electrode de 10µm.

FIGURE 3.29 – Réponse d'un microsysteme en verre recouvert par la polyglycine.

**Note**

Les caractérisations de la polyglycine ont été effectuées avec une solution de pH à 5,95 au lieu de 6, car la polyglycine a un comportement particulier à ce point qui se traduit par une chute brutale de la *ddp* qui s'explique par l'apparition d'un composant chimique spécifique([82]).

### ***Discussion et Conclusion***

*Les résultats obtenus sur les microsystèmes nous laissent penser que la glycine est le meilleur polymère testé, et qui sera par conséquent le polymère utilisé pour le système de la cornée. En effet, il présente la meilleure pente à la taille ( $125\mu\text{m}$ ) avec un coefficient de corrélation de 0.996. Nous avons ensuite entamé une nouvelle série de caractérisation avec le polyglycine sur des électrodes allant jusqu'à  $10\mu\text{m}$  de diamètre, ce dernier a donné des résultats satisfaisants avec une pente de 39 et un coefficient de corrélation de l'ordre de 0,993.*

## **3.6 Intégration des capteurs filaires au support de la cornée**

Après validation de la mesure de la transmittance (Chapitre 2) et du pH avec des systèmes séparés, nous avons entamé l'étape de réalisation du système de transport et d'analyse de la cornée. A défaut du verre nous avons réalisé le dispositif en résine pour montrer la fonctionnalité de maintien d'une cornée basé sur la fluidique (capillaires) et montrer une configuration de l'emplacement des électrodes de mesures du pH. Ce système peut être perfectionné par l'intégration de plusieurs électrodes autour de la cornée, afin de palier aux éventuelles pannes et en même temps acquérir des données multiples.

### ***Fabrication du support***

Nous avons fabriqué des supports de cornées en résine qui permettent :

- le positionnement précis de la cornée durant les mesures en utilisant des capillaires, pour éviter tout stress de la cornée au cours des mesures ;
- les analyses optiques de la cornée en utilisant un matériau transparent ;
- les analyses bactériologiques de la cornée par un réseau de microcapteurs.

Afin de réaliser ce support, nous avons fabriqué un moule. Ce dernier est composé d'une demi sphère en PDMS (Polydimethylsiloxane). La demi sphère possède un méplat permettant à la cornée de présenter la surface à explorer à chaque mesure (figure 3.30). Des canaux ( $1\text{mm}$  de diamètre) ont été ensuite usinés, par voie mécanique, dans la résine après polymérisation (figure 3.31).

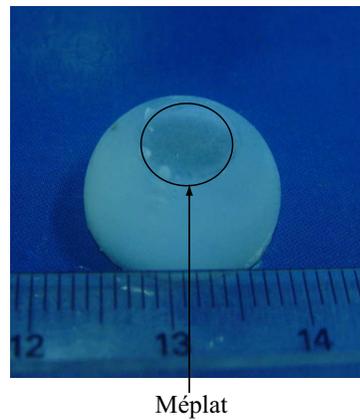


FIGURE 3.30 – Demi sphère en PDMS.

3

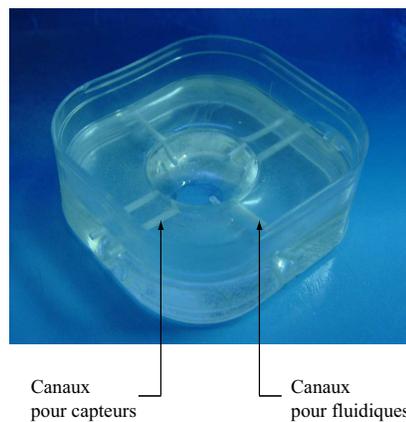


FIGURE 3.31 – Support en résine après perçage des canaux.

La figure 3.32, montre le support final qui comporte :

- Les microélectrodes pour la mesure du pH ;
- Un système de positionnement composé de :
  - canaux usinés dans la résine ;
  - capillaire pour la circulation du liquide, le positionnement et le maintien de la cor-  
née ;
  - connecteurs pour capillaires ;
  - seringues de commande du positionnement ou autres systèmes pneumatiques auto-  
matisés.

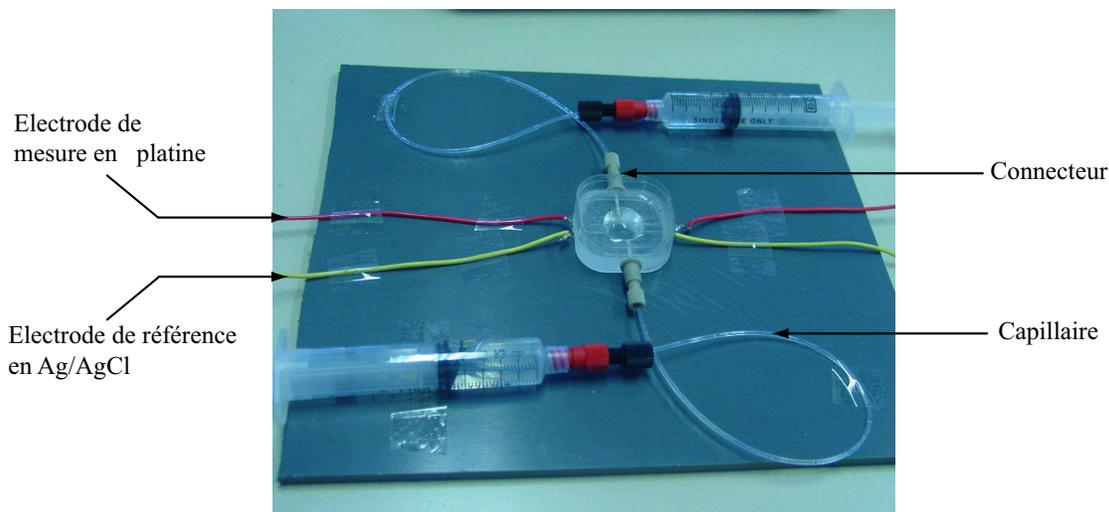


FIGURE 3.32 – Support de transport et d'analyse des cornées.

### Conclusion

*Le dispositif dans sa globalité remplit les fonctions escomptées tels que le positionnement, les électrodes de mesures, l'ergonomie et les mesures optiques de transmission. Néanmoins, par rapport à la reproductibilité des mesures de pH une autre résine pourrait être plus appropriée. Cependant, une solution envisageable consiste à intégrer un microsystème finalisé dans le support.*

## 3.7 Conclusion

Le développement des capteurs est passé par plusieurs étapes assujetties à plusieurs conditions qui, au cours de cette étude, ont été mises en exergue une à une. D'une conception basée sur la réalisation des microsystèmes sur silicium, nous sommes passés à une conception réalisée sur un substrat en verre. Le silicium de part ses propriétés semi-conductrices a engendré des problèmes électriques au niveau des surfaces clivées, qui ont été contournés par l'utilisation de substrats en verre. Dans cette dernière version, des connections (contacts) ont été adaptées pour être reliées d'une façon pratique aux appareils de fonctionnalisation et de mesures. Les résultats obtenus sont pertinents du point de vue de la réponse à des sollicitations chimiques (pH).

Les essais préliminaires sont réalisés d'abord sur des surfaces millimétriques issues de l'inclusion des électrodes filaires dans des matrices de verre. Plusieurs monomères ont été testés à savoir l'aniline, la PEI-L et la glycine. Des résultats obtenus, la glycine nous offre une sensibilité quasi Nernstienne avec une sensibilité de 54 mV/pH contre 65 et 46 pour la PANI et la PEI-L respectivement.

Dans une deuxième étape, en prévision des dispositifs d'analyses des cornées des électrodes filaires micrométriques de diamètre de  $76\mu m$  ont été réalisées puis étudiées à cet effet. Nous avons constaté une influence particulièrement lors de l'électrodéposition de la PEI-L, cette dernière n'a pas été fonctionnalisée après plusieurs essais. Le comportement le plus proche de celui de Nernst est obtenu avec la glycine d'une sensibilité de  $42\text{ mV/pH}$  et un bon coefficient de corrélation (0.995). A noter qu'il est de  $84\text{ mV/pH}$  pour la PANI avec un coefficient de corrélation (0.989).

En parallèle de l'étude des électrodes filaires, en prévision à étendre notre application à d'autres domaines où la miniaturisation est nécessaire. Nous avons mené une étude sur les microsystèmes, en raison des possibilités qu'offre la technique de photolithographie vis-à-vis de la configuration des électrodes et de leurs dimensions. Les différentes tailles (électrodes de travail) étudiées sont  $1000\mu m$ ,  $500\mu m$ ,  $250\mu m$ ,  $60\mu m$  et  $10\mu m$  combinés au trois types de polymères.

La PEI-L n'a pas donné de résultat dans le cas des microsystèmes de faibles dimensions inférieures à  $250\mu m$ , comme cela a été évoqué précédemment. En outre, son utilisation obéit à des exigences très strictes.

En ce qui concerne la PANI, les résultats obtenus sont acceptables vu la reproductibilité des résultats et les bonnes sensibilités acquises avec les microsystèmes jusqu'à  $125\mu m$ . Pour les tailles les plus petites (à partir de  $60\mu m$ ) nous n'avons pas pu effectuer son électrodéposition pour les raisons avancées précédemment.

Quant à la polyglycine, la sensibilité varie de  $52\text{ mV/pH}$  de la plus grande dimension ( $1000\mu m$ ) à  $50\text{ mV/pH}$  pour l'électrode de  $125\mu m$ . Nous avons poursuivi d'autres caractérisations avec le polymère retenu (la polyglycine) sur des électrodes allant jusqu'à  $10\mu m$  de diamètre, ce dernier a donné des résultats satisfaisants avec une pente de  $39\text{ mV/pH}$  et un coefficient de corrélation de l'ordre de 0,995.

Après synthèse des résultats nous pouvons conclure que les microsystèmes sont fonctionnels même aux faibles dimensions. Par conséquent, ils peuvent être intégrés dans différents systèmes pour constituer un capteur entièrement miniaturisé et compact. La polyglycine semble être le matériau le plus approprié en référence des résultats obtenus. Le transducteur étant un polymère solide, cela confère au capteur des qualités de biocompatibilité. Ainsi, des applications dans le domaine du vivant sont aisément envisageables. La cornée, cas de notre étude, peut être caractérisée par un tel capteur en l'adaptant au support conçu à cet effet, d'autant plus que les dispositions, notamment de positionnement par fluide, sont mis au point.

Notre étude, pour être la plus exhaustive possible, pourrait être complétée par des tests sur les phénomènes d'hystérésis et de la durée de vie.

## Conclusion générale

**D**ans le cadre de cette thèse nous avons démontré la faisabilité de deux micro-systèmes dans le domaine médical. Le premier est destiné à la fécondation *in vitro*, le second au transport et au contrôle qualité du greffon cornéen. Pour répondre aux besoins des praticiens nous nous sommes basés sur la technologie silicium et PDMS associée à la métrologie optique.

Dans le cadre de la FIV nous avons réalisé un Lab On Chip qui assure trois fonctions :

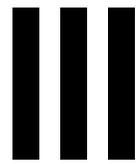
- l'accueil des ovocytes,
- leur déplacement,
- leur positionnement précis sur des sites d'analyse.

Pour atteindre nos objectifs dans ce projet, nous avons réalisé une plateforme en silicium pour l'accueil des ovocytes. Pour une grande miniaturisation nous avons conçu une architecture qui intègre un système de déplacement des ovocytes à l'aide de canaux de microfluidique associés à l'aspiration du liquide qui constitue leur milieu de vie. Ce choix se justifie par la contrainte d'embryo-compatibilité du système. C'est une méthode originale qui peut être appliquée dans le domaine de la manipulation des cellules vivantes. En effet l'aspiration, en sus de permettre le déplacement des cellules, constitue un outil très performant pour leur maintien, en vue par exemple d'une caractérisation mécanique. Dans ce domaine nous avons montré la possibilité de mesures optiques qui peuvent constituer des méthodes pour la caractérisation des ovocytes avant leur fécondation. Les essais que nous avons mené dans ce domaine ont été effectués sur des ovocytes surnuméraires. Ainsi les résultats de caractérisations optiques des ovocytes demandent à être confirmés sur un grand nombre d'ovocytes pour être validés. Ce travail peut être mené à l'aide d'ovocytes d'animaux. Il ouvre une perspective pour cette partie de notre thèse.

Nous nous sommes intéressés dans la deuxième partie de ce travail à concevoir un Lab On chip pour le transport et le contrôle qualité du greffon cornéen. Il s'agit dans ce

domaine d'apporter une solution au transport de la cornée, qui se fait actuellement dans des bouteilles en verre. Ce mode de stockage de la cornée impose la manipulation de la cornée, tissu très fragile, pour le test et l'analyse. Il nous restait à résoudre le problème du contrôle qualité qui se réduit au comptage de nombre de cellules vivantes (ce critère constitue une norme sanitaire avant la greffe). Nous avons démontré que la mesure de la transmittance de la cornée au cours de son stockage constitue une méthode pertinente pour s'affranchir du bleu trypan, produit toxique nécessaire pour le comptage des cellules vivantes sous microscope. Afin d'effectuer cette opération dans de bonnes conditions nous avons réalisé un Lab On Chip en PDMS (transparent) pour le stockage du greffon cornéen. Ce Lab On Chip assure ainsi l'encapsulation de la cornée tout en permettant la mesure de la transmittance optique de celle-ci. Le maintien en vie de la cornée est assuré par un système de microfluidique.

Pour une analyse objective de la présence de foyers infectieux dans la cornée lors de son stockage nous avons optés pour des capteurs ponctuels de pH. En effet pendant la conservation de la cornée destinée à la greffe, des bactéries peuvent la contaminer ceci se traduit par un changement de son pH. La mesure du pH se fait actuellement par colorimétrie, une technique peu précise et opérateur dépendante. Nous avons obtenu dans ce domaine des résultats pertinents. En effet, nous avons démontré la faisabilité d'un capteur de pH dont le transducteur est de  $10\ \mu m$  de diamètre, présentant une réponse linéaire entre un pH de 3 à 11. Ce capteur peut être utilisé dans plusieurs domaines d'applications.



# **Bibliographie**



# Bibliographie

- [1] A. Ashkin. Optical trapping and manipulation of neutral particles using lasers. In *Proc. Natl. Acad. Sci.*, volume 94, pages 4853–60, USA, 1997.
- [2] E. Townes-Anderson, R.S.St. Jules, D.M. Sherry, J. Lichtenberger, and M. Hassain. Micromanipulation of retinal neurons by optical tweezers. *Molecular Vision*, 4 :12, 1998.
- [3] Konig K., Svaasand L., Liu Y., and al. Determination of motility forces of human spermatozoa using an 800 nm optical trap. *Cell. Mol. Biol.*, 422 :501–9, 1996.
- [4] S. Nemoto and H. Togo. Axial force acting on a dielectric sphere in a focused laser beam. *Journal of Applied Optics*, 32(27) :6386–6394, 1998.
- [5] A. Ashkin. Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Physical Review Letter*, 24(4) :156–159, 1970.
- [6] A Ashkin and J.M. Dziedzic. Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science*, 235(4795) :1517–1520, March 1987.
- [7] S. Yu and B.J. Nelson. Microrobotic cell injection. In *Proceedings 2001 ICRA. IEEE International Conference on Robotics and Automation*, pages 620–625, Seoul korea, mai 2001.
- [8] Y. Morito, S. Shikano, C. Nishioka, and K. Horio. Laser manipulation apparatus and cell plate used therefore. United states patent, patent number US 5 952 651, 14 sep. 1999., 1999.
- [9] F. Arai, M. Ogawa, and T. Fukuda. Indirect manipulation and bilateral control of the microbe by the laser manipulated microtools. In *Proc. Of the 2000 IEEE/RSJ Int. Conf. Intelligent Robots and Systems*, 2000.
- [10] F. Arai, T. Sakami, H. Maruyama, A. Ichikawa, and T. Fukuda. Minimally invasive micromanipulation of microbe by laser trapped micro tools. In *Proceedings*

- of the 2002 IEEE International Conference on Robotics & Automation - ICRA'02. Washington, DC, 2002.*
- [11] F. Arai, T. Sakami, H. Maruyama, A. Ichikawa, and T. Fukuda. Minimally invasive micromanipulation of microbe by laser trapped micro tools. In *Proc. of the IEEE International Conference on Robotics and Automation - ICRA02, Washington D.C. - USA., May 2002.*
- [12] M. Gauthier. *Conception et commande d'un dispositif magnétique de micromanipulation par poussée. Application à la manipulation de microobjets biologiques.* PhD thesis, Université de Franche Comté Besançon., 2002.
- [13] E. W. H. Jager, A. Selbing, M. Krieh, and M. Skogland. Microactuators based on polypyrrole for biomedicine. In *Proc. of the 8th International Conference on New Actuators - Actuator 2002., pages 388–90., Bremen - Deutschland, june 2002.*
- [14] Z. Sadani. *Conception de microsystèmes pour la manipulation et la caractérisation d'un ovocyte.* PhD thesis, Université de Franche Comté Besançon., 2004.
- [15] H. Andersson and A. Van Der Berg. Microfluidic devices for cellomics : a review. *Sensors and Actuators B*, 92 :315–325, 2003.
- [16] H.A. Pohl. *Dielectrophoresis : the behavior of neutral matter in nonuniform electric fields.* Cambridge, New York : Cambridge University Press, 1978.
- [17] S. Fiedler, T. Shirley, S.G. Schnelle, and G. Fuhr. Dielectrophoretic sorting of particles and cells in a microsystem. *Analytical Chemistry*, 70 :1909–1915, 1998.
- [18] A.B. Fuchs, A. Romani, D. Freida, G. Medoro, M. Abonnenc, L. Altomare, I. Chartier, D. Guergour, C. Villiers, P. N. Marche, M. Tartagni, R. Guerrieri, F. Chatelain, , and N. Manaresi. Electronic sorting and recovery of single live cells from microlitre sized samples. *Lab. on a Chip.*, 6 :121–126, 2006.
- [19] F.F. Becker, X .B. Wang, Y. Huang, R. Pethig, J. Vykoukal, and P.R.C Gascoyne. The removal of human leukaemia cells from blood using interdigitated microelectrodes. *J. Phys. D : Appl. Phys.*, 27(12) :2659–2662, 1994.
- [20] P.R.C Gascoyne, J. Noshari, F.F Becker, and R. Pethig. Use of dielectrophoretic collection spectra for characterizing differences between normal and cancerous cells. *IEEE Transactions on Industry Applications*, 30(4) :829–834, 1994.
- [21] G. Fuhr, T. Schnelle, T. Mueller, and H. Glasser. Positioning and manipulation of cells and microparticles using miniaturized electric field traps and travelling waves. *Sensors and Materials*, 7 :131–146, 1995.
- [22] G. Caporossi, I. Gutman, P. Hansen, A. Ramos H. Morgan, N.G Green, and A. Castellanos. The role of electrohydrodynamic forces in the dielectrophoretic manipulation and separation of particles. *Journal of Electrostatics*, 47(1) :71–81, 1999.
- [23] L.A. Crum. Acoustic force on a liquid droplet in an acoustic stationary wave. *Journal of the Acoustical Society of America*, 50 :157–163, 1971.
- [24] J.A. Rooney. *Methods of experimental physics*, volume 19. Academic Press, 1981.

- [25] E.H. Trinh, P.L. Marston, and J.L. Robey. Acoustic measurement of the surface tension of levitated drops. *Journal of Colloid and Interface Science*, 74 :2623–2636, 1988.
- [26] Z.M. Zhu and R.E. Apfel. Shape oscillations of microparticles on an optical microscope stage. *Journal of the Acoustical Society of America*, 78 :1796–1798, 1985.
- [27] M.A. Weiser and R.E. Apfel. Extension of acoustic levitation to include the study of micron-size particles in a more compressible host liquid. *Journal of the Acoustical Society of America*, 71 :1261–1268, 1982.
- [28] H.M. Hertz. Standing-wave acoustic trap for nonintrusive positioning of microparticles. *Journal of Applied Physics*, 78 :4845–4849, 1995.
- [29] A. Matkovics. An overview of free radical research. *Acta biologica Szegediensis*, 47(1-4) :93–97, 2003.
- [30] P. Telleman, U.D. Larsen, J. Philip, G. Blankenstein, and A. Wolff. A cell sorting in microfluidic systems. In  *$\mu$ -Total Analysis Systems '98*, volume 39, pages 39–44, 1998.
- [31] G. Blankenstein and U. D. Larsen. Modular concept of a laboratory on a chip for chemical and biochemical analysis. *Biosensors and Bioelectronics*, 13(3-4) :427–438, 1998.
- [32] C.Y. Lee, J. L. Lin, C.S. Liao, F.C. Huang, and G.B. Lee. Integrated microfluidic systems for dna analysis. In *IEEE International Conference on Robotics and Biomimetics ROBIO 2004.*, pages 284– 289, 2004.
- [33] F. Vinet, P. Chaton, and F. Fouillet. Microarrays and microfluidic devices : miniaturized systems for biological analysis. *Microelectronic engineering*, 61-62 :41–47, 2002.
- [34] A. Van den Berg and T. Lammerink. Micro total analysis systems : Microfluidic aspects, integration concept and applications. *Top. Curr. Chem.*, 194 :21–48, 1998.
- [35] H. Watanabe, S. Ohnishi, I. Honna, H. Kitajima, H. Ono, and R. J. L. Sophie. Selective etching of phosphosilicate glass with low pressure vapor HF. *J. Electrochem. Soc.*, 142 :237–243, 1995.
- [36] I. Zobel. Silicon anisotropic etching in alkaline solutions ii : on the possibility of spatial structures forming in the course of Si (100)anisotropic etching in KOH and KOH + ipa solutions. *Sens. Actuators A*, 84(1-2) :116–125, 2000.
- [37] N.T. Nguyen and S.T. Wereley. *Fundamentals and applications of microfluidics*. 2002.
- [38] B. Wacogne, Z. Sadani, and T. Gharbi. Compensation structures for v-grooves connected to square apertures in KOH etched (100) silicon : theory, simulation and experimentation. *Sens. Actuators A*, 112(2-3) :328–339, 2004.
- [39] Q. Zhang, L. Liu, and Z. Li. A new approach to convex corner compensation for anisotropic etching of (100) Si in KOH. *Sens. and Actuators A*, 56 :251–254, 1996.

- [40] P. Enoksson. New structure for corner compensation in anisotropic KOH etching. *Microch. Microeng.*, 7 :141–144, 1997.
- [41] B. Nikpour, L.M. Landsberger, T.J. Hubbard, M. Kahrizi, and A. Iftimie. Concave corner compensation between vertical (010)-(001) planes anisotropically etched in Si (100). *Sens. and Actuators A*, 66 :299–397, 1998.
- [42] B. Wacogne, R. Zeggari, Z. Sadani, and T. Gharbi. A very simple compensation technique for bent v-grooves in KOH etched (1 0 0) silicon when thin structures or deep etching are required. *Sens. Actuators A*, 126 :264–269., 2006.
- [43] G.K. Mayer, H.L. Offereins, H. Sandmaier, and K. Köhl. Fabrication of non-undretched convex corners is anisotropic etching of (100) silicon in aqueous KOH with respect to novel micromechanic elements. *Electrochem. Soc.*, 137 :3947–3951, 1990.
- [44] H.L. Offereins, K. Köhl, and H. Sandmaier. Methods for the fabrication of convex corners in anisotropic etching of (1 0 0) silicon in aqueous KOH. *Sens. Actuators A*, 25(1-3) :9–13, 1991.
- [45] R. Zeggari, B. Wacogne, C. Pieralli, C. Roux, and T.Gharbi. A full micro-fluidic system for single oocyte manipulation including an optical sensor for celle maturity estimation and fertilisation indication. *Sens. Actuators B*, 125(2) :664–671, 2007.
- [46] M. MADOU. *Fundamentals of microfabrication*. CRC press, 1997.
- [47] G. Wallis and DI. Pomerrantz. Field assisted glass-metal sealing. *Appl.Phys* ;, 40 :3946–3949, 1969.
- [48] E. Peeters. *process developpement for 3D silicon microstructures with application to mechanical sensor design*. PhD thesis, Catholic University of Louvain, Belgium, 1994.
- [49] B. Puers, A. Cozma, and E. Van De Weyer. Technology establishment for silicon-glass electrostatic bonding. Technical report, Intermediate Project Report, KU Leuven, 1993.
- [50] K.B. Albaugh and P.E. Cade. Mechanism of anodic bonding of silicon to pyrex glass. In *tech. Digest, IEEE solid-state sensors and actuators workshop*, page 109. Hilton Head Island, SC., 1988.
- [51] R. Zeggari, B. Wacogne, C. Pieralli, C. Roux, and T. Gharbi. Optics and microsystems for in vitro fertilization. *Laser Physics*, 16(2) :294–302, 2006.
- [52] L. Ventura, S.J.F. Sousa, A.M.V. Messias, and M.B. Josemilson. System for measuring the transmission spectrum of in vitro corneas. *Physiol. Meas.*, 21 :197–207, 2000.
- [53] H. Davson. The hydration of the cornea. *Biochem. J.*, 59(1) :24–28, 1955.
- [54] O.A. Candia. Fluid and electrolyte transport in corneal transparency. *Mt. Sinai. J. Med.*, 47 :74–79, 1980.
- [55] H. Davson. *Physiology of the eye*, chapter The cornea, pages 105–138. 1990.

- [56] V. Borderie, O. Touzeau, T. Bourcier, and L. Laroche. Physiologie de la cornée. *EMC - Ophtalmologie*, 2 :103–117, 2005.
- [57] J.P. Boitte and C. Bouat. Plea for a graft. *J. Fr. Ophtalmol.*, 21(1) :5–11, 1998.
- [58] B. Delbosc and V. Borderie. Methods of preservation of the human corneas. *J. Fr. Ophtalmol.*, 20(3) :221–240, 1997.
- [59] D.J. Doughman, D. Van Horn, J.E. Harris, G.E. Miller, R. Lindstrom, and R.A. Good. The ultrastructure of human organo-cultured cornea. *Arch. Ophtalmol.*, 92(6) :516–523, 1974.
- [60] E. Pels and Y. Schuchard. Organ-culture preservation of human corneas. *Doc. Ophtalmol.*, 56(1-2) :147–153, 1983.
- [61] B. Delbosc, J. Naegelen, P. Herve, J.P. Carbillet, and M. Montard. Preservation of human corneas in an enriched culture medium at +37 degrees centigrade :histological and biochemical analyses. *J. Fr. Ophtalmol.*, 10(10) :547–549, 1987.
- [62] L. Laroche, V. Borderie, M. Lopez, and H. Saraux. Microbiological safety and endothelial quality control during preservation of corneal grafts at +31 degree c. *J. Fr. Ophtalmol.*, 17 :314–320., 1994.
- [63] W.J. Armitage. *Anatomy and physiology of the cornea*. University Press Oxford, 1999.
- [64] A.D. Eaton, L.S. Clesceri, and A.E. Greenberg. *Standard methods for the examination of water and wastewater*. Environment Federation, Washington, DC. Section 2580, Oxydation Reduction Potential, 1995.
- [65] G.F. Huang and M.K. Guo. Resting dental plaque pH values after repeated measurements at different sites in the oral cavity. In *Nat. Sci. Counc. ROC. B.*, volume 24, pages 187–192, 2000.
- [66] B.J.C. Deboux, E. Lewis, P.J. Scully, and E. Edwards. A novel technique for optical fibre pH sensing based on methylene blue adsorption. *Lightwave Technol.*, 13 :1407–1414., 1995.
- [67] P.A. Wallace, N. Elliott, M. Uttamlal, A.S. Holmes-Smith, and M. Campbell. Development of a quasi-distributed optical fibre pH sensor using a covalently bound indicator. *Meas. Sci. Technol.*, 12 :882–886, 2001.
- [68] D. Flannery. pH sensor using langmuir blodgett overlays on polished optical fibers. *Opt. Lett.*, 22 :567–569, 1997.
- [69] C. Ruan, K. Zeng, and C.A. Grimes. A mass-sensitive pH sensor based on a stimuli-responsive polymer. *Anal. Chim. Acta*, 497 :123–131, 2003.
- [70] A. Errachid, A. Ivorra, J. Aguiló, R. Villa, N. Zine, and J. Bausells. New technology for multi-sensor silicon needles for biomedical applications. *Sens. and Actuators B*, 78(1-3) :279–284, 2001.
- [71] Z.M. Baccar, N. Jaffrezic-Renault, and M. Lemiti. Aminated membranes for pH detection obtained by photochemical vapor deposition technique. *Electrochem. Soc.*, 144(11) :3989–3992, 1997.

- [72] S. Yao, M. Wang, and M. Madou. A pH electrode based on melt-oxidized iridium oxide. *Electrochem. Soc.*, 148 :H29–36, 2001.
- [73] S. Nomura, Y. Kitasako, N. Hiraishi, M. Nakajima, and T. Nikaido. Application of semiconductor pH-imaging sensor to the imaging of extracted human carious dentin. *Anal. Sci.*, 17 :539–541, 2001.
- [74] Y.H. Liu, T.H. Dam, and P. Pantano. A pH-sensitive nanotip array imaging sensor. *Anal. Chim. Acta.*, 419 :215–225, 2000.
- [75] R. Bashir. Micromechanical cantilever as an ultrasensitive pH microsensor. *Appl. Phys. Lett.*, 81 :3091–3093, 2002.
- [76] A. Guiseppi-Elie, G.G. Wallace, and T. Matsue. *Chemical and biological sensors based on electrically conducting polymers. Handbook of Conductive Polymers*. 2nd ed. New York7 Marcel Dekker, 1996.
- [77] A. Talaie, J.Y Lee, J. Jang, J.A. Romangnoli, T. Taguchi, and al. Dynamic sensing using intelligent composite : an investigation to development of new pH sensors and electrochromic devices. *Thin Solid Films*, 363(1-2) :163–166, 2000.
- [78] W.S. Han, M.Y. Park, D.H. Cho, T.K. Hong, D.H. Lee, J.M. Park, and K.C. Chung. The behavior of a poly(aniline) solid contact pH selective electrode based on n,n,n', n'tetrabenzylethanediamine ionophore. *Anal. Sc.*, 17 :727–732, 2001.
- [79] P.C. Pandey and G. Singh. Tetraphenylborate doped polyaniline based novel pH sensor and solid-state urea biosensor. *Talanta*, 55(4) :773–782, 2001.
- [80] B. Lakard, G. Herlem, S. Lakard, R. Guyetant, and B. Fahys. Potentiometric pH sensors based on electrodeposited polymers. *Polymer*, 46 :12233–12239, 2005.
- [81] E. D. Stilwell and S-M. Park. Electrochemistry of conductive polymers ii. electrochemical studies on growth properties of polyaniline. *J. Electrochem. Soc.*, 135(9) :2254–2262, 1988.
- [82] A.T. Hubbard. *Encyclopedia of surface and colloid science*. Marcel Dekker, 2002.

# **IV**

## **Index**



# Index

- Acoustique, 8  
Aniline, 86, 90, 106  
Argent, 86, 91, 98, 101
- Bowman, 51
- Capteur, 79, 88, 94, 105, 108, 111  
Cornée, 52, 54–56, 58, 62, 72, 73, 75, 77, 79, 87, 95, 100, 108, 111
- Descemet, 51  
Diélectrophorèse, 7
- Electrodes de référence, 86  
Endothélium, 51, 54  
Epithélium, 50, 57  
Éthylènediamine, 89, 91, 95
- FIV, 3, 11, 39
- Glycine, 90, 92, 97, 100, 110  
Gravure, 4, 12, 13, 18, 23, 27, 44
- Lab On Chip, 3, 11, 43  
Lithographie, 9, 12, 15, 25, 31, 32
- Microfluidique, 9–11, 43  
Microsystème, 4, 11, 31, 37, 41
- Nernst, 81, 97
- Ovocyte, 10, 39, 44
- PDMS, 63, 68  
PDMST, 108  
Pincés Optiques, 5  
Plateforme, 4, 10, 25, 28, 37, 44  
Platine, 82, 85, 89, 97, 101  
Polymère, 79, 85, 86, 88  
Potentiométrique, 79, 82, 85, 88  
Potentiostat, 99, 101, 104
- Silicium, 4, 9, 12, 25, 31, 44  
Sillon, 11, 13, 17, 41  
Spectromètre, 58, 60  
Stroma, 51, 54, 56
- Transducteur, 79, 84, 86, 111  
Transmittance, 49, 60, 77
- Verre, 4, 31, 32, 44

# Glossaire

**Asepsie** consiste à ne pas apporter de micro-organismes étrangers au site concerné (bactéries, parasites. . .). Méthodes visant l'absence de contamination microbiologique d'un site opératoire par exemple. *page 81*

**Cellules de Schwann** forment des couches de cellules qui recouvrent les segments de la gaine de myéline de certaines cellules nerveuses. *page 76*

**Dynamique** d'un capteur c'est la zone qui représente le domaine de réponse du capteur avant saturation. *page 126*

**Film lacrymal** un mécanisme naturel visant à protéger la surface de l'œil des matières irritantes comme la saleté, la poussière et les autres particules se trouvant dans l'air, en plus de protéger les yeux contre les infections. *page 85*

**Humeur aqueuse** un liquide transparent à faible viscosité, dépourvu d'éléments figurés du sang, continuellement filtré et renouvelé qui, avec le corps vitré, maintient la pression intra-oculaire et la forme du globe oculaire. *page 74*

**Lift-off** techniques de lithographie permet de structurer des couches minces métalliques déposées sur un substrat. *page 153*

**Lithographie** désigne l'ensemble des opérations permettant de reproduire les motifs présents sur un schéma sur la surface d'un substrat. *page 169*

**Organoculture** des milieux nutritifs dérivés des méthodes de cultures cellulaires et ont été mis au point uniquement pour la cornée humaine. *page 83*

**Proteoglycan** une catégorie spéciale de glycoprotéines qui sont fortement glycosylées. *page 76*

**Solution tampon** solution qui maintient approximativement le même pH malgré l'addition de petites quantités d'un acide, d'une base ou d'une dilution. *page 155*

**Substance fondamentale** un ensemble de protéines (principalement d'acide hyaluronique) sur lequel se fixent les sels minéraux pour former différents tissus conjonctifs.  
*page 76*

# Liste des Acronymes

DRIE .....	Deep Reaction Ion Etching.
EFS .....	Etablissement Français du sang
FIV .....	Fécondation <i>in vitro</i> .
ICSI.....	Intra Cytoplasmic Sperm Injection.
ISFET.....	Ion Sensitive Field Effect Transistor.
PCR.....	Réaction en Chaîne de Polymérase.
PDMS.....	Polydimethylsiloxane.
PEI-L .....	Polyéthylèneimine Linéaire.
SHE.....	Standard Hydrogen Electrode.
SRE.....	Silver Reference Electrode.
UTCG.....	Unité de Thérapie Cellulaire et Génique.

# Table des figures

1.1	Principe physique des pinces optiques . . . . .	5
1.2	Schéma de principe du "Lab On Chip". . . . .	11
1.3	Schéma de principe des sites d'immobilisation. . . . .	12
1.4	Motif du masque non compensé. . . . .	14
1.5	Motif du masque compensé. . . . .	15
1.6	Apparition de la future ouverture pyramidale. . . . .	16
1.7	Evolution des plans lors de la gravure. . . . .	16
1.8	Connexion du canal avant la formation de l'ouverture. . . . .	17
1.9	Formation de l'ouverture pyramidale. . . . .	17
1.10	: L'arête $\langle 4\bar{1}0 \rangle$ arrive la première au point $O$ . . . . .	18
1.11	: L'arête $\langle 410 \rangle$ arrive la première au point $O$ . . . . .	19
1.12	: Parcours du plan $\{771\}$ . . . . .	22
1.13	Schéma de la sous gravure. . . . .	23
1.14	Image MEB de la face inférieure. . . . .	26
1.15	Images MEB illustrant la technique de gravure utilisée. . . . .	26
1.16	Image MEB de la face supérieure. . . . .	28
1.17	Image MEB d'une ouverture. . . . .	29
1.18	Schéma de principe des ateliers de mesures. . . . .	30
1.19	Résultats expérimentaux ateliers d'analyses. . . . .	30
1.20	Une partie du masque pour les ouvertures. . . . .	32
1.21	Wafer de verre (4 pouces) après lift-off. . . . .	32
1.22	Face inférieure après la soudure anodique. . . . .	33
1.23	Montage des connecteurs microfluidiques. . . . .	34
1.24	Test des connecteurs. . . . .	34
1.25	Dispositif de fibrage de la plateforme. . . . .	35
1.26	Plateforme et les connexions associées. . . . .	35

1.27	Montage expérimental pour la manipulation et l'analyse d'un ovocyte. . . . .	36
1.28	Le déplacement et l'immobilisation d'une bille en polystyrène. . . . .	38
1.29	Le déplacement et l'immobilisation de l'ovocyte. . . . .	39
1.30	Caractérisation de l'ovocyte. . . . .	40
1.31	Schéma de principe du système. . . . .	41
1.32	Vues rapprochées du composant. . . . .	41
1.33	Système de mesure des propriétés optiques des ovocytes. . . . .	42
1.34	Mesure de l'indice de réfraction des ovocytes. . . . .	43
1.35	Estimation de la maturité des cellules. . . . .	44
2.1	Structure de la cornée. . . . .	50
2.2	Conservation de la cornée après prélèvement. . . . .	53
2.3	Réfraction de la lumière par la cornée[56]. . . . .	57
2.4	Représentation de l'œil et des quatre images de Purkinje. . . . .	58
2.5	Dispositif expérimental pour la mesure de la transmission. . . . .	59
2.6	Transmission de la lumière par un objet absorbant. . . . .	60
2.7	Transmittance spectrale. . . . .	61
2.8	Schéma du support. . . . .	62
2.9	Modèle servant à la réalisation du support. . . . .	63
2.10	Injection du PDMS dans la boîte de pétri. . . . .	63
2.11	Vue de dessus du support de cornées. . . . .	64
2.12	Schéma représentant le principe de la mesure de la transmittance. . . . .	64
2.13	Résultat des mesures de la cornée hors milieu. . . . .	66
2.14	Estimation du temps nécessaire à l'extraction du milieu de la cornée. . . . .	67
2.15	Spectres des mesures effectuées dans le premier support. . . . .	68
2.16	Support pour le positionnement de la cornée sous le faisceau lumineux. . . . .	69
2.17	Spectres des mesures obtenus à l'aide du nouveau support. . . . .	70
2.18	Schéma représentant le principe de la mesure de la transmittance. . . . .	70
2.19	Élimination de l'effet du milieu. . . . .	73
2.20	Comparaison entre la transmittance de cornées contenant un nombre différent de cellules. . . . .	74
2.21	Évolution de la transmittance des cornées en fonction du temps. . . . .	76
3.1	Les critères de qualité d'un capteur chimique. . . . .	80
3.2	Échelle du pH. . . . .	80
3.3	Schéma d'une électrode de verre. . . . .	83
3.4	Schéma d'un ISFET (reproduction de[70]). . . . .	84
3.5	Schéma de principe de la mesure du pH de la cornée. . . . .	87
3.6	Principe de la mesure potentiométrique. . . . .	89
3.7	Molécule de l'aniline. . . . .	90
3.8	Molécule de la glycine. . . . .	90
3.9	Montage de voltampérométrie cyclique. . . . .	91
3.10	Voltampérogramme d'une solution d'EDA. . . . .	91

---

3.11	Voltampérogramme d'une solution d'aniline. . . . .	92
3.12	Voltampérogramme d'une solution de glycine. . . . .	93
3.13	Images AFM en mode contact sur platine $1 \times 1 \mu m^2$ . . . . .	94
3.14	Electrode millimétrique en verre. . . . .	95
3.15	Caractérisation d'électrodes millimétriques modifiées par l'EDA. . . . .	96
3.16	Caractérisation d'électrodes millimétriques modifiées par l'aniline. . . . .	96
3.17	Caractérisation d'électrodes millimétriques modifiées par la glycine. . . . .	97
3.18	Fils micrométriques de platine et d'argent pris dans de la résine. . . . .	98
3.19	Électrode en verre fabriquée au laboratoire. . . . .	99
3.20	Caractérisation d'électrodes micrométriques modifiées par l'aniline. . . . .	99
3.21	Caractérisation d'électrodes micrométriques modifiées par la glycine. . . . .	100
3.22	Architectures retenues pour les microsystèmes. . . . .	101
3.23	Architecture et images des microsystèmes réalisés. . . . .	102
3.24	Microsystèmes étudiés. . . . .	103
3.25	Mode de connexion utilisé. . . . .	104
3.26	Montage utilisé pour l'électrodéposition. . . . .	104
3.27	Réponse d'un microsystème en verre recouvert par l'EDA. . . . .	105
3.28	Réponse d'un microsystème en verre recouvert par de la polyaniline. . . . .	106
3.29	Réponse d'un microsystème en verre recouvert par la polyglycine. . . . .	107
3.30	Demi sphère en PDMS. . . . .	109
3.31	Support en résine après perçage des canaux. . . . .	109
3.32	Support de transport et d'analyse des cornées. . . . .	110



# Table des matières

<b>I</b>	<b>Lab On Chip pour la fécondation <i>in vitro</i></b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Plateforme pour la FIV</b>	<b>3</b>
1.1	État de l'art . . . . .	4
1.1.1	Les pinces optiques . . . . .	5
1.1.2	La manipulation mécanique . . . . .	6
1.1.3	La diélectrophorèse . . . . .	7
1.1.4	Manipulation des cellules par ondes acoustiques . . . . .	8
1.1.5	La microfluidique . . . . .	9
1.2	Schéma de principe . . . . .	11
1.3	Choix de la technologie silicium . . . . .	12
1.4	Techniques d'usinage du silicium . . . . .	12
1.5	Usinage de la face inférieure . . . . .	13
1.5.1	Gravure sans structure de compensation . . . . .	14
1.5.2	Étude théorique de la structure de compensation . . . . .	14
1.5.3	Règles de définition de la structure de compensation . . . . .	17
1.5.4	Influence des sous gravures des plans $\{111\}$ . . . . .	23
1.5.5	Calcul des différents paramètres . . . . .	24
1.5.6	Résultats Expérimentaux . . . . .	25
1.6	Usinage de la face supérieure . . . . .	27
1.6.1	Mise en œuvre expérimentale . . . . .	27
1.6.2	Résultats expérimentaux . . . . .	27
1.6.3	Conclusion . . . . .	31
1.7	La partie verre . . . . .	31
1.7.1	Présentation schématique . . . . .	32

1.7.2	Résultats expérimentaux . . . . .	32
1.8	Assemblage du microsysteme . . . . .	33
1.8.1	Montage des connecteurs microfluidiques . . . . .	33
1.8.2	Montage des fibres optiques et des capillaires microfluidiques . . . . .	34
1.8.3	Montage expérimental pour la manipulation et l'analyse de l'ovocyte . . . . .	36
1.9	Résultats Expérimentaux . . . . .	37
1.9.1	Validation du microsysteme avec des billes en polystyrène . . . . .	37
1.9.2	Validation du microsysteme avec des ovocytes surnuméraires . . . . .	39
1.10	Mesure des propriétés optiques. . . . .	40
1.10.1	Premier microsysteme . . . . .	40
1.10.2	Second microsysteme . . . . .	42
1.10.3	Mesure de l'indice de réfraction des ovocytes . . . . .	42
1.10.4	Estimation de la maturité des cellules . . . . .	43
1.11	Conclusion . . . . .	44

## **II Lab On Chip pour le transport et le contrôle qualité du greffon cornéen.in vitro** **47**

<b>2</b>	<b>Etude du spectre de Transmittance de la cornée</b>	<b>49</b>
2.1	Généralités . . . . .	49
2.1.1	Anatomie . . . . .	49
2.1.2	Histologie . . . . .	50
2.2	La greffe de la cornée . . . . .	52
2.2.1	Les maladies de la cornée . . . . .	52
2.2.2	L'intervention chirurgicale . . . . .	52
2.2.3	Le prélèvement et la conservation du greffon avant la greffe . . . . .	52
2.2.4	La cession de la cornée . . . . .	55
2.2.5	La greffe de la cornée à l'Etablissement Français du Sang (EFS) . . . . .	56
2.3	Comportement optique de la cornée . . . . .	56
2.3.1	Transmission de la lumière . . . . .	56
2.3.2	Réfraction de la lumière . . . . .	56
2.3.3	Réflexion de la lumière . . . . .	57
2.4	Dispositif expérimental . . . . .	58
2.4.1	Description du dispositif de mesure . . . . .	58
2.4.2	<i>Caractrisationdudispositif</i> . . . . .	60
2.4.3	Mesures effectuées sur des cornées en dehors du milieu de conservation . . . . .	62
2.4.4	Mesures effectuées sur des cornées dans le milieu de conservation . . . . .	68
2.5	Tests sur site . . . . .	73
2.5.1	La transmittance en fonction du nombre de cellules endothéliales . . . . .	73
2.5.2	Evolution de la transmittance de la cornée avec le temps . . . . .	75

---

2.6	Conclusion . . . . .	77
<b>3</b>	<b>Microcapteurs pour la détection de bactéries</b>	<b>79</b>
3.1	État de l'art . . . . .	79
3.1.1	Introduction . . . . .	79
3.1.2	Définition du pH . . . . .	80
3.1.3	La mesure du pH . . . . .	82
3.2	Approche conceptuelle . . . . .	87
3.3	Réalisation de microcapteurs . . . . .	88
3.3.1	Le principe du capteur . . . . .	88
3.3.2	Les polymères étudiés . . . . .	89
3.3.3	Electrodéposition des polymères sur le platine . . . . .	91
3.4	Caractérisation des capteurs . . . . .	94
3.4.1	Etude des capteurs filaires . . . . .	95
3.5	Etude des capteurs microsystèmes . . . . .	100
3.5.1	Etude de microsystèmes sur substrat en silicium . . . . .	101
3.5.2	Etude des microsystèmes sur substrat en verre . . . . .	103
3.5.3	Caractérisation des microcapteurs réalisés . . . . .	105
3.6	Intégration des capteurs . . . . .	108
3.7	Conclusion . . . . .	110
<b>III</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>115</b>
	<b>Bibliographie</b>	<b>117</b>
<b>IV</b>	<b>Index</b>	<b>123</b>
	<b>Index</b>	<b>125</b>

## Résumé

Au cours de cette thèse, deux Lab On Chip ont été réalisés. Le premier est destiné à la fécondation *in vitro* (FIV) et le second au transport et au contrôle qualité d'un greffon cornéen. Le Lab On Chip pour la FIV est constitué d'une plateforme et d'un ensemble de sondes permettant la caractérisation de l'ovocyte. La plateforme en silicium, assure le maintien en vie de l'ovocyte en formant un réservoir pour le milieu de vie des cellules. Un réseau de microcanaux usiné sur la plateforme permet d'aspirer le milieu des cellules et confère à cette dernière les fonctions : de déplacement, de positionnement et d'immobilisation de l'ovocyte. Des tests préliminaires, sur des ovocytes surnuméraires, ont montré la faisabilité des analyses non invasives pour la caractérisation des ovocytes avant fécondation.

Actuellement, la manipulation de la cornée, pour effectuer certaines analyses, risque de l'endommager. Pour résoudre ce problème, nous avons développé une méthode optique, non invasive, pour caractériser l'état de la cornée. Il s'agit d'une mesure de la transmittance de la cornée corrélée avec le nombre de cellules vivantes. Afin de détecter les infections dans la cornée, nous avons développé des microcapteurs de pH. Ces derniers offrent une mesure ponctuelle plus précise. La caractérisation des microcapteurs a donnée des résultats pertinents jusqu'à une taille de 10  $\mu\text{m}$ . Enfin, nous avons intégré un système de capillaires pour maintenir à la fois la cornée dans son milieu de vie et pour la positionner d'une manière non invasive, afin d'effectuer son analyse.

**Mots clés :** Lab On Chip, microsystèmes, manipulation des cellules uniques, FIV, gravure humide KOH, gravure sèche DRIE, microcapteurs, spectre de transmission de la cornée, polymères en couches minces, microélectrodes.

## Abstract

In this thesis, two Lab On Chip has been realised. The first one is intended for *in vitro* fertilization (IVF), the second for the transportation and quality control of the cornea. The Lab On chip for IVF is formed of a platform and a set of probes. The platform is made of silicon ; it forms a reservoir for the life fluid of the oocyte to keep it alive. On the platform we machined a network of microchannels to aspire the life fluid ; this operation gives the platform the functions of : transportation, positioning and immobilization of the oocyte. A preliminary test, on supernumerary cells, demonstrates the feasibility of non invasive tests for the characterization of the oocyte before fertilization.

Actually, the manipulation of the cornea, for execute some analysis, can cause damage for it. To resolve this problem, we developed an optical method, so no invasive, for characterization state of the cornea. It consist in the measure of cornea transmittance, that measure is correlated with the number of living cells. To detect infections in the cornea, we developed pH micro-sensors. The latter offer a more accurate measure. The characterisation of the pH micro-sensors has yielded results relevant until a size of 10  $\mu\text{m}$ . Finally, we incorporated a system of capillaries to maintain the cornea in his life fluid, also for its positioning bynon invasive manner for analysis.

**Key words :** Lab On Chip, microsystems, single cell manipulation, wet etching KOH, dry etching DRIE, IVF, microsensors, micromachining, corneal transmission spectrum, thin polymers films, microelectrodes.