



HAL
open science

Contrôle de température et étude des transferts thermiques dans des dispositifs microfluidiques

Guilhem Velve-Casquillas

► **To cite this version:**

Guilhem Velve-Casquillas. Contrôle de température et étude des transferts thermiques dans des dispositifs microfluidiques. Physique [physics]. Université Paris Sud - Paris XI, 2008. Français. NNT : . tel-00391813

HAL Id: tel-00391813

<https://theses.hal.science/tel-00391813>

Submitted on 4 Jun 2009

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.



THESE DE DOCTORAT

SPECIALITE : PHYSIQUE

Ecole Doctorale « Sciences et Technologies de l'Information des Télécommunications et des Systèmes »

Effectuée au Laboratoire de Photonique et de Nanostructures

Présentée par :

GUILHEM VELVE CASQUILLAS

Sujet : Contrôle de température et étude des transferts thermiques dans des dispositifs microfluidiques.

Soutenue le 27 novembre 2008 devant les membres du jury :

Dominique MAILLY..... : Président du jury

Yong CHEN.....: Directeur de thèse

Jean Jacques GREFFET.....: Directeur de thèse

Lionel BUCHAILLOT..... : Rapporteur

Christian BERGAUD.....: Rapporteur

Anne PAOLETTI..... : Examineur

A mes deux petites grands-mères, mami Mimi qui n'as jamais manqué de sourire pour sa petite famille ainsi que mami Jeanette et ses petits clins d'œils complices.

Deux petites grands mères qui ont donné naissance à une grande famille.

Remerciements

J'ai conscience de la chance que j'ai d'être né en France et d'avoir ainsi pu effectuer un doctorat dans d'aussi bonnes conditions. Je tiens donc à remercier tout d'abord **l'état français** qui a financé mes études de 4 à 28 ans.

Je tiens à remercier le professeur **Yong Chen** qui m'a soutenu dès le début pour l'obtention de ma bourse de thèse et m'a, par la suite, offert tous les moyens à sa disposition pour mener à bien mes recherches. Il a toujours privilégié les choix qu'il considérait comme bénéfiques pour ma carrière et ma formation de chercheur. Connaissant mon goût prononcé pour le voyage il m'a également permis d'effectuer des collaborations scientifiques en Chine et au Etat Unis.

Je remercie également grandement le professeur **Jean Jacques Greffet** qui a accepté d'encadrer ma thèse. Il m'a énormément apporté d'un point de vue scientifique et ne m'a pas laissé tomber dans les moments les plus foisonnant.

Je remercie le professeur **Phong Tran** de m'avoir soutenu dans mes recherches en biologie et de m'avoir fait confiance en m'invitant à plusieurs reprises dans son laboratoire de Philadelphie, mettant tout en œuvre pour que je m'y sente bien accueilli.

Je remercie **Anne-Marie Haghiri-Gosnet** pour son encadrement et sa bonne humeur.

Je remercie tout particulièrement **Mael Le berre** pour sa réflexion scientifique et sa contribution éclairée à tous les projets décrits dans cette thèse. Mais surtout c'est grâce à toi que je suis docteur aujourd'hui alors Mael pour tout ce que tu as fait pour moi, encore un grand merci.

Je remercie le « petit » **Adrien Plecis** qui a mis toutes les forces actives du laboratoire en ordre de bataille et m'a appris à filer droit dans mes choix thématiques.

Au jour le jour j'ai été accompagné par une équipe administrative et technologique très compétente au LPN. Pour ne citer qu'eux je tiens à remercier : **David Chouteau** particulièrement pour le développement du dépôt d'oxyde multicouches qui a permis à toute l'équipe « nanoflux » d'intégrer des électrodes étanches, **Christophe Roblin**, **Christophe Dupuis**, **Ali Madouri Stephane Guilet**, **Laurent Couraud** ainsi que **Laetitia Leroy** pour les dépôts métalliques et sa bonne humeur.

Mes remerciements également pour leur collaboration scientifique à :

Alice Demarez, **Cecile Crozatier**, **Jean Christophe Galas**, **Nathalie Bontoux**, **Courtney Terenna** et **Chuanhai Fu**.

Damien Baigl pour tout le temps passé sur mes présentations et pour cette autre vision de la science qu'il contribue à diffuser au jour le jour.

Je remercie **Fabien Bertholle** et **Sebastien Méance** pour leur investissement personnel, lors de leur stage de fin d'études qu'ils ont effectués sur certaines thématiques scientifiques présentées dans cette thèse.

Je remercie **mes petits parents** pour l'amour et le soutien moral et logistique qu'ils m'ont apporté sans faillir depuis 28 ans et particulièrement pendant cette thèse.

Je passe un grand bonjour à Jeremy Cramer, Helena, Truong, la famille Gallon et Raphaël Acosta qui m'ont rendu simplement heureux.

Je remercie **Jacques Weber** professeur de logique formelle à l'ESIEE qui m'a donné à la sortie du bac l'opportunité de faire une école d'ingénieur malgré un dossier scolaire improbable.

Je remercie **le monde entier** d'exister, et de donner un peu de sens à ce travail scientifique..

Je ne remercie pas **Marlboro** et **Old Holborn** pour avoir enfumer mes petits poumons pendant dix ans.

Table des matières

SUJET : CONTROLE DE TEMPERATURE ET ETUDE DES TRANSFERTS THERMIQUES DANS DES DISPOSITIFS MICROFLUIDIQUES.....	1
TABLE DES MATIERES	7
INTRODUCTION.....	11
CHAPITRE 1 :	15
MICROTHERMIQUE ET DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE.....	15
1.1 PROPRIETES THERMIQUES A L'ECHELLE MICROMETRIQUE.....	17
1.1.1 Les transferts thermiques radiatifs	18
1.1.2 Les transferts thermiques conductifs.	18
1.1.3 Les transferts thermiques convectifs.....	20
1.2 SOLUTIONS TECHNOLOGIQUES POUR LA MESURE DE TEMPERATURE	22
1.2.1 Les thermocouples.....	22
1.2.2 Les couches minces métalliques : Les RTD.....	22
1.2.3 Les couches minces d'oxyde métalliques ou de semi-conducteurs : Les thermistances	23
1.2.4 Les couche mince d'ITO.....	23
1.2.5 Les marqueurs fluorescents	23
1.2.6 Les caméras infrarouges	23
1.3 SOLUTIONS TECHNOLOGIQUES POUR LES ELEMENTS DE CHAUFFE ET DE REFROIDISSEMENT	24
1.3.1 Les Couches minces métalliques	24
1.3.2 Couche mince d'ITO.....	24
1.3.3 Injection de fluide à différentes températures	24
1.3.4 Microcaloducs	25
1.3.5 Micro Peltier	25
1.3.6 Autres : Laser et réaction chimique.....	26
1.4 : METHODES DE CONTROLES DE TEMPERATURE POUR LA BIOLOGIE CELLULAIRE	26
1.4.1 introduction	26
1.4.2 Contrôles de température pour la biologie : Solutions externes	28
1.4.3 Contrôles de température pour la biologie : Solutions intégrées.....	31
1.5 MATERIAUX ET TECHNOLOGIES DISPONIBLES	33
1.6 SOFT LITHOGRAPHIE (PDMS) ET DISPOSITIF MULTICOUCHE	35
1.7 METHODE DE MESURE	37
1.8 CONCLUSIONS	39
CHAPITRE 2 :	41
MICROCONDUCTIMETRE THERMIQUE ET NANOFLUIDE	41
2.1 ETAT DE L'ART SUR LES NANOFLUIDES	43
2.1.1 Les nanofluide à base de nanotubes	44
2.1.2 Les nanofluide à base de nanoparticules sphériques	46
2.2 LE MICROCONDUCTIMETRE	47
2.2.1 But et motivation du microconductimètre.....	47
2.2.2 Etat de l'art.....	48
2.2.3 Technologies utilisées.....	49
2.2.4 Théorie simple : le cas du fil chaud.....	50
2.2.5 Résultats théoriques.....	51
2.2.6 Simulations numériques.....	56
2.2.7 Procédure expérimentale.....	57
2.2.8 Résultats expérimentaux	61
2.2.9 Conclusions sur le conductimètre thermique.....	62
2.3 MESURES SUR LES NANOFLUIDES	63
2.3.1 Mesures sur les nanofluides à base de nanotubes	63
2.3.2 Mesures sur les nanofluides contenant des nanoparticules sphériques.....	64
2.3.3 Discussions	66
2.3.4 Conclusions sur les nanofluides	67
2.4 CONCLUSIONS SUR LE MICROCONDUCTIMETRE ET LES NANOFLUIDES	67

CHAPITRE 3 :	69
MESURES DE PROPRIETES THERMOCHIMIQUES: MICROCALORIMETRIE	69
3.1 CALORIMETRIE ET MICROFLUIDIQUE	71
3.1.1 Introduction à la calorimétrie	71
3.1.2 Mélange en microfluidique	73
3.1.3 La microcalorimétrie : état de l'art	77
3.2 MICROCALORIMETRE	78
3.2.1 But et motivation	78
3.2.2 Présentation du dispositif	79
3.2.3 Procédure technologique	80
3.2.4 Montage	81
3.3 RESULTATS EXPERIMENTAUX	82
3.3.1 Considérations et expériences préliminaires	82
3.3.2 Mesures de concentrations et d'enthalpies	85
3.3.3 Réaction enzymatique	86
3.3.4 Discussions	87
3.4 CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	88
CHAPITRE 4 :	89
CONTROLE DE TEMPERATURE A BASE DE RESISTANCES INTEGREES : APPLICATION A LA MICRO-PCR	89
4.1 INTRODUCTION	91
4.2 PRESENTATION DU DISPOSITIF	93
4.2.1 Etat de l'art	93
4.2.2 But, principe et structure du dispositif	94
4.2.3 Technologies utilisées	95
4.3 RESULTATS	99
4.3.1 Montage expérimental	99
4.3.2 Caractérisation thermique	99
4.3.3 Application à la biologie	104
4.4 CONCLUSIONS	104
CHAPITRE 5 :	107
CONTROLE DE TEMPERATURE A BASE DE MICROCANAUX : APPLICATION A LA BIOLOGIE CELLULAIRE	107
5.1 PRESENTATION DU PROJET ET DU DISPOSITIF	109
5.1.1 But et motivation du projet	109
5.1.2 Principe du dispositif	109
5.1.3 Montage expérimental	111
5.1.4 Technologies	111
5.1.5 Etude théorique du dispositif : Analogie des résistances thermiques	113
5.1.6 Etude théorique du dispositif : Analogie avec un échangeur de chaleur	116
5.2 CARACTERISTIQUES THERMIQUES DU DISPOSITIF	118
5.2.1 Influence de la vitesse du flux	118
5.2.2 Influence de l'objectif	122
5.2.3 Positionnement dans le canal	124
5.2.4 Décalage de la mise au point	125
5.3.1 Contrôle du cytosquelette	126
5.3.2 Mouvement des iMTOCs	127
5.3.3 Déformation du noyau	130
5.3.4 Mouvements du SPB	132
5.3.5 Contrôle du fuseau mitotique	134
5.3.6 Contrôle de protéines thermosensibles : synchronisation cellulaire	135
5.4 CONCLUSION LE CONTROLE DE TEMPERATURES POUR LA BIOLOGIE CELLULAIRE	136
CONCLUSIONS GENERALES	138
BIBLIOGRAPHIE	141
ANNEXES ANNEXE A :	149

ANNEXE A :	151
PROCEDES DE MICRO-FABRICATION	151
A.1 PROCEDURE TECHNOLOGIQUE POUR L'INTEGRATION DE RESISTANCES DANS UN DISPOSITIF MICROFLUIDIQUE	153
A.1.1 <i>La préparation du substrat</i>	154
A.1.2 <i>La photolithographie</i>	154
A.1.3 <i>Les dépôts de métaux</i>	156
A.1.4 <i>Le « lift off »</i>	156
A.1.5 <i>Les dépôts de diélectriques</i>	157
A.1.6 <i>Gravures et protection des contacts électriques</i>	158
A.1.7 <i>Le collage plasma</i>	159
A.1.8 <i>Les connectiques électriques</i>	160
A.1.9 <i>Les connectiques fluidiques</i>	160
A.1.10 <i>Tableau récapitulatif des procédures technologiques</i>	160
A.2 PROCEDURE TECHNOLOGIQUE POUR LA FABRICATION D'UN MOULE DE MICROCANAUX.....	161
A.3 MOULAGE, COUCHE MINCE, NANO STRUCTURES ET TRAITEMENT DE SURFACE : UN MARIAGE REUSSI.	162
ANNEXE B :	165
TECHNOLOGIE DE FABRICATION DE DISPOSITIFS POLYETHYLENE/PDMS	165
B.1 CHOIX DU POLYMERE	167
B.2 DESCRIPTION DE LA TECHNOLOGIE.....	168
B.3 DISCUSSION	169
B.4 CONCLUSION	169
ANNEXE C :	171
S.POMBE : SA VIE, SON HISTOIRE ET SON CYTOSQUELETTE	171
C.1 INTRODUCTION	173
C.2 S.POMBE, UNE LEVURE MODELE	173
C.3 LE CYTOSQUELETTE DE S.POMBE	174
C.4 OUTIL BIOLOGIQUE ET MICROSCOPIE	178

Introduction

La microfluidique est une science qui s'intéresse aux mouvements des fluides dans des canaux artificiels ayant des tailles comprises entre 1 et 500 μm . Cette science se situe à l'interface de plusieurs domaines scientifiques, principalement la physique des fluides et les micro technologies. Cependant les recherches en microfluidique ont une application principale qui vise à développer des nouveaux outils dans les sciences de la vie et la chimie analytique.

Les phénomènes d'écoulement de fluides dans les microcanaux sont maintenant bien élucidés et de nombreuses solutions technologiques existent pour la fabrication de dispositifs microfluidiques. A l'heure actuelle une grande partie des recherches en microfluidique concerne la création d'outils pour l'étude d'autres domaines scientifiques. A cet effet, il est souvent nécessaire de coupler la microfluidique avec d'autres disciplines comme l'électrocinétique ou la chimie de surface afin de pouvoir mettre au point les outils microfluidiques capables de répondre à une problématique posée. Dans cette thèse nous avons couplé la microfluidique et la thermique aux échelles micrométriques pour développer des outils nous permettant de répondre à des questions scientifiques dans les autres domaines d'intérêt que sont la physique, la chimie et la biologie. Rappelons d'abord très brièvement l'historique du développement technologique de la microfluidique

Les années 50 ont connu l'invention et le développement des premiers transistors. Fabriqués dans des blocs de semi-conducteur, ils ont progressivement remplacé les lampes longtemps utilisées dans la fabrication des appareils électroniques (radio, calculateur...) [Brinkman 1997].

Dans les années 60, l'utilisation de procédés technologiques comme la « photolithographie » la gravure et les dépôts de couches minces ont permis la miniaturisation et l'intégration de transistors sur des galettes de semi-conducteurs, principalement du silicium. La recherche spatiale, via le programme Apollo doté d'une enveloppe de 25 milliards de dollars, a donné la possibilité de financer les programmes de recherche sur les circuits intégrés et les calculateurs. Ces recherches ont amené à la fabrication des premiers circuits intégrés et avec eux, des premiers microprocesseurs. Les investissements massifs de capitaux dans la filière microélectronique ont aussi permis de développer un large éventail de procédés technologiques de fabrication de circuits intégrés.

Au cours des années 80, l'utilisation des procédés de gravure du silicium développés pour l'industrie microélectronique a permis de fabriquer les premiers dispositifs contenant des micro-éléments mobiles intégrés sur une galette de silicium. [Ho, 1998] Ces nouveaux types de dispositifs appelés MEMS (Micro Electro Mechanical System) ont donné naissance à des applications industrielles, particulièrement dans le cadre des capteurs de pression et des têtes d'imprimantes.

Dans les années 90, de nombreuses recherches ont été menées pour appliquer les MEMS dans les domaines de la biologie, de la chimie et du biomédical [Voldman 1999]. Ces applications nécessitant de contrôler des mouvements de liquides dans des microcanaux ont considérablement contribué au développement de la microfluidique. Un important effort de recherche a été effectué pour le développement et la conception de laboratoires sur puce comme la réalisation d'électrophorèses dans des microcanaux gravés dans le verre [Pleicis 2008]. A cette époque la majorité des dispositifs microfluidiques étaient encore fabriqués en silicium ou en verre et nécessitaient de ce fait les lourdes infrastructures de l'industrie microélectronique.

A partir des années 2000, les technologies basées sur le moulage de micro canaux dans des polymères ont connu un fort développement. La réduction des coûts et du temps de

fabrication des dispositifs ont permis à un grand nombre de laboratoires de mener des recherches en microfluidique [Xia 1998].

C'est donc en utilisant des technologies de moulage de polymère couplées avec les possibilités d'intégration de résistances offertes par les technologies issues de l'industrie microélectronique, que nous avons fabriqué les dispositifs microfluidiques décrits dans cette thèse. Cette alliance technologique nous a donné l'opportunité de fabriquer des dispositifs microfluidiques intégrant des pistes métalliques pour la mesure et le contrôle de la température sur puce.

Dans le premier chapitre, nous décrirons les propriétés thermiques aux échelles micrométriques, les solutions existant pour le contrôle de température d'un dispositif microfluidique et les méthodes de microfabrication que nous utilisons dans cette thèse.

Dans le deuxième chapitre, nous présenterons un dispositif permettant de mesurer la conductivité thermique d'un liquide sur un volume de 20 μ L ainsi que les résultats obtenus à l'aide de ce dernier sur des nanofluides.

Dans le troisième chapitre nous décrirons un microcalorimètre basé sur une technologie verre/PDMS utilisant des résistances de platine intégrées pour la mesure de températures.

Enfin, les deux derniers chapitres seront consacrés à la réalisation de dispositifs permettant de contrôler la température d'une chambre microfluidique. Deux configurations de dispositifs ont été étudiées :

Le premier dispositif utilise des micro-éléments résistifs intégrés et des microcanaux de refroidissement pour contrôler la température de la chambre. Ce contrôle de température a été fabriqué pour l'étude de réactions biochimiques sur puce, en particulier la PCR.

La deuxième configuration a été proposée pour une étude particulière en biologie cellulaire. Elle n'utilise pas de résistances intégrées et permet de contrôler la température du dispositif uniquement à l'aide de canaux microfluidiques.

Des informations complémentaires sont regroupées dans trois annexes :

Les deux premières décrivent les détails des procédés de microfabrication utilisés dans cette thèse et une technologie permettant de fabriquer des dispositifs en polyéthylène/PDMS intégrant des résistances. La dernière expose les bases de la biologie cellulaire de la levure *S.pombe*.

La miniaturisation permet d'atteindre des temps caractéristiques de transfert thermique très courts. Les résistances intégrées permettent ainsi de contrôler et de mesurer la température rapidement et localement.

Nous avons couplé la microthermique et les technologies de microfabrication pour développer des dispositifs microfluidiques dédiés à la physique, à la thermochimie, à la biologie cellulaire et moléculaire.

Pour la physique nous avons fabriqué un outil permettant la mesure de la conductivité thermique de liquides sur des gouttes de 25 μ L. Ce dispositif utilise une piste métallique intégrée donnant la possibilité de chauffer transitoirement la goutte de liquide et d'étudier ses propriétés de conduction thermique. Ce dispositif a par la suite été utilisé lors d'une étude physique portant sur la conductivité thermique de dispersion de nanoparticules.

Pour la chimie nous avons mis au point un microcalorimètre pour le monitoring sur puce de réactions chimiques exothermiques ou endothermiques. Ce dispositif mélange les deux réactifs et mesure la variation de température due à la réaction chimique. Ces mesures de température sont effectuées à l'aide de résistances de platine intégrées sous les mélangeurs.

Pour la biologie cellulaire et moléculaire nous avons mis au point des dispositifs de contrôle de température intégrés. Le dispositif de contrôle de température pour la biologie moléculaire, intègre des résistances de chauffe transparentes qui permettent le suivi de fluorescence de réactions biochimiques. Ce dispositif PDMS multicouche réutilisable se sert

de canaux de refroidissement moulés dans le PDMS pour accroître la vitesse des changements de température durant les cycles de PCR.

Un second contrôle de température, dédié à l'étude du cytosquelette de levures, est constitué d'un dispositif verre/PDMS bicouche qui n'utilise pas de résistances intégrées. Le contrôle de température est obtenu par la circulation de liquides à température contrôlée parcourant un réseau de micro canaux situé au dessus de celui contenant les levures.

Le couplage entre la microfluidique utilisant le moulage du PDMS et la micro thermique nous a permis d'atteindre des cinétiques de plusieurs dizaines de degrés par seconde. Les possibilités de contrôle de l'environnement offertes par la microfluidique et la vitesse des transferts thermiques aux échelles micrométriques nous ont permis de développer des outils ouvrant de nouvelles voies de recherche en biologie cellulaire. Les méthodes de contrôle de température intégrées développées pour nos applications peuvent également être adaptées à d'autres types d'expériences en modifiant la géométrie des canaux micro fluidiques.

Chapitre 1 :

Microthermique et dispositif microfluidique

Les technologies de microfabrication utilisées le plus couramment pour la fabrication de dispositifs microfluidiques se sont révélées compatibles avec un très large éventail de technologies existantes. Le couplage de la microfluidique avec d'autres technologies permet de créer des outils de recherche toujours plus puissants.

Particulièrement, les technologies associant verre et PDMS permettent de profiter des technologies de dépôt de métaux et de diélectrique développées pour l'industrie de la microélectronique. L'intégration d'électrodes a permis le développement de nombreuses branches de la microfluidique utilisant par exemple les flux électro-osmotiques, l'électroporation [Fox 2006] ou l'électrochimie [Erickson 2004]

L'intégration de résistances dans des dispositifs microfluidiques permet aussi de fabriquer des éléments de chauffe et de mesure de température locales. Cette intégration permet de tirer parti de la rapidité des transferts thermiques aux petites échelles et ainsi de développer des outils permettant de répondre à des questions scientifiques nécessitant des variations de température rapides.

Dans ce chapitre nous allons donner un bref aperçu des différents types de transferts thermiques et de leur influence respective dans des dispositifs microfluidiques. Par la suite nous détaillerons les différentes solutions existant pour intégrer des éléments de contrôle et de mesure de température dans un microsystème. Nous détaillerons également les différentes méthodes, intégrées ou non, utilisées par les biologistes pour contrôler la température de leur expérience. Enfin nous exposerons les technologies disponibles pour la fabrication de dispositifs microfluidiques et les principes de mesures physiques utilisés dans cette thèse pour la mesure de température dans un microcanal.

1.1 Propriétés thermiques à l'échelle micrométrique

Aux échelles micrométriques les relations fondamentales régissant les transferts thermiques restent inchangées. En effet les lois de Fourier sont valables pour des échelles de longueur grandes devant le libre parcours moyen des atomes. Pour un gaz dans les conditions normales de température et de pression (cntp) le libre parcours moyen est d'environ 40 nm et de quelques nanomètres pour un liquide. Ainsi en microfluidique l'équation de la chaleur (1.1) qui permet de calculer la distribution de la température dans un milieu en tout point et à tout moment reste inchangée.

$$\frac{\partial T(x,t)}{\partial t} = \alpha \Delta T(x,t) + \frac{\dot{q}}{\rho C} \quad (1.1)$$

Avec,

T	: Température (K)
t	: Temps (s)
α	: Diffusivité thermique (m ² /s)
Δ	: Opérateur Laplacien
\dot{q}	: Génération volumique d'énergie (W/m ³)
ρ	: Densité (Kg/m ³)
C	: Capacité calorifique (J/Kg.K)

La principale différence entre la thermique macroscopique et la thermique aux micro échelles se situe dans les temps caractéristiques des transferts thermiques. La constante de temps d'un système thermique caractérise le temps que met le système pour se stabiliser en température après une perturbation. Comme le système tend asymptotiquement vers son nouvel état, il ne l'atteint jamais. Néanmoins la constante de temps donne un ordre de grandeur de la vitesse de réactivité du système.

Afin de pouvoir estimer le temps de réponse du système, il convient de comprendre quels sont les types de transferts thermiques prédominant dans le système. Les transferts de chaleur peuvent se faire de trois manières différentes, par rayonnement, par convection et par conduction. Nous allons brièvement décrire ces trois types de transfert thermique et les équations qui les régissent en régime permanent.

1.1.1 Les transferts thermiques radiatifs

Lorsqu'un corps est à une température supérieure à 0K il émet des radiations électromagnétiques et il en reçoit des autres corps environnants en fonction de leurs températures respectives. Il existe donc un transfert thermique d'origine radiative entre deux corps à des températures différentes. C'est le seul mode de transfert thermique qui peut s'opérer dans le vide. Pour un corps gris (émissivité indépendante de la longueur d'onde) isotrope le flux thermique radiatif est décrit par l'équation (1.2):

$$q_{rad} = \varepsilon A \sigma (T_S^4 - T_{ext}^4) \quad (1.2)$$

Avec,

- q_{rad} : Flux thermique radiatif (W)
- ε : Emissivité, représente l'efficacité d'émission de la surface comparée à un corps noir.
- A : Aire de la surface émettrice (m²)
- σ : Constante de Stephan-Boltzmann (W/m².K⁴)
- T_S : Température de la surface étudiée (K)
- T_{ext} : Température des surfaces extérieure (K)

Le rayonnement ne devenant prépondérant qu'à haute température (plusieurs centaines de degrés Celsius) dans la plupart des applications microfluidiques les échanges d'énergie par rayonnement peuvent la plupart du temps être négligés.

1.1.2 Les transferts thermiques conductifs.

Ce transfert représente le transfert d'énergie par les particules élémentaires (atomes, phonons, électrons...). Les transferts thermiques conductifs sont la somme de toutes ces contributions.

Dans un conducteur électrique les électrons peuvent circuler librement dans tout le matériau. Le déplacement libre de ces électrons est un très bon moyen de transport d'énergie thermique, ce qui explique la grande conductivité thermique des métaux.

A cela s'ajoute la possibilité de propagation dans la matière, particulièrement dans les cristaux, d'ondes acoustiques appelées phonons qui améliorent les transferts thermiques.

Toutes ces contributions aux transferts thermiques, qui sont particulières à chaque matériau, sont regroupées dans une même grandeur appelée « conductivité thermique », notée k , qui représente la faculté d'un matériau à transmettre la chaleur par conduction. L'équation (1.3), issue de l'équation de Fourier, exprime le flux thermique conductif entre deux points ayant des températures différentes :

$$q_{cond} = kS \frac{\Delta T}{L} \quad (1.3)$$

Avec,

- q_{cond} : Flux thermique conductif (W)
- k : Conductivité thermique (W/m.K)
- S : Surface de contact (m²)
- ΔT : La différence de température entre les deux surfaces (K)
- L : La distance entre les deux surfaces (L)

Les transferts conductifs apparaissent lorsqu'il existe une différence de température dans un milieu. Les transferts thermiques conductifs sont plus efficaces dans les solides ou les liquides que dans les gaz. De la même manière le type de matériau est important : ainsi les bons conducteurs électriques sont généralement d'excellents conducteurs thermiques. Généralement les transferts conductifs ne peuvent pas être négligés dans les dispositifs microfluidiques et sont même souvent le transfert énergétique prédominant.

L'efficacité du transfert conductif dépend du coefficient de conduction thermique k que l'on retrouve dans l'équation précédente. La table (1.1) donne quelques valeurs de coefficients de conduction caractéristiques qui permettront de calculer l'ordre de grandeur de la contribution du transfert conductif dans un cas particulier.

Matériaux	k (W/m.K) à 300°K
Air ¹	0.0263
PDMS ²	0.15
SU8 ³	0.2
Ethylène glycol ¹	0.252
Eau ¹	0.61
Silice fondu (verre) ¹	1.38
Quartz ¹	6.21/10.4
Platinum ¹	133
Silicium ¹	148

Table 1.1 : Conductivité thermique des matériaux utilisés dans nos recherches

¹ [Frank P. Incropera 2002]

² [<http://web.mit.edu/6.777/www/matprops/pdms.htm>]

³ [<http://www.mit.edu/~6.777/matprops/su-8.htm>]

Considérant uniquement la contribution de la conduction thermique, le temps nécessaire pour atteindre des conditions isothermes diminue avec le carré de la taille du système. En d'autres termes, un système avec une taille caractéristique 10 fois plus petite changera de température 100 fois plus vite. Ceci illustre bien l'avantage de la miniaturisation pour fabriquer des outils ayant une réponse thermique rapide.

Pour avoir une estimation grossière du temps de diffusion caractéristique d'un système nous pouvons utiliser l'équation (1.4) :

$$t_{cond} = \frac{L^2}{\alpha} \quad (1.4)$$

Avec,

- t_{cond} : Temps de diffusion caractéristique (s)
- L : Distance caractéristique (m)
- α : Diffusivité thermique (coefficient de diffusion thermique) (m^2/s)

Le temps de transfert conductif dépend du coefficient α que l'on retrouve dans l'équation (1.4). La table (1.2) donne les coefficients de diffusion pour les matériaux utilisés en microfluidique et l'ordre de grandeur des temps caractéristiques des transferts conductif pour des distances caractéristiques de 1 μm et de 100 μm .

Matériaux	α (m^2/s) à 300°K $\times 10^6$	Temps pour L= 100 μm	Temps pour L=1 μm
PDMS ²	0.105	95 ms	9.5 μs
Eau ¹	0.146	68 ms	6.8 μs
Silice fondu (verre)	0.834	12 ms	1.2 μs
Ethylène glycol ¹	0.939	10 ms	1 μs
Air ¹	22.5	0.44 ms	44 ns
Platinum ¹	25.1	0.39 ms	39 ns
Silicium ¹	89.2	0.11 ms	11 ns

Table 1.2 : Diffusivité et temps caractéristique de diffusion pour des matériaux utilisés dans nos recherches. ¹ [Frank P. Incropera 2002] ² [web.mit.edu/6.777/www/matprops/pdms.htm]

1.1.3 Les transferts thermiques convectifs.

Les transferts thermiques par convection désignent les transferts par mouvement de masse. La convection représente le transfert de matière à l'échelle macroscopique. Les transferts thermiques convectifs apparaissent dès qu'un fluide est en mouvement à l'intérieur ou aux limites d'un système. Ils peuvent apparaître naturellement car une différence de température dans un fluide produit une différence de densité. Cette dernière produira un mouvement de fluide car sous l'action de la gravité terrestre le fluide chaud, plus léger, s'élèvera et le fluide froid descendra. Ce phénomène est appelé convection naturelle.

Un autre phénomène, appelé convection forcée apparaît lorsqu'un fluide est mis en mouvement par un moyen extérieur (pompe, différence de pression,...) De manière générale, plus le fluide a un mouvement rapide, plus le transfert de chaleur est efficace. D'autre part les mouvements de liquides sont plus efficaces que les mouvements de gaz. De manière générale, les transferts convectifs forcés ne peuvent pas être négligés dans les dispositifs microfluidiques et sont souvent le transfert énergétique prédominant lorsque des liquides sont en mouvement.

L'efficacité du transfert convectif entre un fluide et une paroi est synthétisée dans le coefficient de convection h que l'on retrouve dans l'équation (1.5). Celle ci donne le flux énergétique échangé entre une paroi et un fluide en mouvement :

$$q = hS(T_{\infty} - T_s) \quad (1.5)$$

Avec,

- q : Flux thermique convectif (W)
- h : Coefficient de convection ($\text{W}/\text{m}^2 \cdot \text{K}$)
- S : Surface (m^2)
- T_{∞} : Température du fluide (K)
- T_s : Température de la surface (K)

La température du fluide est notée T_{∞} , car nous prenons donc comme référence la température du fluide à l'infini. Un fluide en mouvement sur une surface immobile développe un profil de vitesse dit « de Poiseuille ». Le fluide est à l'arrêt au contact de la surface immobile et sa vitesse augmente au fur et à mesure que l'on s'éloigne. La figure (1.1) illustre bien le phénomène dans le cas d'un tube :



Figure 1.1 : Ecoulement de Poiseuille dans un canal
[www.biochimie.univ-montp2.fr/deug/viscosite]

Le fluide au contact de la surface étant à l'arrêt, il n'y a pas de convection dans cette zone. Les transferts thermiques se font uniquement par conduction jusqu'à atteindre la zone où la vitesse du fluide devient non négligeable. C'est ce que nous appelons de façon plus précise « le transfert conducto-convectif ». Ce phénomène est important en microfluidique car les surfaces ne sont séparées que par quelques dizaines de microns.

La table (1.3) donne quelques valeurs de coefficients de convection caractéristiques qui permettront de calculer l'ordre de grandeur de la contribution du transfert convectif dans un cas particulier.

Situation	h ($\text{W}/\text{m}^2 \cdot \text{K}$)
Convection naturelle : gaz	2-25
Convection naturelle : liquides	50-1000
Convection forcée : gaz	25-250
Convection forcée : liquides	100-20 000
Convection forcée avec changement de phase	2500-100 000

Table 1.3 : Ordre de grandeur de coefficient de convection typique
[Frank P. Incropera 2002]

Considérons maintenant uniquement la contribution de la convection thermique. Si nous prenons l'exemple d'une barre métallique plongée dans un bain à une température différente de cette dernière. Si nous considérons le cas où la température dans la barre est homogène en tous points (conductivité infinie ou $t_{conv} \gg t_{cond}$), la barre échange de l'énergie avec le bain par transfert conducto-convectif. Pour avoir une estimation grossière du temps de convection caractéristique de ce système nous pouvons utiliser l'équation (1.6) [Taine 2003]

$$t_{conv} = \frac{\rho CL}{2h} \quad (1.6)$$

Avec,

- t_{conv} : Temps convectif caractéristique (s)
- ρ : Densité (Kg/m³)
- C : Capacité calorifique (J/K/s)
- L : Distance caractéristique (m)
- h : Coefficient de convection (W/m².K)

Un troisième type de transfert thermique convectif, qui n'a pas été utilisé dans cette thèse, est appelé transfert convectif forcé avec changement de phase. Il apparaît lorsque le fluide caloporteur change de phase, que ce soit par condensation ou par évaporation. Quand il est mis en œuvre c'est généralement le mode de transfert convectif le plus efficace.

1.2 Solutions technologiques pour la mesure de température

Plusieurs choix technologiques sont possibles pour l'intégration d'éléments de mesure de température et de chauffe. Les technologies issues de l'industrie de la microélectronique utilisant des dépôts de couches minces sont bien adaptées à cet usage. Les principales méthodes de mesure de température utilisées en microfluidiques sont présentées ci-dessous.

1.2.1 Les thermocouples

Les thermocouples s'utilisent en paires, une différence de température entre les deux couches de matériaux choisis produit une différence de potentiel, c'est « l'effet Seebeck ». En mesurant la tension aux bornes du thermocouple, il est donc possible de déduire la différence de température entre les deux couches. Il est donc nécessaire de maintenir une des couches à une température donnée pour connaître la température de l'autre. Les thermocouples sont assez peu utilisés en microfluidique, on les trouve généralement sous forme de milli-thermocouples commerciaux placés manuellement dans le dispositif.

1.2.2 Les couches minces métalliques : Les RTD

Les résistances dépendantes en température (RTD), sont des résistances métalliques dont la résistance électrique augmente avec la température. Cette augmentation de résistance électrique est principalement due aux collisions électrons/phonons. Il est donc possible de déduire la température du métal en effectuant une mesure de résistance électrique. Les dépôts de couches minces métalliques sont bien maîtrisés sur tous les substrats utilisés en microfabrication, l'intégration de RTD est donc aisée dans les microsystèmes. De plus dans le cas du platine, par exemple, la dépendance de la résistance avec la température est presque linéaire dans les gammes de température utilisées en microfluidique.

1.2.3 Les couches minces d'oxyde métalliques ou de semi-conducteurs : Les thermistances

Assez proche des RTD dans le fait que leur résistance électrique varie avec la température, les thermistances sont généralement constituées d'oxydes métalliques ou de semi-conducteurs. Elles ont généralement une variation en température plus élevée que les RTD ce qui leur donne une meilleure précision que ces dernières. Les dépôts de couches minces de ces matériaux sont bien maîtrisés mais pour l'instant rarement intégrés dans les dispositifs microfluidiques, principalement en raison de leur variation en température hautement non linéaire. [Lekas]

1.2.4 Les couche mince d'ITO

Composé d'un mélange d'oxyde d'indium et d'oxyde d'étain, l'ITO est un conducteur électrique dont la résistance varie avec la température. Il se dépose en couche mince et commence à être utilisé dans quelques applications microfluidiques pour la mesure de température. Son principal avantage est sa transparence une fois sous forme de couche mince, ce qui permet l'observation au microscope de la zone où l'on mesure la température. [Sun 2002] Associé avec une couche d'oxyde d'antimoine et d'étain (ATO) l'ITO forme un thermocouple transparent. [Kreider 1991]

1.2.5 Les marqueurs fluorescents

Il est également possible de mesurer la température à l'intérieur d'un canal microfluidique en injectant dans celui-ci un marqueur dont l'intensité de fluorescence varie avec la température (Figure 1.2). Des recherches sur la Rhodamine B, ont montré une résolution en température de l'ordre du degré Kelvin [Ross 2001.] et des résolutions spatiales inférieures au micron [Ebert 2007] [Arata 2005]. Néanmoins l'addition de rhodamine dans le liquide contenu dans le microcanal est une méthode qui peut être considérée comme trop intrusive pour beaucoup d'applications microfluidiques.

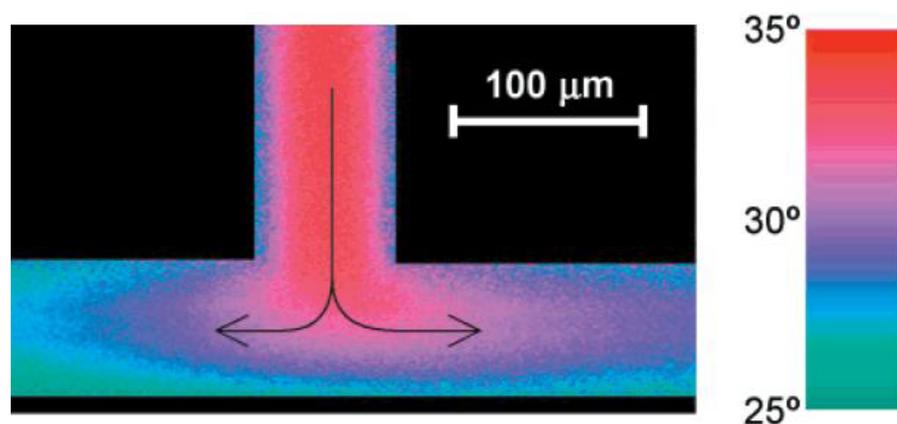


Figure 1.2 : Image en fausse couleur de la distribution de température d'un micro canal. Les couleurs sont calculées en fonction de la fluorescence de la rhodamine [Ross 2001]

1.2.6 Les caméras infrarouges

L'utilisation de caméras infrarouges équipées d'objectifs spécifiques est un moyen externe non intrusif pour effectuer des mesures de température dans les microcanaux (Figure

1.3). Cette méthode permet d'atteindre une précision de l'ordre du degré Kelvin, une résolution spatiale submicronique [Conseil 2005] et une résolution temporelle de 2 ms. [www.mikroninfrared.com] Néanmoins l'utilisation de cameras infrarouges nécessite une parfaite connaissance des caractéristiques d'absorption et d'émission des matériaux constituant le dispositif microfluidique et demande souvent un traitement lourd de l'information reçue.

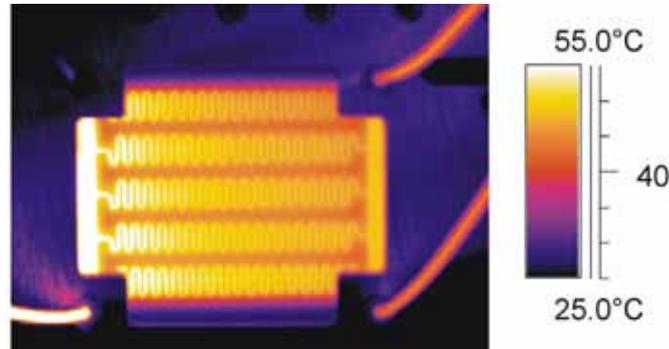


Figure 1.3 : Image infrarouge d'un micro échangeur thermique. [Möllmann 2004]

1.3 Solutions technologiques pour les éléments de chauffe et de refroidissement

1.3.1 Les Couches minces métalliques

Les couches minces métalliques peuvent aussi être utilisées en tant qu'élément chauffant. Le passage d'un courant électrique provoque un effet Joule dans le métal, ce phénomène autorise des changements de température très rapides de l'ordre de la milliseconde. Comme décrit précédemment, les dépôts de couches minces métalliques sont très bien maîtrisés grâce aux recherches menées pour l'industrie microélectronique.

1.3.2 Couche mince d'ITO

A l'instar des couches métalliques, le passage d'un courant électrique dans un film d'ITO provoque un effet Joule. De surcroît, les éléments de chauffe en ITO sont transparents dans le visible. Comme pour les métaux, les temps caractéristiques de changement de température des pistes sont de l'ordre de la milliseconde.

1.3.3 Injection de fluide à différentes températures

Il est également possible d'utiliser les liquides circulant dans des canaux microfluidiques pour contrôler la température dans le dispositif. La circulation de liquide à température contrôlée dans les canaux permet de contrôler la température des canaux adjacents. [Casquillas 2008] En raison des constantes de temps fluidiques, les temps caractéristiques de changement de température sont de l'ordre de la seconde. Les écoulements laminaires en microfluidique permettent également de créer de forts gradients de température au sein d'un même microcanal (Figure 1.4). Pour cela il suffit de contrôler précisément le débit de deux fluides entrants à des températures différentes. [Lucchetta 2005]

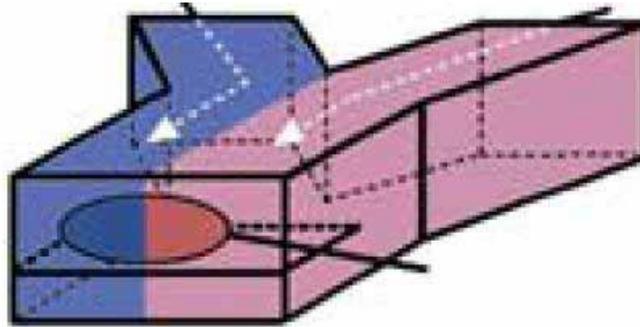


Figure 1.4 : Deux fluides à des températures différentes injectés dans un même microcanal circulent en parallèle et permettent de créer un fort gradient de température à l'intérieur du canal. [Lucchetta 2005]

1.3.4 Microcaloducs

Les microcaloducs sont des systèmes de refroidissement passifs. Une source de chaleur produit un mouvement de convection naturelle et un changement de phase du liquide contenu dans un canal proche de la source de chaleur. L'énergie nécessaire au changement de phase du liquide refroidit la source de chaleur puis est dissipée à l'extérieur du système lors de la condensation du fluide dans un dissipateur. La figure 1.5 donne une illustration du principe de fonctionnement d'un caloduc :

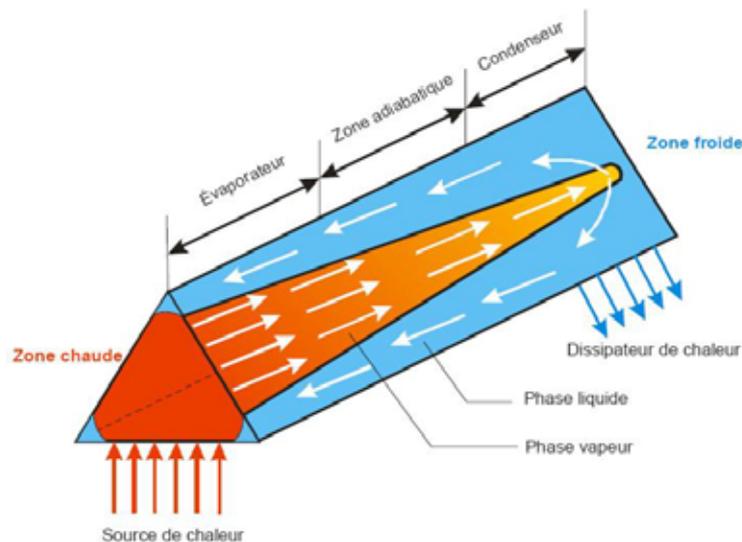


Figure 1.5 : Schémas de principe d'un microcaloduc. [Palm 2006]

1.3.5 Micro Peltier

L'effet Peltier, découvert en 1884, est un phénomène physique qui génère une différence de température aux bornes d'un assemblage d'éléments semi conducteurs lorsque l'on applique une tension à ses bornes. Les éléments Peltier fonctionnent comme des pompes à chaleur. Des micro et milli éléments Peltier commencent à être intégrés en tant qu'élément de contrôle de température dans des dispositifs microfluidiques [George Maltezos 2005]. Ils ont l'énorme avantage de pouvoir être utilisés comme éléments de chauffe et de

refroidissement. Comme le montre la figure 1.6 les plus petit d'entres eux peuvent mesurer moins de 1 mm².



Figure 1.6 : Micropeltier sur un mécanisme de montre et sur une pièce de 1 centime d'Euros [micropelt.com]

1.3.6 Autres : Laser et réaction chimique

L'utilisation de laser comme méthode de chauffe ponctuelle est parfois utilisée en microfluidique mais reste cantonnée à des applications spécifiques comme les micropompes. [Liu 2005] De récentes recherches ont également validé le concept de contrôle de la température dans un dispositif microfluidique en pratiquant des réactions chimiques endothermiques ou exothermiques dans un canal proche du canal dont on veut contrôler la température. [Guijt 2003] Il est aussi possible de contrôler la température dans un dispositif microfluidique en utilisant l'effet Joule produit par un courant électrique dans un liquide ionique. [Mello 2004]

1.4 : Méthodes de contrôles de température pour la biologie cellulaire

1.4.1 introduction

Les système de mesure et de contrôle de température aux échelles micrométriques permettent de modifier la température très rapidement et de manière locale. De nombreuses applications sont envisageables pour ce type de microsystème notamment dans le domaine de la biologie cellulaire. Dans le cadre de notre projet nous avons utilisé une technologie verre/PDMS pour fabriquer un contrôle de température appliqué à la biologie cellulaire sur puce. En utilisant cette technologie nous avons mis au point un dispositifs de contrôle de température pour l'étude du cytosquelette de levure *S.pombe*. Ce dispositif de contrôle de température utilise la circulation de liquide dans le dispositif pour modifier la température dans ce dernier. Son principe de fonctionnement découle d'une étude que nous avons effectuée précédemment sur les performances de canaux de refroidissements intégrés pour le contrôle de température d'une réaction de PCR sur puce. [Cf. annexe C]

Ces deux dernières décennies de nombreuses recherches ont été menées en microfluidique afin de fabriquer des outils de recherche pour la biologie. Les premiers dispositifs, fabriqués en silicium, étaient peu adaptés aux contraintes des applications biologiques. Le développement des technologies à base de moulage de polymère a permis un nouvel essor des applications de la microfluidique pour la biologie, principalement par le biais des laboratoires sur puce (Labs-On-Chip) (Figure 1.7). Le but des laboratoires sur puce est

d'intégrer tous les éléments nécessaires à une analyse biologique donnée dans une seule puce. Le développement des « Lab-On-Chip » devrait permettre à terme de réduire considérablement les équipements et la main d'œuvre nécessaire pour effectuer une analyse clinique.

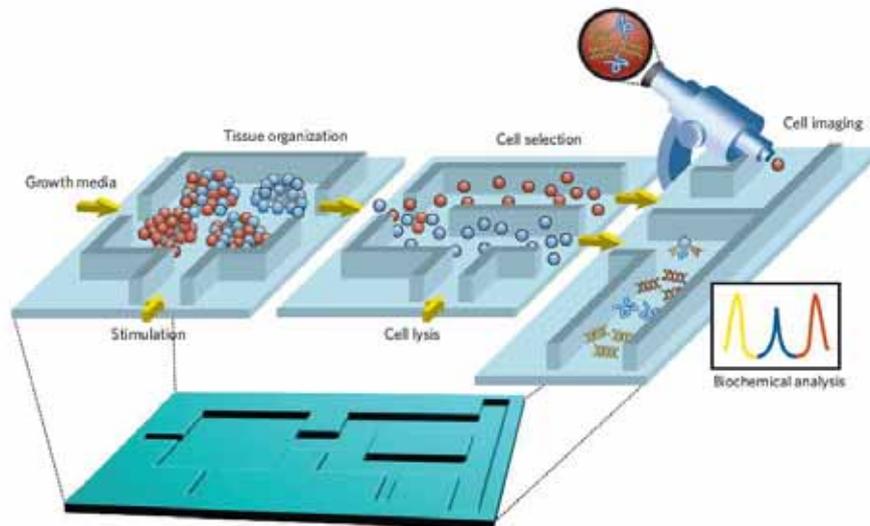


Figure 1.7 : Schéma de principe d'un laboratoire sur puce permettant d'effectuer sur la même puce, une culture cellulaire, une sélection des cellules, une lyse cellulaire et une analyse des cellules sélectionnées. [Jamil El-Ali 2006]

La microfluidique présente de nombreux aspects positifs pour les applications biologiques. Elle autorise une forte parallélisation des expériences ainsi que le contrôle et la mesure simultanée de nombreux paramètres comme la température ou la composition du milieu. Elle permet également de répondre à des questions scientifiques spécifiques comme dans le cas d'expérimentations menées sur une cellule ou une molécule unique. Les applications de la microfluidique en biologie cellulaire sont nombreuses (Figure 1.8), nous pouvons citer entre autre : le tri de cellules, le suivi de lignées cellulaires ou l'étude de la réaction des cellules au stress mécanique.



Figure 1.8 : Des levures S.pombe emprisonnées et déformées dans un canal microfluidique en forme de serpent. [Terenna 2008]

La microfluidique a également trouvé de nombreux débouchés dans le cadre de la biologie moléculaire. Les applications les plus connues de la microfluidique dans ce domaine sont les immuno-essais, la micro PCR et la cristallisation de protéines (Figure 1.9).

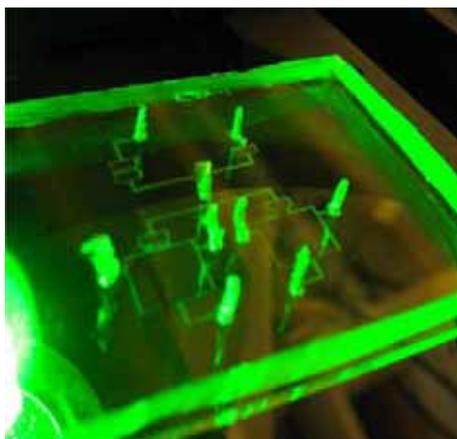


Figure 1.9 : Dispositif de cristallisation de protéines. [M. Lounaci, 2006]

La température est un paramètre crucial à contrôler dans le cadre d'expériences de biologie sur puce. Que ce soit pour maintenir en vie les cultures cellulaires ou pour effectuer des réactions de biochimie dans les conditions optimales. De multiples méthodes de contrôle de température ont été mises au point pour répondre aux besoins des biologistes dans ce domaine.

1.4.2 Contrôles de température pour la biologie : Solutions externes

La plupart des méthodes de contrôle de température présentées dans ce chapitre ont été développées pour répondre aux exigences liées à l'expérimentation biologique sur les cellules de mammifères. Cet important domaine de recherche nécessite un contrôle de la composition et de la température du milieu ambiant reproduisant les conditions physiologiques propres aux mammifères afin de maintenir les cellules en bon état au cours de l'expérience. Le contrôle de température de l'expérience peut être réalisé par des moyens externes. Il est ainsi possible de changer la température de la pièce entière ou plus couramment d'enfermer le microscope dans une boîte d'incubation contrôlée en température (Figure 1.10). Ces méthodes répondent très bien aux exigences des biologistes n'ayant pas besoin de faire varier rapidement la température de leurs expériences au cours du temps. Par contre ces méthodes de contrôle de température macroscopique ont des temps de réponse de plusieurs dizaines de minutes en raison de la grande taille du système. Ce type d'équipement est conçu pour obtenir une température précise sur des temps d'expériences longs pouvant atteindre plusieurs jours.



Figure 1.10 : Boîte d'incubation montée sur un microscope [www.solentsci.com]

Pour obtenir des changements de température plus rapides, la méthode la plus simple est de réduire le volume à thermaliser. En utilisant une platine de microscope modifiée il est possible de ne contrôler en température que la boîte de pétri contenant les cellules. Pour cela la boîte de pétri, positionnée sur une platine de microscope contrôlé en température (Figure 1.11). La température de cette dernière peut être modifiée par effet Joule, par circulation de liquide ou à l'aide de module Peltier. Cette méthode ne permet pas de changement de température rapide (quelques degrés Celsius par minute) en raison de la faible conductivité thermique du plastique de la boîte de pétri et de la distance entre l'élément chauffant et le centre de la boîte de pétri. Ce type de contrôle de température provoque généralement des gradients de température de plusieurs degrés entre la périphérie et le centre de la boîte de pétri. [Bioptechs.com]

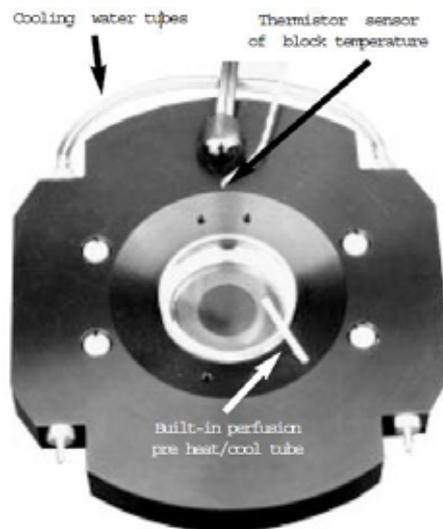


Figure 1.11 : Boîte de pétri entourée d'une platine de microscope contrôlée en température. [Ala Scientific instrument Inc, modèle HCMIS]

Il existe également des systèmes beaucoup plus onéreux utilisant des boîtes de pétri chauffantes. Le fond de la boîte de pétri est dans ce cas constitué d'une lamelle de verre recouverte d'une couche mince résistive d'oxyde d'étain et d'indium (ITO). Il est ainsi possible de contrôler la température du fond de la boîte de pétri et du milieu environnant en ajustant le courant circulant dans la couche d'ITO (Figure 1.12). Ce type de système ne permet pas de descendre en dessous de la température ambiante mais permet d'atteindre des changements de température de l'ordre de 5°C/min et des écarts de température à l'échelle de la boîte de pétri inférieures à 1°C. [bioptechs.com] Ce type de système existe en configuration ouverte, avec la surface supérieure de l'échantillon en contact avec l'air ambiant ou sous forme de système fermé avec des micro aqueduc intégrés qui permettent de changer le milieu de culture à l'intérieur de l'enceinte sans l'ouvrir. Les systèmes fermés, plus complexes que les systèmes ouverts, permettent d'éviter l'évaporation du médium de culture et d'uniformiser la température de l'échantillon.



Figure 1.12 : Système de contrôle de température utilisant des boîtes de pétri chauffantes.
Gauche : système ouvert Droite : système fermé [bioptechs.com]

Il est également possible d'utiliser un module Peltier percé en son centre directement sous la boîte de pétri pour en contrôler la température de cette dernière (Figure 1.13). Ce système permet d'atteindre des vitesses de changement de température de l'ordre du degré par seconde. [Gorjánác 2007] Néanmoins cette méthode n'est pas très répandue et présente une incertitude sur la température au niveau du trou pratiqué dans le module Peltier pour permettre l'observation de l'échantillon au microscope.

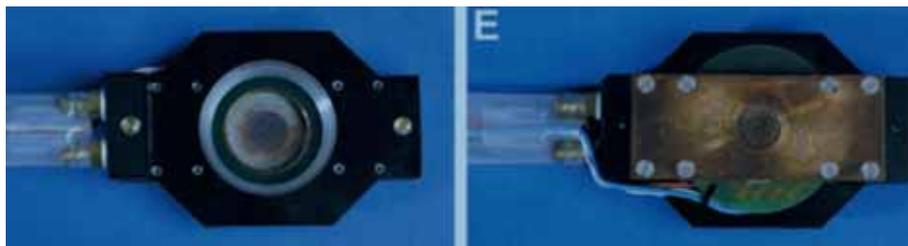


Figure 1.13 : Boîte de pétri contrôlé en température par un module Peltier [Gorjánác 2007]

Toutes ces méthodes de contrôle de température nécessitent une bonne connaissance du système car de forts gradients de température peuvent apparaître dans l'échantillon. Lorsque l'expérience nécessite de l'imagerie en haute résolution utilisant des objectifs à immersion le gradient de température peut atteindre 10°C sur les quelques millimètres autour du point de contact avec l'objectif [Warner : Application Fundamentals]. En effet, l'objectif agit comme un pont thermique et provoque un gradient de température au point de contact avec l'échantillon. Pour résoudre ce problème il est possible d'égaliser la température de l'objectif avec celle de l'échantillon en utilisant des colliers d'objectifs contrôlés en température (Figure 1.14).



Figure 1.14 : Gauche : Objectif de microscope contrôlé en température par effet joule [Warner 2006] Droite : Collier pour objectif de microscope utilisant un circulateur d'eau. Contrairement à celui utilisant l'effet joule, ce collier permet de descendre en dessous de la température ambiante [bioptechs.com].

1.4.3 Contrôles de température pour la biologie : Solutions intégrées

Afin d'augmenter la vitesse des transferts thermiques et l'uniformité de la température de l'échantillon, il est possible d'utiliser un dispositif microfluidique avec un contrôle de température intégré. Cette intégration permet de surcroît de profiter de toutes les fonctionnalités apportées par la microfluidique. (Vannes, stress mécanique, contrôle du milieu, parallélisation...) De nombreuses recherches ont été effectuées dans ce domaine et plusieurs méthodes existent pour contrôler la température dans un dispositif microfluidique.

De nombreux dispositifs micro fluidiques intégrant un contrôle de température à base de microélectrodes ont été proposés pour des applications spécifiques en biologie cellulaire et moléculaire (Figure 1.15). [Hung, 2005] L'intégration par dépôt de couches minces de microélectrodes de chauffe et de mesure sur un substrat permet d'obtenir des changements de températures de l'ordre de plusieurs dizaines de degrés par seconde mais ne permet pas de travailler en dessous de la température ambiante. [Velve Casquillas 2006] Cette méthode de fabrication utilise des technologies lourdes nécessitant une salle blanche ce qui augmente grandement le coût de fabrication de ce type de dispositif.

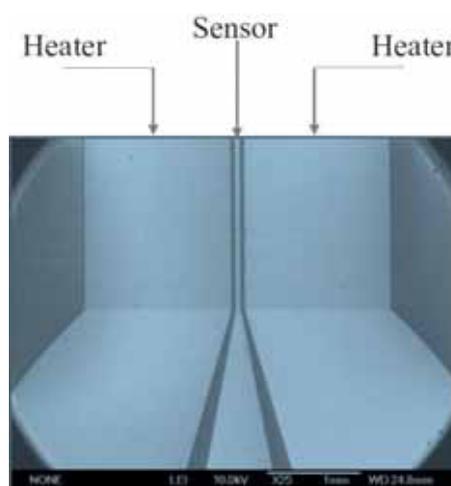


Figure 1.15 : Couche mince de platine déposée sur du verre pour le contrôle de température d'un dispositif de RT-PCR [Liao 2005]

Une autre méthode consiste à utiliser la circulation de liquide contrôlée en température dans des micro canaux. Cette méthode a par exemple permis d'étudier un œuf de drosophile placé dans un microcanal en PDMS et soumis simultanément à deux flux d'eau à des températures différentes [Lucchetta 2005]. Les écoulements laminaires des liquides dans les micro canaux, limitent le mélange des deux liquides et permettent d'obtenir de forts gradients de température à l'interface entre les deux liquides (Figure 1.16). Cette méthode a permis d'étudier l'influence de la température sur différentes parties du même œuf simultanément.

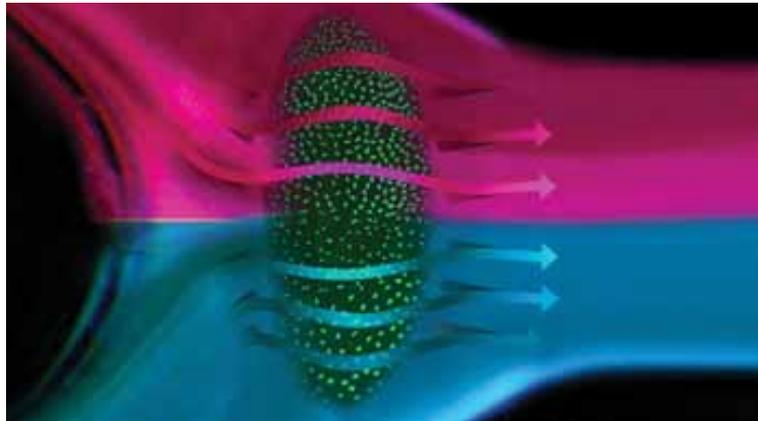


Figure 1.16 : Œuf de drosophile attaché dans un canal microfluidique soumis à deux flux de liquide à deux températures différentes. [Lucchetta 2005]

Une autre étude [Groisman, 2005] décrit un chemostat intégré permettant de contrôler la température dans une chambre microfluidique en faisant circuler de l'eau à 37°C dans une série de canaux moulés dans une couche collée au dessus de la chambre d'étude. Ces recherches ont démontrées la viabilité de l'utilisation de multicouches PDMS pour contrôler la température d'un échantillon à l'aide de liquide circulant dans des canaux surplombant les chambre de culture (Figure 1.17). Néanmoins ces recherches ne tirent pas parti de la rapidité des transferts thermiques entre deux couches de PDMS pour changer rapidement la température de l'échantillon.

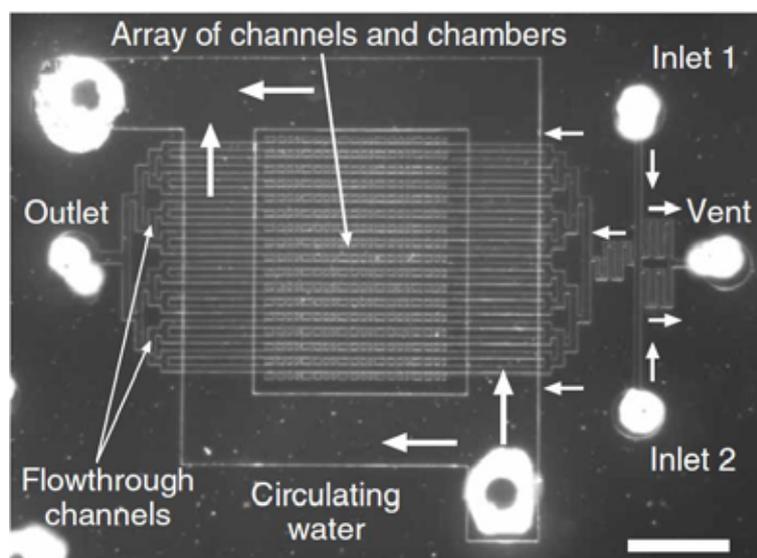


Figure 1.17 : Microphotographie du chemostat proposé par [Groisman, 2005]

1.5 Matériaux et technologies disponibles

Beaucoup de recherches ont été menées pour permettre d'effectuer des expériences de chimie et de biologie dans des dispositifs microfluidiques. [El-Ali 2006] Le choix du substrat est d'une grande importance en raison des possibilités offertes par les propriétés mécaniques et chimiques du matériau et des technologies compatibles avec ce dernier. La survie des cultures cellulaires requiert des conditions spécifiques, que se soit en terme de renouvellement des milieux de cultures ou des propriétés chimiques des surfaces en contact. De même en biologie moléculaire les problèmes liés aux propriétés de surface du dispositif microfluidique ont une grande importance. En effet, dans les dispositifs micro fluidiques l'absorption des molécules sur les surfaces du dispositif devient non négligeable en raison du rapport surface sur volume élevé inhérent aux microsystèmes. [Tabeling 2003]

Le premier matériau utilisé pour la fabrication de dispositifs microfluidiques est le silicium. Ce dernier bénéficie, grâce aux recherches en microélectronique, d'un éventail de technologies très complet et bien contrôlé. Le silicium permet d'obtenir des propriétés de surface contrôlées au niveau atomique et profite d'une large gamme de traitement de surface susceptible de modifier ses propriétés. Néanmoins, les problèmes d'étanchéité, l'opacité du silicium dans le visible et la lourdeur des installations et des procédés technologiques nécessaires à la fabrication de micro systèmes en silicium en font un matériau de moins en moins utilisé pour les applications biologiques.

Les oxydes de silicium (verre, quartz...) ont profité de la majorité des développements technologiques du silicium. Ainsi une grande partie des étapes de dépôt et de collage de la filière silicium ont été adaptées aux oxydes de silicium (Figure 1.18). Leurs propriétés de surface sont également bien contrôlées et de nombreux traitements chimiques ou physiques permettent de les modifier. Les technologies sur oxydes de silice sont également lourdes et les problèmes d'étanchéité et de scellement des dispositifs restent importants. Toutefois la transparence dans le visible de ces matériaux en font une bonne alternative au silicium.

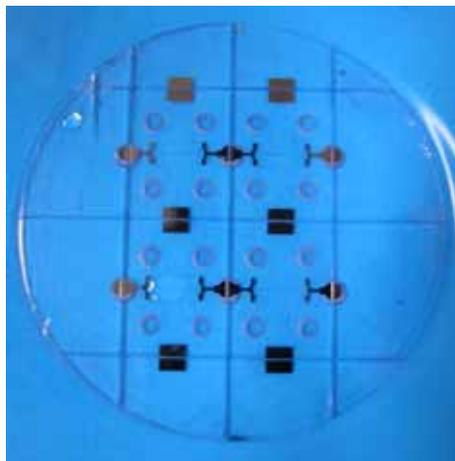


Figure 1.18 : Dispositif verre/verre intégrant des électrodes pour le contrôle du flux dans les microcanaux. [Pleicis 2008]

Les technologies couplant le verre et le PDMS présentent de nombreux avantages. La possibilité de coller de manière covalente un bloc de PDMS sur un substrat en verre permet de profiter des atouts des deux technologies. Ainsi il est possible de profiter des technologies disponibles sur les oxydes de silicium et des propriétés mécaniques du PDMS. Le PDMS permet la fabrication de dispositifs multicouches incluant des vannes par simple moulage

(Figure 1.19). [Quake 2000] L'élasticité du PDMS et la forte adhésion entre le verre et le PDMS permettent de résoudre facilement les problèmes d'étanchéité des dispositifs. Néanmoins le PDMS a deux défauts majeurs dus à ses propriétés de surface. Tout d'abord, en raison de sa faible énergie de surface, les dépôts de métaux et de diélectrique, nécessaires à l'intégration d'éléments de chauffe et de mesure, n'adhèrent pas sur le PDMS. Ces dépôts de couches minces peuvent cependant être directement effectués sur la lamelle de verre. De plus les propriétés de surface du PDMS sont difficiles à contrôler car les molécules de PDMS sont constamment en mouvement les unes par rapport aux autres. Néanmoins de nombreuses méthodes de fonctionnalisation de surface ont été mises au point afin de contrôler les propriétés de surface du PDMS. Cette technologie a connu un grand succès et les dispositifs à base de verre et de PDMS sont pour l'instant ceux qui concentrent la majorité des recherches pour les applications biologiques.

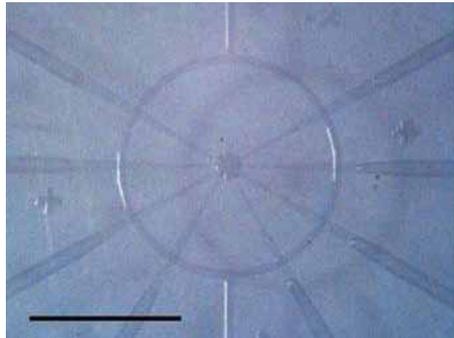


Figure 1.19 : Pompe péristaltique utilisant une technologie bicouche de PDMS [quake 2000].

La possibilité de fabriquer des dispositifs microfluidiques avec d'autres polymères que le PDMS a aussi été beaucoup étudiée. Chacun d'entre eux ayant des particularités susceptibles d'être plus adaptées à une application donnée. Néanmoins, aucun d'entre eux n'a trouvé un spectre d'applications aussi large que le PDMS dans le cadre de la biologie sur puce. Les recherches les plus abouties concernent le PMMA (Figure 1.20). Ce dernier a l'avantage d'avoir une surface mieux contrôlée que le PDMS, de ne pas être perméable à la vapeur d'eau et surtout d'être compatible avec certaines méthodes de dépôts de métaux et de diélectrique. Néanmoins un soin particulier doit être apporté pour obtenir une bonne étanchéité entre les connectiques fluidiques et le PMMA. D'autre part sa rigidité complexifie l'intégration de vannes.

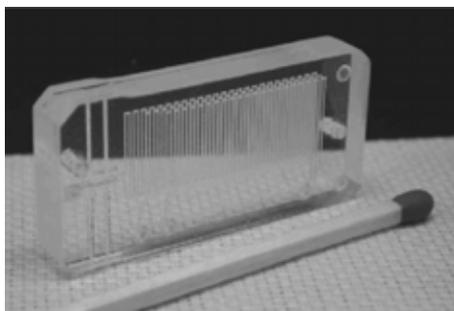


Figure 1.20 : Dispositif microfluidique 3 couches en PMMA [Klank 2002]

1.6 Soft lithographie (PDMS) et dispositif multicouche

Les technologies basées sur le moulage de polymère permettent de fabriquer un grand nombre de dispositifs microfluidiques à partir d'un moule unique fabriqué par photolithographie. Cette fabrication des dispositifs par moulage est beaucoup moins contraignante et coûteuse que les filières de fabrication de dispositif en silicium. Il est ainsi possible d'installer un laboratoire de fabrication de dispositif microfluidique par moulage dans une simple sorbonne. De surcroît les polymères utilisés sont la plupart du temps beaucoup moins chers que le silicium : ainsi le moulage est rapidement devenu la méthode de prédilection pour la fabrication de dispositifs microfluidiques. Les technologies à base de moulage sont très rapides à mettre en œuvre, Il est ainsi théoriquement possible pour un laboratoire ayant les moyens de fabriquer les masques de photolithographie lui-même, de passer de l'idée d'un dispositif à sa réalisation finale en 24 heures. La figure 1.21 décrit la méthode utilisée pour la fabrication par moulage de dispositif en PDMS (Poly DiMéthyl siloxane). Les étapes de fabrication par photolithographie du moule initial sont décrites en annexe [Cf. Annexe A].

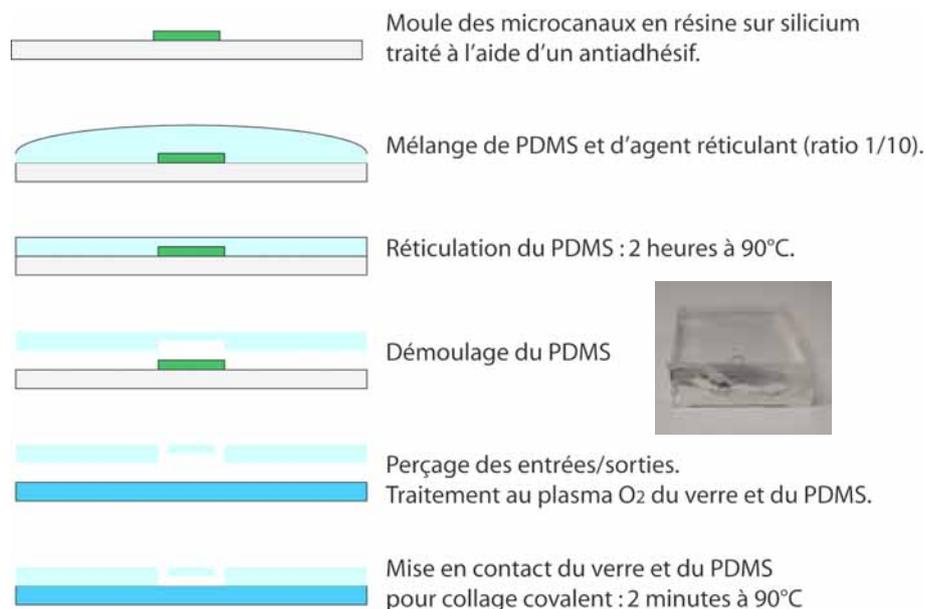


Figure 1.21 : Procédure technologique utilisée pour la fabrication de dispositif microfluidique par moulage de PDMS. Insert : Photo d'un bloc de PDMS réticulé.

Le PDMS est un élastomère transparent très utilisé pour le moulage de dispositifs microfluidiques. Le PDMS est rarement utilisé seul, il est souvent collé sur un substrat en verre pour former le dispositif final. Les assemblages de verre et PDMS permettent d'utiliser les avantages des deux technologies. Les canaux microfluidique sont moulés dans le PDMS et le substrat en verre est utilisé comme tel ou modifié à l'aide de couche mince de métaux, de diélectrique ou de traitements chimiques de surface. Après réticulation, le PDMS peut être collé de manière covalente à la lamelle de verre à l'aide d'un traitement plasma.

Le PDMS possède des qualités très utiles pour de nombreuses applications microfluidiques. Cet élastomère est transparent, biocompatible et économique. Toutefois, c'est surtout la possibilité de fabriquer des dispositifs microfluidiques multicouches intégrant des valves qui explique son succès. Deux couches de PDMS contenant des microcanaux

peuvent être assemblées entre elles à l'aide d'un traitement plasma. La procédure pour fabriquer un dispositif multicouche en PDMS est décrite dans la figure 1.22 :

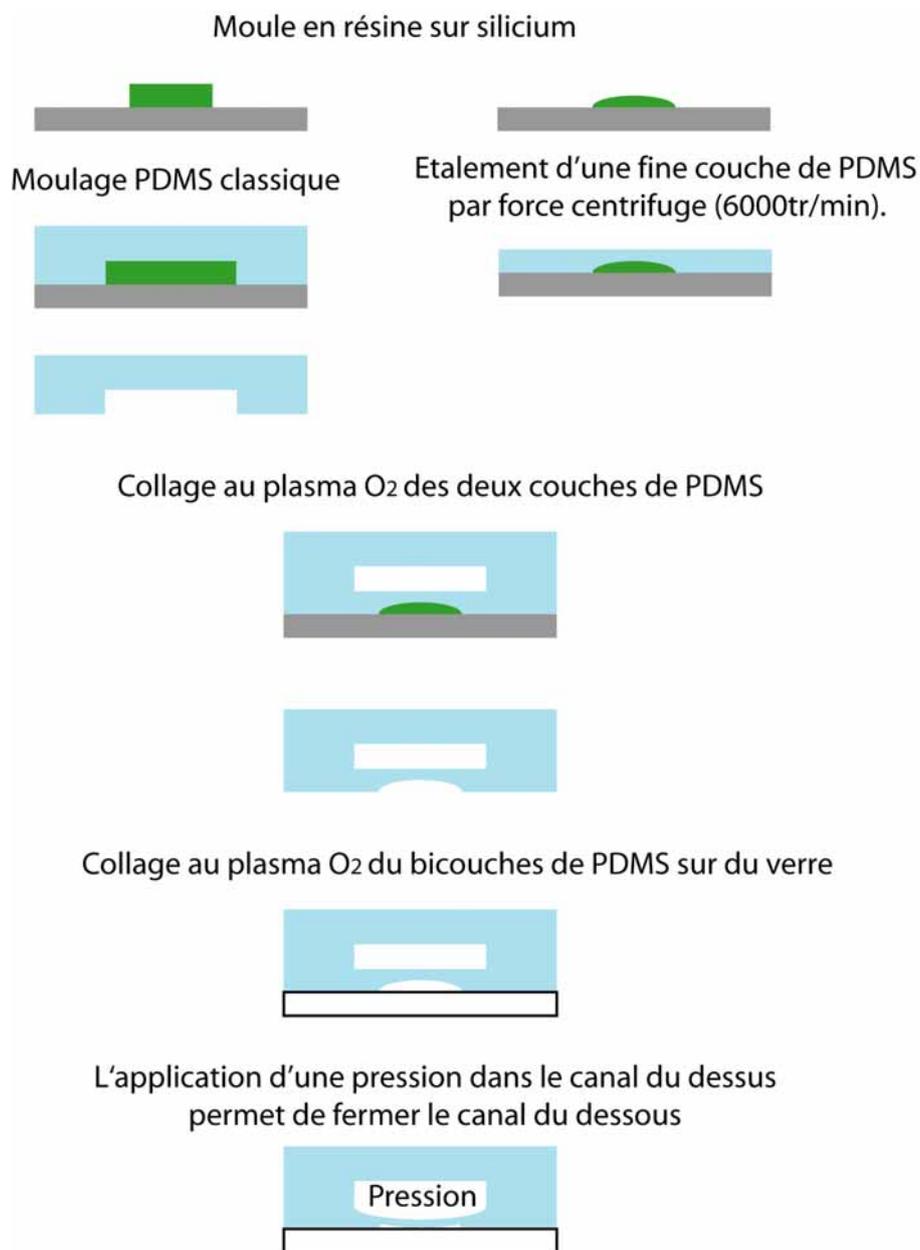


Figure 1.22 : Procédure technologique utilisée pour la fabrication d'un dispositif micro fluidique bicouche. La dernière étape illustre le fonctionnement d'une vanne intégrée.

Les technologies bicouche de PDMS peuvent être utilisées pour fabriquer une valve intégrée contrôlée en pression. Contrairement au silicium et à la majorité des polymères utilisés en microfabrication, le PDMS peut être facilement déformé à l'aide de forces ayant un ordre de grandeur compatible avec les contraintes acceptables par le dispositif. Ainsi en appliquant une pression dans un canal, il est possible de boucher le canal situé en dessous et de fabriquer ainsi une vanne. L'intégration de vannes dans un dispositif microfluidique a donné lieu à de nombreuses applications, que se soit pour le tri cellulaire, l'isolation d'une partie du dispositif, le contrôle des flux à l'intérieur du dispositif ou l'intégration de pompes péristaltiques (figure 1.23).

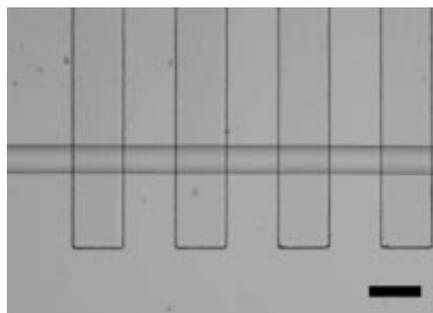


Figure 1.23 : Pompe péristaltique [Hunger 2000]. Le fonctionnement coordonné d'une série de valves permet de déplacer des liquides à l'intérieur du dispositif microfluidique.

1.7 Méthode de mesure

Ce rapide survol des méthodes disponibles pour la mesure de température et la chauffe en microfluidique donne les bases pour choisir la technologie requise en fonction de l'application voulue et des moyens technologiques du laboratoire. Nous avons choisi d'utiliser des couches minces métalliques en raison de la maturité de cette technologie, la linéarité de sa dérive en température, la précision relative de mesure de l'ordre du milli Kelvin et la possibilité de les utiliser comme éléments de chauffe et de mesure simultanément à l'aide d'un appareillage électronique simple.

Nous avons choisi d'utiliser des couches métalliques de platine car la dérive de la résistance électrique du platine en fonction de la température est presque linéaire dans notre gamme de température (0-100°C). Néanmoins le platine en couche mince ne se comporte pas comme un bloc de platine brut. Les dépôts en couche mince sont formés d'un assemblage polycristallin de platine dont les propriétés varient en fonction des paramètres de dépôts. De plus pour des raisons technologiques [cf. annexe A] les couches de platine que nous utilisons sont entourées d'une fine couche de chrome ou de titane. Ceci a pour conséquence de modifier la courbe de variation en température de la résistance de nos pistes métalliques. Néanmoins comme nous pouvons le voir ci après, la variation en température de la résistance de nos pistes conserve sa linéarité. (Figure 1.24)

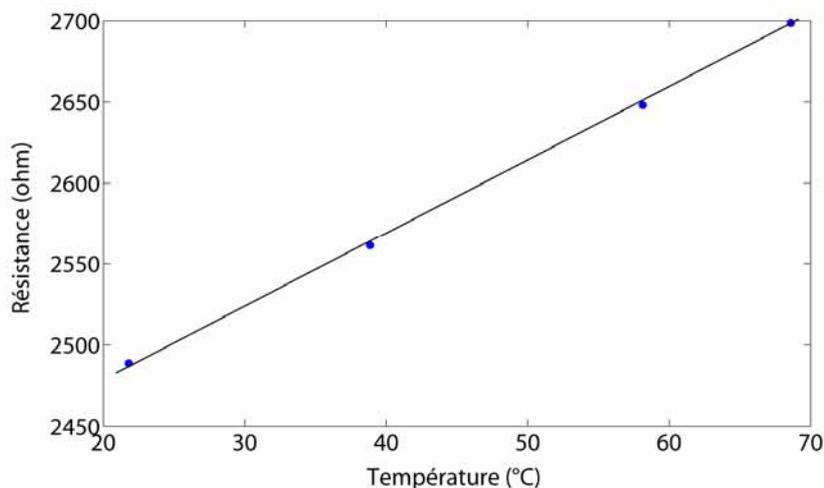


Figure 1.24 : Valeur de la résistance d'une couche mince métallique (Cr/Pt/Ti :5nm/50nm/5nm) en fonction de la température.

Même si d'un dispositif à l'autre il est possible d'utiliser les mêmes coefficients de variation en température, les conditions de dépôt pouvant varier avec le temps il est préférable de calibrer chaque nouveau dispositif avant utilisation. La calibration consiste à relever la valeur de la résistance électrique de la piste de platine pour différentes températures afin de pouvoir déterminer la valeur du coefficient de la pente.

Dans un dispositif microfluidique il est important d'être capable de mesurer la température localement, dans un microcanal par exemple.

Afin de ne pas prendre en compte la résistance électrique des fils de contact et des parties de la piste métallique qui ne nous intéressent pas nous utilisons la mesure de résistance électrique quatre points. Cette méthode de mesure de résistance nécessite une source de courant, un voltmètre et une conception de piste appropriée. La figure 1.25 montre la géométrie typique d'une telle résistance de mesure.

Pour ne mesurer qu'une partie de la résistance électrique (encerclée en rouge sur le schéma) nous avons au préalable dessiné la résistance pour que celle-ci se sépare en quatre aux bornes de la zone à mesurer.

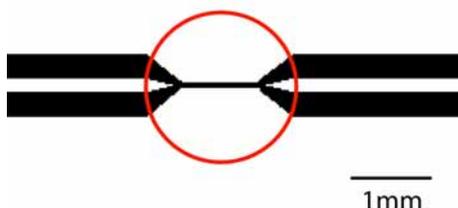


Figure 1.25 : Schéma d'une piste métallique simple permettant de réaliser une mesure 4 points. Le rond rouge désigne la partie de la piste dont la résistance est mesurée en utilisant cette méthode.

Conformément au schéma électrique de la figure 1.26 une source de courant et un voltmètre sont connectés aux bornes de la résistance.

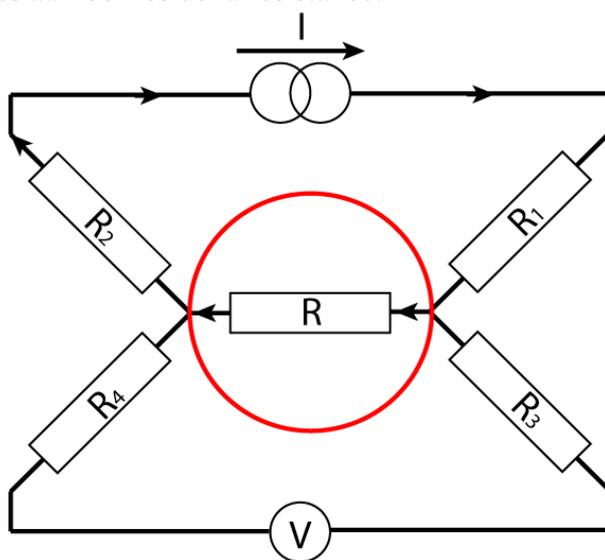


Figure 1.26 : Schéma explicatif du câblage électrique nécessaire pour effectuer une mesure 4 points.

Le courant circulant dans la boucle du voltmètre est nul en première approximation car un voltmètre a théoriquement une résistance électrique infinie.

En appliquant une loi des mailles nous obtenons :

$$V = R_3 \times 0 + R \times I + R_4 \times 0$$

$$V = R \times I$$

Connaissant V et I nous pouvons calculer R sans tenir compte des résistances R_1 , R_2 , R_3 et R_4 . Nous obtenons donc uniquement la résistance de la piste métallique située entre les deux points de séparation. Ce qui permet de déduire la température de la piste et donc de son milieu de manière locale.

Dans le cas d'utilisation des pistes métalliques comme élément de mesure de température, le courant injecté dans la piste pour la mesure de la résistance provoque un effet Joule. Il est donc important d'utiliser un courant qui provoque une élévation de la température de la piste plus faible que la résolution de mesure voulue.

1.8 Conclusions

La miniaturisation d'un système permet d'augmenter les vitesses de changement de température dans ce dernier. De nombreuses solutions technologiques existent pour mesurer et modifier la température dans un microsystème. Au cours de cette thèse, nous nous proposons d'utiliser les moyens technologiques existants pour intégrer des éléments de contrôles et de mesures de température dans des dispositifs microfluidiques. Cette intégration nous permettra de profiter de la rapidité des transferts thermiques aux échelles micrométriques pour fabriquer des dispositifs microfluidiques permettant de réaliser de nouvelles expérimentations dans d'autres domaines scientifiques comme la chimie ou la biologie.

Chapitre 2 :

Microconductimètre thermique et nanofluide

Les suspensions de nanoparticules, souvent appelées nanofluides, ont montré des caractéristiques thermiques intéressantes comparées aux fluides caloporteurs traditionnels [Eastman, 2001]. La conductivité thermique de ces nanofluides peut être significativement plus élevée que celle des liquides purs ne contenant pas de nanoparticules. Pour l'instant aucune des théories physiques proposées n'est complètement en accord avec les résultats expérimentaux obtenus. Pour comprendre les phénomènes mis en jeu dans les nanofluides, des expériences supplémentaires seront nécessaires.

La mesure de la conductivité thermique des nanofluides pose un problème d'instrumentation original. Pour l'instant aucun outil de mesure de conductivité thermique n'est adapté à la caractérisation de ces nanofluides qui sont généralement produits en faible quantité par les laboratoires de recherche. Pour cela, nous avons mis au point un microconductimètre thermique capable de mesurer la conductivité thermique de liquides conventionnels et de nanofluides sur des volumes de 25 μL .

Ce chapitre commence par une brève description des connaissances actuelles sur les nanofluides et pose les problématiques soulevées par cette nouvelle classe de liquides caloporteurs. Nous présenterons par la suite le principe et la caractérisation de notre microconductimètre thermique et les résultats obtenus à l'aide de ce dernier sur les nanofluides.

2.1 Etat de l'art sur les nanofluides

Les nanofluides sont composés de nanoparticules ou de nanofibres suspendues dans un liquide dont la taille typique est comprise entre 1 et 100 nm. Ce type de dispersion suscite depuis quelques années un grand intérêt depuis la découverte de leurs propriétés thermiques particulières. En effet l'adjonction dans un liquide de certains types de nanoparticules, même en très faible proportion (<1% en volume), est capable d'augmenter la conductivité thermique de ce dernier de 150% dans le cas de nanotubes de carbone [Choi 2001], et de 40% pour des nanoparticules d'oxyde de cuivre [Eastman 2001]. De nombreuses recherches ont été menées depuis 2001 sur cette nouvelle classe de fluides afin d'apporter une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu, et mettre ainsi au point des liquides caloporteurs plus performants. La forte conductivité thermique des nanofluides les désigne en effet comme des candidats potentiels pour le remplacement des fluides caloporteurs utilisés dans les échangeurs thermiques pour améliorer leurs performances. [Kebinski,2005] Certaines limitations susceptibles d'atténuer les perspectives d'impact des nanofluides comme remplaçants des fluides caloporteurs ont été étudiées. D'une part des études menées sur la performance de refroidissement des nanofluides en dynamique ont montré que l'addition de nanoparticules dans un liquide augmente la viscosité de ce dernier et de ce fait les pertes en charge. [Yang 2005] D'autre part, le manque de stabilité dans le temps de certains nanofluides peut entraîner l'agglomération des nanoparticules et une modification de leurs propriétés de conduction thermique. Néanmoins, en l'état actuel des recherches, ces deux effets restent moins importants lors de l'utilisation de nanofluides que dans le cas de suspension de microparticules classiques. [Daungthongsuk 2005]

En dehors des applications industrielles possibles l'étude des nanofluides présente un intérêt scientifique pour la compréhension des phénomènes mis en jeu aux échelles nanométriques. Les propriétés thermiques des nanofluides ne suivent pas les prévisions données par les théories classiques décrivant les suspensions de particules solides dans un liquide. Malgré le nombre élevé d'études publiées sur le sujet ces dernières années, aucune théorie ne parvient à décrire correctement les résultats expérimentaux obtenus sur les

nanofluides [Vadasz 2006]. Il est à noter, que les résultats obtenus varient énormément d'une publication à l'autre ce qui ne facilite pas la comparaison entre ces derniers et les théories proposées. Des recherches complémentaires sont nécessaires pour valider ou infirmer les différentes théories proposées pour décrire les propriétés thermiques des nanofluides.

Différents types de nanomatériaux ont été utilisés pour fabriquer des nanofluides. Nous pouvons de manière générale distinguer deux types de nanofluides :

- ceux contenant des nanotubes de carbone
- ceux contenant des nanoparticules apparentées à des sphères.

2.1.1 Les nanofluides à base de nanotubes

Un nanotube de carbone est une structure cristalline du carbone proche des fullerènes. Ces tubes de quelques nanomètres de diamètre peuvent atteindre plusieurs centaines de micromètres de longueur (Figure 2.1). Les nanotubes peuvent être constitués d'une seule couche de graphène repliée sur elle-même : nous avons affaire alors à des nanotubes « mono feuillet » ou d'un enroulement de plusieurs couches de graphène nous avons affaire alors à des nanotubes « multi feuillets ».

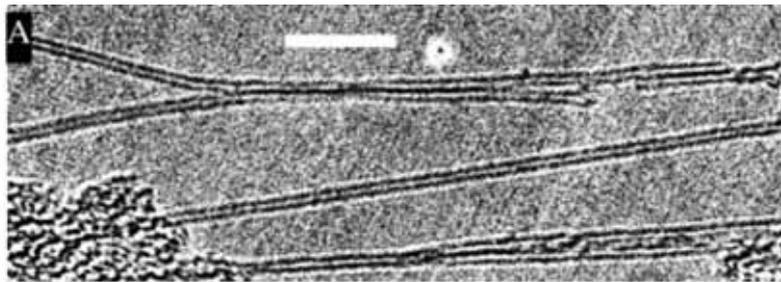


Figure 2.1 : Image TEM (Microscopie électronique à transmission) de nanotubes « mono feuillet » (barre d'échelle 10nm) [Wang,2005]

Ce sont les études portant sur les nanofluides à base de nanotubes de carbone qui ont montré les augmentations de conductivité thermique les plus élevées. Ces dernières sont de l'ordre de 150% pour des concentrations en volume de 1%. [Choi 2001].

Une manière simple de se représenter l'effet de nanotubes en solution est de considérer les nanotubes en suspension comme autant de nano ponts thermiques susceptibles de conduire rapidement l'énergie d'un point à l'autre de l'échantillon (Figure 2.2).

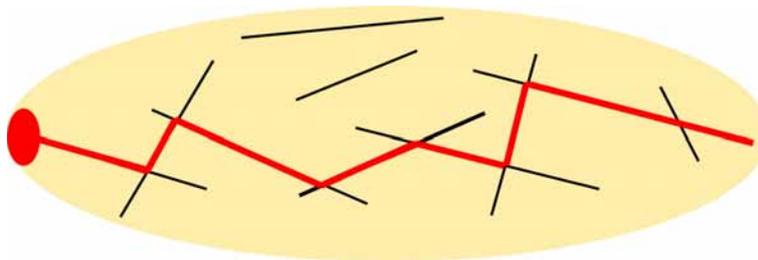


Figure 2.2 : Explication schématisée de la création d'un réseau de ponts thermiques (trait rouge) créée par une dispersion de nano-fibres (trait noir) dans un liquide (Beige) qui permet la propagation d'un point chaud (ovale rouge).

Cette augmentation de conductivité thermique peut être prédite par la théorie du milieu effectif qui prévoit de fortes augmentations de conductivité thermique pour des fluides contenant des nanoparticules ayant un grand rapport d'aspect. [Kebblinski 2005]. Cette théorie permet de calculer l'augmentation de conductivité thermique du liquide en fonction du rapport d'aspect des nanotubes utilisés. Elle prédit que la conductivité thermique du nanofluide devrait augmenter fortement avec le rapport d'aspect des nanotubes (Figure 2. 3).

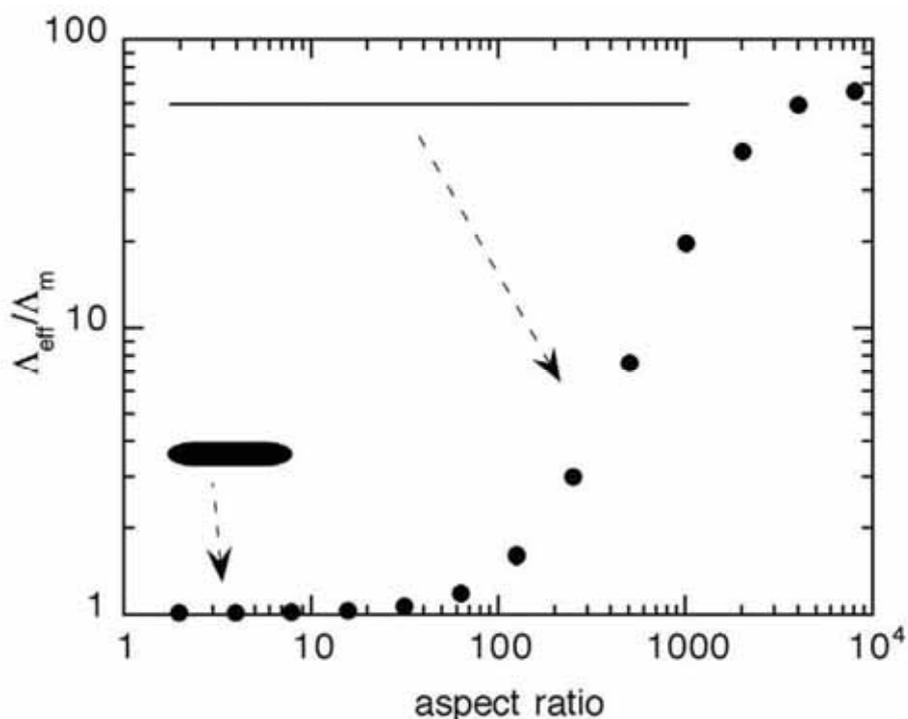


Figure 2.3 : Conductivité thermique effective estimée à l'aide de la théorie du milieu effectif [Kebblinski 2005] normalisée par la conductivité du liquide de base et tracée en fonction du rapport d'aspect de la fibre. La résistance interfaciale entre la fibre et le liquide est fixée à 5 fois le rayon de la fibre avec $k_{\text{fibre}} = 3000 \text{ W/m.K}$ et $k_{\text{liquide}} = 0,15 \text{ W/m.K}$

Les augmentations de conductivité thermique prévues (jusqu'à 6000%) par cette théorie sont largement supérieures à celles obtenues expérimentalement (150%). Ceci peut être expliqué par la forte résistance interfaciale entre le nanotube et le liquide résultant de la faible affinité entre les liquides et les nanotubes de carbone qui provoque une déplétion des molécules de liquide environnant, autour du nanotube (Figure 2.4). Ceci a pour effet de réduire le couplage thermique entre les nanotubes et le liquide environnant ; ce qui réduit la conductivité thermique du mélange.

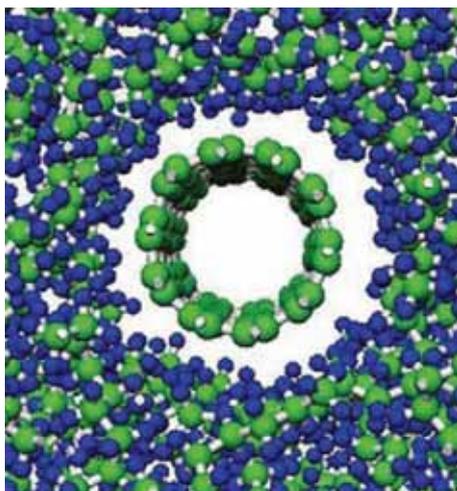


Figure 2.4 : Image issue d'une simulation dynamique moléculaire illustrant le faible couplage thermique pouvant exister entre un nanotube de carbone et de l'octane liquide. Cette distance entre le nanotube et le liquide environnant est principalement due à l'action des forces de Van der Waals. L'espace ainsi créé entre le nanotube et le liquide provoque un faible couplage thermique entre le liquide et le nanotube. [Kebinski 2005]

Une fonctionnalisation adéquate du nanotube, qui augmente l'affinité du nanotube avec le liquide environnant, permet de limiter ce problème. Ce type de fonctionnalisation a un double intérêt car elle permet d'améliorer la stabilité de la suspension ainsi que les propriétés de transfert thermique du nanofluide. En revanche, les molécules greffées à la surface du nanotube peuvent également induire une résistance interfaciale supplémentaire. [Shenogin 2004]

La principale difficulté rencontrée avec les nanofluides à base de nanotubes de carbone est de disperser de manière stable dans le temps les nanotubes de carbone dans le liquide de base. [Wang 2005] Une fonctionnalisation adéquate du nanotube, qui augmente l'affinité du nanotube avec le liquide environnant permet de limiter ce problème. Ce type de fonctionnalisation permet d'améliorer la stabilité de la suspension.

Le rapport d'aspect des nanotubes, les méthodes de préparation et les fonctionnalisations des nanotubes diffèrent d'une publication à l'autre, entraînant une grande variabilité sur les augmentations de conductivité thermique obtenues. Ainsi la conductivité thermique augmente de 10% pour une concentration de 1% de nanotube dans l'eau [Xie 2003] à 38% pour une concentration de 0.6% de nanotubes dans l'eau [Assael 2005] ou encore de 150% pour une concentration de 1% de nanotubes dans l'éthylène glycol [Choi 2001].

2.1.2 Les nanofluides à base de nanoparticules sphériques

Plusieurs types de matériaux peuvent être utilisés pour la fabrication de nanofluides à base de nanoparticules sphériques. Ces nanoparticules peuvent être fabriquées à l'aide de diélectrique, de métaux ou d'oxyde métallique. Les oxydes métalliques ont donné des augmentations de conductivité thermique de 40% pour des concentrations volumiques inférieures à 1%. [Eastman 2001] D'autres études sur les dispersions de nanoparticules sphériques à base de matériaux divers ont permis d'atteindre des résultats similaires (Figure 2.5). [Kebinski 2005]

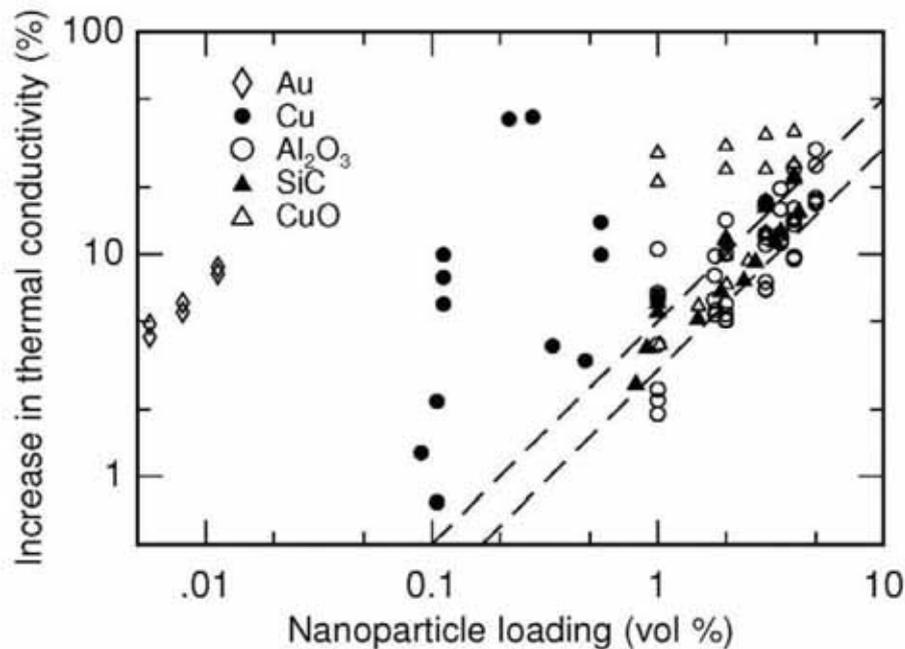


Figure 2.5 : Augmentation relative de la conductivité thermique en fonction de la fraction volumique de nanoparticules dans le liquide de base pour différents matériaux. La ligne pointillée du bas est une prédiction calculée par la théorie des milieux effectifs pour des nanoparticules parfaitement dispersées. La ligne pointillée supérieure est une prédiction considérant une agglomération aléatoire des nanoparticules. La majorité des nanoparticules donnent des résultats pouvant être décrits par les théories classiques. Néanmoins, certaines d'entre elles comme les nanoparticules à base de cuivre d'oxyde de cuivre ou d'or donnent des résultats anormaux non prévisibles par des théories classiques. [Kebinski 2005]

Il est difficile de comparer les différentes études expérimentales sur les nanofluides car chacune d'entre elles a été menée pour des particules de tailles diverses et des préparations d'échantillons différentes. Or la taille des particules et la préparation des échantillons sont des facteurs déterminants qui influent fortement sur les résultats obtenus. [Trisaksr 2005] Les théories classiques [Hamilton 1962] [Jeffrey 1973] [Davis 1986] qui permettent de décrire la conductivité thermique de suspension de particules dans un liquide ne sont pas capables de décrire les comportements obtenus dans certains nanofluides. [Vadasz 2006] D'autres approches théoriques ont vu le jour pour tenter de décrire les augmentations de conductivité thermique des nanofluides. Des phénomènes comme la contribution du mouvement brownien, [Jang 2004] ou les échanges de phonons [Kebinski 2002] entre les particules ont été étudiés. Néanmoins aucune d'entre elles ne parvient à décrire correctement tous les comportements obtenus expérimentalement.

2.2 Le microconductimètre

2.2.1 But et motivation du microconductimètre

Les nanofluides sont la plupart du temps des liquides coûteux, produits en petite quantité par des laboratoires de recherches. Nous avons développé un outil de mesure de conductivité thermique sur de petits volumes adapté aux contraintes des études sur les nanofluides restant à effectuer. Les spécificités requises d'un microconductimètre thermique adaptés aux études sur les nanofluides sont les suivantes :

- Travailler sur des volumes de nanofluides de quelques dizaines de microlitres.
- Pouvoir travailler indifféremment sur des liquides isolant ou conducteurs électriques.
- L'échantillon devra être de taille et forme contrôlée indépendamment de sa mouillabilité.
- L'enceinte devra être facile à nettoyer.

Le microconductimètre thermique décrit ici utilise le principe du « Transient Hot Strip » (THS). Cette méthode est basée sur la mesure de la variation de température d'une bande métallique en contact avec le matériau à étudier. Lorsqu'un courant traverse la bande métallique, cette dernière s'échauffe et un transfert thermique apparaît entre la bande métallique et le matériau en contact avec cette dernière. Par exemple, si le matériau environnant a une grande conductivité thermique, le transfert thermique entre la bande et le matériau sera élevé et la bande métallique chauffera plus lentement. Ainsi les propriétés thermiques du matériau en contact peuvent être déduites en mesurant la montée en température de la bande métallique.

Dans notre cas la bande métallique est remplacée par une piste de platine définie par photolithographie et déposée sur un substrat en verre. La goutte de fluide à étudier est déposée au-dessus de cette piste de platine. En appliquant un courant électrique aux bornes de la piste de platine, cette dernière s'échauffe. Comme la résistance du platine varie avec la température, en effectuant une mesure « quatre points » de la résistance de la piste pendant la chauffe nous pouvons en déduire la variation de température du platine avec le temps. La forme de cette élévation de température nous donne des informations sur les caractéristiques thermiques du liquide en contact. La suite du chapitre décrit plus précisément la méthode utilisée pour obtenir la conductivité thermique du liquide en contact.

2.2.2 Etat de l'art

Dans les années 70, la possibilité d'utiliser le régime transitoire de l'élévation de température d'un fil suspendu pour mesurer la conductivité thermique du liquide environnant a été décrite par [Haarman J W 1971]. Cette méthode, appelée « méthode du fil chaud », a par la suite trouvée des applications industrielles dans la mesure de conductivité thermique mais aussi dans la mesure de flux. La forme du fil chaud n'était pas adaptée à la mesure de la conductivité thermique des solides. L'idée d'aplatir ce fil pour en faire une bande que l'on peut insérer entre deux blocs solides a été étudiée afin de déduire les caractéristiques du solide environnant en 1979. [Gustafsson, 1979] Différentes variantes ont été étudiées par la suite, comme l'utilisation d'un régime de chauffe semi permanent, [Hammerschmidt, 2003] ou en étudiant les différentes durées possibles de l'impulsion de courant de chauffe. [Gustafsson, 1987] L'utilisation des microtechnologies a permis de déposer cette bande métallique sous forme d'une couche mince, de réduire la taille caractéristique du système et ainsi de mesurer l'effusivité thermique d'un liquide sur un volume de la taille d'une goutte. [Gustavsson, 2003]

Pour l'instant aucun système ne permet de mesurer la conductivité thermique de liquide sur des volumes de quelques dizaines de microlitres. Le dépôt d'une couche de diélectrique sur la résistance métallique a par la suite permis d'étendre les mesures d'effusivité thermique aux liquides conducteurs, [Gustavsson, 2005] L'effusivité thermique est une grandeur utilisée en thermique et décrite par la relation suivante :

$$\varepsilon = \sqrt{\rho C_p k} \quad (2.1)$$

Avec,

- ε : Effusivité ($J/m^2.K.S^{-1/2}$)
- k : Conductivité thermique ($W/m.K$)
- ρ : Densité (Kg/m^3)
- C_p : Capacité calorifique ($J/K.Kg.$)

2.2.3 Technologies utilisées

Afin de pouvoir travailler sur de petits volumes, il est nécessaire de miniaturiser l'élément de chauffe et de mesure. Pour cela, nous utilisons une piste de platine recouverte d'une couche mince d'oxyde et de nitrure de silicium. Cette piste de 1mm de long et de $20\mu m$ de large est utilisée comme élément chauffant et comme sonde de température simultanément. Le platine est déposé sous la forme d'une couche mince de 50 nm d'épaisseur sur un substrat en verre de 1mm d'épaisseur. La forme de la piste est déterminée par une étape de photolithographie. Etant donné que le platine n'adhère pas sur les diélectriques comme le verre, la couche de platine est placée entre deux couches de 5 nm de titane et 5 nm de Chrome. Afin de pouvoir mesurer la conductivité thermique des liquides électriquement conducteurs la piste de platine est également recouverte d'un assemblage de couche de diélectriques de 900 nm d'épaisseur. Cet assemblage de diélectriques est constitué d'une alternance de 18 couches de 50 nm de SiO_2 et de Si_3N_4 permettant ainsi d'obtenir un oxyde sans pores, isolant parfaitement la résistance et évitant ainsi l'apparition de réactions d'électrochimie ou de fuites de courants électriques dans le liquide. Enfin, un bloc de PDMS, troué en son centre, est collé de manière covalente sur la piste métallique à l'aide d'un traitement plasma (figure 2.6). La goutte contenue dans la cavité est ainsi maintenue dans une forme contrôlée avec un volume constant au dessus de la piste métallique (Figure 2.7). Cette procédure est décrite de manière détaillée dans l'annexe A.

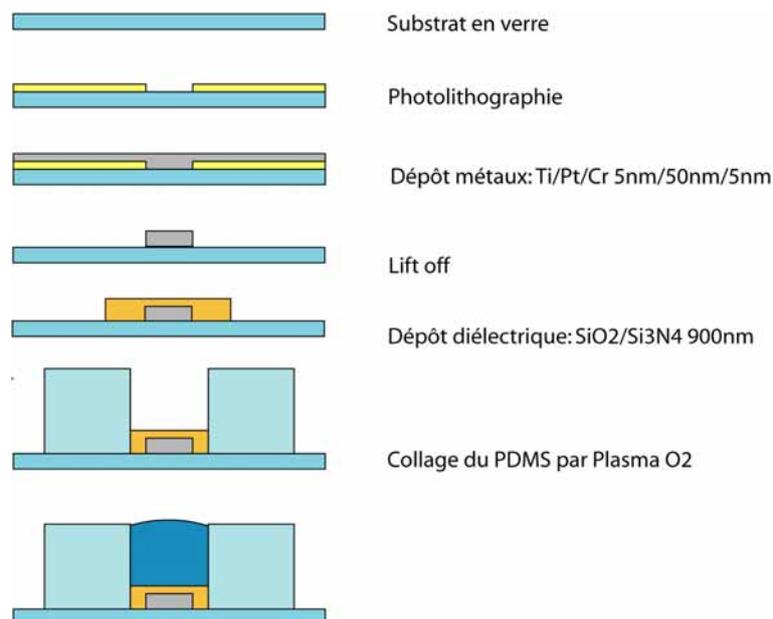


Figure 2.6 : Description des étapes technologiques de la fabrication d'un microconductimètre thermique.

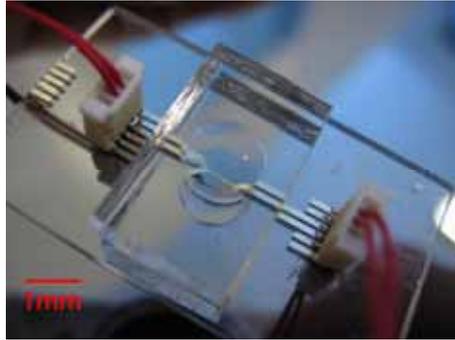


Figure 2.7 : Photographie d'un des premiers modèles du microconductimètre thermique. La piste de platine est grossie par l'effet de lentille produit par la goutte d'eau contenue dans la cavité.

2.2.4 Théorie simple : le cas du fil chaud

Afin de donner un ordre d'idée de la réponse thermique d'une piste métallique traversée par un courant électrique, considérons le cas d'un fil infini, dans lequel circule un courant électrique qui dissipe une puissance constante à partir de $t = 0$, plongé dans un milieu homogène. En utilisant ces hypothèses [Castro,1976] donne une élévation de température de la forme :

$$\Delta T(t) = \frac{q}{4\pi k} \ln\left(\frac{4\alpha t}{r^2 C}\right) \quad (2.2)$$

Avec,

- T : Température (K)
- q : Quantité d'énergie dissipée dans le fil (J)
- k : Conductivité thermique (W/m.K)
- α : Diffusivité (m²/s)
- t : Temps (s)
- r : Rayon du fil (m)
- C : Capacité thermique (J/Kg.K)

L'augmentation de la température du fil augmente avec le logarithme du temps et avec l'inverse de la conductivité thermique du fluide environnant. En traçant cette augmentation de température par rapport à une échelle de temps logarithmique, nous obtenons une droite dont la pente est proportionnelle à l'inverse de la conductivité thermique.

Notre système est loin du système idéal du fil chaud infini, néanmoins notre dispositif conserve des similitudes avec le « fil chaud ». La figure 2.8 montre une augmentation de température par rapport au logarithme du temps de notre piste métallique déposée sur du verre.

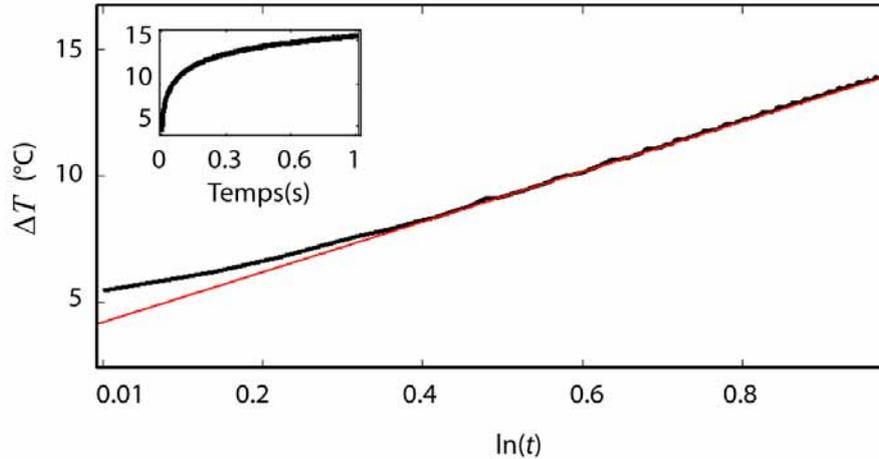


Figure 2.8 : Augmentation de température typique obtenu avec notre conductimètre thermique à vide en fonction du logarithme du temps.

Nous remarquons que notre système conserve sur une partie de la courbe une augmentation linéaire par rapport au logarithme du temps.

2.2.5 Résultats théoriques

Comme nous l'expliquions auparavant, le microconductimètre thermique que nous proposons est loin du système idéal du fil chaud infini. Tout d'abord notre piste métallique n'est pas en contact avec un milieu homogène car elle est déposée sur un substrat en verre d'un côté et est en contact avec le liquide à étudier de l'autre. Comme nous le verrons, un calibrage de notre système avec deux liquides de référence permet de résoudre ce problème. Notre système ne possède pas de solutions analytiques simple. Néanmoins, comme nous le démontrerons par la suite, une partie de l'augmentation de température par rapport au logarithme du temps reste proportionnelle à l'inverse de la conductivité thermique du fluide environnant. Notre dispositif utilise des largeurs de pistes métalliques d'une dizaine de microns. Pour cette raison les temps caractéristiques de notre système sont de l'ordre de la microseconde. Les théories développées pour les systèmes précédents font appel à des approximations pour des temps courts par rapport à la constante de temps de la piste. En utilisant des approximations aux temps courts l'augmentation de la température d'une piste métallique traversée par un courant électrique de puissance constante est donnée par [Gustafsson 1983] :

$$T(t) = T_0 \left[1 + A \left(\frac{1}{\sqrt{\frac{k_s^2}{\alpha_s} + \sqrt{\frac{k^2}{\alpha}}}} \right) \sqrt{t} \right] \quad (2.3)$$

Avec,

$T(t)$: Température (K)

T_0 : Température initiale (K)

A : Terme incluant la forme de la piste et la puissance injecté.

k_s : Conductivité thermique du substrat (W/m.K)

α_s : Diffusivité thermique du substrat (m^2/s)

- k : Conductivité thermique du fluide (W/m.K)
- α : Diffusivité thermique du fluide (m²/s)
- t : Temps (s)

Dans notre cas, avec une largeur de piste de 10 μm , le temps caractéristique de notre piste est de 4 μs . Lors de nos mesures de conductivités thermiques nous utilisons deux intervalles de temps différents, (100 μs – 1 ms) et (0,3 s – 0,7 s), nous travaillons donc dans ces deux cas avec des temps long par rapport aux temps caractéristiques de notre système. En partant des équations de [Gustafsson 1983] et en utilisant des approximations spécifiques aux temps long par rapport au temps caractéristiques de la piste, nous obtenons l'équation suivante :

$$T(t) = T_0 \left[1 + A \left(\frac{C}{k} \right) \left(\frac{1}{C + \sqrt{k \rho C_p}} \right) \ln \left(\frac{tk}{d^2} \right) \right] \quad (2.4)$$

Avec,

- C : $\sqrt{k_p \rho_s C_{p_s}}$
- ρ : Densité du fluide
- C_p : Capacité calorifique du fluide (J/K.Kg.)
- C_{p_s} : Capacité calorifique du substrat (J/K.Kg.)
- ρ_s : Densité du substrat
- d : Demi largeur de la piste (m)

En utilisant ce type d'approximation aux temps longs nous obtenons une équation qui conserve une forte variation par rapport à la conductivité thermique du fluide mais qui varie en fonction de nombreux autres paramètres. L'inverse de l'écart de température atteint lors de la chauffe calculé à l'aide de l'équation précédente est représenté en fonction de la conductivité thermique et de la capacité thermique du liquide, en considérant un substrat en verre (Figure 2.9-10).

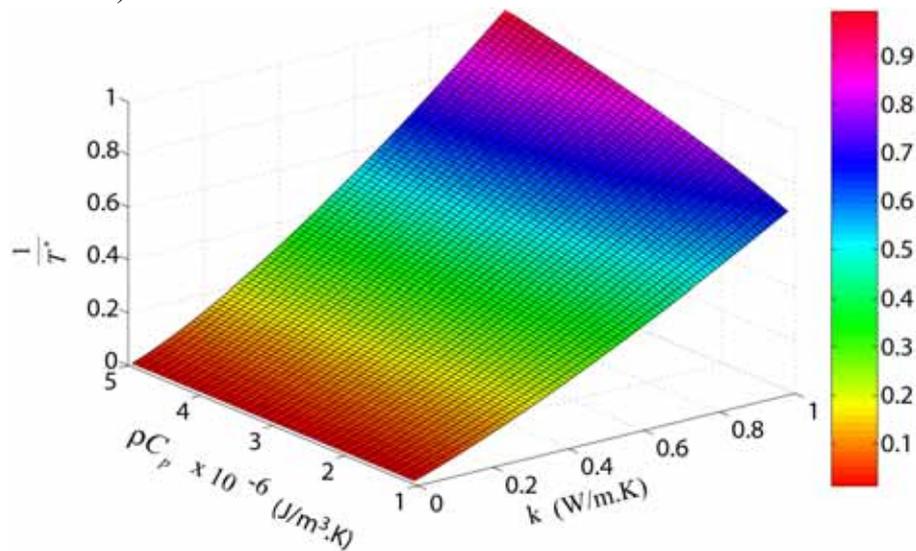


Figure 2.9 : Inverse de l'écart de la température normalisé T^* obtenue en fonction de la conductivité thermique et de la capacité calorifique du liquide en utilisant l'approximation au temps long.

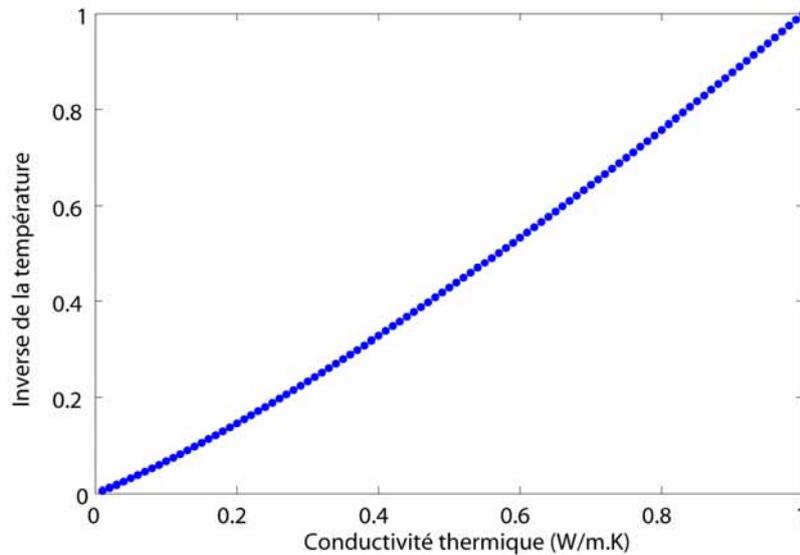


Figure 2.10 : Inverse de la variation de température obtenue en fonction de la conductivité thermique du liquide pour un ρC_p de $2 \cdot 10^6$ en utilisant l'approximation au temps long.

Ces courbes montrent que la température finale varie en fonction de la conductivité thermique du liquide tout en conservant une dépendance plus faible par rapport au ρC_p du fluide. Il est difficile de conclure sans connaître l'importance de l'erreur introduite par nos approximations. De plus, les nombreuses différences entre notre dispositif et le cas idéal décrit par les équations ci dessus peuvent influencer sur le comportement de notre système. Afin de nous rapprocher au plus du cas idéal, nous avons donc étudié tous les paramètres expérimentaux susceptibles de nous éloigner de ce modèle.

Notre piste n'a pas une taille infinie, néanmoins, comme décrit dans [Gustafsson 1987] une piste avec un rapport longueur sur largeur (considérant l'épaisseur de la piste comme négligeable par rapport aux autres dimensions) supérieur à 30 se comportera expérimentalement comme un fil infini.

Si le temps caractéristique de transfert par conduction à travers la goutte est plus court que la durée de l'expérience, alors nous mesurons en partie les transferts de chaleur entre le liquide et le milieu extérieur. Pour ne mesurer que les caractéristiques thermiques intrinsèques au liquide, le temps de l'expérience doit être inférieur au temps de transfert à travers la goutte. Il existe donc une taille de goutte minimum pour laquelle nous pouvons négliger les effets de bord.

$$t = \frac{L^2}{\alpha} \quad (2.5)$$

Avec,

- t : Temps de diffusion caractéristique dans la goutte (s)
- L : Rayon de la goutte (m)
- α : Diffusivité thermique du liquide (coefficient de diffusion thermique) (m^2/s)

Il faut également considérer le temps caractéristique dû au transfert thermique dans l'épaisseur de la lamelle de verre. Pour une lamelle de verre d'une épaisseur de 1 mm, le temps de diffusion est de 1.2 seconde. Le temps caractéristique des transferts thermiques dans la lamelle de verre peut être négligé car la durée maximale de nos expériences est de 0.7 seconde. Afin de pouvoir également négliger les effets de bord dans l'échantillon, notre cuve est un cylindre de 2 mm de rayon et de 2 mm de haut ce qui nous donne un temps caractéristique de 27 sec pour de l'eau.

Le temps caractéristique de thermalisation de la piste et son design sont importants car ils définissent la limite de temps basse à partir de laquelle nous pouvons prédire les transferts thermiques entre la piste et le liquide. Tant que la température de la piste n'est pas homogène il est difficile de prédire les transferts thermiques dans le liquide. Pour cette raison la géométrie de la piste a son importance. Pour nos mesures de conductivité thermique nous avons choisi la géométrie, couramment utilisée dans les microsystèmes utilisant la mesure 4 points, présentée sur la figure 2.11.

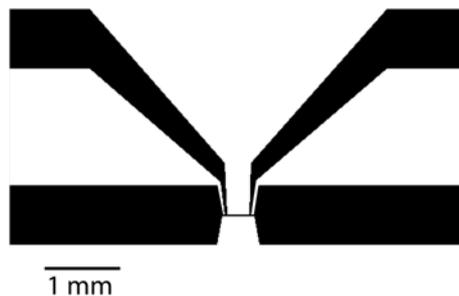


Figure 2.11 : Dessin de masque d'une des pistes métalliques utilisé pour le microconductimètre thermique. La forme de la piste est optimisée pour permettre une mesure 4 points et une chauffe uniforme.

Le courant circulant sur toute la longueur de la piste, elle s'échauffera uniformément sur toute la partie de la piste dont nous mesurons la température. Un gradient de température apparaîtra tout de même dans la zone de l'élargissement de la piste métallique mais il n'aura pas d'influence sur notre mesure de température.

Lors de nos expériences nous avons utilisé le design ci-dessus avec une largeur de 10 microns et une longueur de piste de 500µm. Le temps caractéristique d'une piste de 10 microns de large (4 µs) est très inférieur à la durée de notre expérience (<1sec) et peut donc être négligé.

Comme décrit auparavant, nous considérons dans nos équations l'hypothèse d'une puissance électrique constante. Le montage que nous utilisons génère un courant constant. La résistance de notre piste varie au cours du temps et la puissance injectée varie donc aussi en suivant la loi :

$$P = R \times I^2 \quad (2.6)$$

Avec,

- P : Puissance électrique dissipé par effet joule (W)
- R : Résistance électrique de la piste (Ω)
- I : Courant électrique parcourant la piste (A)

Pour cette raison il est nécessaire de limiter au maximum la puissance injectée dans la piste métallique afin de limiter l'élévation de résistance et ainsi la variation de puissance. De plus une élévation de température faible, de seulement quelques degrés, limite les phénomènes d'évaporation et permet de déterminer la conductivité thermique d'un fluide à une température donnée.

Les transferts par convection naturelle peuvent apparaître dans tout système contenant des fluides et des gradients de température. Néanmoins le temps de mise en place de la convection naturelle dans les microsystèmes contenant des liquides est très largement supérieur à la durée de nos expériences [Healy, 1975] et peut donc être négligé.

La principale différence entre le cas idéal et notre système reste les pertes dans le substrat. Ces pertes limitent l'étendue des gammes de fluide que nous pouvons mesurer. Idéalement les liquides ne devraient pas avoir une diffusivité thermique inférieure à celle du substrat. [Gustafsson 1983] De manière générale, limiter les pertes dans le substrat permet d'obtenir un rapport signal sur bruit plus élevé. Le pourcentage de pertes dans le substrat est décrit par l'équation (2.6) [Gustafsson 1983] :

$$Q = \frac{Q_0}{1 + \frac{k}{k_s}} \sqrt{\frac{\alpha_s}{\alpha}} \quad (2.7)$$

Avec,

- Q : Quantité d'énergie perdu dans le substrat (J)
- Q_0 : Quantité d'énergie dissipé par effet joule (J)
- k_s : Conductivité thermique du substrat
- k : Conductivité thermique du fluide
- α_s : Diffusivité thermique du substrat
- α : Diffusivité thermique du fluide

Les polymères ont une diffusivité thermique inférieure à celle du verre. Ainsi l'utilisation d'un substrat en polymère peut réduire grandement les pertes. Par exemple, lors d'une mesure sur de l'eau nous aurons 51% de pertes dans un substrat en verre et 29% dans un substrat en LDPE (low density polyéthylène). Pour cette raison nous avons développé une technologie qui permet d'intégrer toutes les étapes nécessaires à la fabrication d'un microconductimètre sur du polyéthylène afin de remplacer le substrat en verre. Malheureusement nous n'avons pas eu le temps de la mettre en place dans le cadre de ce projet. [cf. annexe B]

La couche de diélectrique qui encapsule la piste de platine a aussi une constante de temps thermique. Toutefois une épaisseur de 900 nm de diélectrique a un temps caractéristique de 1µs qui est très inférieur au temps de nos expériences et qui peut donc être négligé.

Afin de pouvoir mesurer la valeur de la résistance à tout moment, un courant de mesure circule dans la résistance, même en dehors des créneaux de chauffe. Afin de limiter son influence sur nos mesures de conductivité thermique nous avons choisi un courant de mesure dix fois plus petit que le courant de chauffe afin qu'il produise un échauffement 100 fois moindre et puisse être négligé.

2.2.6 Simulations numériques

En raison de la complexité de notre système, les théories proposées ne permettent pas de prédire complètement le comportement de la bande de métal comme dans le cas du fil chaud. Afin de palier l'absence de solution analytique nous avons étudié le comportement de notre système à l'aide de simulations numériques par élément fini. Nous avons reproduit notre système en 2D sur Femlab (Figure 2.12) et étudié l'échauffement de la piste en fonction du temps pour une échelle de valeur de conductivité thermique et de capacité thermique couvrant tout le spectre des liquides non métalliques

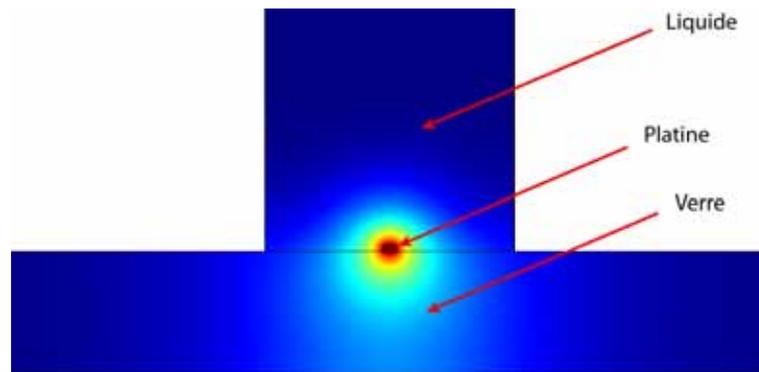


Figure 2.12 : Micro conductimètre thermique simulé sous Femlab.

Nos résultats pour des temps de chauffe « long » ($t < 1,5\text{ms}$) ou des temps de chauffe « très long » ($t < 0,7\text{s}$) sont présentés sur les figures 2.13 et 2.14 :

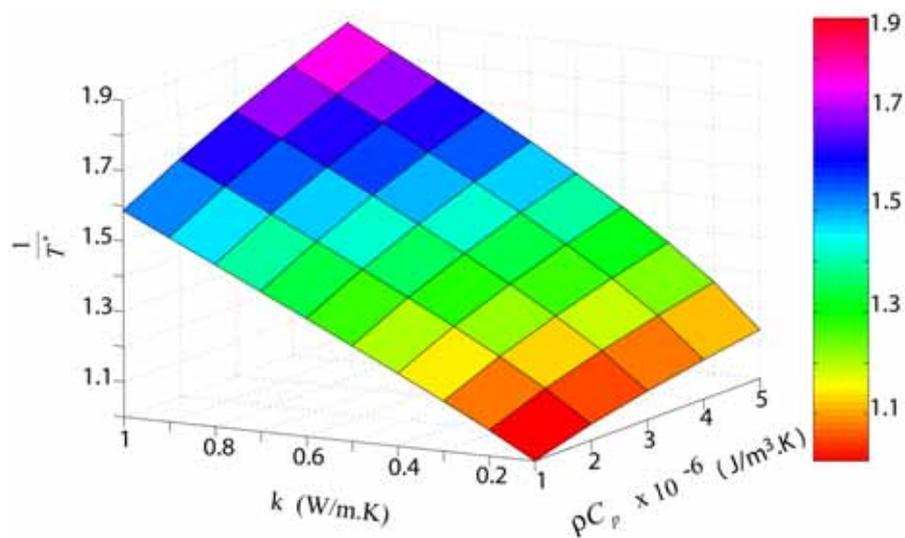


Figure 2.13 : Simulation de la variation de température du conductimètre aux temps long. Inverse du coefficient directeur de la variation de température obtenue en fonction de la conductivité thermique et de la capacité calorifique du liquide en utilisant des temps de chauffe « long ».

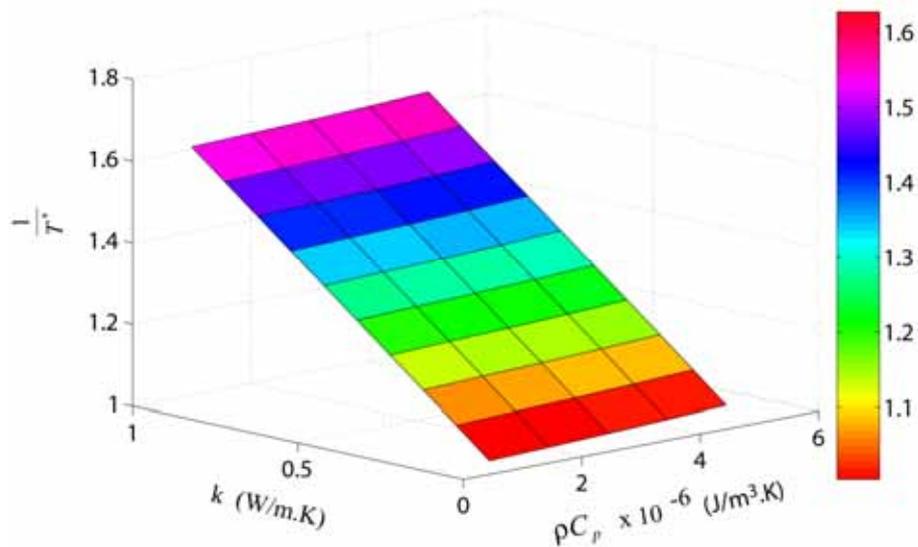


Figure 2.14 : Simulation de la variation de température du conductimètre aux temps très long. Inverse du coefficient directeur de la variation de température obtenue en fonction de la conductivité thermique et de la capacité calorifique du liquide en utilisant des temps de chauffe « très long ».

Ces simulations numériques montrent que la pente de l'élévation de température par rapport au logarithme du temps est inversement proportionnelle à la conductivité thermique du fluide. Aux temps longs comme aux temps très longs par rapport à la taille de la piste l'augmentation de température varie également avec ρC_p mais d'une manière beaucoup plus restreinte, particulièrement aux temps « très longs ». La simulation donne des résultats similaires à la théorie avec une moindre dépendance par rapport au ρC_p du liquide particulièrement aux temps très longs. Ceci peut être expliqué par les approximations effectuées lors de nos calculs théoriques. En nous basant sur les résultats théoriques et numériques présentés précédemment nous avons sélectionné les paramètres expérimentaux les plus favorables pour la mesure de conductivité thermique sur les liquides concernés.

2.2.7 Procédure expérimentale

Tous les résultats obtenus dans le reste de ce manuscrit ont été obtenus en utilisant la procédure expérimentale décrite ci après. L'appareillage expérimental est constitué d'un générateur de fonction, d'un convertisseur tension/courant et d'un voltmètre. L'association du générateur de fonction et du convertisseur tension courant permet de générer des créneaux de courant très rapide. Cette source de courant et le voltmètre permettent d'effectuer une mesure de résistance 4 points de notre piste métallique. Le générateur de fonction et le voltmètre sont commandés par un programme Matlab qui synchronise les instruments et effectue le traitement de données après la mesure. Le dispositif est connecté au montage comme représenté sur la figure 2.15.

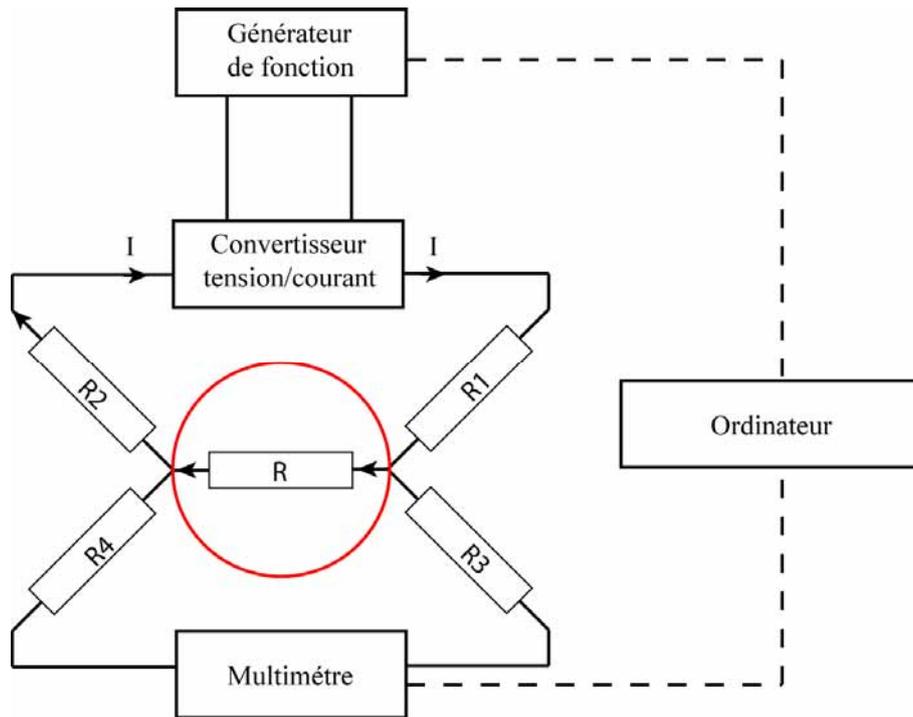


Figure 2.15 : Schéma électrique de notre appareillage expérimental

Afin de pouvoir calculer la résistance de la piste de platine avant l'augmentation de courant qui produira l'échauffement de la piste de platine, il est nécessaire de faire circuler un faible courant dans la piste avant le créneau de chauffe.

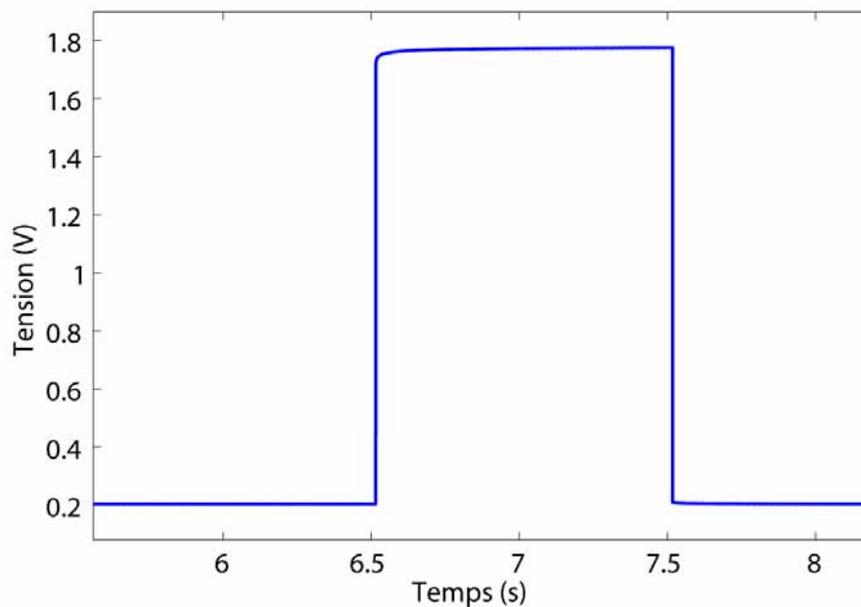


Figure 2.16 : Tension relevée aux bornes de la résistance lors d'une mesure de conductivité thermique

Ce faible courant est déterminé pour ne pas produire un échauffement significatif de la piste susceptible de nuire à nos mesures de conductivité thermique. Durant la phase de chauffe le courant circulant dans la résistance augmente d'un facteur 10 pendant 1 seconde.

La tension mesurée reflète l'augmentation de résistance de la piste (Figure 2.16). Chaque point de mesure est séparé par un temps de 100 μs . Cette augmentation de courant provoque un échauffement de la piste (Figure 2.17).

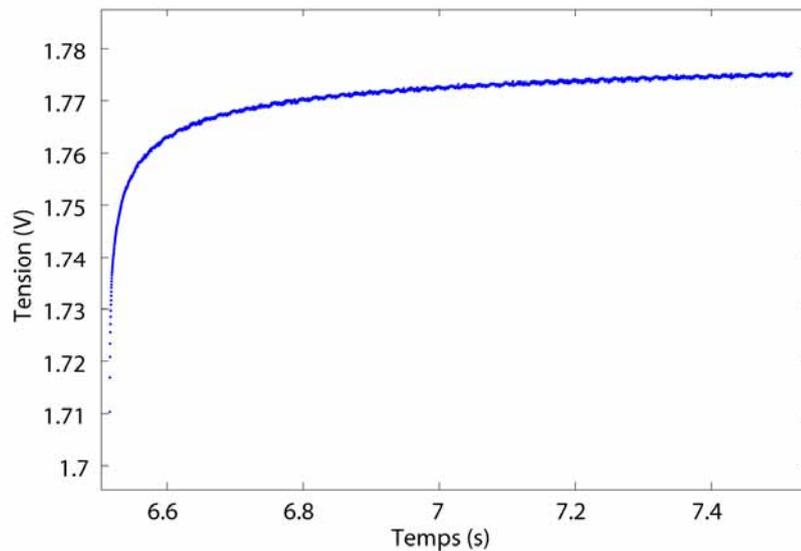


Figure 2.17 : Détail de la montée en tension lors du créneau. L'augmentation de tension est due à l'augmentation de résistance de la piste.

La résistance de la piste est calculée en divisant la tension mesurée par le courant injecté dans la piste (Figure 2.18).

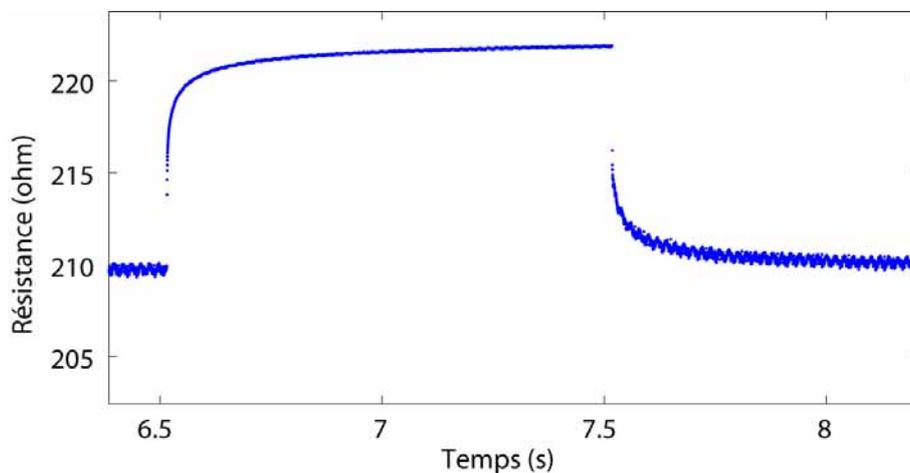


Figure 2.18 : Courbe obtenus après calcul de la résistance

Le programme décale le premier point de l'augmentation de température à l'origine (0,0) afin de pouvoir calculer le logarithme de la résistance par rapport au temps (Figure 2.19).

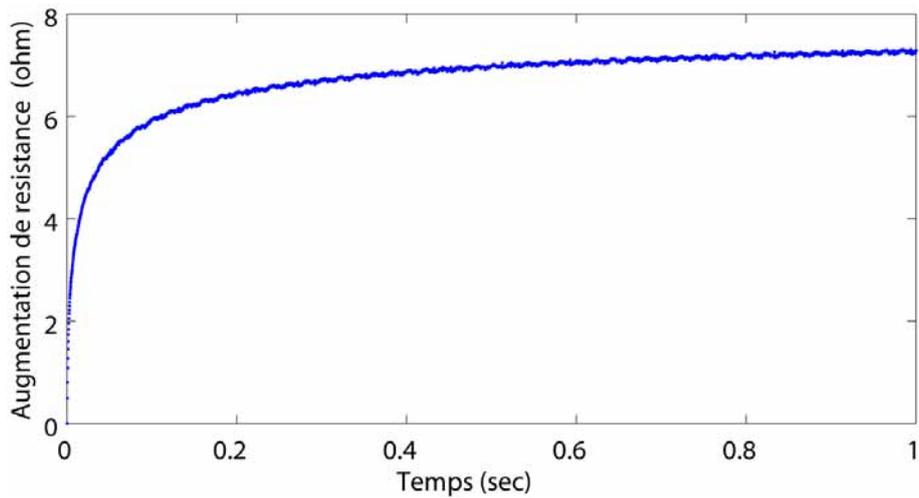


Figure 2.19 : Courbe obtenus après décalage de la résistance à l'origine

Nous pouvons voir sur la Figure 2.19 une perturbation périodique de 50 Hz. Cette variation est due aux perturbations électromagnétiques en provenance du réseau EDF. Cette perturbation est éliminée au temps « très long » en moyennant la valeur de la résistance sur une oscillation complète du 50 Hz (200 points) (Figure 2.20). Par contre lorsque nous travaillons aux « temps longs » (mesure de la pente entre 100 μ s sec et 1ms) aucune correction de bruit n'est effectuée.

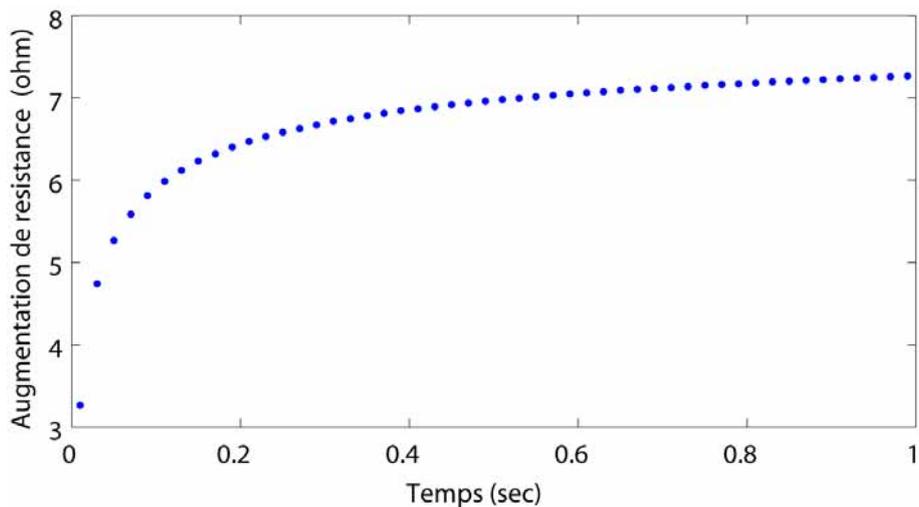


Figure 2.20 : Courbe obtenu après correction du bruit 50 Hz

La variation de la résistance est ensuite tracée par rapport au logarithme du temps (Figure 2.21).

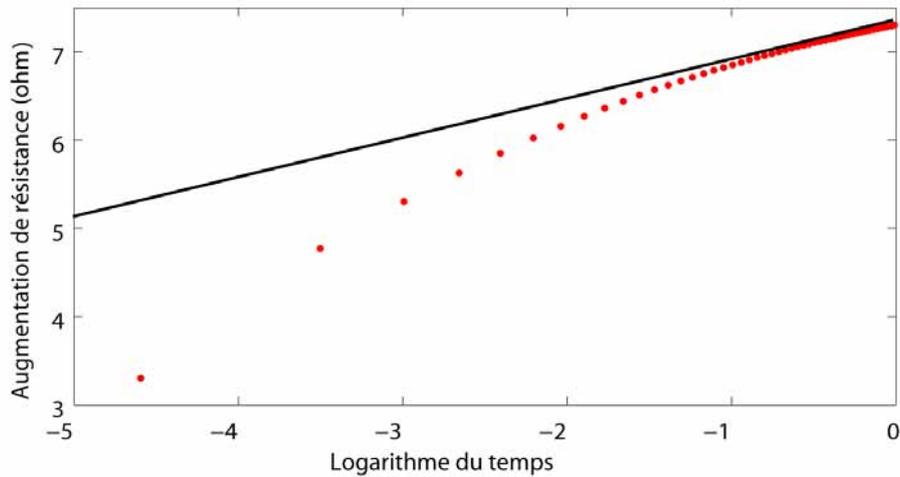


Figure 2.21 : Variation de la résistance avec le logarithme du temps au temps « très long ». Les points représentent les données expérimentales et la droite l'ajustement linéaire utilisé pour le calcul du coefficient directeur.

Enfin nous calculons l'inverse du coefficient directeur de la pente obtenu entre les bornes de temps choisis (Temps « long » ou temps « très long »). Chaque expérience est répétée 10 fois. La moyenne de la conductivité thermique calculée à partir de ces dix mesures nous donne la conductivité thermique du fluide. La variation de température est linéaire par rapport à la résistance. Pour déterminer la conductivité thermique du liquide nous effectuons un calcul de la dérivé de l'augmentation de température par rapport au logarithme du temps. Cette pente est identique à un facteur multiplicatif prêt que nous travaillons à partir des augmentations de résistance ou de température. Après calibration, il est ainsi équivalent de travailler à partir des augmentations de température ou des augmentation de résistance.

2.2.8 Résultats expérimentaux

Afin d'illustrer le lien entre la conductivité thermique et l'élévation de température, nous pouvons voir sur la (Figure 2.22) deux montées en température, tracées par rapport au logarithme du temps, obtenues pour deux liquides de conductivité thermique différentes :

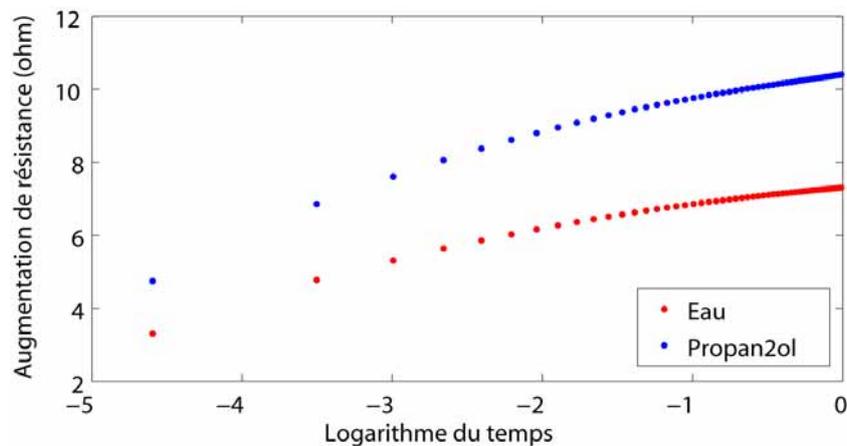


Figure 2.22 : Augmentation de résistance en fonction du logarithme du temps pour deux liquides différents.

Comme nous pouvons le voir, une fois tracée en fonction du logarithme du temps (Figure 2.23), l'augmentation de température obtenue varie avec le liquide utilisé. Afin de montrer la capacité de notre dispositif à mesurer la conductivité thermique d'un liquide en utilisant la procédure expérimentale décrite plus haut, nous avons effectué des mesures de conductivité sur un panel de liquides de références dont les conductivités thermiques sont connues. Notre système a été calibré pour deux liquides de référence (ici le propan-2-ol et l'eau).

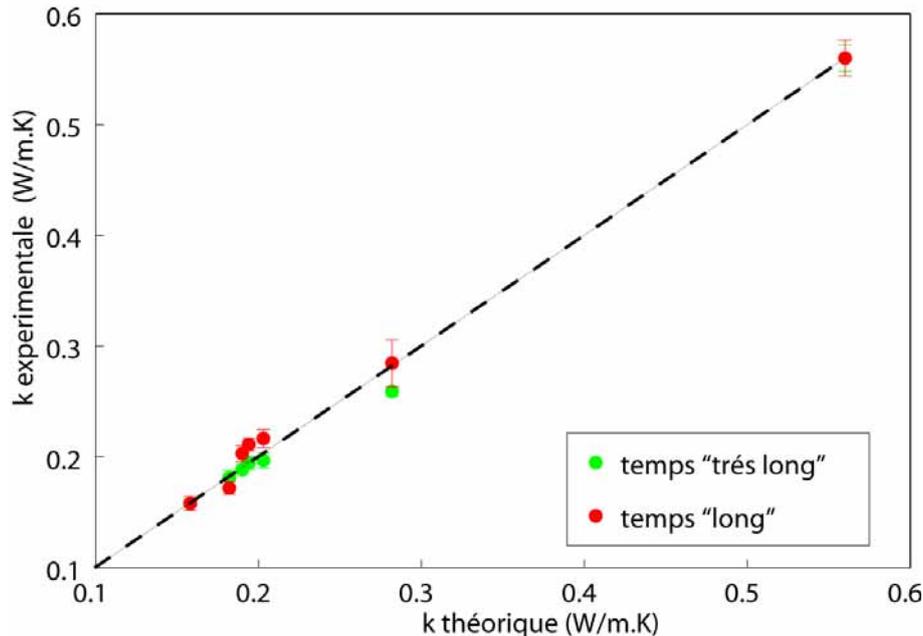


Figure 2.23 : Comparaison entre les conductivités thermiques obtenues expérimentalement avec notre micro conductimètre et les valeurs issues de la littérature pour des liquides courant.

Le dispositif a été calibré avec du propan2ol et de l'eau.

(Liquides utilisé par ordre croissant de conductivité thermique : propan2ol, propan1ol, tétraéthylène glycol, triéthylène glycol, éthanol, diéthylène glycol, glycérol, eau)

Comme nous pouvons le voir notre mesure nous permet de déterminer la conductivité thermique d'un liquide inconnu avec une précision de l'ordre du pourcent au temps « long ». Ce qui est de l'ordre de grandeur des mesures de conductivité thermique obtenues avec des dispositifs macroscopique utilisant des volume 1000 fois plus grand.

2.2.9 Conclusions sur le conductimètre thermique

Le dispositif de mesure de conductivité thermique que nous avons développé permet pour la première fois de mesurer la conductivité thermique sur une goutte de liquide de taille contrôlée. Les faibles dimensions de notre piste ont induit le développement d'une théorie originale pour décrire les transferts thermiques entre la piste et le liquide environnant aux temps long par rapport aux temps caractéristiques de la piste. Nos simulations numériques en élément fini corroborent les résultats obtenus expérimentalement. Nos expériences sur des liquides classiques ont permis d'atteindre une précision de l'ordre du pourcent. La taille réduite et contrôlée de la goutte de liquide à étudier, la facilité d'évacuation du liquide et la précision de ce dispositif en font un outil pertinent pour la mesure de conductivité thermique des nanofluides.

2.3 Mesures sur les nanofluides

2.3.1 Mesures sur les nanofluides à base de nanotubes

Nous avons utilisé le micro conductimètre thermique décrit plus haut, pour effectuer une étude sur la conductivité thermique des nanofluides. Lors de notre étude, nous avons utilisé un protocole de dispersion de nanotubes de carbone dans l'éthylène glycol décrit par [Liu 2005]. Pour cela nous avons dispersé un échantillon de nanotube « multi feuillet » dans de l'éthylène glycol par traitement ultrasons pendant 2 heures. La mesure de conductivité thermique de ces nanofluides a été effectuée sur des gouttes de 50 μL . Chaque expérience a été successivement répétée 10 fois sur une même goutte. L'augmentation de conductivité thermique obtenue en fonction de la concentration de nanotubes, est donnée par la figure 2.24 :

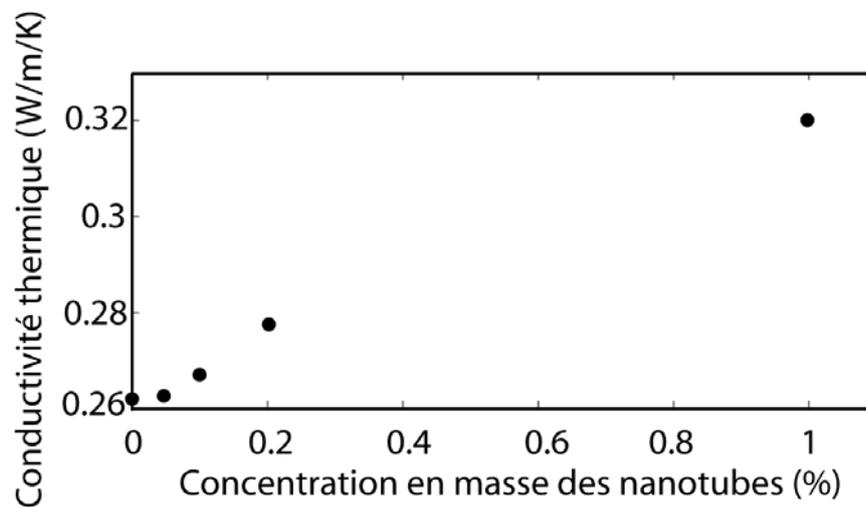


Figure 2.24 : Mesures de conductivité thermique obtenues avec notre dispositif sur un nanofluide, pour différentes concentrations de nanotubes de carbone dispersées dans de l'éthylène glycol.

Pour des concentrations de 1 % en masse (0.75% en volume) nous avons constaté des augmentations de conductivité thermique de 23%. Les résultats obtenus sont deux fois supérieurs à ceux obtenus par [Liu 2005] mais sont inférieurs aux d'augmentations de conductivité thermique, déjà mises en évidence par d'autres équipes de recherche. [Wen 2004] [Assael 2005] [Choi 2001]

L'augmentation de conductivité thermique attendue pour un nanofluide à base de nanotubes dépend fortement du rapport d'aspect de ces derniers [Kebllinski 2005]. Les différentes caractéristiques physiques des nanotubes utilisés peuvent expliquer les différences d'augmentation de conductivité thermique obtenues d'une étude à l'autre. De plus en fonction de la méthode de dispersion utilisée les nanotubes peuvent s'agglomérer ou par exemple se briser lors des étapes de traitement d'ultrasons.

2.3.2 Mesures sur les nanofluides contenant des nanoparticules sphériques

Pour tester la validité de ces théories, nous avons testé à l'aide de notre dispositif la conductivité thermique d'un ensemble de nanofluides commerciaux, préalablement dispersés à base d'oxyde métallique et de diélectrique. Les nanofluides utilisés lors de cette étude, ont les caractéristiques affichées suivantes [sigma] [nyacol] :

Matériaux	Taille des nanoparticules annoncée (nm)	Liquide de base	Densité (Kg/m ³)	Conductivité thermique (W/m.K)
Al ₂ O ₃	< 20	Eau	3.9	26-35
CeO ₂	< 25	Eau	7.65	-
SiO ₂	< 15	Ethanol	2.18	1.3
TiO ₂	< 50	Eau	4.05	2.5-5.0

Table 2.1 : tableau récapitulatif des propriétés des nanoparticules utilisées.

Les nanofluides ont été traités aux ultrasons durant 2 heures pour re-disperser les nanoparticules avant l'expérience. La mesure de conductivité thermique de ces nanofluides a été effectuée sur des gouttes de 50 µL. Chaque expérience a été successivement répétée 10 fois sur une même goutte.

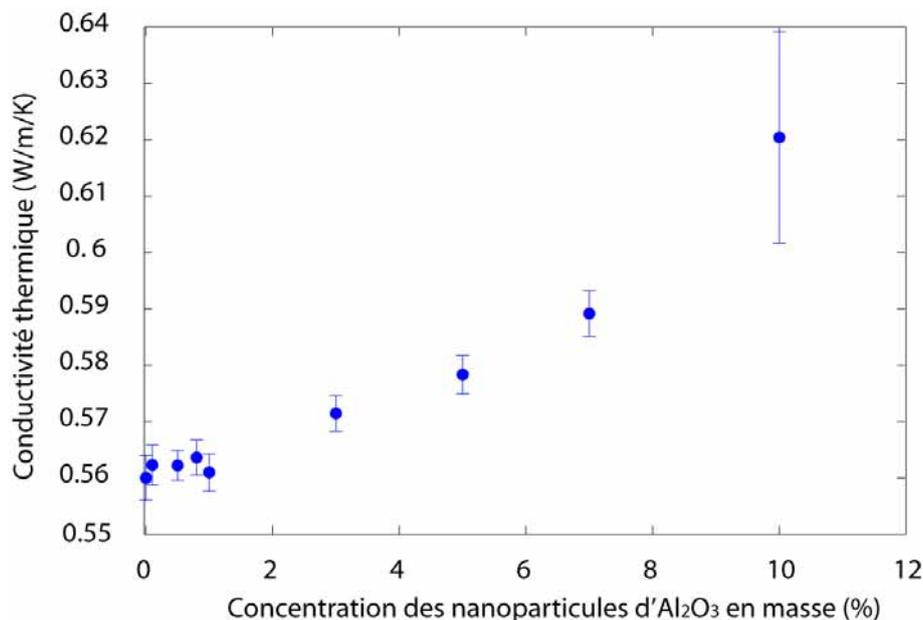


Figure 2.25 : Conductivité thermique obtenue sur une dispersion de nanoparticules d' Al₂O₃ dans de l'eau. La conductivité du liquide augmente avec la concentration de nanoparticules.

Nous observons sur la figure 2.25 une augmentation de la conductivité thermique du fluide de 10% pour une concentration massique d'Al₂O₃ de 10%. (2,5% en volume) Ce résultat ne met pas en valeur un effet particulier dû à la taille nanométrique des particules et reste dans les gammes d'augmentation de conductivité thermique donnée par la théorie du milieu effectif.

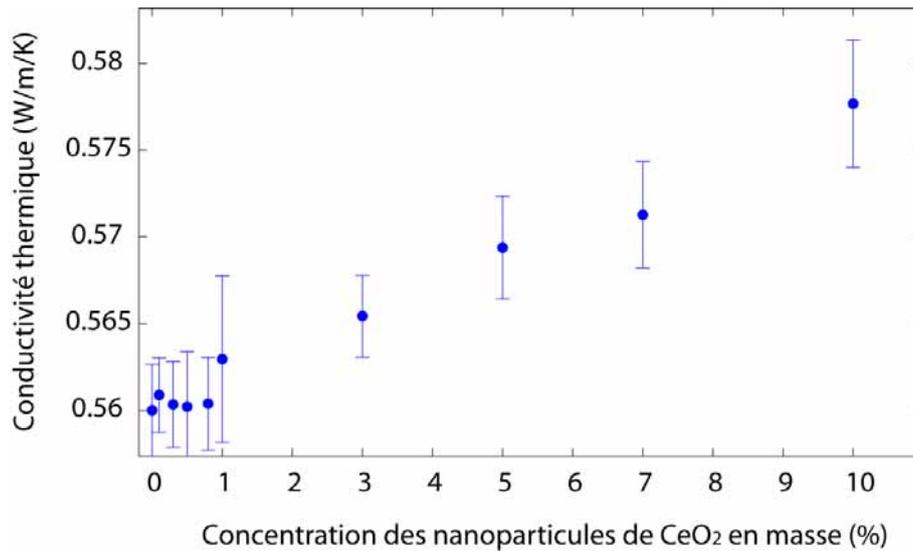


Figure 2.26 : Conductivité thermique obtenue sur une dispersion de nanoparticules de CeO₂ dans de l'eau. La conductivité du liquide augmente avec la concentration de nanoparticules.

Nous observons sur la figure 2.26 une augmentation de la conductivité thermique du fluide de 3,5% pour une concentration massique de CeO₂ de 10%. (1,3% en volume) Ce résultat ne met pas en valeur un effet particulier dû à la taille nanométrique des particules.

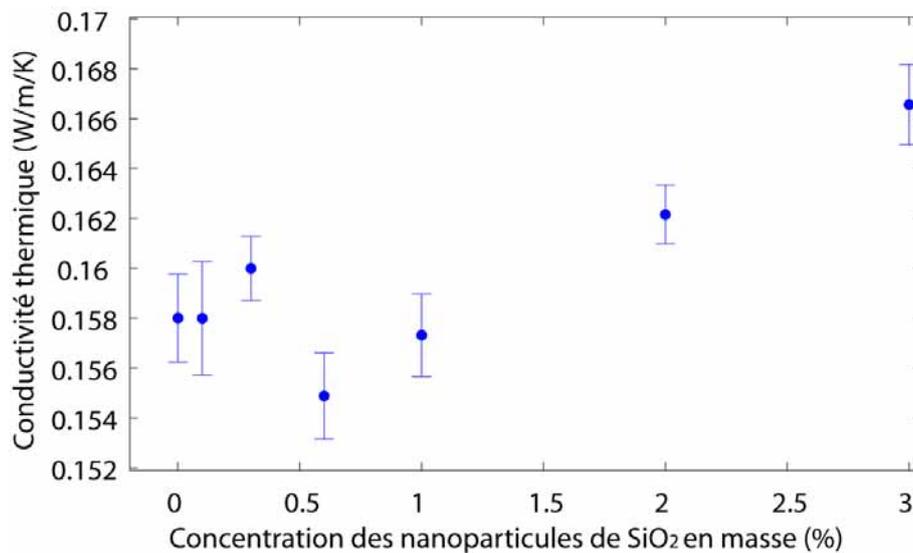


Figure 2.27 : Conductivité thermique obtenue sur une dispersion de nanoparticules de SiO₂ dans de l'eau. La conductivité du liquide augmente avec la concentration de nanoparticules.

Nous observons sur la figure 2.27 une augmentation de la conductivité thermique du fluide de 6,3% pour une concentration massique de SiO₂ de 10%. (1,37% en volume) Ce résultat ne met pas en valeur un effet particulier dû à la taille nanométrique des particules.

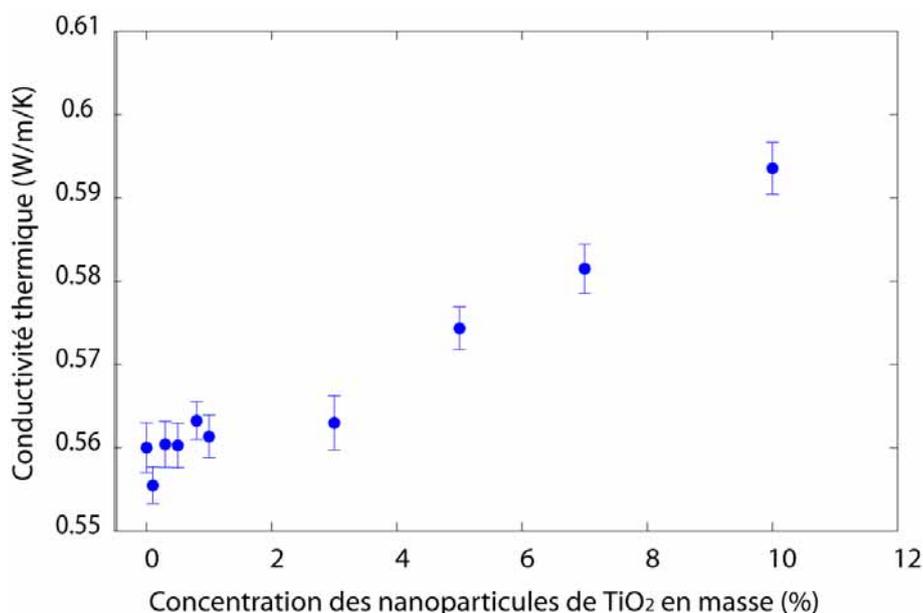


Figure 2.28 : Conductivité thermique obtenue sur une dispersion de nanoparticules de CeO₂ dans de l'eau. La conductivité du liquide augmente avec la concentration de nanoparticules.

Nous observons sur la figure 2.28 une augmentation de la conductivité thermique du fluide de 5.7% pour une concentration massique de TiO₂ de 10%. (2.46% en volume) Ce résultat ne met pas en valeur un effet particulier dû à la taille nanométrique des particules.

L'augmentation de conductivité thermique observée pour tous les nanofluides présentés ci-dessus est faible et conforme aux théories classiques. [Kebinski 2005] Ces augmentations sont de l'ordre de celles que nous aurions pu obtenir avec des suspensions de microparticules.

2.3.3 Discussions

Les augmentations de conductivités thermiques obtenues sur les nanofluides à base de nanotubes de carbone sont en accord avec celles décrites dans la publication sur laquelle nous avons basé notre préparation. Néanmoins, afin de vérifier les caractéristiques de nos dispersions à base de nanotubes de carbone, nous avons centrifugé nos échantillons à 2000tr/min. Après 2 minutes de centrifugation, les nanotubes de carbone avait floculé au fond du tube, montrant ainsi la présence d'agglomérats micrométriques dans nos solutions. La présence potentielle d'agglomérats de nanotubes ne nous permet pas d'exploiter de manière rigoureuse nos résultats. Une meilleure préparation physico chimique de ces nanofluides à base de nanotubes serait nécessaire pour pouvoir tirer des conclusions pertinentes à partir des résultats présentés ici.

Les augmentations de conductivité thermique que nous avons obtenues lors des études sur les nanofluides à base de nanoparticules sphériques sont inférieures à celles attendues. Nous avons donc effectué une caractérisation à la DLS pour connaître la taille de nos particules en suspension. La DLS (Dynamic Light Scattering : diffusion dynamique de la lumière) permet de mesurer la taille des particules dans un liquide. Cette méthode utilise la vitesse de diffusion des particules dans le liquide pour déterminer leur taille. Nous avons utilisé cette méthode pour caractériser nos nanofluides (Table 2.2). Pour pouvoir effectuer une DLS pertinente, nos échantillons ont été préalablement dilués 100 fois dans une solution de NaCl 1mM. Après un traitement ultrasons d'une durée de deux heures, nos échantillons ont été filtrés de manière à retenir toutes les particules d'un rayon supérieur à 250 nm. Cette

filtration permet d'empêcher les grosses particules éventuellement présentes dans la solution (poussières, agglomérats de particules) de perturber nos mesures.

Matériaux	Taille des nanoparticules annoncées (nm)	Résultats des caractérisations (nm)
Al ₂ O ₃	< 20	93
CeO ₂	< 25	47
SiO ₂	< 15	87
TiO ₂	< 50	> 250

Table 2.2 : Tableau récapitulatif des caractéristiques de nos nanofluides mesurées par DLS.

Le nanofluide à base de TiO₂ a perdu sa coloration lors de la filtration. Ce phénomène résulte d'une agglomération massive des nanoparticules ; nous pouvons donc considérer ce nanofluide comme non utilisable. Tous les autres nanofluides contenaient une majorité de particules avec un rayon inférieur à 100 nm mais très supérieur au rayon indiqué par le fabricant. Ce résultat est probablement dû à une agglomération des nanoparticules entre la date de fabrication et l'expérimentation.

Ces résultats montrent que les nanofluides n'avaient pas les caractéristiques indiquées, ce qui peut expliquer les faibles augmentations de conductivité thermique obtenues. La taille des agglomérats de nanoparticules peut expliquer le comportement conforme aux théories classiques.

2.3.4 Conclusions sur les nanofluides

Les résultats que nous avons obtenus au cours de cette étude sur les nanofluides à base de particules sphériques ne mettent pas en évidence d'effet particulier d'augmentation de conductivité thermique sur les nanofluides à base de nanoparticules sphériques. L'agglomération de nos particules ne nous permet pas d'étudier de manière rigoureuse l'influence de la taille de ces dernières sur l'augmentation de conductivité thermique du fluide. Un meilleur contrôle des propriétés physico chimiques de ces fluides serait nécessaire pour pouvoir les étudier correctement et ainsi comprendre leur fonctionnement. Les résultats obtenus sur les nanofluides à base de nanotubes de carbone montrent des augmentations de conductivité thermique de 23% pour des concentrations en masse de 1%. Ces résultats ne sont néanmoins pas exploitables, compte tenu de l'incertitude sur l'état d'agglomération des nanotubes.

2.4 Conclusions sur le microconductimètre et les nanofluides

Le micro conductimètre thermique que nous avons mis au point permet pour la première fois de mesurer la conductivité thermique sur une goutte de liquide de taille contrôlée. Nous avons développé une théorie originale pour décrire les transferts thermiques entre la piste et le liquide environnant au temps long par rapport aux temps caractéristiques de la piste. Nos expériences sur des liquides classiques ont permis d'atteindre une précision de l'ordre du pourcent. La taille réduite et contrôlée de la goutte de liquide à étudier, la facilité d'évacuation du liquide et la précision de ce dispositif en font un outil pertinent pour la mesure de conductivité thermique des nanofluides.

Nos recherches sur les nanofluides ont montrées que cet outil est adapté à la mesure de conductivité thermique sur ce type de liquide souvent conducteur électrique. Notre étude sur les nanotubes de carbone dans l'éthylène glycol a montré une augmentation de conductivité thermique de 23% pour une concentration de nanotube en masse de 1%. Cette augmentation de conductivité thermique est probablement due au fort rapport d'aspect des nanotubes. Néanmoins, le manque de stabilité chimique des dispersions que nous avons utilisées ne nous permet pas d'effectuer de manière rigoureuse les séries d'expérience nécessaire pour pouvoir tirer des conclusions susceptibles d'infirmer ou de confirmer une des analyses théoriques en vigueur sur les mécanismes en jeu dans les nanofluides.

Chapitre 3 :

Mesures de propriétés thermochimiques: Microcalorimétrie

Depuis une dizaine d'années, différentes équipes de recherche ont proposé d'utiliser la microfluidique pour fabriquer des calorimètres sur puce. Ces derniers utilisent des technologies silicium complexes faisant appel à des thermocouples sur des membranes suspendues. Nous proposons ici, un microcalorimètre fabriqué à l'aide de technologies beaucoup plus simples utilisant des canaux microfluidique en PDMS et des résistances de platine déposé sur une lamelle de verre pour la mesure de température. Le but de ce projet est d'étudier les avantages et les inconvénients de ce type de technologie pour la fabrication de microcalorimètres.

Après une brève introduction sur la calorimétrie, nous étudierons dans ce chapitre la problématique du mélange en microfluidique. Par la suite nous dresserons un état de l'art de la calorimétrie sur puce et nous présenterons les résultats obtenus à l'aide de notre calorimètre. Enfin, nous comparerons et discuterons des résultats obtenus avec notre dispositif avec ceux obtenus dans les microcalorimètres en silicium.

3.1 Calorimétrie et microfluidique

3.1.1 Introduction à la calorimétrie

La calorimétrie est une méthode très utilisée en chimie pour déterminer l'enthalpie d'une réaction chimique ou la concentration des espèces en présence. Cette discipline est une branche de la thermodynamique qui a pour objet la mesure des quantités de chaleurs à l'aide d'un calorimètre. Dans le cas idéal, (Figure 3.1) un calorimètre est un système thermodynamique isolé qui n'échange pas d'énergie avec le milieu extérieur.

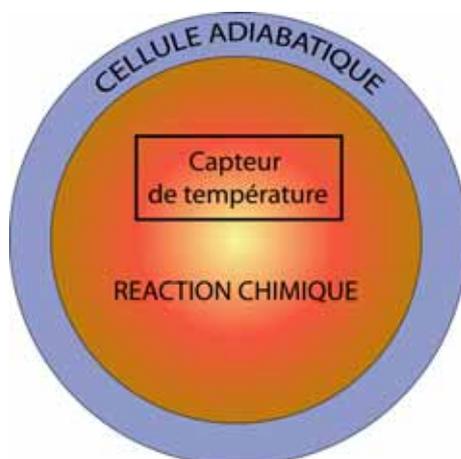


Figure 3.1 : Un calorimètre idéal, constitué d'une cellule adiabatique dans laquelle se produit une réaction chimique.

Dans un calorimètre adiabatique parfait, à pression, entropie et volume constant, lorsqu'une réaction chimique se produit, l'énergie dégagée par cette dernière se traduit par une élévation de température du milieu décrite par l'équation (3.1). Cette élévation de température est proportionnelle à l'enthalpie de réaction, à la concentration des réactifs et inversement proportionnelle à la capacité thermique du milieu.

$$\Delta T = \frac{C \cdot (-\Delta H)}{\rho C_p} \quad (3.1)$$

Avec,

- C : Concentration (mol/ m³)
- ΔH : Enthalpie de la réaction chimique (J/mol)
- ρ : Densité (Kg/m³)
- C_p : Capacité calorifique (J/Kg.K)
- ΔT : Augmentation de température (K)

Il existe différentes méthodes de calorimétrie. Il est possible de classer ces méthodes en fonction du type de transfert thermique existant entre le calorimètre et le milieu environnant. [Zhang 2005] Ces méthodes ne sont pas nécessairement proches du modèle idéal du calorimètre adiabatique.

1 : La calorimétrie adiabatique : Les échanges d'énergie entre le calorimètre et l'extérieur sont ici limités au maximum pour se rapprocher du modèle idéal adiabatique décrit plus haut.

2 : La calorimétrie à conduction thermique: Dans ce type de calorimétrie il existe un échange de chaleur entre le calorimètre et un milieu extérieur isotherme. La température du milieu extérieur est fixe pour garder le coefficient de transfert thermique constant ; ainsi la température à l'intérieur du calorimètre reste proportionnelle à la génération de chaleur. Le calorimètre de ce type le plus connu est le microcalorimètre de Tian-Calvet (Figure 3.2).

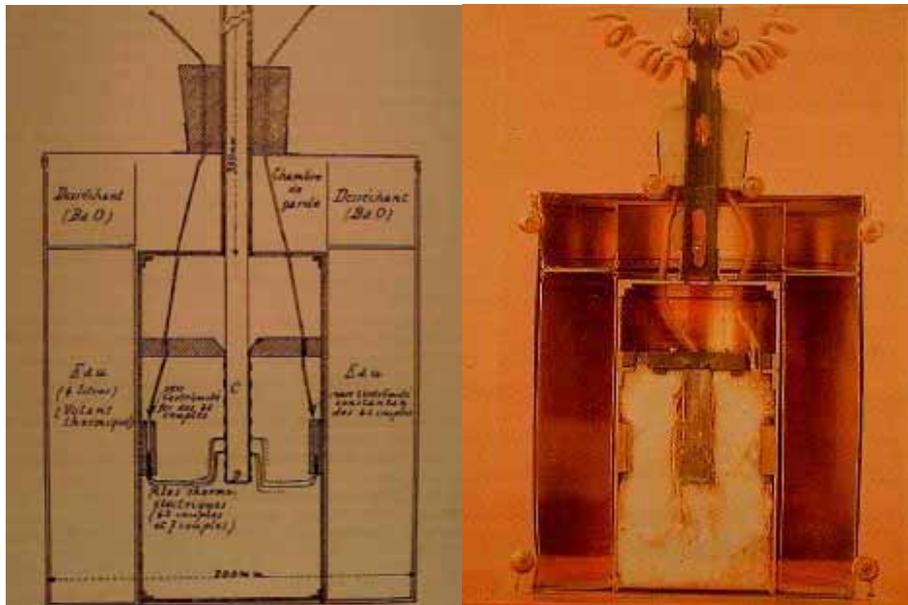


Figure 3.2 : Microcalorimètre de Tian-Calvet [Rouquérol 2005]

3 : La calorimétrie par compensation de puissance : Ici la température interne du calorimètre reste constante durant la réaction chimique. L'énergie nécessaire pour garder la température du calorimètre constante permet de connaître l'énergie produite ou absorbée dans l'enceinte du calorimètre.

Pour ces trois formes de calorimétrie, différentes techniques de mélange de réactif existent :

1 : La titration : Cette méthode permet de déterminer la concentration d'un réactif. Un réactif de concentration inconnue est placé dans le calorimètre et un deuxième réactif de concentration connue (titrant) est progressivement ajouté. Les variations de température mesurées lors des injections successives permettent de déterminer la concentration et l'enthalpie de la réaction chimique.

2 : La batch calorimétrie : dans ce cas l'intégralité du volume des réactifs est placée dans le calorimètre en une seule fois. La mesure de la variation de température au cours du temps permet de connaître la concentration des réactifs ou l'enthalpie de la réaction chimique. [Lerchner 1999]

3 : La calorimétrie en flux continu : dans ce type de calorimètre, un flux continu des deux réactifs s'écoule dans un mélangeur dans lequel se produit la réaction chimique. [Lerchner 2006]

Quelle que soit la méthode de calorimétrie utilisée, le mélange des réactifs chimiques est une étape cruciale et comme nous le verrons par la suite, obtenir un mélange performant dans un dispositif microfluidique pose des problèmes importants.

3.1.2 Mélange en microfluidique

Les faibles dimensions des canaux microfluidiques génèrent des forces visqueuses importantes sur les liquides circulant à l'intérieur et ne favorisent pas la formation d'écoulements turbulents propices au mélange des liquides. Des régimes d'écoulement turbulents peuvent apparaître en mécanique des fluides lorsque l'inertie du fluide devient prépondérante sur les forces de frottements (Figure 3.3). Le rapport entre les forces inertielles et les forces visqueuses est donné par le nombre de Reynolds :

$$Re = \frac{vL}{\eta} \quad (3.2)$$

Avec,

Re : Nombre de Reynolds (sans d'unité)

v : Vitesse du fluide (m/s)

L : Longueur caractéristique (m)

η : Viscosité cinématique (m^2/s)

- Lorsque le nombre de Reynolds est faible (< 2000), ce qui est généralement le cas en microfluidique, les forces visqueuses sont prépondérantes comparées à l'inertie. Le flux est laminaire et réversible, on parle dans ce cas d'écoulement de Stokes.

- Pour des nombres de Reynolds intermédiaires ($2000 < Re < 3000$), les forces inertielles deviennent non négligeable, l'écoulement reste laminaire mais non réversible.

- Pour des valeurs de nombres de Reynolds supérieures, les forces inertielles sont prépondérantes et des turbulences peuvent apparaître.



Figure 3.3 : Illustration de différents types d'écoulement dans un canal. En régime laminaire les liquides peuvent circuler sur une longue distance en parallèle sans se mélanger. En régime transitoire, quelques repliements commencent à apparaître. En régime turbulent la trajectoire du liquide devient chaotique. [Modifié www.mecaflux.com]

Les flux laminaires, propres aux faibles nombres de Reynolds, ne sont pas favorables au mélange. Dans le cas d'un écoulement laminaire les liquides se mélangent par diffusion des espèces. Bien que les phénomènes de diffusion soient considérablement accélérés aux échelles micrométriques, ce mode de mélange reste beaucoup moins performant que le mélange en milieu turbulent. La vitesse de diffusion d'une espèce dans une autre est décrite par la loi de Fick. Dans le cas à une dimension cette loi est décrite par l'équation ci-dessous : [Zengerle 2006]:

$$\frac{\partial C}{\partial t} = D \frac{\partial^2 C}{\partial x^2} \quad (3.3)$$

Avec,

- C : Concentration de l'espèce (mol/L)
- D : Coefficient de diffusion (m^2/s)
- t : Temps (s)
- x : Distance à l'origine (m)

Pour connaître le temps de diffusion caractéristique d'une molécule nous pouvons utiliser l'équation suivante :

$$t = \frac{L_D^2}{D} \quad (3.4)$$

Avec,

- L_D : Distance à parcourir (m)
- t : Temps de diffusion (s)

Pour avoir un ordre de grandeur de temps de diffusion, prenons l'exemple de l'autodiffusion d'une molécule d'eau dans l'eau :

Pour $L_D = 1$ cm, $t = 4,7$ heure

Pour $L_D = 100 \mu\text{m}$, $t = 1,7 \text{ sec}$

Les coefficients de diffusion varient en fonction de la molécule concernée ainsi à 300K [Zengerle 2006] :

Pour l'autodiffusion de l'eau : $D = 3.0 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$

Pour une molécule de rhodamine 6G dans l'eau : $D = 0.3 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$

Pour une protéine IgG du système immunitaire dans l'eau: $D = 0.05 \times 10^{-9} \text{ m}^2/\text{s}$

De nombreuses recherches ont été menées en microfluidique pour permettre d'améliorer les performances des mélangeurs. [Campbell 2004] L'efficacité du mélange entre deux fluides est directement liée à l'aire de l'interface les séparant. C'est à travers cette interface que la diffusion moléculaire, permettant le mélange, peut avoir lieu. Ainsi la plupart des mélangeurs ont pour but d'augmenter l'interface entre les liquides à mélanger. Nous pouvons distinguer deux grandes familles de mélangeurs en microfluidique : les mélangeurs actifs et les mélangeurs passifs.

Les mélangeurs actifs utilisent un élément d'action externe pour effectuer le mélange. Ce type de mélangeur offre l'avantage de fournir un contrôle à distance de l'activité du mélangeur. Les mélangeurs actifs développés en microfluidique utilisent des moyens d'actions physiques très variés comme l'agitation magnétique, ultrasonique, thermique ou électrocinétique. Les mélangeurs passifs quand à eux utilisent la plupart du temps leur géométrie pour améliorer l'efficacité du mélange. Les mélangeurs passifs étant les plus utilisés, les plus simples à mettre en œuvre et les plus faciles à intégrer dans des dispositifs microfluidiques complexes, nous focaliserons notre présentation sur ces derniers.

Le mélangeur passif le plus simple est le serpentin qui permet d'augmenter la longueur du canal et ainsi le temps de résidence du fluide dans le mélangeur (Figure 3.4). Le temps de diffusion diminuant au carré de la largeur du canal, pour diminuer le temps de mélange et la taille du serpentin, il est préférable d'utiliser des serpentins de faible largeur.

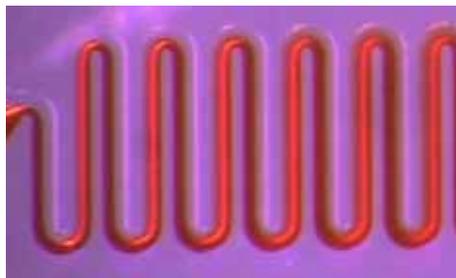


Figure 3.4 : Mélange par diffusion de l'éosine dans l'eau dans le mélangeur en serpentin de notre microcalorimètre.

Ce type de mélangeur est très utilisé car il ne nécessite que les technologies de base nécessaires à la fabrication d'un canal microfluidique. Dans ce type de mélangeur, le temps de mélange dépend de la largeur du canal, il est théoriquement possible de diminuer ce temps à l'infini en diminuant d'autant la taille du canal. Néanmoins les contraintes de microfabrication et les pressions nécessaires pour faire circuler des liquides dans des canaux sub micrométrique permettent difficilement de fabriquer des canaux ayant une largeur inférieure au micromètre.

Pour diminuer le temps de mélange dans un microcanal il est possible d'utiliser un mécanisme appelé « chaos Lagrangien » qui permet de créer un mouvement pseudo chaotique dans un écoulement à faible nombre de Reynolds. Cette méthode permet d'augmenter la

surface d'échange entre les deux fluides très rapidement. En microfluidique le moyen le plus simple pour créer ce type de flux consiste à structurer une des surfaces du canal avec des chevrons. [Stroock 2002] La présence de chevrons crée des zones présentant un diamètre hydraulique plus grand et donc une résistance fluidique plus faible, provoquant ainsi des repliements entre les deux flux de liquides (Figure 3.5). Ce type de mélangeur permet de mélanger un volume de 200 nL en moins d'une seconde.

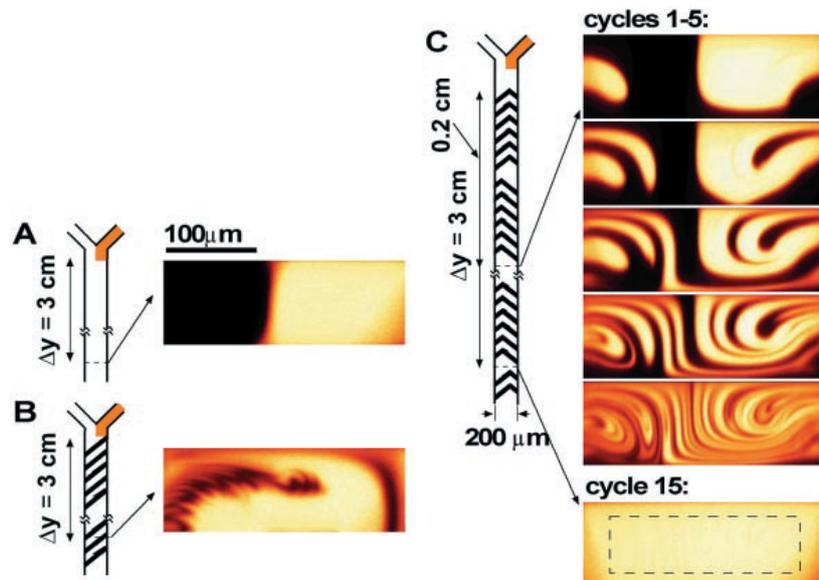


Figure 3.5 : Illustration du fonctionnement du mélangeur à chevrons. A : Dans un canal sans microstructure l'écoulement reste laminaire, le mélange s'effectue par diffusion. B : Dans un canal microstructuré avec des barres parallèles, le flux n'est pas laminaire mais l'interface entre les liquides reste faible. C : Avec la structure en chevrons, les lignes de flux se replient les unes sur les autres ce qui augmente l'interface entre les liquides et la vitesse de mélange.

Cette méthode présente l'avantage de fonctionner avec des dispositifs PDMS une couche. La seule difficulté de cette méthode apparaît lors de la fabrication du moule qui nécessite deux épaisseurs différentes de résine pour la fabrication des chevrons.

Une autre méthode appelée focusing hydrodynamique permet de mélanger très rapidement ($10 \mu\text{s}$) de petits volumes de fluide (5 nL). Il consiste à utiliser un flux de liquide pour réduire la taille d'un autre écoulement afin de diminuer la distance caractéristique de diffusion (Figure 3.6) [Knight 1998].

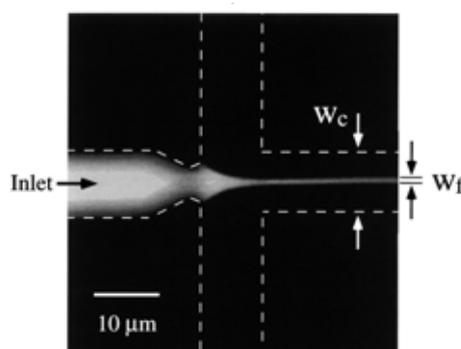


Figure 3.6 : Photo illustrative du focusing hydrodynamique. La vitesse de mélange des deux liquides dépend de la largeur du faisceau de sortie (W_f). [Knight 1998]

Cette méthode utilise des technologies de moulage simple couche de base mais nécessite toutefois un bon contrôle des pressions d'entrées.

Il existe de nombreux autres types de mélangeurs passifs en microfluidique utilisant différentes méthodes pour augmenter l'efficacité du mélange, que se soit en créant des microgouttes [Song 2003], en séparant et en recombinaut les flux [Kim 2005] ou en utilisant plusieurs couches de canaux pour créer un mouvement chaotique. [Xia 2005]

3.1.3 La microcalorimétrie : état de l'art

La possibilité d'intégrer des éléments de mesure de température dans les microsystèmes a permis le développement de la calorimétrie sur puce. La calorimétrie à conduction est la méthode la plus simple à mettre en oeuvre dans les microsystèmes car elle ne nécessite pas d'isolation thermique spécifique. La plupart des microcalorimètres développés précédemment utilisent cette méthode car une bonne isolation thermique est particulièrement difficile à obtenir aux échelles micrométriques en raison du grand rapport surface/volume des microsystèmes.

La plupart des microcalorimètres proposés utilisent des technologies MEMS sur des substrats en silicium et des thermocouples intégrés pour les mesures de température dans le dispositif (Figure 3.7). Le silicium étant un bon conducteur thermique, ce type de dispositif nécessite généralement des structures suspendues pour limiter les échanges avec le milieu extérieur (Figure 3.8) [Herwaarden 2005] [Lerchner 2005].

Le calorimètre à conduction et à flux continu présenté ci-dessous est fabriqué à l'aide d'une technologie intégrant des microcanaux moulés dans du PMMA, fixés sur une série de thermopiles intégrées suspendues. Ce dispositif mesure la variation de température produite par la réaction chimique lors de la rencontre des deux réactifs dans le microcanal situé au dessus des thermopiles. Ce dispositif permet d'effectuer des réactions enzymatiques et ainsi de détecter des concentrations d'acide ascorbique de $20\mu\text{mol}$, ce qui correspond à une limite de détection de $0.35\mu\text{W}$.

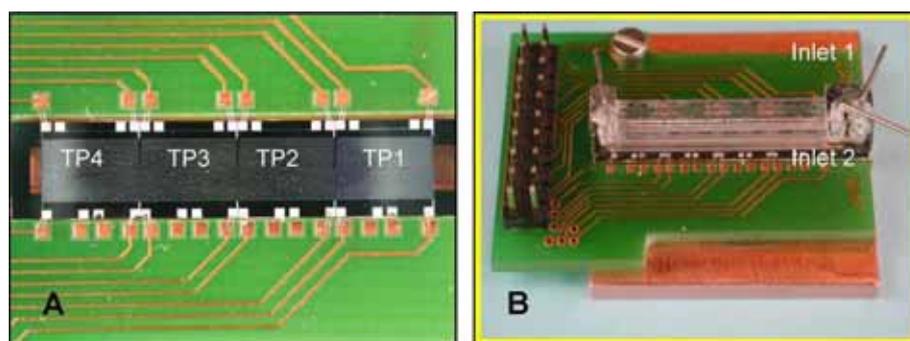


Figure 3.7 : Exemple de calorimètre utilisant une technologie de membrane suspendue en silicium. A : Photo des quatre thermopiles en ligne du dispositif en silicium. B : Microcalorimètre complet comprenant la puce en silicium, les canaux fluidiques en PMMA et une plaque de cuivre utilisé pour stabiliser la température sous le dispositif. [Lerchner 2006 modifié]

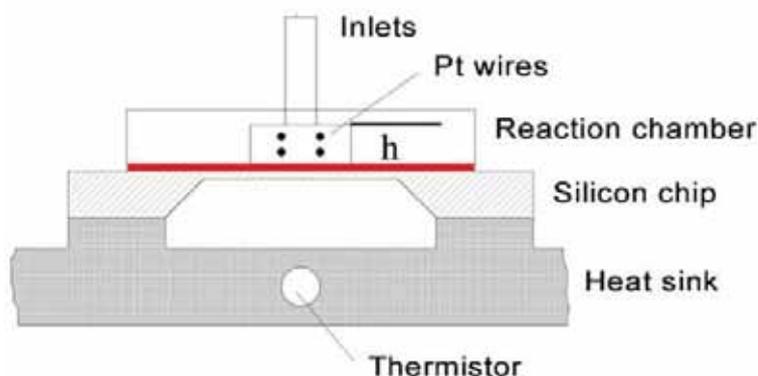


Figure 3.8 : Vue en coupe du calorimètre présenté dans la figure du dessus. Nous pouvons voir en rouge les thermopiles suspendues qui permettent la mesure de température dans le microcanal [Lerchner 2006 modifié].

Le montage utilisé pour les études sur ce calorimètre est constitué d'un thermostat haute précision et de micro échangeurs qui permettent d'uniformiser la température des réactifs avant leur entrée dans le dispositif (Figure 3.9).

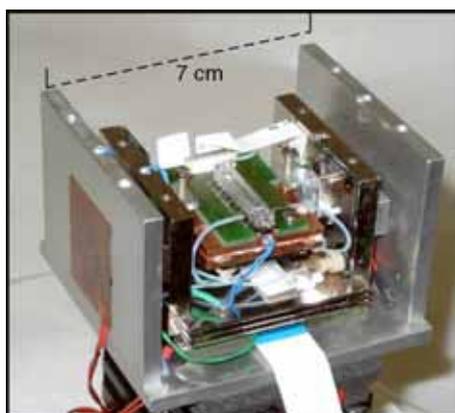


Figure 3.9 : Microcalorimètre monté sur un thermostat haute précision capable de stabiliser la température du dispositif avec une précision de $100\mu\text{K}$. [Lerchner 2005]

Ce type d'installation permet d'isoler complètement le calorimètre du milieu extérieur et permet ainsi de stabiliser la température du dispositif avec une précision de l'ordre de $100\mu\text{K}$.

D'autres microcalorimètres, utilisant une membrane de silicium ou de diélectrique suspendue couplée avec des thermopiles ont été développés pour diverses applications. [Herwaarden 2005] La méthode de mélange en batch a également été utilisée sur certains d'entre eux. [Lerchner 1999, Zhang 2004].

3.2 Microcalorimètre

3.2.1 But et motivation

Le but de ce projet est d'étudier la possibilité d'utiliser les technologies verre/PDMS pour fabriquer un microcalorimètre sur puce. La conductivité thermique du verre étant 100 fois inférieure à celle du silicium il n'est pas nécessaire d'intégrer des microstructures

suspendues sur verre pour isoler thermiquement le système. La possibilité d'intégrer sur un substrat en verre des résistances de platine pour la mesure de température, permet de fabriquer un microcalorimètre à conduction et à flux continu en utilisant des technologies beaucoup moins lourdes que celles utilisées précédemment. Ce type de technologies compatibles avec celles utilisées dans les Labs-on-chip permettra de surcroît d'intégrer ce type de calorimètre dans des systèmes plus complexes.

3.2.2 Présentation du dispositif

Le calorimètre proposé ici est un calorimètre à conduction thermique et à flux continu. Dans ce type de calorimètre les deux réactifs réagissent en continu dans le dispositif pendant un temps donné. En mesurant la variation de température produite par la réaction chimique pendant le temps de circulation des réactifs, il est possible de déterminer l'enthalpie de la réaction ou la concentration des réactifs. Ce système autorise les pertes par conduction, il n'est donc pas adiabatique et les pertes énergétiques dans le substrat devront être prises en compte pour le calcul de l'enthalpie de réaction.

Pour fabriquer ce calorimètre, nous avons utilisé une technologie à base de verre/PDMS intégrant des résistances en platine (Figure 3.10). Il est composé de deux parties distinctes : d'une part un réseau de micro canaux moulés dans un bloc de PDMS pour permettre la circulation des réactifs et d'autre part des résistances en platine déposées sur un substrat en verre pour la mesure de température en différents points du dispositif.

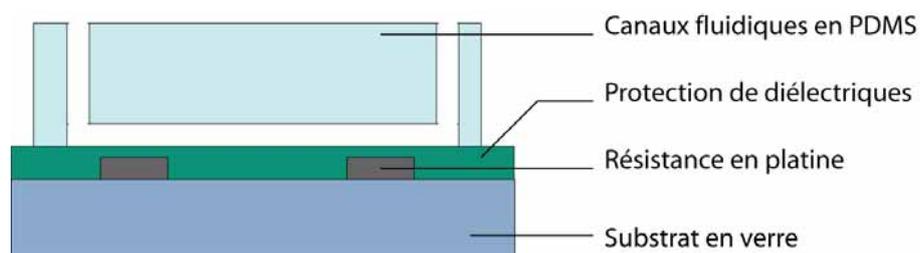


Figure 3.10 : Schéma explicatif de la structure du microcalorimètre proposé

La partie en PDMS contenant les canaux fluidiques peut être séparée en trois zones distinctes : la zone d'entrée des réactifs, une zone d'isolation thermique et le réacteur où les réactifs rentrent en contact et se mélangent (Figure 3.11).

- La zone d'entrée est constituée de deux trous destinés à l'injection des réactifs. Chacun d'eux est suivi d'un long serpentin qui augmente la longueur du chemin fluide à parcourir et permet ainsi d'augmenter le temps de résidence des réactifs dans le dispositif. Les réactifs et le substrat ont ainsi le temps d'échanger de l'énergie et d'égaliser leur température. Une résistance de mesure de température est placée en aval de deux serpentins et permet de connaître la température des liquides à la sortie des serpentins et ainsi d'effectuer les corrections nécessaires en cas de besoin.
- La zone d'isolation thermique, constituée de deux longs canaux dans lesquels les liquides circulent en parallèle, permet d'isoler thermiquement la zone d'injection et le réacteur situé en aval. Cette isolation évite que l'énergie dégagée ou absorbée lors de la réaction chimique en cours dans le réacteur ne se propage par conduction thermique à travers le verre et le PDMS jusqu'aux

résistances de mesures de température situées à la sortie des serpentins d'entrée.

- Dans la partie contenant le réacteur les liquides rentrent en contact, se mélangent par diffusion et réagissent dans un mélangeur en serpentin. Une résistance de platine placée en dessous du mélangeur permet de mesurer la variation de température due à la réaction.

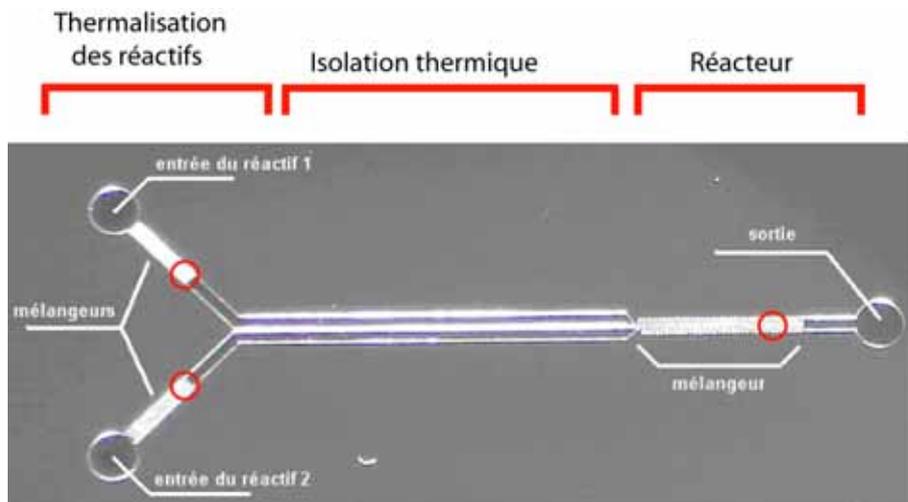


Figure 3.11 : Photographie du moule en résine sur silicium de la partie fluide du microcalorimètre. Les cercles rouges représentent l'emplacement des résistances de mesures de température.

3.2.3 Procédure technologique

La fabrication de ce type de calorimètre utilise des technologies de moulage de PDMS pour la fabrication des canaux fluidiques et de dépôts de couches minces métalliques et diélectrique pour les résistances de mesure de température. L'enchaînement des étapes technologiques utilisées pour fabriquer ce microcalorimètre est détaillé dans la figure 3.12.

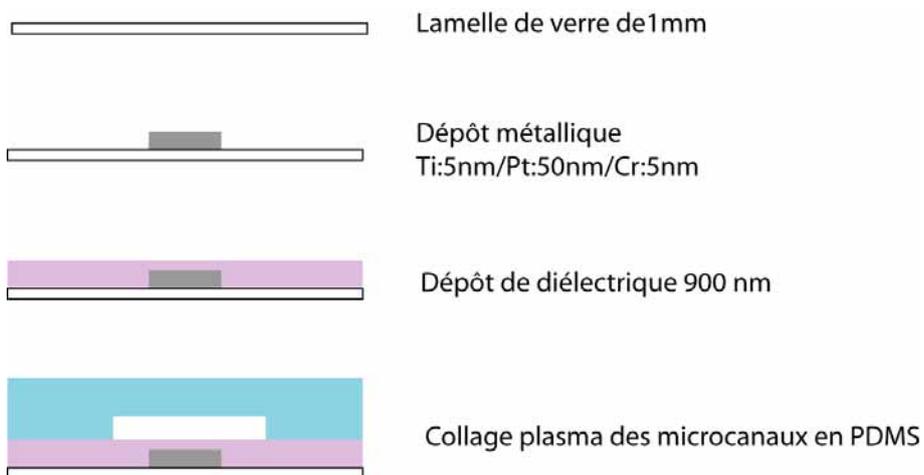


Figure 3.12 : Procédure technologique de fabrication du microcalorimètre.

L'utilisation de dépôts métalliques et de réactifs chimiques dans un même dispositif peut poser des problèmes de corrosion. Ainsi les dépôts métalliques qui nous permettent de fabriquer les résistances de platine nécessaires à la mesure de température sont susceptibles d'être attaqués par les réactifs chimiques présents dans le calorimètre. Les dépôts d'oxydes ou de nitrure de silicium couramment utilisés dans l'industrie microélectronique pour isoler les couches métalliques du milieu extérieur se présentent la plupart du temps sous des formes polycristallines. Ces matériaux, lorsqu'ils sont déposés en couches minces, présentent souvent des défauts de structure qui conduisent à la formation de nano ou de micro pores dans la couche. Ces défauts peuvent conduire à une mauvaise étanchéité et dans notre cas à une détérioration des électrodes par les produits chimiques circulant dans le calorimètre. Pour éviter cette formation de pores dans les couches protégeant nos électrodes nous avons utilisé un empilement de couches de diélectriques. Cet empilement est une alternance de couches de 50 nm de SiO_2 et de 50 nm de Si_3N_4 déposées successivement pour réaliser une couche de protection de 900 nm d'épaisseur. Ce type de couche de diélectrique a par la suite été utilisé dans tous nos autres projets utilisant des électrodes en contact avec des liquides.

3.2.4 Montage

L'appareillage expérimental que nous avons utilisé lors des expériences de calorimétrie est beaucoup plus simple que ceux utilisés habituellement en calorimétrie sur puce. Il est constitué d'un multimètre, d'un pousse seringue et d'une boîte d'isolation thermique. Le dispositif est placé dans une boîte de plexiglas de 1 cm d'épaisseur afin de l'isoler des variations de température extérieures (Figure 3.13). Une plaque de cuivre de 1 cm d'épaisseur sur laquelle est posé le dispositif est placée au fond de la boîte thermique et permet de fixer la température de la partie inférieure du microcalorimètre. Afin d'uniformiser la température des réactifs avant leur entrée dans le dispositif, les tubes contenant ces derniers traversent un baquet d'eau contenu dans la boîte de plexiglas en amont du dispositif.

Pour effectuer les mesures de résistance électrique des pistes de platine nous avons utilisé une station d'acquisition de données Agilent 34970. Cette station d'acquisition est constituée d'un multimètre interne, qui permet d'effectuer des mesures de résistances 4 points, et d'un multiplexeur qui permet de faire commuter le multimètre sur une des trois pistes de platines du calorimètre. L'injection des réactifs à l'intérieur du dispositif est réalisée à l'aide de poussettes seringues Nemesys contrôlés par ordinateur (Figure 3.14).

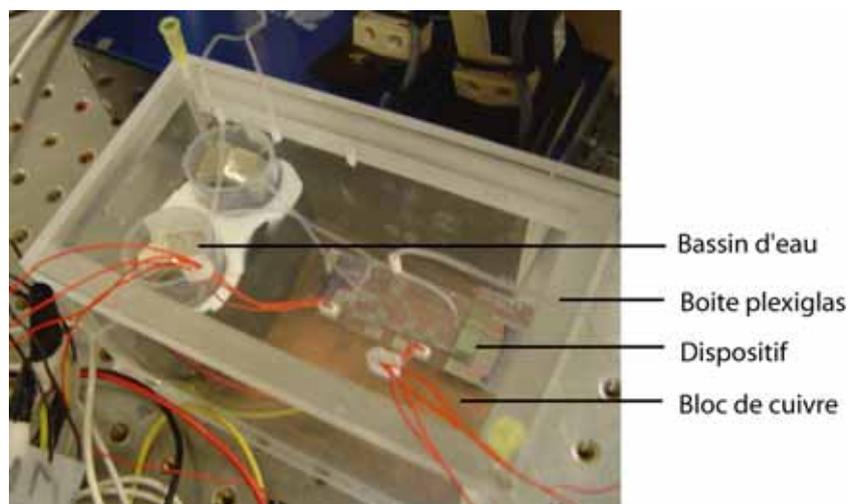


Figure 3.13 : Photographie de la boîte thermique utilisée lors de nos expériences de calorimétrie.

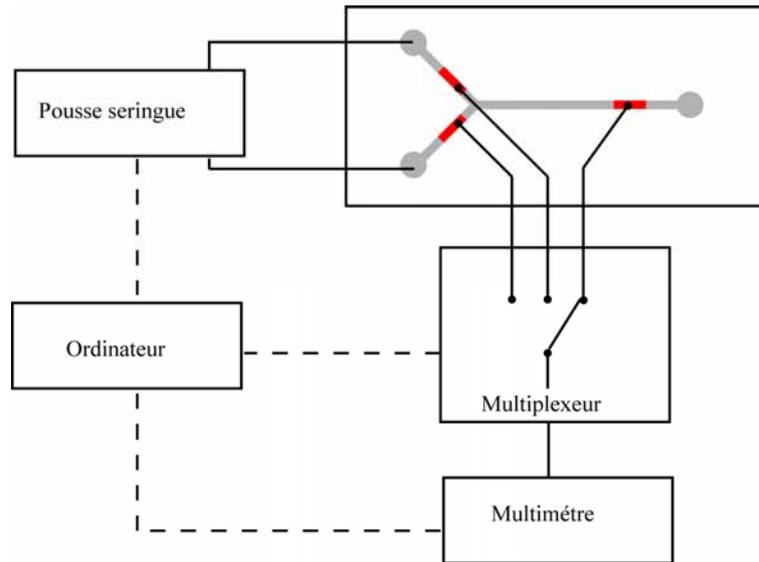
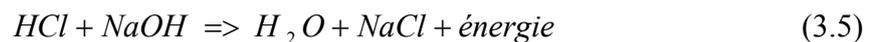


Figure 3.14 : Schémas du montage utilisé pour nos expériences de microcalorimétrie. Les rectangles rouges représentent les résistances intégrées de mesure de température.

3.3 Résultats expérimentaux

3.3.1 Considérations et expériences préliminaires

Afin de déterminer les caractéristiques de notre dispositif nous avons utilisé des réactions de neutralisation acide/base. Ce type de réaction chimique exothermique du premier ordre est très utilisé comme référence pour le calibrage des calorimètres. [Wadso 2001]. Lorsqu'une réaction de neutralisation a lieu dans le mélangeur du calorimètre un dégagement d'énergie se produit.



Cette énergie dégagée par la neutralisation d'un acide par une base provoque une augmentation de la température du milieu (Figure 3.15) :

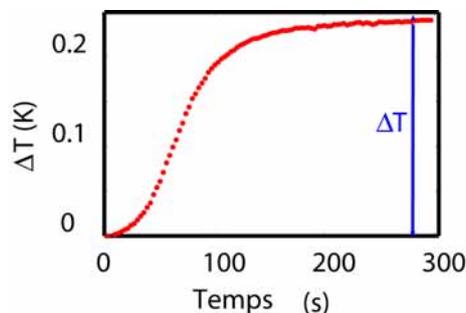


Figure 3.15 : Augmentation de température typique obtenue dans notre calorimètre lors d'une réaction de neutralisation HCl/NaOH.

L'augmentation de température obtenue pour une réaction chimique donnée diminue avec la taille du calorimètre. En effet, le principal problème rencontré en microcalorimétrie

sur puce est le grand rapport surface/volume rencontré dans les microsystèmes. Les pertes thermiques augmentent avec la surface et la génération d'énergie augmente avec le volume des réactifs injectés. Ce fort rapport surface/volume conduit à un grand rapport pertes thermiques /génération d'énergie, ce qui n'est pas favorable à de grandes élévations de température. Pour atteindre la même sensibilité que les calorimètres macroscopiques les microcalorimètres doivent donc compenser cette augmentation de température réduite. Pour cela nous utilisons une méthode de microcalorimétrie en flux continu, qui permet un renouvellement continu des réactifs, couplé avec l'utilisation de matériaux ayant une conductivité thermique relativement faible comme le verre et le PDMS. Ceci nous permet d'atteindre 40% de l'augmentation de température obtenue théoriquement dans une enceinte adiabatique parfaite.

Afin de pouvoir déterminer la concentration des réactifs et l'enthalpie de la réaction à partir de l'augmentation de température obtenue dans notre calorimètre il est nécessaire de modifier l'équation 5.1 afin de prendre en compte les pertes thermiques par conduction à travers le substrat en verre et le PDMS et les pertes thermiques convectives dues au liquide sortant du dispositif. Pour cette raison nous introduisons un coefficient de correction α correspondant aux pertes thermiques propres à notre dispositif, comme décrit dans l'équation ci-dessous :

$$\Delta T_{\text{exp}} = \alpha \cdot \frac{C \cdot (-\Delta H_r)}{\rho C_p} \quad (3.6)$$

Avec,

- C : Concentration (mol/ m³)
- ΔH : Enthalpie de la réaction chimique (J/mol)
- ρ : Densité (Kg/m³)
- C_p : Capacité calorifique (J/Kg.K)
- ΔT : Augmentation de température (K)
- α : Coefficient de correction propre à notre dispositif

Un paramètre important pour fixer α est la valeur du débit de réactif parcourant le dispositif. Dans le cas d'une réaction exothermique de neutralisation par exemple, l'augmentation de température dépend du débit de réactif (Figure 3.16). Cette dépendance est principalement due à la compétition entre deux phénomènes : pour des débits faibles, la quantité de produits chimiques réagissant augmente avec le débit et provoque une augmentation linéaire de la température par rapport au débit, en revanche pour des débits trop élevés, l'intégralité des réactifs n'ont pas le temps de réagir, ce qui provoque une stagnation de l'augmentation de température voire même une diminution de cette dernière. [Zhang, 2004] Les pertes dépendent également de la vitesse du liquide par le biais du coefficient d'échange thermique entre le liquide et les parois du microcanal.

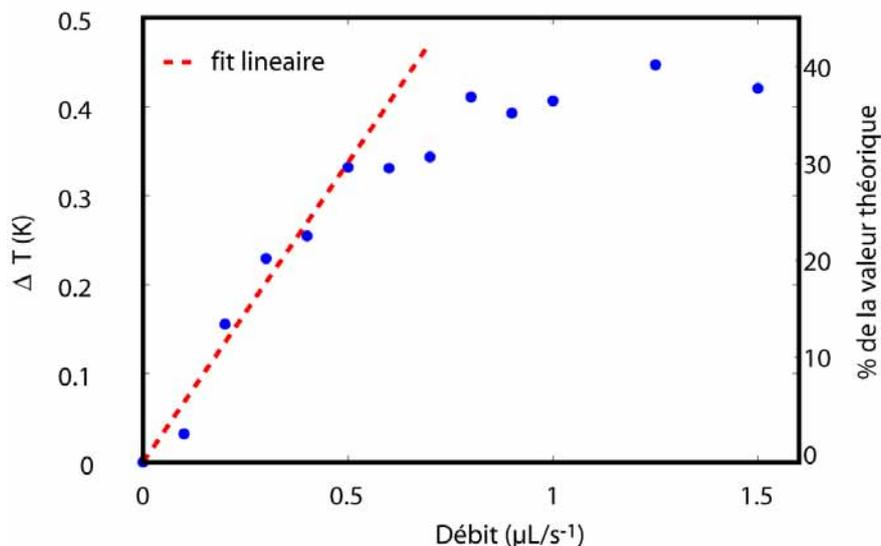


Figure 3.16 : Augmentation de température obtenue dans le calorimètre en fonction du débit de réactif. L'axe des ordonnées sur la droite indique le pourcentage de la valeur théorique adiabatique atteinte lors de la réaction

Pour toutes les expériences de neutralisation effectuées ultérieurement pour étudier les performances de ce microcalorimètre, nous avons utilisé des débits de $0.8\mu\text{L/s}$ qui correspondent au débit maximum permettant de rester dans la partie linéaire de la courbe précédente. Ce débit correspond à une valeur de α de 0.37. Cette valeur est le rapport entre l'augmentation de température calculée à l'aide de l'équation décrivant le cas idéal et l'augmentation de température obtenue dans notre dispositif avec cette valeur de débit.

Afin de minimiser les sources de bruits thermiques extérieurs, nous utilisons les deux résistances situées à l'entrée du dispositif pour corriger les éventuels écarts entre la température du laboratoire, celle des liquides d'entrées et la température du dispositif. En mesurant la température au cours du temps en deux points indépendants du dispositif, il est possible de corriger ce type de contribution thermique extérieure par soustraction des deux signaux. Ainsi le résultat final est la soustraction de la température dans le réacteur et de la température mesuré dans la zone d'entrée des réactifs. Cette correction nous permet de diviser par 20 la contribution des variations de température des liquides d'entrées et de la salle, et ainsi d'atteindre une précision de mesure de l'ordre de la dizaine de milli Kelvin en régime permanent.

La technologie à base de RTD en platine que nous utilisons pose un problème additionnel. La mesure de résistance 4 points nécessite le passage d'un faible courant dans nos pistes de platine. Le courant généré par le multimètre utilisé produit un effet joule et provoque une élévation de température des pistes de platine de l'ordre de 0.1°K . Le mouvement des réactifs chimiques dans les microcanaux crée un mouvement de convection qui modifie les conditions aux limites des pistes de platine. Sans correction, ce changement de coefficient de convection provoque un refroidissement des pistes de platine de 0.03°K lors de la mise en mouvement des liquides avec un débit de $0.8\mu\text{L/s}$. Cette variation de température vient s'ajouter aux variations de température générées par la réaction chimique qui a lieu au même instant dans le mélangeur. Afin de ne pas prendre en compte la variation de température venant du changement de coefficient de convection au dessus des résistances, les canaux microfluidiques du dispositif sont préalablement remplis d'eau. Ainsi lors de la mise en route du flux de réactifs, le coefficient de convection change lors du passage de l'eau et permet une stabilisation de la température avant l'arrivée des réactifs (Figure 3.17).

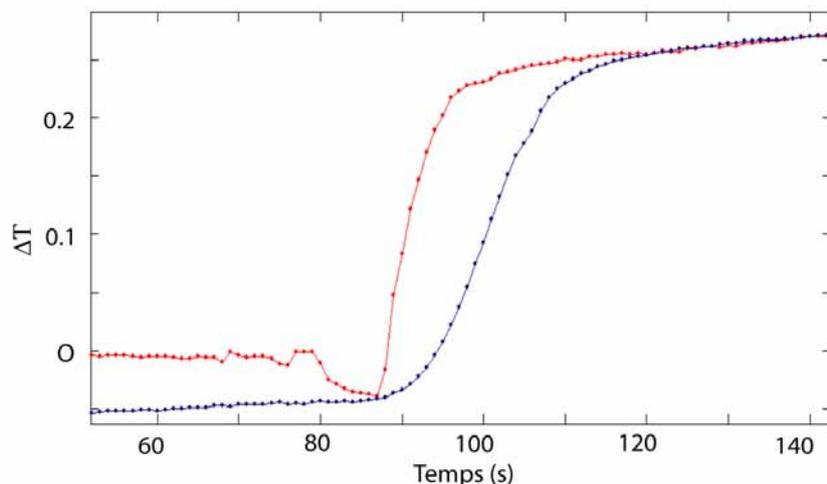


Figure 3.17 : Augmentation de température obtenue lors d'une réaction de neutralisation dans le microcalorimètre. Sur la courbe rouge nous pouvons observer un refroidissement précédant l'augmentation de température due à la réaction chimique. Dans le cas représenté par la courbe bleue les canaux microfluidiques ont été préalablement remplis d'eau et ainsi le refroidissement des résistances par le flux a lieu bien avant le début de la réaction chimique.

3.3.2 Mesures de concentrations et d'enthalpies

Pour connaître les limites de détection de notre calorimètre et vérifier notre capacité à déterminer une enthalpie de réaction, nous avons effectué une série d'expériences de neutralisation de couples acide/bases à différentes concentrations. Pour cela nous avons sélectionné un couple monoacide NaOH/HCl et un couple diacide NaOH/H₂SO₄. Les augmentations de température obtenues en fonction de la concentration des réactifs sont données dans la figure 3.18.

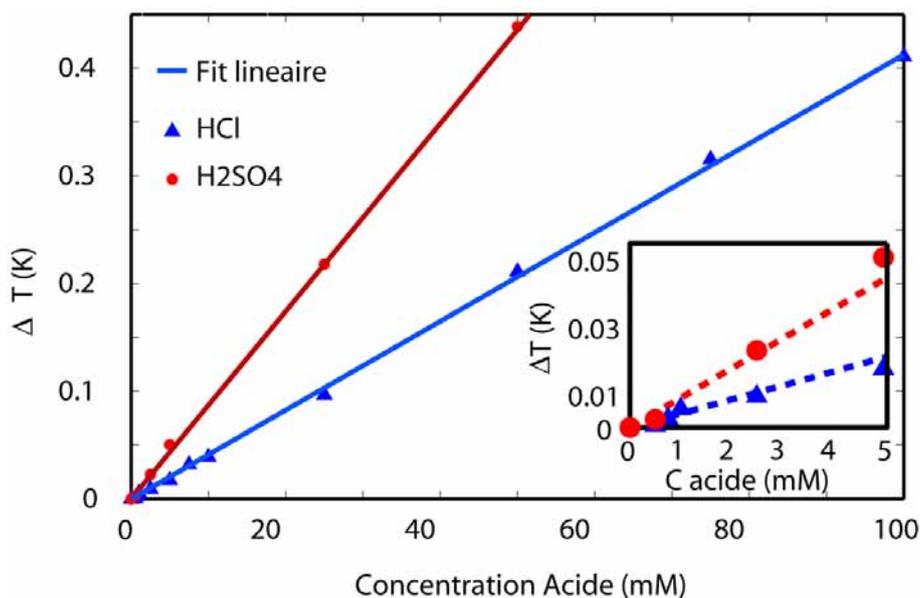


Figure 3.18 : Augmentation de température en fonction de la concentration des réactifs obtenus lors d'une réaction de neutralisation. Insert : Zoom pour les concentrations inférieures à 10mM, les pentes des fit linéaires sont identiques à celles du graphique principal.

Comme décrit dans l'équation (5.2), l'augmentation de température dans le réacteur augmente linéairement avec la concentration des réactifs. Dans les conditions d'expérimentations utilisées, le dispositif a une limite de détection de 500 μ M pour une réaction de neutralisation acide/base, ce qui correspond à une limite de détection de 20 μ W.

A l'aide l'équation (5.2), connaissant α et ρC_p , il est possible de déduire l'enthalpie de la réaction chimique à partir de la dérivée de la droite de l'élévation de température en fonction de la concentration [Table 3.1].

Acide	$\Delta H_{théo}$ (KJ/mol)	ΔH_{exp} (KJ/mol)	Pente
HCl	-47	-46.87	4.142
H ₂ SO ₄	-111.6	-99.27	8.772

Table 3.1 : Comparaison entre les enthalpies de réaction calculées à l'aide de nos mesures et les enthalpies théoriques des réactions chimiques.

Les enthalpies de réaction calculées à l'aide de l'équation 5.2 et de nos mesures sont en accord avec les valeurs d'enthalpies théoriques de ces réactions chimiques. Ainsi nous obtenons des résultats en adéquation avec l'équation 5.2, que ce soit au niveau de la linéarité de l'augmentation de température avec la concentration ou lors du calcul des enthalpies de réaction. Ce calcul de l'enthalpie à partir de nos mesures et de l'équation (5.2) permet d'obtenir une bonne approximation de l'enthalpie de réaction du couple HCl/NaOH par contre il sous estime de 10% l'enthalpie de réaction du couple H₂SO₄/NaOH.

3.3.3 Réaction enzymatique

Nous avons également effectué une expérience préliminaire mettant en jeu une réaction enzymatique glucose /glucose oxydase pour démontrer la possibilité d'effectuer des réactions biochimiques dans notre dispositif. La figure 3.19 montre l'augmentation de température obtenue pour une réaction enzymatique glucose/glucose oxydase .

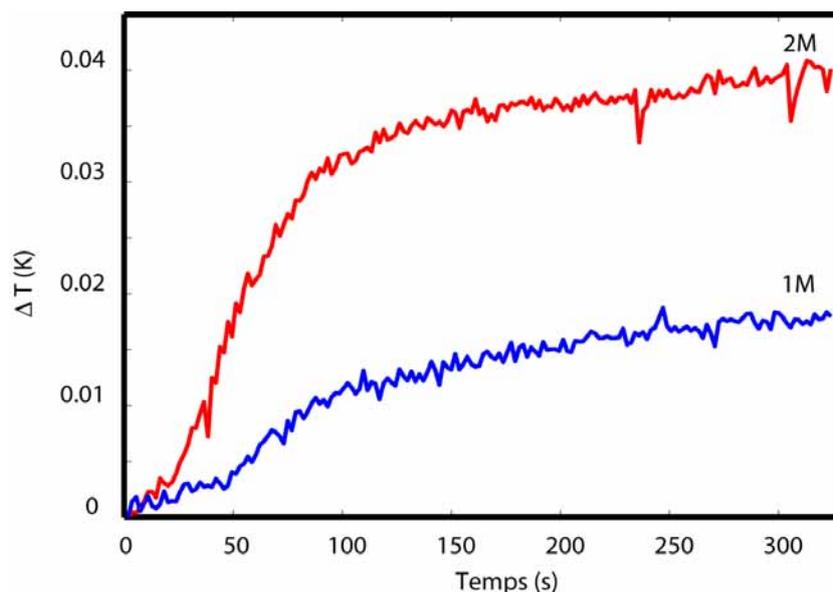


Figure 3.19 : Augmentation de température obtenue lors d'un réaction enzymatique glucose/glucose oxydase.

Contrairement au silicium, le PDMS est perméable au gaz, [Charati 1998] de ce fait il permet une constante introduction d'oxygène dans les microcanaux permettant ainsi d'effectuer des réactions chimiques aérobies.

Ces premiers résultats montrent la possibilité d'effectuer des réactions enzymatiques dans ce microcalorimètre. Une étude plus approfondie avec des débits de réactifs adaptés aux réactions enzymatiques lentes sera nécessaire pour connaître les limites de détection du calorimètre pour ce type de réaction.

3.3.4 Discussions

Les expériences menées lors de cette étude n'utilisent pas de concentration d'acide/base supérieure à 0.1 M car la formation de cristaux de sels à ces concentrations conduit à l'obstruction des canaux microfluidiques. La formation de cristaux de sel apparaît à des concentrations 10 fois moindres dans notre dispositif que lors d'expériences macroscopiques. Nous avons également remarqué ce phénomène de décalage dans les concentrations limites de solubilité lors de recherches en cristallisation de protéines sur puce.

Les résultats obtenus dans ce dispositif sont en adéquation avec la théorie et permettent d'atteindre une limite de détection de 500 μmol sur des réactions de neutralisation monoacide/base. Cette limite de détection est identique à celle obtenue lors de réactions de neutralisation sur les microcalorimètres en silicium en batch. [Lerchner 1999] Par contre, en extrapolant les résultats obtenus sur le microcalorimètre à base de silicium en flux continu le plus abouti, [Lerchner 2006] ce dernier serait capable d'atteindre des limites de détection 50 fois inférieures sur ce type de réaction. Cette différence de limite de détection peut néanmoins être facilement expliquée et minimisée en modifiant le montage.

Afin d'améliorer les limites de détection d'un calorimètre il est possible de jouer sur trois paramètres : Augmenter l'élévation de température obtenue pour une réaction donnée, améliorer la précision de la mesure de température et minimiser les perturbations thermiques extérieures.

L'élévation de température dans notre système représente 40% de la valeur maximale que l'on peut atteindre dans un calorimètre idéal avec ce type de réaction. Même si, comme nous le verrons par la suite, ce rendement peut être amélioré, la principale différence entre notre système et les autres microcalorimètres ne provient donc pas de cette augmentation de température.

En revanche, la différence de température relative la plus faible mesurable à l'aide des thermopiles intégrées dans le calorimètre présenté plus haut est de l'ordre de la centaine de microkelvins alors que la résolution relative de nos mesures de température à base de RTD est de quelques millikelvin. De plus les variations de température extérieure dues à un mauvais contrôle de la température de l'environnement de notre dispositif et des réactifs d'entrées provoque des variations de température de plusieurs millikelvins durant les quelques dizaines de secondes nécessaires pour effectuer nos réactions chimiques.

Pour atteindre les limites de détection des meilleurs calorimètres en silicium il est donc nécessaire d'effectuer deux modifications sur le montage et éventuellement une modification sur le dispositif :

- Utiliser un thermostat similaire à ceux utilisés dans les montages de microcalorimétrie décrits plus haut et permettant d'atteindre une stabilité en température de 100 μK .

- Augmenter la précision des mesures de résistance en utilisant un multimètre 8 chiffre $1/2$ (exemple : Agilent 3458). Ce type de multimètre permettrait d'effectuer des mesures de températures sur nos RTD avec une précision relative de $100\mu\text{K}$.
- Augmenter la valeur des résistances de mesure d'un facteur 100 pour atteindre quelques centaines de kilo-ohms permettrait de diminuer d'un facteur 100 l'influence de l'effet joule résultant de la mesure 4 points.

Il serait également possible d'effectuer une mesure différentielle pour éliminer les artefacts comme la variation de température de la salle ou le refroidissement de nos résistances de mesure de température lors de la mise en mouvement des liquides.

Le dernier levier pour améliorer la limite de détection d'un calorimètre consiste à augmenter l'élévation de température produite par une réaction donnée pour se rapprocher au maximum du cas adiabatique.

Dans notre cas, l'utilisation d'un mélangeur plus efficace, comme les mélangeurs chaotiques à chevrons [Stroocks 2002] permettrait d'obtenir des augmentations de températures plus élevées et d'économiser des réactifs.

Une autre solution consiste à remplacer la lamelle de verre par un substrat en polymère du type LDPE. [cf annexe B] La faible conductivité de ce type de polymère permettrait de limiter les pertes par conduction dans le substrat et ainsi d'obtenir une plus grande élévation de température lors de la réaction.

3.4 Conclusions et perspectives

Le but de ce projet était de démontrer la possibilité d'utiliser un dispositif microfluidique simple en verre PDMS intégrant des résistances de mesure de température en platine pour effectuer de la calorimétrie sur puce. Nous avons proposé, ici, un calorimètre à conduction thermique et à flux continu utilisant pour la première fois une technologie verre/platine/PDMS beaucoup plus simple que les technologies MEMS à base de silicium et de thermopiles proposées précédemment.

Les fortes pertes par conduction thermique propres aux microsystèmes ne sont pas favorables à de fortes augmentations de température lors d'une expérience de calorimétrie. Néanmoins, la faible conductivité thermique des matériaux utilisés pour fabriquer ce calorimètre, nous permet d'atteindre 40% de l'augmentation de température obtenue théoriquement dans une enceinte adiabatique parfaite. Lors de réactions de neutralisation, ce calorimètre permet d'atteindre une limite de détection de $500\mu\text{M}$ correspondant à une puissance de $20\mu\text{W}$. Bien que cette puissance minimum détectable reste 50 fois plus élevée que la puissance minimum détectable dans les microcalorimètres utilisant des technologies à base de silicium les plus abouties, l'utilisation d'un montage aussi abouti que ces derniers permettrait d'atteindre des résultats similaires. Nous avons également montré la possibilité d'effectuer des réactions enzymatiques aérobie dans notre dispositif en tirant parti de la perméabilité du PDMS aux gaz.

Nous avons ainsi démontré pour la première fois la faisabilité d'un microcalorimètre utilisant une technologie simple et compatible avec celles utilisées pour les laboratoires sur puce. Ce dispositif simple pourrait ainsi être intégré dans un système plus complexe pour effectuer du suivi de process.

Chapitre 4 :

Contrôle de température à base de résistances intégrées : Application à la micro-PCR

Nous avons, ici, utilisé la lithographie molle du PDMS et des dépôts de couches minces pour fabriquer un dispositif de PCR sur puce, performant et réutilisable. Ce contrôle de température utilise des éléments de chauffe intégrés, transparents en ITO, et des résistances en platine pour la mesure de température. La partie microfluidique en PDMS utilise une technologie bicouche qui intègre un réseau de microcanaux pour le refroidissement de la chambre de PCR.

Après une explication sur la PCR, nous dresserons un état de l'art des dispositifs de micro PCR. Nous présenterons par la suite : le dispositif proposé, ses caractéristiques thermiques et une expérience de biologie moléculaire effectuée avec ce dernier.

4.1 Introduction

La PCR (Polymerase Chain Reaction), inventée par Kary Mullis en 1985, est une méthode qui permet de dupliquer plusieurs milliards de fois une séquence d'ADN ou d'ARN connue. L'ADN à dupliquer peut être présent en très faible quantité dans la solution initiale. Théoriquement une seule molécule d'ADN suffit pour commencer la réaction. Cette méthode utilise les propriétés de synthèse enzymatiques des ADN polymérase et la faculté d'hybridation et de déshybridation des brins d'ADN en fonction de la température. Lors d'une PCR, un mélange contenant la séquence d'ADN à dupliquer, une enzyme polymérase, deux amorces et des nucléotides libres, subit un cycle de 3 températures spécifique : à 94°C, l'ADN double brin se scinde en deux ADN simple brin, à 60°C, deux petites séquences d'ADN, appelées amorces, viennent se fixer sur l'ADN cible simple brin pour délimiter la séquence d'ADN à amplifier, à 72°C, l'enzyme polymérase s'active et duplique l'ADN cible situé entre les deux amorces. La Figure 4.1 illustre le déroulement d'une réaction de PCR.

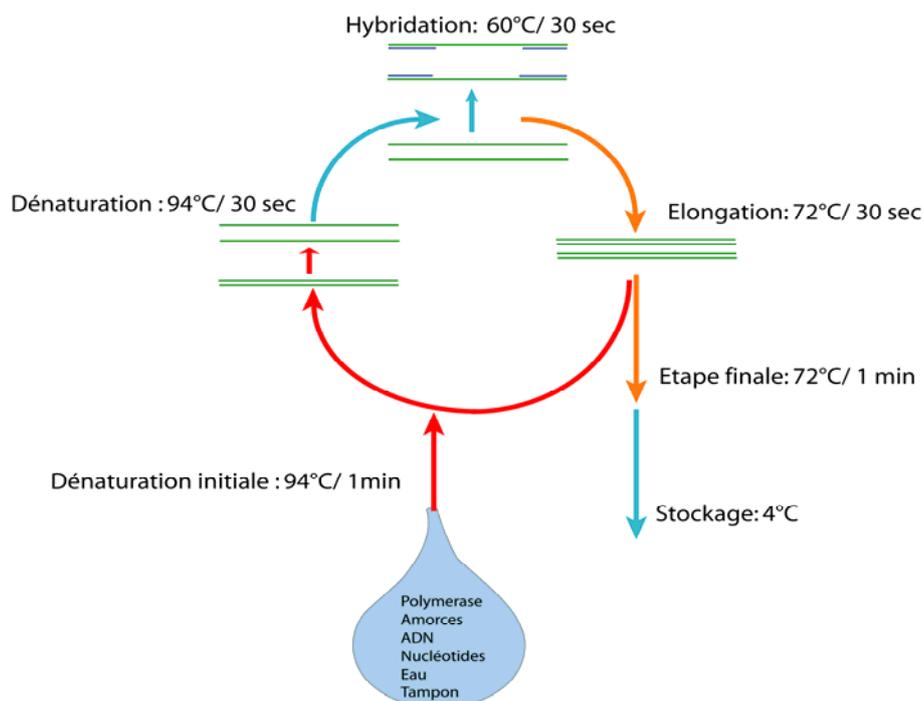


Figure 4.1 : Schéma illustrant les étapes successives nécessaires pour effectuer un cycle de PCR

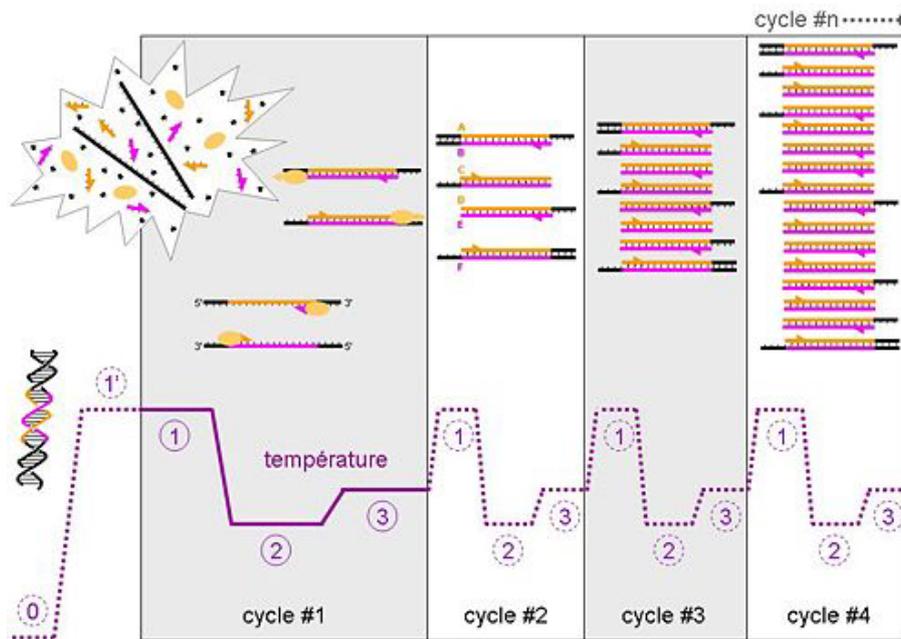


Figure 4.2 : Amplification d'une séquence d'ADN en fonction du nombre de cycles de PCR
 Source : Wikipedia

Théoriquement, à chaque cycle de température, la quantité d'ADN cible présent dans la solution double (Figure 4.2). La réaction continue jusqu'à épuisement d'un des réactifs. Il est ainsi possible de dupliquer des milliards de fois la séquence initiale.

La température est un paramètre important à contrôler pour effectuer une PCR. Un mauvais contrôle de température peut conduire à des réactions chimiques incomplètes et à une mauvaise amplification du fragment d'ADN à dupliquer.

Les contrôles de températures macroscopiques utilisés dans les thermocycleurs commerciaux sont précis et ont fait leurs preuves. Toutefois la taille des systèmes utilisés permet difficilement d'atteindre des changements de température dépassant quelques degrés par seconde et nécessitent des volumes importants de réactifs.

L'intégration de la réaction de PCR dans des dispositifs microfluidiques a de nombreux avantages. La faible taille du dispositif permet d'atteindre des vitesses de chauffe et de refroidissement inégalées dans les systèmes macroscopiques. La miniaturisation permet d'intégrer une grande quantité de chambres de PCR sur le même dispositif et autorise ainsi une forte parallélisation de la réaction de PCR, [Burns 1996] permettant ainsi de limiter les contaminations inhérentes aux manipulations des échantillons et de faciliter la réalisation de screening automatiques. Les faibles volumes mis en jeu permettent d'économiser les réactifs et rendent possible l'amplification de l'ADN ou de l'ARN d'une cellule unique [Lagally 2001]. De plus, l'intégration sur la même puce d'étapes de lyse cellulaire, de PCR et d'électrophorèse permettrait d'effectuer toutes les étapes nécessaires à une analyse génomique sur une même puce. [Zhang 2005]. Néanmoins, la miniaturisation présente quelques désavantages comme le grand ratio surface/volume caractéristique des microsystèmes qui favorise l'adsorption des protéines et de l'ADN sur les parois du dispositif. Ce problème peut toutefois être résolu par des traitements de surface spécifiques qui réduisent grandement l'absorption des molécules d'intérêts sur les parois de la chambre de PCR. [Zhang 2005]

4.2 Présentation du dispositif

4.2.1 Etat de l'art

Les premiers dispositifs de PCR sur puce utilisaient un substrat en silicium [Woolley 1996]. L'utilisation de substrat en silicium impliquait l'utilisation de technologies lourdes et posait des problèmes d'étanchéité et d'observation de l'échantillon. Le développement de la « soft lithographie » a rendu le prototypage de dispositif de PCR intégré plus facile et de nombreuses recherches sur les PCR sur puce ont été publiées au cours des dernières années [Zhang 2005]. Il existe deux méthodes principales pour effectuer les cycles de températures nécessaires à la PCR. La méthode que nous avons choisie qui est aussi la plus répandue consiste à garder l'échantillon immobile et à changer la température du milieu au cours du temps. La seconde méthode, moins répandue, consiste à déplacer l'échantillon dans différentes zones du dispositif fixées à des températures différentes.

De nombreux dispositifs à base de silicium [Daniel, 1998] ou utilisant divers polymères ont été proposés [Auroux 2004]. Bien que le PDMS présente certains défauts pour les applications de PCR sur puce, les recherches utilisant le moulage de ce polymère pour la fabrication de dispositif de PCR sur puce, continuent à se développer fortement. Les recherches importantes menées dans ce domaine ont permis de trouver des solutions aux défauts du PDMS pour les applications de PCR. Le principal défaut du PDMS, qu'il partage avec la majorité des autres technologies, est sa faculté à adsorber les macromolécules comme l'ADN. Afin de remédier à ce problème il est nécessaire de modifier les propriétés de surface du PDMS. De nombreux traitements de surface ont été mis au point comme l'injection préalable d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumine) dans les microcanaux. L'autre défaut principal du PDMS pour les applications de PCR, est sa perméabilité à la vapeur d'eau. Lors du cyclage en température, l'eau contenue dans le dispositif s'évapore à travers le PDMS ; pour remédier à ce problème, il est possible de saturer le PDMS d'eau, à l'aide de canaux d'hydratation. Ces canaux remplis d'eau sont généralement situés dans une couche surplombant la chambre de PCR et doivent couvrir toute la surface de cette dernière.

Afin d'analyser le résultat d'une PCR il est nécessaire d'effectuer une étape supplémentaire, une fois la PCR terminée. Il s'agit généralement d'une électrophorèse. Mais cette étape ne permet pas de quantifier précisément la quantité d'ADN amplifiée. La PCR en temps réel résout ce problème. Cette méthode découverte en 1992 [Higuchi 1992] permet de suivre le bon déroulement de la réaction de PCR et d'estimer la quantité d'ADN dupliquée lors de la réaction, en ajoutant un marqueur fluorescent au mélange de PCR. Dans la méthode la plus couramment utilisée, la fluorescence du marqueur augmente grandement lorsque celui-ci est intercalé dans un ADN double brin. Au cours de la PCR, la quantité d'ADN double brin augmente à chaque cycle. En effectuant une mesure de fluorescence à chaque cycle il est ainsi possible de quantifier la quantité d'ADN double brin et l'efficacité de la PCR. L'obtention de toute la cinétique réactionnelle de polymérisation permet de connaître la quantité d'ADN initiale de l'échantillon, à l'aide d'un traitement mathématique simple.

Malgré le nombre de recherches effectuées sur la PCR sur puce, aucun dispositif permettant des changements de températures aussi rapides lors du refroidissement que de la chauffe n'a été publié. A l'exception, toutefois, des technologies utilisant du silicium qui possède une conductivité thermique de deux ordres de grandeur au dessus de tous les polymères. Pourtant un refroidissement trop lent est susceptible de provoquer des réactions parasites lors du passage à la température de dénaturation. A l'heure actuelle, les vitesses de refroidissement pour PCR utilisant des technologies à base de PDMS sont de l'ordre de quelques degrés par seconde. [Zhang 2005].

Les problèmes de contamination, d'une expérience à une autre, incitent les biologistes à utiliser des dispositifs jetables. Mais les technologies utilisées pour la fabrication des électrodes de chauffe sont souvent lourdes à mettre en œuvre et conduisent à des dispositifs coûteux. Aucune solution permettant de réutiliser les dispositifs sans risquer de contamination entre les expériences successives n'a été proposée pour l'instant.

4.2.2 But, principe et structure du dispositif

Le but de ce projet est de coupler les avantages de la lithographie molle du PDMS et des dépôts de couches minces (Figure 4.3) pour fabriquer un dispositif de PCR sur puce, performant et réutilisable. Le dispositif devra permettre le suivi d'un signal fluorescent au cours de la PCR et intégrer un système de refroidissement performant.

Le dispositif proposé est composé de deux parties distinctes :

- Des dépôts de couches minces sur un substrat en verre pour la chauffe et la mesure de température.
- Un assemblage de couche de PDMS contenant la chambre réactionnelle et le système de refroidissement.

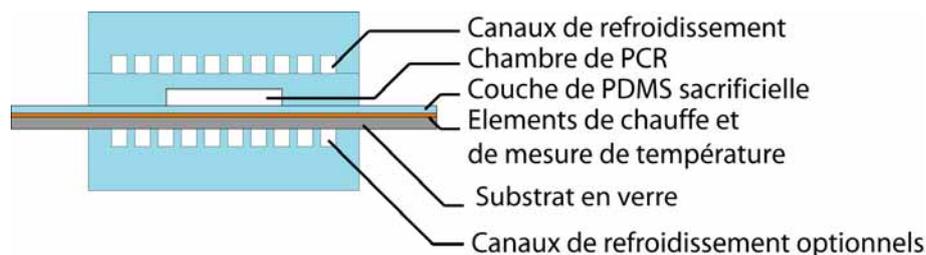


Figure 4. 3: Schémas simplifié du dispositif de PCR proposé

Afin de permettre le suivi par fluorescence de la réaction, l'élément chauffant du dispositif est composé d'une couche mince transparente d'ITO. Une piste de platine déposée au dessus de la couche d'ITO permet de mesurer localement la température au cours de la réaction. Afin d'atteindre la température désirée, le courant traversant la couche d'ITO est adapté en fonction de la température mesurée par la piste de platine.

Les technologies multicouches de PDMS nous permettent de fabriquer des dispositifs microfluidiques contenant plusieurs étages de microcanaux avec des distances entre les couches, d'une dizaine de microns. Cette faible épaisseur de séparation entre les couches nous permet de tirer avantage de la rapidité et de l'efficacité des transferts thermiques aux petites échelles. Dans sa version la plus simple, la partie fluide est constituée de trois couches :

- La première couche de PDMS, en contact avec la lamelle de verre, sert de couche sacrificielle. Elle permet de séparer, une fois l'expérience terminée, la partie fluide et la partie contenant les électrodes.
- La seconde couche contient la chambre réactionnelle contenant le mélange de PCR.
- Une troisième couche, collée au dessus de la couche contenant la chambre de PCR, contient les canaux de refroidissement.

4.2.3 Technologies utilisées

La base de notre dispositif est constitué d'une lamelle de verre de l'épaisseur désirée (250 μ m ou 1mm) sur laquelle nous avons déposé une couche d'ITO de 10 Ω/\square uniformément sur toute la surface et dont la forme sera déterminée ultérieurement par photolithographie. L'ITO est un oxyde résistif, il a l'avantage d'être transparent lorsqu'il est déposé en couche mince. Lorsqu'un courant traverse une piste d'ITO, celle-ci s'échauffe par effet joule ; ainsi en faisant varier le courant, il est possible de faire varier la température de la piste et celle du milieu environnant. Une piste de platine de 50 nm d'épaisseur permet de déterminer la température de la piste d'ITO localement par une simple mesure de la résistance électrique. Afin de préserver la transparence du dispositif, la piste de platine est localisée dans une zone restreinte. Afin d'éviter les contacts électriques entre la piste d'ITO et la piste de platine, une couche de diélectrique sépare les deux couches. Une seconde couche de diélectrique est déposée sur le platine pour éviter toute fuite électrique entre la piste de platine et les futurs canaux fluidiques. Le dépôt de platine est un assemblage de 5nm de titane, de 50 nm de platine, et de 5nm de chrome afin de permettre l'adhésion de la couche métallique aux diélectriques situés de chaque côté de cette dernière. Une fois toutes les étapes technologiques terminées, les contacts électriques sur l'ITO et sur les pistes de platine sont effectués à l'aide d'une colle époxy conductrice. La procédure technologique de fabrication du dispositif est détaillée sur la figure 4.4.

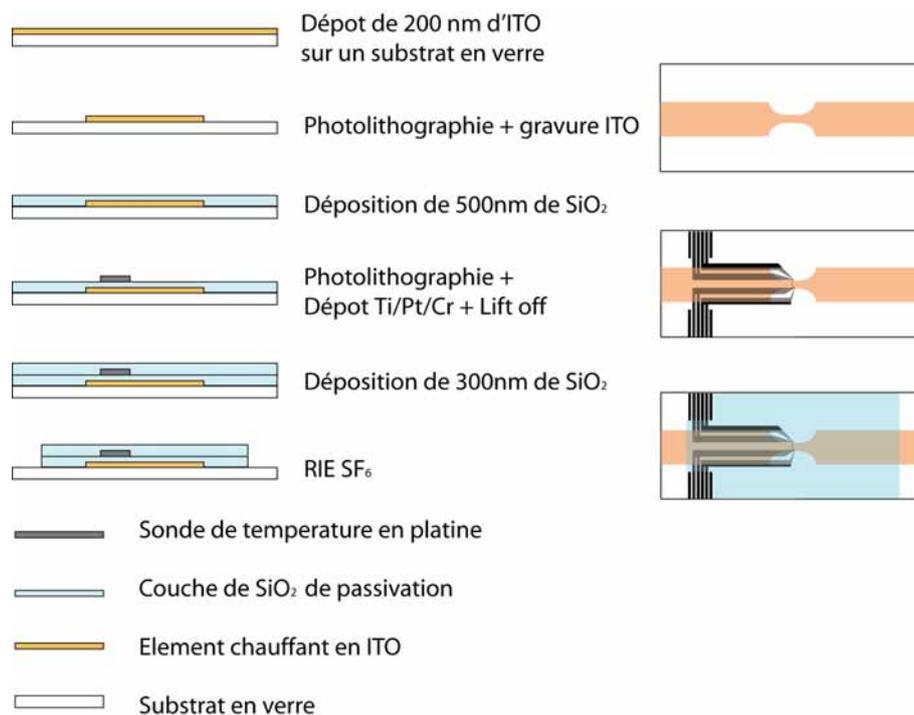


Figure 4.4 : Procédure technologique d'intégration des éléments de chauffe et de mesure de température sur le substrat en verre

Comme décrit auparavant la partie fluidique est constituée d'un empilement de trois couches de PDMS (Figure 4.5-6). La première couche de PDMS, utilisée comme couche sacrificielle, est spincoater à 6000tr/min, sans traitement plasma préalable, sur la lamelle de verre contenant les électrodes. En l'absence de traitement plasma préalable des surfaces, aucune liaison covalente ne lie la couche de PDMS et la lamelle de verre. Il sera donc

possible de les séparer par simple action mécanique. En parallèle, comme décrit sur le schéma techno ci-dessous, un bloc de PDMS dans lequel sont moulés les canaux de refroidissement est collé par plasma au dessus d'une fine couche de PDMS spincoaté à 3000tr/min sur un moule contenant le design des chambres de PCR. Cet assemblage de canaux de refroidissement et de chambre de PCR est ensuite collé de manière covalente, à l'aide d'un traitement plasma sur la couche de PDMS sacrificielle. En fonction des contraintes liées à l'application voulue, il est également possible de coller un bloc de PDMS additionnel contenant des canaux de refroidissement au dos de la lamelle de verre.

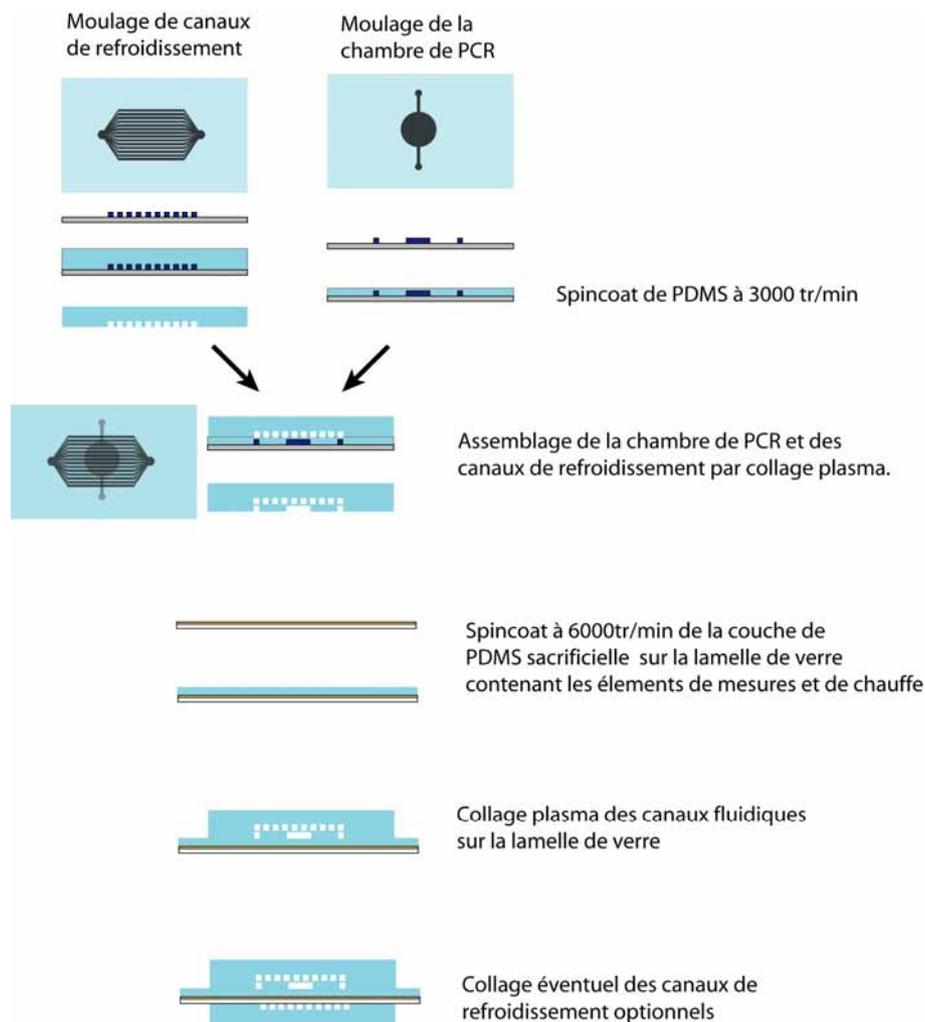


Figure 4.5 : Etape de fabrication technologique de la partie fluidique du dispositif de PCR

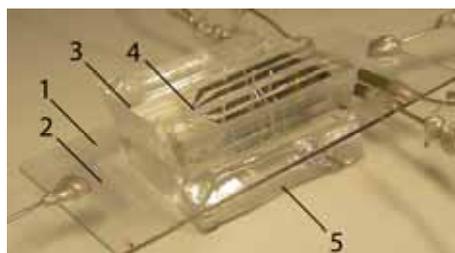


Figure 4.6 : Photographie du dispositif final. (Lamelle de verre : 24mm*40mm)

Sur la figure 4.6 nous pouvons voir les différentes parties du dispositif :

1 : Lamelle de verre.

2 : Piste de chauffe en ITO.

3 : Assemblage multicouche de PDMS contenant la chambre de PCR et les canaux de refroidissement.

4 : Élément de mesure de température en platine.

5 : Bloc de refroidissement additionnel. (Dit refroidissement arrière)

L'ensemble des étapes technologiques décrites précédemment forme un dispositif complet dont la partie contenant les électrodes peut être réutilisée. La procédure qui permet la réutilisation du dispositif est décrite dans la figure 4.7.

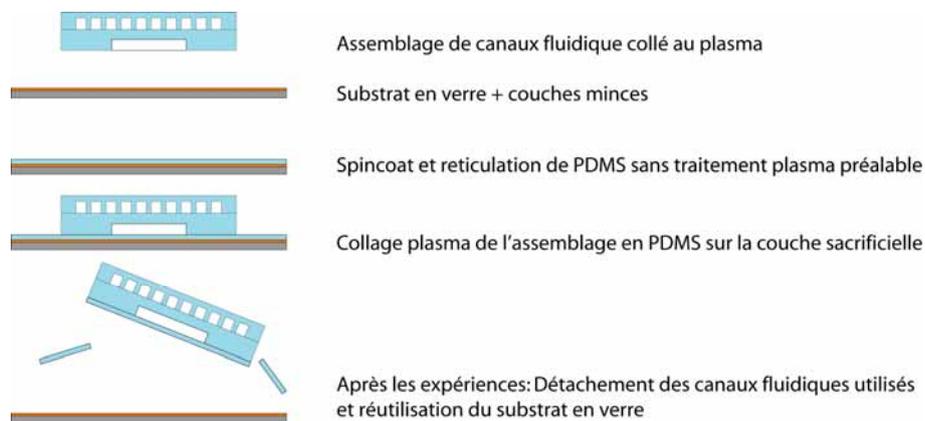


Figure 4.7 : Illustration de la méthode de récupération de dispositif. Cette méthode permet de conserver la lamelle de verre contenant les électrodes intégrées et de se débarrasser du dispositif microfluidique en PDMS souillé par les réactifs.

La partie obtenue par moulage, souillée par les réactifs de PCR, est séparée puis jetée, tandis que la partie propre, contenant les électrodes, protégée par la couche de PDMS sacrificielle, peut être réutilisée pour fabriquer un nouveau dispositif.

Nous avons conçu la chambre de PCR de manière à limiter le rapport surface sur volume. Pour cela il est nécessaire de limiter les différences de taille entre les différentes dimensions du système. Nous avons donc opté pour des chambres de PCR de $150\mu\text{m}$ de hauteur, ce qui correspond à l'épaisseur maximum autorisée par les résines SU8 que nous possédons. Il est également nécessaire d'éviter la formation de bulles d'air, dues aux forces capillaires, lors du remplissage de la chambre de PCR. La présence d'angles dans le design crée des zones difficiles à remplir, lors de l'injection du liquide. Pour cette raison, la chambre de PCR est de forme circulaire. Les expériences et les caractérisations thermiques présentées dans cette thèse utilisent le type de design présenté dans la figure 4.8 :

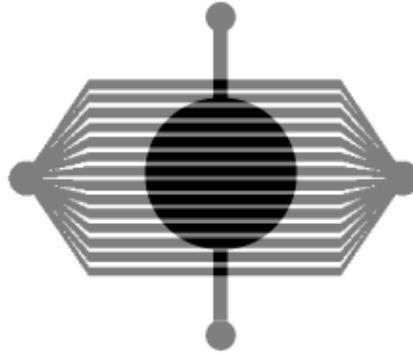


Figure 4.8 : Ce dispositif est constitué d'une chambre de PCR circulaire de 3mm de rayon et de 150 μ m de haut. Cette chambre est surmontée d'un circuit de refroidissement formé d'une série de canaux d'une hauteur de 150 μ m.

Les canaux de refroidissement couvrent toute la chambre de PCR pour assurer une température homogène et empêcher l'évaporation de l'eau contenue dans le mélange de PCR. Bien entendu, il est possible, en fonction de l'expérience à mener, de faire varier les designs de la couche contenant la chambre de PCR et de la couche contenant les canaux de refroidissement. Cette dernière peut éventuellement contenir des valves et des canaux d'hydratation. Par exemple, dans le dispositif de test ci-dessous que nous avons réalisé pour un projet de PCR sur cellule unique, la chambre de PCR a été remplacée par un mixer rotatif en forme d'anneau permettant un meilleur mélange des réactifs. Le mouvement des liquides est contrôlé par une série de valves contenues dans la couche de refroidissement, formant ainsi une pompe péristaltique (Figure 4.9).

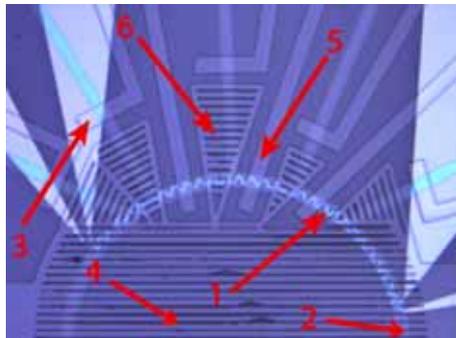


Figure 4.9 : Micro-photographie d'une variante de notre dispositif de PCR, utilisé pour des tests de PCR sur cellule unique.

Avec,

- 1 : Piste de platine
- 2 : Anneau contenant le mélange de PCR.
- 3 : Vanne permettant l'isolation de l'anneau de réaction après l'injection des réactifs de PCR.
- 4 : Canaux de refroidissement
- 5 : Vannes pour l'actionnement de la pompe péristaltique.

4.3 Résultats

4.3.1 Montage expérimental

Notre contrôle de température est basé sur une boucle de rétroaction entre la température mesurée et la température voulue. Un programme Matlab détermine la tension à appliquer aux bornes de la piste d'ITO en fonction de l'écart entre la température voulue et la température mesurée. La piste d'ITO est branchée à une source de tension Agilent 6611C contrôlée par ordinateur. La résistance de platine est branchée à une unité d'acquisition de données Agilent 34970A muni d'un module de mesure de tension 34901A contrôlée par ordinateur. Nous pouvons ainsi contrôler le courant circulant dans la piste d'ITO et effectuer une mesure 4 points de la piste de platine. Après une étape de calibration, nous calculons la température de la piste de platine à partir de la résistance mesurée. Le programme Matlab permet de contrôler simultanément le multimètre et la source de tension. Les flux circulant dans les canaux de refroidissement sont injectés à l'aide d'un pousse seringue Nemesys également contrôlé par le programme Matlab. Un schéma récapitulatif de l'appareillage utilisé est présenté dans la figure 4.10.

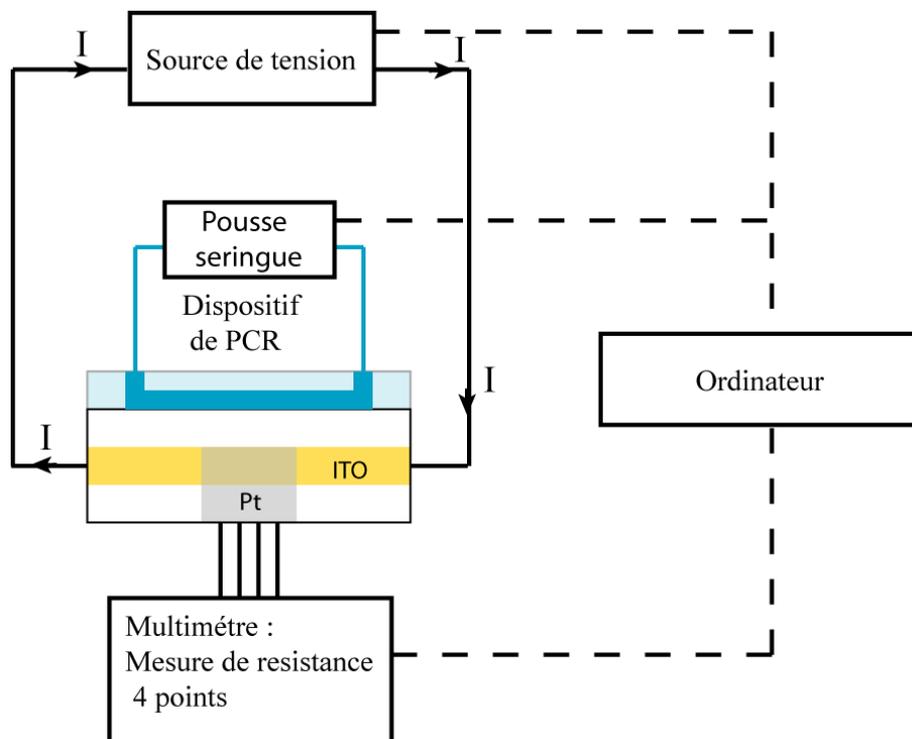


Figure 4.10 : Schéma explicatif du setup utilisé

Nous avons effectué toutes les caractérisations thermiques de notre dispositif en utilisant cet appareillage expérimental. Lors de ces expériences la chambre de PCR de notre dispositif était remplie d'eau.

4.3.2 Caractérisation thermique

La réaction de PCR nécessite de répéter un nombre donné de fois un cycle de trois températures. Pour caractériser notre système nous avons répété 22 fois un cycle de température de PCR classique (94°C ,60°C ,72°C) (Figure 4.11). La figure 4.12 fournit un

exemple d'un cycle de température obtenue dans notre dispositif et illustre l'influence de l'utilisation des canaux de refroidissement.

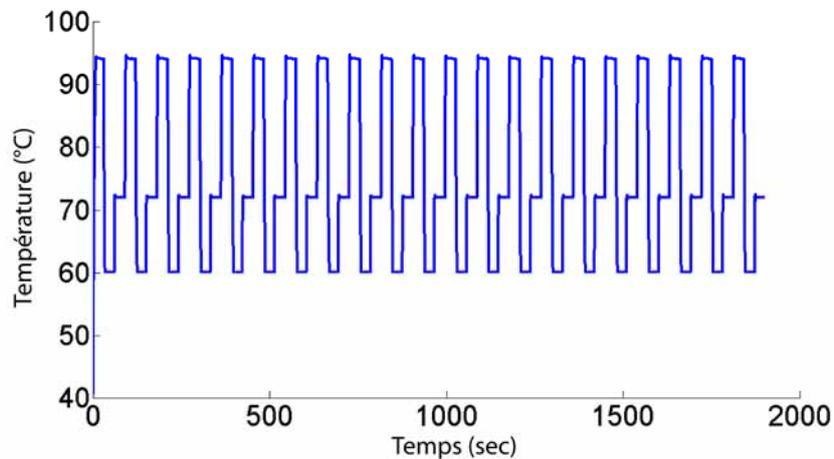


Figure 4.11 : Répétition de 22 cycles de température de PCR consécutif.

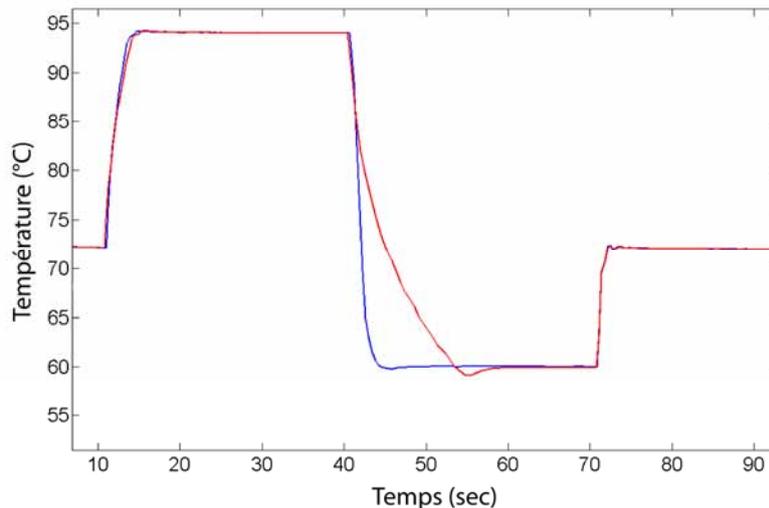


Figure 4.12 : Cycle de température obtenue dans notre dispositif sans refroidissement (rouge) et avec un refroidissement de la chambre par le dessus (bleu).

Le dispositif permet d'obtenir des cycles de PCR reproductibles. La présence des canaux de refroidissement permet grandement améliorer la rapidité du changement de température nécessaire au passage de la température de dénaturation (94°C) à la température d'hybridation (60°C). Afin d'effectuer une caractérisation plus fine des vitesses de refroidissement que nous pouvons atteindre dans nos dispositifs, nous avons étudié le temps nécessaire pour refroidir notre dispositif de 94°C à 60°C en fonction du flux de liquide parcourant les canaux de refroidissement, du liquide utilisé et de l'épaisseur de la lamelle de verre. Dans les trois courbes de la figure 4.13 le liquide circule durant toute la durée de l'expérience dans les canaux de refroidissement. (Refroidissement permanent)

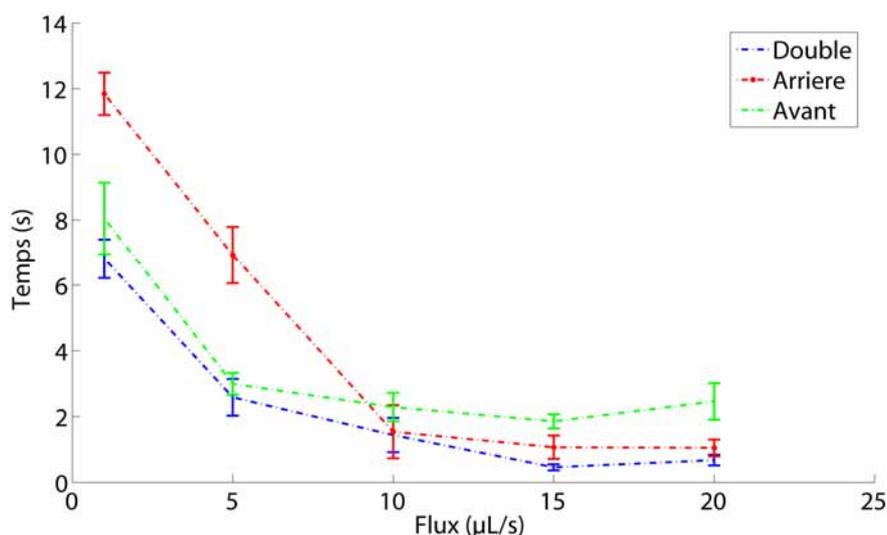


Figure 4.13 : Temps de refroidissement pour passer de 94°C à 60°C obtenu avec de l'eau comme fluide caloporteur sur un dispositif utilisant une lamelle de verre de 1mm. (Refroidissement permanent)

La figure 4.13 permet de comparer l'efficacité des différents types de canaux de refroidissement. Le refroidissement situé au dessus de la chambre de PCR (Avant) a une influence équivalente à celui utilisé de manière optionnelle collé à l'arrière de la lamelle de verre (Arrière). L'utilisation simultanée des deux types de canaux de refroidissement permet d'augmenter sensiblement la vitesse de refroidissement du dispositif (Double). La vitesse de refroidissement augmente avec le débit pour atteindre 84°C par seconde pour des flux d'eau de 20 µL/sec, en utilisant les deux circuits de refroidissement simultanément de manière permanente. Les écarts types obtenus sont principalement dus à la formation de bulles dans nos canaux de refroidissement liés à l'évaporation de l'eau à travers le PDMS et au dégazage de l'eau de refroidissement lorsque sa température augmente. (La solubilité des gaz dans l'eau diminue avec la température)

Afin de réduire l'écart type de nos vitesses de refroidissement, nous avons également testé l'efficacité de nos canaux de refroidissement en utilisant de l'éthylène glycol comme fluide caloporteur (Figure 4.14-15).

L'utilisation d'éthylène glycol permet effectivement de réduire l'écart type et ne change pas significativement la vitesse de refroidissement de notre dispositif. La plus grande reproductibilité de ces mesures est due à l'absence de formation de bulles d'air dans les canaux. Néanmoins, l'impact de l'utilisation d'éthylène glycol comme fluide caloporteur dans un dispositif de PCR n'a pas été étudié et n'est donc pas recommandé pour l'instant. De plus l'utilisation d'éthylène glycol dans les canaux de refroidissement ne permet pas de saturer le PDMS en vapeur d'eau et les canaux ne peuvent donc pas être utilisés en guise de canaux d'hydratation. Nous avons également étudié l'influence de l'épaisseur du substrat en verre sur les performances de refroidissement (Figure 4.14-15).

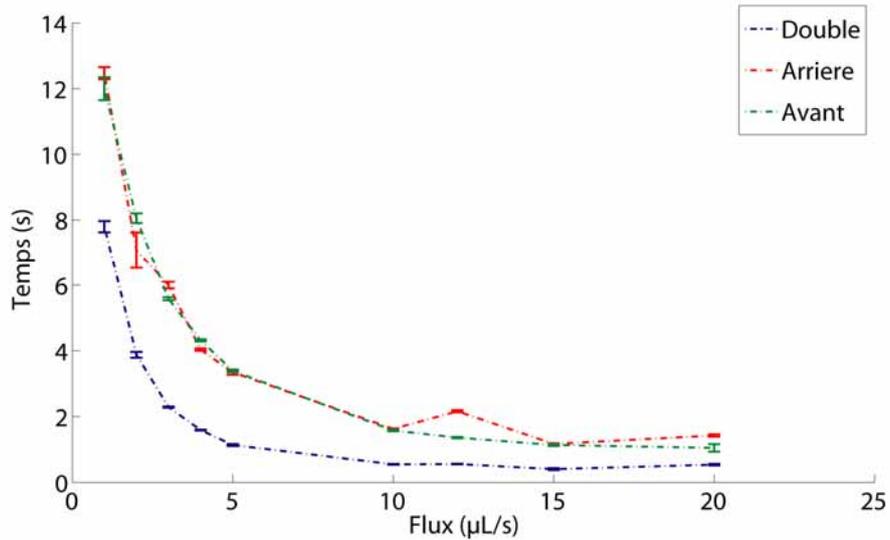


Figure 4.14 : Temps de refroidissement pour passer de 94°C à 60°C, obtenu avec de l'éthylène glycol comme fluide caloporteur sur un dispositif utilisant une lamelle de verre de 1mm. (Refroidissement permanent)

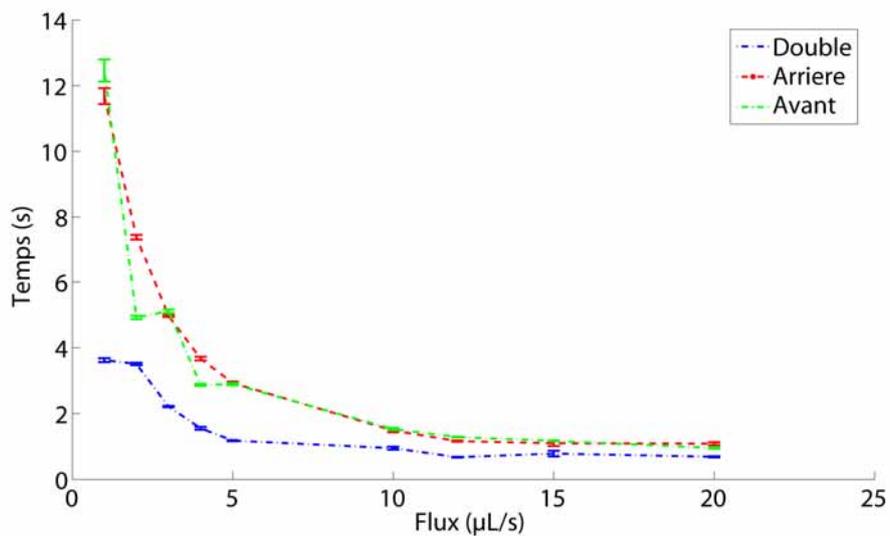


Figure 4.15 : Temps de refroidissement pour passer de 94°C à 60°C, obtenu avec de l'éthylène glycol comme fluide caloporteur sur un dispositif utilisant une lamelle de verre de 250µm. (Refroidissement permanent)

Lorsque nous comparons les vitesses de refroidissement obtenues avec une lamelle de verre de 1mm et une autre de 250µm nous obtenons des résultats sensiblement identiques. L'épaisseur de la lamelle n'a donc pas d'influence significative sur la vitesse de refroidissement de nos dispositifs.

Une autre façon d'utiliser les canaux de refroidissement consiste à ne les utiliser que pendant les phases de refroidissement. Les résultats obtenus dans ce cas (refroidissement transitoire) sont présentés sur la figure 4.16.

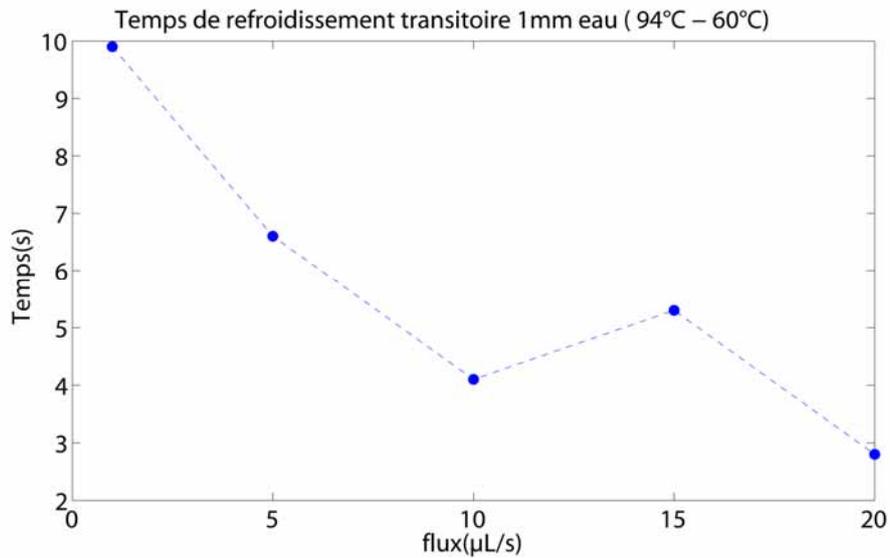


Figure 4.16 : Temps de refroidissement pour passer de 94°C à 60°C, obtenu avec de l'éthylène glycol comme fluide caloporteur sur un dispositif utilisant une lamelle de verre de 1mm. (Refroidissement transitoire)

Les vitesses de refroidissement en transitoire sont moins élevées que dans le cas d'un refroidissement permanent, et les performances de refroidissement dépendent fortement de la formation éventuelle de bulles d'air pendant l'étape de dénaturation.

Comme nous l'avons vu, l'utilisation de microcanaux de refroidissement permet d'augmenter la vitesse des transferts thermiques mais permet aussi de stabiliser le temps nécessaire pour le refroidissement au cours des différents cycles comme le montre la figure 4.17.

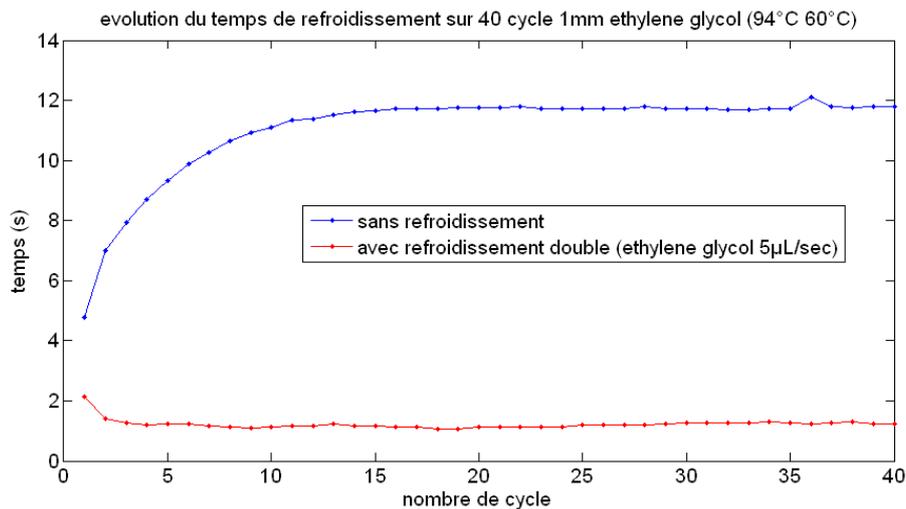


Figure 4.17 : Vitesse de refroidissement obtenues pour 40 cycles de PCR successif avec et sans refroidissement intégré.

En l'absence de refroidissement la lamelle de verre chauffe dans son ensemble et le temps nécessaire pour la refroidir augmente avec le nombre de cycles. Lorsque les canaux de refroidissement sont utilisés, les temps de refroidissement obtenus sont plus rapides et plus stables.

4.3.3 Application à la biologie

Afin de valider la capacité de notre dispositif à effectuer les étapes nécessaires à la PCR, nous avons effectué une série de cycles de température avec un mélange de PCR sans enzyme mais contenant du Picogreen. Le Picogreen est un marqueur dont la fluorescence augmente lorsqu'il est intercalé dans un ADN double brin. Ainsi, la fluorescence de la chambre de PCR devrait chuter lors des étapes de deshybridation à 94°C. Pour cela, nous avons monté notre dispositif sur un microscope équipé d'une lampe à mercure, d'un shutter contrôlé par Matlab et d'un objectif à immersion à eau 60X Zeiss. La figure 4.18 montre la variation de fluorescence pour 4 cycles de PCR :

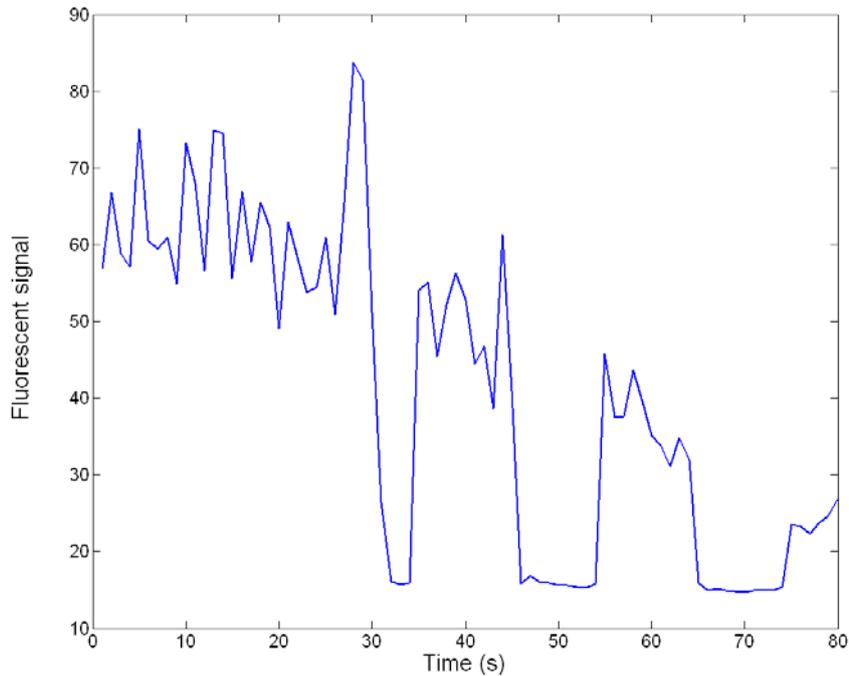


Figure 4.18 : Variation de fluorescence de la chambre de PCR pour 4 cycles de PCR successifs

L'expérience a été répétée deux fois et donne les mêmes résultats. Nous n'expliquons pas l'absence de chute de fluorescence lors de la première étape à 94°C. Néanmoins nous pouvons observer une nette chute de fluorescence lors des trois étapes de dénaturation suivantes, lorsque l'ADN n'est plus sous forme de double brins. La descente progressive de la fluorescence au cours du temps est due au bleaching du Picogreen et à la destruction progressive des molécules de Picogreen, lors des étapes de dénaturation.

4.4 Conclusions

Nous avons mis au point un dispositif de PCR sur puce qui autorise :

- le suivi en temps réel de la réaction,
- la réutilisation du dispositif
- l'obtention de performances de refroidissement inégalées dans ce domaine.

Cette méthode de contrôle de température couplant des électrodes de chauffe et des microcanaux de refroidissement intégrés permet d'obtenir des vitesses de refroidissement

de 84°C/sec. La technologie utilisée sur le substrat en verre permet d'obtenir des dispositifs transparents autorisant le suivi d'un signal fluorescent au cours de la PCR et permettant ainsi la réalisation future de PCR en temps réel. La technologie « « tricouche » » originale que nous avons proposée utilise 2 couches de PDMS pour les circuit fluidique, associées à une couche de PDMS sacrificielle permettant pour la première fois de récupérer la partie la plus coûteuse du dispositif de PCR contenant les électrodes. Nous pouvons ensuite jeter la partie de PDMS souillée par les réactifs.

Bien que la collaboration pour la partie biologique de ce projet n'ait pas pu être menée à terme, les performances de refroidissement de ce dispositif ont néanmoins permis de donner naissance à un contrôle de température appliqué à la biologie cellulaire qui ne nécessite ni électrodes de chauffe ni d'électrodes de mesure.

Chapitre 5 :

Contrôle de température à base de microcanaux : Application à la biologie cellulaire

Les contrôles de température pour la biologie cellulaire décrits dans le chapitre 1 ne permettent pas d'effectuer des changements de températures de plusieurs degrés par seconde. Or, la possibilité de modifier rapidement la température d'une colonie ou d'une cellule unique permettrait d'explorer de nouveaux champs de recherche en biologie cellulaire. Pour répondre à ce besoin nous avons mis au point un dispositif de contrôle de température répondant aux contraintes expérimentales en biologie cellulaire.

Dans ce chapitre :

- Nous allons dans un premier temps décrire le dispositif et l'appareillage de contrôle de température pour la biologie cellulaire que nous proposons.
- Nous présenterons par la suite les caractéristiques thermiques du dispositif.
- Nous finirons par une description des expériences de biologie cellulaires que nous avons effectuées à l'aide de ce dernier.

5.1 Présentation du projet et du dispositif

5.1.1 But et motivation du projet

Le but de ce projet est de mettre au point un dispositif microfluidique de contrôle de température permettant d'effectuer des changements de température de plusieurs degrés par seconde pour étudier la dynamique du cytosquelette de *S.pombe* et le rôle de protéines thermosensibles. Ce dispositif doit pouvoir effectuer des changements de température dans une gamme allant de 5°C à 40°C en moins de 10 secondes et permettre une observation haute résolution de l'échantillon simultanément. En nous inspirant des performances de refroidissement atteintes à l'aide de microcanaux dans un dispositif de contrôle de température pour la PCR que nous avons réalisé précédemment, nous avons développé un dispositif de contrôle de température entièrement fluide ne nécessitant pas de résistances de chauffe et de mesure. Nous avons utilisé ce dispositif pour effectuer une étude du cytosquelette de *S.pombe* visant principalement à comprendre le comportement des IMTOC (Interphase Microtubule Organisation Center) lorsque la contrainte appliquée par les microtubules disparaît lors de leur dépolymérisation à basse température. Nous avons également utilisé ce contrôle de température pour étudier d'autres phénomènes liés au cytosquelette de *S.pombe*, particulièrement l'influence des microtubules sur les mouvements du SPB (spindle pole body) et de la membrane nucléaire. Enfin, nous avons montré que ce type de dispositif peut également être utilisé pour des recherches dans d'autres domaines de la biologie cellulaire telle l'étude du rôle et du comportement de certaines protéines d'intérêt rendues thermosensibles par manipulation génétique.

5.1.2 Principe du dispositif

Afin de répondre aux contraintes liées à nos expériences sur le cytosquelette de *S.pombe*, le dispositif microfluidique utilisé doit regrouper plusieurs fonctionnalités :

- Il doit être capable de contraindre une cellule de *S.pombe* dans une position courbe pendant plusieurs heures. L'environnement, comme la présence

d'oxygène, doivent permettre une croissance normale de la cellule à l'intérieur du dispositif durant toute la durée de l'expérience.

- Afin de pouvoir effectuer de l'imagerie en fluorescence haute résolution du cytosquelette de *S.pombe*, le dispositif doit être transparent et le substrat doit avoir une épaisseur compatible avec les longueurs focales courtes des objectifs 100X à immersion utilisés.
- Le dispositif devra être jetable pour éviter toute contamination entre les expériences. De ce fait la technologie choisie devra permettre de développer des dispositifs peu coûteux et rapides à fabriquer.

Le dispositif de contrôle de température que nous proposons n'utilise pas d'électrode de chauffe et de mesure de température. Il est constitué d'un assemblage de deux couches de PDMS contenant des microcanaux collés sur une lamelle de verre de 150 μm d'épaisseur (Figure 5.1). Les canaux moulés dans la couche de PDMS en contact avec la lamelle de verre sont destinés à contenir les levures. Ces derniers sont surplombés par une deuxième couche de canaux microfluidiques parcourus par de l'eau à température contrôlée. La faible épaisseur séparant les deux couches permet de contrôler la température de la couche de canaux fluidiques en serpentin contenant les cellules (Figure 5.2), en contrôlant la température de l'eau circulant dans les canaux de la couche supérieure.

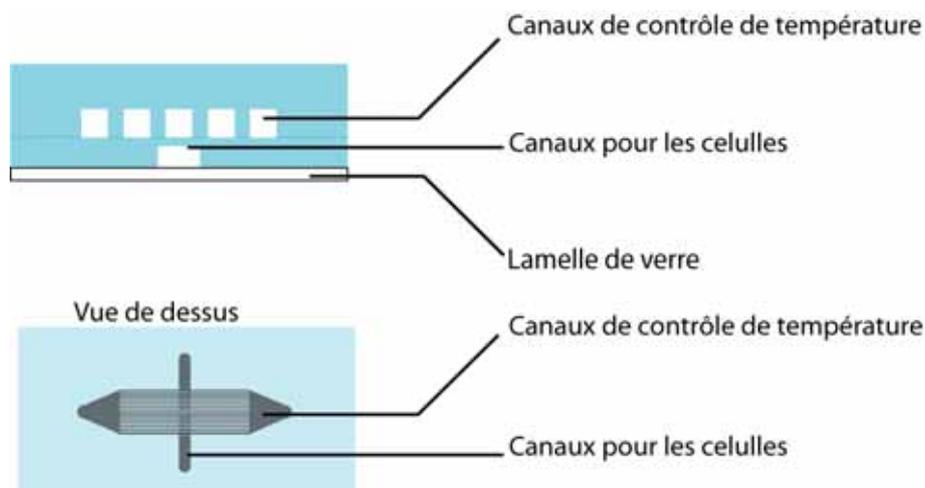


Figure 5.1 : Schéma descriptif du dispositif de contrôle de température.

Pour les expériences où il est nécessaire de pouvoir courber les cellules de *S.pombe*, les canaux contenant les levures ont une forme de serpentin comme présenté ci dessous.



Figure 5.2 : Canal en serpentin permettant de courber les levures *S.pombe*.

5.1.3 Montage expérimental

Le montage de contrôle de température est constitué d'un pousse seringue Nemesys et de deux modules Peltier SC-20 (Figure 5.3-4). Les deux modules Peltier configurés à des températures différentes sont branchés de part et d'autre du dispositif. En fonction du sens du flux imposé par le pousse seringue, le liquide caloporteur (ici de l'eau) qui pénètre dans le dispositif provient d'un module Peltier ou de l'autre. Il est donc possible de modifier la température de l'eau entrant dans le dispositif en changeant le sens du flux parcourant le circuit fluide. Cette méthode permet de ne pas être limité par les vitesses de changement de température des modules Peltier, mais uniquement par les constantes de temps fluidiques et thermiques de notre système.

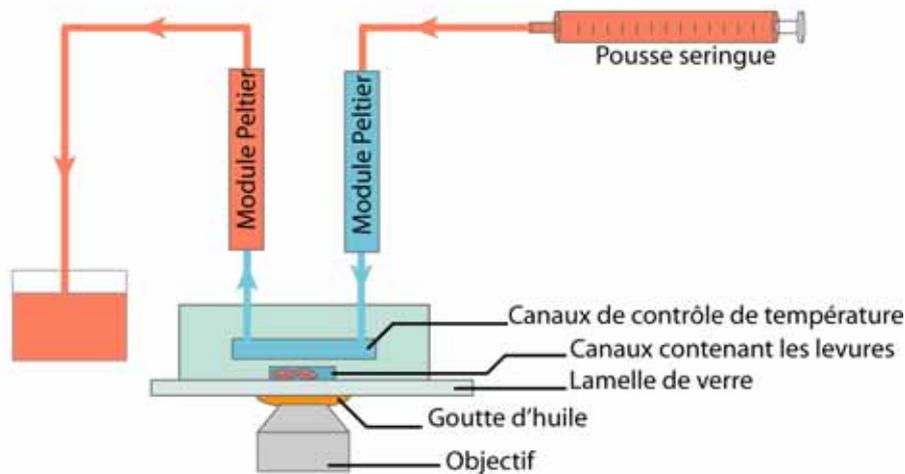


Figure 5.3 : Appareillage expérimental utilisé pour le contrôle de température du dispositif. La couleur des traits représente la température des liquides. (Rouge : chaud, Bleu : froid)

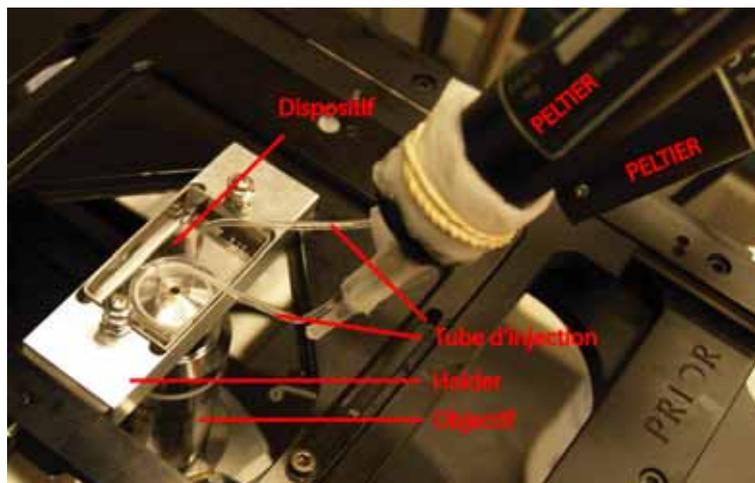


Figure 5.4 : Photo de l'appareillage expérimental utilisé. Nous pouvons voir le dispositif monté sur un microscope avec les deux modules Peltier branchés dessus.

5.1.4 Technologies

Notre dispositif est constitué d'un empilement de deux couches de PDMS contenant les microcanaux (Figure 5.5).

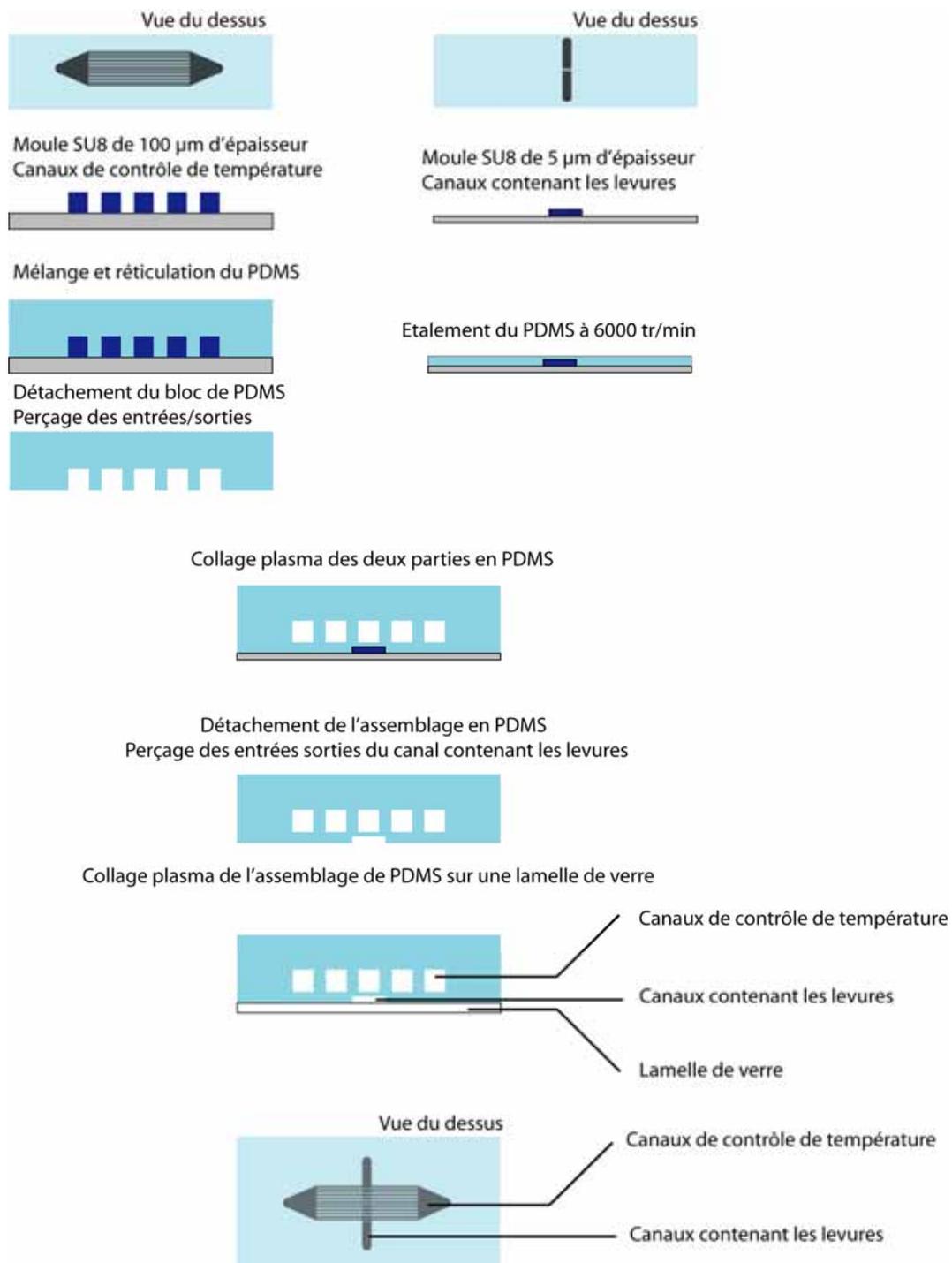


Figure 5.5 : Procédure technologique de fabrication du dispositif

La première couche de PDMS destinée aux cellules est étalée à 6000tr/min sur un moule en SU8 de 5 μm d'épaisseur. En parallèle, un bloc de PDMS, dans lequel sont moulés les canaux de contrôle de température de 100 μm de hauteur, est collé par plasma au dessus de la première couche de PDMS. Cet assemblage de canaux de contrôle de température et de

canaux destinés aux levures est collé de manière covalente à l'aide d'un traitement plasma sur une lamelle en verre de microscope Corning de 150 μ m d'épaisseur.

Afin d'éviter de tordre la lamelle de verre ou d'endommager le dispositif au cours de l'expérience, ce dernier est inséré dans un support de maintien avant d'être adapté sur la platine de microscope (Figure 5.6).



Figure 5.6 : Dispositif de contrôle de température dans son support.

Une fois positionné dans le support, le dispositif est branché aux deux modules Peltier à l'aide de capillaire tygon en plastique souple de 6 cm de long. Cette longueur permet de pouvoir déplacer la platine de microscope sans arracher les connectiques, tout en limitant le temps de transfert du liquide entre le module Peltier et le dispositif.

5.1.5 Etude théorique du dispositif : Analogie des résistances thermiques

Afin d'avoir un ordre d'idées des caractéristiques thermiques de notre dispositif, nous avons décrit de manière simple les transferts thermiques à l'intérieur du système. En régime stationnaire, les échanges à travers le dispositif entre le liquide caloporteur et le milieu extérieur peuvent être modélisé à l'aide d'une analogie électrique faisant appel à des résistances thermiques [Incropera 2002] (Figure (5.7)). Cette figure n'est pas à l'échelle.

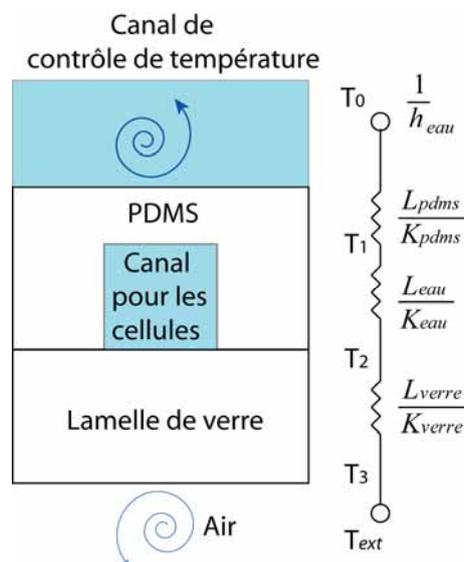


Figure 5.7 : Schéma représentant une vue en coupe du dispositif de contrôle de température à l'aide d'une analogie faisant appel à des résistances thermiques. Les deux tourbillons représentent le mouvement de convection forcée de l'eau dans les microcanaux et le mouvement de convection naturelle de l'air sous la lamelle de verre. Ce schéma correspond au cas où l'objectif n'est pas en contact avec la lamelle de verre.

Nous ne nous intéresserons pas ici aux échanges entre le liquide caloporteur et le milieu extérieur à travers les parois en PDMS supérieure et latérales du dispositif. Dans ce

modèle simplifié nous considérons des temps et des débits suffisamment importants pour que le liquide puisse être considéré comme isotherme sur la longueur du dispositif. Cette hypothèse est partiellement vérifiée par l'expérience. En effet, la différence de température du liquide caloporteur entre l'entrée et la sortie du dispositif est inférieure à 1°C. En considérant ces hypothèses, nous obtenons l'équation (5.1) :

$$q = \frac{\Delta T}{\sum R} = \frac{\Delta T}{\frac{1}{h_{eau}} + \frac{L_{pdms}}{K_{pdms}} + \frac{L_{eau}}{K_{eau}} + \frac{L_{verre}}{K_{verre}} + \frac{1}{h_{air}}} \quad (5.1)$$

Avec,

- q : Flux de chaleur (W/m²)
- ΔT : Différence de température entre deux points. (K)
- $\sum R$: Résistance thermique du système (K m²/W)
- L : Distance à traverser (m)
- K : Conductivité thermique (W/m.K)
- h : Coefficient de convection (W/m².K)

Nous utilisons ici des conditions aux limites de convection libre avec un coefficient de convection typique de 10 W/m².K pour la convection naturelle, et de 5000 W/m².K pour le coefficient de convection forcé dans les microcanaux. Les valeurs de conductivités thermiques utilisées sont celles données au chapitre 2. Considérons un écart de température de 15°C entre la température extérieure et la température du liquide caloporteur : nous obtenons un flux de chaleur en régime stationnaire de 150 W/m². En considérant le liquide caloporteur isotherme dans tout le dispositif et en ne prenant pas en compte les pertes latérales dans ce dernier nous pouvons considérer que le flux de chaleur se conserve. Nous pouvons ainsi estimer la température dans le canal contenant les cellules :

Pour le haut du canal contenant les cellules :

$$T_1 - T_0 = q \times \left(\frac{1}{h_{eau}} + \frac{L_{pdms}}{K_{pdms}} \right) \quad (5.2)$$

Pour le bas du canal contenant les cellule:

$$T_2 - T_0 = q \times \left(\frac{1}{h_{eau}} + \frac{L_{pdms}}{K_{pdms}} + \frac{L_{eau}}{K_{eau}} \right) \quad (5.3)$$

En connaissant le flux de chaleur et la température du liquide caloporteur, nous pouvons calculer à partir équations (5.2) et (5.3) la température sur les surfaces supérieure et inférieure du canal contenant les cellules. L'écart en régime stationnaire entre la température du liquide caloporteur et celle du canal contenant les cellules est de 0.039 °C en haut du canal (T1) et de 0.041°C en bas du canal (T2). Le coefficient de convection dans les canaux de contrôle de température a peu d'influence sur l'écart de température qui reste inférieur à 1°C pour des coefficients de 100 W/m².K. (Limite basse du coefficient de convection pour une convection forcée utilisant des liquides)

L'équation précédente nous donne une approximation par le bas de la puissance dissipée par conduction thermique par la face arrière de la lamelle de verre. Cette puissance est de 15mW pour une surface de 1cm². La quantité d'énergie apportée par le liquide caloporteur (ici de l'eau) est décrite par l'équation (5.4) :

$$q = \rho C_p v \Delta T \quad (5.4)$$

Avec,

- q : Flux de chaleur (W/m²)
- ρ : Densité du liquide caloporteur (Kg/m³)
- C_p : Capacité thermique du liquide caloporteur (J/Kg/K)
- v : Vitesse du liquide caloporteur (m/s)
- ΔT : Différence de température entre le liquide caloporteur et l'extérieur (K)

Pour une différence de température de 15°C entre le liquide caloporteur et le milieu extérieur et un débit d'eau de 20µL/sec utilisé lors de nos expériences, nous obtenons un apport d'énergie de 12mW. L'énergie apportée par le liquide caloporteur n'est pas en excès par rapport à l'énergie perdue par conduction. Nous pouvons ainsi nous attendre à obtenir une forte dépendance de la température du canal, en fonction du débit de liquide caloporteur.

La microscopie « haute résolution » employée dans cette étude utilise des objectifs à immersion à huile. Le contact de la goutte d'huile crée un pont thermique entre la lamelle de verre et l'objectif du microscope qui agit comme un dissipateur de chaleur. [warner : Application Fundamentals] La présence de la goutte d'huile et de la masse métallique de l'objectif modifie donc les conditions aux limites (Figure 5.8). Si nous considérons l'objectif comme un bloc métallique isotherme et en utilisant les hypothèses précédentes, nous pouvons modéliser le système comme suit :

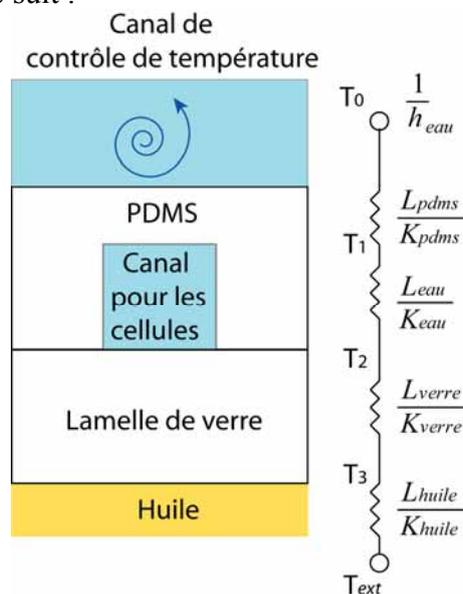


Figure 5.8 : Schéma représentant le dispositif de contrôle de température à l'aide d'une analogie faisant appel à des résistances thermiques. Ce schéma correspond au cas où l'objectif est en contact avec la lamelle de verre.

Nous obtenons le jeu d'équation (5.5) :

$$q = \frac{\Delta T}{\sum R} = \frac{\Delta T}{\frac{1}{h_{eau}} + \frac{L_{pdms}}{K_{pdms}} + \frac{L_{eau}}{K_{eau}} + \frac{L_{verre}}{K_{verre}} + \frac{L_{huile}}{K_{huile}}} \quad (5.5)$$

Nous utilisons ici des conditions aux limites de convection libre avec un coefficient de convection typique de 10 W/m².K pour la convection naturelle et de 5000 W/m².K pour le coefficient de convection dans les microcanaux.

Considérons un écart de température de 15°C entre la température extérieure et la température du liquide entrant. L'écart en régime permanent entre la température du liquide caloporteur et celle du canal contenant les cellules est de 3.8 °C en haut du canal et de 3.9°C en bas du canal.

Nous voyons ici que la présence de la goutte d'huile nécessaire aux objectifs à immersion utilisés dans l'imagerie « haute résolution » a une forte influence sur la température dans le dispositif.

En résumé, cette estimation met en évidence quatre points :

- Lorsque l'objectif n'est pas en contact avec la lamelle de verre, la température dans le canal devrait être sensiblement la même que celle du liquide caloporteur.
- La présence de l'objectif à immersion est susceptible de provoquer un décalage de plusieurs degrés sur la température obtenue dans le canal.
- La température dans le canal contenant les cellules est uniforme sur sa hauteur (5 µm).
- La température dans le canal contenant les cellules varie avec la vitesse du flux, dans nos gammes d'utilisation.

5.1.6 Etude théorique du dispositif : Analogie avec un échangeur de chaleur

Notre système peut être modélisé comme un échangeur de chaleur, ainsi en régime stationnaire :

$$\frac{dH}{dt} = 0 = -qC_p T(x) + qC_p T(x + dx) + h_{eq} P dx (T(x) - T_a) \quad (5.6)$$

Avec,

- H : Enthalpie du système (J)
- P : Périmètre de la section du canal (m)
- T_a : température de l'environnement (K)
- h_{eq} : Coefficient de convection équivalente du système (W/K.m²)
- C_p : Capacité calorifique massique (J/Kg.K)
- q : Débit de masse (Kg/s) , décrit par l'équation ci-dessous :

$$q = \rho v S \quad (5.7)$$

Avec,

S : Surface de la section du canal (m^2)
 v : Vitesse d'écoulement (m/s)
 ρ : Masse volumique (Kg/m^3)

A partir de l'équation (5,6), nous obtenons :

$$qC_p \frac{\partial T}{\partial x} = -h_{eq}P(T(x) - T_a) \quad (5.8)$$

$$\frac{\partial T}{\partial x} = -\frac{h_{eq}P}{qC_p}(T(x) - T_a) \quad (5.9)$$

$$\frac{\partial(T(x) - T_a)}{\partial x} = -\frac{h_{eq}P}{qC_p}(T(x) - T_a) \quad (5.10)$$

$$(T(x) - T_a) = (T(0) - T_a) \exp\left[-\frac{h_{eq}P}{qC_p}x\right] \quad (5.11)$$

$$T(x) - T_a = (T(0) - T_a) \exp\left[-\frac{x}{l}\right] \quad (5.12)$$

Avec,

$$l = \frac{qC_p}{h_{eq}P} \quad (5.13)$$

L'équation (5,12) montre une dépendance exponentielle de la température dans le canal contenant les cellules par rapport au débit de liquide caloporteur. Cette dépendance exponentielle se retrouve lors des caractérisations thermiques de notre système. Le logarithme de la température normalisée obtenue dans le canal contenant les cellules en fonction du débit de liquide caloporteur a un comportement quasi linéaire qui illustre cette dépendance exponentielle (figure 5.9)

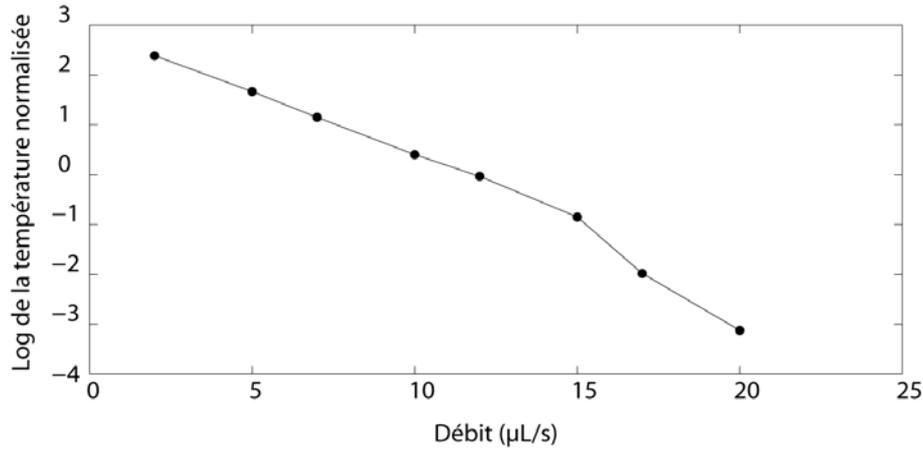


Figure (5.9) : Logarithme de la température normalisée obtenus dans le canal contenant les cellules en fonction du débit de liquide caloporteur circulant dans le microcanaux.

$$\frac{T(x_0) - T_a}{T(0) - T_a} = \exp\left[\frac{-x_0 h_{eq} P}{C_p q}\right] \quad (5.14)$$

$$\ln[T(x_0) - T_a] = \ln\left[(T(0) - T_a) + \frac{1}{q} + \frac{h P x_0}{C_p}\right] \quad (5.15)$$

$$\frac{T(x_2) - T_a}{T(x_1) - T_a} = \frac{(T(0) - T_a) \exp(-\frac{x_1}{l})}{(T(0) - T_a) \exp(-\frac{x_2}{l})} = \exp\left[-\frac{(x_1 - x_2)}{l}\right] \quad (5.16)$$

Comme le montre l'équation (5.16) il est également possible de déterminer la résistance thermique du système pour un flux donné en effectuant un fit exponentiel sur une courbe donnant la température pour deux points différents du canal contenant les cellules en fonction du débit de liquide caloporteur.

5.2 Caractéristiques thermiques du dispositif

5.2.1 Influence de la vitesse du flux

Afin de connaître les caractéristiques thermiques, la robustesse et les plages de fonctionnement du dispositif proposé, nous avons effectué des mesures de la température obtenue dans le canal contenant les cellules en fonction de la vitesse, du sens du flux d'eau dans le dispositif, et de la présence ou non de l'objectif à immersion. Pour cela nous avons utilisé un dispositif microfluidique similaire à ceux décrits plus haut mais avec une piste de platine déposée sur la lamelle de verre. Cette piste de platine, située sous le canal d'étude, nous permet de mesurer la température dans le dispositif à tout moment. Pour plus de détails concernant la fabrication de ce dispositif de caractérisation voir les annexes. [cf annexe A]

Nous avons effectué une première série d'expériences avec un module Peltier réglé à 1°C et un autre réglé à 22°C pour le retour à la température ambiante. Ces valeurs correspondent aux températures que nous utilisons pour dépolymériser et repolymériser le cytosquelette de *S.pombe*. Lorsque nous mettons le pousse seringue en action, l'eau venant du

Peltier en amont, pénètre dans le dispositif et modifie la température de ce dernier (Figure 5.10).

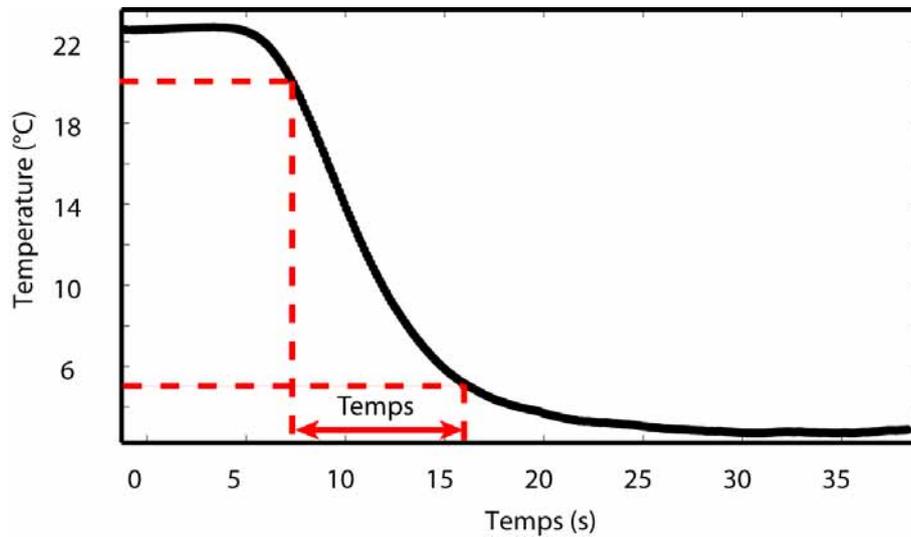


Figure 5.10 : Changement de température typique obtenu dans notre dispositif lors de la mise en route du pousse seringue. (Objectif hors contact et module Peltier réglés à 1°C) Le temps nécessaire pour passer de 20°C à 5°C (En considérant une température finale de 2.7°C) est indiqué sur la courbe.

Dans cette série d'expériences, menée sans objectif à immersion, nous avons étudié l'influence du débit d'eau sur la température dans le canal d'étude et la vitesse de changement de température (Figure 5.11-12).

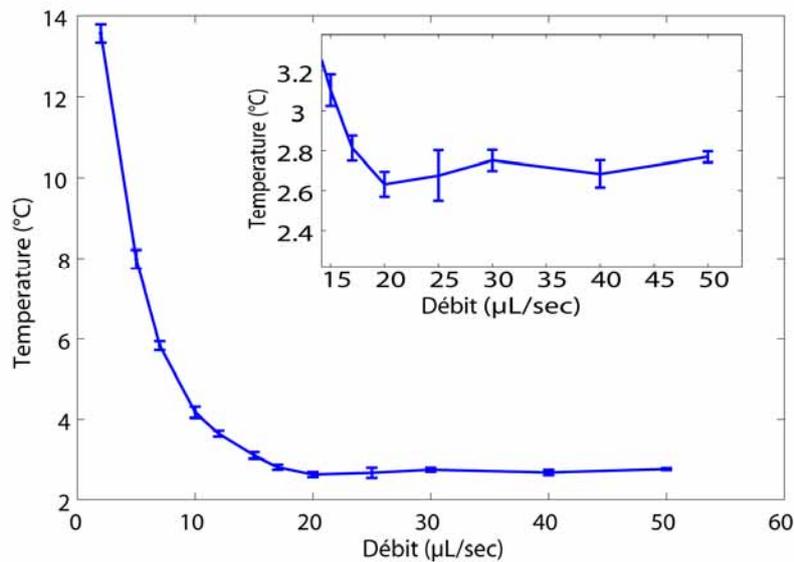


Figure 5.11 : Température dans le dispositif en fonction du débit d'eau provenant des modules Peltiers (Objectif hors contact et module Peltier réglés à 1°C). Détail : zoom pour des débits supérieurs à 15 μL/s.

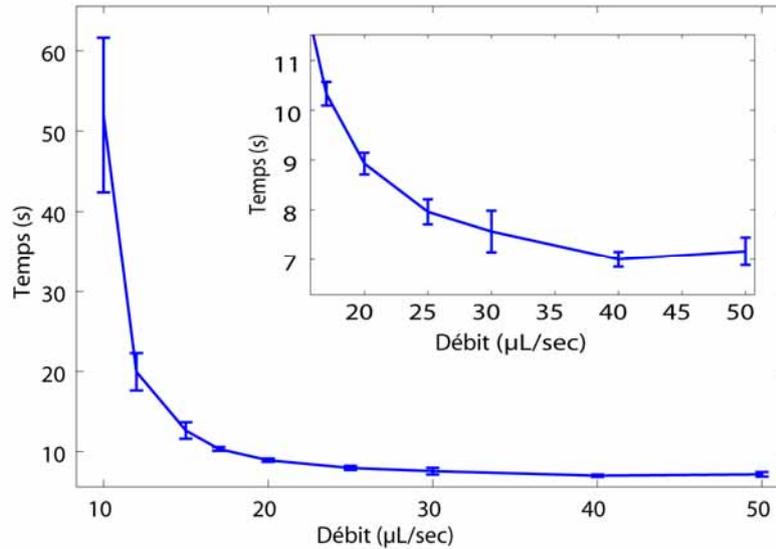


Figure 5.12 : Temps nécessaire au dispositif pour passer de 20°C à 5°C en fonction du débit d'eau provenant des modules Peltier (Objectif hors contact et module Peltier réglés à 1°C, en considérant une température finale de 2.7°C). Insert : zoom pour des débits supérieurs à 15μL/s.

L'écart entre la température dans le canal et la température des Peltier diminue quand le débit d'eau augmente jusqu'à atteindre un quasi plateau, à partir de 20μL/s. Sur ce plateau, cet écart de température est de 1.7°C. La température obtenue dans le canal contenant les cellules avec un Peltier réglé à 1°C est donc de 2.7°C, ce qui est largement suffisant pour dépolymériser le cytosquelette de *S.pombe*. De même la vitesse de changement de température de notre dispositif augmente avec le débit d'eau jusqu'à atteindre un quasi plateau à partir de 30μL/s. Sur ce plateau la température du canal chute de 20°C à 5°C en moins de 10 s. Ce plateau permet de sélectionner une plage de travail prédictible et robuste lorsque nous travaillerons avec des dispositifs sans sonde de température intégrée. Un débit de 30μL/s, situé au milieu du plateau, est un bon choix pour des expériences de contrôle de température avec des dispositifs qui n'utilisent pas de sonde de température.

Pour des débits d'eau plus élevés, les modules Peltier ne sont pas toujours capables de stabiliser leur température interne, il n'est donc pas recommandé d'utiliser des débits d'eau supérieurs à 50μL/s avec ce type de matériel.

La dépendance entre la température du canal d'étude et la vitesse de l'eau pour des débits inférieurs à 15μL/s offre la possibilité de contrôler la température du canal en modifiant légèrement le débit et non plus la température des modules Peltier. Au cours de certaines expériences nous avons utilisé cette méthode pour maintenir les microtubules d'une cellule à la taille désirée, en modifiant le débit en fonction de la taille des microtubules obtenus sur la dernière acquisition d'image.

Afin de démontrer la possibilité de changer la température du dispositif rapidement en prenant en compte l'inertie du système fluide, nous avons effectué une série de changements de température en inversant périodiquement le sens du flux d'eau traversant le dispositif (Figure 5.13).

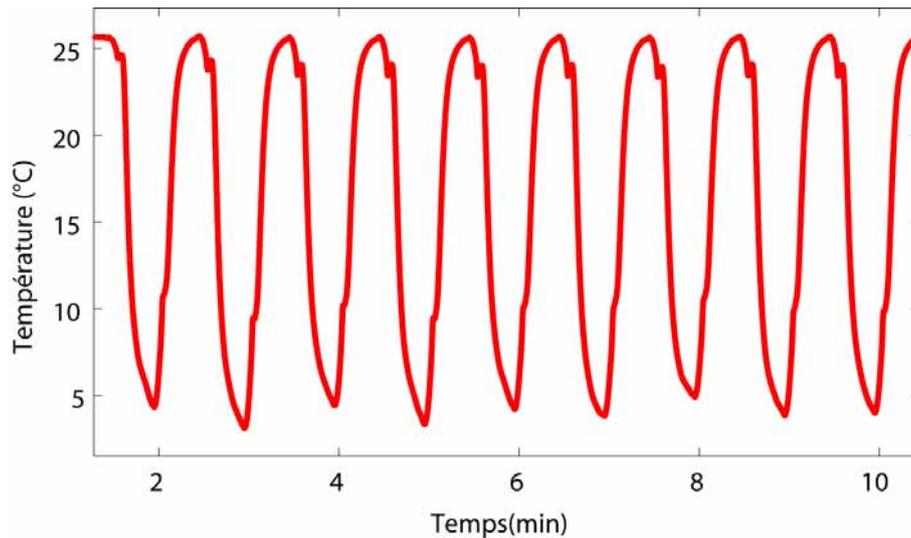


Figure 5.13 : Sur les courbes ci-dessus le sens du flux ($50\mu\text{L/s}$) s'inverse périodiquement toute les 30s. (Objectif hors contact).

Nous avons également étudié les caractéristiques de notre dispositif pour des températures permettant d'effectuer du contrôle d'activités de protéines thermosensibles. La plupart des protéines de *S.pombe* rendues thermosensibles ont un comportement normal à la température permissive (22°C) et sont rendues inopérantes à la température restrictive (33°C - 38°C). Ainsi en changeant rapidement la température de la cellule, il est possible de connaître le rôle d'une protéine au sein de la cellule à un instant donné. A cette fin, nous avons effectué le même type de caractérisation thermique que lors de la série d'expériences précédentes avec un module Peltier à température ambiante (22°C) et un autre à 39°C (Figure 5.14-15).

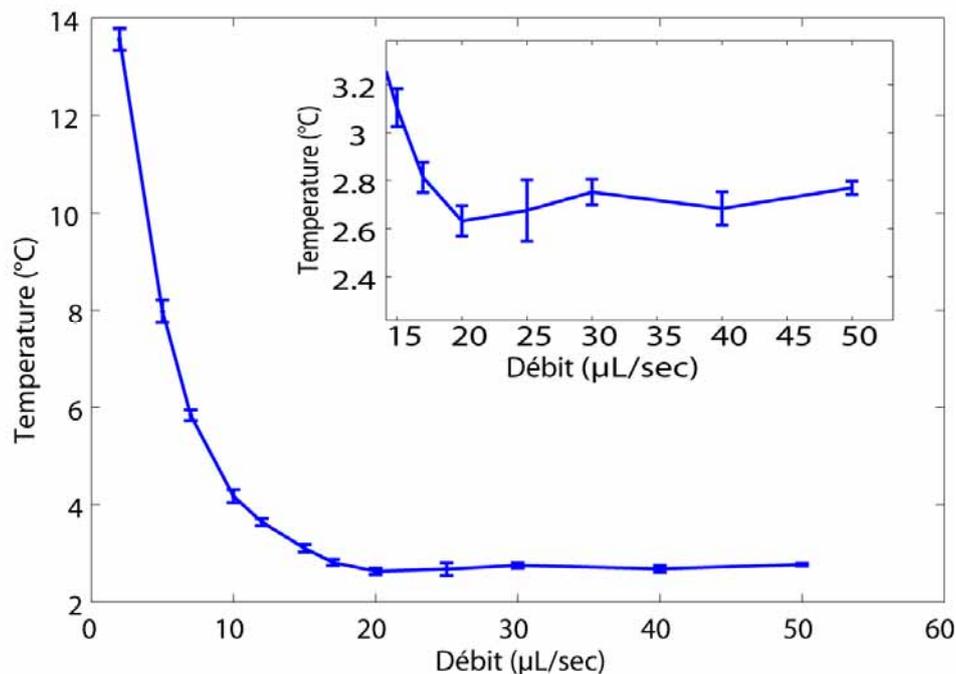


Figure 5.14 : Température dans le dispositif en fonction du débit d'eau venant des modules Peltiers (Objectif hors contact et module Peltier réglés à 39°C). Insert : zoom pour des débits supérieur à $15\mu\text{L/s}$.

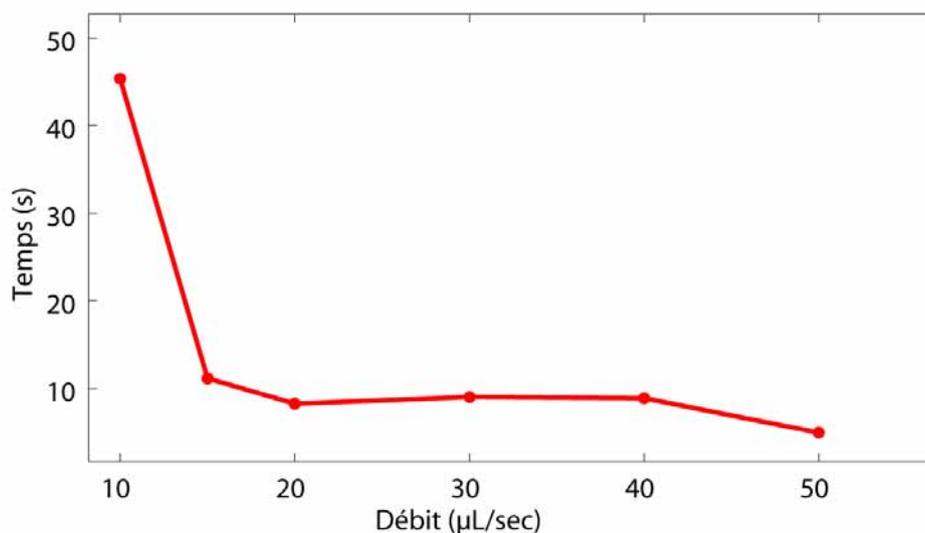


Figure 5.15 : Temps nécessaire au dispositif pour passer de 25°C à 35°C en fonction du débit d'eau venant des modules Peltiers. (Objectif hors contact et module Peltier réglés à 39°C, en considérant une température finale de 38°C))

Comme dans le cas de l'étude sur les basses températures, l'écart entre la température dans le canal et la température des modules Peltier diminue quand le débit d'eau augmente jusqu'à atteindre un quasi plateau au dessus de 20µL/s. Sur ce plateau nous obtenons un écart de température de 1°C, ainsi la température obtenue dans le canal avec un Peltier réglé à 39°C est de 38°C.

De même, la vitesse de changement de température de notre dispositif augmente avec le débit d'eau, jusqu'à atteindre un quasi plateau à partir de 20µL/s. Sur ce plateau la température du canal passe de 25 °C à 35°C en moins de 10 s. Ici aussi ce plateau permet de sélectionner une plage de travail prédictible et robuste lorsque nous travaillerons avec des dispositifs sans sonde de température intégrée.

5.2.2 Influence de l'objectif

Lorsque la goutte d'huile de l'objectif à immersion est en contact avec la lamelle de verre, elle crée un pont thermique entre notre échantillon et la structure métallique de l'objectif qui agit ainsi comme un dissipateur d'énergie. Nous avons évalué expérimentalement l'influence de l'objectif sur la température obtenue en fonction du débit d'eau avec un module Peltier réglé à 1°C (Figure 5.16).

Nous pouvons observer que la présence de l'objectif décale la température dans le canal approximativement de 2.5°C en régime permanent. Ce décalage implique qu'il existe un gradient de température horizontal dans la lame de verre au niveau de l'objectif de 2.5°C. Ce gradient de température peut poser problème si l'application biologique nécessite une température très homogène sur une surface supérieure à la taille de la goutte d'huile de l'objectif à immersion. (3mm de rayon)

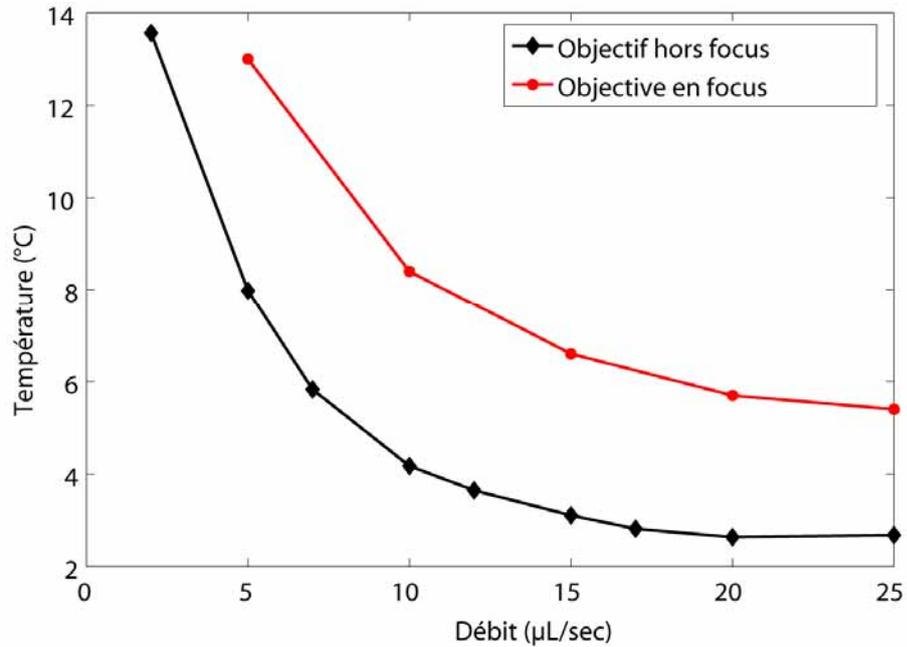


Figure 5.16 : Courbe de comparaison de la température obtenue dans le dispositif en fonction de la présence de l'objectif à immersion.

Pour limiter l'influence de ce phénomène, il est possible de déplacer horizontalement ou verticalement l'objectif entre deux photos et de revenir sur l'échantillon d'étude, uniquement lors de l'acquisition d'image. Nous pouvons observer une augmentation ou une diminution de la température dans le canal de 2.5°C en moins d'une seconde lors de la mise en contact ou de la séparation de l'objectif avec l'échantillon (Figure 5.17-18).

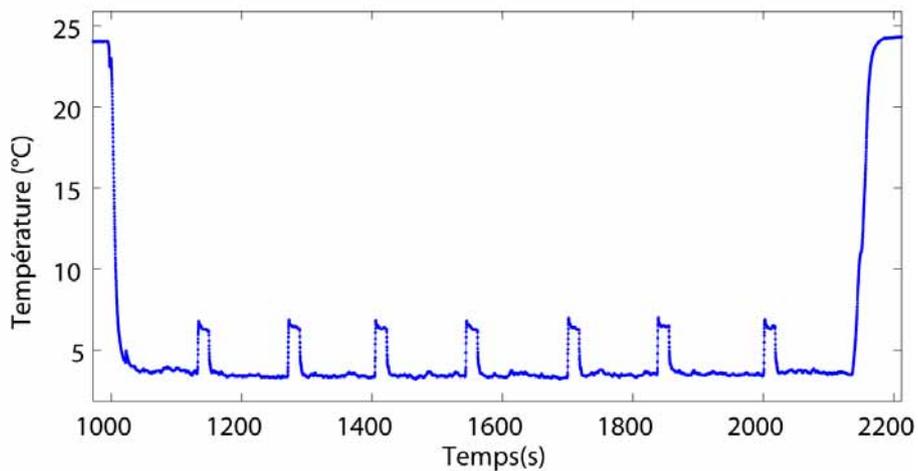


Figure 5.17 : Profil de température lors de la mise en contact de l'objectif toutes les 3 minutes pour les prises de vues. Cette expérience a été effectuée avec un module Peltier réglé à 1°C et un débit de 30μL/s.

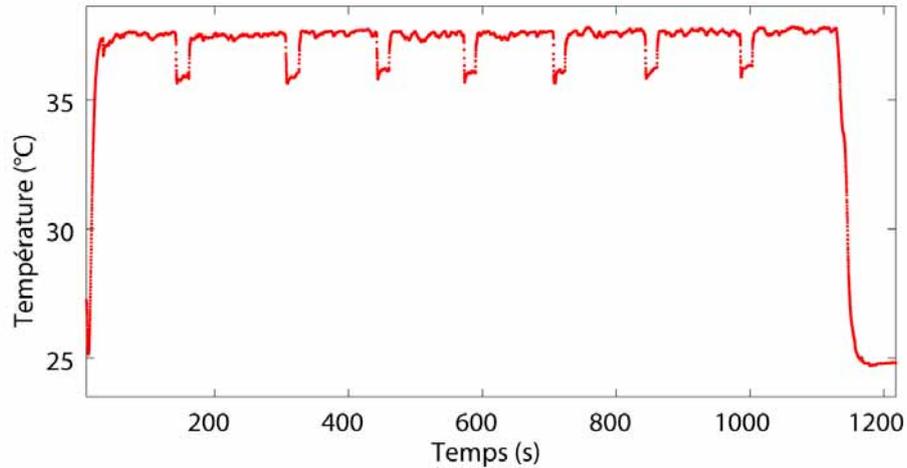


Figure 5.18 : Profil de température lors de la mise en contact de l’objectif toutes les 3 minutes pour les prises de vues. Cette expérience a été effectuée avec un module Peltier réglé à 39°C et un débit de 30 μ L/s.

Il est également possible d’utiliser un dispositif complémentaire de contrôle de température de l’objectif avec un circuit d’eau branché sur le même module Peltier que le dispositif microfluidique, afin que l’échantillon et l’objectif soient à la même température. Dans ce cas la goutte d’huile ne crée plus de pont thermique et la présence de l’objectif ne devrait plus décaler la température de l’échantillon. [bioptechs.com]

5.2.3 Positionnement dans le canal

La température dans le canal dépend également de la position par rapport à l’entrée du flux de fluide caloporteur. Sur la courbe ci-dessous nous pouvons visualiser la différence de température qui existe entre un point dans le canal situé sous l’entrée du canal caloporteur et un point situé sous la sortie du canal caloporteur (Figure 5.19).

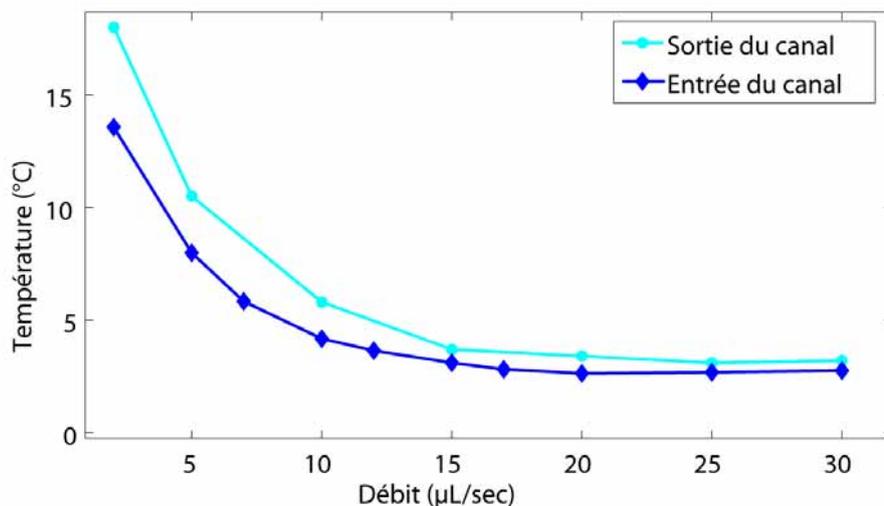


Figure 5.19 : Température mesurée en dessous de l’entrée et de la sortie du fluide caloporteur lorsque l’objectif à immersion n’est pas en contact avec la lamelle de verre

La mesure de cette différence permet de mesurer l'importance relative des échanges par conduction dans le canal sur la baisse de température du liquide caloporteur. La présence de l'objectif influence notablement cette température (Figure 5.20).

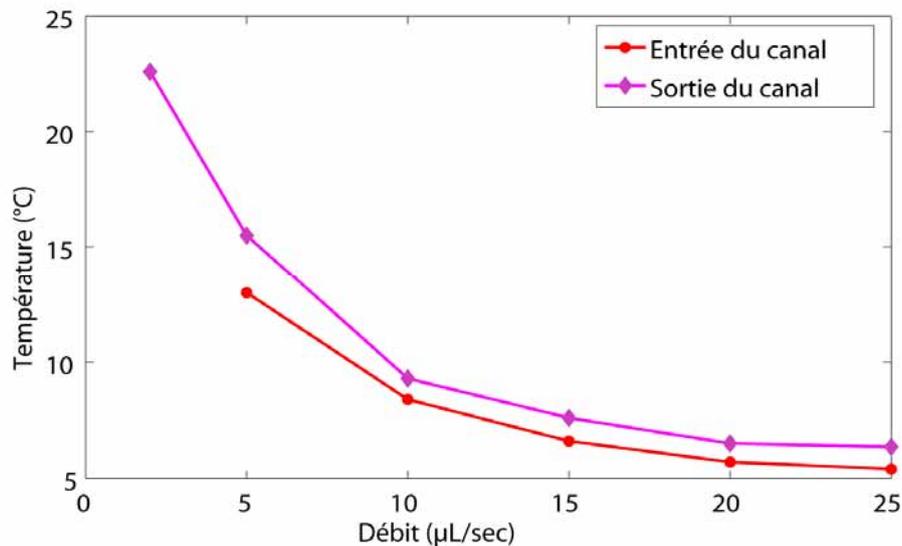


Figure 5.20 : Température mesurée en dessous de l'entrée et de la sortie du fluide caloporteur lorsque l'objectif à immersion est en contact avec la lamelle de verre

Pour des débits supérieurs à 20 µL/sec, la différence de température entre la sortie et l'entrée du canal est inférieure à 1°C quelle que soit la position de l'objectif. Lorsque l'objectif à immersion n'est pas en contact avec la lamelle de verre il y a moins de pertes par conduction thermique. Dans ce cas la différence de température entre l'entrée et la sortie du canal pour des débits supérieurs à 20µL/sec est inférieure à 0.5°C.

La présence de l'objectif a donc un effet sur la température dans les canaux des cellules qui ne se limite pas à la zone de contact entre l'objectif et la lamelle. Néanmoins cette influence reste de l'ordre d'un demi degré.

5.2.4 Décalage de la mise au point

Les objectifs de microscope sont composés d'un fin assemblage de lentilles sensibles aux dilatations thermiques. Par exemple une variation de la température ambiante de 1°C peut produire un décalage de mise au point de 500nm sur un objectif Nikon. [Nikon, Live Cells on the Microscope Stage]

Lors des expériences de contrôle de température que nous effectuons, il est donc nécessaire de compenser cette dérive thermique de l'objectif et de modifier la position du point focal pendant les phases de changement de température. Le phénomène étant relativement reproductible, il est possible d'appliquer à peu près la même correction de mise au point au cours du temps d'une expérience à l'autre. Pour cela il faut que les températures et les débits utilisés soient identiques. De la même manière la pression exercée par l'eau dans les canaux déforme la lamelle de verre et change la mise au point à chaque changement de flux. Ces deux phénomènes sont concomitants et impliquent de maintenir la mise au point pendant les phases de changement de température.

Nous avons utilisé le contrôle de température décrit plus haut pour étudier le cytosquelette de *S.pombe*. Nous avons tout d'abord effectué une expérience préliminaire afin de démontrer la possibilité de contrôler la dynamique du cytosquelette de *S.pombe* à l'aide de notre dispositif de contrôle de température. Pour cela nous avons observé la dépolymérisation des microtubules d'une colonie de *S.pombe* à basse température et la repolymérisation de son cytosquelette lors du retour du dispositif à la température ambiante. Après avoir démontré notre capacité à contrôler la dynamique du cytosquelette de *S.pombe* à l'aide de la température, nous avons effectué une série d'expériences sur la dynamique des iMTOC, structures qui ancrent les microtubules à l'enveloppe nucléaire, et sur l'influence des microtubules sur les mouvements du noyau et du Spindle Pole Body (SPB). Une étude préliminaire a également été menée pour étudier la dynamique du fuseau mitotique lors d'un changement de température survenant au cours de la mitose. Enfin nous avons démontré la possibilité de contrôler l'activité de protéines thermosensibles dans notre dispositif en synchronisant la mitose d'une colonie de *S.pombe* mutante. Les bases de biologie cellulaire de *S.pombe* nécessaires pour la compréhension de ce chapitre sont détaillées dans l'annexe C.

Dans toutes les expériences décrites par la suite, nous avons utilisé un microscope Nikon équipé d'une tête confocale à disque rotatif Yokagawa et d'un objectif à immersion à huile 100X 1.45NA. Le microscope est contrôlé par ordinateur via Métamorph et les compensations de mise au point entre chaque image ont été effectuées manuellement à l'aide de ce logiciel.

5.3.1 Contrôle du cytosquelette

L'expérience qui suit démontre la possibilité d'effectuer simultanément l'acquisition d'images hautes résolutions et de contrôler la polymérisation des microtubules en modifiant la température dans le dispositif. Pour cela nous avons utilisé une souche sauvage de *S.pombe* exprimant de la tubuline fluorescente (wt_atb2_GFP ; Pt 47). Au cours de cette expérience un module Peltier est réglé à 1°C et l'autre à 22°C.

La première phase se déroule à température ambiante, le cytosquelette de *S.pombe* est constitué de microtubules parcourant toute la longueur de la cellule (Figure 5.21).

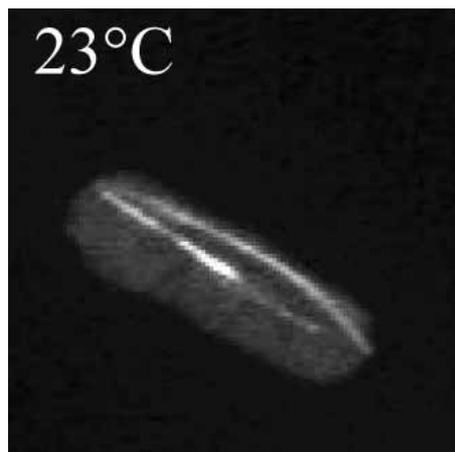


Figure 5.21 : Photo de *S.pombe* à température ambiante.

Dans un deuxième temps nous actionnons le pousse seringue à 30μL/sec afin de faire chuter la température du dispositif en dessous de 7°C. Les microtubules commencent à se dépolymériser et disparaissent presque complètement en moins de trois minutes (Figure 5.22).

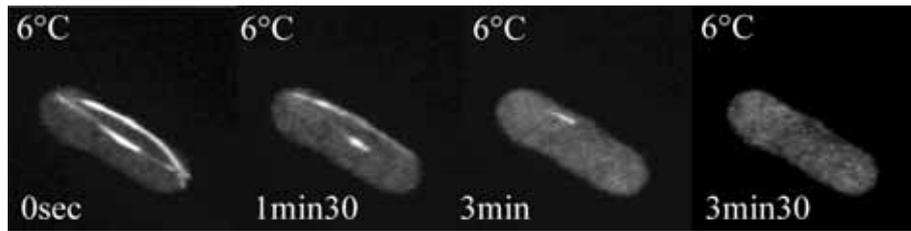


Figure 5.22 : Photos de S.pombe à basse température (<7°C).

La fluorescence du cytoplasme de la cellule augmente quand les microtubules se dépolymérisent car les molécules de tubulines sont dispersées dans toute la cellule. Lorsque nous inversons le sens du flux, le dispositif revient à température ambiante et les microtubules se repolymérisent en moins de trois minutes. (Figure 5.23).

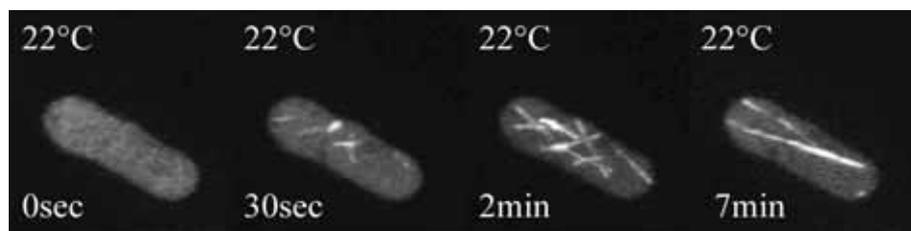


Figure 5.23 : Photos de S.pombe lors du retour à température ambiante.

Cette expérience préliminaire permet de démontrer la viabilité de ce type de dispositif pour contrôler le cytosquelette de S.pombe.

5.3.2 Mouvement des iMTOCs

Le but de cette expérience est de comprendre le type de liaison existant chez S.pombe entre la membrane nucléaire, les iMTOCs et les microtubules. Les microtubules de S.pombe contrôlent la forme de la cellule en définissant la position des zones de croissance cellulaire aux extrémités de la cellule. [Jacqueline Hayles 2001] Réciproquement, nous avons montré au cours d'une autre étude que la forme de la cellule contrôle l'organisation des microtubules. [Terenna 2008] Ainsi, une cellule courbée artificiellement développera un réseau asymétrique de microtubules. Cette expérience de courbure cellulaire a été réalisée à l'aide d'un dispositif microfluidique. En effet, la possibilité de piéger des cellules dans des microcanaux ayant une forme contrôlée permet de déformer les cellules. En injectant des levures S.pombe sauvages dans des canaux tordus, nous avons montré que les microtubules se rassemblent d'un seul côté de la cellule. En touchant la paroi cellulaire, les microtubules se tordent et s'accumulent dans la partie de la cellule leur permettant de conserver le plus grand rayon de courbure (Figure 5.24). Nous avons ainsi montré que la forme de la cellule a une influence sur la structure des microtubules.

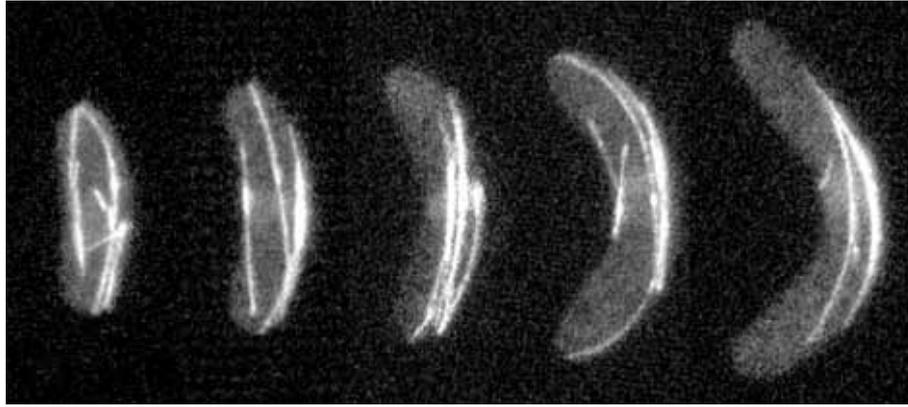


Figure 5.24 : Une cellule *S.pombe* de type sauvage dans un microcanal courbe. Au cours de sa croissance la cellule se courbe et les microtubules se réorganisent de manière asymétrique. [Terrena 2008]

Les microtubules sont liés à l'enveloppe nucléaire de la cellule par des points de fixation appelés iMTOCs (Interphase Microtubule Organisation Center). [PT. Tran 2001] Les types de liaison existant entre les iMTOCs, le noyau et les microtubules ne sont pas connus à ce jour. Lorsqu'une levure *S.pombe* est maintenue en position courbe dans un canal microfluidique, les microtubules se rassemblent ce qui provoque un rassemblement des iMTOCs. La dépolymérisation des microtubules de ces cellules courbées à basse température provoque la libération de la contrainte appliquée par les microtubules sur les iMTOCs. L'étude du comportement des iMTOCs en l'absence de la contrainte appliquée par les microtubules nous permet de connaître le type d'interaction existant entre les iMTOC, le noyau et les microtubules. Si une interaction élastique lie les iMTOCs et le noyau, les iMTOCs devraient retrouver une configuration symétrique lors de la disparition des microtubules. Dans le cas contraire, les iMTOCs resteront dans une position asymétrique et les microtubules repousseront également de manière asymétrique. Il est ainsi possible d'observer le comportement des iMTOCs en présence ou en l'absence de la contrainte appliquée par les microtubules. Pour cela nous avons étudié la dynamique des iMTOCs d'une cellule courbée en utilisant des changements rapides de température pour contrôler la polymérisation des microtubules..

Dans les cellules courbées par croissance dans un microcanal, le phénomène de rassemblement des microtubules est statistique et toutes les cellules ne réagissent pas exactement de la même manière lorsqu'elles sont contraintes dans une forme courbée. Certaines conditions de taille de cellule et de courbure favorisent grandement les chances d'obtenir des cellules ayant la totalité de leurs microtubules dans la même partie de la cellule.

Pour obtenir des cellules ayant une taille optimale pour nos expériences, nous avons utilisé un mutant de *S.pombe* *cdc25_atb2_GFP* (Pt 72). Le gène *cdc25* code pour une protéine nécessaire à l'entrée en phase de mitose. Le mutant thermosensible que nous utilisons a un gène *cdc25* muté qui produit une protéine fonctionnelle à 22°C et inactive à 35°C. Ainsi à 35°C ce mutant ne peut pas rentrer en mitose et continue à grandir indéfiniment. Il est ainsi possible de contrôler la taille de la cellule en choisissant le temps d'incubation de la cellule à 35°C. Pour cette expérience un module Peltier est réglé à 1°C et l'autre à 22°C.

Après 2 heures d'incubation à 35°C les cellules sélectionnées possèdent une structure de microtubules fortement asymétrique (Figure 5.25).

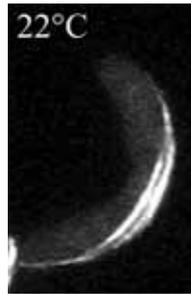


Figure 5.25 : Photo de *S.pombe* dans un canal courbé à température ambiante après deux heures d'incubation à 35°C.

Nous actionnons alors le pousse seringue à 30 μ L/s. pour faire baisser la température du dispositif. Les microtubules commencent à se dépolymériser et disparaissent presque complètement en moins de trois minutes. Nous faisons varier le débit en fonction du temps pour conserver des microtubules très courts et ainsi pouvoir observer leur mouvement dans la cellule (Figure 5.26).

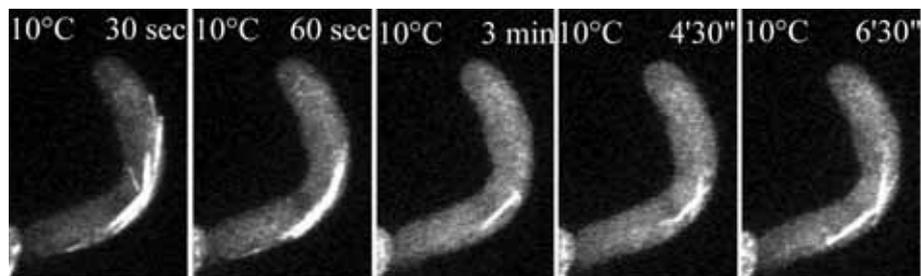


Figure 5.26 : Photo de *S.pombe* dans un canal courbé à basse température.

A basse température les microtubules partiellement dépolymérisées restent à la même position.

Après 6 minutes et 30 seconde à basse température, nous inversons le sens du flux et le dispositif revient à température ambiante. Les microtubules réapparaissent en moins de trois minutes dans leur position initiale, de manière fortement asymétrique (Figure 5.27).

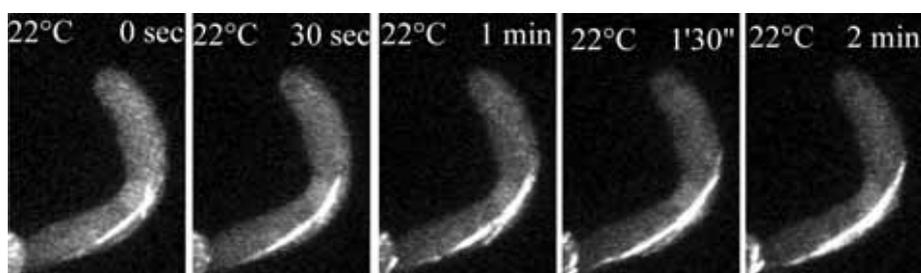


Figure 5.27 : Photo de *S.pombe* dans un canal courbé lors du retour à température ambiante.

Cette étude montre que les iMTOCs n'ont pas d'interaction élastique avec le noyau et ne retrouvent pas une position symétrique en l'absence de contrainte. Une fois que les iMTOCs ont été déplacés par les microtubules, ils conservent leurs nouvelles positions.

Cette expérience requiert une repolymérisation des microtubules dans le sens du grand axe de la cellule. Dans le cas contraire le contact des microtubules avec la membrane cellulaire au dessus du noyau exerce une force suffisante sur les iMTOCs pour les déplacer. Ainsi, lors de leur repolymérisation, les microtubules perturberont la distribution des iMTOCs et rendront l'expérience ininterprétable. Nous pouvons visualiser ce phénomène sur la figure 5.28.

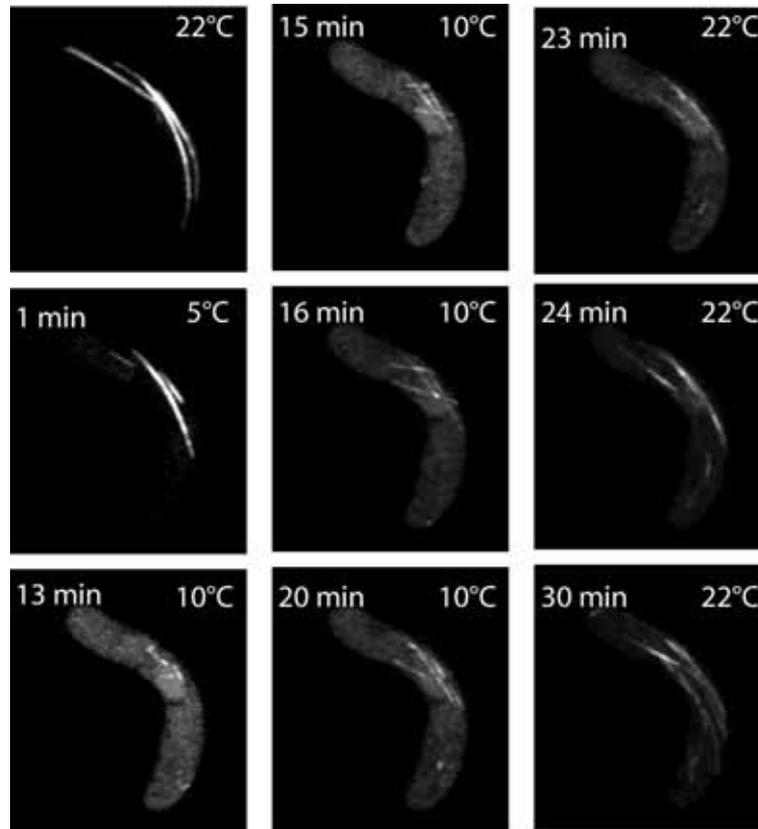


Figure 5.28 : Série de photographie montrant l'influence d'une microtubule touchant la paroi cellulaire sur la réorganisation du cytosquelette de *S.pombe* lors du retour à température ambiante.

Dans cette expérience, un microtubule touche la membrane cellulaire située juste au dessus du noyau et décale ainsi une partie des IMTOC vers le centre de la cellule.(15min-16min) Une fois une partie des IMTOC déplacée, les microtubules repoussent de manière désorganisée dans la cellule. (20min-30min)

5.3.3 Déformation du noyau

L'expérience présentée ici montre l'influence qu'exercent les microtubules sur la forme de la membrane nucléaire. Nous utilisons ici une souche de *S.pombe* mutante *cdc25* exprimant des microtubules et un marqueur de l'enveloppe nucléaire fluorescents, *nup107-GFP* (souche *cdc25 nup-107-GFP + mCherry-tub ; pt800*). *Nup-107* est un gène qui code pour une protéine présente dans les pores nucléaires de *S.pombe* [Bai 2004]. Il est ainsi possible d'observer presque simultanément l'enveloppe nucléaire et les microtubules (Figure 5.29). Au cours de cette expérience un module Peltier est réglé à 1°C et l'autre à 22°C.



Figure 5.29 : Photo en fausse couleur du mutant Pt800 utilisé dans cette étude.
(Rouge : les microtubule mCherry-tub / Vert : enveloppe nucléaire nup-107-GFP)

Lors de la première phase de l'expérience, à température ambiante, nous pouvons observer que l'enveloppe nucléaire est déformée en présence de microtubules (Figure 5.30).

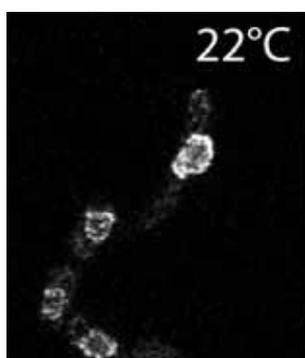


Figure 5.30 : Déformation du noyau de *S.pombe* par les microtubules à température ambiante.

Dans un deuxième temps, nous actionnons le pousse seringue à $30\mu\text{L}/\text{sec}$ afin de faire chuter la température du dispositif en dessous de 7°C . Les microtubules commencent à se dépolymériser et disparaissent presque complètement en quelques minutes (Figure 5.31).

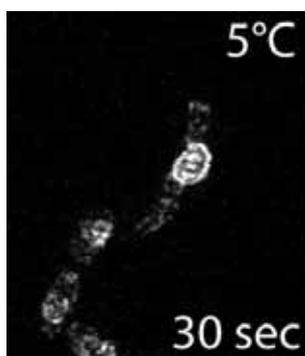


Figure 5.31 : Photo du noyau non déformé, en l'absence de microtubules, lorsque *S.pombe* est à basse température.

Nous pouvons voir qu'en absence de microtubules, l'enveloppe nucléaire redevient presque instantanément sphérique.

Enfin, lorsque nous inversons le sens du flux, le dispositif revient à température ambiante, les microtubules réapparaissent et l'enveloppe nucléaire se déforme à nouveau (Figure 5.32).

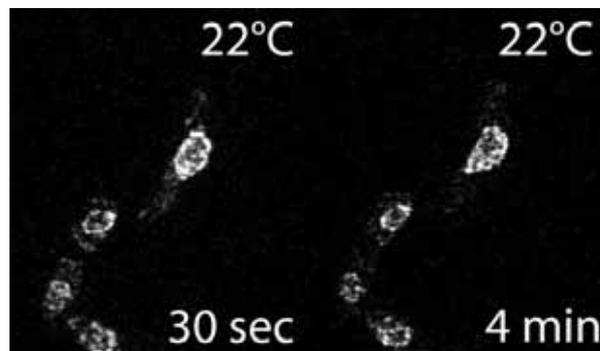


Figure 5.32 : S.pombe lors du retour à température ambiante. Le noyau se déforme à nouveau

L'implication des microtubules dans la déformation de la membrane nucléaire avait déjà été démontrée auparavant à l'aide de drogues dépolymérisantes [Tran 2001]. Néanmoins cette expérience nous permet d'observer pour la première fois, ce phénomène, sur des échelles de temps inférieures à la minute.

5.3.4 Mouvements du SPB

Nous avons également étudié l'influence de la présence de microtubules sur le mouvement du spindle pole body (SPB). Le SPB est un centre de nucléation fixé au noyau qui permet l'assemblage du fuseau mitotique lors de la mitose. Le rôle et le positionnement du SPB sont essentiels au bon fonctionnement de la division cellulaire. Nous avons étudié ici le rôle des microtubules dans les mouvements du SPB. Pour cela nous avons utilisé une souche mutante *cdc25* exprimant un marqueur fluorescent du SPB (*alp4-GFP*) et de la tubuline fluorescente (*cdc25 + alp4-GFP/mCherry-tub ; PT932*) (Figure 5.30).

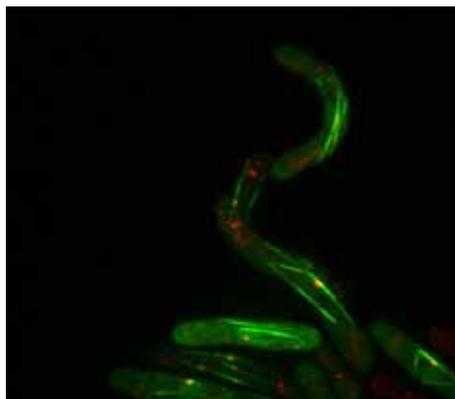


Figure 5.33 : Photographie d'une colonie de mutants S.pombe PT932 qui nous permet d'observer simultanément les microtubules (en vert) et le SPB (en rouge)

Au cours de cette expérience, un module Peltier est réglé à 1°C et l'autre à 22°C. Après une phase à température ambiante où nous pouvons observer le squelette de microtubule de S.pombe et les mouvements du SPB (Figure 5.34).

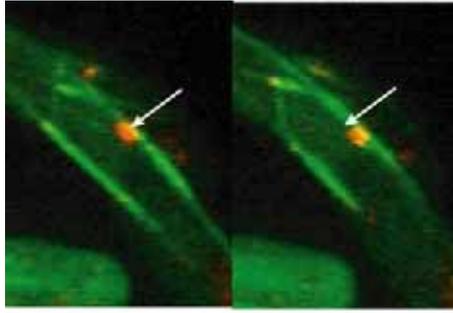


Figure 5.34 : A température ambiante et en présence de microtubule le SPB (point rouge) se déplace. (La flèche blanche pointe la position du SPB sur la première image) (45 secondes entre chaque photo)

Nous actionnons le pousse seringue à $30\mu\text{L}/\text{sec}$ afin de faire chuter la température du dispositif en dessous de 7°C . Les microtubules se dépolymérisent et disparaissent presque complètement. En l'absence de microtubules les SPB sont presque immobiles (Figure 5.35).

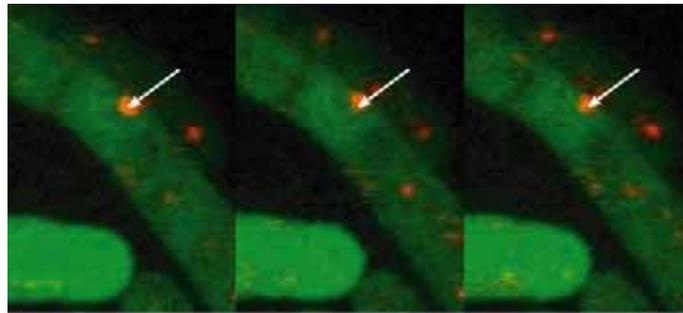


Figure 5.35 : A basse température et en l'absence de microtubule le SPB (point rouge) reste immobile. (3 minutes entre chaque photo)

Lorsque nous inversons le sens du flux, le dispositif revient à température ambiante et les microtubules réapparaissent. Dans un premier temps, ces derniers ne touchent pas la membrane et les SPB restent immobiles (Figure 5.36).

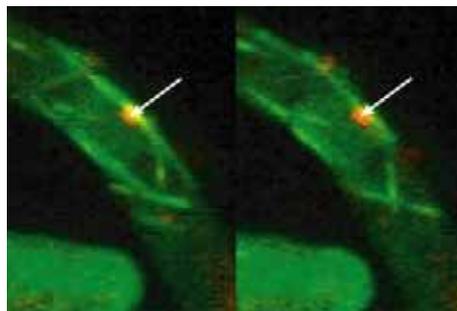


Figure 5.36 : Lors du retour à température ambiante, lors de la croissance des microtubules le SPB (point rouge) reste immobile. (45 secondes entre chaque photo)

Enfin lorsque les microtubules touchent à nouveau la membrane cellulaire, ces derniers appliquent à nouveau une force sur le SPB et ses mouvements deviennent plus rapides (Figure 5.37).

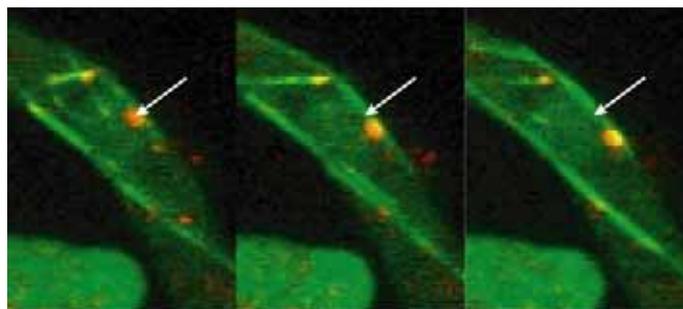


Figure 5.37 : Lorsque les microtubules touchent la membrane le SPB se déplace à nouveau. (45 secondes entre chaque photo)

Cette étude montre que les mouvements du SPB sont très liés à la présence des microtubules. La disparition de ces derniers a une influence immédiate sur les mouvements du SPB. Des recherches utilisant des drogues avaient déjà montré l'importance des microtubules dans les mouvements du SPB [Tran 2001], mais encore une fois, jamais aucune étude sur l'influence des microtubules sur les mouvements du SPB n'avait été menée à des échelles de temps aussi courtes.

5.3.5 Contrôle du fuseau mitotique

Lors des premières phases de la mitose (prophase), le cytosquelette microtubulaire interphasique de *S.pombe* se dépolymérise complètement pour former un nouvel assemblage unique appelé fuseau mitotique. Le fuseau mitotique permet de séparer physiquement le matériel génétique des deux côtés opposés de la cellule pendant la division cellulaire. L'étude de son fonctionnement est un sujet de recherche majeur en biologie cellulaire car la compréhension des mécanismes de division cellulaire permet de mieux cibler les futurs traitements contre le cancer. Lors de l'élongation du fuseau mitotique en anaphase, des microtubules astraux apparaissent aux extrémités de ce dernier. A l'heure actuelle leur rôle n'est pas clairement établi.

Nous pouvons voir ci-dessous, à température ambiante le fuseau mitotique d'une cellule en phase de mitose et ses microtubules astraux aux extrémités (Figure 5.38).

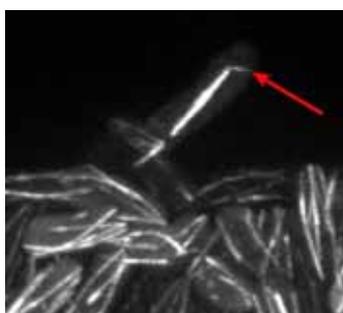


Figure 5.38 : Photo d'une levure *S.pombe* en cours de mitose. A température ambiante nous pouvons voir le fuseau mitotique (trait le plus lumineux) et un microtubule astral (en haut).

A des températures inférieures à 7°C les microtubules astraux disparaissent, mais par contre le fuseau mitotique lui ne se dépolymérise pas car sa structure est plus stable que celle des microtubules (Figure 5.39).



Figure 5.39 : A basse température nous pouvons voir d'une part que les microtubules des cellules en interphase et les microtubules astraux sont dépolymérisés et d'autre part que le fuseau mitotique de la cellule en mitose ne se dépolymérise pas.

En augmentant la température de quelques degrés, les microtubules astraux ne repolymérisent toujours pas mais le fuseau mitotique continue à s'allonger. Si l'on augmente encore la température de quelques degrés, les microtubules astraux et ceux des cellules en interphase repolymérisent. (Figure 5.40).

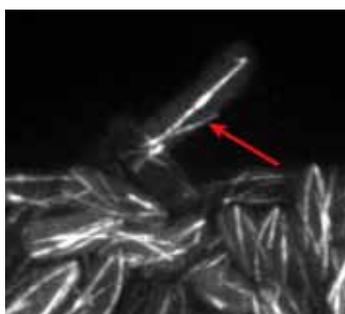


Figure 5.40 : Lors du retour à température ambiante les microtubules astraux se repolymérisent.

Ces résultats préliminaires laissent supposer que des expériences complémentaires permettront d'étudier avec quelques degrés d'écart l'élongation du fuseau mitotique en présence ou non des microtubules astraux. Ceci permettra de comprendre le rôle que jouent ces microtubules dans la division cellulaire.

5.3.6 Contrôle de protéines thermosensibles : synchronisation cellulaire

Afin de valider la possibilité d'utiliser le dispositif que nous proposons pour l'étude de protéines thermosensibles, nous avons effectué une expérience de synchronisation cellulaire en utilisant un mutant *cdc25* thermosensible. A une température de 36°C les mutants *cdc25* ne peuvent plus se diviser et continuent à grandir. Si l'étape à 36°C est suffisamment longue (4 heures) toutes les cellules de l'échantillon se retrouvent bloquées juste avant le stade de la mitose. Ainsi, lors du retour à la température ambiante toutes les cellules commencent leur division de manière synchronisée. Au cours de cette expérience un module Peltier est réglé à 38°C et l'autre à 22°C.

Au départ les cellules de l'échantillon ont des tailles légèrement supérieures à des levures *S.pombe* normales (Figure 5.41).

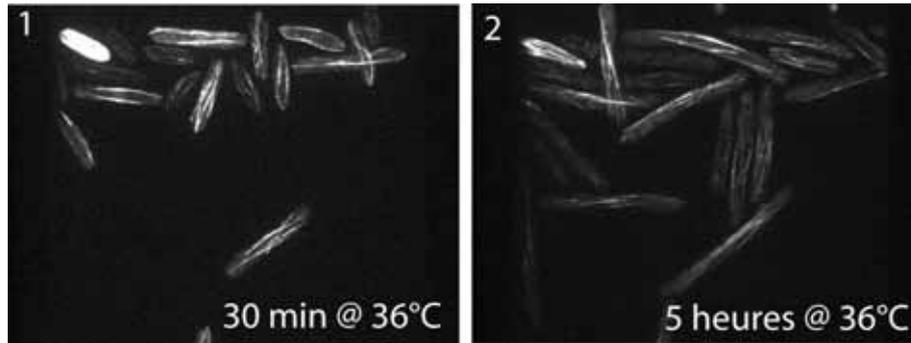


Figure 5.41 : A 36°C les levures *S.pombe cdc25* ne peuvent plus se diviser et continuent à grandir.

A 36°C les cellules continuent à grandir et ne se divisent plus. Après 4 heures, elles sont maintenant, toutes, d'une taille anormalement grand (Figure 5.42).

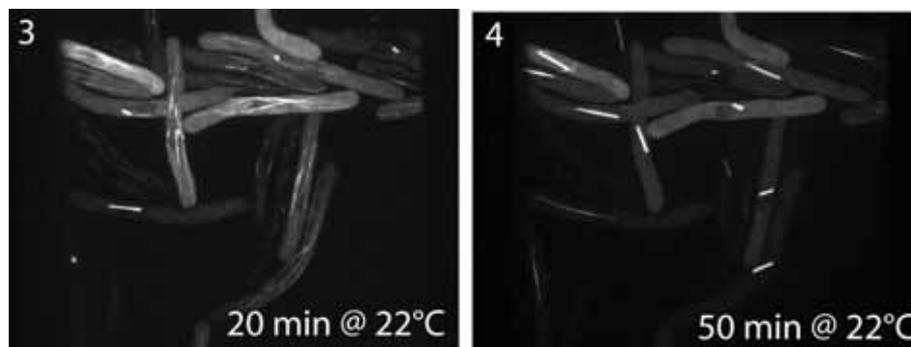


Figure 5.42 : Lors du retour à température ambiante les levures *S.pombe cdc25* peuvent à nouveau se diviser. 30 minutes après le retour à la température ambiante, 40% des cellules rentrent en mitose. (Photo 3). 50 minutes après le retour à la température ambiante 90% des cellules sont maintenant en phase de mitose. (Photo 4)

Comme nous pouvons le voir sur la figure (5.42), 50 minutes après le retour à température ambiante 90% des cellules sont entrées en mitose. Les cellules de l'échantillon ont donc été synchronisées lors de l'étape à 36°C. Cette expérience montre la possibilité de contrôler l'activité de la protéine *cdc25* au sein du dispositif, en utilisant des variations de température.

5.4 Conclusion le contrôle de températures pour la biologie cellulaire

Le contrôle de température pour la biologie cellulaire que nous avons présenté dans ce chapitre nous a permis d'effectuer de nombreuses expériences sur le cytosquelette de *S.pombe*. Pour la première fois un dispositif microfluidique simple adapté aux contraintes de la biologie cellulaire permet de passer entre deux températures de la gamme 5-40 degré en moins de 10 secondes. Il autorise également des prises de vues haute résolution à l'aide d'objectifs à immersion durant les changements de température. Nous avons utilisé ce dispositif pour étudier pour la première fois le comportement des iMTOCs sur l'enveloppe nucléaire de *S.pombe*. Nous avons également montré l'influence des microtubules sur la déformation de l'enveloppe nucléaire et les mouvements du SPB à des échelles de temps

encore jamais atteintes auparavant. Comme le montre nos expériences de synchronisation de division cellulaire ce dispositif permet également de contrôler l'activité de protéines thermosensibles comme cdc25. La possibilité d'activer ou d'inactiver, à l'aide de changements de température, la fonctionnalité d'une protéine en moins de 10 secondes à tout moment du cycle cellulaire, ouvre la voie pour de nouvelles recherches en biologie cellulaire, particulièrement sur le rôle des protéines d'intérêt rendues préalablement thermosensibles.

Conclusions Générales

Cette thèse a eu pour objet de coupler la microthermique, la microfluidique et les méthodes de lithographie molle pour fabriquer des dispositifs de mesure et de contrôle de température intégrés permettant de répondre à des questions scientifiques spécifiques. Nous avons investigué la faisabilité de ce couplage à travers trois projets distincts, couvrant les grands domaines d'intérêt de ce type de dispositif :

- i) En physique, par la réalisation d'un microconductimètre thermique adapté à la caractérisation thermique de petites quantités de fluides.
- ii) En thermochimie, par la réalisation d'un microcalorimètre pour le contrôle de réaction chimique en continu.
- iii) En biologie, pour le contrôle de température de réaction biochimique moléculaire ou cellulaire.

Le couplage entre la lithographie molle, la microfluidique et la thermique aux échelles micrométriques pourrait avoir des applications dans les domaines de la physique, de la chimie et de la biologie. Le contrôle de multiples paramètres simultanément, les faibles constantes de temps des échanges thermiques, la capacité d'intégration et le faible coût permis par ces technologies permettront de mettre au point de nouveaux outils et ainsi d'explorer de nouveaux champs de recherches ou bien encore de mener des études cliniques sur puce.

Nous avons tout d'abord utilisé les avantages apportés par la microthermique et les technologies de microfabrication dans le domaine de la physique en développant un conductimètre thermique sur puce. Ce microconductimètre thermique, dérivé de la méthode du « fil chaud », utilise un dépôt de platine sur une lamelle de verre comme élément de chauffe et de mesure de température. Ce dispositif est capable de mesurer la conductivité thermique de liquides sur des gouttes de 25 μ L avec une précision de 1% comparable à celle des conductimètres macroscopiques utilisant des volumes 1000 fois plus gros. Ce conductimètre thermique a été utilisé pour étudier la conductivité thermique de suspensions de nanoparticules appelées nanofluides. Les résultats obtenus sur des nanofluides à base de nanotubes de carbone corroborent les résultats obtenus précédemment par d'autres équipes. Nous avons également effectué des mesures de conductivité thermique sur des suspensions de nanoparticules sphériques métalliques, d'oxydes métalliques et de diélectriques de différentes tailles. Nous avons mis en évidence le manque de stabilité dans le temps des dispersions de nanofluides commerciaux et les mesures obtenues n'ont pas permis de déterminer clairement le lien entre l'augmentation de la conductivité thermique du liquide et les caractéristiques physiques des nanoparticules en dispersion. Une étude plus approfondie prenant en compte la qualité des dispersions serait nécessaire pour répondre de manière pertinente aux questions scientifiques posées par les caractéristiques thermiques des nanofluides.

L'application de la lithographie molle à la thermochimie nous a donné la possibilité de fabriquer un microcalorimètre à flux continu en verre/PDMS intégrant des résistances de platine pour la mesure de température. Notre dispositif utilise une technologie simple et facilement intégrable contrairement aux dispositifs déjà publiés, utilisant des technologies sur des substrats en silicium. Ces dispositifs nécessitaient des étapes technologiques complexes pour fabriquer des membranes suspendues, afin de limiter les pertes thermiques dues à la grande conductivité thermique du silicium. La lithographie molle sur verre permet de s'affranchir de l'utilisation de membranes suspendues. Nous avons montré que les

microcalorimètres en verre/PDMS permettraient d'atteindre des performances équivalentes aux microcalorimètres utilisant des substrats en silicium tout en utilisant des technologies beaucoup plus simples compatibles avec les « labs-on-chip ». Ce type de dispositif pourra par la suite être intégré dans des systèmes plus complexes pour effectuer des mesures en continu dans un laboratoire sur puce pour le suivi de réactions chimiques.

La possibilité de fabriquer des dispositifs microfluidiques multicouches à base de PDMS nous a permis de mettre au point deux systèmes de contrôle de température.

Le premier est destiné à la réalisation de PCR quantitative sur puce. Ce dispositif est constitué d'une couche mince transparente d'ITO utilisée comme élément de chauffe et d'une piste de platine comme capteur de température. Pour éviter toute contamination entre les expériences, nous avons mis au point une structure en PDMS sur 3 couches qui permet de séparer le circuit fluidique en PDMS contaminé par les réactifs de PCR et de réutiliser la lamelle de verre contenant les résistances avec un circuit en PDMS neuf. Ce dispositif réutilisable permet d'effectuer les cycles de températures nécessaires à la PCR et de suivre un signal fluorescent au cours de la réaction à l'aide d'un microscope. Le réseau de canaux microfluidiques de refroidissement intégré de ce dispositif permet d'atteindre des vitesses de refroidissement de 84°C/S , ce qui correspond actuellement, à notre connaissance, au refroidissement pour la PCR utilisant des technologies à base de PDMS, le plus rapide jamais publié. Ces vitesses de refroidissement élevées devraient permettre à terme d'augmenter la qualité de la réaction tout en envisageant une mesure quantitative sur le transcriptome de cellule unique.

Le second contrôle de température est une version simplifiée de celui décrit précédemment destiné à la biologie cellulaire. Cette version n'utilise plus de résistance intégrée mais uniquement la circulation de liquide à température contrôlée dans des microcanaux. Cette nouvelle méthode pour le contrôle de température pour la biologie cellulaire sur puce est compatible avec la microscopie haute résolution et permet d'atteindre des changements de température supérieures à 5°C/S . Ce dispositif simple et jetable convient aux exigences de l'expérimentation quotidienne en biologie cellulaire qui nécessite d'effectuer un grand nombre d'expériences sans contamination entre elles. Ce nouveau type de contrôle de température intégré permet de tirer avantage de la rapidité des transferts thermiques aux microéchelles et de proposer des possibilités de contrôle de l'environnement apportées par les technologies de fabrication de dispositif microfluidique en PDMS. Il est ainsi possible de cultiver des cellules dans le dispositif, de contraindre mécaniquement ces dernières, de changer le milieu de culture, d'injecter des drogues et de modifier la température ambiante en quelques dizaines de secondes. A l'aide de ce dispositif nous avons étudié le cytosquelette de *S.pombe* en utilisant la sensibilité de ce dernier à la température. Nous avons ainsi montré l'absence d'élasticité des points d'attaches des microtubules sur la membrane nucléaire. Nous avons également démontré la possibilité de contrôler l'activité de protéines thermosensibles à l'aide de notre contrôle de température en inactivant une protéine de signalisation à la température restrictive, bloquant ainsi l'entrée en mitose de mutant *cdc25* et provoquant la synchronisation de la division cellulaire lors du retour à la température permissive.

Le couplage, soft lithographie, microfluidique, micro thermique possède de nombreux atouts pour la recherche dans le domaine de la biologie cellulaire. La rapidité de mise en œuvre, la flexibilité et la rapidité des changements de température permettront d'ouvrir de nouveaux champs de recherches pour la détermination du rôle de protéines dans les différents processus cellulaires. La compréhension du rôle des protéines a des applications directes pour la compréhension du fonctionnement de la machinerie cellulaire et dans recherche de nouveaux traitements.

Ces recherches continueront dans mon stage post doctoral, en utilisant le contrôle de température développé pour l'étude du « cytosquelette de S.pombe » mais orienté cette fois ci vers la détermination du rôle de protéines d'intérêt dans la division cellulaire et la lutte contre le cancer.

Ce travail de recherche a mis en évidence la possibilité d'intégrer des outils de mesure et de contrôle de température dans un dispositif microfluidique à partir des technologies les plus couramment utilisées pour la fabrication de laboratoire sur puce. Les exemples d'applications que nous avons choisis dans cette thèse ne reflètent qu'une petite partie des possibilités offertes par le couplage entre la microfluidique et la thermique. Bien qu'il reste de nombreuses recherches à mener dans ce domaine nous avons développé des outils permettant aussi bien de mener des opérations de routine, que d'ouvrir de nouveaux champs de recherche dans d'autres domaines scientifiques particulièrement en biologie cellulaire.

Bibliographie

United States Patent 6089751 : Transparent temperature sensor for an active matrix liquid crystal display

Alberts, D. Bray, K. Hopkin, *L'essentiel de la biologie cellulaire*, Flammarion, (2005)

P.D. Andrews, J.R. Swedlow, M.E. Dailey, M. Platani, D.C. Focht, K.R. Spring, N.S. Claxton, S.G. Olenych, G.K. Ottenberg, J.D. Griffin, and M.W. Davidson , *Maintaining Live Cells on the Microscope Stage*, www.nikon.com

H.F. Arata, P. Low, K. Ishizuka, C. Bergaud, B. Kima, H. Noji, H. Fujita, *Temperature distribution measurement on microfabricated thermodevice for single biomolecular observation using fluorescent dye.*, *Sensors and Actuators B*, **117**, 339, (2006)

M.J. Assael, C.F. Chen, I.N. Metaxa and W.A. Wakeham, *Thermal conductivity of nanofluids*, In *Thermal Conductivity 27/Thermal Expansion 15: Proc. 27*, (2005)

P.A. Auroux, Y. Koc, A. Mello, A. Manz and P.J.R. Day, *Miniaturised nucleic acid analysis*, *Lab Chip*, **4**, 534, (2004)

S.W. Bai, J. Rouquette, M. Umeda, W. Faigle, D. Loew, S. Sazer, and V. Doye, *The Fission Yeast Nup107-120 Complex Functionally Interacts with the Small GTPase Ran/Spi1 and Is Required for mRNA Export, Nuclear Pore Distribution, and Proper Cell Division*, *Mol Cell Biol*, **24**, 6379, (2004)

W.F. Brinkman, Member, IEEE, D.E. Haggan, and W.W. Troutman, *A History of the Invention of the Transistor and Where It Will Lead Us*, *IEEE J. Solid-State Circuits*, **32**, 1858, (1997)

M.A. Burns, C.H. Mastrangelo, T.S. Sammarco , F.P. Man, J.R. Webster , B.N. Johnson , B. Foerster , D. Jones , Y. Fields , A.R. Kaiser , D.T. Burke , *Microfabricated structures for integrated DNA analysis*. *Proc Natl Acad Sci*, **93**, 5556, (1996)

C.J. Campbell and B.A. Grzybowski, *Microfluidic mixers: from microfabricated to self-assembling devices*, *Phil. Trans. R. Soc. Lond. A*, **362**, 1069, (2004)

S.G. Charati, S.A. Stern , *Diffusion of Gases in Silicone Polymers: Molecular Dynamics Simulations*, *Macromolecules*, **31**, 5529, (1998)

S.U.S. Choi, Z.G. Zhang, W. Yu, F.E. Lockwood, E.A. Grulke , *Anomalous thermal conductivity enhancement in nanotube suspensions - Appl. Phys. Lett.*, **79**, 2252 (2001)

F. Conseil, P. Derderian, D. Collard, L. Buchaillot, M.F. Ravat, *lose infrared thermography using an intensified CCD camera: application in nondestructive high resolution evaluation of electrothermally actuated MEMS*, *Proc SPIE*, **5856**, 819, (2005)

J.H. Daniel , S. Iqbal , R.B. Millington , D.F. Moore , C.R. Lowe , D.L. Leslie, M.A. Lee, M.J. Pearce, Silicon microchambers for DNA amplification, *Sens. Actuators A*, **71** ,81, (1998)

W. Daungthongsuk, S. Wongwises, A critical review of convective heat transfer of nanofluids, *Renewable Sustainable Energy Rev.*,**11**,797, (2005)

R.H. Davis ,The effective thermal conductivity of a composite material with spherical inclusions - *Int. J. Thermophys*, **7**,609, (1986)

J.A. Eastman, S.U.S. Choi, S. Li, W. Yu, L.J. Thompson, Anomalous increased effective thermal conductivities of ethylene glycol-based nanofluids containing copper nanoparticles, *Appl. Phys. Lett.* , **78**,718, (2001)

S. Ebert, K. Travis, B. Lincoln, and J. Guck , Fluorescence ratio thermometry in a microfluidic dual-beam laser trap, *Opt. Express*, **15**, 15493,(2007)

J. El-Ali, P.K. Sorger & K.F. Jensen, Cells on chips, *NATURE*, **442**, 27, (2006)

D. Erickson, D. Li , Integrated microfluidic devices, *Anal. Chim. Acta*, **507**,11, (2004)

M.B. Fox . D.C. Esveld, A. Valero . R. Lutge , H.C. Mastwijk, P.V. Bartels, A. Van Den Berg, R.M. Boom, Electroporation of cells in microfluidic devices: a review, *Anal Bioanal Chem*, **385**, 474, (2006)

I. Bársony, P. Fürjes, M. Ádám, Cs. Dücső, J. Zettner and F. Stam, Thermal response of microfilament heaters in gas sensing, *Sens. and actuators B*,**103**,442, (2004)

D.K. Fyngenson , E. Braun , A. Libchaber .Phase diagram of microtubules.*Phys Rev E Stat Phys Plasmas Fluids Relat Interdiscip Topics*, **50**,1579, (1994)

M. Gorjánác, I.W. Mattaj, J. Rietdorf Some Like It Hot, *Switching Biology on the Microscope*, *G.I.T. Imaging & Microscopy*, **2**, 28, (2007)

A. Groisman, C. Lobo, H. Cho, J.K. Campbell, Y.S. Dufour, A.M. Stevens, A. Levchenko, A microfluidic chemostat for experiments with bacterial and yeast cells. *Nature methods*,**2**, 685, (2005)

R.M. Guijt, A. Dodge, G. Dedem, N. Rooij, E. Verpoorte, Chemical and Physical processes for integrated temperature control in microfluidic devices, *Lab Chip*, **3**, 1,(2003)

S.S. Guo, M.H. Sun, J. Shi W.H. Huang, C. Combellas, Y. Chen, Patterning of hydrophilic micro arrays with super-hydrophobic surrounding zones, **84** , 1673, (2007)

S.E. Gustafsson, transient hot strip techniques for measuring thermal conductivity and thermal diffusivity, *The Rigaku Journal*, **4**, 16, (1987)

S.E. Gustafsson, E. Karawacki and M.N. Khan, Transient hot-strip method for simultaneously measuring thermal conductivity and thermal diffusivity of solids and fluids *J. Phys. D: Appl. Phys*, **12**,1411, (1979).

S.E. Gustafsson and E. Karawacki, Transient hot strip probe for measuring thermal properties of insulating solids and liquids, *Rev. Sci. Instrum.*, **54**,744,(1983)

M. Gustavsson, H. Nagai, and T. Okutani, Thermal effusivity measurements of insulating liquids using microsized hot strip probes, *Rev. Sci. Instrum.*, **74**, 4542, (2003)

M. Gustavsson, H. Nagai, and T. Okutani, Measurements of the Thermal Effusivity of a Drop-Size Liquid Using the Pulse Transient Hot-Strip Technique, *Int. J. Thermophys.*, **26**, 1803, (2005)

J.W Haarman, A contribution to the theory of the transient hot-wire method, *Physica*, **52**, 605, (1971)

R.L. Hamilton, O.K. Crosser, Thermal Conductivity of Heterogeneous Two-Component Systems- *Industrial & Engineering Chemistry Fundamentals*, **1**, 187, (1962)

U. Hammerschmidt, *International Journal of Thermophysics*, A Quasi-Steady State Technique to Measure the Thermal Conductivity, **24**, 1291, (2003)

J. Hayles and P. Nurse, A journey into space, *Nature reviews: molecular cell biology*, **2**, 647, (2001)

J.J. Healy, J.J de Groot and J. Kestin, the theory of the transient hot-wire method for measuring thermal conductivity, *physica*, **82C**, 392, (1976)

A.W. van Herwaarden, Overview of calorimeter chips for various applications, *Thermochim. Acta*, **432**, 192,(2005)

C.M. Ho, Y.C. Tai, Micro Electro- mechanical systems (MEMS) and fluid, *Annu. Rev. Fluid Mech.*,**30**, 579, (1998)

P.J. Hung, P.J. Lee, P. Sabounchi, N. Aghdam, R. Lin and L.P. Lee, A novel high aspect ratio microfluidic design to provide a stable and uniform microenvironment for cell growth in a high throughput mammalian cell culture array, *Lab Chip*, **5**, 44, (2005)

F.P. Incropera, D.P. Dewitt, *Fundamentals of heat and mass transfer*, fifth edition, Wiley, (2002)

S.P. Jang, S.U.S. Choi, Role of Brownian motion in the enhanced thermal conductivity of nanofluids, *Appl. Phys. Lett.*, **84**, 4316, (2004)

D.J. Jeffrey, Conduction Through a Random Suspension of Spheres, *Proc. R Soc.: Mathematical and Physical Sciences*, **335**, 355, (1973)

M.A. Jordan and L. Wilson, Microtubules as a target for anticancer drugs, *Nature Reviews: cancer*, **4**,253, (2004)

P. Keblinski, J. A. Eastman, and D. G. Cahill, Nanofluids for thermal transport, *materials today*,**8**, 36, (2005)

P. Keblinski, SR Phillpot, SUS Choi, JA Eastman, Mechanisms of heat flow in suspensions of nano-sized particles (nanofluids), *Int. J. Heat Mass Transfer*, **45**, 855, (2002)

D.S. Kim, S.H. Lee, T.H. Kwon, C.H. Ahn , A serpentine laminating micromixer combining splitting/recombination and advection, *Lab Chip*, **5**, 739, (2005)

H. Klank, J.P. Kutter, O. Geschke , CO₂-laser micromachining and back-end processing for rapid production of PMMA-based microfluidic systems , *Lab Chip*, **2**, 242, (2002)

J. Knight, A. Vishwanath, , J.P. Brody & R.H Austin, Hydrodynamic focusing on a silicon chip: mixing nanoliters in microseconds. *Phys. Rev. Lett.*, **80**, 3863, (1998)

K.G. Kreider, Thin film transparent thermocouples, *Solid-State Sensors and Actuators : Transducers, Digest of technical paper*, 643, (1991)

E.T. Lagally, C.A. Emrich , R.A. Mathies. Fully integrated PCR-capillary electrophoresis microsystem for DNA analysis. *Lab Chip*, **1**, 102, (2001)*

M. Le Berre, C. Crozatier, G. Velve Casquillas, Y. Chen, Reversible assembling of microfluidic devices by aspiration. *Microelectron. Eng.*, **83**, 1284 (2006)

S. Lekas, *Signal Conditioning & PC Based Data Acquisition Handbook*, Iotech inc

J. Lerchner, A. Wolf, G. Wolf, V. Baier, E. Kessler, M. Nietzsche, Krugel, A new micro-fluid chip calorimeter for biochemical applications *Thermochim. Acta*, **445**, 144, (2005)

J. Lerchner, A. Wolf, G. Wolf, I. Fernandez, Chip calorimeters for the investigation of liquid phase reactions: Design rules, *Thermochim. Acta*, **446**, 168, (2006)

J. Lerchner, A. Wolf and G. Wolf, Recent developments in integrated circuit calorimetry, *J. Therm. Anal. Calorim.*, **57**, 241, (1999)

C. Liao, G. Lee, H. Liu, T. Hsieh, C. Luo, Miniature RT-PCR system for diagnosis of RNA-based viruses, *Nucleic Acids Res.*, **33**, 156, (2005)

M. Liu , M. Lin , I. Huang , C. Wang , Enhancement of thermal conductivity with carbon nanotube for nanofluids, *J. Heat & Mass Transfert*, **32**, 1202, (2005)

P. Lindner , *Schizosaccharomyces pombe* n. sp. neuer Gärungserreger *Wochenschr f Brauerei*, **10**, 1298, (1893)

G.L. Liu, J. Kim, Y. LU and L.P. Lee, Optofluidic control using photothermal Nanoparticles, *nature materials*, **5**, 27, (2005)

M. Lounaci, P. Rigolet, G. Velve Casquillas, H.W. Huang, Y. Chen, Toward a comparative study of protein crystallization in microfluidic chambers, *Microelectron. Eng.* , **83**, 1673, (2006)

E.M. Lucchetta, J.H. Lee, L.A. Fu, N.H. Patel & R.F. Ismagilov, Dynamics of Drosophila embryonic patterning network perturbed in space and time using microfluidics, *Nature*, **434**, 1134,(2005)

G. Maltezos, M. Johnston, and A. Scherer, Thermal management in microfluidics using micro-Peltier junctions, *Appl. Phys. Lett.* **87**, 87, (2005)

A. J. de Mello, M. Habgood, N.L. Lancaster, T. Welton and R. C. Wootton, Precise temperature control in microfluidic devices using Joule heating of ionic liquids, *L a b C h i p*, **4**,417, (2004)

K.P. Möllmann, N. Lutz, and M. Vollmer, Thermography of Microsystems, *InfraMation Proceedings*, (2004)

C.A. Nieto de Castro, J.C.G. Calado, W.A. Wakeham and M. Dix, An apparatus to measure the thermal conductivity of liquids, *J. Phys. E: Sci. Instrum.*, **9**, 1073, (1976)

A. Plecis, Etude et contrôle de la charge de surface dans les dispositifs micro/nanofluidiques : nouveaux outils pour les sciences séparatives, thèse de doctorat, (2008)

S. Palm, R.B. Oueslati, S. Martel, D. Therriault, Fabrication de microcaloducs a section triangulaire par écriture directe, conference SHF : Microfluidics (2006).

D. Prasher , V. Eckenrode , W. Ward , F. Prendergast , M. Cormier. "Primary structure of the Aequorea victoria green-fluorescent protein"., *Gene*, 111, 229, (1992)

S.R. Quake* and A. Scherer, From Micro to Nanofabrication with Soft Materials, *science*, **290**, 1536 ,(2000)

D. Ross, M. Gaitan, and L.E. Locascio, Temperature Measurement in Microfluidic Systems Using a Temperature-Dependent Fluorescent Dye, *Anal. Chem.*,**73**, 4117, (2001)

F. Rouquérol et J. Rouquérol, Pourquoi plus de cent tentatives de mesure de la chaleur? , Présentation aux Journées mic-jirec, (2005)

S. Shenogin, A. Bodapati, L. Xue, R. Ozisik, and P. Keblinski, Effect of chemical functionalization on thermal transport of carbon nanotube composites, *Appl. Phys. Lett.*,**85**, 2229, (2004)

J. Shi, C. Peroz, G. Velve Casquillas, A. Pepin, M. Belotti, L.P. Xu, D. Peyrade, Y. Chen, Fabrication and surface functionalization of high aspect ratio plastic nanostructures. *Microelectron. Eng.*, **84**, 1724, (2007)

O. Shimomura , F.H. Johnson & Y. Saiga, Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan Aequorea. *J. Cell. Comp. Physiol.*, **59**, 223, (1962).

J. Song, D. Tice & R.F. Ismagilov, Microfluidic system for controlling reaction networks in time. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **42**, 768, (2003).

A. Stroock, S.K.W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezic, H.A. Stone & G.M. Whitesides, Chaotic mixer for microchannels., *Science*, **295**, 647, (2002)

K. Sun, A. Yamaguchi, Y. Ishida, S. Matsuo, H. Misawa, A heater-integrated transparent microchannel chip for continuous-flow PCR, *Sens. Actuators: B*, **84**, 283, (2002)

P. Tabelling, *Introduction à la microfluidique*, Belin, 2003

J. Taine, J.P. Petit, transferts thermiques, *Introduction aux science des transferts*, Dunod, (2003)

C.R. Terenna, T. Makushok, G. Velve-Casquillas, D. Baigl, Y. Chen, M. Bornens, A. Paoletti, M. Piel, PT Tran, Physical mechanisms redirecting cell polarity and cell shape. Accepted in *Current Biology*, (2008)

P.T. Tran, L. Marsh, V. Doye, S. Inoue, F. Chang, A Mechanism for Nuclear Positioning in Fission Yeast Based on Microtubule Pushing, *The Journal of Cell Biology*, **153**, 397, (2001)

P. T. Tran, *Microfluidics, microtubules, and cellular patterns*, présentation, (2006)

P.T. Tran, L.Marsh, V.Doye, S.Inoué and F.Chang, A mechanism for nuclear positioning in fission yeast based on microtubule pushing, *Journal of cell biology*, **153**, 397, (2001)

V. Trisaksri, S. Wongwises, Critical review of heat transfer characteristics of nanofluids, *Renewable Sustainable Energy Rev.*, **11**, 512, (2005)

M.A. Unger, H. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, S.R. Quake, Monolithic Microfabricated Valves and Pumps by Multilayer Soft Lithography, *Science*, **288**, 113, (2000)

P. Vadasz, heat conduction in nanofluid suspension, *Journal of heat transfer*, **128**, 465, (2006),

G. Velve Casquillas, M. Le berre, C.R. Terrena, C. Fu, A.M. Haghiri-Gosnet, J.J. Greffet, P.T. Tran, Y. Chen, Disposable microfluidic temperature control for on chip cell studies, *proceeding microTAS*, (2008)

G. Velve Casquillas, N. Bontoux, M. Le Berre, J.J. Greffet, Y. Chen, Fast temperature control using an integrated cooling system for on-chip quantitative PCR, *Proceeding MNE*, (2006)

J. Voldman, M.L. Gray, and M.A. Schmidt, *Microfabrication in Biology and Medicine*, *Annu. Rev. Biomed. Eng.*, **1**, 401, (1999)

I. Wadso and R. Goldberg, Standards in isothermal microcalorimetry *Pure Appl. Chem.*, **73**, 1625, (2001)

Y. Wang, Z. Iqbal, and S. Mitra, Rapidly Functionalized, Water-Dispersed Carbon Nanotubes at High Concentration, *J. AM. CHEM. SOC. E*, **128**, 95, (2005)

Warner 2006 datasheet OW series

www.warneronline.com, Heating: Application Fundamentals

S. Wei Bai, J. Rouquette, M. Umeda, W. Faigle, D. Loew, S. Sazer and V. Doye, The Fission Yeast Nup107-120 Complex Functionally Interacts with the Small GTPase Ran/Spi1 and Is Required for mRNA Export, Nuclear Pore Distribution, and Proper Cell Division, *J. Biol. Chem.*, **279**, 6379, (2004)

D. Wen, Y. Ding, Effective Thermal Conductivity of Aqueous Suspensions of Carbon Nanotubes - *J. Thermophys Heat Transfer*, **18**, 481, (2004)

A.R. Wheeler, W.R. Throdsset, R.J. Whelan, A.M. Leach, R.N. Zare, Y.H. Liao, K. Farrell, I.D. Manger, and A. Daridon, Microfluidic Device for Single-Cell Analysis, *Anal. Chem.*, **75**, 3581, (2003)

V. Wood & *al.* The genome sequence of *Schizosaccharomyces pombe*. *Nature*, **415**, 871, (2002)

A.T. Woolley, D. Hadley, P. Landre, A.J. Mello, R.A. Mathies, M.A. Northrup. Functional integration of PCR amplification and capillary electrophoresis in a microfabricated DNA analysis device. *Anal Chem.*, **68**, 4081, (1996)

Y. Xia and G.M. Whitesides, Soft lithography, *Annu. Rev. Mater. Sci.*, **28**, 153, (1998)

H.M. Xia, S.Y.M. Wan, C. Shu, Y.T. Chew, Chaotic micromixers using two-layer crossing channels to exhibit fast mixing at low Reynolds numbers, *Lab Chip*, **5**, 748, (2005)

H. Xie, H. Lee, W. Youn, M. Choi, Nanofluids containing multiwalled carbon nanotubes and their enhanced thermal conductivities, *J. Appl. Phys.*, **94**, 4967, (2003)

Y. Yang, Z.G. Zhang, E.A. Grulke, W.B. Anderson, G. Wu, Heat transfer properties of nanoparticle-in-fluid dispersions (nanofluids) in laminar flow, *Int. J. Heat Mass Transfer*, **48**, 1107, (2005)

R. Zengerle and S. Haeberle, *cours de microfluidique*, chapitre 4: Diffusion

C. Zhang, J. Xu, W. Ma, W. Zheng, PCR microfluidic devices for DNA amplification, *Biotechnol. Adv.*, **24**, 243 (2005)

Y. Zhang, S. Tadigadapa, Calorimetric biosensors with integrated microfluidic channels, *Biosensors and Bioelectronics*, **19**, 1733, (2004)

Y. Zhang, A micromachined thermal sensor for biochemical sensing and polymer characterization, *thesis*, (2005)

Annexes

Annexe A :
Procédés de micro-fabrication

Les technologies basées sur le moulage de micro canaux en PDMS ont connu un fort développement. La réduction des coûts et du temps de fabrication des dispositifs ont permis à un grand nombre de laboratoires de mener des recherches en microfluidique. Les technologies multicouches de PDMS peuvent être couplées avec d'autres procédés technologiques permettant ainsi d'étendre les fonctionnalités et le champ d'application des dispositifs microfluidiques en verre/PDMS. Les technologies de dépôt de couches minces développées pour la microélectronique sont compatibles avec les substrats en verre. Il est ainsi possible d'intégrer des électrodes et des résistances à l'intérieur du dispositif. Le champ d'application de l'intégration de pistes métalliques en microfluidique est très large. Ces dernières permettent notamment : de contrôler et de mesurer la température localement, d'effectuer des mesures capacitatives, des réactions d'électrochimies ou des contrôles de flux par électro-osmose.

Dans cette annexe nous allons décrire de manière détaillée les étapes nécessaires pour intégrer une résistance sur verre dans un dispositif microfluidique. Par la suite nous décrirons la procédure permettant de fabriquer un moule microfluidique en résine. Enfin, nous procéderons à un rapide récapitulatif des technologies alternatives compatibles avec celles utilisées dans les dispositifs verre/PDMS.

A.1 Procédure technologique pour l'intégration de résistances dans un dispositif microfluidique

L'intégration de résistance dans un dispositif microfluidique nécessite des étapes de photolithographie, de dépôt métallique et éventuellement en fonction de l'application visée, de gravure et de dépôt de diélectrique. Nous allons détailler ci-dessous les étapes technologiques les plus courantes utilisées lors de l'intégration d'une résistance de platine dans un dispositif microfluidique (Figure A.1). Pour obtenir des dispositifs identiques et opérationnels, toutes ces étapes doivent être effectuées dans une salle blanche avec le minimum de contamination particulaire possible.

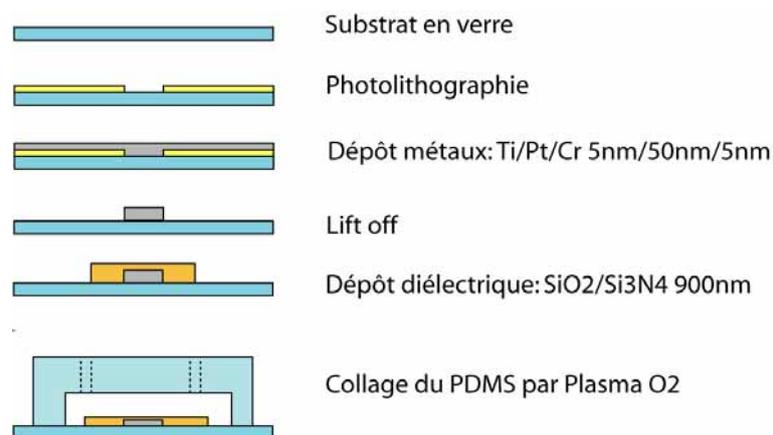


Figure A.1 : Procédure technologique pour la fabrication d'un dispositif microfluidique avec une piste de platine intégrée dans le microcanal

La première étape consiste à s'assurer de la propreté du substrat en verre avant de commencer les étapes de microfabrication. Après nettoyage du substrat, il est nécessaire

d'effectuer une photolithographie afin de reporter physiquement le dessin de la future résistance sur le substrat. L'étape de photolithographie utilise un procédé proche de la photographie pour reporter le dessin de la résistance dans une résine photosensible.

Après l'étape de photolithographie, une couche de métal est déposée uniformément sur toute la surface de l'échantillon. Une fois cette étape terminée, l'échantillon est immergé dans un bain d'acétone qui dissout la résine et permet d'éliminer le métal collé sur celle-ci. Cette étape appelée « lift off » permet de ne garder que le métal collé sur la lamelle de verre et de se débarrasser de celui déposé sur la résine. Ainsi le motif de la résistance précédemment défini dans la résine par photolithographie est maintenant reporté sous forme de piste métallique sur le substrat.

Dans les applications microfluidiques, il est souvent nécessaire de protéger électriquement et chimiquement la piste métallique des agressions liées aux expérimentations futures effectuées dans le dispositif microfluidique. Pour cela nous déposons une couche de diélectrique uniformément sur la totalité de notre dispositif. Afin de pouvoir procéder aux contacts électriques futurs de nos résistances il est :

- soit nécessaire de protéger les pads de contacts lors du dépôt
- soit d'effectuer une gravure du diélectrique au niveau de ces derniers.

Une fois que toutes les étapes technologiques nécessaires à la fabrication de la résistance sont terminées, il est possible de coller la partie fluide en PDMS sur le substrat en verre. Pour cela nous utilisons un plasma d'air ou d'oxygène qui permet d'activer les surfaces du verre et du PDMS. Une fois le plasma terminé, le bloc de PDMS et la lamelle de verre sont mis en contact et se retrouvent ainsi collés de manière covalente.

A.1.1 La préparation du substrat

Pour fabriquer la majeure partie de nos dispositifs nous utilisons des lamelles de verre Corning 75x25mm d'une épaisseur de 1mm. Le type nettoyage du substrat s'effectue en fonction des étapes technologiques à effectuer et de la taille des pistes métalliques à intégrer.

Pour les dispositifs les plus sensibles comme ceux nécessitant une étape de bonding (collage) anodique ou intégrant des pistes métalliques inférieures à 10 microns, il est préférable d'effectuer un nettoyage type Piranha (mélange H_2O_2/H_2SO_4 , 95%/30%, 1:5, 1 heure). Ce mélange très réactif doit être utilisé avec précaution car un mauvais rapport des deux produits peut provoquer une réaction fortement exothermique dangereuse pour l'utilisateur, particulièrement en cas d'addition de matière organique. Ce type de nettoyage permet d'éliminer la quasi-totalité des particules et des dépôts éventuels présents sur le substrat.

Pour les dispositifs n'intégrant pas de piste métallique inférieure à 10 microns, un nettoyage à l'acétone suivi d'un rinçage à l'isopropanol est la plupart du temps, suffisant pour atteindre la propreté de substrat requise.

A.1.2 La photolithographie

L'étape de photolithographie permet de retranscrire dans une résine le motif désiré présent sur un masque. Ce masque se présente généralement sous la forme d'une plaquette de quartz recouverte par le dessin en chrome du motif voulu. Le chrome d'une épaisseur de 50 nm ne laisse pas passer les UV (UV3 et UV4) utilisés par les machines de photolithographie. Ainsi en plaquant ce masque au dessus d'une résine photosensible, et en éclairant l'ensemble

avec des UV, il est possible de n'insoler que les zones de résine non protégées par les dessins en chrome présents sur le masque.

La résine étant photosensible, cette dernière subit des modifications chimiques dans les zones touchées par les UV. Après développement, cette méthode permet de retranscrire le motif du masque dans la résine. Ultérieurement il sera possible par le biais de dépôt, de gravure ou de « lift off » de transformer ce motif de résine en motif métallique afin de fabriquer une résistance. Les étapes nécessaires à la réalisation d'une photolithographie sont détaillées dans la Figure A.2.

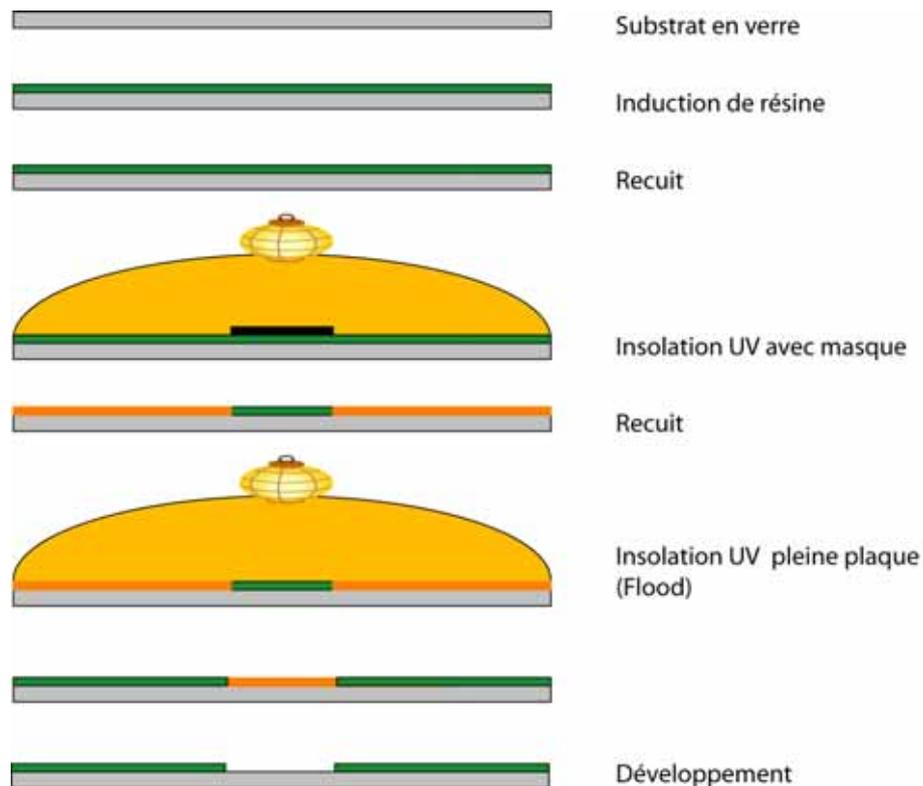


Figure A.2 : Procédure technologique pour effectuer une photolithographie sur une résine inversible type AZ5214.

Le choix de la résine est primordial et se fait en fonction de l'application recherchée. Par exemple pour fabriquer des moules, nous choisirons des résines ayant une bonne résistance mécanique et chimique comme les résines SU8. Pour réaliser une résistance par « lift off » il est préférable d'utiliser une résine produisant des reliefs possédant des flancs obliques. Les résines photosensibles utilisées en photolithographie peuvent être classées en trois catégories :

- Les résines positives dont les zones insolées par les UV seront plus faciles à dissoudre dans le développeur que les parties ayant été protégées par le masque.
- Les résines négatives dont les zones insolées par les UV seront plus difficiles à dissoudre dans le développeur que les parties ayant été protégées par le masque.
- Les résines inversibles sont initialement positives et deviennent négatives lors d'une étape spécifique appelée insolation pleine plaque ou « flood ».

Les flancs de résine obtenus après photolithographie avec les résines inversibles se prêtent bien aux applications nécessitant un « lift off » ultérieur. C'est pourquoi pour ce type d'application nous utilisons une résine inversible type AZ5214.

L'étalement de la résine sur le substrat (induction) s'effectue par force centrifuge à l'aide d'une tournette. Une goutte de résine AZ5214 est déposée au centre de l'échantillon qui est ensuite mis en rotation. L'épaisseur finale de résine est fonction de la viscosité de la résine et de la vitesse de rotation de l'échantillon. Cette méthode très utilisée permet d'obtenir un dépôt de résine d'épaisseur uniforme, sur toute la surface de l'échantillon.

L'étalement est immédiatement suivi d'une étape de recuit sur une plaque chauffante. Ce recuit permet aux solvants présents dans la résine de s'évaporer

Une fois que l'échantillon est revenu à température ambiante, il est placé sous une lampe UV pour l'insolation. Le masque de photolithographie est placé sur l'échantillon en contact avec la résine. Le plaquage du masque sur l'échantillon est primordial pour obtenir des motifs conformes au dessin inscrit sur le masque. Une fois le masque en place, le cache protégeant l'échantillon du flux d'UV issus de la lampe à mercure est ouvert. La durée d'insolation dépend de la lampe UV, de l'épaisseur et du type de résine utilisée.

Un deuxième recuit est ensuite effectué à l'aide d'une plaque chauffante afin de terminer la réaction chimique commencée lors de l'insolation.

Dans le cas des résines positives et négatives, ce dernier recuit est suivi par l'étape de développement. Par contre, dans le cas des résines inversibles, il est nécessaire d'effectuer une deuxième étape d'insolation après ce deuxième recuit.

Cette deuxième étape d'insolation, appelé flood, se fait sans masque et permet d'inverser la résine.

Enfin l'échantillon est plongé dans un bain de développeur. Cette étape permet de dissoudre sélectivement les zones de résine insolée ou non. Après séchage, l'échantillon est prêt pour l'étape de métallisation.

A.1.3 Les dépôts de métaux

Une fois la photolithographie terminée, l'échantillon est placé dans un bâti de métallisation. Nous utilisons un bâti de déposition SCM 450 utilisant un canon à électrons pour déposer la couche de platine de 50 nm nécessaire à nos mesures de température. Le platine n'adhère pas sur le verre, pour cette raison nous déposons préalablement une couche d'accroche en titane de 5nm. De même les oxydes protecteurs déposés dans la suite de la procédure technologique n'adhèrent pas sur le platine. Pour remédier à ce problème, nous déposons une couche de chrome de 5nm sur la couche de platine. Ainsi notre dépôt métallique est composé d'une alternance de trois couches métalliques : 5 nm de chrome, 50 nm de platine et 5 nm de chrome. Le chrome pourrait également être utilisé en tant que couche d'accroche pour le platine sur le verre mais comme nous le verrons plus loin, pour des raisons de sélectivité de gravure, il est préférable d'utiliser des métaux différents pour fabriquer les deux couches d'accroche.

A.1.4 Le « lift off »

Le « lift Off » est une étape relativement simple qui consiste à plonger l'échantillon dans un bain d'acétone (Figure A.3). La résine utilisée pendant la photolithographie est soluble dans l'acétone. Lorsque la résine se dissout elle décroche la couche métallique déposée dessus. Ainsi après le bain d'acétone, il ne subsiste du métal que sur les parties du substrat qui n'étaient pas protégées par la résine.

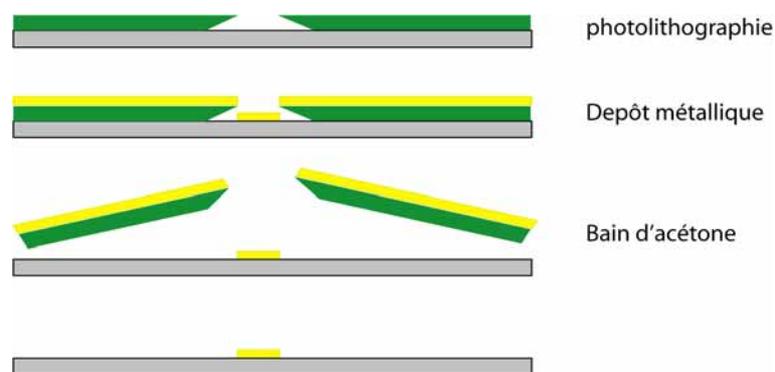


Figure A.3 : Principe du « lift of ». Les flancs obliques de la résine permettent de briser la continuité de la couche métallique et d’obtenir un décrochage propre du métal et une piste conforme au dessin de masque.

Pour obtenir un « lift off » propre il est parfois nécessaire, après quelques minutes de bain d’acétone, d’effectuer un traitement ultrason dans l’acétone des échantillons. Ceci afin de décrocher la totalité de la résine, du substrat. Lorsque les propriétés d’adhésion du métal sur le substrat ne permettent pas d’utiliser des ultrasons, il est possible d’utiliser un jet d’acétone, éventuellement à l’aide d’une seringue, ceci afin de décrocher les morceaux de résine et de métaux résiduels. Un rinçage méticuleux à l’acétone et à l’isopropanol est toutefois nécessaire pour éviter tout nouveau dépôt de particules métalliques en suspension sur le substrat.

A.1.5 Les dépôts de diélectriques

Une fois nos pistes métalliques définies sur le substrat, il peut être nécessaire de déposer une couche de diélectrique sur ces dernières pour les isoler électriquement et chimiquement des canaux microfluidiques.

Pour les dépôts de diélectrique, nous utilisons une machine de PECVD Unaxis D200. Néanmoins, les dépôts de diélectrique par PECVD comportent souvent des nanopores susceptibles de nuire à l’étanchéité des couches protectrices. Pour illustrer les problèmes liés à ces nanopores nous avons placé une goutte d’un mélange permettant de graver le chrome (Chrome Etch, BASF) sur un dépôt de SiO_2 de 900 nm déposé sur une couche de chrome. Le résultat est présenté sur la figure A.4 :

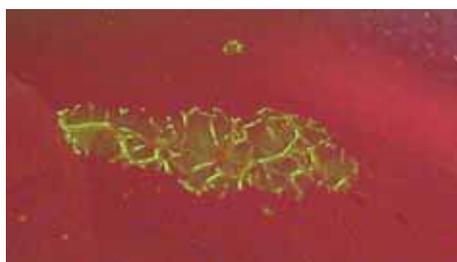


Figure A.4 : Effet produit par une goutte de « Chrome Etch » sur une couche de chrome recouverte de 900 nm de SiO_2 . Nous pouvons observer le décollement de la couche de chrome sous l’oxyde.

Pour cette raison, nous avons développé une méthode de dépôt de diélectriques multicouches qui permet d’obtenir des dépôts d’oxyde étanche. Le même essai de gravure au « Chrome etch » que précédemment a été effectué sur ce type de diélectrique (Figure A.5).



Figure A.5 : Effet produit par une goutte de « Chrome Etch » sur une couche de chrome recouverte d'une alternance de couche de SiO₂ et de Si₃N₄ de 50 nm formant une épaisseur finale de 900 nm. Dans ce cas La couche de chrome protégée par l'oxyde reste intacte.

A.1.6 Gravures et protection des contacts électriques

Une fois le dépôt de diélectrique terminé, il est nécessaire de dégager des emplacements pour effectuer les contacts électriques. A cette fin il faut graver la couche de diélectrique. La méthode la plus courante consiste à effectuer une photolithographie permettant de protéger par une couche de résine tout le dispositif à l'exception des pads de contact. Il est ensuite possible d'effectuer une gravure de l'oxyde par voie humide (solution de HF ou de BHF) ou par voie sèche (RIE : « Reactive Ion Etching »). Les zones d'oxyde protégées par la résine ne seront pas gravées lors de cette étape. Une fois les pads de contact dégagés de leur couche d'oxyde, l'échantillon est plongé dans un bain d'acétone afin de retirer toute trace de résine.

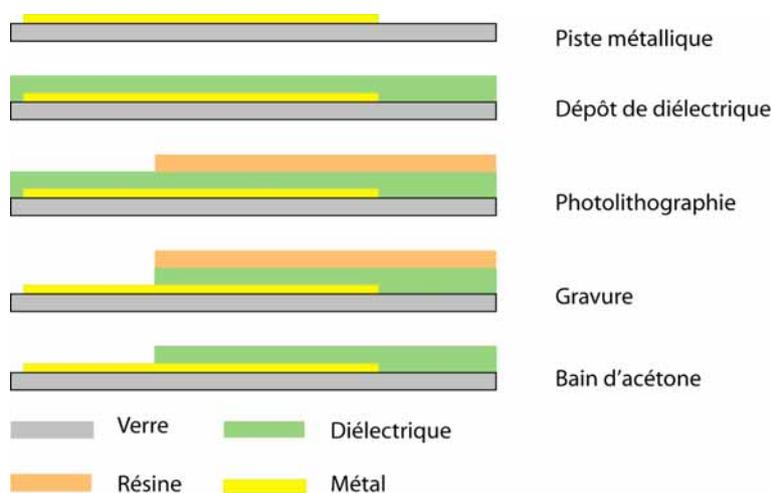


Figure A.6 : Procédure technologique pour la gravure d'oxyde des pad de contact électrique.

La procédure décrite dans la figure A.6 nécessite une photolithographie supplémentaire et une étape de gravure. Pour simplifier cette procédure technologique il est possible de protéger les pads de connections en déposant un cache sur ces derniers, lors de l'étape de dépôt d'oxyde. Cette procédure est décrite dans la figure A.7 ci-dessous :

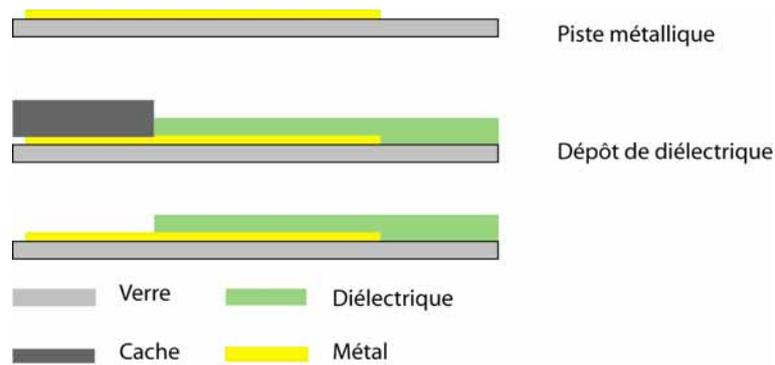


Figure A.7 : Procédure technologique utilisant une protection des pads de contact électrique pendant le dépôt d'oxyde.

Quel que soit la procédure utilisée, il est indispensable de graver les 5nm de couche d'accroche en chrome présente sur les pads de contact. En effet, le chrome s'oxyde presque instantanément, produisant une couche isolante électriquement, ne permettant pas d'effectuer des contacts électriques de qualité lors de la soudure. Une fois les pads de contact dégagés de leurs oxydes protecteurs, il faut plonger l'échantillon dans une solution de chrome Etch pendant 30 secondes. Les parties en chrome protégées par l'oxyde ne seront pas affectées par cette étape. Après rinçage, nous obtenons des pads de contact présentant une surface en platine permettant d'effectuer les soudures.

La couche de platine déposée contient des défauts susceptibles de permettre au chrome etch d'attaquer la couche d'accroche du platine sur le substrat en verre. Pour éviter un décollement des pads de contact, nous avons utilisé du titane et non du chrome comme couche d'accroche entre le substrat en verre et la couche de platine.

A.1.7 Le collage plasma

Il est conseillé d'effectuer le collage des parties fluidiques sur le substrat contenant les électrodes, avant d'effectuer les soudures car l'étape de soudure est source éventuelle de pollution.

Nous utilisons un générateur de plasma Harrick (Figure A.8) pour effectuer le collage entre le bloc de PDMS contenant les canaux microfluidique, et le substrat en verre. Pour ce faire, nous plaçons le substrat en verre et le bloc de PDMS dans l'enceinte de la chambre à plasma. Nous actionnons la pompe à vide du plasma pour faire chuter la pression de la chambre à 500 mT et nous actionnons le générateur HF qui permet de créer le plasma dans la chambre. Après 30 secondes de traitement plasma, le générateur HF est stoppé et la chambre est remise à pression ambiante. Cette étape plasma crée des liaisons O-H très réactives à la surface du verre et du PDMS. Lors de la mise en contact du bloc de PDMS et de la lamelle de verre, les liaisons O-H se recombinent et collent de manière covalente les deux parties.



Figure A.8 : Photo du plasma cleaner Harrick

Le plasma est effectué à partir de l'air ambiant, il est important de correctement contrôler la pression de la chambre et la puissance du générateur RF pour obtenir le plasma adéquat. Idéalement, le plasma doit avoir une couleur violette. Une luminescence blanche du plasma indique une pression de gaz trop importante, dans la chambre.

A.1.8 Les connectiques électriques

Une fois le dispositif en verre/PDMS assemblé, il est possible d'effectuer les connections électriques. A cette fin, nous utilisons une colle conductrice époxy pour souder notre dispositif et les câbles électriques.

A.1.9 Les connectiques fluidiques

Les connectiques fluidiques entre le dispositif en PDMS et la tuyauterie extérieure sont relativement aisées car l'élasticité du PDMS permet d'obtenir des connections étanches. Avant de coller le dispositif en PDMS sur la lamelle de verre, nous perçons à l'aide d'une aiguille à bout plat, les entrées/sorties du dispositif. Une fois le dispositif terminé il suffit d'insérer dans ces trous d'aiguille des petits tubes métalliques d'un diamètre légèrement supérieur à la taille du trou. L'élasticité du PDMS permet de réaliser facilement cette opération. Les petits tubes métalliques sont eux même insérés dans des tubes plastique Tygon reliés au système fluidique extérieur (pousse seringue ou source de pression) .

A.1.10 Tableau récapitulatif des procédures technologiques

La figure A.9 récapitule tous les paramètres utiles pour effectuer les photolithographies que nous avons utilisées le plus couramment lors de la fabrication des moules et l'intégration des électrodes dans nos dispositifs.

SUR MA750 (UV4)						
RESINE	SU8 - 2100		SU8 - 2050		SPR 20	AZ 5214
SUBSTRAT	WAFER SILICIUM					LAMMELLE DE VERRE
MASQUE	PLASTIQUE + PLAQUE DE VERRE APPLIQUEE DESSUS POUR FAIRE MASSE					VERRE
PROCESS						
TOURNETTE	60s à 500 tr/min et 60s à 1800 tr/min	60s à 500 tr/min et 60s à 2000 tr/min	60s à 3000 tr/min	60s à 2000 tr/min	60s à 1500tr/min + accélération de 2000	30s à 1000 tr/min avec Primer puis Prog2 avec résine (4000 tr/min)
RECUIT	5min à 65°C et 35min à 95°C		5min à 65°C et 15min à 95°C		3min à 115°C	1min 30s à 125°C
INSOLATION	1min 40s		55s	1min 30s	1min 40s	6s
RECUIT	1min à 65°C et 15 min à 95°C		1min à 65°C et 4 min à 95°C			1min 15s à 125°C
FLOOD						20s
DEVELOPPEMENT	env 10min		env 5min	env 30min	à l'œil	avec AZ 726 MIF 30s
RESULTAT	hauteur de résine de 150 μm	hauteur de résine de 125 μm	hauteur de résine de 40 μm	hauteur de résine de 60 μm	Penser à un recuit de fluage de 15min à 165°C	hauteur de résine de 1,4 μm

Figure A.9 : Tableau récapitulatif des paramètres de photolithographie utilisés couramment dans cette thèse. Ces paramètres ne sont valides que pour des photolithographies effectuées sur les équipements du LPN mais donnent un ordre de grandeur des temps et des températures requis pour réaliser les étapes de photolithographie.

A.2 Procédure technologique pour la fabrication d'un moule de microcanaux

La fabrication d'un moule microfluidique simple ne nécessite qu'une étape de photolithographie suivie d'un traitement antiadhésif. Une procédure classique destinée à fabriquer un moule de 100 μm de hauteur en résine SU8 sur une galette de silicium est décrite sur la figure A.10.

Les résines SU8 fabriquées par Microchem ont l'avantage d'être résistantes aux agressions physiques et chimiques. De plus, il existe plusieurs variantes de ce type de résine qui permettent de réaliser des moules avec des hauteurs de canaux allant de 500 nm à 500 μm .

Après l'étape de photolithographie il est nécessaire, d'effectuer un traitement antiadhésif sur le moule pour éviter que lors du démoulage, le PDMS n'arrache les motifs en résine. Au sein de notre laboratoire, nous effectuons ce traitement par évaporation de TMCS (Tri Methyl Chloro Silane) sur le moule. Pour cela nous enfermions dans une boîte étanche le moule accompagné d'une goutte de TMCS déposée dans un becher. L'évaporation de cette dernière dépose une monocouche de TMCS sur toute la surface du moule et lui confère ainsi ses propriétés antiadhésives.

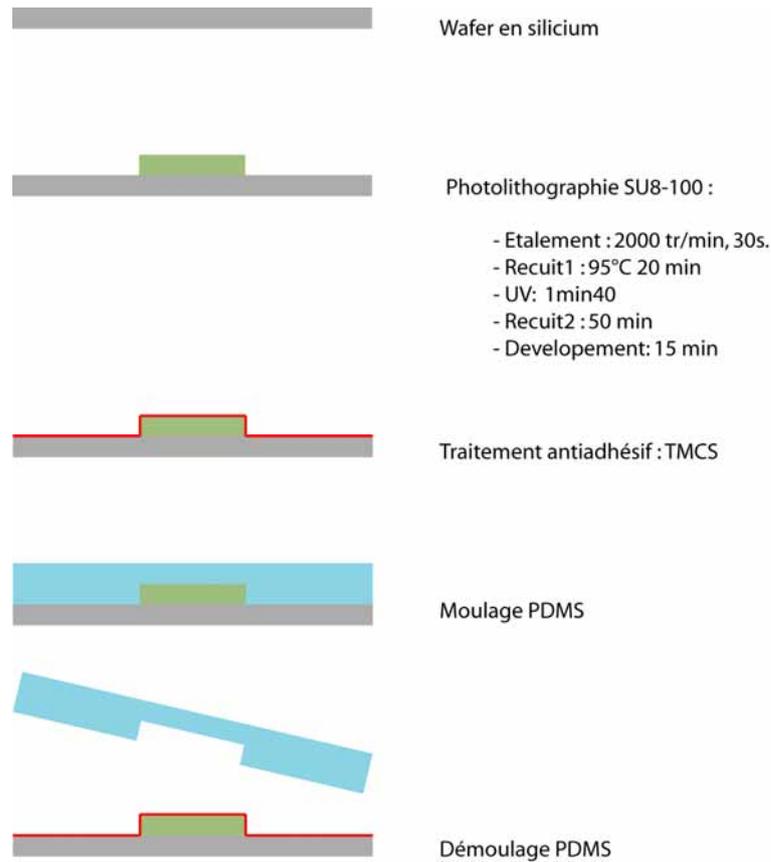


Figure A.10 : Procédure technologique pour la fabrication d'un moule en SU-8 suivi du moulage d'une réplique en PDMS de ce dernier.

A.3 Moulage, couche mince, nano structures et traitement de surface : un mariage réussi.

Il est également possible de profiter des technologies de nanoinprint pour nano structurer le substrat en verre. Le nanoinprint consiste à mouler à l'aide d'une presse un réseau de nano structures dans une résine déposée sur le substrat, et éventuellement à transférer ce motif sur le ce dernier par gravure ou « lift off » (Figure A.11). La présence de nano structures permet de modifier les propriétés physiques de la surface des matériaux. Il est par exemple possible de créer des surfaces super hydrophobes, simplement en nano structurant un matériau. [Guo 2007]

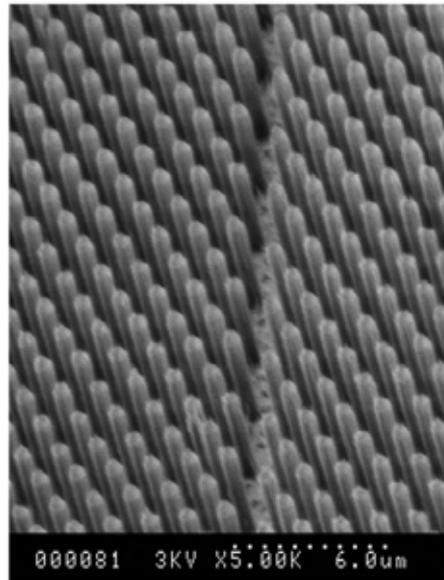


Figure A.11 : Nano structures fabriquées par nanoinprint et transférées par gravure dans le PMMA.
[Shi 2007]

De nombreux traitements de surface ont également été développés pour modifier les propriétés du verre et du PDMS. Il est ainsi possible de rendre l'intérieur du canal microfluidique hydrophile, hydrophobe ou réactif à une molécule donnée. Ceci permet par exemple d'éviter ou de favoriser l'absorption d'une molécule d'intérêt sur la surface du canal microfluidique (Figure A.12).

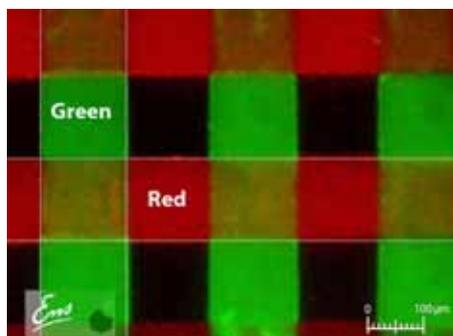


Figure A.12 : Double fonctionnalisation de surface par absorption de protéine sur un substrat en verre.
[Le Berre 2006]

La compatibilité de toutes ces technologies entre elles permet de réaliser des dispositifs microfluidiques complexes susceptible de répondre aux exigences de questions scientifiques très spécifiques dans d'autres domaines scientifiques.

Annexe B :

Technologie de fabrication de dispositifs polyéthylène/PDMS

Les recherches couplant la microfluidique et la thermique utilisent la plupart du temps des substrats en verre ou en silicium. Pour certaines applications spécifiques, les déperditions énergétiques vers le milieu extérieur doivent être limitées. Dans ce cas l'utilisation d'un substrat de faible conductivité thermique est souhaitable. Dans ce but nous avons mis au point une nouvelle technologie permettant de fabriquer des dispositifs microfluidiques sur un substrat en polymère : le LDPE (Low Density Poly Ethylene : Poly Ethylène Basse Densité). Notre étude montre que le LDPE est compatible avec toutes les technologies de microfabrication nécessaires pour intégrer des résistances dans un dispositif microfluidique. La faible conductivité thermique du LDPE permet de diminuer les pertes thermiques dans le substrat. Cela nous permettrait dans le cadre du micro conductimètre thermique de mesurer les paramètres thermiques de fluides ayant une conductivité et une diffusivité thermique plus faibles. Dans le cadre du microcalorimètre, l'utilisation de substrats polymère permet d'obtenir des élévations de température plus importantes et donc d'atteindre des limites de détection plus faibles. L'utilisation de ce nouveau substrat pourrait être étendue à d'autres applications, couplant la microfluidique et la thermique.

Dans ce chapitre, nous présenterons tout d'abord les caractéristiques physico-chimiques requises qui nous ont menées à sélectionner le LDPE comme substrat. Nous présenterons par la suite la technologie que nous avons développée et nous discuterons les résultats obtenus.

B.1 Choix du polymère

Le choix du polymère a été effectué en prenant en compte deux paramètres principaux :

- Les qualités thermiques du polymère afin de limiter les pertes énergétiques dans le substrat.
- Sa compatibilité potentielle avec les étapes de microfabrication nécessaires à la fabrication de dispositif microfluidique.

Le polymère doit ainsi être un bon isolant thermique et avoir des qualités physico-chimiques compatibles avec les technologies utilisées. Ce polymère doit présenter plusieurs caractéristiques :

- Pouvoir être moulé sous forme de plaque.
- Une bonne tenue en température pour les étapes de recuit de photolithographie.
- Une bonne tenue chimique à l'acétone pour l'étape de « lift off ».
- Une bonne accroche des métaux
- Une bonne accroche des diélectriques
- La possibilité de coller du PDMS sur le polymère à l'aide d'un traitement plasma

B.2 Description de la technologie

Nous avons utilisé le LDPE comme substrat pour fabriquer un microconductimètre thermique. La procédure technologique utilisée est décrite sur la figure B.1.

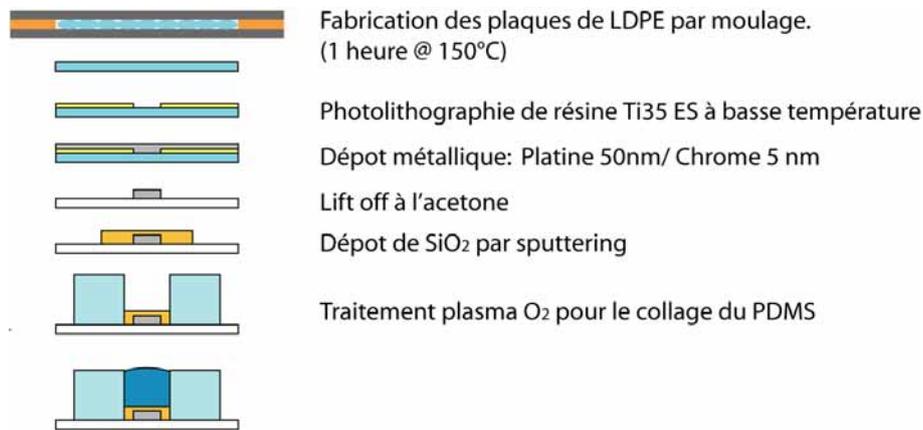


Figure B.1 : Procédure technologique de fabrication d'un microconductimètre thermique en LDPE

En raison de sa température de fusion, le LDPE ne tolère aucune étape technologique à plus de 90°C. Ainsi ce matériau ne permet que les dépôts de diélectrique par sputtering et exclut l'utilisation de la méthode de photolithographie classique. Cette limitation sur la température d'utilisation a conduit à la mise au point d'une nouvelle procédure de photolithographie basse température.

La première étape consiste à thermo mouler (1heure à 150°C) à l'aide d'une presse, des grains de LDPE, pour former une plaque homogène. Après le moulage de la plaque de LDPE il est nécessaire d'effectuer une photolithographie de la résistance sur le substrat LDPE. La température de fusion du LDPE ne permet pas d'utiliser des procédures de photolithographie classiques. Pour cette raison nous avons utilisé une résine photosensible Ti35 ES. Cette résine autorise des recuits à des températures plus faibles que l'AZ5214. En abaissant la température et en augmentant la température de recuit recommandé de la Ti35E nous avons pu effectuer des photolithographies de cette résine sur un substrat LDPE. La procédure utilisée est décrite ci-dessous :

Procédure de photolithographie à base de Ti35 ES sur MJB3

- Induction a 3000tr/min pendant 30 secondes.
- Recuit @95°C 3 min
- UV MJB3 2min30
- Recuit @95°C 3 min
- UV MJB3 flood pleine plaque 10 minutes
- DVP AZ400K 1:8 pendant 3 minute

Après un dépôt de platine, un « lift off », un dépôt de diélectrique par sputtering et un collage plasma du bloc de PDMS destiné a recevoir la goutte de liquide, nous avons obtenu le dispositif représenté sur la figure B.2:

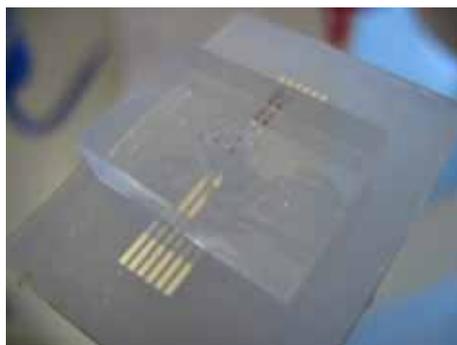


Figure B.2 : Photographie d'un microconductimètre thermique en LDPE

B.3 Discussion

L'opacité du LDPE dans le visible ne destine pas ce substrat à des applications nécessitant la visualisation du contenu des canaux, à travers le substrat. Nos essais ont montré que les dépôts de platine sur LDPE ne nécessitent pas de couche d'accroche (Généralement du Chrome ou du Titane) contrairement au verre et au silicium. Ceci rend possible la fabrication d'électrodes en platine pur. Des tests de résolution limite de nos pistes métalliques ont montré certaines limitations pour la fabrication de piste métallique inférieures à 10 micromètres (Figure B.3). Cette limite est due à la forte rugosité du substrat en LDPE après l'étape de moulage de la plaque. Cette étape technologique nécessiterait une optimisation des conditions de moulage pour permettre de tirer pleinement parti des potentialités du LPDE.



Figure B.3 : Piste de platine de 10µm de large, obtenue par photolithographie à basse température sur LDPE. Nous pouvons observer le manque d'homogénéité de la largeur des pistes

B.4 Conclusion

La nouvelle technologie que nous avons développée permet d'effectuer toutes les étapes nécessaires à la fabrication d'un dispositif microfluidique intégrant des résistances sur un substrat en LDPE :

- La photolithographie
- Les dépôts métalliques
- Le « Lift off »

- Les dépôts de diélectriques
- Le collage plasma du PDMS

La mise au point d'une méthode originale de photolithographie à basse température a permis pour la première fois, de fabriquer un dispositif microfluidique avec des résistances intégrées sur un substrat en LDPE. La faible conductivité thermique du LDPE permettrait de fabriquer des dispositifs microfluidiques mieux adaptés aux applications nécessitant de faibles pertes par conduction thermique. Néanmoins, des améliorations sur le moulage des substrats seront nécessaires pour permettre de diminuer la rugosité de ce dernier et autoriser ainsi l'intégration de pistes métalliques d'une taille inférieure à 10 μ m.

Annexe C :

S.pombe : sa vie, son histoire et son cytosquelette

Ce chapitre pose les bases permettant de comprendre le fonctionnement de *S.pombe* et de son cytosquelette en particulier. Il s'achève par une brève description des moyens de microscopie que nous utilisons pour visualiser le cytosquelette de *S.pombe*, lors de nos expériences.

C.1 Introduction

La cellule est l'unité de base d'un organisme vivant. Elle forme un système complexe dont l'étude a donné naissance à une discipline scientifique propre : la biologie cellulaire. La biologie cellulaire est un important sujet de recherche actuel. La connaissance du fonctionnement intime des mécanismes cellulaires permettra à terme, de mieux cibler les efforts de recherches pour de nouveaux traitements dans le domaine médical. Afin de maintenir en vie les colonies de cellules, il est nécessaire de contrôler une multitude de paramètres comme : la quantité d'oxygène, le renouvellement des nutriments ou la température du milieu. La température est un paramètre important et de nombreuses méthodes ont été mises au point pour maintenir les échantillons biologiques à la température voulue. En revanche, aucune solution pratique n'existe pour l'instant permettant des changements de températures rapides lors d'une expérience de biologie cellulaire. La possibilité d'effectuer des changements de température de plusieurs degrés en quelques secondes, permettra d'ouvrir de nouveaux champs de recherches à des échelles de temps beaucoup plus courtes. Ce type de contrôle de température pourra trouver entre autre des applications en biologie cellulaire dans le cadre :

- de l'étude du cytosquelette.
- de la dynamique physico-chimique de la cellule.
- de recherches sur le rôle de protéines thermosensibles.

La microfluidique apporte déjà des avantages considérables à la biologie cellulaire, en permettant de déformer, [Terenna 2008] de trier, d'étudier des cellules uniques [Aaron 2003] et de changer la composition du milieu en quelques secondes. L'utilisation de dispositif en PDMS autorise de surcroît le passage à travers le PDMS des gaz, comme l'oxygène ou le dioxyde de carbone, nécessaires au bon fonctionnement de la biochimie cellulaire. Associer les possibilités d'expérimentation en biologie cellulaire apportées par la microfluidique et les constantes de temps de changement de température de la micro thermique, permettra de créer des outils très puissants dans le domaine de la biologie cellulaire. Dans le cadre de nos recherches, nous nous intéresserons plus particulièrement à une levure modèle appelée *S.pombe*. Toutes les expériences de contrôle de température pour la biologie cellulaire présentées dans cette thèse ont eu pour objet l'étude de cette levure.

C.2 *S.pombe*, une levure modèle

Schizosaccharomyces Pombe (*S.pombe*) est une levure à fission utilisée comme organisme modèle en biologie cellulaire et moléculaire. « Pombe », qui veut dire bière en swahili, a été isolée en 1890 à partir d'un échantillon de bière de millet provenant de Zanzibar (Figure C.1-2). [Lindner 1893]

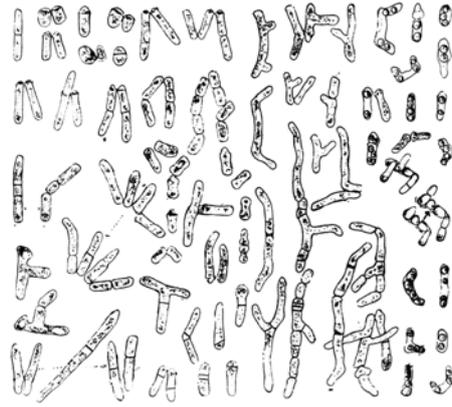


Figure C.1 : Dessin original de la première description de *S.pombe* [Lindner 1893]

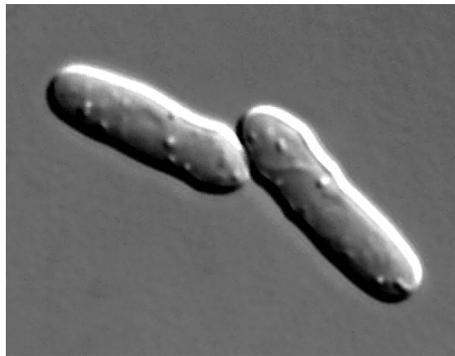


Figure C.2 : Photographie de *S.pombe* [Tran 2006]

Elle se présente sous la forme d'un organisme eucaryote unicellulaire, cylindrique, de 3 à 4 μm de longueur. *S.pombe* est sans danger et peut être cultivée facilement. Les cellules grandissent par leurs extrémités et se divisent par fission médiane, produisant ainsi deux cellules filles cylindriques, de tailles égales. *S.pombe* est devenue avec le temps un organisme modèle pour l'étude des mécanismes de contrôle de cycle cellulaire. Elle a donné lieu à des découvertes essentielles dans la caractérisation et la mise en évidence du caractère universel de molécules contrôlant le cycle cellulaire. Ces recherches ont d'ailleurs été récompensées par un prix Nobel de médecine et de physiologie en 2001.

Le génome de *S.pombe* a été séquencé et publié en 2002 [Wood 2002] ce qui en fait ainsi le sixième organisme eucaryote à avoir été séquencé. Ce séquençage a révélé qu'un quart des gènes de *S.pombe* était déjà présents dans le génome d'autres espèces et que 50 gènes identifiés chez *S.pombe* sont impliqués dans des maladies humaines dont la moitié sont des cancers.

C.3 Le cytosquelette de *S.pombe*

Le cytosquelette de *S.pombe* a de multiples fonctions : il joue un rôle important dans la forme de la cellule pendant l'interphase et dans la ségrégation du matériel génétique pendant la mitose. Dans le cas des levures *S.pombe*, pendant l'interphase, le cytosquelette est constitué de 3 ou 4 fuseaux de microtubules repartis autour du grand axe de la cellule (Figure C.3).

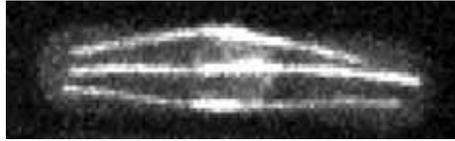


Figure C.3 : Cytosquelette de *S.pombe* [Tran 2006] Image reconstituée prise au microscope confocal d'un *Pombe* mutant exprimant de la GFP_tubuline (en blanc).

Les microtubules sont constitués d'un assemblage ordonné de molécules de α -tubuline et de molécules β -tubuline (Figure C.4). Les molécules de tubulines s'ajoutent et se détachent constamment à l'extrémité libre du filament de tubuline (extrémité +). Cet équilibre dynamique provoque, en fonction des conditions, la croissance ou la dépolymérisation des microtubules.

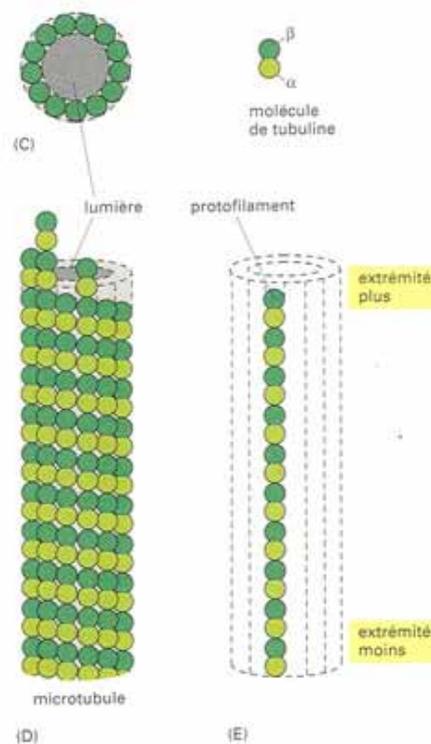


Figure C.4 : Schéma représentant un microtubule. Les microtubules sont constitués de molécules de tubuline assemblées sous forme de tubes. [Alberts 2005]

Lors de l'addition d'une nouvelle molécule de tubuline à l'extrémité + d'un microtubule, ce dernier est lié à une molécule de GTP. Au bout d'un certain laps de temps la molécule de GTP perd un phosphate et se transforme en GDP. Un microtubule en phase de croissance est ainsi constitué d'un assemblage de GDP-tubuline sur toute sa longueur avec une épaisseur de GTP-tubuline à son extrémité +. Les molécules de GTP-tubuline sont associées de manière plus stable aux microtubules que les molécules de GDP-tubuline. Si les molécules de tubuline s'ajoutent suffisamment rapidement, le microtubule grandit et une capsule de GTP-tubuline se forme à l'extrémité + du microtubule le protégeant ainsi de la dépolymérisation. En revanche, si ce processus de polymérisation ralentit, la protection de GTP-tubuline disparaît et provoque généralement une dépolymérisation soudaine et très rapide du microtubule (Figure C.5).

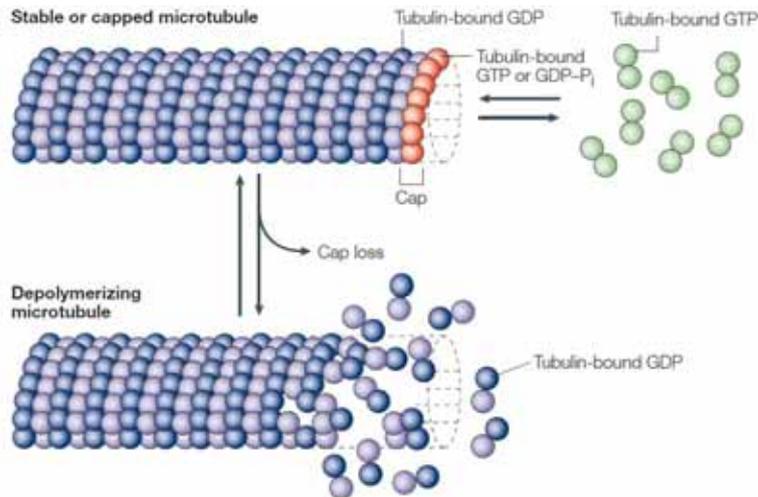


Figure 4 | Polymerization dynamics and the GTP cap. Tubulin-bound GTP is hydrolysed to

Figure C.5 : Illustration de la création de la capsule de GTP par polymérisation de nouvelles molécules de tubulines. Lorsque la vitesse de polymérisation de la tubuline est trop faible, la protection de GTP disparaît et le microtubule se dépolymérise. [Jordan, 2004]

La température influe de manière importante sur la vitesse de polymérisation de la tubuline à l'extrémité + des microtubules (Figure C.6).

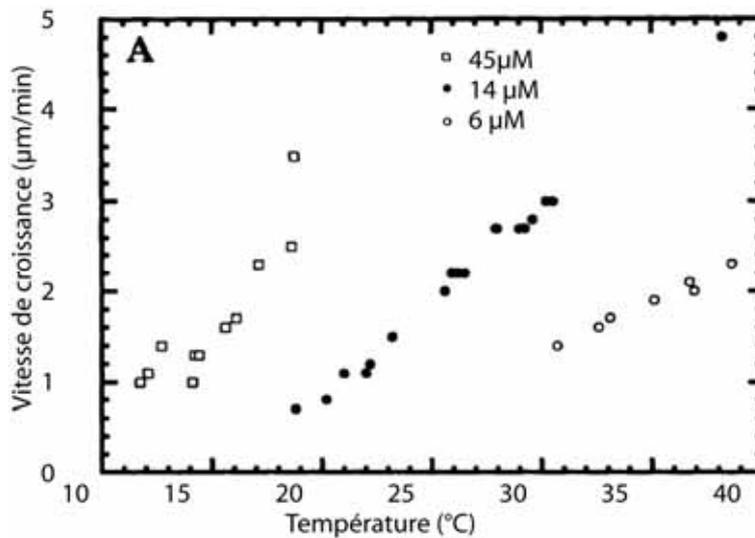


Figure C.6 : Expérience « in vitro » montrant la dépendance de la vitesse de croissance des microtubules avec la température et la concentration de tubuline. L'expérience, menée pour 3 concentrations de tubuline différentes, montre également que la vitesse de polymérisation augmente avec la concentration de tubuline du milieu. [modifié Fyngenson 1994]

A faible température, l'ajout de nouvelles molécules de tubuline sur le microtubule ralentit, la capsule de GTP disparaît et les microtubules dépolymérisent. Ainsi, pour des températures inférieures à 10°C, la plupart des microtubules de *S.pombe* disparaissent en quelques minutes. [Fyngenson 1994] A température ambiante, la vitesse de polymérisation des microtubules augmente, la capsule de GTP se reforme et les microtubules retrouvent leur

taille normale. Les processus de polymérisation et de dépolymérisation des microtubules ont lieu sur des échelles de temps de quelques minutes. Lorsque les microtubules dépolymérisent à basse température, toutes les molécules de tubuline sont libérées dans le cytoplasme. Cette forte concentration de tubuline dans le cytoplasme permet une re-polymérisation rapide des microtubules lors du retour à la température ambiante. Il est ainsi possible de contrôler l'état du cytosquelette de la cellule en contrôlant la température.

La vitesse de croissance des microtubules peut être modélisée comme le produit entre le rythme R auxquels les dimères de tubuline rencontre l'extrémité du microtubule et la probabilité de collage de ces derniers. Le rythme des rencontres peut être calculé à l'aide des équation de transport diffusif. Ce calcul consiste à intégrer le nombre de dimères situés à une distance r du microtubule divisé par le temps nécessaire au dimère pour diffuser sur cette distance $t(r)$ multiplié par la probabilité du dimère de diffuser dans la direction du microtubule $p(r)$. L'équation (C.1) exprime le rythme de rencontre entre le microtubule et les dimères de tubuline [Fygenon 1994] :

$$R = \int_a^\infty \frac{n(r)}{t(r)} p(r) dr = \int_a^\infty \frac{4\pi r^2 C}{r^2} \frac{\pi b^2}{4\pi r^2} dr = \frac{\pi b^2 DC}{a} \quad (C.1)$$

Avec,

- a : Taille d'un dimère de tubuline (m)
- b : Diamètre effectif d'une extrémité de microtubule (m)
- D : Coefficient de diffusion (m²/s)
- C : Concentration des dimères (dimère/m³)

Le coefficient de diffusion D est décrit par l'équation (C.2),

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta a} \quad (C.2)$$

Le Rythme de rencontre entre les dimères de tubuline et les microtubules est donc proportionnel à la température et à la concentration des dimères. La probabilité de collage entre ces derniers, qui n'est pas décrite ici, varie également avec la température. La vitesse de collage étant limitée par le rythme des rencontres entre le dimère et le microtubule, la vitesse de polymérisation augmente presque linéairement avec la température (Figure C.6).

Le cytosquelette joue un rôle important dans la croissance de *S.pombe*. Pendant l'interphase, les microtubules déposent sur la membrane cellulaire les molécules nécessaires à la formation d'un complexe protéinique permettant la croissance de la membrane cellulaire (Figure C.7).

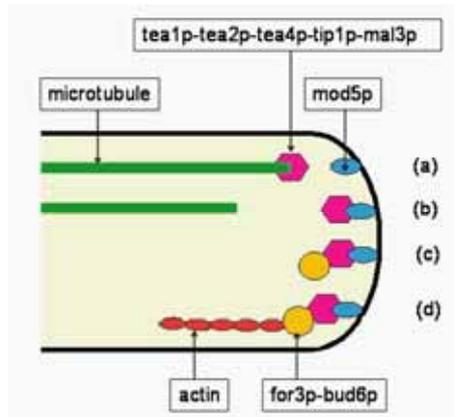


Figure C.7 : Les microtubules participent à la déposition d'un complexe protéinique nécessaire pour la fixation future d'actine et la croissance membranaire. [Tran 2006]

Un défaut dans l'organisation de la structure des microtubules provoque généralement une modification de la forme de la cellule. Une mutation du gène *mto2* de *S.pombe* a la particularité de produire des levures courbées. Cette forme anormale provient d'un défaut d'organisation des microtubules. La structure en microtubule de ce mutant n'est pas symétrique et la majorité des microtubules se situent du même côté de la cellule. La répartition des microtubules de ce mutant provoque une accumulation du complexe protéinique nécessaire à la croissance cellulaire sur un côté donné de la levure. La levure grandit donc plus vite d'un côté que de l'autre ce qui provoque une courbure de la cellule (Figure C.8).

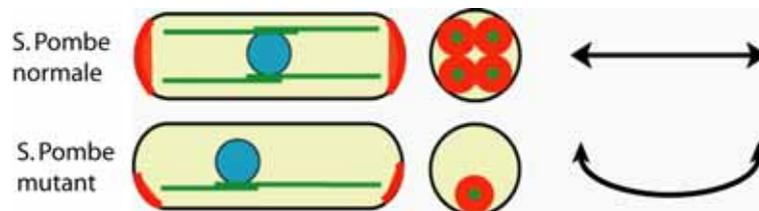


Figure C.8 : L'organisation asymétrique des microtubules (en vert) chez le mutant *mto2Δ* génère un dépôt d'actine (en rouge) asymétrique et provoque une croissance cellulaire qui mène à une cellule courbée. [Tran 2006 modifié]

C.4 Outil biologique et microscopie

Pour visualiser le cytosquelette de *S.pombe*, nous utilisons des mutants génétiquement modifiés exprimant de la tubuline fluorescente. Dans le cas le plus simple, le code génétique de ces levures mutantes est modifié de manière à obliger la cellule à fabriquer une molécule de tubuline liée à une molécule fluorescente de GFP. Pour cela le code génétique permettant de synthétiser une molécule de tubuline succède à celui permettant de fabriquer une molécule de GFP. La GFP est une molécule fluorescente verte existant dans la nature depuis 160 millions d'années et isolée de la méduse *Aequorea Victoria* en 1962 (Figure C.9). [Shimomura 1962].



Figure C.9 : *Aequorea victoria*, mère de la GFP. [wikipedia]

En 1992 la séquence d'ADN permettant à *Aequorea victoria* de produire la GFP a été séquencée. [Prasher 1992] Si un organisme vivant peut produire une protéine fluorescente, un autre organisme vivant sera susceptible de faire de même après incorporation du code génétique correspondant à la fabrication de cette protéine. La GFP est ainsi devenue un outil permettant à des organismes génétiquement modifiés de produire des molécules fluorescentes. La molécule de GFP la plus utilisée a un pic d'excitation à 488nm et un pic d'émission à 509 nm. Ainsi en éclairant l'échantillon à l'aide d'une source lumineuse à 488nm et en observant la lumière émise filtrée à 509nm, nous obtenons une cartographie de la présence de GFP dans l'échantillon. Dans le cas où des molécules de GFP sont liées aux molécules de tubulines, il est possible d'obtenir une cartographie des molécules de tubulines dans l'échantillon. Par la suite, d'autres fluorophores ont été mis au point, permettant de couvrir tout le spectre visible. Dans le cadre de nos expériences nous avons utilisé une deuxième protéine, appelée « mCherry », fluorescente à une autre longueur d'onde. Nous avons utilisé ces marqueurs pour rendre fluorescentes différentes protéines liées au cytosquelette, à la membrane nucléaire ou encore à la membrane cellulaire.

Toutes nos acquisitions d'images ont été effectuées à l'aide d'un microscope confocal à « disque rotatif ». En microscopie classique pour obtenir une image nette, l'objet doit se situer dans le plan focal du système optique. En microscopie haute résolution, une partie de l'objet sera floue si ce dernier est trop épais. Le microscope confocal est un microscope optique qui permet de réaliser des images haute résolution avec une très faible profondeur de champ (400nm). En prenant une succession de photos à différentes profondeurs dans l'échantillon, il est possible de reconstituer une image en 3D de l'objet observé. Dans un microscope confocal, les prises de vues sont généralement effectuées à l'aide d'un laser focalisé qui balaye la surface de l'échantillon en positionnant un sténopé devant le détecteur, dans un plan focal conjugué au plan focal de l'objectif. L'image ainsi obtenue ne prend en compte que la lumière issue du plan focal, car les photons issus des autres plans focaux ne passent pas le sténopé. Cette méthode permet d'obtenir une coupe optique nette du plan focal, car la lumière provenant des plans adjacents est stoppée par le sténopé. En effectuant une série de photos sur différents plans focaux, il est donc possible de reconstituer une image 3D nette d'un objet épais. Dans notre cas, l'utilisation d'un disque rotatif, dit disque de Nipkov, situé devant la source laser, permet de limiter le bleaching des fluorophores et d'effectuer des acquisitions en temps réel.

Contrôle de température et étude des transferts thermiques dans des dispositifs microfluidiques.

Soutenu par : Guilhem Velvé Casquillas

Directeurs de thèse : Pr. Yong Chen et Pr. Jean Jacques Greffet

Résumé :

Cette thèse a pour objet de coupler la microfluidique et la microthermique pour réaliser des dispositifs miniaturisés de mesure et de contrôle de température. Nous avons utilisé les faibles constantes de temps des échanges thermiques aux échelles micrométriques et la capacité d'intégration offerte par la microfluidique, pour développer de nouveaux outils afin d'explorer d'autres domaines scientifiques. Dans le domaine de la physique, nous avons fabriqué un micro-conductimètre thermique afin d'étudier certaines des propriétés thermiques des nanofluides. Dans le domaine de la thermochimie nous avons mis au point un microcalorimètre à flux continu intégrable dans un laboratoire sur puce. Les possibilités offertes par la rapidité des transferts thermiques aux échelles micrométriques nous ont permis de développer des dispositifs de contrôle de température appliqués à la biologie cellulaire. Ce type de dispositif permet de confiner une colonie de cellules et d'effectuer des changements de température du milieu, en quelques secondes. Nous avons ainsi la possibilité de contrôler l'activité de protéines thermosensibles et d'étudier certaines propriétés du cytosquelette de *S.Pombe*. Les caractéristiques de ce type de dispositif ouvrent la voie à de nouvelles recherches en biologie cellulaire, particulièrement sur le rôle de protéines d'intérêt thérapeutique rendues préalablement thermosensibles.

Abstract: Thermal transfer and temperature control in microfluidic device

The purpose of this work is to study microfluidic devices with integrated thermal elements for process temperature monitoring and controlling. The ability of multiple parameters controlling, the small time-constant of micro-scale heat transfer, and the possibility of large scale device integration allow us to propose new tools for other advanced research purposes. In physics, we fabricated micro-conductimeters as tool to study thermal conductivity of nanofluids. In chemistry, we developed a flow-in micro-calorimeter which is compatible to the common lab-on-chip technologies. The possibility given by the high speed of heat transfer in microfluidic device led to the development of new tools for cell biology. In particular, we have being able to confine a colony of yeast cell and change the working temperature in a few seconds. It allowed us to control thermo sensitive protein activity and studying cytoskeleton properties of *S.Pombe* yeast. The devices and methods we proposed are therefore pertinent, providing new tools for cell biology studies and allowing in particularly a better understanding of the role of thermo sensitive proteins.