

Spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellule biologique unique avec sensibilité maximisée jusqu'à 40 GHz

Wenli Chen, David Dubuc, Katia Grenier

▶ **To cite this version:**

Wenli Chen, David Dubuc, Katia Grenier. Spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellule biologique unique avec sensibilité maximisée jusqu'à 40 GHz. Journées Nationales Microondes (JNM 2015), Jun 2015, Bordeaux, France. pp.3 - 4. hal-01951750

HAL Id: hal-01951750
https://laas.hal.science/hal-01951750

Submitted on 11 Dec 2018

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

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

Spectroscopie diélectrique hyperfréquence de cellule biologique unique avec sensibilité maximisée jusqu'à 40 GHz

W. Chen, D. Dubuc, K. Grenier

LAAS-CNRS and Toulouse Univ., 7 Avenue du Colonel Roche, 31400 Toulouse
wenli.chen@laas.fr

Résumé

Cet article présente l'optimisation de la sensibilité d'un biocapteur hyperfréquence dédié à l'analyse d'une cellule biologique unique vivante de 40 MHz à 40 GHz, directement dans son milieu de culture. Afin d'améliorer la sensibilité du capteur, différentes coupures capacitives (5µm et 10µm) situées au centre du biocapteur ont été évaluées avec différentes tailles de billes de polystyrène (10µm et 20µm). Les meilleurs contrastes capacitif et conductif ont été atteints pour une coupure de 5 µm. Ce capteur a ensuite été évalué pour la mesure de cellules biologiques individuelles et vivantes, directement dans leur milieu de culture. Des contrastes capacitif et conductif de 0,4 fF à 5 GHz et 85 µS à 40 GHz, et des écarts-types associés estimés à 7% et 14% respectivement ont été obtenus.

1. Introduction

L'analyse cellulaire est actuellement basée sur des méthodes de détection optique. Microscopie et cytométrie en flux impliquent des techniques de coloration ou fluorescence très efficace notamment en termes de précision et spécificité. Elles sont néanmoins consommatrice en temps de manipulation, coûteuses et peuvent être invasives vis à vis des cellules [1].

Parmi les techniques d'analyse cellulaires complémentaires [2], l'utilisation des ondes électromagnétiques présente des avantages importants. La spectroscopie diélectrique hyperfréquence est particulièrement attractive en raison des atouts suivants [3]: non-invasivité pour les cellules, sans-contact, non destructrice et non-ionisante. Elle est également miniature et compatible avec les applications de laboratoire sur puce [3]-[5]. Les cellules peuvent également être analysées directement dans leur milieu de culture pendant des processus biologiques [6]. La spectroscopie diélectrique hyperfréquence constitue donc un candidat prometteur pour l'analyse cellulaire non-invasive en temps réel.

Les communautés biologistes et médicales réalisent leurs investigations aussi bien aux niveaux de population de cellules que de cellules individuelles [7]. Jusqu'à présent, la technique de détection hyperfréquence a été développée principalement au niveau de population de cellules [3], [8]-[9] et plus récemment au niveau de la cellule unique avec une architecture interférométrique hyperfréquence [10], ou en large bande avec une topologie capacitive de 40 MHz à 40 GHz [11].

Cet article porte sur la topologie capacitive adaptée à l'analyse large bande de cellule biologique unique par spectroscopie diélectrique hyperfréquence et se concentre sur l'optimisation de la sensibilité du biocapteur et la répétabilité des mesures.

2. Architecture du biocapteur et Micro-fabrication

Le dispositif développé pour effectuer la spectroscopie diélectrique hyperfréquence d'une cellule biologique unique est présenté sur la figure. 1. Il comporte un guide d'onde coplanaire avec une coupure capacitive au centre. Le canal micro-fluidique placé perpendiculairement au dessus, inclut un piège mécanique en son centre. Celui-ci est utilisé pour immobiliser précisément une cellule juste au-dessus de la coupure capacitive, où les champs électromagnétiques sont focalisés. Le mécanisme de piègeage hydrodynamique est présenté sur la figure. 2.

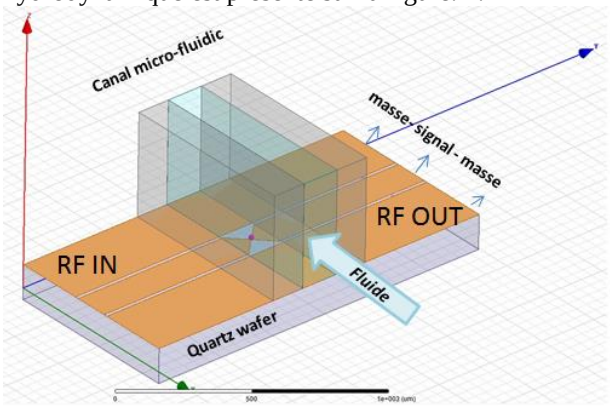


Figure 1. Modèle 3D du dispositif sur HFSS, la cellule biologique simulée est indiquée en rouge.

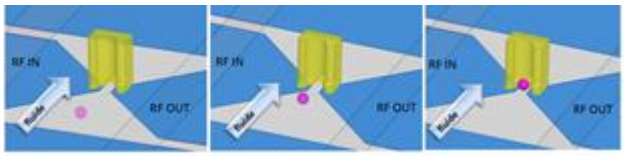


Figure 2. Principe du mécanisme de piégeage hydrodynamique.

Etant donné l'interstice (de quelques micromètres d'épaisseur) existant entre le bloqueur et le substrat comportant le guide d'onde coplanaire, les cellules arrivant face au bloqueur sont dirigées par force hydrodynamique au niveau de l'interstice, au bas du bloqueur. La première cellule arrivée empêche alors tout flux de liquide sous le bloqueur, ce qui permet de dévier tout autre cellule arrivant ultérieurement au niveau du bloqueur, tout en assurant le blocage constant de la cellule. La figure 3 présente une photographie agrandie du piège avec une bille de polystyrène bloquée à l'intérieur. En raison du liquide dans le canal, il n'est pas possible de visualiser clairement à la fois la bille bloquée et la métallisation du capteur. Le guide d'onde est réalisé avec une couche d'or d'épaisseur 0.3 µm, alors que le piège et le canal micro-fluidique sont constitués de SU-8, polymérisé après photolithographie.

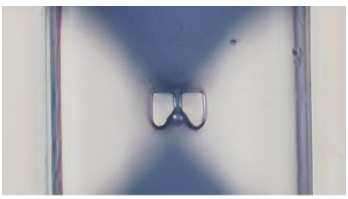


Figure 3. Photographie d'une seule bille bloquée dans le piège, située au-dessus du gap capacitif

Plusieurs architectures de biocapteurs ont été fabriquées. Les tailles de la coupure capacitive et du piège ont été modifiées afin d'optimiser le capteur en termes de sensibilité de détection et d'efficacité de piégeage. Cet article se concentre sur l'étude de la sensibilité et de la répétabilité des mesures micro-ondes.

Des largeurs de gap capacitif de 5 et 10 µm ont été définies et évalués en raison du diamètre moyen de 15 µm des cellules biologiques ciblées.

3. Validation des simulations électromagnétiques avec les mesures pour des microsphères de polystyrène

Pour évaluer les performances du biocapteur, des simulations électromagnétiques ont été effectuées avec le logiciel HFSS© à l'aide de microsphères en polystyrène. Elles présentent l'avantage d'être un modèle simple avec des valeurs de permittivité et de conductivité constantes par rapport aux cellules biologiques. Le biocapteur a également été caractérisé lorsque chargé avec des microsphères de polystyrène dans de l'eau dé-ionisée (eau DI) ainsi qu'avec le milieu liquide hôte seul. Une procédure de 'de-embedding' est alors appliquée sur les paramètres S mesurés (en réflexion et transmission) de 40 MHz à 40GHz, afin d'éliminer l'impact des lignes d'accès et des parois fluidiques. Le composant peut alors être modélisé par une capacité et une conductance. C_{bille} et G_{bille} correspondent respectivement aux capacité et conductance lorsque le composant est chargé par une bille, tandis que $C_{milieu\ hôte}$ et $G_{milieu\ hôte}$ sont relatives à la mesure avec milieu hôte seul [11].

.

Pour distinguer la contribution des microsphères de polystyrène dans le liquide environnant, le contraste capacitif de la bille par rapport au milieu d'hôte est calculé avec l'équation 1 :

$$\Delta C = C_{bille+milieu\ d'hôte} - C_{milieu\ d'hôte} \qquad \textit{Equation. 1}$$

De même pour la conductance :

$$\Delta G = G_{bille+milieu\ d'hôte} - G_{milieu\ d'hôte} \qquad \textit{Equation. 2}$$

Les Figure 4 et 5 présentent les résultats des simulations et mesures obtenues pour une bille de polystyrène de 10µm de diamètre, avec un biocapteur à coupure capacitive de 10µm.

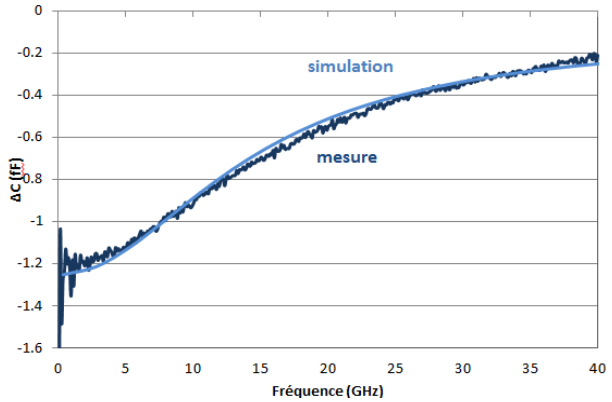


Figure 4. Comparaison simulation/mesure du contraste capacitif d'une bille de polystyrène de diamètre 10µm pour un biocapteur à coupure capacitive de 10µm.

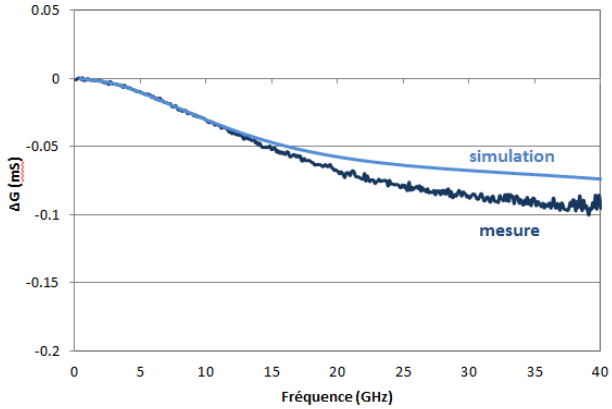


Figure 5. Comparaison simulation/mesure du contraste conductif d'une bille de polystyrène de 10µm de diamètre pour un biocapteur à coupure capacitive de 10µm.

Ces figures montrent une excellente concordance entre simulation et mesure, ce qui valide notre approche.

4. Optimisation de la sensibilité et répétabilité des mesures avec des billes de polystyrène

La sensibilité du biocapteur a été évaluée pour différentes tailles de coupure capacitive dans le cas de billes de polystyrène dans de l'eau dé-ionisée.

Les figures 6 et 7 présentent les contrastes capacitifs et conductifs extraits pour deux diamètres de billes: 10 et 20 µm. Les contrastes ont été calculés par rapport au milieu liquide environnant, l'eau DI. Par conséquent, la ligne «zéro» dans les Figures 6 et 7 correspond à l'eau dé-ionisée de référence. La répétitivité des mesures a été évaluée avec l'extraction de l'écart type pour tous les cas.

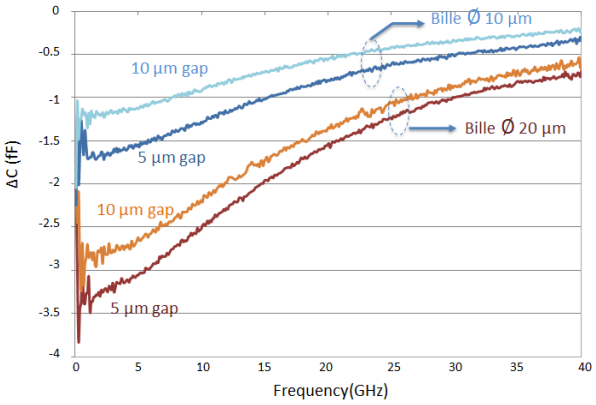


Figure 6. Contraste capacitif des billes de polystyrène de diamètre de 10µm et 20µm pour des biocapteurs avec coupure capacitive de 5µm et 10µm

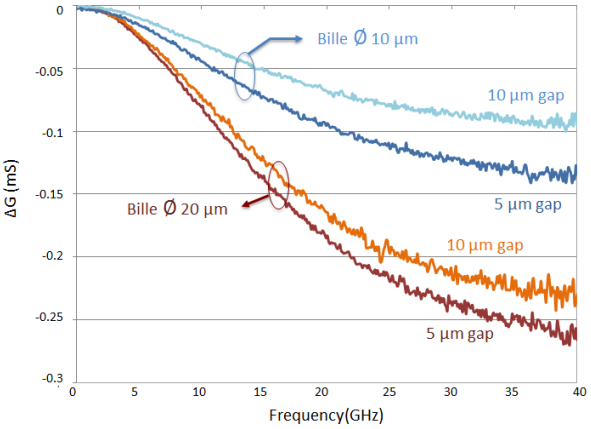


Figure 7. Contraste conductif des billes de polystyrène de diamètre de 10µm et 20µm pour des biocapteurs avec coupure capacitive de 5µm et 10µm

Les résultats sont résumés dans le tableau 1. Les billes de diamètre 10 µm présentent des contrastes capacitif et conductif plus faibles que pour les 20 µm, ce qui peut être facilement expliqué par la réduction de taille. Les mesures sont également très répétitives avec des écarts-types de l'ordre de 4% et 6% pour les contrastes capacitif et conductif respectivement. De plus, dans toutes les configurations, la coupure capacitive de 5 µm présente un plus grand contraste par rapport à celle de 10 µm. Les contrastes capacitif et conductif sont respectivement améliorés d'environ 40% et 50%, dans le cas de la bille de diamètre 10 µm.

Tableau 1. Résumé des contrastes capacitif et conductif à 5 et 40 GHz respectivement, vis à vis des tailles de coupure capacitive et diamètre des billes. Ecarts-types entre parenthèses.

ΔC (fF) @5GHz			ΔG (mS) @40GHz		
	ϕ10µm	ϕ20µm		ϕ10µm	ϕ20µm
gap 10µm	-1.12 (0.05)	-2.53 (0.09)	gap 10µm	-0,09 (0,009)	-0,225 (0,009)
gap 5µm	-1.53 (0.06)	-3,05(0,05)	gap 5µm	-0,135 ((0,009)	-0,26 (0,01)

Ce résultat peut être expliqué par la variation de la pénétration du champ électromagnétique à l'intérieur du milieu hôte et des billes, comme le montre la Figure 8 avec des simulations par éléments finis effectuées avec le logiciel HFSS© pour les deux configurations de coupure capacitive de 5µm et 10µm. Afin de mieux estimer l'emplacement des billes et la distribution des champs, différents cercles de diamètres allant de 10 à 20 µm sont indiqués sur la figure. L'intensité du champ électromagnétique, calculée dans un cercle de 10µm, présente une augmentation de 63% avec la coupure capacitive de 5 µm par rapport à celle de 10 µm.

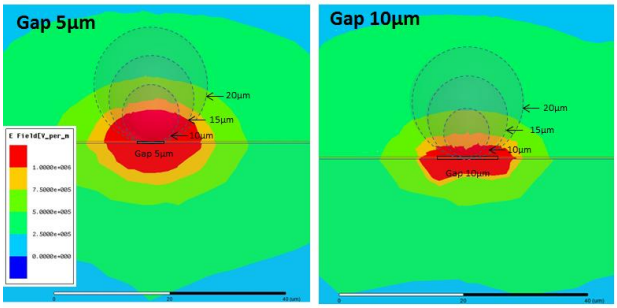


Figure 8. Distribution de champ électromagnétique en fonction de la largeur de la coupure capacitive (indiquée gap).

Basé sur cette étude et afin de maximiser la sensibilité du biocapteur, une coupure capacitive de 5 µm est préférée et employée dans la section suivante, qui dédiée à la mesure RF de cellules biologiques uniques directement dans leur milieu de culture.

5. Spectroscopie diélectrique hyperfréquence de bille puis cellule biologique unique en milieu de culture

Des mesures RF de cellules biologiques uniques ont été réalisées. Les cellules utilisées sont de la lignée cellulaire monocytaire humaine THP1, couramment utilisées pour des études sur la leucémie. Le diamètre moyen des cellules est de 15,4 µm et le milieu de culture cellulaire traditionnel est celui de Roswell Park Memorial Institute (RPMI) avec 10% de Sérum de Veau Fœtal (SVF).

Plusieurs cellules vivantes individuelles ont été mesurées les unes après les autres et la valeur moyenne de leurs contrastes est donnée sur la Figure 9, ainsi que pour les billes de polystyrène de diamètre 10µm,

mesurées dans le même milieu de culture que les cellules. La référence utilisée dans ces cas est donc le milieu de culture, qui correspond à la ligne "zéro" en abscisse de la Figure 9.

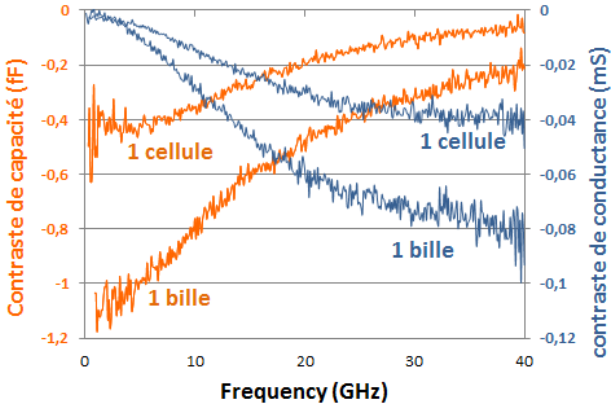


Figure 9. Contrastes capacitif et conductif d'une cellule biologique vivante et d'une bille de polystyrène dans le milieu de culture cellulaire (RPMI additionné de 10% de SVF).

Le contraste capacitif de la cellule est inférieur à celui de la bille. Ceci est lié à leurs permittivités effectives relatives respectives. En effet, la permittivité de la cellule est proche du milieu de culture, et notamment de l'eau (de 80 à 30 en fonction de la fréquence), alors que les billes de polystyrène présentent une permittivité constante proche de 2,5.

Le tableau 2 présente un résumé des contrastes capacitifs et conductifs pour bille et cellule uniques en milieu de culture, ainsi que les écart-types correspondants. Ceux-ci sont estimés à 7% et 14% respectivement dans le cas d'une cellule unique. Ces valeurs sont plus importantes que celles obtenues dans l'étude de l'optimisation de la sensibilité et peuvent être expliquées par l'hétérogénéité des cellules, qui présentent intrinsèquement des variations en termes de diamètre et position dans le cycle cellulaire. La mesure RF de cellule biologique vivante constitue donc un défi atteignable avec une excellente répétabilité de mesure.

Tableau 2. Résumé des contrastes capacitif et conductif à 5 et 40 GHz respectivement, d'une cellule biologique et une bille de polystyrène dans un milieu de culture cellulaire. Ecart-types entre parenthèses.

dans milieu de culture	ΔC (fF) @ 5 GHz	ΔG (mS) @ 40 GHz
Bille	-1 (0.04)	-0.085 (0.008)
Cellule unique	-0.99 (0.04)	-0.082 (0.008)

6. Conclusions

L'optimisation de la sensibilité du biocapteur hyperfréquence dédié à l'analyse de cellules biologiques uniques directement dans leur milieu de culture a été effectuée et a conduit à une règle importante de conception pour focaliser davantage les champs électromagnétiques dans la cellule et atteindre une amélioration de 40% à 60% sur les contrastes capacitif et conductif respectifs. Même si la mesure RF de cellules biologiques vivantes individuelles est particulièrement difficile en raison de contrastes diélectriques extrêmement faibles (de l'ordre de quelques centaines d'ato-farads), une excellente répétabilité des résultats a été démontrée par spectroscopie diélectrique jusqu'à 40 GHz.

7. Bibliographie

[1] J. L. Carey, J. P. McCoy, D.F. Keren, "Flow Cytometry in Clinical Diagnosis," 4th Edition, American Society for Clinical Pathology Press, Chicago, IL, 2007, ISBN-13: 978-0891895480.

[2] Rashid Bashir, BioMEMS: state-of-the-art in detection, opportunities and prospects, Advanced Drug Delivery Reviews 56 (2004) 1565– 1586.

[3] K. Grenier, D. Dubuc et al., 'Integrated Broadband Microwave and Microfluidic Sensor dedicated to Bioengineering', IEEE Trans. on Microwave Theory and Techniques, Vol. 57, n°12, Dec. 2009, pp. 3246-3253.

[4] M.M Bajestan, A.A. Helmy, H. Hedayati, K. Entesari, "A 0.62-10GHz CMOS Dielectric Spectroscopy System for Chemical/Biological Material Characterization," IEEE International Microwave Symposium, Tampa, USA, 2014.

[5] J.-C. Chien, M. Anwar, E.-C. Yeh, L. P. Lee, A. M. Niknejad, "A 6.5/17.5-GHz Dual-Channel Interferometer-based Capacitive Sensor in 65-nm CMOS for High-Speed Flow Cytometry," IEEE International Microwave Symposium, Tampa, USA, 2014.

[6] S. Anghyun, T. Stintzing, I. Block, D. Pavlidis, M. Rieke, P. G. Layer, "High frequency wideband permittivity measurements of biological substances using coplanar waveguides and application to cell suspensions", 2008 IEEE MTT-Symposium International, pp. 915 – 918, 2008.

[7] D. Di Carlo, N. Aghdam, L.P. Lee, "Single-cell enzyme concentrations, kinetics, and inhibition analysis using high-density hydrodynamic cell isolation arrays," Anal. Chem., vol. 78, pp. 4925-4930, 2006.

[8] N. Haase, A.F. Jacob, "Characterization of biological substances using a substrate integrated microwave near-field sensor," European Microwave Week 2012, Amsterdam, Netherlands, Oct. 2012.

[9] F. Artis et al., "Microwave dielectric spectroscopy for biological cells suspensions analysis and proliferation evaluation," IEEE EuMC 2014, Rome, Italy, Oct. 2014.

[10] Y. Yang, P. Wang et al., "Distinguishing the viability of a single yeast cell with an ultra-sensitive radio frequency sensor, Lab on a Chip, 10, pp. 553-555, 2010.

[11] T. Chen et al, Microwave biosensor dedicated to the dielectric spectroscopy of a single alive biological cell in its culture medium, IEEE IMS (2013) 978-1-4673-2141.