



HAL
open science

Conception et analyse d'un microsysteme pour l'injection transdermique

Antonin Hoël

► **To cite this version:**

Antonin Hoël. Conception et analyse d'un microsysteme pour l'injection transdermique. Sciences de l'ingénieur [physics]. École normale supérieure de Cachan - ENS Cachan, 2007. Français. NNT : . tel-00463096

HAL Id: tel-00463096

<https://theses.hal.science/tel-00463096>

Submitted on 12 Mar 2010

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.



N° ENSC-2004/01

**THESE DE DOCTORAT
DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN**

Présentée par

Monsieur Antonin HOËL

pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'ECOLE NORMALE SUPERIEURE DE CACHAN

Domaine :

ELECTRONIQUE–ELECTROTECHNIQUE–AUTOMATIQUE et MICROSYSTEMES

Sujet de la thèse :

**Conception et analyse d'un microsysteme pour l'injection
transdermique.**

Thèse présentée et soutenue à Ker Lann le 16 octobre 2007 devant le jury composé de :

Lluis MIR	Directeur de recherche- IGR	Président
Isabelle DUFOUR	Chargée de Recherche HDR-Bordeaux	Rapporteur
Patrick TABELING	Directeur de Recherche MMN- Paris	Rapporteur
Christian BERGAUD	Chargé de Recherche-Toulouse	Examineur
Caroline JULLIEN	Chargée de Recherche-SATIE	Directrice de thèse
Damien GRENIER	Professeur-ENS Cachan	Directeur de thèse
Bruno LE PIOUFLE	Professeur-ENS Cachan	Invité

Laboratoire SATIE
(ENS CACHAN-Antenne de Bretagne/CNRS/UMR 8029)
61, avenue du Président Wilson, 94235 CACHAN CEDEX (France)
Campus de Ker Lann, 35170 Bruz (France)

Conception et analyse d'un microsysteme pour
l'injection transdermique

Antonin

30 octobre 2007

Introduction

Angioskin

De nos jours, l'augmentation de l'âge moyen et de l'exposition au soleil de la population européenne induit une augmentation significative des problèmes de peau. Or nombre de ces maladies (on pensera aux cancers, ou à des maladies bénignes telles que le psoriasis) peuvent être efficacement traitées par thérapies géniques. C'est en partant de cette constatation que le projet Angioskin a été initié.

Angioskin est le projet de recherche Européen numéro 512127. Il a pour titre 'DNA electrotransfer of plasmids coding for antiangiogenic factors as a proof of principle of non-viral gene therapy for the treatment of skin disease'. Ce projet a pour objectif de démontrer la possibilité d'amener des gènes thérapeutiques dans les cellules de la peau par injection au travers de microaiguilles et transfert électrique afin de traiter des maladies de peau, héréditaires ou non.

Le projet Angioskin se situe dans la continuité de deux autres projets européens : le projet CLINIPORATOR qui portait sur l'analyse des mécanismes du transfert d'ADN par électroporation et l'élaboration d'un générateur labellisé par la communauté européenne, et le projet ESOPE qui portait sur l'élaboration des procédures standard d'opération pour l'électrothérapie génique sur l'Homme. Ces projets ont montré l'efficacité de l'électrothérapie génique dans le traitement de tumeurs cancéreuses et ont aboutit à la conception d'un système d'électrodes et générateur complet pour effectuer ces traitements in vivo. Angioskin constitue une spécialisation de ces projets au traitement de la peau et une miniaturisation du système d'électrodes.

Ce projet implique de nombreux partenaires publics et industriels dont les tâches vont du développement du produit à transférer et du microsystème pour le faire, aux tests cliniques de ces derniers. La partie technologique du système est réalisée au sein de deux laboratoires essentiellement : FEMTO-ST pour les microaiguilles et électrodes, et SATIE/BIOMIS pour le système de distribution microfluidique. C'est sur cette dernière partie que s'appuie ce travail de thèse.

La micromécanique des fluides

Au sens strict, la microfluidique est un champ disciplinaire qui étudie les écoulements de liquides ou gaz dans des canaux de dimension sub-millimétrique, dont l'épaisseur peut en conséquence être dans certains cas de taille comparable aux objets qui y circulent (bulles, cellules, gouttes, polymères). Au sens large, il s'agit d'un domaine technologique multidisciplinaire qui intègre la mécanique des fluides, la chimie analytique, la chimie de surface, l'ingénierie moléculaire... De manière pratique, le terme microfluidique caractérise des outils technologiques utilisés dans les systèmes miniaturisés pour la maîtrise des écoulements et le contrôle des quantités transportées par les fluides.

Dans cet environnement les forces misent en jeu et les comportements des fluides sont différents de ceux observés à l'échelle macroscopique et qui constituent notre compréhension intuitive de la mécanique des fluides. Les méthodes pour manipuler ces fluides doivent donc être adaptées aux particularités de l'échelle micrométrique, tout en prenant en compte l'éventuelle circulation d'objets (molécules d'ADN, ou cellules par exemple) au sein des fluides.

Objectifs de la thèse

Ce travail de thèse, tout en étant cadré sur la réalisation concrète du système microfluidique du projet Angioskin, présente certains aspects de l'interaction entre les microsystèmes et des objets biologiques. En particulier, les paramètres intervenant dans l'injection d'une suspension d'ADN au travers d'une matrice de microaiguilles sont évalués. La connaissance de ces paramètres permet de situer les avantages et les défauts de ce procédé par comparaison avec les autres méthodes d'administration transdermique. D'une manière générale, ce travail vise à assurer que toutes les exigences des partenaires médicaux du projet Angioskin sont remplies.

Le premier chapitre présente le contexte technique et médical de l'administration transdermique afin de préciser les exigences du cahier des charges du projet Angioskin. Le second chapitre introduit des notions fondamentales de mécanique des fluides (résistance hydrodynamique, capillarité, rhéologie de fluides complexes...) nécessaires à la compréhension et la conception d'un système microfluidique. Dans cette partie, on s'intéresse notamment aux particularités des systèmes micrométriques et du transport de molécules d'ADN dans ces systèmes. Le système d'injection et sa conception sont ensuite présentés dans le troisième chapitre. Enfin, le dernier chapitre de cette thèse présente quelques particularités de la culture cellulaire dans les microsystèmes ainsi que ses enjeux au travers de deux petits projets menés parallèlement à Angioskin.

Remerciements

Je tiens à remercier Patrick Tabeling pour avoir accepté de juger mon travail de thèse ainsi que pour l'accueil qui m'a été fait dans son laboratoire lorsque j'ai eu besoin de leurs installations. Je remercie de même sincèrement Isabelle Dufour, Lluis Mir, Christian Bergaud et Bruno Le Pioufle pour avoir accepté de participer à mon jury de thèse.

Je remercie de même Sylvain Allano et Pascal Larzabal, directeurs successifs du laboratoire SATIE, pour m'avoir permis de réaliser ma thèse dans les meilleures conditions possibles, ainsi que Patrice Quiton, directeur de l'antenne de Bretagne de l'ENS Cachan pour m'avoir accueilli dans ses locaux.

J'ai eu durant ma thèse l'opportunité de travailler dans le cadre d'un projet de recherche ambitieux et stimulant. Je tiens à remercier spécialement Lluis Mir pour son travail de coordination sur le projet Angioskin ainsi que l'ensemble des participants au projet pour les nombreuses discussions très instructives que nous avons pu avoir. Je remercie en particulier Gonzalo Cabodevila et Nolwenn Baron pour leur précieux travail sur les microaiguilles, ainsi que l'étroite collaboration dans laquelle nous avons pu travailler.

J'ai eu aussi la chance d'avoir accès aux installations et au savoir faire du laboratoire du professeur Kitamori à l'université de Tokyo. Je le remercie sincèrement, ainsi que son équipe, pour leur accueil chaleureux et leurs enseignements.

Enfin, je remercie bien sur mes encadrants, Damien Grenier et Marie-Caroline Jullien, et avec eux toute l'équipe Biomis, pour l'aide, la confiance et l'autonomie qu'ils m'ont accordées dans la réalisation de ce travail de thèse.

Table des matières

1	Introduction à l'injection transdermique	10
1.1	Le projet Angioskin	10
1.1.1	Le psoriasis	10
1.1.2	Méthode de traitement	12
1.1.3	Conclusion	13
1.2	Administration transdermique	13
1.2.1	La peau	13
1.2.2	Diffusion	15
1.2.3	Procédés chimiques	16
1.2.4	Procédés électriques	18
1.2.5	Procédés mécaniques	20
1.3	Transfert d'ADN	24
1.3.1	La cellule	25
1.3.2	Structure de la membrane plasmique	26
1.3.3	Transfection chimique : les liposomes	27
1.3.4	Electroporation	27
1.3.5	Conclusion	29
1.4	Système d'injection	29
1.4.1	Fabrication des microaiguilles	29
1.4.2	Les microseringues	32
2	La mécanique des fluides en milieu confiné	36
2.1	Généralités	36
2.1.1	Rappels de mécanique des fluides	36
2.1.2	Le mouillage	38
2.1.3	Hydrodynamique à l'échelle micrométrique	40
2.1.4	Calcul analytique des paramètres d'un écoulement microfluidique	41
2.2	L'ADN en microfluidique	43
2.2.1	La molécule d'ADN	43
2.2.2	Rhéologie de l'ADN	46
2.2.3	Problèmes propres à l'ADN en microfluidique	48
2.3	Expérimentations	51
2.3.1	Agrégation des molécules d'ADN	51

2.3.2	PIV	52
2.3.3	Test de solidité de l'ADN	57
3	Conception et dimensionnement du système	66
3.1	Définition du système	66
3.1.1	Cahier des charges	66
3.1.2	Principe du système	68
3.1.3	Matériel et technologies	70
3.1.4	Choix de conception	71
3.2	Modélisation	73
3.2.1	Le modèle	74
3.2.2	Propriétés mécanique du PDMS	75
3.2.3	Apport du modèle	77
3.2.4	Validation	78
3.2.5	Conclusion	81
3.3	Conception et fabrication des différents éléments	82
3.3.1	La matrice de réservoirs	82
3.3.2	Le circuit de remplissage	84
3.3.3	La diode microfluidique	85
3.3.4	Le boîtier et l'assemblage	88
3.3.5	Conclusion	89
3.4	Détails du fonctionnement	89
3.4.1	Utilisation du système	89
3.4.2	Remplissage	90
3.4.3	Résultats d'injection	96
3.5	Conclusion	96
4	Cellules et microsystèmes	98
4.1	Le projet IFR	98
4.1.1	Contexte	98
4.1.2	Description du système	99
4.1.3	Fonctionnement	100
4.2	Projet IFR, étude préliminaire	103
4.2.1	Diffusion	103
4.2.2	Viabilité des cellules	106
4.2.3	Conclusion et perspectives	108
4.3	Culture de cellules dans un microcanal	108
4.3.1	Principe de l'expérience	108
4.3.2	Réalisation	110
4.3.3	Résultats	111
4.3.4	Conclusion	113
5	Conclusion et perspectives	116
5.1	Système de distribution microfluidique	116
5.2	Culture de cellules dans les microsystèmes	117
5.3	Perspectives	118

A	Procédés de fabrication	129
A.1	Photolithographie	129
A.1.1	Principe	129
A.1.2	Gravure	130
A.1.3	Réalisation de moules	130
A.2	Reactive Ion Etching	131
A.2.1	RIE	131
A.2.2	DRIE	132
A.3	PDMS	132
A.3.1	Préparation	132
A.3.2	Moulage	133
A.3.3	Collage	133
A.3.4	Traitement de surface	134
A.3.5	Connection	134
B	Brevet	135

Glossaire

ADN Acide DesoxyriboNucleique, c'est une molécule présente chez tous les êtres vivants, elle porte l'identité génétique de l'individu.

Angiogénèse Processus de formation de nouveaux capillaires sanguins à partir de vaisseaux sanguins existants. C'est un processus essentiel au développement normal des tissus, mais il est aussi responsable de l'évolution de certaine maladie, en particulier des cancers.

BET Bromure d'éthidium : marqueur fluorescent de l'ADN.

Coefficient de partage adimensionnel, définit la répartition de concentration d'un élément entre deux phases en contact : $K = C_{\text{phase1}}/C_{\text{phase2}}$; caractérise l'affinité relative de cet élément pour ces deux phases.

DAPI (Di Aminido Phenyl Indol) marqueur fluorescent spécifique de l'ADN.

Dérivée particulière On appelle "dérivée particulière" de G la variation DG de G pendant un intervalle de temps DT infiniment petit lorsqu'on suit la particule dans son mouvement. Dans ce cas, les variables d'espace varient elles-mêmes au cours du temps et la dérivée temporelle est une différentielle totale.

Electrophorèse L'électrophorèse est un procédé consistant à déplacer des molécules chargées sous l'influence d'un champ électrique.

Electroosmose L'électroosmose est un déplacement de fluide entraîné par frottement visqueux lors de la mise en mouvement de molécules chargées sous l'influence d'un champ électrique.

FITC (Fluoresceine Iso Thio Cyanate) colorant fluorescent vert.

IGR Institut Gustave Roussi

IFR Institut Fédératif de Recherche. L'IFR mentionné dans ce manuscrit est l'institut d'Alembert qui regroupe quatre laboratoires de recherche au sein de l'ENS-Cachan.

Liaison hydrogène La liaison hydrogène est une liaison chimique de faible intensité qui relie les atomes. On peut la décrire comme une interaction électrostatique, de type force de van der Waals, entre des dipôles.

Miscible Se dit de deux liquides qui peuvent se mélanger (contrairement à l'eau et l'huile par exemple, qui ne sont pas miscibles)

Papules Lésion cutanée élémentaire, se présentant comme une élevation résistante et solide, ne contenant pas de liquide, spontanément résolutive et disparaissant sans cicatrice

PDMS Le PolyDiMethylSiloxane est un polymère répliquant très bien les motifs micrométriques par moulage. Sa simplicité d'utilisation et ses qualités mécaniques en ont fait un matériau très apprécié pour les applications microfluidiques.

Peptide Chaîne d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques : on parle de peptide lorsque la chaîne compte moins de cents acides aminés

Phase Une phase est un milieu dans lequel les paramètres varient de manière continue ; cela inclut notamment la composition chimique et la densité. De fait, un corps pur dans un état donné (solide, liquide ou gazeux) constitue en général une seule phase.

Photolithographie La photolithographie désigne l'ensemble des opérations permettant de réaliser un micro-système. On utilise pour cela une résine photosensible, que l'on expose à des rayons ultraviolets au travers d'un masque pour y transférer un motif, puis que l'on développe chimiquement pour révéler le motif transmis. Ce procédé est décrit plus en détail en annexe.

Plasmide Petite molécule d'ADN extrachromosomique circulaire double brin, capable de se répliquer indépendamment, et portant des caractères génétiques non essentiels à la cellule hôte.

Protéine Chaîne d'acides aminés reliés par des liaisons peptidiques : on parle de protéine lorsque la chaîne compte au moins cent acides aminés

Rhéologie La rhéologie est une partie de la physique qui étudie la plasticité, l'élasticité, la viscosité et la fluidité caractéristiques des corps déformables. Du grec *reo* (couler) et *logos* (étude).

SU8 La SU8 est une résine photosensible négative. Il en existe plusieurs variantes de viscosité différentes permettant de réaliser des motifs très épais en photolithographie. C'est la résine que l'on utilise pour réaliser les moules pour les systèmes en PDMS.

Thixotrope Se dit des fluides ayant la propriété de passer d'un état visqueux à un état liquide lorsqu'on les agite et de retrouver leur état initial après un temps de repos.

Viscoélastique Qualifie un matériau dont la viscosité permet des déformations élastiques.

Wafer En micro-électronique, un wafer désigne un disque assez fin de matériau semi-conducteur, comme le silicium. Il sert de support à la fabrication de micro-structures par des techniques telles que le dopage, la gravure, la déposition d'autres matériaux et la photolithographie.

Chapitre 1

Introduction à l'injection transdermique

Il existe de nombreuses méthodes pour injecter un produit sous la peau. Le choix, dans le cadre d'Angioskin, d'utiliser une matrice de microaiguilles est le fruit d'un compromis entre l'efficacité de l'injection, le taux de pénétration de produit à l'intérieur des cellules cibles, le coût et la complexité des moyens employés et, enfin, le confort du patient. On se propose dans cette partie d'identifier le contexte de l'injection transdermique, puis d'en étudier les différentes méthodes pour préciser l'intérêt porté à l'utilisation de microaiguilles.

1.1 Le projet Angioskin

L'objectif du projet Angioskin est de réussir le traitement local d'une maladie de peau par thérapie génique. L'étude porte sur le traitement du psoriasis, mais la méthode pourrait être étendue à d'autres maladies.

1.1.1 Le psoriasis

Généralités

Le psoriasis est une maladie bénigne de la peau, d'origine mal connue, en partie génétique. Elle peut être déclenchée par plusieurs facteurs dont le stress, des irritations locales, l'exposition au soleil, certains médicaments... Cette affection dermatologique touche 2 à 3% de la population mondiale. Elle se caractérise par des plaques rouges et bien délimitées, contenant des papules, et des squames (sorte de petites écailles de peau). Bien qu'inoffensives, celles-ci sont inesthétiques.

Le psoriasis se traduit par un renouvellement trop rapide des cellules de l'épiderme. Celles-ci se renouvellent en seulement quatre à six jours, au lieu des

trois semaines habituelles ce qui génère des inflammations localisées. Les cellules épidermiques s'accumulent à la surface de la peau et y forment une couche de pellicules blanches.

Dans sa forme bénigne, le psoriasis se limite au cuir chevelu, aux genoux, aux coudes, aux pieds, aux mains et, parfois, aux organes génitaux. Dans les cas graves, il s'étend et peut gagner la totalité du corps. Cette maladie chronique évolue de façon très individuelle, avec des poussées, mais aussi des rémissions au cours desquelles les lésions disparaissent. On dit alors que le psoriasis est 'blanchi'. Le répit est de durée très variable et la rémission souvent incomplète. En l'absence de traitement curatif, il est toutefois possible de maîtriser le psoriasis, de diminuer l'étendue des lésions et d'améliorer la vie des patients.

Il n'existe pas de traitement définitif : actuellement, le traitement consiste dans un premier temps à faire disparaître les lésions, puis à appliquer au niveau des zones psoriasiques de petites quantités de produits dans le but de freiner les récurrences.

Pour le psoriasis comme pour les tumeurs cancéreuses, la croissance est permise par un phénomène de vascularisation : de nouveaux vaisseaux sanguins se créent pour irriguer les cellules proliférantes. On appelle ce phénomène l'angiogénèse. Dans le cadre d'Angioskin, c'est sur cet élément que l'on compte agir : en utilisant un composé anti-angiogénique, on peut empêcher la formation de nouveaux vaisseaux sanguins et donc l'alimentation des cellules malades. Plus précisément, l'objectif est de traiter la peau génétiquement pour lui permettre de produire elle-même la protéine curative.

Thérapie génique

La thérapie génique consiste à utiliser du matériel génétique pour traiter une maladie. Concrètement, on introduit un gène dans des cellules afin qu'elles produisent une protéine particulière. Cette protéine pouvant servir à remplacer une protéine manquante à l'organisme malade, ou agir activement sur la maladie (voir figure 1.1).

Pour faire pénétrer le gène dans les cellules, il existe plusieurs méthodes, dont certaines sont décrites dans la suite de ce document. La méthode la plus employée aujourd'hui est cependant encore la voie virale : les virus ont naturellement la capacité de migrer et de pénétrer dans des cellules cibles de certains organes pour y introduire leur ADN. On peut donc ajouter au génome d'un virus le gène que l'on souhaite administrer pour ensuite le transmettre aux cellules.

Pour Angioskin, on souhaite utiliser un gène codant pour un peptide ayant des propriétés anti-angiogéniques, l'AMEP. Une fois introduit dans les cellules de la peau, ce gène va permettre aux cellules de produire l'AMEP qui régulera

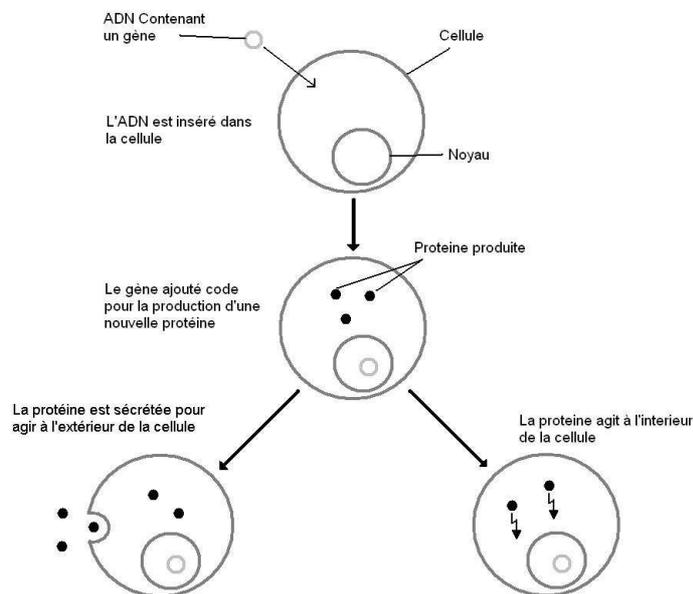


FIG. 1.1 – Principe de la thérapie génique.

la vascularisation de la peau. Les études préliminaires seront réalisées sur des souris. Le psoriasis n'existe pas à l'état naturel chez les souris, mais certaines mutations spontanées ou induites des souris (souris transgéniques), ou l'injection de cellules jouant un rôle dans le développement de la maladie peuvent simuler efficacement certains aspects de la maladie [1]. On notera que l'expérimentation animale, tout comme l'expérimentation humaine, est soumise à des règles éthiques ainsi qu'à une législation spécifique à chaque pays [2].

1.1.2 Méthode de traitement

Il existe généralement plusieurs moyens d'atteindre une maladie que l'on souhaite soigner. On peut en particulier choisir entre un traitement général, touchant tout l'organisme, et un traitement local, ciblé sur la partie malade. Pour le traitement de maladies de peau, le traitement local correspond à une administration transdermique des médicaments.

Voie générale et thérapie génique

Dans beaucoup de situations, la voie générale est la plus simple. La prise de médicaments par voie orale en particulier ne nécessite aucun équipement, ni aucune aide. Toutefois, ce moyen n'est pas adapté à la thérapie génique. Bien

qu'il soit possible, en utilisant un vecteur viral, de répandre dans tout le corps le médicament, on ne peut se permettre de risquer une modification génétique aléatoire au sein de l'organisme. De fait, les traitements en thérapie génique sont généralement réalisés ex vivo, sur des cellules réintroduites dans l'organisme après avoir été transfectées. Cette raison essentiellement, mais aussi le coût prohibitif des produits utilisés en thérapie génique conduit pour des traitements in vivo à cibler uniquement l'organe ou la région du corps à traiter. Pour le projet Angioskin, on s'est donc naturellement tourné vers une administration transdermique.

Application transdermique

L'administration de produits par la voie transdermique présente de nombreux avantages par rapport aux méthodes traditionnelles (voie orale et injection) [3, 4]. Elle évite les dégradations enzymatiques subies par les médicaments administrés oralement et est indolore contrairement aux injections. Dans certains cas, comme celui du projet Angioskin, elle présente surtout un moyen de mieux cibler les cellules à traiter (quand elles se situent dans la peau) ce qui permet d'améliorer l'efficacité des traitements et de mieux doser les produits utilisés.

L'imperméabilité de la peau présente cependant une limite sérieuse à ce moyen d'administration de médicaments. En effet, la couche superficielle de la peau (le 'stratum corneum') protège efficacement le corps humain contre toute intrusion extérieure. Il est très difficile de faire passer des médicaments en quantité suffisante au travers de cette barrière.

1.1.3 Conclusion

On cherche dans le cadre du projet Angioskin à réaliser le traitement génique d'une maladie de peau. Il y a pour cela deux principales barrières à l'administration du médicament : l'épiderme, qui fait obstacle à l'application transdermique, et la membrane cellulaire, qui fait obstacle à l'insertion du gène dans les cellules, et donc à la thérapie génique. On verra dans la suite de cette partie des méthodes pour franchir ces deux barrières, puis on présentera plus en détails celles retenues pour le projet Angioskin.

1.2 Administration transdermique

1.2.1 La peau

La peau est l'organe le plus étendu du corps humain, sa surface totale est de près de 2 m^2 , elle représente environ 10% du poids d'une personne. Elle remplit des fonctions de protection et d'interaction avec l'extérieur de l'organisme. Elle est composée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (voir figure 1.2).

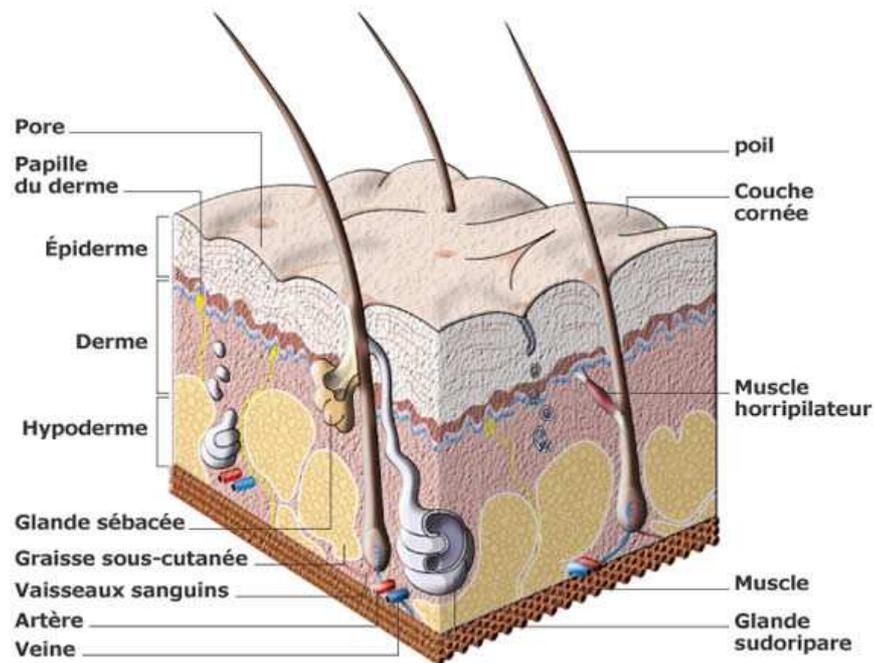


FIG. 1.2 – Coupe de la peau [5].

L'épiderme

L'épiderme a chez l'Homme une épaisseur moyenne de 0,1 mm [5]. C'est la couche externe de la peau, elle est stratifiée. Sur sa face profonde, les cellules basales se régénèrent en permanence et donnent naissance à des kératinocytes qui migrent vers la surface, perdent leur noyau, s'aplatissent et meurent en quelques semaines. Cette dernière étape fait de la couche superficielle de l'épiderme, le stratum corneum, un tissu très dense de cellules mortes. C'est cette dernière couche qui contribue le plus à l'imperméabilité de la peau ; elle est constituée de 10 à 50 couches de cellules mortes dont l'espace intercellulaire est de l'ordre de 20 nm [6]. Les cellules mortes de l'épiderme sont éliminées par nos gestes quotidiens (frottements des vêtements, toilette...) et sont renouvelées par la régénération des cellules basales. Le psoriasis correspond à un dérèglement de ce cycle qui s'emballe et conduit à une surproduction de kératinocytes.

Le derme

Le derme se trouve sous l'épiderme. Il est d'épaisseur variable, en moyenne quatre fois plus épais que l'épiderme, très épais dans la paume des mains et sur la plante des pieds, et plutôt mince sur les paupières. Le derme est fortement

vascularisé et joue un rôle dans le contrôle de la température du corps : il peut se gonfler de sang chaud (la peau rougit) ce qui permet d'irradier cet excès de température vers l'extérieur ; ou le sang peut s'en retirer (la peau blanchit) lorsque la température externe est trop froide afin d'éviter que le corps ne perde trop de chaleur par la peau. Le derme assure la nutrition de la peau, c'est aussi là que se situent les racines des poils, les glandes sudorales et les terminaisons nerveuses. C'est justement parce que les terminaisons nerveuses ne se situent que dans le derme que des microaiguilles qui le pénètrent à peine sont indolores.

L'hypoderme

L'hypoderme est situé sous le derme. C'est un tissu riche en graisse et en vaisseaux sanguins. Son principal rôle est d'amortir les pressions et chocs auxquelles la peau est soumise. Il protège également l'organisme des variations de température. Il est particulièrement important dans les zones devant supporter un impact telles que les fesses ou les talons. En revanche dans d'autres zones, il est quasi-inexistant. Il sert enfin de réservoir énergétique pour le reste de la peau. Situé trop en profondeur, il n'est généralement pas visé par les systèmes d'administration transdermique.

1.2.2 Diffusion

Molécules et taille

La dimension des molécules joue un rôle important dans leur mobilité et leur potentiel de pénétration dans la peau. On utilise généralement le Dalton (Da) comme unité de masse pour caractériser une molécule. Un Dalton correspond à la masse d'un atome d'hydrogène, c'est à dire $1,66.10^{-27}$ kg.

Pour l'ADN, on peut aussi utiliser le nombre de paires de base comme unité de longueur et avoir une dimension caractéristique correspondant à la longueur de contour des molécules. On a alors :

- 1 kbp = 1000 paires de bases
- 1 kbp = $6,1.10^5$ Da
- 1 kbp = $0,34 \mu\text{m}$

Quelques dimensions :

- Eau : 18 Da
- Glucose : 180 Da
- Insuline : environ 6000 Da
- ADN Plasmide d'Angioskin : environ 5 kbp soit 30000 Da ou $1,5 \mu\text{m}$ de longueur

Enfin, on peut évaluer la taille caractéristique d'un polymère en solution au moyen de son rayon de giration. Ce rayon donne une dimension approximative de la molécule lorsqu'elle est repliée sur elle même, au repos. Pour un polymère simple, ce rayon de giration peut être évalué au moyen de la formule 1.1.

$$R_g = a.N^\nu \quad (1.1)$$

Dans cette équation, a est la longueur d'un monomère, N le nombre de monomères que contient le polymère et ν est un exposant dit de Flory qui vaut 0,588 pour un bon solvant. Pour les molécules biologiques, comme l'ADN, cette loi doit être corrigée en prenant en compte la forme semi rigide qu'elles prennent en solution. On peut alors évaluer leur rayon de giration au moyen de l'équation 1.2 [7].

$$R_g = 2.L_p.\left(\frac{N_p}{6}\right)^\nu \quad (1.2)$$

Dans cette équation, N_p correspond au nombre de fragments (dits de Kuhn) composants la molécule et L_p est la longueur de ces fragments. Cette formule permet d'évaluer le rayon de giration de notre molécule d'ADN de 5 kpb à près de 200 nm.

Diffusion dans la peau

Le moyen le plus simple de faire passer des médicaments sous la peau consiste à les laisser diffuser. Toutefois, tous les composés ne sont pas susceptibles de traverser le stratum corneum à une vitesse utile. Pour que la diffusion soit effective, le composé doit avoir une faible masse moléculaire (inférieure à 600 Da), une bonne solubilité à la fois dans l'eau et dans l'huile, et un coefficient de partage élevé entre membrane et solution ambiante [8]. Le coefficient de partage représente la répartition de concentration d'un produit entre deux phases en contact. Ici, il s'agit de la membrane cellulaire et milieu qui l'entoure. Ces trois conditions sont remplies par la nicotine par exemple, ce qui peut expliquer l'efficacité de patchs transdermique pour l'administration de ce médicament dans le traitement de la dépendance au tabac.

Peu de molécules réunissent les propriétés nécessaires à la pénétration de la peau par diffusion. En particulier, les molécules chargées (comme l'ADN) pénètrent très mal la peau. Mais le facteur le plus limitant pour l'ADN reste la taille des molécules. En particulier, le plasmide envisagé pour Angioskin est une molécule cinq cent fois trop massive pour traverser le stratum corneum. Son rayon de giration est de 200 nm, alors que l'espace entre les cellules où il devrait circuler est de l'ordre de 20 nm. Il n'est donc pas possible de faire diffuser de l'ADN plasmide au travers de la peau.

1.2.3 Procédés chimiques

De nombreuses méthodes à caractère chimique ont été étudiées pour obtenir de meilleurs taux de pénétration dans la peau par diffusion. On ne cherchera pas à en faire une étude exhaustive, mais à en présenter les principales caractéristiques. Le procédé le plus simple donnant des résultats est d'augmenter l'hydratation de la peau, mais il existe aussi des agents chimiques permettant de

désorganiser le stratum corneum pour y ouvrir des passages jusqu'aux couches plus profondes de l'épiderme.

Hydratation

Le stratum corneum est un tissu très sec dont la teneur en eau n'est que de 15 à 20% du poids du tissu sec [9]. Cependant, ce taux d'hydratation dépend de l'environnement, et on peut l'augmenter en trempant la peau dans l'eau, en l'exposant à une forte humidité, ou en empêchant l'évaporation naturelle au moyen d'un film plastique, ou d'un patch occlusif. C'est cette dernière méthode qui, étant la plus efficace, est généralement utilisée en clinique. Elle permet d'amener la teneur en eau du stratum corneum au même niveau que celle des tissus inférieurs, soit 400% du poids du tissu sec environ.

L'hydratation du stratum corneum augmente le taux de pénétration de la plupart des substances qu'elles soient hydrophiles ou lipophiles. Les mécanismes conduisant à cette amélioration ne sont pas totalement déterminés. D'un point de vue mécanique, l'hydratation entraîne une dilatation des tissus pouvant conduire à l'ouverture de passages aqueux au travers du stratum corneum. Chimiquement, l'augmentation importante de la quantité d'eau pourrait modifier la solubilité d'un composé et augmenter son taux de pénétration dans les membranes [9].

Agents chimiques promoteurs de pénétration

De nombreux agents chimiques peuvent être utilisés pour améliorer la diffusion de produits dans la peau. Ces agents peuvent interagir de plusieurs manières avec le stratum corneum ou le produit à administrer ; en particulier, ils peuvent désorganiser les couches cellulaires ou les membranes lipidiques, ou encore cibler la solubilité du médicament.

Les alcools (tels que l'éthanol) peuvent servir de solvant pour le médicament administré. En augmentant la solubilité, ils permettent d'avoir des concentrations de médicament plus importantes et donc d'augmenter les gradients de concentration qui sont les moteurs du phénomène de diffusion. D'autre part, ils peuvent aussi agir sur la solubilité des tissus biologiques entraînant une élévation du coefficient de partage entre membrane et solution ambiante augmentant encore la diffusion au travers des membranes.

Les sulfoxides et plus particulièrement le dimethylsulphoxide (ou DMSO) ont pour propriété de dénaturer les protéines. Appliqué à la peau, le DMSO modifie la conformation de la kératine entraînant une distorsion des cellules pouvant créer des passages pour les produits que l'on souhaite administrer. Les agents tensioactifs ont aussi un effet sur la kératine [9].

Enfin, de nombreux agents chimiques agissent sur les barrières lipidiques. C'est le cas des acides gras [10], des surfactants ou encore de l'azone qui est historiquement la première molécule à avoir été qualifiée comme un promoteur de pénétration dans la peau. Les acides gras et l'azone s'insèrent dans les membranes lipidiques où leur présence cause des défauts ponctuels affectant la perméabilité de la membrane. Les surfactants solubilisent les éléments lipophiles et peuvent donc solubiliser des parties des membranes ouvrant ainsi des passages au travers.

Bien que de nombreux agents chimiques aient été testés, à ce jour, aucun n'a montré toutes les qualités que l'on peut attendre d'un promoteur de pénétration idéal. On attend en effet de ces composants chimiques qu'ils soient non toxiques, non irritants, non allergisants, qu'ils n'aient aucune activité pharmacologique une fois introduits dans le corps, qu'ils ne laissent pas de marque sur la peau, que leurs effets de perméabilisation soient transitoires, mais efficaces et de préférence unidirectionnels (permettant la pénétration, mais pas la perte de composants de la peau).

D'une manière générale, il convient de préciser que l'efficacité des agents chimiques dépend du médicament que l'on souhaite administrer : il n'y a pas de promoteur de pénétration chimique universel. Il est de plus difficile de savoir a priori quel promoteur chimique sera efficace pour un nouveau médicament, ce qui rend leur usage fastidieux.

Conclusion

Tout comme la diffusion naturelle dans la peau, les procédés chimiques promoteurs de pénétration n'exploitent que le phénomène de diffusion pour faire pénétrer un composé dans la peau. Ce phénomène est très lent et a pour seul moteur la différence de concentration entre l'extérieur et l'intérieur de la peau. De ce fait, seule une très faible quantité des molécules utilisées pénètrent réellement dans la peau. Enfin, la diffusion dans la peau reste très sensible à la taille des molécules transportées. Les dimensions et les coûts de productions des molécules d'ADN plasmide rendent ces procédés inadaptés à un traitement génétique.

1.2.4 Procédés électriques

Ionophorèse

Contrairement aux procédés chimiques vus précédemment, la ionophorèse n'agit pas sur la perméabilité de la peau, mais fournit une force motrice aux molécules chargées électriquement. Pour cela, on place une électrode là où l'on souhaite faire entrer la solution ionisée et on relie une autre partie du corps à la masse. Lorsque l'on applique le courant, les molécules chargées se mettent en mouvement. Les molécules de charge opposée à celle de l'électrode pilote sont

alors repoussées vers l'intérieur de la peau. Des molécules non chargées peuvent alors aussi être entraînées par électroosmose, mais ce phénomène est faible comparé au déplacement des ions.

Pour ce procédé, on applique un courant faible, inférieur à $0,5 \text{ mA par cm}^2$ en continu ou de manière pulsée afin d'éviter l'apparition de brûlures et d'irritations. Expérimentalement, on constate que les cations pénètrent mieux par cette méthode que les anions [11]. Le pH de la solution à administrer joue un rôle important dans la pénétration du composant actif. Les ions présents en solution entrent en compétition lors de la mise en mouvement et les ions H^+ étant particulièrement petits, ils pénètrent plus facilement que le composant actif. D'autre par, un pH trop faible peut provoquer des réactions indésirables de la peau, et doit aussi être ajusté pour assurer l'ionisation du composant actif.

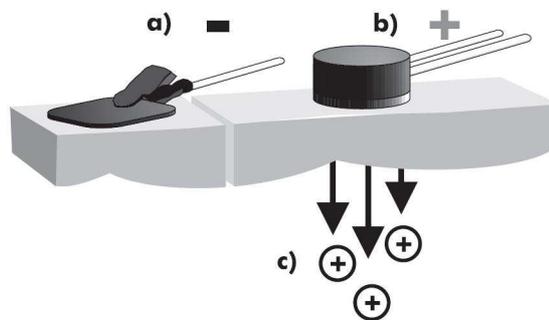


FIG. 1.3 – Système d'électrodes placées à la surface de la peau : a) Electrode chargée négativement, b) Electrode d'administration du produit contenant des ions chargés positivement, c) à l'application du courant, les ions chargés positivement sont repoussés par l'électrode b) et pénètrent dans la peau.

La ionophorèse peut-être utilisée pour l'administration comme pour l'extraction de produits de la peau puisque lorsque les molécules chargées positivement sont repoussées par une électrode, les molécules chargées négativement sont alors extraites à cette électrode. Une application commerciale de ce principe est en vente depuis 2002 aux Etats Unis : la Gluowatch. Cette montre, destinée aux diabétiques, permet de mesurer le taux de glucose dans le sang très simplement et de manière totalement non invasive. On remarquera pour cette application que le glucose est une molécule non chargée et que c'est donc par électroosmose que celle-ci est extraite de la peau.

La ionophorèse ne jouant pas sur la perméabilité de la peau, elle peut être efficacement couplée à d'autres procédés mécaniques ou chimiques, comme la sonophorèse [12], ou l'application d'acides gras [13]. Elle permet aussi de contrôler le taux de pénétration ou d'extraction des produits par le biais de la durée ou

de l'intensité du courant appliqué. C'est toutefois un procédé relativement lent qui ne peut que difficilement faire pénétrer de grandes molécules dans la peau. En effet, une application trop intense du courant électrique peut provoquer une brûlure ou des lésions légères de la peau [14].

Magnétophorèse

Tout comme la ionophorèse, la magnétophorèse est une méthode servant à favoriser la pénétration de molécules dans la peau en ajoutant une force motrice supplémentaire aux forces de diffusion. De même encore, cette méthode fonctionne sur des molécules aux propriétés particulières : les molécules diamagnétiques. Une substance diamagnétique est une substance qui, placée dans un champ magnétique, s'aimante en sens inverse. Ainsi, les substances diamagnétiques tendent à s'éloigner des maximum d'intensité du champ magnétique et donc ces substances sont poussées vers l'intérieur la peau lorsqu'elles sont soumises à un champ magnétique extérieur.

De même que l'ionophorèse où un transport de molécules non chargées peut être obtenu par électroosmose, un phénomène identique peut être observé avec la magnétophorèse. En effet, l'eau est diamagnétique, elle est donc déplacée sous l'effet d'un champ magnétique. Elle peut alors par magnéto-osmose entraîner avec elle d'autres molécules.

L'efficacité de cette méthode a été montrée en utilisant de l'acide benzoïque comme molécule test [15]; toutefois, la magnétophorèse reste un procédé peu étudié et sans doute peu efficace.

Conclusion

Les procédés électriques d'administration transdermique ont de nombreuses qualités qui ont permis d'aboutir à des objets commerciaux particulièrement innovants. Leur principal intérêt est de ne pas agir sur la perméabilité de la peau, mais de fournir une force motrice aux molécules que l'on fait pénétrer. Seules, elles ne peuvent toutefois atteindre les couches profondes de la peau que difficilement, ou très lentement. Leur efficacité est de plus, comme pour les procédés chimiques, sensible à la taille des molécules transportées, ce qui les rend inadaptés à l'administration de solution d'ADN.

1.2.5 Procédés mécaniques

Si la peau présente une trop forte opposition à l'administration transdermique, il est possible d'agir mécaniquement dessus pour la déstructurer, la percer ou même en retirer une partie. Plusieurs méthodes pour parvenir à ces résultats sont présentées dans cette partie.

Ablation du stratum corneum

Puisque le stratum corneum constitue la barrière étanche qui s'oppose à la pénétration transdermique, une méthode évidente d'amélioration de la pénétration consiste à le retirer, ou du moins à en réduire l'épaisseur. Il existe pour cela plusieurs procédés ; en particulier l'utilisation d'une sorte de ruban adhésif [16] ou l'ablation laser [17]. Après que le stratum corneum ait été ainsi traité, les médicaments pénètrent plus facilement par diffusion dans la peau.

Si l'ablation laser nécessite un matériel lourd et onéreux, l'usage de ruban adhésif est à la fois simple et efficace pour retirer le stratum corneum. Il suffit de coller le ruban sur la partie de la peau à opérer puis de le retirer, arrachant de la sorte une partie des cellules de la peau. En opérant plusieurs fois (environ quarante [16]), on peut retirer une partie significative du stratum corneum. L'intérêt principal de cette méthode est qu'elle peut être envisagée en addition de n'importe quelle autre pour réduire la barrière que représente le stratum corneum.

Perçage de la peau

Sans aller jusqu'à retirer le stratum corneum, il est possible d'augmenter la perméabilité de la peau en y perçant de petits trous. Pour cela, on peut se servir d'une matrice de micropointes que l'on presse contre la peau puis que l'on retire [18], ou encore projeter des particules au travers d'un masque afin de graver les trous dans la peau [19]. Ces deux méthodes conduisent à une nette diminution des propriétés de barrière de la peau évaluée soit par l'augmentation d'un facteur mille de la perméabilité de la peau [18], soit par une diminution de sa résistivité [19]. Dans un cas comme dans l'autre, l'augmentation, même d'un facteur mille, de la perméabilité de la peau ne constitue pas une solution pour l'administration d'une solution d'ADN.

Des micropointes peuvent toutefois être enduites de la solution à administrer avant l'insertion. Cela permet de la faire pénétrer directement avec les aiguilles, sans compter sur la diffusion pour véhiculer le médicament [20]. On a donc une meilleure proportion de produit qui pénètre dans la peau, ce qui limite le gaspillage. Pour ce procédé, le médicament est administré sous une forme sèche, ce qui limite sa solubilité et donc sa propension à se répartir dans les tissus. Ce n'est donc pas une méthode idéale pour un traitement de la peau, elle est plutôt destinée à un traitement général où l'on souhaite faire passer le médicament dans le sang.

Sonophorèse

La sonophorèse (ou phonophorèse) est une méthode de perméabilisation de la peau basée sur l'utilisation d'ultrasons. On utilise pour cela un générateur d'ultrason séparé de la peau par un milieu de couplage. Les puissances appliquées sont de l'ordre d'un Watt par centimètre carré à une fréquence de 20kHz [21, 22],

les pressions mises en jeu sont généralement comprises entre 1 et 5 Bars [23]. La sonophorèse peut aussi être appliquée à la cornée lors du traitement de maladies oculaires [24].

La sonophorèse génère un phénomène de cavitation à la surface de la peau. La cavitation est un phénomène physique qui se manifeste dans un liquide soumis à des variations importantes de pression. Localement, la pression diminue en dessous de la pression de vapeur saturante ce qui mène à la formation de bulles. En particulier, ce phénomène se produit lorsque qu'un liquide est soumis à des ultrasons : des cavités gazeuses micrométriques se forment et implosent violemment entraînant localement des hausses de pression et de température dans le liquide. L'effondrement de ces microbulles ouvre localement les membranes des cellules à proximité (figure 1.4).

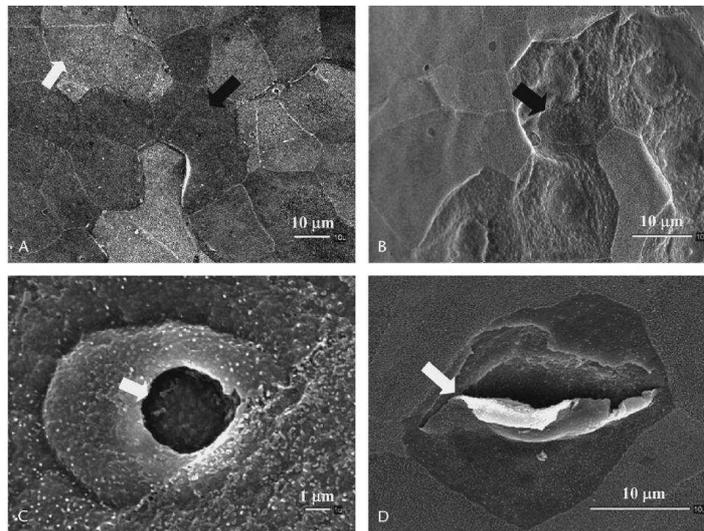


FIG. 1.4 – Effet des ultrasons sur les cellules de la cornée.

Comme il ne s'agit que d'une méthode d'amélioration de la perméabilité de la peau, elle ne permet pas de faire pénétrer des molécules de très grande taille. Samir Mitragotri [25] présente des résultats pour des molécules de 180 et 5000 Da (respectivement manitol et inuline) et rapporte une amélioration de la perméabilité d'un facteur 33 (manitol) et 20 (inuline); mais pour de grosses molécules dont le taux de pénétration dans la peau est très faible, voire nul, l'augmenter d'un facteur dix ou vingt ne permettra pas d'obtenir un transfert significatif dans la peau.

Onde photomécanique

L'application d'une très forte pression pendant un temps très court permet d'augmenter la perméabilité de la peau. Pour réaliser cela, on utilise une source laser de forte puissance pour envoyer une impulsion de forte intensité sur une cible. On peut ainsi obtenir une onde de pression allant de 300 à 1000 bars pendant une durée allant de cent nanosecondes à une microseconde environ.

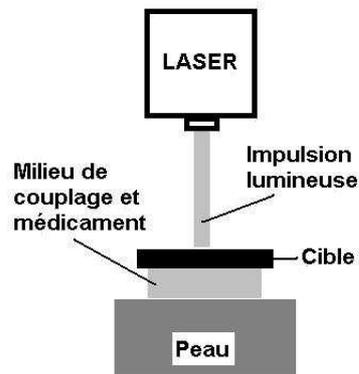


FIG. 1.5 – Schéma de l'application d'onde photomécanique

La transformation de l'énergie lumineuse du laser en une onde de pression mécanique est généralement obtenue par ablation d'une cible posée à la surface de la peau. Dans ce cas, les radiations du laser causent la désintégration de la cible qui éjecte de petites particules à une vitesse supersonique de sa face insolée (voir figure 1.5). La pression induite dépend alors des caractéristiques de l'onde lumineuse émise (temps et intensité). Dans ce procédé, c'est l'action directe de l'onde de pression qui modifie la perméabilité de la peau.

Comme il ne s'agit encore que d'une méthode de perméabilisation de la peau, elle n'est pas non plus adaptée à l'administration d'ADN plasmide. Elle permet toutefois de faire pénétrer des molécules de relativement grande taille. Ainsi, des molécules de 40 kDa (dextran) peuvent pénétrer jusqu'à $40\ \mu\text{m}$ sous la surface de la peau [26] et des billes de latex de 100 nm pénètrent l'épiderme [23]. Des molécules de plus petite taille (insuline) peuvent aussi pénétrer jusque dans le sang. C'est un procédé totalement indolore, qui endommage le stratum corneum temporairement. Le principal défaut est le matériel nécessaire : il est coûteux et encombrant, totalement impropre à un usage domestique.

Les microaiguilles percées

La méthode la plus intuitive pour faire passer un produit dans la peau est sans doute la réduction à l'échelle de la peau du moyen d'injection universelle qu'est l'aiguille percée. Pour cela, des microaiguilles agencées en matrice, peuvent être utilisées. Le procédé est simple : la matrice d'aiguilles est plantée dans la peau, et le produit peut-être injecté au moyen d'une simple seringue, comme à l'échelle macrométrique.

Les microaiguilles présentent de multiples intérêts pour l'administration transdermique. Tout d'abord, elles sont indolores car elles ne pénètrent pas les couches profondes de la peau, là où se trouvent les terminaisons nerveuses. Ensuite, les dégâts causés à la peau sont uniquement mécaniques : des trous nombreux mais de petites tailles qui se résorbent rapidement. Enfin, elles permettent d'injecter efficacement une quantité importante de produit sans pour autant en gaspiller beaucoup.

Cette méthode toutefois n'en est qu'à ses débuts et présente aussi des difficultés : les microaiguilles risquent de se casser dans la peau, ou simplement de ne pas la percer rendant toute injection impossible. D'autre part, l'injection au travers d'une matrice de microaiguilles est difficile à contrôler au niveau de chaque aiguille. Pour parvenir à injecter une même quantité de produit au travers de chaque aiguille, il faut alors prévoir un système de distribution adapté.

Conclusion

Les manières d'agir mécaniquement sur la peau sont très variées, et n'ont pas été toutes exposées ici. Certaines, comme les ondes photomécaniques nécessitent un appareillage très lourd, tandis que pour d'autres, un simple scotch est utilisé. D'une manière générale, toutes ces méthodes n'apportent pas de meilleurs résultats que les procédés chimiques et électriques ; en particulier pour l'administration de molécules de très grande taille. Seule l'injection au travers de microaiguilles fait exception. Ce dernier procédé permet non seulement de faire passer des molécules de grande taille au travers de la peau, mais il garanti aussi et surtout une utilisation optimale du produit puisque tout ce qui est injecté traverse effectivement la peau. C'est donc cette dernière méthode qui a été retenue pour administrer l'ADN plasmide dans le cadre du projet Angioskin. Les microaiguilles sont présentées plus en détail dans la partie 1.4.

1.3 Transfert d'ADN

Une fois franchie la barrière de l'épiderme, l'ADN doit être introduit à l'intérieur des cellules pour pouvoir s'exprimer. On doit pour y parvenir avoir recours à un procédé permettant aux molécules d'ADN de traverser la membrane plasmique entourant les cellules.

1.3.1 La cellule

La cellule est l'unité structurale et fonctionnelle constituant tout ou partie d'un être vivant. Il en existe deux types distincts : les cellules eucaryotes dont le noyau est isolé du reste de la cellule par une membrane plasmique, et les cellules procaryotes, plus primitives (bactéries par exemple) dont le noyau n'est pas isolé. Une cellule est composée à 70% d'eau et contient plusieurs organelles qui assurent son bon fonctionnement. On distingue essentiellement trois parties de la cellule : la membrane, le noyau et le cytoplasme.

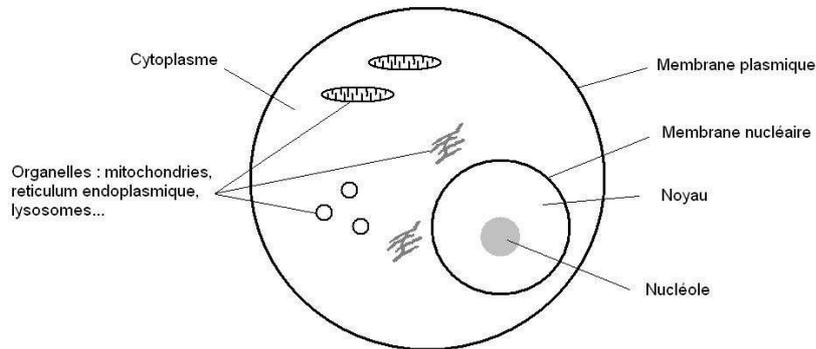


FIG. 1.6 – La cellule

La membrane plasmique

La cellule est contenue dans une membrane essentiellement constituée de lipides. Cette membrane sert principalement à contrôler les échanges de la cellule avec l'extérieur, et de ce fait, elle constitue une barrière à l'assimilation des solutions médicamenteuses. Dans les cellules animales (eucaryotes), le noyau est aussi entouré d'une membrane.

Le noyau

Le noyau contient le matériel génétique de la cellule, assure la transmission des caractères héréditaires et joue un rôle important dans le métabolisme cellulaire, notamment dans la régulation de la synthèse des protéines. Il contient la chromatine (un mélange d'ADN et de protéines) et le nucléole qui est le lieu de synthèse de l'ARN.

Le cytoplasme

On désigne par cytoplasme tout le contenu de la membrane plasmique à l'exception du noyau. Il est essentiellement constitué d'eau et contient les organelles de la cellule (c'est à dire, les mitochondries, l'appareil de Golgi, les lysosomes...).

1.3.2 Structure de la membrane plasmique

La membrane cellulaire est constituée principalement d'une bicouche lipidique. Ces lipides sont des molécules comprenant une tête polaire (hydrophile) et une queue apolaire (hydrophobe). En milieu aqueux, ces lipides s'organisent pour réduire les contacts entre leur partie hydrophobe et la solution environnante. Ils peuvent ainsi prendre la forme de micelle en formant une sphère de têtes hydrophiles isolant les queues hydrophobes, ils peuvent aussi former de petites poches appelées liposomes ou enfin, une membrane pouvant envelopper une entité plus vaste comme la cellule (figure 1.7).

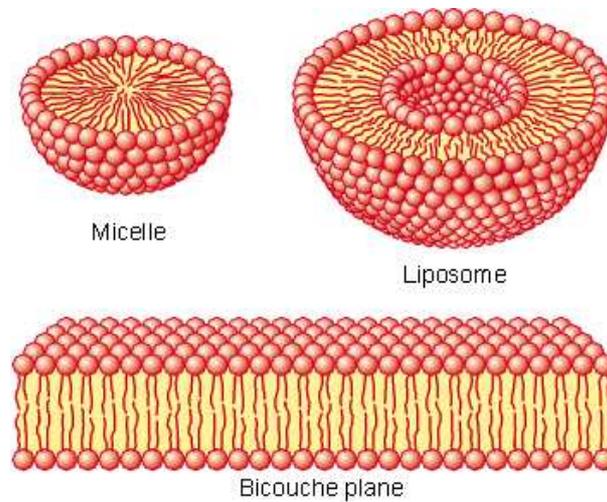


FIG. 1.7 – Agencement des lipides en bicouches

Cette structure est à l'origine du rôle de barrière de la membrane plasmique. En effet, la région hydrophobe centrale constitue une barrière infranchissable pour les substances polaires et les substances chargées électriquement comme les ions, même celles de petite taille. Toutefois, les molécules neutres, comme l'eau, peuvent traverser lentement une bicouche lipidique et les molécules apolaires la traverse facilement.

Une structure seulement constituée d'une bicouche lipidique serait instable. En effet, les composants de la bicouche lipidique ne sont pas liés de façon covalente, ils peuvent se déplacer librement dans celle-ci, mais en restant sur une même face. Des mouvements de translocation d'un côté à l'autre de la bicouche sont possibles, mais rares.

Dans une membrane cellulaire se trouvent aussi des glucides et des protéines pour garantir d'une part la stabilité de la structure et d'autre part permettre les divers échanges nécessaires au bon fonctionnement de la cellule. En particulier, la

répartition des glucides et protéines engendre un potentiel transmembranaire de l'ordre de 60 mV participant à la stabilité de la membrane. L'intérieur est chargé positivement, l'extérieur négativement. Différents procédés peuvent permettre à de grosses molécules de traverser cette membrane. On peut par exemple avoir recours à un procédé chimique ou électrique, comme présenté dans la suite de ce manuscrit.

1.3.3 Transfection chimique : les liposomes

Les liposomes sont des vésicules sphériques dont le centre est occupé par une cavité aqueuse et dont l'enveloppe est constituée de phospholipides agencés en bicouche, comme pour la membrane plasmique des cellules (voir figure 1.7). Ils constituent donc de grosses particules polaires. Ces vésicules peuvent servir à encapsuler les médicaments afin de les transporter. Ils présentent une affinité particulière pour les parois cellulaires ; ils sont en particulier capables de fusionner avec les membranes, ce qui permet de libérer dans la cellule les composés actifs encapsulés dans les liposomes (figure 1.8).

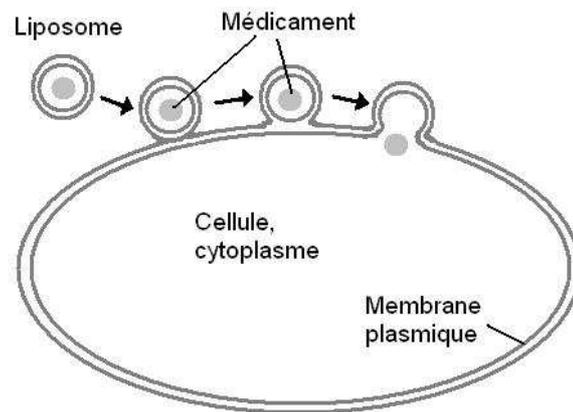


FIG. 1.8 – Administration intracellulaire avec un liposome

Pour un traitement transdermique, les liposomes peuvent être appliqués directement sur la peau. Du fait de leur grande taille, et malgré leur souplesse et leur mobilité [8, 27], on ne peut que difficilement les faire pénétrer profondément. D'autre part, ils ne sont pas aussi efficaces que les vecteurs viraux pour la transfection [28] et leur préparation nécessite une étape d'encapsulation de la molécule qui peut être délicate.

1.3.4 Electroporation

L'électroporation consiste à rendre les membranes cellulaires plus perméables par l'application d'un champ électrique [29]. La figure 1.9 présente un schéma

de principe de ce procédé [30]. Ce procédé permet de faire pénétrer des substances médicamenteuses à l'intérieur des cellules, permettant ainsi de diminuer le dosage des traitements en améliorant leur assimilation et leur ciblage. Ceci est particulièrement bénéfique dans le cas de traitements lourds comme celui du cancer.

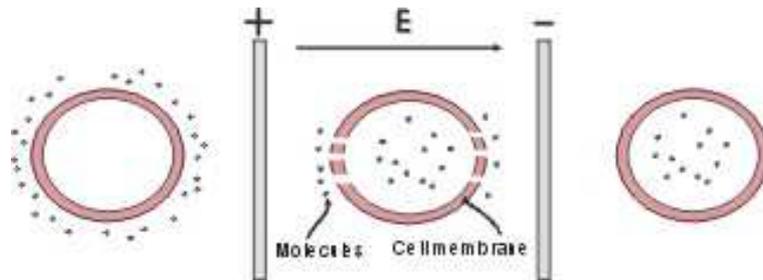


FIG. 1.9 – Schéma de l'électroporation [30]

C'est un procédé dont l'efficacité est démontrée pour l'application de produits par voie transdermique [3] sans même utiliser de microaiguilles pour franchir le stratum corneum comme c'est envisagé dans le projet Angioskin. Contrairement à la ionophorèse qui est un procédé moteur, l'électroporation est un procédé de perméabilisation des membranes cellulaires et donc de la peau.

On utilise comme pour la ionophorèse deux électrodes, mais par l'application de contraintes électriques différentes, on obtient un mécanisme différent. Les pulsations électriques appliquées sont de haut voltage et de très courte durée (μ s ou ms) générant des champs électriques de plusieurs centaines de volts par centimètre carré. À l'application du champ électrique, on modifie la répartition des charges dans le cytoplasme des cellules et donc le potentiel transmembranaire. Cette modification engendre une instabilité de la membrane qui se traduit par l'ouverture de pores. Si on ne dépasse pas un certain seuil (dépendant de la taille de la cellule et de l'ordre de 500 V.cm^{-1} pour une cellule de $20 \mu\text{m}$ de diamètre) cette ouverture est réversible et la membrane retrouve naturellement sa structure initiale une fois la répartition des charges revenue à la normale. Dans le cas contraire, la membrane se disloque de manière irréversible et la cellule meure.

Les forts courants électriques induits lors de l'électroporation sont à l'origine de son principal défaut. Ils causent en effet une contraction des muscles rendant le traitement inconfortable, voir douloureux. Pour éviter cet effet indésirable, il faut limiter les dimensions du système. On peut ainsi conserver la valeur des champs électriques tout en diminuant la tension appliquée. En particulier, l'article [31] présente un réseau de microélectrodes permettant une électroporation de la peau indolore. De ce fait, l'électroporation est un procédé favorisé par la miniaturisation.

L'un des principaux attraits de l'électroporation est que son mode d'application peut très simplement être couplé à un procédé tel que l'ionophorèse [32]. En pratique, dans un processus d'électroporation, on peut appliquer une ou deux pulsations électriques de forte intensité pour ouvrir les membranes cellulaires, et poursuivre avec une série de pulsations électriques plus faibles destinées à déplacer par électrophorèse, ou électroosmose les médicaments vers l'intérieur des cellules [33].

1.3.5 Conclusion

Bien qu'elles n'aient pas été présentées dans cette partie, il existe de nombreuses méthodes, spécifiques à l'ADN, pour pénétrer à l'intérieur des cellules. Les plus efficaces à ce jour sont virales et ne sont pas adaptées à un traitement in vivo. Parmi les méthodes non virales, l'électroporation est très prometteuse et permet très simplement de localiser le traitement, entre les électrodes [34].

Dans le cadre du projet Angioskin, il a donc été décidé de réaliser un couplage microaiguilles/électroporation pour assurer la pénétration de la solution d'ADN à l'intérieur des cellules de la peau. De cette manière, les microaiguilles permettent de franchir la couche externe de l'épiderme tandis que l'électroporation ouvre les membranes cellulaires pour permettre la pénétration du produit à l'intérieur des cellules ciblées.

1.4 Système d'injection

Les microsystèmes en général, et les microaiguilles en particulier commencent à trouver de nombreuses applications dans le domaine de l'administration de médicament [35]. L'un des principaux attraits de l'injection au travers de microaiguilles est que, contrairement à toutes les méthodes jouant sur la perméabilité de la peau, ce n'est pas uniquement une faible quantité du produit utilisé qui pénètre réellement dans la peau, mais sa totalité. C'est cette raison, appuyée sur le coût très important des produits employés en thérapie génique, qui a conduit à choisir une injection au travers de microaiguilles : on cherche ici à obtenir une optimisation du traitement en terme de quantité de produit utilisé.

1.4.1 Fabrication des microaiguilles

Différents concepts de microaiguilles

Les technologies de microfabrication de MEMS (Micro Electro Mechanical System) permettent de paralléliser massivement les géométries conçues. Une fois un motif élémentaire défini, celui-ci peut alors aisément être répliqué et assemblé en matrices de toutes tailles. Les travaux portant sur la réalisation de

microaiguilles par le biais de ces technologies ont donc naturellement dévié vers la réalisation de matrices de microaiguilles.

Suivant la manière dont on travaille le wafer, on peut répartir les aiguilles sur toute une surface [18, 36, 37] ou seulement les aligner en peigne [38, 39]. Les aiguilles réalisées parallèlement au plan du wafer, qui ne peuvent qu'être alignées, sont généralement plus grandes et plus complexes que les aiguilles normales au plan du wafer pour lesquelles les contraintes de fabrication imposent une certaine simplicité.

Un grand nombre de travaux ont mené à la réalisation de nombreuses formes de microaiguilles en faisant varier les procédés de fabrication. On distingue les aiguilles percées des aiguilles non percées. Les aiguilles non percées ont été conçues pour faire des microtrous dans la peau [18] afin de faciliter le passage de produit à travers l'épiderme, ou pour servir d'électrodes et réaliser un contact intracellulaire [36] par exemple. Les aiguilles percées sont en revanche destinées au prélèvement [37] ou à l'injection [38] de produits dans les tissus.

Aujourd'hui, des systèmes d'administration de produits par voie transdermique utilisant des aiguilles non percées commencent à être commercialisés (le système Macroflux d'Alza par exemple [40]). En revanche, les microaiguilles percées n'étant pas encore bien maîtrisées, elles restent à ce jour des objets de laboratoire.

Dimensionnement

Le dimensionnement des microaiguilles est gouverné par trois éléments majeurs : tout d'abord, les aiguilles doivent être suffisamment longues pour pénétrer la peau à la profondeur requise (de 150 à 500 μm), ensuite, le rapport de forme de ces aiguilles doit permettre la perforation de l'épiderme en limitant la force d'insertion, enfin, les aiguilles doivent être suffisamment solides pour ne pas se briser lors de l'insertion. Elles doivent donc être effilées, ou biseautées, mais suffisamment large pour supporter des efforts radiaux importants (soit près d'une centaine de micromètre à la base).

Des études ont été menées afin de prévoir le comportement mécanique des aiguilles lors de leur insertion dans la peau [41]. La force nécessaire à l'insertion d'une microaiguille aux dimensions étudiées varie entre 0.1 N et 3 N et semble toujours inférieure aux contraintes de rupture maximales tolérées par les aiguilles. Toutefois, l'insertion en bloc d'une matrice d'aiguilles est beaucoup plus contraignante car les efforts appliqués se répartissent entre toutes les aiguilles divisant ainsi la force d'appui. De plus, la densité d'aiguille joue alors un rôle important dans la pénétration : si les aiguilles sont trop proches, la peau ne peut plus se déformer et les contraintes deviennent alors insuffisantes pour permettre le perçage (on peut appeler cela 'l'effet Fakir').

On notera qu'il existe des méthodes, autres que topologiques, pour améliorer la pénétration des aiguilles dans la peau. En particulier, l'application de vibrations ultrasoniques permet de réduire ces efforts de pénétration [42]. Cette méthode, ainsi que l'emploi d'une force d'impact ont été étudiées par l'équipe en charge de la réalisation des microaiguilles du projet Angioskin. Ces études ont finalement aboutit à la réalisation d'un système d'insertion vibrant (une sorte de pistolet) devant améliorer le taux de pénétration des aiguilles dans la peau.

Les aiguilles d'Angioskin

Les aiguilles du projet Angioskin sont développées au laboratoire FEMTO-ST (UMR CNRS 6174). Elles ont la particularité de devoir servir d'une part d'aiguilles pour l'injection et d'autre part d'électrodes pour l'électroporation. Pour permettre une bonne distribution du champ électrique dans l'épiderme lors de l'électroporation, ces aiguilles doivent donc avoir une forme régulière. Elle ne peuvent être pyramidales ou coniques comme le sont la plupart des microaiguilles existantes, ce qui ajoute une contrainte importante concernant leur solidité. D'autre part, ces aiguilles doivent être percées pour permettre l'injection du produit dans la peau. Elles ont donc la forme de cylindres creux (figure 1.10).

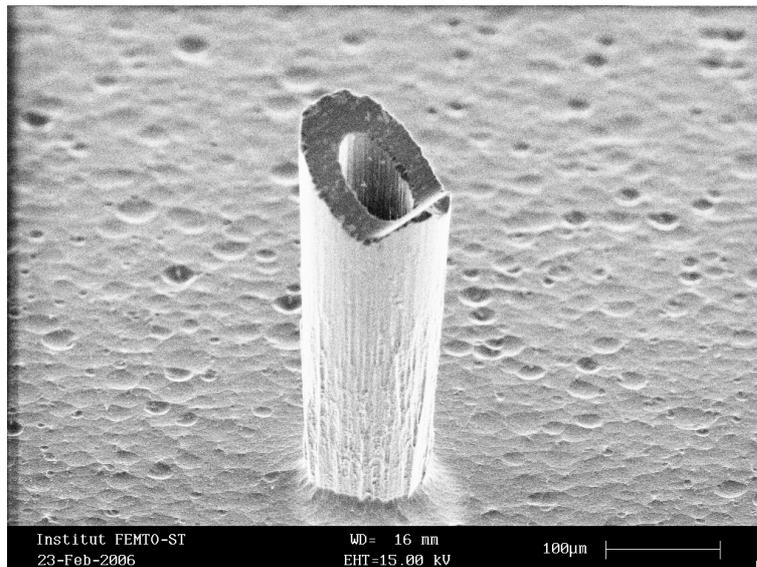


FIG. 1.10 – Aiguille d'Angioskin.

Du point de vue technologique, ces aiguilles sont réalisées dans du silicium au moyen d'un procédé de DRIE (Deep Reactive Ion Etching). Il s'agit d'un procédé de gravure sèche permettant d'obtenir des motifs avec de grands rap-

ports d'aspects. Les détails de ce procédé sont présentés en annexe (partie A.2.2). Elles sont ensuite recouvertes d'or afin de pouvoir remplir leur rôle d'électrodes. Concrètement, pour traverser l'épiderme, les aiguilles devaient initialement mesurer au moins $300\ \mu\text{m}$ de long (longueur prévue pour des tests sur les souris), pour un diamètre extérieur de près de $100\ \mu\text{m}$. Ce rapport de forme n'étant pas très important, les aiguilles doivent être biseautées pour pouvoir percer la peau.

L'expérience a montré au cours de l'avancement du projet que les aiguilles de $300\ \mu\text{m}$ de long, facilement réalisables, n'étaient pas suffisantes pour transpercer la peau. Leur conception est donc en évolution permanente en vue de parvenir à une solution efficace. Toutefois, l'augmentation de la taille des aiguilles présente de nombreuses difficultés de fabrication avec les technologies utilisées. D'autres technologies, plus onéreuses, sont actuellement envisagées en parallèle afin de disposer au plus tôt de prototypes exploitables.

1.4.2 Les microseringues

Dans le cadre de l'utilisation d'aiguilles percées, il faut réaliser un système dédié à la manipulation des petites quantités de liquide devant être injectées au travers des aiguilles. Suivant la complexité de ce système, on pourra contrôler ou non les paramètres de l'injection ; en particulier la quantité de produit injecté et l'uniformité de l'injection.

Les systèmes de distribution microfluidiques

Réaliser un système de distribution microfluidique ne représente pas un défi technologique en soi. Une imprimante à jet d'encre peut réaliser et positionner des millions de spots de quelques picolitres en une seconde. Cette technologie a d'ailleurs été adaptée à la distribution de produits réactifs pour permettre de paralléliser des tests chimiques [43]. Pour des applications pharmaceutiques, d'autres systèmes permettant de disposer une matrice de gouttes sur une surface plane existent déjà dans le commerce ; le robot *ChipWriterProTM* de VIRTEK est l'un des plus répandu pour cette tâche.

Des microsystèmes ont aussi été créés pour déposer des microgouttes tout en allégeant la technologie employée par ces robots. La solution la plus élégante consiste à exploiter les forces capillaires en tamponnant la surface de travail avec une matrice de micro-tampons [44]. Tous ces systèmes ne sont toutefois conçus que pour déposer un certain nombre de microgouttes sur une surface plane, et les volumes concernés ne sont pas toujours extensibles aux quantités à manipuler pour une administration de médicaments.

Tout ces systèmes ne permettent toutefois qu'une injection "dans l'air" des produits manipulés. La peau présente à la fois une résistance importante et une inhomogénéité qui nécessitent un traitement très différent. De fait, bien peu de travaux présentent l'intégration d'un système microfluidique à une matrice de

microaiguilles. Quelques travaux ont portés sur l'intégration d'un système microfluidique complexe avec une aiguille unique [45] voir avec plusieurs aiguilles alignées [46]. L'injection d'insuline pour les diabétiques se fait d'ailleurs aujourd'hui au moyen de systèmes miniaturisés permettant au patient, grâce à une micropompe, de s'injecter la quantité de médicament requise. Toutefois, le contrôle de l'injection au travers d'une matrice d'aiguilles plane est aujourd'hui encore un terrain de recherche vierge.

Injection dans la peau

Le moyen le plus simple de faire passer un liquide au travers d'une matrice d'aiguilles est d'adapter à l'ensemble de la matrice un réservoir unique. On peut ensuite tenter de contrôler les paramètres d'injection au moyen d'une approche théorique : connaissant le diamètre interne des aiguilles et la pression appliquée, on peut déterminer le débit de l'injection et donc le volume que l'on injecte. L'article [47] présente une approche théorique et expérimentale de ce calcul. Pour un débit fixé, plus il y a d'aiguilles, plus la pression à appliquer est faible. Pour une matrice de 8 aiguilles de longueur $200\ \mu\text{m}$ et diamètre intérieur $40\ \mu\text{m}$, il faut appliquer $20\ \text{kPa}$ pour un débit de $1000\ \mu\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$.

Toutefois, cette approche ne fonctionne bien que pour une injection dans l'air. Pour une injection transdermique, la résistance de la peau devrait être prise en compte. Dans l'article [48], la matrice de huit microaiguilles décrite dans l'article [47] est collée à l'extrémité d'une seringue et est utilisée pour injecter un produit dans la peau (du Methyl Nicotinate : ce produit induit une dilatation des vaisseaux sanguins que l'on peut ensuite détecter en mesurant les flux sanguins dans la peau) . Ce système permet d'injecter dans la peau $1\ \mu\text{l}$ de produit en trente secondes à une pression d'un demi bar environ. Cela représente une différence de plusieurs ordres de grandeur sur le débit par rapport à l'injection dans l'air, ce qui démontre bien que la résistance de la peau est le facteur limitant en terme de vitesse d'injection.

D'autre part, la peau n'est pas un matériau homogène, et toutes les aiguilles d'une matrice ne la perce pas de la même manière. De ce fait la résistance à l'injection n'est pas la même pour chaque aiguille. En particulier, la manière dont la peau est comprimée au niveau de chaque aiguille a une importance considérable sur le débit du liquide injecté au travers de cette aiguille [49]. Dans le cas d'une répartition non uniforme des résistances hydrodynamiques dans un circuit microfluidique, le produit injecté passe en majorité par les chemins présentant la résistance la plus faible. Ceci implique qu'il est impossible de garantir une injection de produit uniforme sur toute une matrice de microaiguilles avec un système à réservoir unique. Ainsi, pour obtenir un contrôle de la distribution d'un fluide au travers de l'ensemble des aiguilles, il faut assurer ce contrôle au niveau de chaque aiguille.

Contrôle des volumes manipulés

Il existe quelques méthodes qui permettent de contrôler les volumes injectés par des microsystèmes. Le plus simple est de jouer sur le volume d'un réservoir que l'on vide totalement. Ainsi, dans l'article [50], la quantité de produit injectée est déterminée par le volume interne des micropipettes. Cette méthode ne permet pas de faire varier les quantités injectées mais a l'avantage d'être très simple à mettre en place, et a donc été choisie pour la réalisation du système de distribution d'Angioskin.

Il est possible aussi de réaliser une seringue permettant d'injecter un volume variable en exploitant la dilatation thermique contrôlée d'un matériau spécifique. Le mercure par exemple a un coefficient de dilatation thermique important : si on augmente de 10° la température d'un millilitre de mercure, on augmente son volume de 17 microlitres. Ainsi, l'article [51] présente une seringue exploitant la dilatation du galinstan (un alliage métallique liquide à température ambiante). Contrairement au mercure, cet alliage n'est pas toxique et leur système permet d'injecter de manière contrôlée des volumes de l'ordre du femtolitre.

Le système d'injection d'Angioskin

Dans le cadre d'Angioskin, plusieurs fonctions doivent être assurées par le système d'injection. Tout d'abord le système doit assurer l'injection d'une quantité donnée de produit au travers d'une matrice de microaiguilles tout en garantissant l'uniformité de l'injection sur l'ensemble de la matrice. On doit ainsi pouvoir contrôler le volume injecté au travers de chaque aiguille. Enfin, l'ADN ne doit pas être dénaturé lors des manipulations du système.

Concrètement, l'objectif à atteindre par le prototype est d'injecter $10 \mu\text{l}$ d'une solution d'ADN au travers d'une matrice de cent microaiguilles réparties sur un centimètre carré. L'injection doit être uniforme sur la surface de la peau car le traitement génique ne peut être efficace que si des cellules sont transfectées sur toute la surface de peau malade ; et naturellement, l'ADN doit arriver intact à l'intérieur des cellules pour pouvoir s'exprimer.

Pour des raisons d'hygiène médicale, le système d'Angioskin est conçu pour être à usage unique. Après chaque utilisation, l'ensemble composé de la matrice de microaiguilles et du système d'injection doit être changé. D'un point de vue financier, le coût du produit manipulé est a priori plus élevé que celui du système d'injection. Aussi, même s'il est bon de garder à l'esprit les coûts de fabrication du système complet, on prêtera une attention particulière aux pertes de produit à l'intérieur de ce dernier. Le gaspillage de produit peut être réduit en limitant le nombre de manipulations que l'on fait avec et d'autre part, en veillant à ce qu'il n'y ait pas de pertes trop importantes de produit dans le système.

Pour assurer l'injection de la quantité de produit voulue, l'approche choisie est de vider complètement un réservoir d'un volume donné. D'autre part, pour assurer l'uniformité de l'injection, chaque aiguille a son propre réservoir. Cette approche, indispensable pour garantir une injection uniforme, pose problème vis à vis de la limitation des pertes de produit. En effet, les pertes sont fatalement plus élevées dans un réseau d'une centaine de chambres que dans un réservoir unique. Il faut de plus prévoir une méthode efficace pour remplir les cent réservoirs tout en limitant encore les pertes de produit.

Concevoir et fabriquer des solutions techniques à ces différentes exigences constituent la majeure partie de ce travail de thèse. Le système complet et sa réalisation sont décrits plus en détail dans le troisième chapitre. Avant de développer le détail de la conception de ce système, il est important de présenter les particularités des écoulements dans les microcanaux. Ceci fait l'objet du prochain chapitre où une attention particulière est portée à la circulation des molécules d'ADN.

Chapitre 2

La mécanique des fluides en milieu confiné

Ce travail de thèse est centré sur la réalisation d'un système microfluidique afin de permettre l'injection d'une solution d'ADN au travers d'une matrice de microaiguilles. On s'intéressera dans ce chapitre à la mécanique des fluides dans le cadre de ce type d'application ; c'est à dire à la mécanique des fluides dans les microsystèmes et plus particulièrement au cas des suspensions d'ADN. Dans ce contexte, la taille et les propriétés mécaniques des molécules transportées par le fluide a une grande influence sur le comportement de la solution.

2.1 Généralités

2.1.1 Rappels de mécanique des fluides

Les équations présentées dans cette partie correspondent à une description eulérienne des écoulements, comme on le fait généralement en mécanique des fluides. Dans une description eulérienne, on définit un écoulement par la vitesse du fluide en tout point du référentiel. Cette description s'oppose à la description lagrangienne qui consiste à suivre les particules dans leur mouvement et donc définit le mouvement des objets par leur position à tout instant. La description lagrangienne est mieux adaptée à la mécanique du solide.

Equation de conservation de la masse dans un écoulement

L'équation de conservation de la masse (appelée aussi équation de continuité) traduit le fait que si l'on considère un volume quelconque dans un écoulement, la masse de fluide entrant dans ce volume à chaque instant est égale à la masse sortant. De ce fait, la masse totale de ce volume ne varie pas. Cette équation peut s'écrire de deux manières différentes 2.1 et 2.2 :

$$\frac{\partial \rho}{\partial t} + \operatorname{div} \rho \vec{v} = 0 \quad (2.1)$$

$$\frac{d\rho}{dt} + \rho \operatorname{div} \vec{v} = 0 \quad (2.2)$$

Dans ces équations, ρ est la masse volumique du fluide et \vec{v} est la vitesse d'un élément de fluide. Pour un fluide incompressible, la masse volumique est constante ($d\rho/dt=0$). L'équation de conservation de la masse se réduit alors à 2.3 :

$$\operatorname{div} \vec{v} = 0 \quad (2.3)$$

Equation de la dynamique des fluides

Dans le cas général, un écoulement est décrit par l'équation bilan de la quantité de mouvement 2.4.

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho(\vec{v} \cdot \vec{\operatorname{grad}}) \vec{v} = \rho \cdot \vec{f} - \vec{\operatorname{grad}} p + \operatorname{div}(\sigma) \quad (2.4)$$

Dans cette équation, σ représente le tenseur des contraintes visqueuses. On peut décrire les différents termes de cette équation comme suit :

$\frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + (\vec{v} \cdot \vec{\operatorname{grad}}) \vec{v}$ représente la dérivée particulaire de la vitesse d'un élément de fluide. Le premier terme correspond à l'accélération de cet élément dans un repère Eulérien ; le second terme correspond à la variation de vitesse liée à l'exploration du champ de vitesse par la particule lors de son mouvement.

$\rho \cdot \vec{f}$ représente l'ensemble des forces de volume appliquées au fluide. Il s'agit généralement de la gravité, mais cela peut aussi comprendre des forces électrostatiques, par exemple.

$-\vec{\operatorname{grad}} p$ représente les forces de pression dans le fluide. Ces forces sont toujours présentes ; en particulier, ce sont celles qui conditionnent l'équilibre d'un fluide au repos.

$\operatorname{div}(\sigma)$ représente les forces de viscosité dues à la déformation des particules de fluide.

Equation de Navier-Stokes

Pour un fluide Newtonien (comme l'eau), le tenseur des contraintes est proportionnel au tenseur des taux de déformation. Si de plus, le fluide peut-être considéré comme incompressible, on peut alors réécrire l'équation de la dynamique des fluides en simplifiant le tenseur des contraintes visqueuses (équation 2.5). C'est l'équation de Navier-Stokes ; μ y représente la viscosité du fluide.

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} + \rho(\vec{v} \cdot \vec{\operatorname{grad}}) \vec{v} = \rho \cdot \vec{f} - \vec{\operatorname{grad}} p + \mu \Delta \vec{v} \quad (2.5)$$

Cette équation est à manipuler avec prudence lorsque l'on traite de fluides complexes. Pour une solution d'ADN par exemple, la viscosité ne reste pas constante dans l'espace ou au cours du temps. Cette équation n'est alors plus valable. On l'utilisera toutefois encore, localement, ou en première approximation.

Nombre de Reynolds

Le nombre de Reynolds (2.6) aide à caractériser un écoulement. Il représente le rapport entre les forces d'inertie ($(\vec{v} \cdot \vec{\text{grad}}) \vec{v}$) et les forces visqueuses ($\mu \Delta \vec{v}$) et permet en particulier de déterminer la nature du régime d'écoulement (turbulent ou laminaire, par exemple). A un faible nombre de Reynolds correspond un écoulement laminaire. Dans ce cas, les forces d'inerties peuvent être négligées devant les forces visqueuses. Au contraire, pour un nombre de Reynolds élevé, on pourra négliger les forces visqueuses dans l'équation de Navier-Stokes.

$$Re = \frac{\rho \cdot U \cdot L}{\mu} \quad (2.6)$$

Ce nombre est sans dimension. On le calcule à partir des données suivantes : ρ , la masse volumique du fluide, U , la vitesse caractéristique (ou moyenne) de l'écoulement, et L , une dimension caractéristique du problème (par exemple, le diamètre d'un tuyau ou la taille d'un obstacle).

2.1.2 Le mouillage

Le mouillage met en jeu des forces de surface. Comme on le verra plus loin (2.1.3), ces forces deviennent prépondérantes aux petites échelles. Ce sont donc des forces qu'il faut prendre en compte lorsque l'on s'intéresse au remplissage d'un système microfluidique.

Tension de surface

Au sein d'un fluide (liquide ou gaz), les molécules exercent entre elles des forces d'attraction ou de répulsion. Ce sont essentiellement les forces de Van der Waals (attraction) et les forces électrostatiques (attraction ou répulsion).

Si l'on considère un corps pur liquide, composé d'un seul type de molécules, les molécules s'attirent et constituent une phase. Au sein d'un liquide, chaque molécule est tirée dans toutes les directions par les molécules voisines et donc, la résultante des forces est nulle. Dans le vide, une molécule n'est, par contre attirée par rien. Donc, à la frontière liquide/vide, les molécules sont attirées côté liquide mais pas côté vide ; la résultante des forces s'exerçant sur les molécules de la surface est donc dirigée vers l'intérieur du liquide. Ceci tend la surface. Ainsi, en l'absence de toute autre force, une goutte de liquide dans le vide prendra une forme sphérique [52].

Lorsque deux liquides miscibles sont mis en contact, ils forment une phase unique, et il n'y a pas d'interface, ni de tension de surface. En revanche, s'ils ne sont pas miscibles, ils forment deux phases séparées. Dans ce cas, les molécules des deux fluides se repoussent à l'interface. Les molécules de chaque fluide sont donc soumises à une force répulsive venant de l'autre fluide et une force attractive vers l'intérieur de leur propre phase. Dans ce cas encore, la résultante des forces est dirigée vers l'intérieur de la phase à laquelle appartiennent les molécules.

On notera γ la tension de surface. Sa dimension est le J.m^{-2} ou le N.m^{-1} . Concrètement, γ correspond à l'énergie nécessaire à apporter pour augmenter la surface de la phase liquide d'une unité. Quelques valeurs :

- $\gamma_{\text{eau/air}} = 72 \text{ mJ.m}^{-2}$ à 25°C
- $\gamma_{\text{eau/air}} = 58 \text{ mJ.m}^{-2}$ à 100°C
- $\gamma_{\text{eau/huile}} \approx 50 \text{ mJ.m}^{-2}$

Ligne triple

La ligne triple est la ligne de contact entre trois phases différentes. On décrira le cas d'un contact solide/liquide/gaz, mais on pourrait aussi bien étudier trois liquides non miscibles, par exemple. On a au niveau de cette ligne de contact une relation entre les tensions de surface des trois interfaces et l'angle de mouillage (voir figure 2.1). C'est la relation d'Young.

$$\gamma_{\text{liquide/air}} \cdot \cos(\theta_E) = \gamma_{\text{solide/air}} - \gamma_{\text{solide/liquide}} \quad (2.7)$$

Pour une goutte d'eau posée sur une surface solide plane, l'angle de mouillage est l'angle formé par la tangente à la surface de l'eau et la surface solide. On définit le paramètre d'étalement S comme étant la différence entre l'énergie de surface du substrat sec et celle du substrat mouillé. Ce paramètre représente la force résistant à l'étalement d'une goutte liquide sur une surface solide.

$$S = \gamma_{\text{solide/air}} - (\gamma_{\text{solide/liquide}} + \gamma_{\text{liquide/air}}) \quad (2.8)$$

Si S est positif, cela signifie que le système abaissera son niveau d'énergie en se mouillant ; dans ce cas donc, le liquide s'étalera sur toute la surface pour minimiser l'énergie du système et on observera un mouillage total de la surface solide et un angle de contact nul. S négatif correspond au cas d'un mouillage partiel.

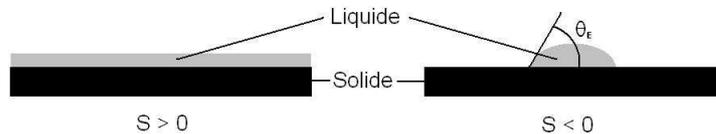


FIG. 2.1 – Mouillage total ($\theta_E = 0$) et mouillage partiel

Capillarité

On parle de capillarité lorsque dans un tube fin, les forces de surface entraînent la mise en mouvement d'un liquide. Dans un tube, un déplacement du fluide se traduit par un changement des interfaces solide/liquide et solide/air. En revanche, l'interface liquide/air reste constante : c'est la section du tube. Dès lors, pour qu'un liquide progresse dans un tube par capillarité, il suffit (en l'absence d'autre force) que la tension de surface des parois sèches ($\gamma_{solide/air}$) soit supérieure à celle des parois mouillées ($\gamma_{solide/liquide}$). On définit le paramètre d'imprégnation I :

$$I = \gamma_{solide/air} - \gamma_{solide/liquide} = \gamma_{liquide/air} \cdot \cos(\theta_E) \quad (2.9)$$

I représente la force d'avancement de la ligne triple par unité de longueur. Si on étudie l'équilibre hydrostatique d'une colonne de liquide dans un tube vertical, au repos les forces mises en jeu sont les effets de surface et la gravité. Cet équilibre est alors décrit par l'équation 2.10 :

$$2 \cdot \pi \cdot r \cdot I = \pi \cdot r^2 \cdot \rho \cdot g \cdot h \quad (2.10)$$

Ce qui donne la hauteur h atteinte par la colonne de liquide en fonction de la tension de surface ($\gamma_{liquide/air}$), l'angle de mouillage (θ_E), la densité du liquide (ρ), la gravité (g) et le rayon du tube (r). Cette loi régissant la montée capillaire est aussi appelée loi de Jurin (équation 2.11).

$$h = \frac{2 \cdot \gamma_{liquide/air} \cdot \cos(\theta_E)}{\rho \cdot g \cdot r} \quad (2.11)$$

Ce phénomène donne un aperçu très concret de l'importance relative des forces de surface (capillarité) et de volume (gravité) en fonction des dimensions d'un système. En effet, la hauteur atteinte par la colonne d'eau est inversement proportionnelle à la dimension caractéristique de notre canal : son rayon r .

2.1.3 Hydrodynamique à l'échelle micrométrique

L'importance relative des différentes forces mises en jeu varie en fonction des dimensions caractéristiques d'un système. Les forces de volume comme la gravité, sont proportionnelles à une longueur au cube tandis que les forces de surfaces, comme la capillarité, sont proportionnelles à une longueur au carré. On voit donc que le rapport de force volume/surface est proportionnel à la longueur caractéristique du système. En d'autres termes, lorsque cette longueur diminue, les forces de volume perdent de leur importance devant les forces de surfaces. De ce fait, on pourra souvent négliger les forces de volume devant les forces de surface dans les microsystèmes.

C'est ce que l'on observe en étudiant la montée capillaire : la hauteur atteinte par la colonne de liquide dépend d'une longueur caractéristique du système, le rayon du tube 2.11. De manière chiffrée, pour de l'eau avec un angle de mouillage

θ_E de 60° , on obtient une hauteur de 0,7 mm pour un rayon du tube d'un centimètre et une hauteur de 7 m pour un rayon d'un micromètre.

Les forces de surface prennent donc une importance considérable dans les microsystèmes. En particulier, le caractère hydrophile ou hydrophobe d'un matériau est un élément fondamental pour la réalisation d'un microsystème fluide. L'importance de ces propriétés de surface est présentée plus en détails dans le cas particulier de notre système (paragraphe 3.1.4).

D'autre part, le nombre de Reynolds est proportionnel lui aussi à la dimension caractéristique du système (voir 2.6). En microfluidique, on a donc toujours des nombres de Reynolds très faibles. Cela signifie que les écoulements sont toujours de type laminaire pour les liquides simples et donc que les termes non linéaires sont négligeables devant les termes de viscosité dans l'équation de Navier-Stokes. En tenant compte de ces effets, on peut simplifier cette équation pour les écoulements microfluidiques (2.12).

$$\rho \frac{\partial \vec{v}}{\partial t} = -\text{grad} p + \mu \Delta \vec{v} \quad (2.12)$$

Si cette particularité simplifie les calculs, l'absence d'instabilité pouvant conduire à des écoulements turbulents dans les systèmes microfluidiques rend plus difficiles certaines opérations qui profitaient des turbulences aux plus grandes échelles. Il est en particulier difficile de réaliser le mélange de deux composants dans un microsystème fluide en prenant partie des instabilités hydrodynamiques générées par un obstacle.

2.1.4 Calcul analytique des paramètres d'un écoulement microfluidique

Comme les écoulements sont laminaires en microfluidique, il est souvent possible d'avoir des formules analytiques simples décrivant les particularités d'un écoulement. L'exemple présenté ici permet d'introduire certaines de ces formules. On considère pour cela un écoulement dans un canal circulaire de rayon R et de longueur L . On se place en régime stationnaire.

Calcul de la vitesse

En régime stationnaire, l'équation 2.12 devient l'équation de Stokes :

$$\text{grad} p = \mu \Delta \vec{v} \quad (2.13)$$

Pour des raisons de symétrie, on se place ici en coordonnées cylindriques. Les équations 2.14 présentent alors l'expression du gradient de pression aux bornes du canal et du Laplacien de la vitesse dans ce système de coordonnées. On considère ici que le fluide ne se déplace que suivant l'axe Z (l'axe directeur du canal) et que l'écoulement est invariant le long de cet axe ainsi que par symétrie de révolution.

$$\begin{cases} \text{grad}p = \frac{\partial p}{\partial r} \vec{u}_r + \frac{\partial p}{\partial z} \vec{u}_z \\ \Delta \vec{v} = \frac{1}{r} \frac{\partial}{\partial r} \left(r \frac{\partial v}{\partial r} \right) \vec{u}_z \end{cases} \quad (2.14)$$

Les conditions aux limites 2.15 expriment le non glissement aux parois (la vitesse du fluide est donc nulle contre la paroi du canal) et l'impossibilité d'avoir une vitesse infinie au centre du canal. Cette seconde condition est introduite du fait de l'apparition d'un logarithme dans le calcul de la vitesse; une vitesse infinie ne présentant pas une solution réaliste, l'une des conditions limites doit l'annuler.

$$\begin{cases} v(R) = 0 \\ v(0) \neq \infty \end{cases} \quad (2.15)$$

L'intégration de l'équation 2.13 donne donc la vitesse du fluide v_z en tout point du canal. Numériquement, si on applique une différence de pression ΔP d'un Bar (100000 Pa) aux extrémités d'un canal de rayon 40 μ m et de longueur 10 cm remplis d'eau (viscosité $\mu = 10^{-3}$ Pl), on obtient alors une vitesse au centre du canal de 0,4 m.s⁻¹.

$$v_z(r) = \frac{\Delta P \cdot (r^2 - R^2)}{4 \cdot \mu \cdot L} \quad (2.16)$$

Débit

On obtient le débit Q (équation 2.17) par intégration de la vitesse sur la section du canal. En reprenant les conditions d'écoulement décrites au paragraphe précédent, on obtient un débit de 1.10^{-9} m³.s⁻¹ c'est à dire 1 μ l.s⁻¹. On remarque que, bien que les vitesses puissent être importantes dans les microcanaux, les volumes manipulés sont toujours très faibles.

$$Q = \int_0^{2\pi} \int_0^R v \cdot r \cdot dr \cdot d\theta = -\frac{\pi \cdot \Delta P \cdot R^4}{8 \cdot \mu \cdot L} \quad (2.17)$$

Le signe "-" dans cette équation signifie que l'écoulement est dirigé vers les pressions les plus faibles. On définit, par analogie à un circuit électrique, la résistance hydrodynamique (R_h) reliant le débit à la pression par la relation $\Delta P = R_h \cdot Q$. Cette résistance ne dépend que des dimensions et de la topologie du système et de la viscosité du liquide. Dans le cas de notre canal, elle vaut :

$$R_h = \frac{8 \cdot \mu \cdot L}{\pi \cdot R^4} \quad (2.18)$$

De manière analogue, pour un canal de section rectangulaire (hauteur b et de section S), on pourrait montrer que cette résistance vaut :

$$R_h = \frac{12 \cdot \mu \cdot L}{S \cdot b^2} \quad (2.19)$$

A la manière des résistances dans un circuit électrique, on peut jouer sur la résistance hydrodynamique d'un microcanal pour modifier la circulation des fluides dans un microsystème fluide. Nous avons exploité cette propriété dans la conception du système décrit au prochain chapitre (voir paragraphe 3.3.2).

Taux de cisaillement

Le taux de cisaillement τ représente la déformation d'un élément de fluide dans un écoulement. Le cisaillement du fluide peut engendrer d'importantes contraintes sur les grandes molécules s'y trouvant. On s'y intéressera particulièrement dans les cas de suspensions d'ADN. Ce taux est la dérivée spatiale de la vitesse (équation 2.20).

$$\tau = \frac{\partial v}{\partial r} = \frac{\Delta P \cdot r}{2 \cdot \mu \cdot L} \quad (2.20)$$

En moyenne, sur une section du canal, le taux de cisaillement $\langle \tau \rangle$ vaut :

$$\langle \tau \rangle = \frac{1}{\pi \cdot R^2} \cdot \int_0^{2\pi} \int_0^R \frac{\partial v}{\partial r} \cdot r \cdot dr \cdot d\theta = \frac{\Delta P \cdot R}{3 \cdot \mu \cdot L} \quad (2.21)$$

Numériquement, et toujours pour le canal décrit précédemment, cela donne $\langle \tau \rangle = 1,2 \cdot 10^4 \text{ s}^{-1}$. Il s'agit là d'un taux de cisaillement relativement important, qui engendre des contraintes sur les grandes molécules transportées par le fluide. Concrètement, dans ce canal, deux points espacés d'un micromètre peuvent avoir une différence de vitesse de $1,2 \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$.

2.2 L'ADN en microfluidique

2.2.1 La molécule d'ADN

Structure de l'ADN

La molécule d'ADN est un long polymère biologique. Elle est composée de bases azotées réparties le long d'une chaîne sucre-phosphate. Quatre bases azotées composent l'ADN : l'adénine (A), la thymine (T), la guanine (G) et la cytosine (C), elles sont complémentaires deux à deux (A-T et G-C) et hydrophobes. La chaîne sucre-phosphate est, elle, hydrophile. Généralement, l'ADN se présente sous la forme d'une double hélice composée de deux brins d'ADN complémentaires attachés par des liaisons hydrogènes entre les couples de bases azotées. Cette configuration minimise la surface de contact entre les bases azotées hydrophobes et l'eau et la molécule d'ADN est donc globalement hydrophile. Elle peut toutefois se présenter sous d'autres formes comme de simples brins ou des anneaux.

L'ADN est un poly-électrolyte. En solution, les groupements phosphates qui la composent s'hydratent et s'ionisent de telle sorte que l'ADN peut être alors considérée comme une longue chaîne de groupements négativement chargés,

c'est-à-dire comme un poly-électrolyte, ou comme un poly-anion. Pour des raisons d'électroneutralité, ces charges négatives sont en fait compensées en solution par des charges positives. Les propriétés mécaniques et topologiques de l'ADN dépendent donc de la teneur en ions de la solution dans laquelle elle se trouve.

Pour être fonctionnelle au niveau biologique, une molécule d'ADN ne doit pas présenter d'extrémité libre, c'est pourquoi les plasmides (tel que celui du projet Angioskin) sont des molécules d'ADN refermées sur elles mêmes. Les chromosomes ont des séquences terminales leur épargnant cette conformation, mais l'ADN des bactéries, plus simple, est lui aussi circulaire. Cette particularité biologique vient du fait qu'un brin d'ADN brisé accidentellement est automatiquement réparé dans la cellule. Or, une molécule d'ADN avec des extrémités libres ne diffère en rien d'une molécule brisée.

Les plasmides se présentent sous une forme super enroulée. C'est à dire que les deux brins le constituant sont accrochés l'un à l'autre en ayant été torsadés un grand nombre de fois, ce qui leur donne la forme d'une sorte de pelote d'ADN. Si l'un des brins vient à se briser en un point (cassure simple), les deux parties peuvent tourner librement l'une par rapport à l'autre et l'ADN peut se démêler. Il prend alors une forme circulaire. Si les deux brins se cassent en un point (cassure double), l'anneau est brisé et l'ADN prend alors une forme linéaire (voir figure 2.2).

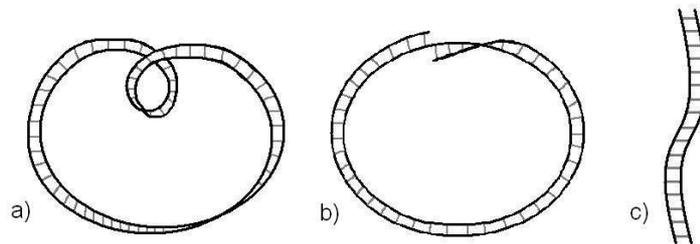


FIG. 2.2 – De gauche à droite : ADN super enroulé (une seule boucle représentée), ADN circulaire, et ADN linéaire

Les forces de cisaillement peuvent mener à la dégradation de l'ADN. R. Adam ([53]) a montré en 1977 que des taux de cisaillement de l'ordre de 2500 s^{-1} suffisaient à briser de longues molécules d'ADN ($1, 2 \cdot 10^8 \text{ Da}$). Or, les taux de cisaillement peuvent être significativement plus élevés dans les microcanaux : à débit donné et dans un canal de section circulaire, ces forces sont inversement proportionnelles au cube du rayon de section du canal (2.22). Plus récemment, une méthode pour casser des brins d'ADN en petits morceaux en utilisant les forces de cisaillement a été développée [54]. Pour cela, on force une

solution d'ADN à passer au travers d'un microcanal à un débit donné. Avec cette méthode, on peut casser l'ADN en petits morceaux dont la taille moyenne dépend du taux de cisaillement. Pour obtenir des morceaux d'une longueur moyenne de 5kb, il faut appliquer un débit de $4,5 \text{ ml.min}^{-1}$ environ au travers d'une section de $62 \mu\text{m}$; soit un taux de cisaillement de 2.10^6 s^{-1} environ.

$$\tau = \frac{8.Q}{3.\pi.R^3} \quad (2.22)$$

Il est donc important de s'assurer que les molécules d'ADN ne seront pas dégradées lors des manipulations dans notre système. Cette étude est présentée dans la partie 2.3.3.

Les marqueurs fluorescents

Il est possible de marquer les molécules d'ADN en les mettant en solution avec d'autres molécules, fluorescentes, ayant une affinité avec les molécules d'ADN. Cela permet de visualiser directement l'ADN. Par exemple, si on voit des cellules fluorescentes après avoir ajouté de l'iodure de propidium à une culture de cellule, cela signifie que les parois cellulaires étaient ouvertes et ont laissé passer le marqueur. Avec un objectif de très fort grossissement, on peut aussi visualiser les molécules individuellement (figure 2.3).

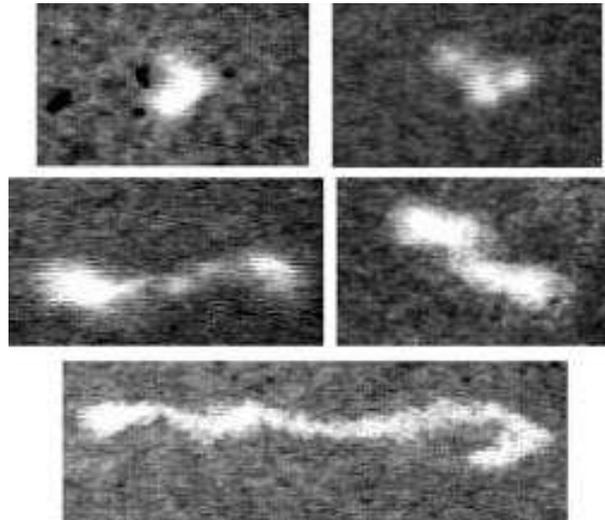


FIG. 2.3 – Molécules d'ADN marquées (marqueur YOYO-1, [55])

L'iodure de propidium s'intercale entre les paires de bases à raison d'une molécule d'iodure de propidium pour trois paires de base. En s'intercalant, le marqueur augmente toutefois les dimensions caractéristiques et donc les propriétés mécaniques de la molécule. De manière chiffrée, une molécule d'iodure

de propidium a un poids moléculaire de 415 Da tandis que trois paires de base d'ADN ont un poids de 1830 Da (environ); le marquage de l'ADN augmente donc la masse de la molécule de plus de 20%.

Du fait de la modification des molécules d'ADN induite par l'ajout d'un marqueur fluorescent, on doit faire preuve d'une certaine prudence quand à l'interprétation de résultats visuels sur des molécules d'ADN marquées. Il faut aussi veiller à utiliser le marqueur au moment où cela perturbe le moins l'expérience; ainsi, lors d'une électrophorèse sur gel d'Agarose, on n'ajoute le marqueur qu'après avoir fait migrer l'ADN. Ainsi, on ne modifie les propriétés de l'ADN qu'au moment de la visualisation des résultats, lorsque l'ADN est immobile.

2.2.2 Rhéologie de l'ADN

La rhéologie est l'étude de la déformation et de l'écoulement des corps sous l'effet de contraintes extérieures. On distingue les fluides newtoniens (eau, huile), pour lesquels le taux de cisaillement est proportionnel aux contraintes appliquées, et les fluides non newtoniens ayant un comportement plus complexe. Les fluides complexes peuvent avoir une viscosité qui évolue en fonction de la contrainte appliquée (voir figure 2.4). C'est le cas par exemple du ketchup qui est un fluide à seuil : en dessous d'une certaine contrainte, il ne se met pas en mouvement (et ne sort donc pas de la bouteille).

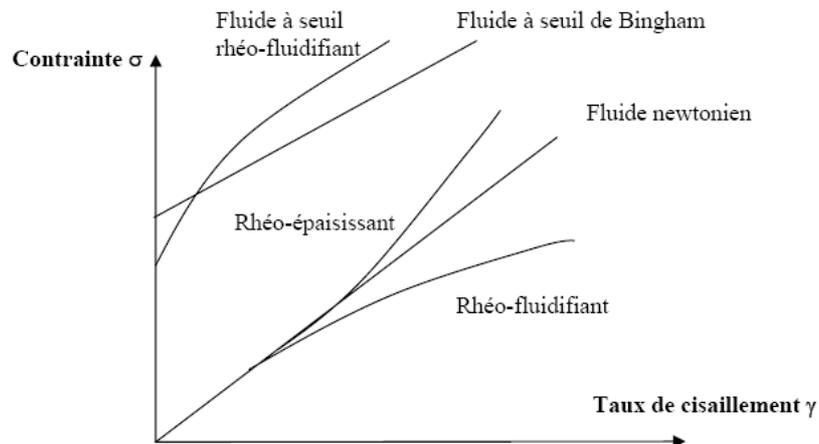


FIG. 2.4 – Relation entre taux de cisaillement et contrainte pour différents types de fluides

Les suspensions d'ADN sont connues pour avoir un comportement thixotrope et viscoélastique [56, 7]. La thixotropie correspond à une évolution de la viscosité en fonction du temps, tandis que la viscoélasticité est liée au rapport

entre le temps de réarrangement des molécules et le temps de cisaillement. Le comportement de ces solutions est donc très dépendant du temps d'application des contraintes. Leurs propriétés rhéologiques dépendent de plus d'un grand nombre de paramètres allant des dimensions et de la topologie de la molécule d'ADN étudiée aux propriétés chimiques (pH, salinité...) de la solution dans laquelle les molécules baignent.

Thixotropie

Un fluide thixotrope a une viscosité qui diminue avec le temps sous une contrainte constante. Ce comportement peut s'expliquer, dans le cas de l'ADN notamment, par un arrangement des molécules qui s'alignent par rapport à la contrainte. L'orientation des molécules dans le sens de l'écoulement facilite la circulation du fluide et donc diminue la viscosité de ce dernier.

On utilise le nombre de Déborah (De , équation 2.23) pour caractériser les fluides thixotropes. Le nombre de Deborah correspond au rapport entre le temps de relaxation caractérisant la fluidité intrinsèque d'un matériau τ (le temps de réorganisation des molécules après une sollicitation par exemple) et l'échelle de temps caractéristique d'une expérience testant la réponse de ce matériau T .

$$De = \frac{\tau}{T} \quad (2.23)$$

Le nombre de Déborah permet de caractériser la fluidité de l'objet que l'on observe. Plus ce nombre est petit, et plus l'objet semble fluide. Si on considère un glacier que l'on observe pendant une minute, il paraît solide; mais si on l'observe pendant mille ans (et que l'on multiplie ainsi son nombre de Déborah par $5 \cdot 10^8$), il coulera le long de la montagne. Dans le cas d'une solution d'ADN, les molécules tendent à s'aligner dans le sens de la contrainte, diminuant ainsi la viscosité de la solution [57]. Ainsi, plus la contrainte est longue et plus les molécules s'aligneront. On a donc pour un nombre de Déborah petit une solution qui tend à être plus fluide que pour un nombre de Déborah plus important pour lequel les molécules n'ont pas le temps de s'aligner.

Viscoélasticité

La viscoélasticité est un comportement mêlant l'élasticité (comportement de type solide) pour laquelle l'élongation est proportionnelle à la contrainte et la viscosité (comportement fluide) pour laquelle le taux de cisaillement augmente avec la contrainte (figure 2.4). Concrètement, pour des contraintes de courte durée, un fluide viscoélastique peut revenir vers sa forme initiale après déformation comme le ferait un solide élastique.

D'un point de vue global, un fluide viscoélastique aura un comportement de type élastique lorsque le temps d'application de la contrainte sera très court; par exemple, une goutte d'un tel type de fluide peut rebondir si on la laisse

tomber sur une surface. Pour une contrainte de plus longue durée, le comportement observé sera de type visqueux ; par exemple, cette même goutte posée sur la même surface s'étalera comme un fluide newtonien de même viscosité.

Dans le cas d'une suspension d'ADN, cette propriété s'explique par la nature des molécules d'ADN. Celles ci se comportent comme une multitude de petits ressorts qui s'étirent lorsque l'on applique une contrainte. Ces molécules se rétractent ensuite lorsque la contrainte n'est plus appliquée, entraînant un léger repli de la molécule et donc du liquide environnant.

Chimie du milieu

La conformation de la molécule d'ADN est influencée par les espèces chimiques présentes en solution. Ainsi, la présence et la quantité de certains ions vont modifier le comportement individuel des molécules d'ADN et, plus globalement, les propriétés rhéologiques de la suspension. Une étude menée en 1964 par R.L. Scruggs et P.D. Ross [58] a montré qu'en particulier, un taux de salinité croissant du milieu diminue la viscosité de la solution.

Dans le cadre du projet Angioskin, l'ADN sera a priori en suspension dans de l'eau distillée ; les faibles quantités injectées ne rendant pas indispensable l'emploi d'un liquide physiologique. Cependant les variations des propriétés rhéologiques liées à la chimie du milieu sont suffisamment faibles pour ne pas constituer un élément déterminant dans la conception du système d'injection.

2.2.3 Problèmes propres à l'ADN en microfluidique

La manipulation de molécules d'ADN dans des microcanaux présente quelques difficultés. On en relève essentiellement trois : l'adsorption des molécules sur les parois qui conduit à une perte de produit actif, leur agrégation à l'entrée des canaux pouvant former des bouchons et enfin, le cisaillement des molécules qui peut conduire à leur destruction.

Adsorption

L'adsorption est un phénomène faisant adhérer certaines molécules gazeuses ou liquides sur les surfaces solides par des interactions chimiques plus ou moins fortes. Ce phénomène peut être par exemple utilisé dans la réalisation de masques de protection pour piéger des molécules nocives. Dans les microsystèmes, l'importance relative gagnée par les parois vis à vis du volume tend à augmenter l'ampleur de ce phénomène. Il représente alors une perte de composant actif (les molécules d'ADN par exemple) lors de son transport. C'est donc un phénomène que l'on souhaite éviter ou au moins minimiser [59].

On distingue deux types d'adsorption : l'adsorption physique et l'adsorption chimique. L'adsorption physique, ou physisorption, met en jeu des liaisons faibles telles que les forces de Van der Waals. Elle est en général réversible et on peut la comparer au dépôt de buée sur une paroi froide. L'adsorption chimique s'accompagne d'une modification de la répartition des charges électroniques des molécules adsorbées, les forces mises en jeu sont du même type que celles qui sont impliquées dans la formation des liaisons chimiques. Elle est souvent irréversible et engendre le dépôt d'une couche monomoléculaire sur le solide.

L'adsorption physique ne constitue pas un problème pour les molécules d'ADN : du fait de leur grande taille, elles sont entraînées par le flot plutôt qu'accrochées aux parois par des liaisons faibles. En revanche, l'adsorption chimique peut poser problème. Comme on l'a vu au paragraphe 2.2.1, la structure de l'ADN est telle que seules ses parties hydrophiles sont présentées au milieu ambiant. Or, dans un circuit en PDMS, les parois sont hydrophobes et auront donc tendance à repousser les molécules hydrophiles. La nature du PDMS nous préserve donc du risque d'adsorption sur les parois.

Agrégation

Les molécules d'ADN sont des polymères pouvant atteindre de très grandes tailles. De ce fait, en microfluidique, leurs dimensions peuvent ne plus être négligeables devant celles des canaux dans lesquels elles circulent. On se retrouve alors avec une solution ayant une rhéologie particulièrement complexe, mais aussi avec un risque important d'apparition d'un phénomène d'agrégation qui conduit à l'obstruction d'une partie du système.

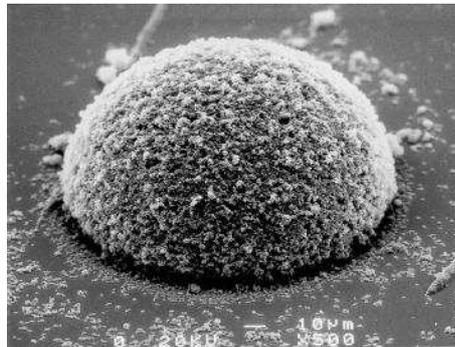


FIG. 2.5 – Bouchon formé à partir de billes de polystyrène de $1\mu\text{m}$ de diamètre à l'entrée d'un microcanal [60]

Dans son article [60], B. Stoeber étudie l'agrégation de billes de polystyrène au niveau d'un rétrécissement de la géométrie du circuit fluidique. Ces billes,

d'un diamètre inférieur au micromètre, se rassemblent et s'agrègent à l'entrée du rétrécissement entraînant ainsi la formation d'un bouchon qui empêche alors la bonne circulation des billes dans le circuit (figure 2.5). Comme les dimensions caractéristiques des objets présentés dans cet article sont comparables à celles que peuvent prendre une solution d'ADN dans un microsystème fluïdique, il est légitime de s'intéresser à ce phénomène d'agrégation.

Intégrité des molécules

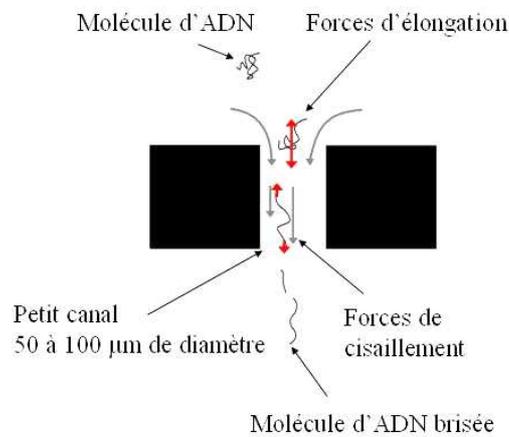


FIG. 2.6 – Forces hydrodynamiques lors du passage dans un microcanal

Dans les microsystèmes fluïdiques, les molécules d'ADN peuvent être soumises à des forces hydrodynamiques importantes. En particulier, les forces d'élongation et de cisaillement peuvent être assez fortes pour entraîner une rupture des molécules (figure 2.6). Ce phénomène, étudié de longue date [61], est aujourd'hui utilisé pour produire des fragments d'ADN de longueur aléatoire [54]. Dans ces travaux, Y. Thorstenson fait circuler une solution d'ADN dans un système comportant un canal d'un diamètre interne de $64\ \mu\text{m}$ sur quelques millimètres. Après plusieurs passages, on obtient une fragmentation de l'ensemble des molécules d'ADN en solution. Plus récemment, P.J. Shrewsbury a observé directement des molécules d'ADN par fluorescence dans un microcanal [55]. La diminution de la taille moyenne des molécules en sortie du système peut être ici due à un repli élastique des molécules sur elle-même ; mais la possibilité d'une rupture des brins d'ADN reste une hypothèse plausible.

Si une molécule d'ADN est brisée, elle perd sa fonctionnalité en cas de thérapie génique. Il est donc indispensable de s'assurer de l'intégrité des molécules d'ADN pour le système du projet Angioskin.

2.3 Expérimentations

Bien que la rhéologie des solutions d'ADN ait déjà été bien étudiée, des questions propres aux écoulements dans les microcanaux restent à élucider. En particulier, les phénomènes de bouchage ou de rupture dépendent énormément de la topologie et des dimensions de la molécule d'ADN utilisée. Or l'ADN plasmide utilisé pour Angioskin a une topologie particulière (de type super enroulé) et son coût prohibitif l'a dispensé de toute étude rhéologique exhaustive à ce jour. Il convient donc de s'assurer au moyen de quelques expériences qu'il n'y a pas de risque de perte d'ADN par bouchage ou dégradation dans le micro-système.

2.3.1 Agrégation des molécules d'ADN

Pour évaluer, dans le cas de l'ADN, les risques d'agrégation, des tests ont été réalisés avec plusieurs tailles de molécules d'ADN. La concentration massique en ADN était fixée à 1mg/ml pour les différentes solutions, la pression appliquée au système était de 15 kPa et l'étranglement consiste en un orifice de section carrée de $50\mu\text{m}$ de coté. On a pu observer pour le plus grand ADN (50 kpb) la formation systématique d'un bouchon en moins de 30s (figure 2.7, gauche). La visualisation par fluorescence (figure 2.7, droite) permet de s'assurer que le bouchon est bien formé d'ADN et non causé par une poussière comme cela arrive parfois. Pour les deux autres solution (300 et 2000pb) en revanche, aucune formation de bouchon n'a pu être observée, même en augmentant la pression appliquée jusqu'à un bar.

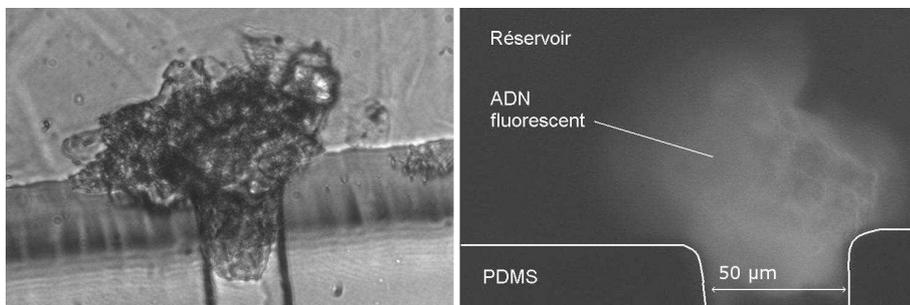


FIG. 2.7 – Agrégation de molécules d'ADN linéaire de 50kpb à l'entrée d'un canal d'une section de $50\times 50\mu\text{m}$ (à gauche, en lumière visible, à droite, en fluorescence)

Les rayons de giration théoriques des molécules étudiées dans ces expériences sont respectivement 35nm, 100nm, et 700nm pour les ADN à 300pb, 2000pb et 50kpb. En utilisant le même calcul, on trouve un rayon de giration de près de 200nm pour l'ADN plasmide d'Angioskin. On est donc plus proche des conditions expérimentales pour lesquelles le bouchon ne se forme pas. D'autre part, comme on peut le voir en particulier lors des tests d'électrophorèse (partie 2.3.3),

les ADN utilisés en thérapie génique sont circulaires et plus compacts que les polymères linéaires. On ne sera donc pas dérangé par ce phénomène pour la conception du système d'injection d'Angioskin.

2.3.2 PIV

La vélocimétrie par image de particules ou PIV (Particle Imaging Velocimetry) est une méthode permettant à l'aide d'une caméra de mesurer la vitesse d'un fluide en un point donné. On utilise pour cela des traceurs fluorescents, un microscope équipé pour la fluorescence, une caméra et un ordinateur.

Les expériences ont été menées dans l'équipe de P. Tabeling (UMR 7083, ESPCI, Paris). Pierre Joseph y a monté un poste d'expérimentation pour les mesures par PIV. On peut se référer à son travail [62] pour plus de détails concernant le fonctionnement de ce poste d'expérimentation.

Principe

Le fluide est ensemencé avec des billes fluorescentes de quelques centaines de nanomètres de diamètre dont on observe le déplacement avec un microscope à fluorescence et un fort grossissement (100 fois). Le grossissement de l'objectif permet de focaliser sur une petite région de l'écoulement et assure ainsi la localisation en altitude de la mesure de vitesse avec une précision de moins de 500 nm (l'épaisseur du plan focal). Une caméra enregistre les images de l'écoulement qui sont transmises à l'ordinateur. Un calcul de corrélation est alors effectué entre deux images successives. La position du maximum de corrélation donne le déplacement moyen des particules entre les deux images et permet donc de calculer la vitesse du fluide dans le secteur observé.

Pour la mesure d'un profil de vitesse dans un micro-canal, l'objectif du microscope est monté sur un élément piezoélectrique dont on contrôle le déplacement. On peut ainsi focaliser sur différentes tranches de liquide dans le canal par pas de cents nanomètres et mesurer leur vitesse successivement. La figure 2.8 présente un schéma du montage. La caméra et le piezo sont reliés à un ordinateur pour piloter le tout. Le logiciel utilisé dans le montage est LabView.

La précision et les limites de ce procédé sont liées à la qualité de la caméra et aux dimensions de la fenêtre d'observation. Il est en particulier important d'avoir une constante de temps entre deux images successive qui soit la plus stable possible et donc indépendante du pilotage par ordinateur. Pour ce montage, cette constante de temps correspond au temps d'entrelacement de la caméra. Une image est composée de deux trames : d'abord la caméra balaye les lignes de pixels impaires dans la fenêtre d'enregistrement (lignes 1, 3, 5...) puis les lignes de pixels paires. Il y a donc un décalage constant entre deux lignes consécutives ; ce décalage vaut $50 \mu\text{s}$ pour la caméra utilisée. En séparant une image en deux images contenant, l'une les lignes impaires et l'autre les lignes paires, on obtient

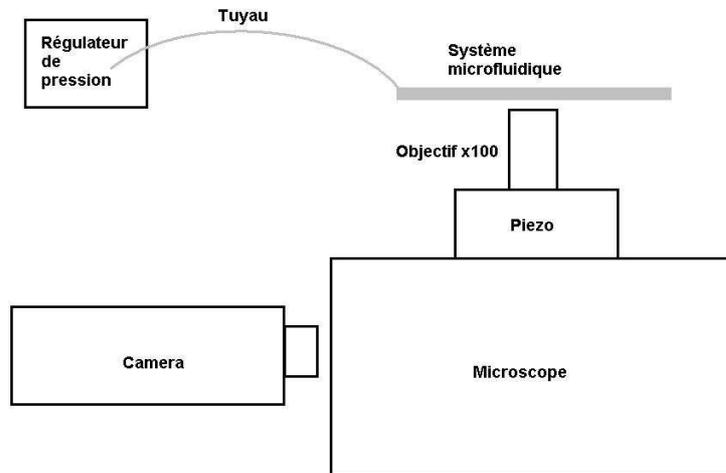


FIG. 2.8 – Schéma du montage de PIV (suivi de particules)

deux images séparée dans le temps de $50 \mu\text{s}$, à la précision de la caméra.

Il est impossible d'obtenir une constante de temps plus faible, et donc la vitesse maximum mesurable par ce procédé est directement limité par la taille de la fenêtre d'observation. Plus la fenêtre est grande, et plus on pourra mesurer des vitesses importantes. D'autre part, plus cette fenêtre est grande et plus le nombre de particules traitées est important, ce qui augmente le bruit. En effet, lorsqu'une molécule entre ou sort de la fenêtre entre deux images, cela introduit une erreur. Ce type d'erreur ne peut être éliminé qu'en limitant le nombre de particules traitées d'une part, et en faisant une étude sur un nombre important de mesures pour avoir des résultats statistiquement significatifs.

Mesures

Le circuit utilisé est un canal en serpentin d'une section rectangulaire de $25 \times 300 \mu\text{m}$ et d'une longueur de 15 cm. Il est moulé dans du PDMS et collé sur une fine lamelle de verre. On utilise un objectif à immersion d'un fort grossissement (100x) et son point de focalisation ne se trouve qu'à $100 \mu\text{m}$ de la lentille. Il faut donc une lamelle de verre de moins de $100 \mu\text{m}$ d'épaisseur.

Pour la réalisation d'un profil de vitesse, on mesure la vitesse trois fois à chaque altitude dans le canal, et on fait ensuite la moyenne des résultats significatifs. S'il n'y en a pas, le point de mesure est retiré. On fait donc 900 mesures de vitesse pour balayer un canal de $30 \mu\text{m}$ d'épaisseur avec un pas de 100 nm, et de ces cents mesures, on ne conserve au plus que 300 points. Une série de mesure correspond à la réalisation d'un profil de vitesse au moins trois fois, sur

une fenêtre donnée en entrée puis en sortie du canal.

Les paramètres étudiés sont la longueur des brins d'ADN (on disposait pour cela d'ADN linéaire à 0.3kpb, 2kpb et 50kpb), la concentration massique d'ADN, et la vitesse de la solution.

Pour des raisons de coûts, les mesures ne portent que sur de l'ADN linéaire. En effet, le prix de l'ADN plasmide circulaire dans le commerce est jusqu'à plusieurs millions de fois plus élevé pour une quantité identique. Il ne faudra pas perdre de vue que le comportement rhéologique de cet ADN est sensiblement différent de celui de l'ADN linéaire. Toutefois, dans un processus de rupture, l'ADN circulaire passera par l'étape de linéarisation avant de se fragmenter. On peut donc considérer que cette étude se situe dans ce cas intermédiaire.

Les séries de mesures ont porté sur des concentrations massiques d'ADN à 1 mg.ml^{-1} et $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$. On s'est surtout intéressé à la concentration prévue du plasmide d'Angioskin, et on a étudié aussi une concentration plus faible pour faciliter la circulation de l'ADN plus visqueux (celui à 50kpb).

Pour finir, la vitesse de la solution dans le canal est contrôlée par l'application d'une pression à l'entrée du système. Comme les vitesses nous intéressant étaient les plus élevées possible, on a été limité par la capacité de mesure du système. La vitesse maximale mesurable du fluide est de $1,5 \text{ mm.s}^{-1}$.

La taille des brins d'ADN s'est avérée être le facteur le plus influent sur la viscosité de la solution. La solution d'ADN à 0.3 kpb se comporte à peu près comme de l'eau : comportement Newtonien et viscosité proche de 10^{-3} Pl . Dans ce cas, il semble que les brins d'ADN soient trop courts pour interagir entre eux et influencer le comportement global du fluide.

A l'autre extrême, la solution d'ADN à 50 kpb est trop visqueuse. Même à concentration massique plus faible et avec des pressions beaucoup plus élevées (1.5 Bar), l'écoulement de cette solution dans un microcanal est particulièrement difficile. L'ADN se déplace en pâtés compacts, et reste bloqué par endroits dans le système. Du liquide circule plus rapidement autour des amas d'ADN entraînant une partie des marqueurs fluorescents. Sur une même image, on observe donc l'écoulement de deux entités distinctes : le déplacement lent, parfois par saut, des amas d'ADN et l'écoulement rapide de solution sans ADN zigzagant rapidement entre les pâtés d'ADN. Ce type d'écoulement est impossible à aborder par PIV et aucun profil de vitesse n'a pu être établi.

Enfin, l'ADN à 2 kpb s'est, lui, bien prêté aux expériences. Les figures 2.9, 2.10 et 2.11 présentent les profils de vitesse de cet ADN à des concentrations et pressions différentes. Sur ces figures, les points correspondent aux valeurs mesurées et les courbes correspondent à un ajustement parabolique des points de mesure.

Ajustement

Pour un fluide Newtonien dans ces conditions expérimentales, le profil de vitesse est parabolique et on dispose d'une relation simple entre le profil de vitesse et les propriétés du fluide (équation 2.24).

$$v(z) = \frac{\Delta P}{2.L.\mu} \left(z^2 - \frac{e^2}{4} \right) \quad (2.24)$$

Connaissant les dimensions du canal et les contraintes appliquées au fluide, on peut donc à partir de la courbe du profil de vitesse remonter aux propriétés du fluide. Pour cela, on ajuste une courbe parabolique (d'équation $y = A.x^2 + B$) aux points de mesure à l'aide du logiciel Matlab. En comparant la courbe d'ajustement avec une courbe théorique, on peut écrire :

$$A = \frac{\Delta P}{2.L.\mu} \text{ et } B = \frac{\Delta P.e^2}{8.L.\mu} \quad (2.25)$$

Ce qui permet de déduire localement la viscosité du fluide au niveau de la mesure du profil de vitesse (équation 2.26). On peut ainsi comparer la viscosité à l'entrée et à la sortie du circuit.

$$\mu = \frac{\Delta P}{2.L.A} \quad (2.26)$$

L'utilisation d'une courbe d'ajustement permet aussi de comparer le profil de vitesse à celui que l'on attendrait pour un fluide Newtonien.

Résultats

La première chose que l'on constate sur ces courbes est que l'ADN se déplace plus rapidement en fin de canal (courbes rouges) qu'à l'entrée (courbes bleues). On observe cette accélération de l'ADN pour toutes les expériences à l'exception de celles impliquant de l'ADN à 0,3 kpb.

On observe aussi que le canal n'a pas la même épaisseur en début et en fin de circuit. On le vérifie en mesurant la distance entre les deux points de vitesse nulle sur la courbe d'ajustement. Sur la figure 2.9 par exemple, le canal fait 30 μm d'épaisseur à l'entrée et 25 μm d'épaisseur en sortie. Cette déformation est due à une déformation différente du PDMS composant le circuit ; probablement due à la différence de pression entre l'entrée (pression proche de la pression appliquée, donc une déformation importante du canal) et la sortie (pression proche de la pression atmosphérique, donc déformation nulle ou très faible).

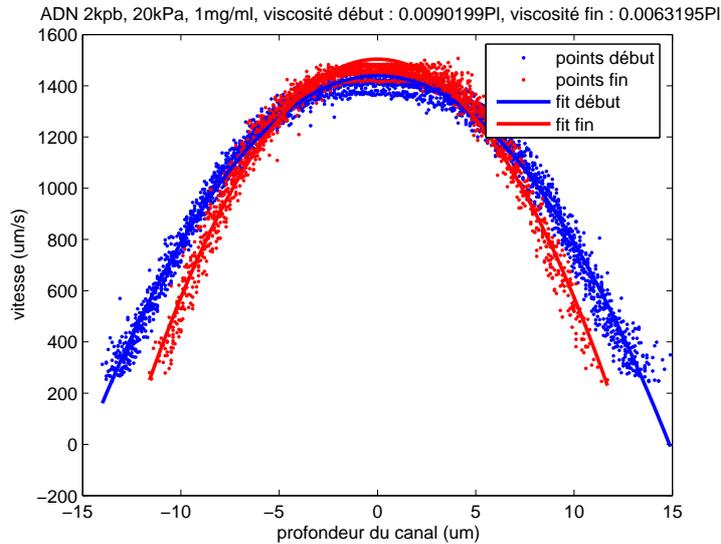


FIG. 2.9 – Profils de vitesse en entrée et en fin de canal pour une solution d’ADN de 2 kbp, à une concentration de 1 mg.ml^{-1} et une pression appliquée de 20 kPa

Discussion

La viscosité d’un fluide est un paramètre qui dépend fortement de la température. Or, les mesures sont longues, et la température ambiante de la salle où se déroule l’expérience n’est pas constante. Il semblerait aussi que, plus que l’évolution de la température ambiante, l’éclairage pour la fluorescence entraîne un échauffement léger du circuit. Ces facteurs pourraient être à l’origine de la dérive de viscosité entre deux séries de mesure portant sur la même expérience. Naturellement, le nécessaire a été fait pour limiter au maximum l’échauffement du circuit, une légère dérive demeurant toutefois inévitable du fait de la nécessité de l’éclairage.

L’approximation de l’écoulement à un fluide Newtonien est naturellement discutable lorsque l’on fait le calcul de la viscosité localement. En effet, on vérifie bien en faisant ces mesures que la suspension d’ADN n’a pas un comportement Newtonien. En particulier, sur les profils de vitesse, on observe un écart pour les grandes vitesses entre les points de mesure et la courbe d’ajustement qui représente un profil parabolique caractéristique d’un écoulement de fluide Newtonien.

L’interprétation de ces résultats ne permet pas de conclure quant à une éventuelle dégradation des molécules d’ADN soumises à un cisaillement. En effet, la différence de profil de vitesse entre l’entrée et la sortie du microcanal

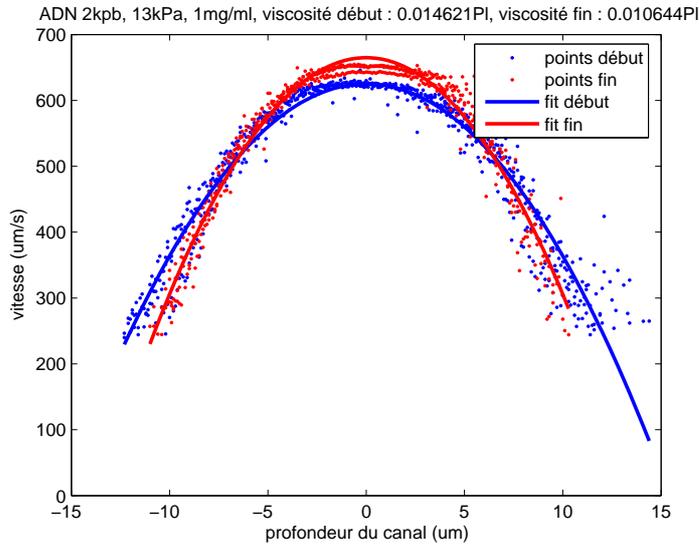


FIG. 2.10 – Profils de vitesse en entrée et en fin de canal pour une solution d’ADN de 2 kbp, à une concentration de 1 mg.ml^{-1} et une pression appliquée de 13 kPa

ne résulte probablement que de la thixotropie de la solution d’ADN. Les brins d’ADN s’alignent le long des lignes de courant sans nécessairement subir de dégradation de leur structure. Il est même vraisemblable que cet alignement soit progressif et débute dans le tuyau précédant l’entrée du canal ce qui pourrait expliquer la différence de viscosité observée dès l’entrée pour les différentes pressions étudiées.

Cette absence de conclusion nous a donc mené à employer une autre méthode de caractérisation pour nous assurer de l’intégrité des molécules d’ADN après passage dans un microcanal.

2.3.3 Test de solidité de l’ADN

Le passage dans un microcanal engendre de fortes contraintes sur les grandes molécules. En effet, les forts taux de cisaillement, mais aussi les forces d’élongation à l’entrée du canal tendent à étirer les molécules au point de risquer de les briser (figure 2.6). L’électrophorèse sur gel d’agarose est une méthode permettant de distinguer des séquences d’ADN en fonction de leur taille. L’objectif est ici de voir si l’ADN peut se briser à cause des fortes contraintes de cisaillement dans un micro canal. En effet, s’il se brise, on peut alors distinguer la trace des petits fragments d’ADN lors de l’électrophorèse.

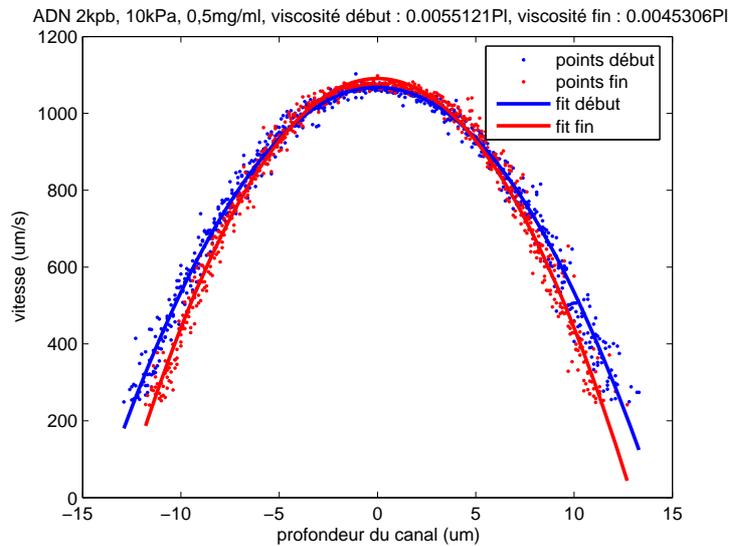


FIG. 2.11 – Profils de vitesse en entrée et en fin de canal pour une solution d'ADN de 2 kbp, à une concentration de $0,5 \text{ mg.ml}^{-1}$ et une pression appliquée de 10 kPa

Principe

Pour déterminer si les brins d'ADN se brisent lors d'un passage dans un micro canal, on en fait l'essai. On fait donc passer notre ADN dans un canal de section 60×60 micromètres carrés puis on réalise l'électrophorèse de l'échantillon.

L'électrophorèse sur gel d'agarose consiste à placer des échantillons d'ADN dans un gel et à les faire migrer par électrophorèse. L'ADN est chargé négativement ; en présence d'un champ électrique, il se déplace donc vers l'électrode positive. La vitesse de migration des séquences d'ADN dans le gel dépend de leur longueur et de leur topologie. En la comparant à un témoin connu, on peut donc caractériser une solution d'ADN.

Dispositif et protocole

Les tests ont été réalisés avec un ADN plasmide long de 7164 paires de bases, le pCMV beta. La concentration et la topologie étudiées en priorité sont celles envisagées dans le projet Angioskin, c'est à dire 1 mg/ml . Les échantillons traités pour chaque test ont un volume de $5 \mu\text{l}$. Les expériences ont été conduites dans l'équipe de L. Mir (IGR, UMR 8121, Villejuif)

Pour réaliser les échantillons, on fait passer des solutions d'ADN dans un micro canal. On applique pour cela une pression au moyen d'une seringue. En

	Concentration	Longueur du canal	Nombre de passages	Linéarisé
A	1mg/ml	10 mm	1	non
B	1mg/ml	4 mm	1	non
C	0,5mg/ml	10 mm	1	non
D	1mg/ml	10 mm	10	non
E	0,25mg/ml	10 mm	1	non
T	Témoin			

FIG. 2.12 – Expériences réalisées pour le premier gel

tirant le piston, on multiplie par quatre le volume de l'air à la sortie du canal et on divise donc la pression par quatre. Ce procédé permet d'obtenir de manière très simple une différence de pression de trois quarts d'atmosphère entre l'entrée et la sortie du canal.

Deux longueurs de canal ont été utilisées (4 et 10 mm) et plusieurs concentrations d'ADN (1mg/ml, 0,5mg/ml et 0,25mg/ml). On a aussi étudié l'importance du nombre de passages dans le micro canal (un ou dix passages).

Le dispositif pour l'électrophorèse est constitué d'un gel à 0.7% d'agarose dans un tampon de TAE (Tris Acetate d'EDTA) placé dans un bain de TAE. Les échantillons d'ADN sont de concentration variable et on a placé 5 μ L de solution pour chaque test dans le gel. Enfin, on applique un courant de 100 mA pendant 1h30 pour faire migrer l'ADN. La révélation se fait avec du BET (Bromure d'ethidium) qui est un marqueur fluorescent de l'ADN.

Pour une partie des échantillons, l'ADN a été "linéarisé". Une enzyme (EcoR1) a été utilisée pour couper la boucle d'ADN en un point et donc rendre la molécule linéaire. La digestion par cette enzyme (1h à 37° C) coupe le brin d'ADN en tout point où se trouve une certaine séquence de bases (appelés sites de coupures). EcoR1 n'a qu'un site de coupure sur l'ADN étudié; si elle en avait plusieurs, l'ADN serait découpé en plusieurs morceaux.

Les expériences menées sont présentées dans les tableaux 2.12 et 2.13. Chaque expérience a été réalisé deux ou trois fois et est référencée par une lettre.

Résultats

La figure 2.14 présente le résultat de la première électrophorèse dont les expériences sont listées dans le tableau 2.12. On constate avant tout que la plupart des expériences menées sont identiques à l'expérience témoin. Donc pour toutes ces expériences, l'ADN est de la même taille que l'ADN qui n'a pas été soumis au passage dans le microcanal. Cela signifie que les brins d'ADN ne sont pas cassés, ou seulement en quantité trop faible pour être observée.

	Concentration	Longueur du canal	Nombre de passages	Linéarisé
A	1mg/ml	10 mm	10	non
B	1mg/ml	10 mm	10	oui
C	1mg/ml	10 mm	1	non
D	1mg/ml	10 mm	1	oui
T	Témoin			oui
T	Témoin			non

FIG. 2.13 – Expériences réalisées pour le second gel

On peut observer dans ce test la présence de trois bandes dans chaque traînée. Ces bandes correspondent à trois conformations de l'ADN plasmide : linéaire, circulaire et super enroulé (figure 2.2). Ces trois bandes apparaissent toujours lorsque l'on procède à l'électrophorèse d'un ADN plasmide. Les formes circulaires et linéaires sont dues à des dégradations élémentaires causées par la manipulation de l'échantillon. Sur le gel, la forme progressant le plus vite est la forme super enroulée, suivie par l'ADN linéaire puis l'ADN circulaire. On vérifie que la marque la plus avancée est bien la plus intense ce qui montre que l'essentiel de l'ADN n'est pas dégradé.

Enfin, pour certains tests, on peut observer une trace au delà de la bande de l'ADN super enroulé. Ces traces sont difficiles à distinguer sur les photos, on devine toutefois sur la figure 2.14 celle du test "D" à l'extrémité droite de la première rangée. En fait, elles apparaissent avec plus ou moins d'intensité pour les trois tests "D", ainsi que pour l'un des tests "E". Ces traces correspondent à de l'ADN qui a migré plus vite que le plasmide super enroulé. Il s'agit donc de fragments plus petits et donc de brins d'ADN brisés. Les tests "D" correspondent à des expériences où la solution d'ADN a effectué dix passages au travers du micro canal. Il s'agissait en les réalisant d'amplifier l'éventuel phénomène de rupture de brins d'ADN pour mieux le visualiser. Et de fait, c'est sur ces seuls tests que l'on peut observer des traces de rupture. La trace observée sur le test "E" n'étant pas répétée sur les deux autres tests de la série, elle n'est pas significative. Ce n'est probablement qu'un artefact dû à une mauvaise manipulation.

Sur le second gel (figure 2.15), on a diminué la quantité d'ADN déposée pour tenter de limiter les traînées que l'on observait sur le gel précédent. On a aussi voulu vérifier qu'il n'y avait pas de fragments d'ADN brisés dans ces traînées. Pour cela, on a linéarisé par digestion enzymatique une partie de l'ADN afin de ne plus observer qu'une seule bande frontale (celle de l'ADN linéaire) moins avancée que la bande de l'ADN super enroulé. Ces conditions expérimentales sont décrites dans les tableaux 2.13.

On constate sur ce gel que la bande de l'ADN linéaire est pratiquement in-

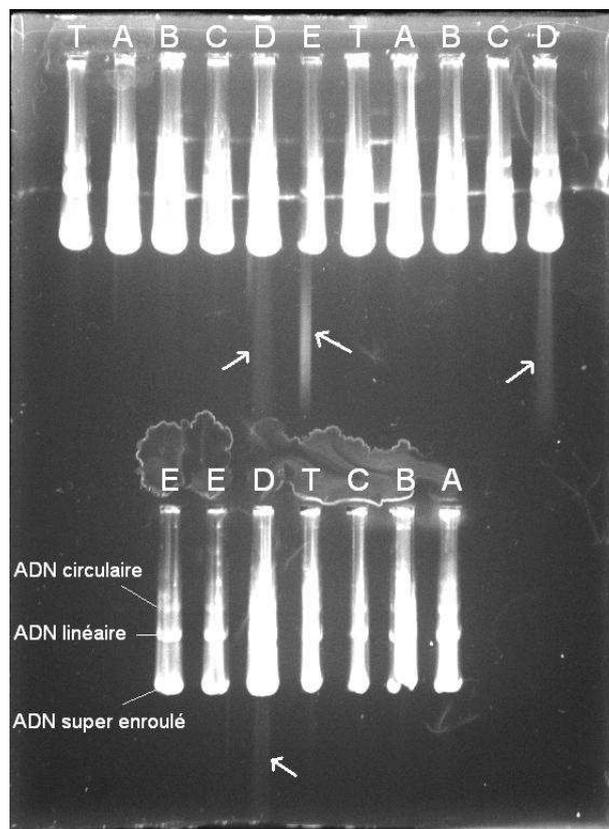


FIG. 2.14 – Résultat de la première électrophorèse

existante sur les tests n'ayant pas été digérés par l'enzyme. Cela signifie que la forme de l'ADN linéaire est plus rare que les deux autres et qu'elle le reste même après dix passages dans un micro canal. Comme cette forme est due à une dégradation élémentaire de l'ADN plasmide, on peut en conclure que l'ADN est très peu dégradé.

On observe pour trois des six tests de la série où l'ADN a été linéarisé que la digestion est incomplète. On peut donc encore voir des bandes correspondant à l'ADN circulaire et super enroulé. En revanche, on n'observe nulle part de trace de fragment d'ADN plus petits comme c'était le cas avec le premier test. La quantité d'ADN utilisée est sans doute trop faible pour faire apparaître ces effets déjà faibles lors du test précédent.

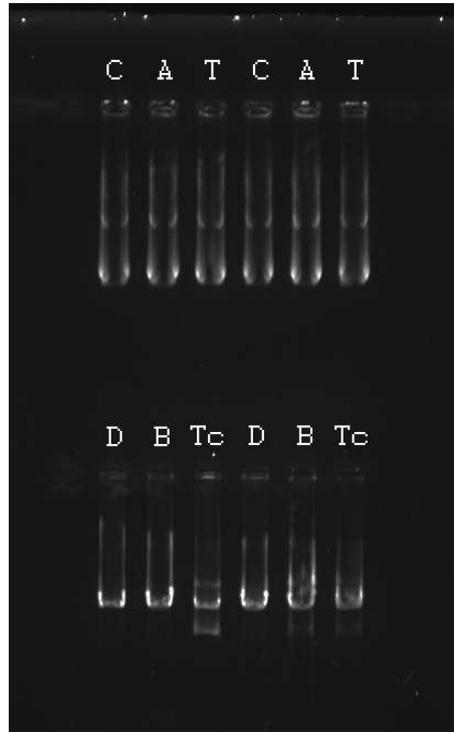


FIG. 2.15 – Résultat de la deuxième électrophorèse

Discussion

Ces tests d'électrophorèse permettent de conclure de manière fiable que les molécules d'ADN ne sont pas dégradées de manière significative au cours de ces expériences. La pression utilisée lors de ces tests correspond à la plus importante pression appliquée pour l'injection au travers des microaiguilles. La manipulation de l'ADN dans notre système ne devrait donc pas le dégrader. Cette expérience permet d'autre part d'évaluer la viscosité de l'ADN plasmide en solution.

La pression est appliquée au moyen d'une simple seringue. On crée donc une différence de volume d'air en sortie qui engendre une dépression. En négligeant les $5 \mu\text{l}$ de liquide qui entrent dans le système pendant la mise en pression devant l'imprécision de $0,1 \text{ ml}$ induite par la manipulation manuelle de la seringue, on a un système fermé et on peut invoquer la loi des gaz parfaits (2.27) pour calculer la différence de pression.

$$P_1 \cdot V_1 = n \cdot R \cdot T = P_2 \cdot V_2 \quad (2.27)$$

Dans cette équation, P_1 est la pression atmosphérique et V_1 le volume initial

de la seringue ; P_2 est la pression après l'actionnement du piston et V_2 est le volume intérieur maximum de la seringue. Enfin, n est la quantité d'air dans la seringue, R est la constante des gaz parfaits et T est la température. Dans le cadre de l'expérience, P_1 , V_2 , n , R et T sont des constantes. On calcule donc aisément P_2 en fonction de V_1 .

Comme il faisait beau à l'IGR ce jour là, la pression atmosphérique (P_1) était relativement élevée (1024 hPa d'après météoFrance). Pour les tests, on a choisit de multiplier par quatre le volume d'air dans la seringue. La seringue utilisée avait un volume en butée de 8,75 ml. L'erreur de 0,1 ml sur la manipulation de la seringue correspond donc à une erreur en pression de 1,2 kPa (équation 2.28). La pression sous la seringue était d'un quart d'atmosphère soit 25,6 kPa et donc la différence de pression ΔP entre l'entrée et la sortie du canal était de $76,8 \pm 1,2$ kPa.

$$dP_2 = \frac{dV_2}{V_1} \cdot P_1 \quad (2.28)$$

On a mesuré le temps de passage de l'ADN dans le micro canal de 10 mm. Pour l'ADN à 1 mg/ml, il fallait en moyenne 3,5 s pour que 5 μ l de solution traverse le canal ; pour l'ADN à 0,25 mg/ml, il fallait 2,2 s pour 5 μ l. Ces mesures nous permettent d'avoir une estimation de la viscosité de la solution dans le canal.

On fait l'hypothèse que l'écoulement est similaire pour un canal de section carrée et un canal circulaire de même surface de section. On peut donc à partir de l'équation 2.17 calculer la viscosité en fonction du débit, de la pression et des données géométriques du système (équation 2.29).

$$\mu = \frac{\pi \cdot \Delta P \cdot R^4}{8 \cdot Q \cdot L} \quad (2.29)$$

On obtient $\mu = 3,2 \cdot 10^{-3}$ Pl pour l'ADN à 1 mg/ml et $\mu = 1,9 \cdot 10^{-3}$ Pl pour l'ADN à 0,25 mg/ml. Ces viscosités sont inférieures à celles mesurées pour un ADN linéaire pourtant plus court (l'étude par PIV a montré que la viscosité de l'ADN à 2 kpb est de l'ordre de 10^{-2} Pl). Cette différence est due à la topologie de l'ADN plasmide : étant super enroulé, il se présente comme des particules bien plus petites qu'un ADN linéaire déroulé. On observe bien cette différence de viscosité lors des tests d'électrophorèse : l'ADN superenroulé, moins visqueux, migre plus loin que le même ADN linéarisé.

Conclusion

Après un passage dans le micro canal, l'ADN ne présente pas de signe de rupture. Si les manipulations sont répétées, dans le cas de dix passages consécutif en particulier, on peut observer des traces indiquant une rupture de brins d'ADN,

mais le phénomène n'est que de très faible amplitude. Le passage dans des micros canaux et dans les conditions expérimentales étudiées ne menace donc pas de manière significative l'intégrité de l'ADN. On ne devrait donc rencontrer aucun problème de ce type dans le cadre du projet Angioskin. Ceci nous permet de procéder à la conception du système d'injection, présentée dans le prochain chapitre.

Chapitre 3

Conception et dimensionnement du système

Le système développé pour le projet Angioskin doit permettre de transférer les cellules de l'épiderme. Pour cela, l'ADN injecté a deux importantes barrières à franchir : le stratum corneum, car les cellules à traiter se situent en dessous, et la membrane cellulaire car les gènes doivent être insérés à l'intérieur des cellules. L'idée du projet pour réaliser ces fonctions est d'employer des microaiguilles pour percer la peau, et l'électroporation pour ouvrir les membranes cellulaires. Les aiguilles du système servent donc d'électrodes en plus d'amener le produit sous la peau. La figure 3.1 présente un schéma de principe de cette solution. Le système complet du projet comporte donc une partie mécanique (aiguilles), une partie fluïdique (manipulation des médicaments) et une partie électrique (électroporation). On décrit dans ce chapitre la partie fluïdique du système.

3.1 Définition du système

3.1.1 Cahier des charges

L'objectif de la partie fluïdique du projet est de faire passer au travers d'une matrice d'aiguille percée une quantité donnée de produit.

Manipulation d'ADN

Le produit en question est une solution d'ADN plasmide développé lui aussi dans le cadre du projet afin de permettre le traitement génique de maladies de peau en insérant dans les cellules un gène codant pour la production d'une molécule aux propriétés antiangiogéniques. Les molécules d'ADN sont de grande taille et fragiles. Elles sont donc très sensibles aux forces hydrodynamiques qui

risquent de les fragmenter. Pour que le traitement soit possible, les molécules doivent rester fonctionnelles, donc ne doivent pas être dégradées par leur manipulation dans le système. Nous avons vérifié dans le chapitre précédent (partie 2.3.3) que les molécules d'ADN utilisées dans le cadre du projet n'étaient pas dégradées dans notre système.

Maitrise de la quantité injectée

La quantité de produit injectée doit pouvoir être contrôlée afin de maîtriser le traitement. Comme pour tout traitement médical, le dosage du produit est important. Ici, on souhaite surtout n'utiliser que la quantité nécessaire au traitement et éviter ainsi un surdosage qui constituerait un gaspillage de la solution d'ADN.

Injection homogène

On souhaite réaliser un traitement de la peau en surface. Par conséquent, on veut répartir l'injection de la solution d'ADN de la manière la plus uniforme possible. Concrètement, on prévoit de réaliser un prototype permettant d'injecter de 10 à 20 μl de produit au travers d'une matrice de cent aiguilles également réparties sur 1 cm^2 . On doit donc réaliser un système capable d'éjecter de 100 à 200 nl de produit au travers de chaque aiguille et ce, malgré la non homogénéité de la peau qui induit une résistance à l'injection différente en sortie des différentes aiguilles.

Minimisation des pertes

Les solutions d'ADN plasmide sont très coûteuses à produire. On souhaite donc limiter au maximum les pertes de produit à l'intérieur du système. C'est d'ailleurs ce qui a motivé le choix de microaiguilles pour faire pénétrer l'ADN sous la peau puisque tout ce qui passe au travers des aiguilles est inséré sous la peau. La manipulation du produit dans un système fluide implique nécessairement des pertes. Toutefois, la minimisation de ces pertes est une contrainte omniprésente dans la conception du système.

Intégration du système

Enfin, il reste à prendre en compte les contraintes liées à l'intégration du système et de ses différentes parties. En particulier, la partie fluide n'existe que pour être adaptée aux aiguilles et doit donc être dimensionnée en conséquence et ne pas nuire au bon fonctionnement des autres parties. D'autre part, il faut aussi prévoir de l'espace pour réaliser la connexion électrique du réseau d'électrodes qui se fait sur la même face que le circuit microfluidique.

3.1.2 Principe du système

Dans cette partie nous présentons les caractéristiques générales du système. Une modélisation mécanique est proposée dans la partie 3.2, et les détails des différents éléments font l'objet de la partie 3.3.

Le système complet d'Angioskin

Comme cela l'a été évoqué précédemment, il y a dans le projet Angioskin deux barrières à franchir. La première, macroscopique, est l'épiderme qui protège l'intérieur du corps contre toute agression extérieure ; et la seconde est la membrane des cellules que l'on doit transférer.

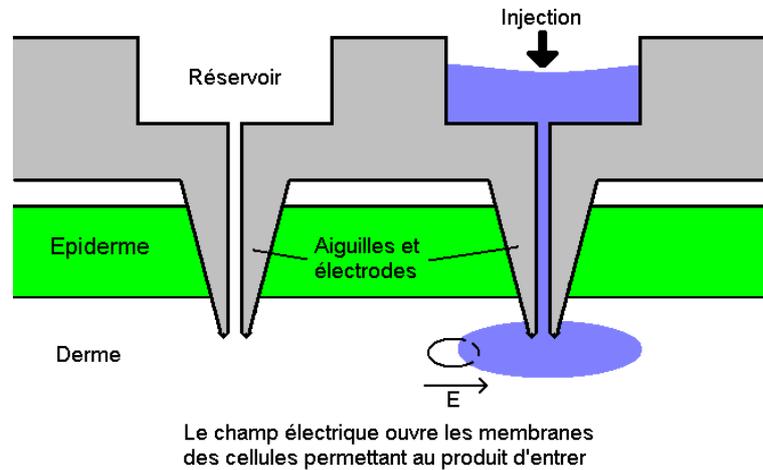


FIG. 3.1 – Schéma de principe du système d'Angioskin.

Pour franchir la première barrière, on utilise des microaiguilles. Celles ci traversent la peau et permettent donc de délivrer le produit thérapeutique à proximité de cellules à transférer. Pour amener ensuite le produit à l'intérieur des cellules, c'est le phénomène d'électroporation qui est exploité. Les aiguilles servent à la fois à injecter le produit et comme électrode pour appliquer le champ électrique nécessaire à l'électroporation.

La partie fluïdique

L'objectif de cette partie est de réaliser une injection uniforme d'une quantité donnée de produit au travers des microaiguilles. Pour cela, il a été décidé d'adapter à chaque aiguille un réservoir individuel et de le vider totalement. Cette méthode permet de garantir à la fois la quantité totale de produit injecté (il s'agit du volume des réservoirs) et l'uniformité de l'injection puisque tous les

réservoirs sont de taille identique. Le système est donc constitué d'une matrice de réservoirs, recouverts d'une membrane déformable permettant d'expulser leur contenu. La figure 3.2 présente une vue d'ensemble du réseau de chambres. Le système est placé à l'intérieur d'un boîtier dont on contrôle la pression et est connecté à l'extérieur au niveau de l'entrée du circuit de remplissage.

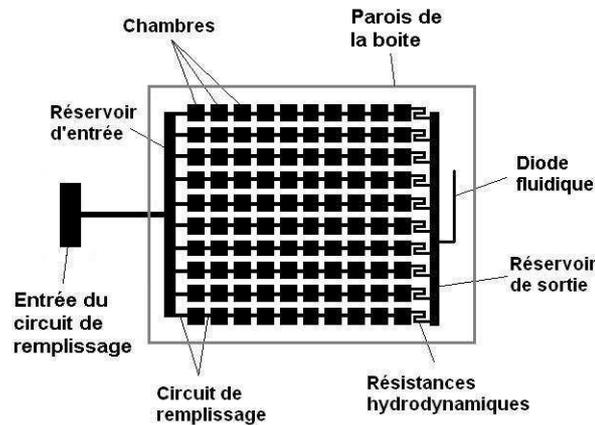


FIG. 3.2 – Vue d'ensemble du circuit fluide

Le remplissage s'effectue par le biais d'un circuit irrigant tous les réservoirs à partir d'une unique entrée. Pour cela, on bouche les aiguilles en les plantant dans un morceau de PDMS, puis on diminue la pression dans le boîtier. Cela aspire le liquide à travers le circuit de remplissage ce qui remplit l'ensemble des chambres. Ce circuit est terminé par une diode fluide qui ne permet la circulation du liquide que dans ce sens. La partie gauche de la figure 3.3 présente ce remplissage.

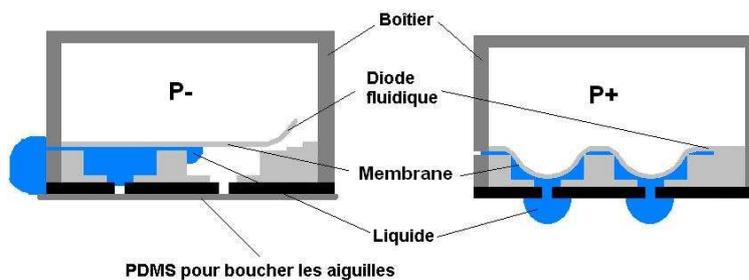


FIG. 3.3 – Schéma de principe de la partie fluide

Pour l'injection, on libère les aiguilles et on augmente la pression dans le boîtier. Cette pression positive va d'abord fermer la diode fluide qui empêche

tout retour du liquide au travers du circuit de remplissage (figure 3.3, droite) ; puis la pression appliquée cause la déflexion de la membrane à l'intérieur des réservoirs ce qui, dans un premier temps, ferme le circuit de remplissage et, dans un second temps, vide les réservoirs au travers des aiguilles. Le circuit de remplissage est conçu pour être bouché le mieux possible au moment de l'injection. C'est ce qui permet de garantir l'individualisation des chambres et donc l'uniformité de l'injection. Les détails de ce système sont présentés dans la partie 3.3.

3.1.3 Matériel et technologies

Le système est réalisé dans un matériau polymère, le PDMS, et sa fabrication se fait en salle blanche. Les divers procédés et techniques intervenant dans sa réalisation sont exposés en détail dans l'annexe A.

Le PDMS

L'utilisation du PDMS en microtechnologies a été initiée par l'équipe de G. M. Whitesides [63] puis, du fait des nombreuses qualités de ce polymère, elle s'est généralisée pour les applications microfluidique. En particulier, le PDMS est très simple à manipuler et permet de répliquer parfaitement par moulage des motifs micrométriques. Sa manipulation ne nécessite que peu de matériel : une enceinte sous vide pour éliminer les bulles formées lors du mélange et un four pour le faire réticuler.

En plus de la simplicité de manipulation, le PDMS a les propriétés suivantes :

- C'est un polymère hyperélastique. A l'instar du caoutchouc, il peut donc subir de très grandes déformations sans se dégrader, et constitue donc un matériau de choix pour la réalisation de membranes déformables. L'équipe de S. Quake [64] a été la première à réaliser des vannes en exploitant cette qualité.
- Il est biocompatible [65] ce qui est indispensable pour un élément d'un système servant à manipuler des produits de traitement médical.
- Il est naturellement hydrophobe, mais il existe des traitements permettant de le rendre hydrophile lorsque c'est nécessaire.
- Il est poreux aux gaz, mais pas aux liquides.

Le PDMS est le principal support pour la fabrication de microsystèmes fluidiques au sein de l'équipe Biomis. Ses propriétés de biocompatibilité en particulier ont été vérifiées et exploitées pour la fabrication de systèmes de culture cellulaire comme celui présenté dans la partie 4.1.

Salle blanche

La réalisation de systèmes micrométriques nécessite un environnement particulièrement propre puisque la dimension d'une poussière n'est plus négligeable devant celle du système. De ce fait, la microfabrication se fait dans une salle

propre et maintenue en surpression par rapport à l'extérieur afin de limiter la présence de poussières. La salle blanche de BIOMIS est de classe 10000, ce qui signifie qu'il y a moins de 10000 particules de poussière par pied cube.

Cette salle blanche est équipée de plusieurs appareils permettant de réaliser les différentes étapes de fabrication des microsystèmes. Les principaux appareils sont un bâti d'évaporation qui permet de déposer des couches de métal jusqu'à plusieurs centaines de nanomètres d'épaisseur, un bâti de RIE pour la gravure sèche, une aligneuse pour la photolithographie et un profilomètre permettant de mesurer les dimensions des objets fabriqués.

3.1.4 Choix de conception

Matrice de réservoirs

Vider un réservoir unique au travers d'une matrice d'aiguille ne peut conduire à une injection homogène que si les aiguilles sont toutes parfaitement identiques. Ce qui n'est jamais le cas en pratique. Plus important encore, la peau n'est pas un matériau homogène et par conséquent, la résistance à l'injection n'est pas la même d'une aiguille à l'autre.

Disposer d'un réservoir par aiguille permet d'éviter ce problème. En effet, si une aiguille présente une trop grande résistance hydrodynamique, le contenu de son réservoir ne pourra pas se vider au travers d'une aiguille voisine comme ça aurait été le cas pour un système à réservoir unique. Le réservoir de cette aiguille mettra simplement plus de temps à se vider, ou, dans le pire des cas, ne se videra pas complètement.

Pour ces raisons, il a été décidé d'adapter un réservoir individuel à chaque aiguille. Cela permet de garantir une injection homogène d'une quantité de produit fixée, chaque réservoir étant entièrement vidé lors de l'injection. De plus, le volume injecté au travers de chaque aiguille est directement lié au volume du réservoir qui l'alimente. On contrôle donc la quantité de produit injecté au travers de chaque aiguille par le biais de la géométrie de la matrice de réservoirs.

Séparation des circuits de remplissage et d'injection

Lorsque l'on utilise une seringue traditionnelle, le remplissage de la seringue se fait par l'aiguille, tout comme l'injection. Dans le cas d'une matrice d'aiguilles un tel procédé de remplissage reste possible : il suffit de tremper toutes les aiguilles dans la solution dont on souhaite remplir le système. Procéder ainsi a deux principaux avantages : cela permet de remplir la totalité des réservoirs en limitant les risques de mauvais remplissage, et c'est la forme la plus simple possible pour la réalisation du système, donc la plus facile à fabriquer et présentant le moins de risques de défaillance.

Toutefois, si on prend en compte le fait que l'on souhaite limiter au minimum le gaspillage du produit utilisé, cette manière de procéder devient beaucoup plus problématique. En effet, il faut alors placer devant chaque aiguille la quantité de produit que peut contenir chacun des réservoirs. En d'autres termes, il faut placer cent gouttes de produit de 100 à 200 nl sur une surface plane, puis les mettre en contact avec les aiguilles avant d'aspirer. Il faut aussi faire en sorte que chaque gouttelette soit entièrement aspirée au travers de l'aiguille lors de cette manipulation.

Chaque manipulation de produit engendre des pertes non négligeables à cette échelle. Une partie du produit manipulé reste toujours dans l'outil de manipulation. On notera aussi que l'évaporation devient elle aussi un problème critique : à l'air libre et à température ambiante, une goutte de 100 nl d'eau s'évapore totalement en quelques minutes.

Afin de simplifier la manipulation du produit thérapeutique, il a donc été décidé de séparer le remplissage du système de l'injection. On a donc conçu un réseau de canaux permettant de remplir la totalité des réservoirs à partir d'une seule entrée. De ce fait, les pertes de produit dans le système sont légèrement augmentées puisque tout le produit restant dans le système de remplissage n'est pas injecté au travers des aiguilles, mais les pertes liées à la manipulation préalable du produit sont considérablement réduites.

Individualisation des chambres

Le fait d'avoir conçu un circuit de remplissage implique que les chambres ne sont pas réellement indépendantes les unes des autres. Elles sont reliées par un réseau de canaux, ce qui met à mal le principe de la pluralité de réservoirs. Pour le remplissage, on a besoin d'un circuit unique, mais lors de l'injection, il nous faut à nouveau une matrice de chambres indépendantes pour garantir l'uniformité de l'injection. Pour permettre cela, le circuit de remplissage doit être fermé lors de la phase d'injection.

Afin de réaliser cette individualisation des chambres, le circuit de remplissage est positionné juste sous la membrane. Ainsi, sa section est liée à la pression appliquée : lors du remplissage, la dépression dans le réservoir de pression tire la membrane vers le haut, ce qui augmente la section du circuit de remplissage et diminue donc sa résistance hydrodynamique (figure 3.4, (1)) ; à l'inverse, lors de l'injection, la membrane s'enfonce dans les canaux, ce qui augmente considérablement leur résistance hydrodynamique figure 3.4, (2)). Afin d'accroître les écarts de section, le circuit de remplissage est réalisé en deux fois ce qui permet de lui donner une forme en escalier. Typiquement, le circuit de remplissage a une section rectangulaire de $300 \times 100 \mu\text{m}$, avec une marche à $50 \mu\text{m}$.

Cette méthode d'individualisation ne garantit pas une fermeture à 100% du circuit de remplissage. Il reste toujours de fins passages entre les chambres lors

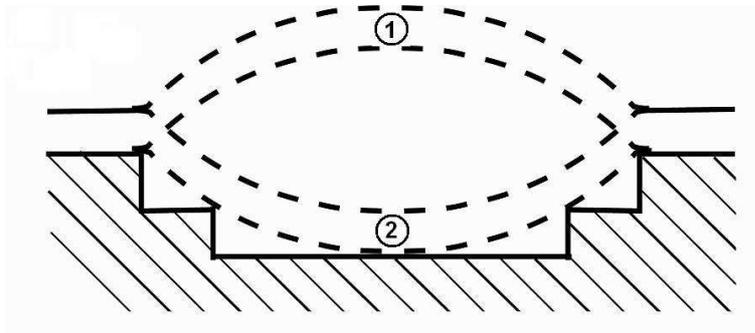


FIG. 3.4 – Vue en coupe d’un canal du circuit de remplissage, (1) pendant le remplissage, (2) pendant l’injection

de l’injection. Toutefois, la résistance hydrodynamique de ces passages est telle que le liquide n’y passe pas à moins qu’une aiguille ne soit totalement bouchée.

Propriétés de surface du PDMS

Les propriétés de surface du PDMS ont de l’importance lors du remplissage d’un système. La nature hydrophobe du matériau peut empêcher une solution aqueuse d’envahir tous les recoins du système menant ainsi à la formation de bulles. Il est possible de traiter le PDMS pour le rendre hydrophile ; on a donc pu tester le remplissage du système pour un PDMS hydrophile et un PDMS hydrophobe ; la figure 3.5 donne un bon aperçu du résultat de ces tests.

Lorsque les parois en PDMS sont hydrophiles, les solutions aqueuses tendent à remplir les canaux très rapidement par capillarité. Dans notre cas, le liquide envahi le circuit de remplissage, mais pas les chambres (comme on peut le voir sur la partie gauche de la figure 3.5). Lorsque qu’ensuite on essaye d’aspirer le produit dans le système, il reste sur les parois sans remplir le volume des chambres laissant ainsi une grosse bulle d’air dans chaque chambre. A l’inverse, Lorsque le PDMS est hydrophobe, le liquide occupe d’abord le volume avant de s’attacher aux parois. Il ne reste alors que de petites bulles d’air dans les coins des chambres. Lorsqu’elles sont assez petites, ces bulles sont immédiatement absorbées dans le PDMS du fait de leur pression interne élevée. Le remplissage du système s’opère donc mieux avec un PDMS hydrophobe. Le remplissage du système est présenté plus en détail dans la partie 3.4.2.

3.2 Modélisation

L’objectif de cette étude est de réaliser un modèle mécanique du système d’injection et d’en déduire un dimensionnement optimal. La modélisation permet de se faire une idée du comportement théorique du système. Elle a été faite

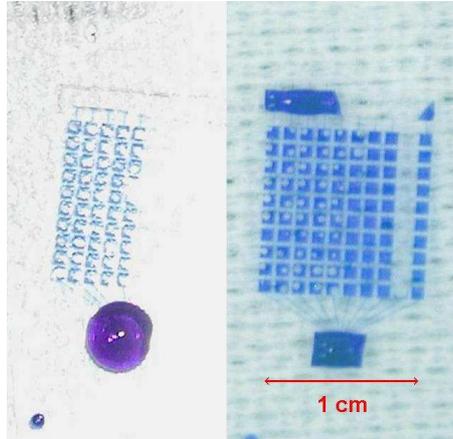


FIG. 3.5 – Remplissage d’un réseau de chambres dont une moitié est hydrophile et l’autre hydrophobe. La photo de gauche montre le remplissage instantané du système par capillarité, la photo de droite montre le résultat après aspiration de l’encre au travers du système.

au moyen du logiciel Femlab, version 3.1.

Le système est un réseau de chambres en PDMS couvertes d’une membrane. L’éjection du liquide se fait par l’application d’une pression sur la membrane entraînant ainsi sa déformation à l’intérieur des chambres. La modélisation permet d’établir des relations entre d’une part les caractéristiques géométriques du système (épaisseur de la membrane, forme et taille de la chambre) et la pression appliquée, et d’autre part le comportement de l’ensemble (déformation de la membrane, risques de rupture, volume mort et volume chassé).

3.2.1 Le modèle

Le PDMS est un matériau hyperélastique, incompressible et le problème présente de très grandes déformations. Ce type de problème n’étant pas géré par Femlab 3.1, il faut entrer soi même les équations de comportement du système.

On note :

- F le tenseur des gradients de déformation
- J le déterminant de F : $J = \det(F)$
- C le tenseur de Cauchy-Green : $C = F^T F$
- E le tenseur de tension de Green : $E = 1/2.(C - I)$
- I la matrice identité
- I_1 un invariant de tension : $I_1 = \text{trace}(C)$

Pour un matériau hyperélastique, les contraintes S sont calculées par le biais d’une fonction d’énergie W .

$$S = \partial W / \partial E \quad (3.1)$$

Le modèle Neo-Hookean a été utilisé pour ces calculs. Pour ce modèle, la fonction d'énergie de tension s'exprime :

$$W = 1/2.G.(I_1 - 3) + 1/2.\kappa.(J - 1)^2 \quad (3.2)$$

Où G est le module de cisaillement ($G = 250$ kPa pour le PDMS) et κ est le module d'élasticité pris très grand ($\kappa = 10^4$ MPa) car le PDMS est pratiquement incompressible.

Enfin, le contact au fond de la chambre est simulé par une force appliquée à la membrane du type : $F = A.e^{-B.d}$ où A et B sont des constantes et d est la distance entre la membrane et le fond de la chambre. Pour B très grand, cette force est négligeable tant que la membrane ne touche pas le fond de la chambre. Les valeurs prises pour ces modèles sont la pression appliquée au système pour A et $1\mu\text{m}^{-1}$ pour B (soit 10^6m^{-1}).

Les figures 3.6 et 3.7 présentent le maillage du modèle et la déformation tridimensionnelle de la membrane à l'intérieur de la chambre. Le maillage est composé de 3000 à 5000 éléments tétraédriques.

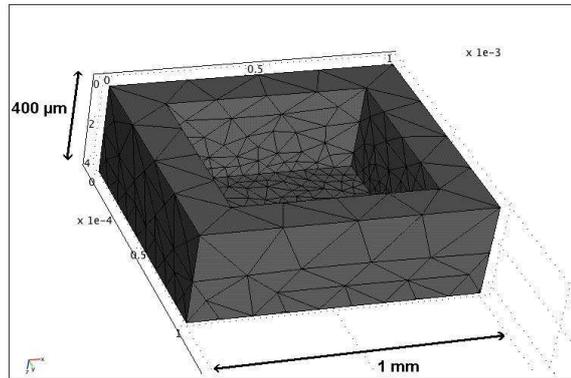


FIG. 3.6 – Maillage du modèle mécanique de la chambre d'injection

3.2.2 Propriétés mécanique du PDMS

Le paramètre utilisé pour caractériser le PDMS dans les calculs est son module de cisaillement. Or ce dernier dépend d'un grand nombre de facteurs dont les proportions de durcisseur dans le mélange, ou la marque de PDMS utilisée. D'après la littérature [66], ce paramètre peut varier entre 100 kPa et 3MPa. Pour avoir une idée plus précise de l'ordre de grandeur de ce paramètre pour

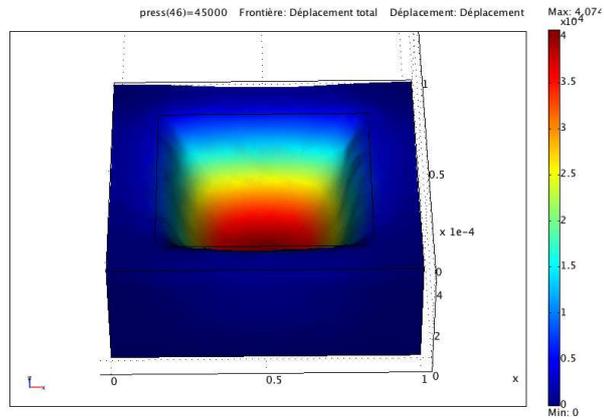


FIG. 3.7 – Déformation de la membrane à l'intérieur de la chambre sous une pression de 45kPa

le PDMS utilisé ici, des essais de traction ont été menés sur les machines de l'IUT de Rennes. Des échantillons se présentant comme des pavés carrés de PDMS d'un centimètre de coté et de quatre millimètres d'épaisseur ont été collés à des plaques de verre par traitement plasma. Afin de ne pas briser le verre dans les mors de la machine de traction, des plaques d'aluminium y ont été collées avec une colle cyanolite. Les échantillons ainsi préparés ont permis de tester le PDMS en cisaillement.

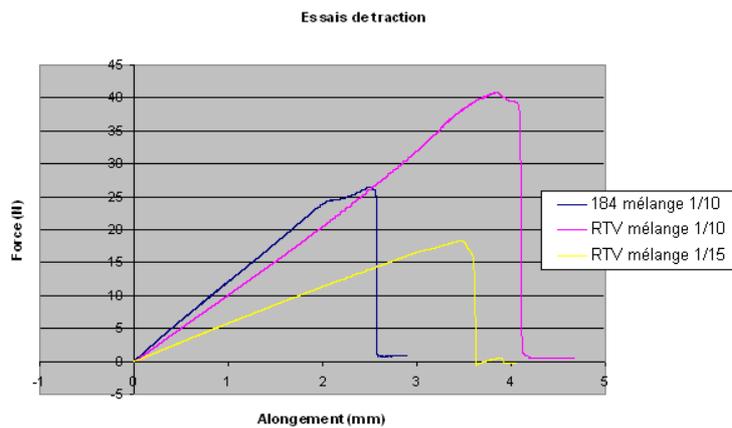


FIG. 3.8 – Acquisition du module de cisaillement du PDMS

La figure 3.8 présente le résultat de ces tests pour trois échantillons. Deux types de PDMS ont été testés (le RTV de General Electronics et le 184 de Sylgard) ainsi que deux proportions de l'agent réticulant (1/10 et 1/15). On notera que la rupture du PDMS n'a pas été clairement observée : il se décolle du verre avant de rompre. D'une manière générale, le PDMS ne rompt que sous des conditions irréalisables dans nos microsystèmes et peut donc ne pas être prise en compte pour la modélisation. Le module de cisaillement est donné par l'équation 3.3. F représente la force appliquée à l'échantillon et δ la déformation engendrée ; h et S sont la hauteur et la surface de l'échantillon de PDMS.

$$G = \frac{F.h}{S.\delta} \quad (3.3)$$

Ces courbes ont été ensuite comparé au calcul de Femlab pour ce même essai de traction et le module de cisaillement a été ajusté afin que le calcul numérique corresponde aux essais. Cela donne un module de cisaillement de 250 kPa pour le PDMS RTV mélangé à 1/15, 380kPa pour le RTV à 1/10 et 580 kPa pour le 184 à 1/10. Toutes ces valeurs sont soumises à des fluctuations dues à l'imprécision du mélange polymère/ agent réticulant ainsi qu'aux conditions variables de réticulation.

3.2.3 Apport du modèle

D'un point de vue qualitatif, les calculs par éléments finis ont permis de cerner la géométrie optimale des microchambres permettant de minimiser le volume mort lors de la déflexion de la membrane. On constate avant tout que, tant que l'on reste dans des dimensions permettant d'injecter un minimum de 10 μ l au travers du système, plus les dimensions horizontales des chambres sont grandes et plus le volume injecté à pression égale est important. De même, augmenter la hauteur des chambres permet d'améliorer la quantité de volume injecté, mais augmente aussi considérablement le volume perdu à l'intérieur du système, ce qui n'est pas le cas pour une augmentation horizontale du volume. Pour un meilleur rapport entre le volume injecté et le volume perdu, il convient donc d'exploiter au maximum la surface sur laquelle se répartissent les chambres tout en optimisant le rapport d'aspect hauteur/largeur.

La figure 3.9 présente l'évolution du rapport entre les volumes de liquide injectés et perdus dans le système en fonction de la pression appliquée. Chaque courbe représente une géométrie différente pour la chambre : dans la légende 400x700x700 signifie que la chambre est un volume parallélépipédique de 400 μ m de hauteur et 700 μ m de coté ; 300xD800 correspond à une chambre cylindrique de 800 μ m de diamètre et 300 μ m de hauteur.

Ces courbes montrent que la forme des chambres n'a que peu d'influence sur la qualité du système, comme le montre la superposition des courbes relatives à la chambre cylindrique et celle d'un chambre carrée dans la figure 3.9. De ce fait, la préférence sera donnée à des chambres de forme carrée, parce qu'elles sont

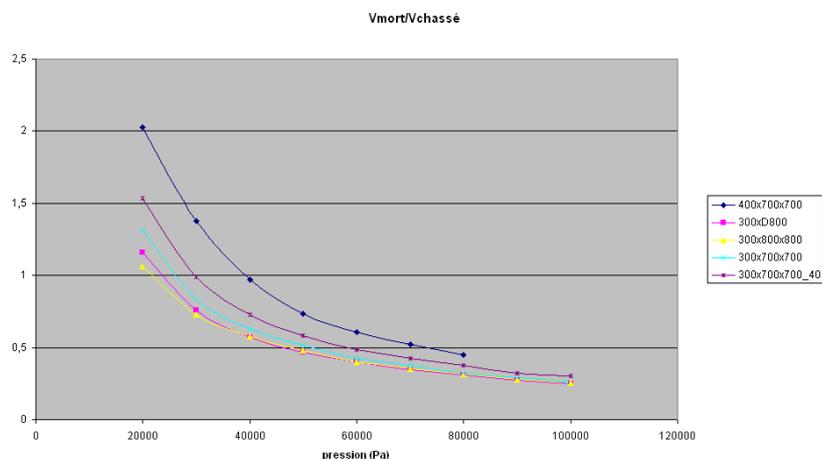


FIG. 3.9 – Rapport entre les volumes injectés et volumes perdus dans le système en fonction de la pression appliquée

plus faciles à répartir dans l'espace tout en exploitant au maximum la surface utilisable.

On constate aussi, comme on pouvait s'y attendre, qu'une pression plus importante permet d'injecter davantage de produit. Augmenter la pression appliquée pour réduire le volume mort est toutefois une solution à envisager avec précautions; en effet une pression trop importante pourrait endommager le micro-système.

La figure 3.10 montre la déformation de la membrane pour une pression de 50kPa. On visualise bien l'espace qui constitue l'essentiel du volume mort. Il est possible en terme d'optimisation de combler cet espace en donnant aux parois une structure pyramidale afin de diminuer les pertes de produit dans le système.

3.2.4 Validation

Afin de valider le modèle de simulation, la déflexion calculée de la membrane a été comparée à des mesures faites sur un système test. On applique au moyen d'une seringue une pression dans une chambre recouverte d'une membrane, et la membrane se déforme sous l'effet de la pression. On mesure alors la déformation de la membrane au moyen d'un profilomètre. La figure 3.11 présente un schéma de ce montage.

Les résultats de ce test sont présentés dans la figure 3.12. Il y apparaît clairement que les courbes ne se superposent pas, et particulièrement pour les faibles pressions. Le test a été effectué trois fois et les résultats étaient à chaque

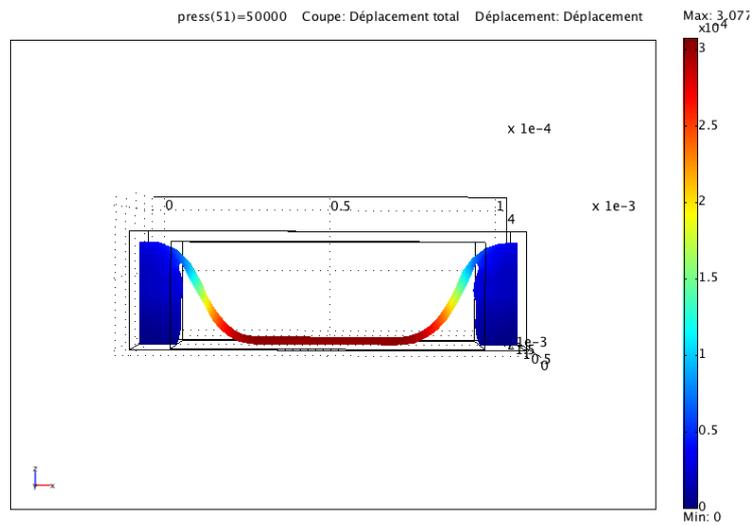


FIG. 3.10 – Chambre en coupe, déformation de la membrane à 50kPa

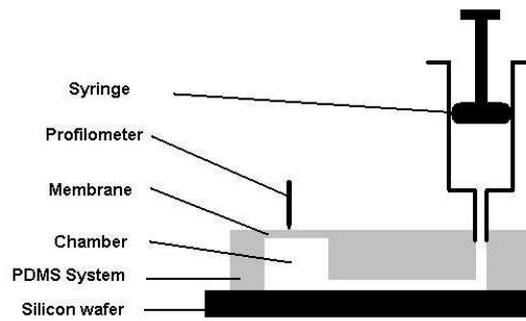


FIG. 3.11 – Schéma du système de mesure de déflexion de la membrane

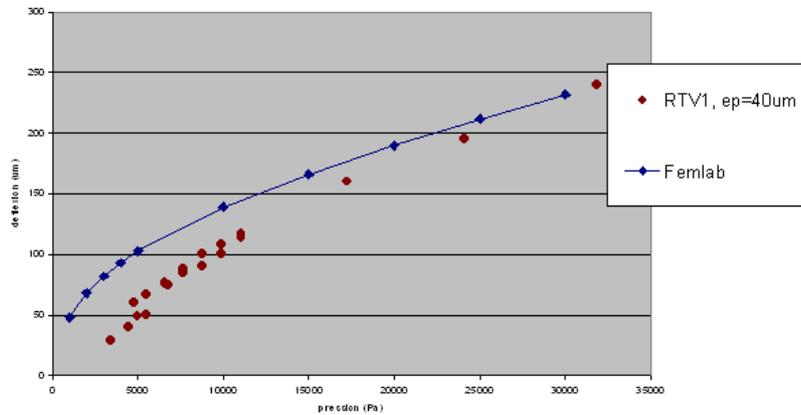


FIG. 3.12 – Comparaison entre déflexion calculée et mesurée

fois comparables. Il constitue toutefois une validation suffisante du modèle pour l'exploitation qualitative qui en est faite. En effet, l'écart entre les courbes calculées et mesurées n'est que de quelques pourcents pour l'essentiel de la plage de mesure. Le montage ne permet malheureusement pas d'explorer des pressions plus importantes car au delà de 30 kPa, la pointe du profilomètre déchire la membrane pendant la mesure.

Il y a plusieurs causes aux écarts entre les calculs et les observations. Tout d'abord, la pression est appliquée au moyen d'une simple seringue de 20ml. Comme le déplacement de la membrane constitue un changement de volume négligeable devant celui de la course du piston, la loi des gaz parfait permet de connaître la pression induite par le déplacement du piston 3.4.

$$P_i \cdot V_i = P_f \cdot V_f \quad (3.4)$$

Ici, P_i est la pression atmosphérique, V_i le volume initial de la seringue (20ml), P_f est la pression appliquée à la membrane et V_f le volume interne de la seringue après déplacement du piston. Pour appliquer une pression de 11kPa sur la membrane avec ce système, on doit réduire le volume de la seringue de 10%, et donc déplacer le piston de la graduation 20 à la graduation 18. En supposant que la précision de positionnement du piston soit d'un quart de graduation, on a alors une erreur sur l'établissement de la pression de 1,5kPa soit environ 14%. Pour des pressions appliquées plus importantes, cette erreur est plus faible. L'erreur est estimée par la différenciation de l'équation 3.4. En considérant que la pression atmosphérique et le volume initial de la seringue sont des constantes, on obtient l'équation 3.5.

$$\Delta P_f = \frac{P_i \cdot V_i \cdot \Delta V_f}{V_f^2} \quad (3.5)$$

Une autre source d'erreur dans la prise de mesure est due à l'utilisation d'un profilomètre. En effet, la pointe du profilomètre appuie sur le relief mesuré avec une force non nulle. Bien que faible (un poids de quelques milligrammes) cette force est très ponctuelle et suffit à déformer localement la membrane. La caméra du profilomètre permet d'avoir une appréciation visuelle de l'erreur induite. Celle-ci est de l'ordre de quelques micromètres au plus.

Enfin, la valeur du module de cisaillement du PDMS utilisée dans les calculs est elle-même soumise à de légères fluctuations dues à sa préparation manuelle. De plus, la préparation toujours manuelle des échantillons pour l'évaluation du module de cisaillement a elle aussi introduit une incertitude. En négligeant l'incertitude de la machine de traction devant celle de la préparation des échantillons, on obtient à partir de l'équation 3.3 l'erreur théorique sur le module de cisaillement 3.6. En estimant à 0,2 mm l'erreur de dimensionnement de l'échantillon sur chaque longueur, on obtient une erreur de 5%.

$$\Delta G = \frac{F \cdot \Delta h}{S \cdot \delta} + \frac{F \cdot h \cdot \Delta S}{S^2 \cdot \delta} \quad (3.6)$$

Les causes énoncées ici ne suffisent pas à expliquer complètement l'écart observé entre les mesures et le calcul. La simplicité du modèle choisi est probablement responsable de l'écart résiduel. Malgré tout, le modèle a fait ses preuves, au moins pour les informations qualitatives, et les ordres de grandeurs que l'on peut en tirer.

3.2.5 Conclusion

La validation avait deux objectifs : le premier était de vérifier que les paramètres utilisés dans les calculs sont ceux que l'on a avec le PDMS utilisé ici. Les calculs ont été réalisés pour un PDMS dont le module de cisaillement est 250 kPa ce que l'on obtient avec le PDMS RTV mélangé à 1/15. On notera toutefois qu'il s'agit d'une limite basse et il pourrait être envisagé d'utiliser un module de cisaillement plus important si le besoin se présentait. L'autre objectif était de vérifier la cohérence des résultats numériques, ce que le faible écart entre mesure et calcul confirme.

Pour la définition d'une géométrie optimale, on retiendra que plus la surface de la membrane est importante, plus le volume chassé est important, indépendamment de sa forme. Le rapport volume perdu sur volume injecté étant d'autre part peu dépendant de la forme de la chambre, il est préférable de choisir la géométrie engendrant le plus grand volume, donc carrée, de ce point de vue.

On a pu aussi voir dans quelle gamme de pression travailler pour obtenir le comportement souhaité. D'autres tests ayant montré que l'on peut raisonnablement compter sur une pression d'un bar sans avoir de contraintes de réalisations trop strictes pour l'ensemble du système, la pression pour l'actionnement du système pourra être comprise entre 0,5 et un bar. On obtient aisément des volumes injectés de l'ordre de dix microlitres pour cent aiguilles avec ces pressions.

3.3 Conception et fabrication des différents éléments

Le système est constitué de plusieurs parties ayant chacune un rôle spécifique. Le coeur du système est la matrice de réservoirs dans laquelle est réparti le produit à injecter ; mais d'autres éléments sont indispensables au bon fonctionnement du système. Le remplissage des chambres a en particulier nécessité l'ajout d'un circuit spécifique et distinct du circuit d'injection et une diode fluïdique permet d'aiguiller le liquide vers le circuit de remplissage ou d'injection.

3.3.1 La matrice de réservoirs

Description

La matrice de réservoirs est l'élément principal du système. Chaque chambre est une micro-seringue s'ajustant à l'une des aiguilles du système. Les chambres sont recouvertes par une fine membrane de PDMS qui envahit tout leur volume lorsqu'elle est mise sous pression chassant ainsi le liquide qu'elles contenaient. La dimension des chambres est adaptée à la quantité de produit que l'on souhaite injecter.

Concrètement, comme les aiguilles sont espacées les unes des autres de 1 mm, les chambres ne peuvent dépasser cette dimension. La dimension maximale qu'il est possible de réaliser pour chaque chambre est un pavé de $800\ \mu\text{m}$ de côté et $400\ \mu\text{m}$ de hauteur. Au delà, les parois séparant les chambres sont trop fines et la fabrication devient délicate. Ces dimensions correspondent à un volume de $0,25\ \mu\text{l}$ pour une chambre et compte tenu des pertes de produit dans le système, on ne peut espérer injecter plus de $20\ \mu\text{l}$ au travers de l'ensemble des aiguilles.

Fabrication

La matrice de réservoirs est réalisée par moulage. Le moule est fait en résine épaisse (SU8) déposée sur un wafer de silicium. Afin d'obtenir une structure plusieurs niveaux, on procède à une succession d'enduction de résine et d'insolation (voir annexe A). On dépose d'abord une couche de $50\ \mu\text{m}$ de résine que l'on insole pour faire le premier niveau du circuit de remplissage, puis une seconde couche de $50\ \mu\text{m}$ pour le second niveau. Cela permet d'obtenir la forme d'escalier de la figure 3.4. On dépose ensuite par dessus une nouvelle couche de résine de $100\ \mu\text{m}$ cette fois pour réaliser les chambres. Là encore, on peut

procéder à plusieurs étapes d'enduction-insolation afin de donner aux chambres une forme pyramidale (qui limite le volume mort). Pour la plupart des systèmes, le circuit de remplissage est fait en deux étapes et les chambres en trois ; cela permet d'obtenir des chambres de $400\mu\text{m}$ d'épaisseur.

Après les étapes d'enduction et d'insolation, le moule est développé et traité afin que le PDMS n'y adhère pas. Le PDMS est préparé puis mis sur le moule et l'ensemble est placé sous vide pour éliminer les bulles d'air formées lors de la préparation du PDMS et de sa déposition sur le moule. Une fois le PDMS dégazé, on serre le moule entre deux plaques pour que les chambres traversent le PDMS de part en part. Enfin, le tout est mis à l'étuve pour deux heures à 70°C pour le faire réticuler, puis on le démoule.

La membrane

L'épaisseur de la membrane est fixée empiriquement par les conditions de fabrication et de manipulation. Une membrane de $30\mu\text{m}$ d'épaisseur est facile à manipuler et se déforme très bien aux pressions appliquées. L'expérience montre que, jusqu'à une épaisseur de $10\mu\text{m}$, le risque de rupture de la membrane pour une utilisation normale du système, est inexistant. Comme une membrane plus fine se déforme mieux, minimiser l'épaisseur de la membrane permet de réduire les pertes de produit dans le système. Toutefois des membranes trop fines se déchirent lors de l'assemblage et pour l'étude du système, on s'est contenté de manipuler des membranes de $30\mu\text{m}$ d'épaisseur.

La membrane est réalisée en PDMS par enduction centrifuge. Elle est étalée sur un wafer en silicium exactement de la même manière qu'une résine photosensible. Cela permet de réaliser avec une très bonne répétabilité des membranes fines et faciles à manipuler puisque après leur réticulation, elles sont étalées sur un wafer auquel elles n'adhèrent pas. On peut maîtriser l'épaisseur de la membrane réalisée en jouant sur la vitesse de rotation de la tournette (Suss microtech CT62). Toutefois, il ne faut pas perdre de vue que l'épaisseur ne dépend pas que de cette vitesse de rotation, mais aussi de la viscosité du PDMS. Or, après avoir été préparé, cette viscosité augmente jusqu'à ce qu'il soit réticulé. On doit donc prendre en compte le temps écoulé entre le mélange et l'étalement, c'est à dire le temps de dégazage du PDMS. Cette méthode permet de réaliser de membranes épaisses de $20\mu\text{m}$ à $100\mu\text{m}$ environ.

Une fois la membrane réalisée, elle doit être collée au corps du système. On utilise pour cela le collage plasma. Le réseau de chambres d'une part et la membrane déposée sur son wafer d'autre part sont exposés à un plasma d'oxygène pendant 30s. Le réseau de chambres est ensuite placé sur la membrane et le tout est mis quelques minutes au four pour stabiliser le collage. Enfin, on décolle l'ensemble du wafer. Comme la membrane est fine, elle se déchire et seule la partie collée part avec le système ; l'autre partie reste sur le wafer.

3.3.2 Le circuit de remplissage

Description

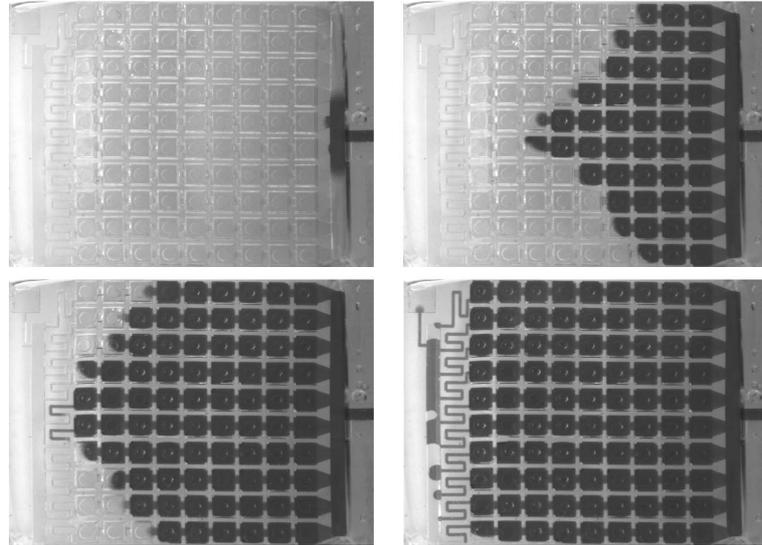


FIG. 3.13 – Remplissage du système complet. Le système se remplit en 4s pour 1/10 de bar environ

Le circuit de remplissage est constitué de canaux reliant les chambres entre elles (figure 3.2). Il s'ouvre sur l'extérieur du boîtier, qui est à pression atmosphérique, et débouche à l'intérieur dont la pression est fixée au dessus ou en dessous en fonction de la phase d'actionnement. La figure 3.13 montre son fonctionnement.

Comme précisé au paragraphe 3.1.4, le circuit de remplissage doit être ouvert pendant la phase de remplissage du système et fermé lors de l'injection. Afin de limiter les ouvertures entre les différentes chambres, ce circuit est réduit en terme de dimensions et de nombre de canaux. Sa section doit tout de même permettre de laisser passer les molécules d'ADN sans qu'il y ait de risque d'agglomération. Les canaux ont donc une section de taille supérieure à un carré de $100 \mu\text{m}$ de coté.

Le circuit de remplissage alimente les chambres par rangées. Cela pose un problème pour le bon remplissage de l'ensemble du système car cela implique le risque qu'une rangée de chambre ne se remplisse pas ou pas bien (ce problème est traité par l'ajout de résistances hydrodynamiques). Si cette géométrie a malgré cela été choisie, c'est parce qu'alimenter toutes les chambres par un seul chemin (un circuit en serpent) implique une résistance hydrodynamique

trop importante sur l'ensemble du circuit qui rend le remplissage extrêmement difficile et lent.

Résistance hydrodynamique

Les résistances hydrodynamiques (voir figure 3.2) ont été ajoutées pour garantir le bon remplissage de toutes les rangées de chambres par le circuit de remplissage. En effet les différentes rangées du circuit ne se remplissent pas nécessairement à la même vitesse. De légères disparités dans les propriétés du matériau, mais aussi dans la géométrie des canaux suffisent à privilégier certaines rangées par rapport à d'autres lors du remplissage.

Sur la figure 3.13 c'est essentiellement la différence de longueur des parcours pour l'encre qui induit le décalage du remplissage des différentes rangées. Il est en effet plus coûteux en terme d'espace occupé (et de volume mort dans le système) de créer une arborescence de canaux garantissant une répartition égale de la longueur des trajets que d'augmenter l'effet des résistances hydrodynamiques (c'est à dire augmenter leur longueur et réduire leur section).

Lorsqu'une rangée est pleine, tout le liquide aspiré par le système tendra à passer par ce chemin sans envahir davantage les rangées restantes où le caractère hydrophobe du PDMS empêche le liquide de progresser. L'air restant dans le système à ce moment est donc piégé et ne peut plus en sortir ce qui empêche donc une partie des réservoirs d'être remplis.

Lorsque le liquide atteint la résistance hydrodynamique, sa progression est très fortement ralentie. En effet, le rapport surface sur volume est plus important dans ces canaux étroits ce qui diminue considérablement l'importance de la force d'aspiration devant la résistance des parois hydrophobes. Cela permet de mettre chaque rangée pleine en attente jusqu'à ce que tout le système soit rempli.

La taille de ces résistances a été fixée empiriquement pour ne pas ralentir le remplissage du système, tout en assurant la bonne répartition du liquide dans les chambres. Elles consistent en un canal en forme de lacet d'une longueur d'un millimètre et de section carrée de $100\ \mu\text{m}$ de côté.

Fabrication

Le circuit de remplissage et les résistances hydrodynamiques sont réalisés par moulage en même temps que la matrice de réservoirs. Ils sont des éléments du même moule.

3.3.3 La diode microfluidique

Lors de l'injection, le liquide ne doit pas ressortir par le circuit de remplissage, mais par les aiguilles. Les canaux reliant les chambres doivent se boucher,

mais cela suppose qu'il y ait une différence de pression suffisante entre les deux faces de la membrane. Or pour le remplissage, l'intérieur du système doit être relié au réservoir de pression afin de pouvoir aspirer le produit. Il faut donc ajouter un actionneur assurant l'ouverture et la fermeture du circuit de remplissage au niveau de sa connexion avec le réservoir de pression.

Cet élément est une diode fluidique qui doit donc être passante lors du remplissage du système, lorsque la pression dans le boîtier est faible, et bloquante lors de l'injection lorsque la pression est élevée. Compte tenu des pressions mises en jeu (de l'ordre d'un bar), celle-ci doit être très robuste et surtout avoir un réel comportement "tout ou rien". En effet, s'il y a des fuites, une partie du produit ne pourra pas être injecté, et sera donc perdue.

Les différents concepts de diode

A l'échelle macroscopique, un élément de type "diode fluidique" est généralement constitué d'une partie mobile. Par exemple, une bille se déplaçant dans une chambre bouche un canal si une pression négative la retient, et laisse passer le fluide lorsqu'une pression positive l'éloigne du canal (figure 3.14). Ce type d'élément est très fiable et robuste. Toutefois, il devient problématique à réaliser dans un microsystème. En effet, l'assemblage de pièces micrométriques est une opération délicate, et les risques de rupture ou de blocage du système sont importants. Pour ces raisons, les diodes passives sont préférées aux petites échelles.

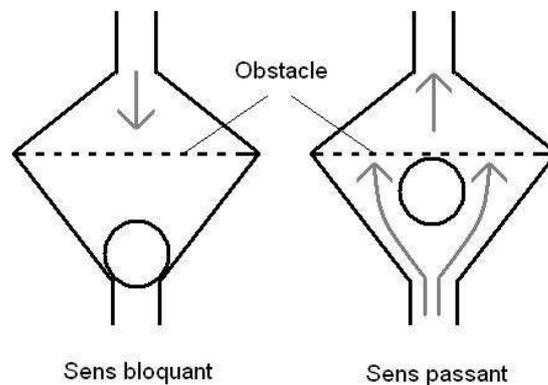


FIG. 3.14 – Schéma de principe d'une diode à partie mobile

Par diode passive, on comprend que la diode ne contient aucun élément mobile ou déformable qui modifierait sa géométrie pour réaliser la fonction de diode. Ces diodes sont basées sur le comportement d'un fluide face à des obstacles ou un circuit particulier dans un canal. Elles sont très simples à fabriquer, le motif permettant leur action est tout simplement moulé en même temps que

le reste du circuit fluide, et sont très fiables. Le seul défaut de ces diodes est leur comportement général : elles n'ont pas un comportement tout ou rien. Pour une différence de pression donnée, le débit sera plus important dans un sens que dans l'autre. Dans des conditions optimales, la différence de débit entre les deux sens de circulation du fluide est de l'ordre de 30% [67, 68]. Ces diodes peuvent permettre en particulier de réaliser une pompe faisant avancer le fluide en moyenne dans un sens à partir d'une sollicitation périodique.

Comme les diodes passives ne sont pas parfaitement bloquantes, elles ne conviennent pas à l'usage que l'on souhaite en faire ici. Afin d'obtenir cette fonction, on a choisit d'utiliser la membrane du système pour réaliser une diode de type "porte". Une diode de ce type a été réalisée récemment par M. Adams [69]. Le modèle qu'il présente est très fragile, et d'une fabrication complexe ; mais il est possible de réaliser un élément plus simple et plus robuste en le plaçant à la sortie du circuit fluide. L'élément en question est une simple trappe réalisée dans la membrane. Lors du remplissage, celle ci se soulève et laisse passer l'air et le liquide qui est aspiré ; tandis que pendant l'injection, elle se retrouve plaquée contre la sortie du circuit de remplissage la fermant ainsi totalement. Ainsi conçue, la diode est très robuste (elle a été testée jusqu'à deux bar), et elle est parfaitement bloquante.

Fabrication

La diode telle qu'elle est conçue a le gros avantage d'exploiter les éléments existant du système, et plus particulièrement la membrane en PDMS. La diode est donc une trappe formée dans la membrane au dessus d'un canal terminant le circuit de remplissage. Sa fabrication est assez délicate toutefois. Afin d'empêcher localement la membrane de coller au reste du système, on intercale un morceau de papier fin (papier à cigarette) entre celle ci et le corps du système lors de l'assemblage de la membrane (figure 3.15). La trappe est ensuite découpée au cutter autour du bout de papier et celui ci est retiré.

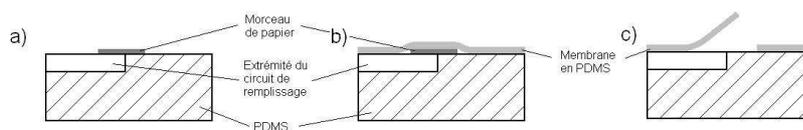


FIG. 3.15 – Fabrication de la diode : a) positionnement du morceau de papier, b) collage de la membrane, c) découpe de la membrane et extraction du papier

Comme précisé précédemment (partie 3.3.1), la membrane se déchire à l'endroit où elle n'est plus collée. Par conséquent, il est nécessaire de faire en sorte que la membrane soit collée tout autour du morceau de papier délimitant la trappe. Les dimensions de ce morceau de papier sont dès lors très restreintes

(quelques centaines de micromètres pour le côté le plus court) ce qui rend sa manipulation délicate. L'opération au cutter nécessite elle aussi du doigté pour ne pas abîmer le reste du système.

D'autres procédés ont été testés pour simplifier la réalisation de cette diode. Le plus prometteur consistait à traiter l'emplacement de la trappe au moyen d'un plasma de CF_4/O_2 plutôt que d'utiliser un morceau de papier. Le plasma CF_4/O_2 peut être utilisé pour graver le PDMS, et il le dégrade en le rendant plus difficile à coller. Toutefois, les résultats n'ont pas été aussi bons que pour la méthode originale.

Conclusion

Plusieurs diodes ont été testées sur le système pour remplir la fonction désirée. En particulier, un type de diode passive et un concept de diode à partie mobile. Comme cela a été évoqué, une diode passive n'étant pas parfaitement bloquante, elle ne convient pas au système. Quant à la microdiode à partie mobile qui a été testée, elle ne fonctionne tout simplement pas. La partie mobile se coince et la diode reste toujours passante, dans les deux sens. Le principal problème est que la microfabrication se fait en deux dimensions et qu'il faut donc gérer le jeu mécanique sur la dimension verticale du canal. Ce jeu conduit à un problème d'arqueboutement (blocage de la partie mobile) contre lequel il est pratiquement impossible de se prémunir.

En revanche, la diode fluïdique à membrane conçue pour le système remplit toutes les conditions nécessaires au fonctionnement de ce dernier. Elle a de plus l'avantage d'exploiter la même membrane que le reste du système ; ce qui simplifie sa fabrication. Toutefois, les étapes de fabrication de cette diode restent trop manuelles et requièrent un certain doigté. Elle peut donc encore être améliorée sur ce point.

3.3.4 Le boîtier et l'assemblage

Le boîtier du système sert en même temps de réservoir de pression. Il englobe le système et permet d'appliquer au choix une pression supérieure ou inférieure à la pression atmosphérique pour déformer la membrane qui recouvre le réseau de chambres (voir figure 3.3). La pression à l'intérieur de ce boîtier est gérée par une pompe de type seringue (qui n'apparaît pas sur la figure 3.3). Il est réalisé par une entreprise spécialisée dans l'usinage de précision.

L'assemblage du système se fait en plusieurs étapes. Tout d'abord, on colle la partie PDMS (c'est à dire le réseau de chambres sur lequel est collé la membrane) sur la matrice d'aiguilles. On procède pour cela à un collage plasma : les deux parties à assembler sont exposées à un plasma d'oxygène puis mises en contact. On profite de la transparence du PDMS pour pouvoir réaliser l'assemblage de ces deux pièces, chaque microréservoir devant s'ajuster à une aiguille.

Le positionnement, réalisé manuellement pour l'instant, pourrait être un jour automatisé. C'est en effet une opération délicate qu'il faut réussir rapidement du fait du faible temps d'action du traitement plasma.

La seconde étape de l'assemblage consiste à placer et coller le boîtier. Celui-ci s'appuie sur la matrice d'aiguilles et englobe tout le système fluide en PDMS (à l'exception de l'entrée du circuit de remplissage). A ce jour, ce collage se fait avec du PDMS. Ce n'est pas très robuste, mais cela garantit une certaine étanchéité de l'assemblage car le PDMS bouche tous les trous.

Enfin, il ne reste qu'à connecter le boîtier à un actionneur de pression. On utilise pour cela une simple seringue avec un tuyau à son extrémité. Le tuyau s'ajuste à un trou de même diamètre percé dans le boîtier.

3.3.5 Conclusion

A l'origine, le système décrit ici avait été pensé comme une simple matrice de réservoirs couverts d'une membrane qui aurait été rempli et vidé au travers des aiguilles. L'ajout d'un circuit de remplissage a complexifié ce concept tant du point de vue du fonctionnement interne du système que de celui de sa fabrication. Toutefois, l'aboutissement est un système fluide adapté à la problématique du projet et d'un usage facile.

3.4 Détails du fonctionnement

Le système présenté dans ces pages est destiné à être utilisé en clinique. Cette partie décrit son fonctionnement en conditions normales, ainsi que les résultats obtenus lors des divers essais.

3.4.1 Utilisation du système

Utilisation normale

Lorsqu'il sera livré pour les essais cliniques, le système sera directement utilisable. Il aura été stérilisé, et les aiguilles seront plantées dans une pièce de PDMS. Les aiguilles sont ainsi protégées contre les chocs pendant le transport, et elles sont bouchées afin de permettre le remplissage du système.

Dans ces conditions, on peut opérer au remplissage comme décrit dans la partie 3.1.2. Pour cela, on place une gouttelette de produit sur la spatule d'entrée du circuit de remplissage puis on l'aspire dans le système en utilisant la seringue. Pour garantir un remplissage complet du système, il faut placer une goutte de 30 μ l et arrêter l'aspiration juste avant qu'elle ne soit complètement entrée dans le système.

On procède ensuite à la mise en place du système sur le patient : on retire la protection des aiguilles, puis on les plante dans la peau. On applique la pression pour injecter le produit au travers des aiguilles, et on procède à l'électroporation. Contrairement à une injection macroscopique où le produit ne retourne jamais dans l'aiguille, il y a un risque pour un système miniaturisé comme celui-ci. Il faut donc maintenir la pression d'injection pendant tout le processus d'électroporation pour maintenir le produit sous la peau.

Réutilisation

Le système de remplissage est initialement prévu pour être à usage unique. Ce qui rend sa réutilisation difficile, c'est que le remplissage ne se déroule bien que si l'intérieur du système fluide est entièrement propre et hydrophobe. Hors, après une première utilisation, il reste du produit à l'intérieur du système, ce qui perturbe son bon remplissage. Le système ne peut donc être réutilisé que s'il est séché.

Le protocole de séchage est simple : le système doit être mis une heure à l'étuve à 110°C. Une température trop élevée pouvant le dégrader, il n'est pas recommandé de dépasser cette consigne ; en particulier, le plastique du boîtier commence à fondre à 120°C.

Stérilisation

La stérilisation se fait à l'autoclave. C'est à dire en chaleur humide : de la vapeur d'eau à 110°C. Après un passage à l'autoclave, de la vapeur d'eau peut s'être condensée à l'intérieur du système le rendant impossible à utiliser, comme après une première utilisation. Pour gérer ce problème, le remède est le même : une heure à l'étuve à 110°C.

3.4.2 Remplissage

Comme cela l'a été évoqué (paragraphe 3.1.4), le réseau de chambre ne se remplit bien que si le PDMS qui le constitue est hydrophobe. C'est un résultat peu commun en microfluidique où l'on recherche généralement l'hydrophilicité des matériaux pour éviter la formation de bulles. Cette particularité est liée à la géométrie complexe du système et plus particulièrement aux changements de sections du circuit lorsqu'un canal débouche sur une chambre.

Remplissage hydrophile et capillarité

Si l'on se place dans une situation où les parois du système sont hydrophiles, on pourra observer le remplissage des canaux du circuit de remplissage par capillarité puisqu'ils sont de section constante (voir 2.1.2). En revanche, dès que ces canaux débouchent sur une chambre de section cinq fois plus grande, la surface liquide/air doit augmenter pour permettre la progression du liquide, ce

qui change l'équilibre des forces.

Pour décrire la situation, on va considérer le cas simple d'un canal circulaire débouchant sur un cône d'angle α à la base (figure 3.16).

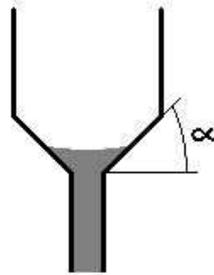


FIG. 3.16 – Impregnation d'un cône

Le travail élémentaire pour déplacer la ligne triple, et donc pour faire progresser un liquide par capillarité peut être décrit par l'équation 3.7 :

$$\delta W = \gamma_{solide/air} \cdot dS_{paroi} - \gamma_{solide/liquide} \cdot dS_{paroi} - \gamma_{liquide/air} \cdot dS_{liquide/air} \quad (3.7)$$

Dans cette équation, δW est le travail élémentaire à apporter pour faire progresser le liquide, γ représente les tensions de surface pour les trois interfaces (solide/air, solide/liquide et liquide/air), dS_{paroi} représente la variation de la surface de la goutte en contact avec le solide et $dS_{liquide/air}$ représente la variation de la surface en contact avec l'air. Comme la paroi est indéformable, la variation de la surface du liquide en contact avec la paroi est égale à l'opposé de la variation de la surface de l'air en contact avec la paroi. C'est pour cela qu'un seul dS_{paroi} intervient dans cette équation.

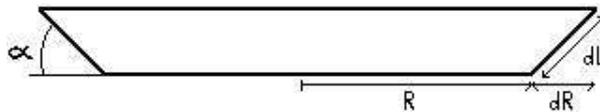


FIG. 3.17 – Tranche de cône et paramétrage

Dans le cas d'un cône, on peut décrire $dS_{liquide/air}$ et dS_{paroi} à l'aide du paramétrage proposé sur la figure 3.17.

$$dS_{\text{liquide/air}} = \pi.(r + dr)^2 - \pi.r^2 \quad (3.8)$$

$$dS_{\text{liquide/air}} = \pi.r^2 + 2.\pi.r.dr + \pi.dr^2 - \pi.r^2 \quad (3.9)$$

$$dS_{\text{liquide/air}} = 2.\pi.r.dr \quad (3.10)$$

$$dS_{\text{liquide/air}} = 2.\pi.r.dl.\cos\alpha \quad (3.11)$$

De même :

$$dS_{\text{paroi}} = 2.\pi.r.dl \quad (3.12)$$

On obtient donc :

$$dS_{\text{liquide/air}} = dS_{\text{paroi}}.\cos\alpha \quad (3.13)$$

En intégrant cette relation 3.13 à l'équation 3.7 on peut écrire le paramètre d'imprégnation du cône 3.14.

$$I_{\text{cône}} = \gamma_{\text{solide/air}} - (\gamma_{\text{solide/liquide}} + \gamma_{\text{liquide/air}}.\cos\alpha) \quad (3.14)$$

On vérifie bien que pour $\alpha = 90^\circ$ on retrouve la condition d'imprégnation d'un tube (équation 2.9) et pour $\alpha = 0^\circ$, on retrouve la condition d'étalement simple (équation 2.8). On notera toutefois que contrairement à l'étalement simple où on considère que l'on dispose d'un volume de liquide à étaler sur une surface, le volume de départ est dans ce cas nul. Ce qui signifie qu'à moins d'avoir les conditions d'un mouillage total, le liquide ne progressera pas sur cette surface. On peut encore introduire la relation de Young dans l'équation 3.14 et obtenir une condition simple d'imprégnation du cône.

$$I_{\text{cône}} = \gamma_{\text{liquide/air}}.(cos\theta_E - cos\alpha) \quad (3.15)$$

Le liquide ne peut donc progresser dans le cône par capillarité que si $\alpha > \theta_E$. Cette condition ne peut être remplie dans notre système à l'endroit où les canaux de remplissage débouchent sur les chambres ; à moins de leur donner une forme qui serait coûteuse à la fois en termes d'espace occupé et de volume de liquide gaspillé dans le système. Il n'est donc pas possible d'exploiter les forces capillaires pour remplir le système.

Remplissage hydrophobe

Pour remplir un microcircuit fluide hydrophobe, on est obligé de se munir d'un système de pompage. On doit être alors capable de fournir une force suffisante pour dépasser la résistance des forces capillaires (les forces gravitationnelles étant insuffisantes dans un microsystème). Dans cette partie, on considère donc que le liquide est aspiré (ou poussé) par une pompe de type seringue.

A cette échelle, la forme prise par le liquide lorsqu'il remplit une chambre est conditionnée par la tension de surface du liquide. Le travail élémentaire à apporter pour augmenter le volume de liquide dans la chambre est donc égal au travail à fournir pour l'augmentation de la surface entourant ce volume. Cette surface a deux parties : une partie du liquide est en contact avec le solide (le PDMS ici) et l'autre partie est en contact avec l'air.

La relation de Young (équation 2.7) permet de simplifier l'équation 3.7 en faisant intervenir l'angle de contact θ_E . Cette relation (3.16) est d'autant plus simple que, pour une solution aqueuse dans un PDMS hydrophobe, θ_E vaut 90° et donc le travail élémentaire δW ne dépend que de l'évolution de la surface de contact entre l'air et le liquide.

$$\delta W = \gamma_{\text{liquide/air}} \cdot (\cos(\theta_E) \cdot dS_{\text{paroi}} - dS_{\text{air}}) \quad (3.16)$$

Dans ces conditions, la forme prise par la goutte de liquide dans le système est simple à prévoir : elle évolue simplement en gardant minimale la surface liquide/air. Cette surface prend donc des formes en fraction de sphère, ou de cylindre circulaires (figure 3.18).

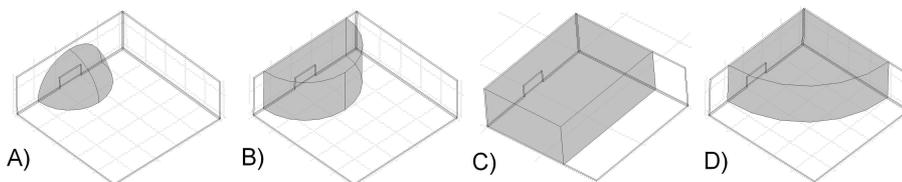


FIG. 3.18 – Schéma de l'évolution du liquide dans une chambre lors du remplissage. A) Quart de sphère au départ, B) Demi cylindre lorsque la paroi haute est atteinte, C) Parallélépipède quand 5 parois sont touchées, D) Quart de cylindre en cas de remplissage dissymétrique

Cette prise de forme est naturellement une approximation négligeant les effets dynamiques au cours du remplissage. En particulier, la surface du PDMS n'est pas parfaitement homogène, et l'angle de contact à l'avancée du liquide n'est pas toujours exactement de 90° . Cependant, les résultats observés correspondent très bien à cette approximation.

Résultats

L'observation du remplissage permet de s'assurer qu'il s'opère bien et de manière répétable. La méthode choisie permet de remplir complètement le système avec une excellente répétabilité. La figure 3.13 montre le résultat de ce procédé.

La figure 3.19 présente le remplissage normal d'une chambre. Dans ce cas de figure, on observe que l'angle de contact entre le PDMS et la goutte d'encre est légèrement supérieur à 90° . De ce fait, les coins du réservoir ne se remplissent pas bien. Toutefois, les coins du réservoir sont justement les emplacements dont le liquide n'est pas éjecté par le système. Ce n'est donc pas un défaut grave de remplissage ; cela peut même être considéré comme une bonne chose puisque le volume mort se trouve réduit (bien que de manière négligeable). D'autre part, l'importante pression interne dans ces petites bulles les conduits à se résorber rapidement par diffusion de l'air dans le PDMS. On l'observe très bien pour le coin supérieur droit de cette chambre : en l'espace de quelques secondes (entre les images 3 et 4), la bulle a totalement disparu.

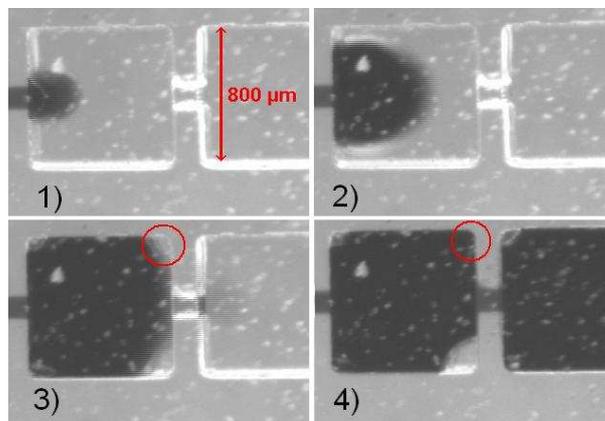


FIG. 3.19 – Etapes du remplissage d'une chambre ; la bulle d'air dans le coin en haut à droite est absorbée dans le PDMS en quelques secondes

La forme des chambres a une grande importance dans le remplissage. Pour le système de la figure 3.20, les faces hautes et basses du réservoir ne sont pas bien parallèles. De ce fait, le remplissage ne s'opère pas de manière symétrique et l'encre ne s'attache qu'à l'un des cotés du réservoir lors du remplissage. On se retrouve dans le cas de figure D) de la figure 3.18 et le remplissage du réservoir est mauvais.

Pour finir, il est assez simple d'obtenir un remplissage parfait du système moyennant quelques artifices. La meilleure solution en ce sens consiste à remplir les réservoirs par les coins comme montré sur la figure 3.21. Dans ce cas, la chambre se remplit entièrement et régulièrement sans laisser d'espace pour d'éventuelles bulles d'air. Si cette solution n'a pas été adoptée pour le système d'Angioskin, c'est surtout parce que les petites bulles d'air restant parfois dans les coins des chambres ne sont pas gênantes. Il est aussi préférable de garder l'ouverture au centre de la paroi afin que la membrane se déforme mieux lors de l'éjection de produit.

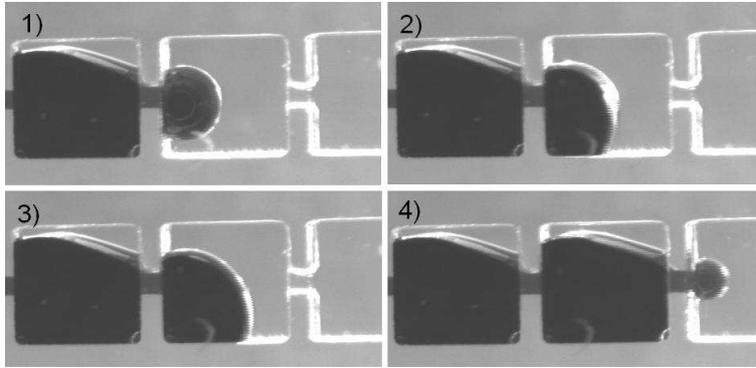


FIG. 3.20 – Mauvais remplissage causé par un défaut géométrique du système

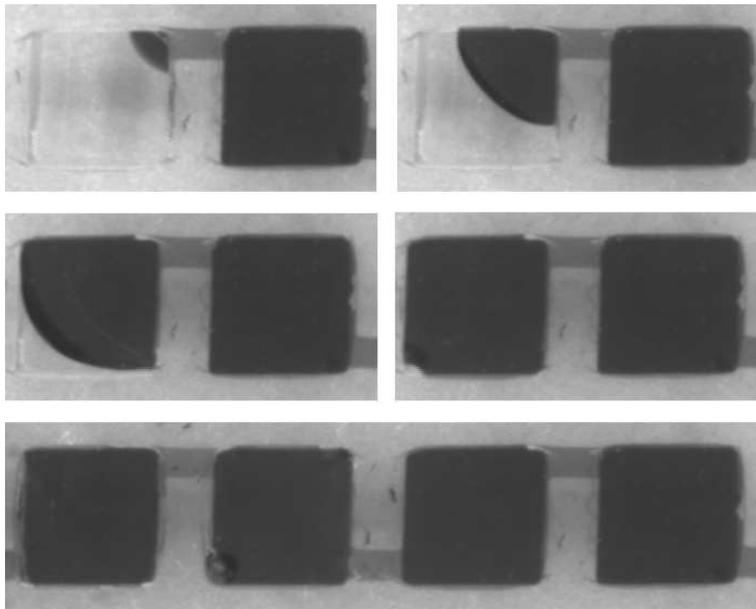


FIG. 3.21 – Progression de l'encre lors d'un remplissage par les coins. Pour ces images, la chambre est remplie en 2.5s

3.4.3 Résultats d'injection

Premiers résultats

Les premiers résultats de distribution de liquide par le système ont permis de s'assurer de son bon fonctionnement. Ces essais se font dans l'air ; il n'y avait donc pas de résistance hydrodynamique importante comme pour une injection dans la peau. Toutefois, il était plus facile ainsi de quantifier la quantité de produit éjecté au travers d'une aiguille et donc de vérifier d'une part la quantité pouvant être injecté et d'autre part l'uniformité de la distribution. La figure 3.22 présente le résultat de ces tests. Le volume éjecté au travers des aiguilles est de $120\text{nl} \pm 19\text{nl}$, et le produit est distribué par 80% des aiguilles. Les 20% d'aiguilles ne distribuant pas l'encre ont été bouchées accidentellement au cours du processus de fabrication et d'assemblage du système.

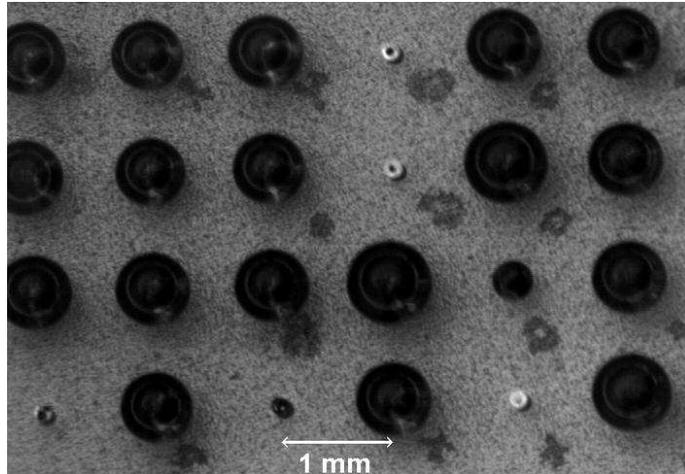


FIG. 3.22 – Résultat d'éjection dans l'air

Injection dans la peau

Pour valider définitivement le système, des tests d'injection dans la peau devront être réalisés. L'injection dans la peau devrait présenter des différences significatives par rapport à l'injection dans l'air, la peau présentant une résistance bien plus importante. Comme nous ne disposons pas encore de matrice de microaiguilles pouvant percer la peau, ces tests n'ont pu être réalisés à ce jour.

3.5 Conclusion

Le système fluide développé au cours de ce travail de thèse permet la distribution homogène d'une quantité contrôlée de liquide. Sa conception a pris

en compte toutes les contraintes liées à la manipulation d'ADN. En particulier, il est possible de manipuler de petites quantités de produit tout en limitant le gaspillage de ce dernier, et des tests ont été réalisés pour vérifier que l'ADN ne risquait pas d'être dégradé dans le système. Les objectifs spécifiés dans le cahier des charges ont donc été atteints.

Ce système reste toutefois perfectible. Sa fabrication artisanale est longue et délicate ; il est donc difficile de le produire en grande quantité avec les moyens d'un laboratoire. Hors il a été conçu pour un usage unique et une grande quantité de tests devra être menée au cours de la phase de validation biologique du projet Angioskin. Il est actuellement possible de le réutiliser moyennant une procédure de nettoyage et séchage assez longue, mais cela ne constitue pas une solution confortable au problème.

Pour finir, il est difficile actuellement de comparer l'injection d'ADN au travers de microaiguilles avec d'autres méthodes d'administration transdermique. Bien que le procédé soit très prometteur, il n'a encore donné aucun résultat concret.

Chapitre 4

Cellules et microsystemes

Du fait de leurs dimensions similaires, les microsystemes fluidiques sont de bons moyens pour étudier les cellules individuellement, ou en petites quantités [70, 71]; et inversement, les cellules peuvent y servir de micro réacteurs chimiques [72, 73], voir même d'actionneurs mécaniques [74]. Les projets présentés dans cette partie portent sur un microsysteme pour l'étude de l'influence de gradient de concentration d'espèces chimique sur des populations de cellules, et sur la culture de cellules en microcanal pour simuler une artère in vitro.

4.1 Le projet IFR

Le savoir faire acquis dans la réalisation du système de distribution microfluidique peut être exploité dans d'autres contextes. Le système a donc été revu en insistant cette fois sur l'aspect "Réseau de chambres individualisable" dans le cadre d'un projet de recherche de l'institut d'Alembert (IFR 121). Ce projet est mené en collaboration avec le laboratoire de biologie de Cachan, le LBPA.

4.1.1 Contexte

La recherche en biologie nécessite parfois de tester l'influence d'un paramètre sur la santé d'une population de cellules. Dans le cadre d'une étude pharmacologique en particulier, il faut pouvoir tester différentes concentrations d'un produit sur différentes populations de cellules afin de déterminer un seuil critique de toxicité ou d'efficacité. Les microsystemes offrent une solution élégante à ce problème en permettant de limiter les quantités de produits et cellules utilisés dans ces tests tout en permettant de les paralléliser à grande échelle [70, 71, 75].

On s'intéressera à terme dans ce projet à l'étude de la différenciation des cellules souches. Au cours de leur développement, les cellules souches embryonnaires, toutes identiques, se différencient pour donner naissance à tous les tissus

du corps humain. Comprendre et contrôler ce phénomène de différenciation cellulaire pourrait permettre, par exemple, de régénérer des tissus abimés, voir de reconstituer des organes complets *in vitro* à partir de cellules souches prélevées sur le patient. Elles font donc actuellement l'objet de beaucoup de recherches dans le domaine de la médecine.

Le phénomène de différenciation cellulaire est en partie piloté par la concentration locale de certaines espèces chimiques. Pour mieux le comprendre, il faudrait réaliser de très nombreuses expériences afin d'évaluer l'influence de tous les paramètres. On cherche donc à réaliser un système permettant de faire ces expériences en séries. L'idée présentée dans la suite de ce chapitre est de mettre des cellules en cultures dans une matrice de réservoirs, puis de les mettre en présence d'une concentration variable de deux produits donnés. Dans un premier temps, ce même système pourra être utilisé pour mener une étude de toxicologie sur des cellules de foie en analysant la réponse des cellules en culture en fonction de la concentration locale de produit.

4.1.2 Description du système

Les différentes parties

Tout comme le coeur du système de distribution d'Angioskin, ce système est constitué d'une matrice de réservoirs. Les réservoirs sont connectés entre eux par des canaux assez grands pour laisser passer une population de cellules (soit au moins $100 \times 100 \mu\text{m}$ de section). Un système de vannes au niveau des canaux permet d'ouvrir ou de fermer les connexions entre les chambres. Les vannes sont constituées d'une membrane en PDMS pouvant se déformer à l'intérieur des canaux comme celles décrites par l'équipe de S. Quake [64]. La déformation de la membrane est contrôlée par la mise sous pression d'un second circuit fluide situé sous le réseau de chambres (voir figure 4.1 et photo 4.2).

Les deux circuits fluidiques sont indépendants. D'un côté, le réseau de chambres est connecté à plusieurs réservoirs pour manipuler les produits et les cellules traités par le système. De l'autre côté, le circuit de fermeture des vannes n'est connecté qu'à une simple entrée permettant de le remplir d'eau et de le mettre (ou non) sous pression. La fabrication des deux circuits se fait par moulage. Ils sont ensuite collés de part et d'autre de la membrane réalisée, elle, par enduction centrifuge.

Principe

L'objectif de ce système est de profiter de la répartition des concentrations de deux produits par diffusion dans le système pour évaluer l'action d'un gradient de concentration de ces produits sur l'évolution d'une population de cellules. Pour cela, des cellules sont mises en culture dans les chambres du système. Les propriétés de biocompatibilité du PDMS permettent la culture de cellules à sa

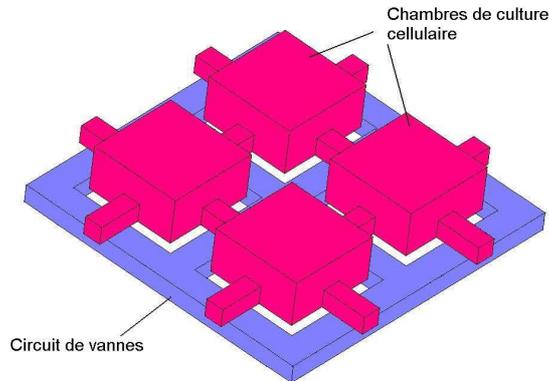


FIG. 4.1 – Géométrie du système

surface moyennant quelques traitements préalables ; ces procédés font partie du savoir faire de l'équipe BIOMIS [76]. Une fois les cellules mises en place, elles sont exposées aux produits évalués.

La diffusion est un moyen simple de réaliser un gradient de concentrations, et a fait l'objet de plusieurs travaux en microfluidique [77, 78]. Les produits à évaluer sont placés aux entrées du réseau de chambres à partir desquelles ils diffusent dans tout le système. Lorsque les concentrations des produits se sont convenablement réparties (au bout de quelques heures), le système de vannes permet de stopper la diffusion, et de conserver ainsi la répartition de concentrations obtenue. Le système peut alors être mis plusieurs jours à l'incubateur pour permettre aux cellules de se développer. La répartition des concentrations obtenue par diffusion est logarithmique. Cela permet d'observer dans un même système l'influence de concentrations différentes de plusieurs ordres de grandeur. Les cellules et leur développement sont étudiés après plusieurs cycles de divisions cellulaires.

4.1.3 Fonctionnement

La figure 4.3 présente le schéma de principe du système. Son exploitation se déroule en trois parties essentiellement : le remplissage du système, la mise en culture des cellules et enfin, la mise en place du gradient de concentration.

Remplissage

Les deux parties présentées dans la figure 4.3 sont remplies de manière différente. Tout d'abord, le circuit de fermeture des vannes est rempli avec de l'huile. Le PDMS étant lipophile, l'huile entre dans les canaux par capillarité,

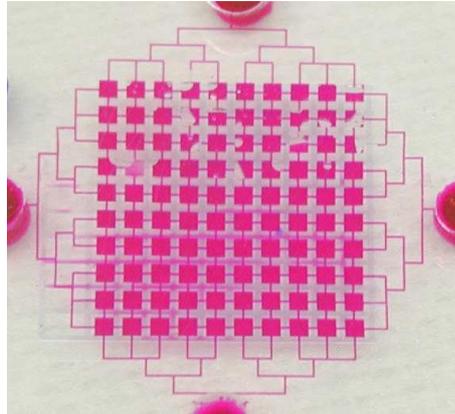


FIG. 4.2 – Photo du système ; pour la visualisation, de l'encre rouge a été injectée dans les chambres, et de l'encre bleue dans le circuit de fermeture des vannes

et les forces capillaires sont suffisamment élevées pour chasser l'air des canaux par diffusion au travers du PDMS. Il suffit donc pour ce remplissage de placer une goutte d'huile à l'entrée du circuit et d'attendre une demi journée pour que l'huile ait complètement remplacé l'air initialement présent dans ce circuit.

Pour remplir le réseau de chambres avec du milieu de culture cellulaire (RPMI-1640, Sigma), on procède à un remplissage sous vide. En effet, le milieu de culture étant de nature aqueuse, il ne peut entrer dans des canaux en PDMS (hydrophobes) par capillarité. Pour cela, on isole le circuit de fermeture des vannes (en le bouchant) pour que l'huile ne se mélange pas au milieu de culture, puis on plonge le système dans un bain de milieu de culture. On met alors le tout sous vide et l'air contenu dans les chambres sort du système, de même qu'une partie de l'air emprisonné dans le PDMS. Lorsque l'on remet le tout à pression atmosphérique, le milieu de culture envahi le vide dans les chambres. Le PDMS absorbe finalement les bulles d'air restantes (figure 4.4).

Répartition des cellules

Avant l'insertion de cellules dans le système, celui ci est laissé pendant une nuit avec du milieu de culture seul. L'expérience a montré que cela améliorait l'adhésion des cellules sur le PDMS. Cet effet est probablement causé par la diffusion d'éléments du milieu de culture dans le PDMS améliorant ainsi ses qualités de biocompatibilité. Du milieu de culture contenant les cellules est ensuite injecté avec une seringue dans le système par les entrées du réseau de chambres. En injectant et aspirant alternativement la solution au travers de chacune des quatre entrées, on obtient une bonne répartition des cellules dans le système.

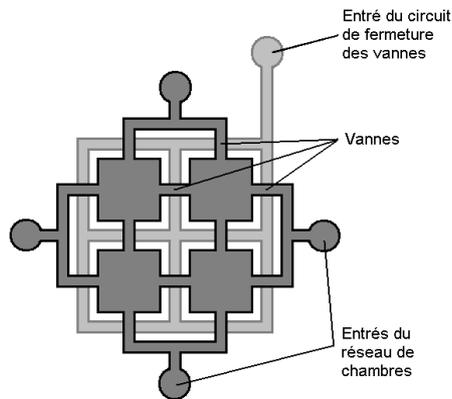


FIG. 4.3 – Schéma de principe du système

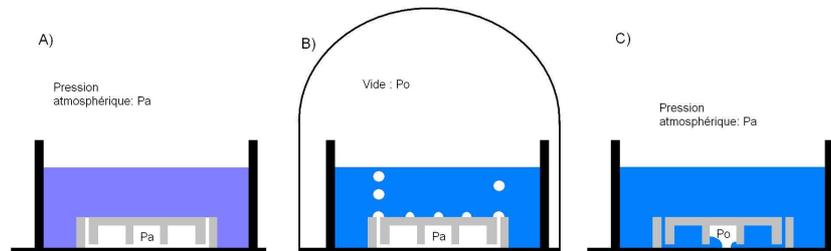


FIG. 4.4 – Principe du remplissage sous vide : A) on plonge le système dans la solution dont on souhaite le remplir, B) on met le tout sous vide : l'air sort du système, mais aussi du PDMS qui en contient un peu, C) On remet le tout à pression atmosphérique, le liquide envahi les chambres vides et l'air restant est absorbé par le PDMS

Mise en place du gradient de concentration

Les produits à tester sont placés dans deux des réservoirs d'entrée pour leur permettre de diffuser dans tout le réseau de chambres. Le système est alors mis à l'incubateur le temps que la diffusion génère la répartition de produits souhaitée. Le moment venu, le circuit de fermeture des vannes est mis sous pression afin d'isoler les chambres et donc de stopper le phénomène de diffusion. Le système est enfin laissé à l'étuve pour le temps de l'étude. Compte tenu de la longue durée de l'étude, l'évaporation des produits est à surveiller. Afin de la limiter, on veille à ce que le système soit placé dans une atmosphère à pression de vapeur saturante en eau ; mais il peut être nécessaire de remettre un peu de milieu de culture dans les réservoirs d'entrée. Il ne reste alors qu'à observer l'évolution de la population de cellules et mener l'étude biologique.

4.2 Projet IFR, étude préliminaire

4.2.1 Diffusion

Modèle numérique

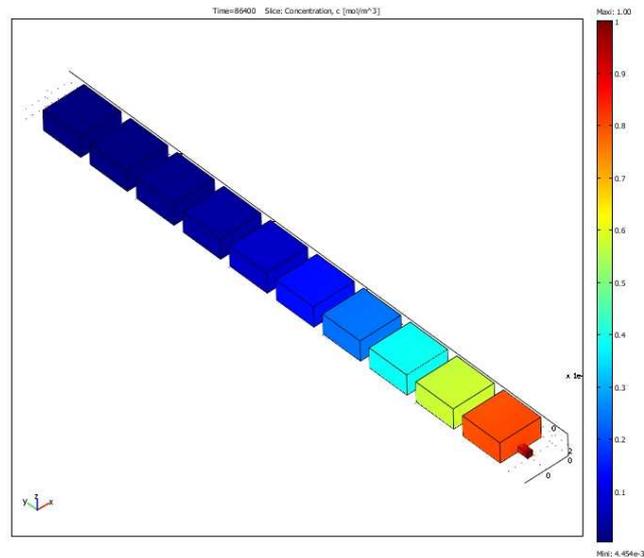


FIG. 4.5 – Diffusion d'un composé chimique dans une série de chambres

Le modèle est réalisé avec Comsol 3.3. Il simule la diffusion d'un soluté dans une rangée de 10 chambres. Les chambres ont une base carrée de $800 \mu\text{m}$ de coté et une hauteur de $400 \mu\text{m}$ (soit un volume de $0,256 \text{ mm}^3$ chaque) et sont séparées par un canal de section carrée de $100 \mu\text{m}$ de coté sur une longueur de $200 \mu\text{m}$. Comme montré sur la figure 4.5.

Ce modèle comporte 44000 éléments (bien qu'un modèle plus simple avec 3500 éléments ait donné les mêmes résultats) et représente la diffusion dans de l'eau d'un composé dont le coefficient de diffusion est de $5 \cdot 10^{-10}$ (coefficient de diffusion de la fluorescéine dans l'eau). Les figures 4.6 et 4.7 présentent l'évolution de la concentration dans le modèle en fonction de la distance à l'origine où la concentration est fixée à 1 mol/L . La répartition de concentration est présentée en fonction du temps de diffusion (6, 12 ou 24 heures) en valeurs réelles (figure 4.6) et en logarithme (figure 4.7).

Ce modèle permet de voir que les sauts de concentration se font dans les canaux, plus étroits, tandis que dans chaque chambre, la concentration est uniforme. On vérifie aussi que l'on peut changer le gradient de concentration en jouant sur le temps de diffusion (cad. le temps au bout duquel on ferme le réseau

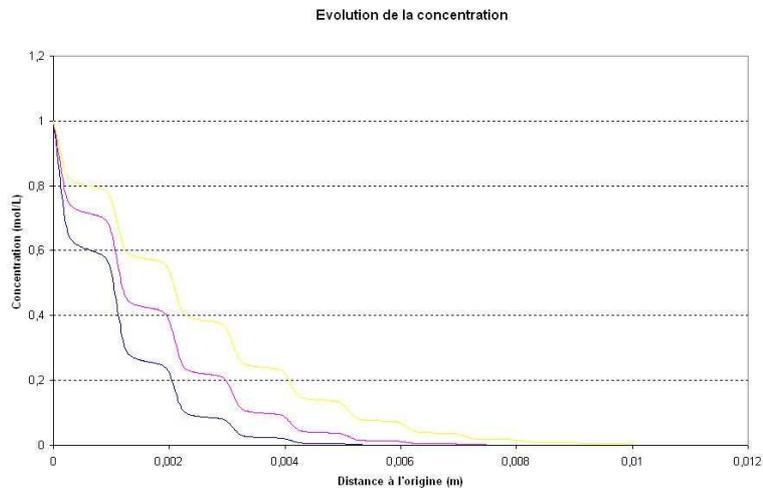


FIG. 4.6 – Concentration dans la rangée de chambres

de vannes) et donc choisir la plage de concentrations sur laquelle travailler. On peut ainsi obtenir des concentrations différentes de plusieurs ordres de grandeurs dans un même système, comme requis.

Vérification expérimentale

Une vérification de principe a été réalisée avec deux produits fluorescents : de la fluorescéine, et de la rhodamine. On fait ainsi diffuser dans le réseau de réservoirs soit l'un de ces produits, soit les deux, pour vérifier que la diffusion croisée se déroule normalement. On observe ensuite le système par fluorescence, et l'intensité lumineuse permet de visualiser la concentration.

La figure 4.8 présente l'observation par fluorescence des concentrations de fluorescéine et de rhodamine. L'observation par fluorescence ne permet d'observer expérimentalement que deux ordres de grandeur de concentration dans le système. Il est donc difficile avec nos équipements de visualiser toute la plage de concentration théorique. On voit sur cette figure quatre chambres dans lesquelles les deux produits ont diffusé : la rhodamine vient du haut de l'image tandis que la fluorescéine vient de la droite. On constate sur ces images que les concentrations ne se répartissent pas équitablement. Si les deux produits avaient diffusé séparément, on devrait observer la même concentration de rhodamine dans les deux chambres du haut et la même concentration de fluorescéine dans celles de droite. Or la chambre située en haut à droite montre une faible concentration de rhodamine et de fluorescéine. Il est donc à prévoir que les affinités chimiques des deux composants que l'on souhaite faire diffuser de cette manière auront

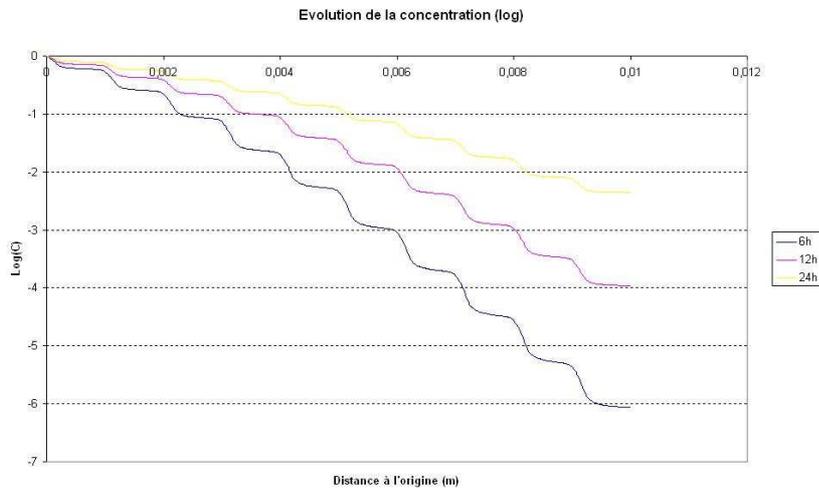


FIG. 4.7 – Concentration dans la rangée de chambres

une influence sur la répartition des concentrations dans le système. De fait, et comme nous l'avons vérifié par la suite, la fluorescéine et la rhodamine ne se mélangent pas bien.

La réalisation d'un gradient de concentration d'un seul produit est donc très simple à obtenir ; il faut en revanche bien connaître les propriétés chimiques des deux produits que l'on va utiliser pour réaliser un gradient croisé de concentration. En effet, outre le fait que ces produits peuvent réagir chimiquement entre eux, ils n'ont pas nécessairement le même coefficient de diffusion, et ne se répartiront donc pas dans le système à la même vitesse. Pour ce dernier point, il est éventuellement possible d'adapter la géométrie du système pour favoriser

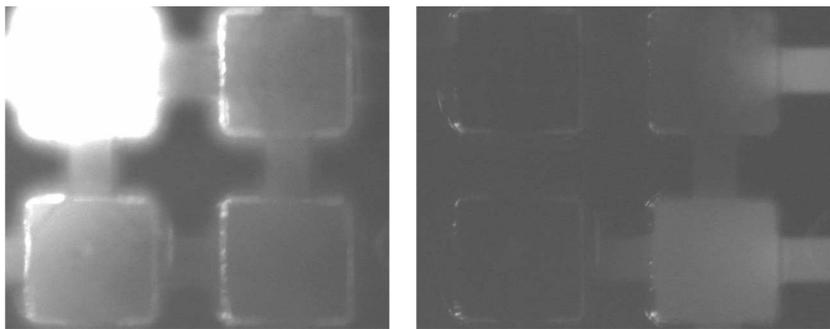


FIG. 4.8 – Diffusion croisée de rhodamine et de fluorescéine dans un micro-système. A gauche, visualisation de la rhodamine et à droite, la fluorescéine

la diffusion dans une direction par rapport à l'autre et donc ajuster le temps de diffusion relatif des deux produits.

Parmi les évolutions possibles de ce système, on pourrait envisager de le doter de deux circuits de vannes indépendants. Cela permettrait de stopper la diffusion de l'un des produits avant l'autre. On peut aussi tout simplement avoir des canaux plus larges dans une direction que dans l'autre augmentant ainsi la vitesse de diffusion des produits d'une chambre à une autre dans cette direction.

Conclusion

La diffusion est un phénomène très simple à exploiter pour créer un gradient de concentration. Pour peu que l'on connaisse les propriétés chimiques du produit que l'on fait diffuser, il est facile de prévoir la répartition des concentrations dans le réseau de chambres à un instant donné. L'exploitation de ce phénomène permet d'avoir au moyen d'un protocole très simple, et avec des moyens restreint une grande plage de concentrations pour réaliser les études biologiques attendue.

4.2.2 Viabilité des cellules

Le système ne permettant pas la circulation de fluides au cours de la période expérimentale, l'oxygène et les nutriments nécessaires au bon fonctionnement des cellules peuvent venir à manquer. Il est donc impossible de cultiver des cellules dans ces conditions pendant une longue période. Toutefois, pour qu'une étude puisse être menée avec ce système, les cellules doivent pouvoir survivre et se développer le temps de plusieurs cycles de divisions cellulaires; c'est à dire pendant au moins cinq jours. La croissance des cellules dans le système a donc été étudiée.

Principe

Comme les nutriments ne peuvent être renouvelés au cours de l'expérience, il a été décidé de réaliser des réservoirs suffisamment grands pour que les cellules aient au départ tout le nécessaire pour se développer pendant une semaine. Dans une étude d'E. Leclerc [79], les cellules se développent normalement pendant près de cinq jours sans aucun apport extérieur dans des microchambres en PDMS. Les réservoirs de notre système ont donc été créés plus grands pour augmenter la réserve de nutriment et donc tenter d'assurer une survie à plus long terme de la population de cellules.

La porosité du PDMS aux gaz permet pour sa part d'assurer un certain renouvellement de l'oxygène dans les réservoirs. Le coefficient de diffusion de l'oxygène dans le PDMS (D_{PDMS}) vaut $4,1 \cdot 10^{-5} \text{cm}^2 \cdot \text{s}^{-1}$. Pour avoir les meilleurs échanges possibles, le plafond des réservoirs doit être le plus fin pos-

sible; une épaisseur de $200\mu\text{m}$ semblant être un bon compromis [79]. Toutefois, l'épaisseur du plafond n'est pas encore contrôlée dans notre procédé de fabrication du système.

Vérification expérimentale

Pour ces tests, le réseau de chambres a été préalablement rempli d'eau en salle blanche au moyen d'un remplissage sous vide (comme présenté au paragraphe 4.1.3). Dans le laboratoire de biologie, l'eau est remplacée par du milieu de culture cellulaire contenant un peu d'antibiotique (gentamicine) afin de stériliser le système. Le système est laissé ainsi pendant une nuit à l'incubateur.

Les cellules sont ensuite prélevées de leur culture et mises en suspension dans une solution de milieu de culture. On utilise pour cette étude des cellules M44; ce sont à l'origine des cellules immortalisées de rats. La solution contient 10^5 cellules par millilitre ce qui permet d'avoir une dizaine de cellules par chambre. Elles sont injectées dans le système à l'aide d'une seringue comme décrit au paragraphe 4.1.3.

Le système est ensuite mis à l'étuve à 37°C pour que les cellules puissent vivre et se développer. Pour limiter l'évaporation, l'ensemble du système est mis dans une boîte de pétri remplie d'eau afin d'être en atmosphère humide. Les cellules sont enfin surveillées régulièrement et observées au microscope pendant une semaine.

Résultats

Du point de vue de la répartition des cellules dans le système, les résultats sont très bons. Lorsque l'on n'injecte qu'une faible quantité de cellules, on se retrouve fatalement avec un certain nombre de chambres sans cellules, mais on obtient tout de même aisément une moyenne de dix cellules par chambre, avec la majorité des chambres comprenant entre 5 et 20 cellules. En revanche, pour une concentration plus importante, la répartition se fait de manière plus homogène, et très satisfaisante compte tenu de la simplicité du mode opératoire.



FIG. 4.9 – Evolution de la population de cellule dans l'une des chambres au bout de trois, six et huit jours (environ 40, 120 et 150 cellules, de gauche à droite)

En ce qui concerne la survie et le développement des cellules, les résultats préliminaires sont plus mitigés : dans un même système, une chambre peut avoir une population de cellules en parfaite santé et en plein développement tandis qu'une autre chambre peut voir mourir toute sa population de cellules en quelques jours. La cause de ces résultats aléatoires est probablement due au fait que les tests préliminaires ont été réalisés avec peu de cellules (10 en moyenne par chambre) et que ces cellules ne produisaient alors pas suffisamment de facteur de croissance : une protéine régulant le développement d'une population de cellules. On a pu malgré tout observer des cellules vivant et se développant parfaitement dans le système sur une période de 8 jours comme montré dans la figure 4.9 où la population évolue d'une quarantaine de cellules à près de cent cinquante.

4.2.3 Conclusion et perspectives

Ces travaux constituent avant tout une étude de faisabilité pour le projet. Ils ont de ce point de vue apporté beaucoup d'informations très positives. En particulier, au sujet de la manipulation des cellules, on est parvenu à les répartir de façon homogène dans le système sans avoir recours à des manipulations complexes. D'autre part, on a pu vérifier que malgré le fait que les cellules soient enfermées dans de petits réservoirs, elles ont suffisamment d'éléments nutritifs et d'oxygène pour continuer à se développer pendant une semaine.

4.3 Culture de cellules dans un microcanal

L'un des principaux attraits des microsystèmes fluidiques, est de permettre de réaliser des modèles *in vitro* de fonctions, ou d'organes vivants [80]. Ainsi, au sein de l'équipe Biomis, Laurent Griscom travaille sur un modèle de peau en cultivant des cellules nerveuses et des cellules de peau sur une même puce [81, 82]. Le projet présenté ici porte sur la réalisation et l'étude d'un modèle de vaisseau sanguin. Il est réalisé au sein du laboratoire du professeur Kitamori à l'université de Tokyo durant un séjour de deux mois au cours de l'été 2007.

4.3.1 Principe de l'expérience

Contexte

Les parois des vaisseaux sanguins sont constituées de cellules endothéliales. Ces cellules servent principalement à contenir le sang dans les veines tout en permettant les échanges nutritifs avec les tissus environnants. Elles participent aussi à la réponse inflammatoire en produisant des molécules d'adhésion cellulaires qui influencent la migration des leucocytes dans les tissus irrités [83]. Les cellules endothéliales sont soumises en permanence à des contraintes mécaniques liées à la déformation des vaisseaux sanguins d'une part, et aux forces de cisaillement générées par la circulation sanguine d'autre part.

La culture de ces cellules dans un microcanal en verre offre la possibilité de les étudier dans des conditions proches de leur état naturel, tout en gardant un accès visuel pour les observer. Les protocoles de mise en culture de ces cellules dans un microcanal ont été élaborés dans le laboratoire du professeur Kitamori par Yo Tanaka [84]. L'accès visuel aux cellules permet en particulier d'utiliser des marqueurs fluorescents pour les étudier. Les travaux présentés ici ont porté sur la mise en place de protocoles d'immunomarquage dans le microcanal.

L'immunomarquage

L'immunomarquage permet de reconnaître des molécules particulières. Pour cela, on utilise des anticorps que l'on peut visualiser par fluorescence, et qui se fixent spécifiquement sur la molécule à reconnaître (l'antigène).

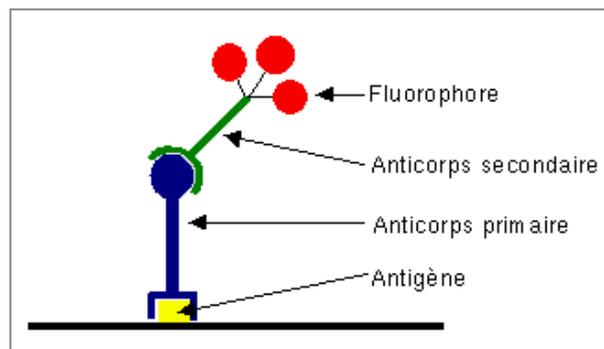


FIG. 4.10 – Principe de l'immunomarquage

Le principe de marquage est simple : la préparation contenant la molécule à mettre en évidence est plongée dans une solution contenant l'anticorps dit primaire. Celui-ci se fixe de façon spécifique à l'antigène recherché. Après rinçage, l'excès d'anticorps est évacué et il ne reste que celui s'étant fixé. Cet anticorps pourrait être directement porteur du marqueur fluorescent, toutefois on utilise généralement un second anticorps, porteur du marqueur fluorescent, et pouvant se fixer à l'anticorps primaire (figure 4.10). Cette technique indirecte a plusieurs avantages. D'un point de vue pratique d'abord, il est plus simple de produire un seul anticorps fluorescent pour une batterie de marqueurs spécifiques ; mais cela amplifie aussi le signal puisque l'anticorps primaire va pouvoir accrocher plusieurs anticorps secondaires.

4.3.2 Réalisation

Concept et assemblage de la puce

Le canal est réalisé dans une lame de verre. Il a une forme semi circulaire et mesure $200\mu\text{m}$ de large et $100\mu\text{m}$ de profondeur au maximum sur six centimètres de longueur. Un support métallique simplifie sa manipulation, et surtout les connexions fluidiques (figure 4.11).

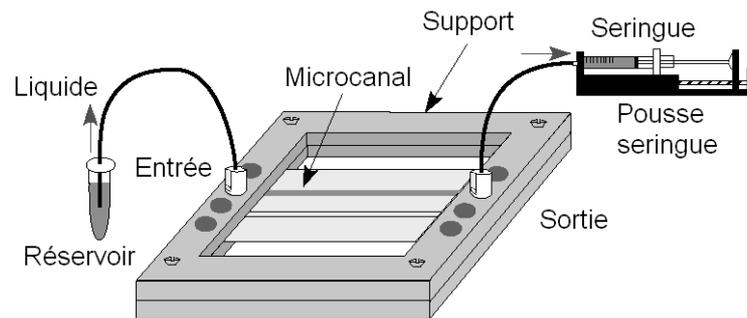


FIG. 4.11 – Le microcanal et son environnement

A chaque extrémité du canal, la connexion est réalisée en vissant l'embout des tuyaux extérieurs dans le support métallique pour les mettre en contact avec la lame de verre et l'entrée du canal. Un joint torique assure l'étanchéité du montage. Une seringue est connectée au tuyau de sortie pour la mise en mouvement des fluides par aspiration tandis que le tuyau d'entrée est connecté aux réservoirs de produits que l'on fait circuler dans le canal.

Mise en culture des cellules

Avant l'introduction des cellules, la surface intérieure du microcanal est modifiée par dépôt de protéines favorisant l'adhésion cellulaire. Le canal est d'abord rempli de Poly-L-lysine (Sigma) pendant une heure, puis on y introduit du Matrigel (Becton Dickinson) pendant deux heures. Après cette étape préliminaire, le canal est rempli de milieu de culture, et les cellules peuvent être introduites.

Les cellules sont introduites dans le canal et mises à l'incubateur pendant deux heures. Durant cette étape, le fluide n'est pas mis en mouvement dans le canal puisqu'il faut permettre aux cellules de se déposer sur les parois et d'y adhérer. Après deux heures, le fluide doit être mis en mouvement pour assurer l'approvisionnement en nutriments et en oxygène aux cellules dans le canal. Toutes les cellules qui n'ont pas adhéré aux parois sont alors emportées par le courant. Les cellules restantes (la très grande majorité si l'expérience s'est bien déroulée) commencent alors à envahir les parois du canal en se multipliant par division cellulaire.

Protocole de marquage des cellules

Le marquage des cellules dans le microcanal n'est pas très différent des protocoles de marquage dans de simples puits. La séquence de produits à appliquer est la même, et on change uniquement le réservoir d'entrée du système pour introduire les différents produits. Le protocole se présente comme suit :

Fixation des cellules Le canal est rempli d'une solution de paraformaldehyde (4%) pour tuer et immobiliser les cellules. Durée : 20 min ; débit : $0,7\mu\text{l}/\text{min}$; température : 37°C .

Rinçage Le canal est rincé avec du PBS (Phosphate Buffered Saline). Durée : 15 min ; débit : $0,7\mu\text{l}/\text{min}$; température : 20°C .

Ouverture (facultatif, marquage du noyau) Les parois cellulaires sont percées chimiquement (Triton X-100) pour permettre aux marqueurs de pénétrer à l'intérieur des cellules. Durée : 10 min ; débit : $0,7\mu\text{l}/\text{min}$; température : 20°C .

Rinçage PBS ; Durée : 15 min ; débit : $0,7\mu\text{l}/\text{min}$; température : 20°C .

Premier anticorps Durée : une nuit ; pas de circulation ; température : 4°C .

Rinçage PBS ; Durée : 15 min ; débit : $0,7\mu\text{l}/\text{min}$; température : 20°C .

Second anticorps Durée : 40 min ; débit : $0,7\mu\text{l}/\text{min}$; température : 20°C .

Rinçage PBS ; Durée : 15 min ; débit : $0,7\mu\text{l}/\text{min}$; température : 20°C .

DAPI (facultatif, marquage du noyau) Durée : 10 min ; débit : $0,7\mu\text{l}/\text{min}$; température : 20°C .

Rinçage PBS ; Durée : 15 min ; débit : $0,7\mu\text{l}/\text{min}$; température : 20°C .

L'observation se fait ensuite par fluorescence. Les couleurs d'excitation des marqueurs pour le noyau (DAPI) et les anticorps (FITC) étant différentes, on peut les observer séparément, puis les superposer. La rhodamine est fréquemment utilisée pour marquer les membranes cellulaires et réaliser ainsi de belles images des cellules ; toutefois, son spectre d'émission recouvre celui du marqueur porté par l'anticorps secondaire et empêche l'observation de ce dernier. Les marquages du noyau et de la membrane sont facultatifs ; ils ont essentiellement un rôle esthétique.

4.3.3 Résultats

Culture de cellules

Contrairement à la culture dans de grands réservoirs vue au début de ce chapitre, il n'y a pas suffisamment de nutriments dans un microcanal pour permettre aux cellules de se développer. Ainsi, si l'on introduit trop de cellules à l'origine, celles-ci ne pourront pas s'attacher aux parois et la mise en culture échouera (figure 4.12, partie gauche). Inversement, si l'on n'introduit pas suffisamment de cellules, il leur sera difficile de recouvrir toutes les parois du microcanal.

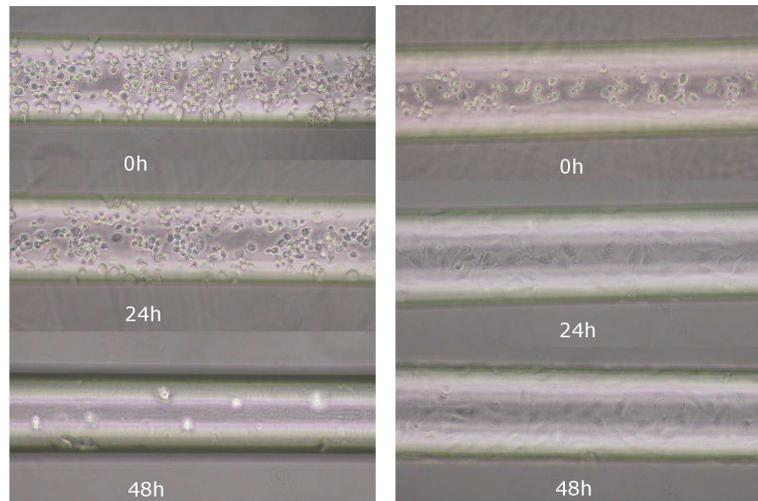


FIG. 4.12 – Développement des cellules endothéliales dans un microcanal. A gauche, la mise en culture échoue, à droite, elle se déroule normalement.

Toutefois, si l'on introduit la bonne concentration de cellules (environ 10^7 cellules/ml), la mise en culture se déroule généralement sans problème (figure 4.12, partie droite). Dans ces conditions, il faut compter environ quatre jours pour permettre aux cellules d'envahir toutes les parois du canal.

Immunomarquage

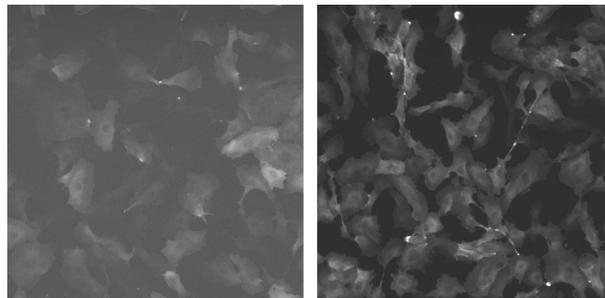


FIG. 4.13 – Immunomarquage des molécules d'adhésion ICAM produites par les cellules endothéliales. A gauche : sans stimulation, à droite : après une stimulation chimique au $Tnf-\alpha$

Les expériences d'immunomarquage ont été effectuées dans des puits de culture cellulaire dans un premier temps, puis dans le microcanal dans un second temps. L'expérimentation préalable dans les puits de culture permet de

s'assurer que le marquage fonctionne bien d'une part, et sert d'élément de comparaison pour le marquage dans le microcanal d'autre part.

Le premier anticorps testé (CD31) est un marqueur spécifique aux cellules endothéliales humaines. La fluorescence observée lors de cette expérience atteste donc uniquement du fait que l'on est bien en train de manipuler ce type de cellules. Ce test a donc surtout servi à la prise en main des différentes manipulations à réaliser pour l'immunomarquage.

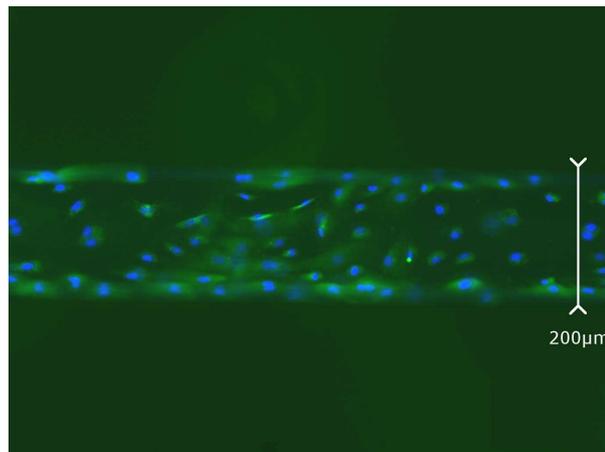


FIG. 4.14 – Immunomarquage des molécules d'adhésion produites par les cellules endothéliales (en vert) ; les noyaux des cellules sont colorés en bleu.

La seconde expérience vise à mettre en évidence certaines molécules d'adhésion secrétées par les cellules endothéliales. On a pour cela utilisé un anticorps spécifique aux molécules ICAM (InterCellular Adhesion Molecules). Ces molécules sont naturellement produites par les cellules endothéliales, même en l'absence de stimulation. Toutefois, leur expression est bien plus importante après une excitation chimique (Tumor Necrosis Factor : $TNF-\alpha$). La figure 4.13 présente le résultat de ce marquage dans les puits de culture. Comme l'expression naturelle de la molécule est beaucoup plus faible qu'après stimulation le temps d'exposition et le contraste sont plus importants pour l'image de gauche (sans stimulation) ; à temps d'exposition et contraste égaux, celle-ci aurait été entièrement noire. La figure 4.14 présente le résultat de cette expérience dans le microcanal.

4.3.4 Conclusion

La culture et l'immunomarquage des cellules endothéliales dans un microcanal constituent un outil puissant pour leur étude. Cela permet en particulier

de visualiser de manière précise et leur réaction à certaines excitations dans des conditions très proche de leur état naturel. Dans cette étude, la réaction à l'excitation chimique par du $\text{tnf-}\alpha$ a pu être observée, toutefois d'autres stimulations pourront être étudiées à l'avenir. Il sera en particulier intéressant d'étudier la réaction de ces cellules soumises à des contraintes mécaniques telles qu'un important taux de cisaillement par exemple.

Chapitre 5

Conclusion et perspectives

5.1 Système de distribution microfluidique

Ce travail de thèse présente en détail la conception et le développement d'un actionneur microfluidique pour la distribution de fluide au travers d'une matrice de microaiguilles. L'actionneur en question constitue un élément d'un projet de recherche européen, Angioskin, visant à réaliser le traitement d'une maladie de peau (le psoriasis) par injection d'ADN codant pour une protéine anti-angiogénique. Le contexte médical de ce projet a imposé plusieurs contraintes sur les caractéristiques du système de distribution fluide ; il doit permettre de manipuler de petites quantités de fluide tout en limitant les pertes, et assurer l'injection d'une quantité définie de produit de manière uniforme au travers d'une matrice de cent microaiguilles malgré des conditions d'injection variables. En effet, les propriétés mécaniques inhomogènes de la peau ne doivent pas influencer la répartition du liquide injecté. Ces précautions sont rendues nécessaires par le coût important de la solution d'ADN thérapeutique (de l'ordre de 10 000 euros/mg) qui doit donc être utilisé dans les meilleures conditions possibles. L'état de l'art concernant de tels systèmes est aujourd'hui encore à peu près vierge. En effet, s'il existe déjà des systèmes de distribution microfluidiques très performants (les imprimantes à jets d'encre en particulier) aucun n'est adapté aux conditions d'injection au travers d'une matrice de microaiguilles ayant des résistances hydrodynamiques variables en sortie. Enfin, il a été aussi nécessaire de s'assurer que les molécules d'ADN pouvaient circuler correctement, et surtout sans être dégradées, dans le microsystème afin de garder leurs propriétés thérapeutiques.

Le microsystème a été réalisé en PDMS. Il est constitué d'une matrice de réservoirs individuels (un par microaiguille) recouverts d'une membrane déformable. Ce concept permet de contrôler au niveau de chaque aiguille le volume éjecté par le système : il s'agit du volume déplacé par la membrane dans chaque micro-réservoir. L'homogénéité de l'injection est ainsi garantie car tous

les micro-réservoirs ont un volume identique. Afin d'éviter un remplissage délicat par les aiguilles, un circuit de remplissage distinct du circuit d'éjection a été ajouté. Ce système permet d'irriguer tous les micro-réservoirs à partir d'une entrée unique. Une diode microfluidique assure l'aiguillage du liquide vers les circuits de remplissage ou d'éjection. Enfin, ce circuit de remplissage est situé sous la membrane et est dimensionné pour être bouché dès le début de l'injection afin d'avoir à nouveau des réservoirs séparés pour chaque aiguille. Ce système a fait l'objet d'un brevet européen (n° : 06425292.7, 2006) présenté en annexe.

Afin de vérifier que leur circulation dans des microcanaux n'altérerait pas la qualité des solutions d'ADN, plusieurs expérimentations ont été réalisées. Du fait de leur grande taille, les molécules d'ADN peuvent en effet former des bouchons en s'agglomérant à l'entrée des microcanaux ; elles peuvent aussi se rompre du fait des importantes contraintes hydrodynamiques rencontrées dans le microsystème. Les écoulements de solutions d'ADN ont donc été observés par vélocimétrie par image de particules (PIV), et par électrophorèse après passage dans un microcanal. On a pu ainsi vérifier que d'une part l'ADN plasmide utilisé dans le projet circulerait normalement dans le système (alors qu'un ADN plus long risquerait de boucher les microcanaux) et qu'il n'est pas dégradé par la manipulation. Les expériences ont donc validé le système pour son utilisation avec des solutions d'ADN plasmide.

5.2 Culture de cellules dans les microsystèmes

La géométrie du système a été reprise dans un projet annexe, en insistant cette fois sur l'individualisation de micro-réservoirs mis en réseau. Ce projet mené en collaboration avec le Laboratoire de Biotechnologie et de Pharmacologie génétique Appliquée (le LBPA, à l'ENS-Cachan) vise à mettre des cellules en culture dans un microsystème et à les exposer à un gradient de concentrations chimiques pour déterminer l'influence de la concentration d'un produit sur le développement de cellules réalisant ainsi une parallélisation de tests pour une analyse toxicologique. Dans ce projet, le gradient de concentrations est réalisé par diffusion passive du produit à travers le circuit de remplissage du système ; il est ensuite maintenu en fermant au moyen d'un réseau de vannes les connexions entre les réservoirs. Cette méthode permet d'avoir des concentrations d'espèces chimiques réparties sur plusieurs ordres de grandeurs et assure donc une grande plage d'étude pour les essais biologiques. Ce type de système simplifie, et réduit considérablement le coût, des expériences qui n'auraient pu être réalisées qu'avec un robot distributeur de gouttes. Pour ce projet, il a aussi été vérifié que des cellules pouvaient bien être cultivées dans le système et rester viables pendant une durée suffisante à l'expérimentation (environ une semaine).

Enfin, un autre projet de culture cellulaire dans un microsystème a été réalisé au sein de l'équipe du professeur Kitamori, à Tokyo. Il s'agissait de réaliser

des protocoles d'immunomarquage sur un modèle in vitro de vaisseau sanguin. Ce modèle a été réalisé en cultivant des cellules endothéliales humaines (les cellules des parois sanguines) dans un microcanal. Cette collaboration a surtout constitué un approfondissement de connaissances au niveau de la culture des cellules dans les microsystèmes.

5.3 Perspectives

Le système de distribution microfluidique conçu au cours de cette thèse reste à être testé en interaction avec les autres composants du projet Angioskin (à savoir la matrice de microaiguilles, l'électroporation pour le transfert de gènes et les essais cliniques de la thérapie génique). Cependant, avant de passer à une éventuelle phase commerciale, la question de la possibilité d'industrialiser la fabrication du système doit être résolue. Dans cette optique, la réalisation encore trop manuelle de la diode constitue un obstacle à surmonter. Le système doit encore donc évoluer vers une forme plus adaptée à une éventuelle commercialisation.

Finalement, d'autres applications, à l'instar du projet de culture cellulaire avec un gradient de concentration d'un produit donné présenté dans cette thèse, pourraient être trouvées pour exploiter le système de distribution mis au point.

Bibliographie

- [1] Michael P. Schön. Animal models of psoriasis - what can we learn from them? *The journal of investigative dermatology*, 112 :405–410, 1999.
- [2] I. VESSIER. Expérimentation animale : biologie, éthique, réglementation. *INRA Prod. Anim.*, 12 :365–375, 1999.
- [3] Mark R. Prausnitz. A practical assessment of transdermal drug delivery by skin electroporation. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 35 :61–76, 1999.
- [4] Mark R. Prausnitz. Microneedles for transdermal drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 :581–587, 2004.
- [5] <http://www.cnrs.fr>.
- [6] Cecily Cannan Selby. An electron microscope study of thin sections of human skin. ii. superficial cell layers of footpad epidermis. *Journal of Investigative Dermatology*, 29 :131–149, August 1957.
- [7] T. G. Mason, A. Dhople, and D. Wirtz. Linear viscoelastic moduli of concentrated dna solutions. *Macromolecules*, 31 :3600–3603, 1998.
- [8] B.W. Barry. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 14 :101–114, 2001.
- [9] Adrian C. Williams and Brian W. Barry. Penetration enhancers. *Advanced drug delivery Reviews*, 56 :603–618, 2004.
- [10] Kumar Babita and Ashok K. Tiwary. Transcutaneous delivery of levodopa : Enhancement by fatty acid synthesis inhibition. *Molecular Pharmaceutics*, 2(1) :57–63, 2005.
- [11] Richard H. Guy. Iontophoresis - recent developments. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 50 :371–374, 1998.
- [12] Long Le, Joseph Kost, and Samir Mitragotri. Combined effect of low-frequency ultrasound and iontophoresis : Applications for transdermal heparin delivery. *Pharmaceutical Research*, 17(9), 2000.
- [13] O. Pillai and R. Panchagnula. Transdermal iontophoresis of insulin. *Skin Pharmacology and Physiology*, 17 :289–297, 2004.
- [14] J. Singh, M. Gross, B. Sage, H.T. Davis, and H.I. Maibach. Regional variations in skin barrier function and cutaneous irritation due to iontophoresis in human subjects. *Food and Chemical Toxicology*, 39 :1079–1086, 2001.

- [15] S. Narasimha Murthy. Magnetophoresis : an approach to enhance transdermal drug diffusion. *Pharmazie*, 54, 1999.
- [16] Saqib J. Bashir, Ai-Lean Chew, Angela Anigbogu, Frank Dreher, and Howard I. Maibach. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Research and Technology*, 7 :40–48, 2001.
- [17] Woan-Ruhoh Lee, Shing-Chuan Shen, Hsien-Hung Lai, Chung-Hong Hu, and Jia-You Fang. Transdermal drug delivery enhanced and controlled by erbium :yag laser : a comparative study of lipophilic and hydrophilic drugs. *Journal of Controlled Release*, 75 :155–166, 2001.
- [18] S. Henry, D.V. McAllister, M.G. Allen, and M.R. Prausnitz. Micromachined needles for the transdermal delivery of drugs. In *IEEE Micro Electro Mechanical Systems*, pages 494–498, Heidelberg, Germany, January 1998.
- [19] Terry O. Herndon, Salvador Gonzalez, T. R. Gowrishankar, R. Rox Anderson, and James C. Weaver. Transdermal microconduits by microscission for drug delivery and sample acquisition. *BMC Medicine*, pages 2–12, 2004.
- [20] Michel Cormier, Bonny Johnson, Mahmoud Ameri, Kofi Nyam, Luz Libiran, Dee Dee Zhang, and Pete Daddona. Transdermal delivery of desmopressin using a coated microneedle array patch system. *Journal of Controlled Release*, 97 :503–511, 2004.
- [21] Ahmet Tezel and Samir Mitragotri. Interactions of inertial cavitation bubbles with stratum corneum lipid bilayers during low-frequency sonophoresis. *Biophysical Journal*, 85, 2003.
- [22] Hua Tang, Chiao Chun, Joanne Wang, Daniel Blankschtein, and Robert Langer. An investigation of the role of cavitation in low-frequency ultrasound-mediated transdermal drug transport. *Pharmaceutical Research*, 19(8), August 2002.
- [23] Apostolos G. Doukas and Nikiforos Kollias. Transdermal drug delivery with a pressure wave. *Advanced drug delivery Reviews*, 56 :559–579, 2004.
- [24] Vesna Zderic, John I. Clark, Roy W. Martin, and Sharam Vaezy. Ultrasound-enhanced transcorneal drug delivery. *Cornea*, 23(8), November 2004.
- [25] Samir Mitragotri and Joseph Kost. Low-frequency sonophoresis : A noninvasive method of drug delivery and diagnostics. *Biotechnology progress*, 16 :488–492, 2000.
- [26] Shun Lee, Nikiforos Kollias, Daniel J. McAuliffe, Thomas J. Flotte, and Apostolos G. Doukas. Topical drug delivery in humans with a single photomechanical wave. *Pharmaceutical Research*, 16(11), 1999.
- [27] Gregor Cevc. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 :675–711, 2004.
- [28] Aurélien Lorin, Christelle Flore, Annick Thomas, and Robert Brasseur. Les liposomes : description, fabrication et applications. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.*, 8 :3 :163–176, 2004.

- [29] Anne-Rose Denet, Rita Vanbever, and Véronique Pr eat. Skin electroporation for transdermal and topical delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 :659–974, 2004.
- [30] <http://www.cliniporator.com>.
- [31] Tak-Wah Wong, Ching-Hung Chen, Chien-Chun Huang, Cheng-De Lin, and Sek-Wen Hui. Painless electroporation with a needle-free microelectrode array to enhance transdermal drug delivery. *Journal of Controlled Release*, 110 :557–565, 2006.
- [32] Shu-Lun Chang, G unter A. Hofmann, Lei Zhang, and Leonard J. Deftos. The effect of electroporation on iontophoretic transdermal delivery of calcium regulating hormones. *Journal of Controlled Release*, 66 :127–133, 2000.
- [33] Saulius Satkauskas, Michel F. Bureau, Marko Puc, Abderrahim Mahfoudi, Daniel Scherman, Damijan Miklavcic, , and Llu is M. Mir. Mechanisms of in vivo dna electrotransfer : Respective contributions of cell electroporation and dna electrophoresis. *Molecular Therapy*, 5 :2 :133–140, 2002.
- [34] Franck Andr e. *Electrotransfert de g enes in vivo : optimisation et m ecanismes*. Th ese de doctorat de doctorat de l’institut national agronomique Paris-Grignon, 2006.
- [35] S. Zafar Razzacki, Prasanna K. Thwar, Ming Yang, Victor M. Ugaz, and Mark A. Burns. Integrated microsystems for controlled drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56 :185–198, 2004.
- [36] Y. Hanein, C.G.J.Schabmueller, G.Holman, P. L ucke, D.D. Denton, and K.F. B ohringer. Hi-aspect ratio submicrometer needles for intracellular applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 13 :S91–S95, 2003.
- [37] E.V. Mukerjee, S.D. Collins, R.R. Isseroff, and R.L. Smith. Microneedle array for transdermal biological fluid extraction and in situ analysis. *Sensor and Actuators A*, 114 :267–275, 2004.
- [38] Seung-Joon Paik, Sangwon Byun, Jung-Min Lim, Yonghwa Park, Ahra Lee, Seok Chung and Junkeun Chang, Kukjin Chun, and Dongil Cho. In-plane single-crystal-silicon microneedles for minimally invasive microfluid systems. *Sensors and Actuators*, 114 :276–284, 2004.
- [39] Shankar Chandrasekaran and A. Bruno Frazier. Mechanical characterization of surface micromachined hollow metallic microneedles. In *Proceedings of Sixteenth Annual International Workshop on Microelectromechanical Systems of IEEE*, pages 363–366, Kyoto, January 2003.
- [40] <http://www.alza.com>.
- [41] Shawn P. Davis, Benjamin J. Landis, Zachary H. Adams, Mark G. Allen, and Mark R. Prausnitz. Insertion of microneedles into skin : measurement and prediction of insertion force and needle fracture force. *Journal of Biomechanics*, 37 :1155–1163, August 2004.

- [42] Andrew M. Newton. Ultrasonically driven microneedle arrays. 2003 NNUN REU Program at Cornell NanoScale Facility, 2003.
- [43] Bas de Heij, Martina Daub, Oliver Gutmann, Remigius Niekrawietz, Hermann Sandmaier, and Roland Zengerle. Highly parallel dispensing of chemical and biological reagents. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, pages 119 – 122, 2004.
- [44] Cheng-En Ho, Fan-Gang Tseng, Shih-Chang Lin, Chiun-Jie Su, Zheng-Yan Liu, Ru-Ji Yu, Yu-Feng Chen, Haimei Huang, and Ching-Chang Chieng. Characterization of the surface tension and viscosity effects on the formation of nano-liter droplet arrays by an instant protein micro stamper. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 15 :2317–2325, 2005.
- [45] Jeffrey D. Zahn, Ajay A. Deshmukh, Alexandros P. Papavasiliou, Albert P. Pisano, and Dorian Liepman. An integrated microfluidic device for the continuous sampling and analysis of biological fluids. In *Proceedings of 2001 ASME International Mechanical Engineering*, November 2001.
- [46] Seung-Joon Paik, Jung-Min Lim, Ilwoo Jung, Yonghwa Park, Sangwon Byun, Seok Chung, Kukjin Chun, Junkeun Chang, and Dongil Dan Cho. A novel microneedle array integrated with a pdms biochip for microfluid systems. In *Transducers '03*, June 2003.
- [47] Boris Stoeber and Dorian Liepmann. Two-dimensional arrays of out-of-plane needles. In *Proceedings from The 2000 International Mechanical Engineering Congress and Exposition*, Orlando, Florida, November 2000.
- [48] Raja K. Sivamani, Boris Stoeber, Gabriel C. Wu, Hongbo Zhai, Dorian Liepmann, and Howard Maibach. Clinical microneedle injection of methyl nicotinate : stratum corneum penetration. *Skin Research and Technology*, 11 :152–156, 2005.
- [49] Wijaya Martanto, Jason S. Moore, Tracey Couse, and Mark R. Prausnitz. Mechanism of fluid infusion during microneedle insertion and retraction. *Journal of Controlled Release*, 112 :357–361, 2006.
- [50] Ian Papautsky, John Brazzle, Harold Swerdlow, Robert Weiss, and A. Bruno Frazier. Micromachined pipette arrays. *IEEE Transactions on biomedical engineering*, 47, june 2000.
- [51] Michael Knoblauch, Julian M. Hibberd, John C.Gray, and Aart J.E. van Bel. A galinstan expansion femtosyringe for microinjection of eukaryotic organelles and prokaryotes. *Nature Biotechnology*, 17, 1999.
- [52] Pierre-Gille de Gennes, Françoise Brochard-Wyart, and David Quéré. *Gouttes, bulles, perles et ondes*. Editions Belin, 2002.
- [53] Randall E. Adam and Bruno H Zimm. Shear degradation of dna. *Nucleic Acids Research*, 4(5) :1513–1537, 1977.
- [54] Yvonne R. Thorstenson, Scott P Hunicke-Smith, Peter J. Oefner, and Ronald W. Davis. An automated hydrodynamic process for controlled, unbiased dna shearing. *Genome Research*, 8 :848–855, 1998.

- [55] P.J. Shrewsbury, S.J. Muller, and D. Liepmann. Effect of flow on complex biological macromolecules in microfluidic devices. *Biomedical Microdevices*, 3/3 :225–238, 2001.
- [56] Ranjini Bandyopadhyay and A. K. Sood. Rheology of semi-dilute solutions of calf-thymus dna. *Pramana Journal of physics*, 58 :4 :684–694, 2002.
- [57] Philip LeDuc, Charbel Haber, Gang Bao, and Denis Wirtz. Dynamics of individual flexible polymers in a shear flow. *Nature*, 399 :564–566, 1999.
- [58] Robert L. Scruggs and Philip D. Ross. Viscosity study of dna. *Biopolymers*, 2 :593–609, 1964.
- [59] Bo Huang, Hongkai Wu, Samuel Kim, and Richard N. Zare. Coating of poly(dimethylsiloxane) with n-dodecyl-b-d-maltoside to minimize nonspecific protein adsorption. *Lab on a Chip*, 5 :1005–1007, 2005.
- [60] Boris Stoeber, Eddie Espanol, and Dorian Liepmann. Operational limits of suspension flows through sudden contractions. *2001 ASME*, November 2001.
- [61] Peter F. Davison. The effect of hydrodynamic shear on the deoxyribonucleic acid from t2 and t4 bacteriophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45(11) :1560–1568, 1959.
- [62] Pierre Joseph. *Etude expérimentale du glissement sur surfaces lisses et texturées*. Thèse de doctorat de l’université Paris 6, 2005.
- [63] Younan Xia and George M. Whitesides. Soft lithography. *Angew Chem. Int. Ed.*, 37 :550–575, 1998.
- [64] M. Unger, H. Chou, T. Thorsen, A. Sherer, and S. Quake. Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography. *Science*, 288, 2000.
- [65] François Briquet, André Colas, and Xavier Thomas. Silicones for medical use. Technical report, Dow Corning, 1996.
- [66] J.C. Lötters, W. Olthuis, P.H. Veltink, and P. Bergveld. The mechanical properties of the rubber elastic polymer polydimethylsiloxane for sensor applications. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 7 :145–147, 1997.
- [67] Marc Anduze, Stéphane Colin, Robert Caen, Henri Camon, Véronique Conedera, and Thierry Do Conto. Analysis and testing of a fluidic vortex microdiode. *Journal of Micromechanics and Microengineering*, 11 :108–112, 2001.
- [68] S. Bendib, O. Français, P. Tabeling, and H. Willaime. Analytical study and characterization of micro-channel and passive micro-diode. *12th Micromechanics Europe Workshop*, pages 147–150, 2001.
- [69] M. L. Adams, M. L. Johnston, A. Scherer, and S. R. Quake. Polydimethylsiloxane based microfluidic diode. *J. Micromech. Microeng.*, 15 :1517–1521, 2005.

- [70] Tai Hyun Park and Michael L. Shuler. Integration of cell culture and microfabrication technology. *Biotechnology Progress*, 19 :243–253, 2003.
- [71] Jamil El-Ali, Peter K. Sorger, and Klavs F. Jensen. Cells on chips. *Nature*, 442 :403–411, 2006.
- [72] Frederick K. Balagaddé, Lingchong You, Carl L. Hansen, Frances H. Arnold, and Stephen R. Quake. Long-term monitoring of bacteria undergoing programmed population control in a microchemostat. *Science*, 309 :137–140, 2005.
- [73] Alex Groisman, Caroline Lobo, Hojung Cho, Kyle J. Campbell, Yann S. Dufour, Ann M. Stevens, and Andre Levchenko. A microfluidic chemostat for experiments with bacterial and yeast cells. *Nature Methods*, 2 :685–689, 2005.
- [74] Yo Tanaka, Keisuke Morishima, Tatsuya Shimizu, Akihiko Kikuchi, Masayuki Yamato, Teruo Okano, and Takehiko Kitamori. An actuated pump on-chip powered by cultured cardiomyocytes. *Lab on Chip*, 6 :362–368, 2006.
- [75] Jay Warrick, Keil Regehr, Maribella Domenech, Ivar Meyvantsson, Caroline Wagner, Caroline Alexander, and David J. Beebe. High-throughput microfluidic cellular assays. In *MicroTas*, October 2007.
- [76] L. Griscom, Y. Chateau, J.-P. Penneç, L. Misery, and B. Le Pioufle. Co-culture of cells in pdms microsystem for sensitized artificial skin. *Microtechnology in Medicine and Biology*, pages 184 –187, 2005.
- [77] Noo Li Jeon, Stephan K. W. Dertinger, Daniel T. Chiu, Insung S. Choi, Abraham D. Stroock, and George M. Whitesides. Generation of solution and surface gradients using microfluidic systems. *Langmuir*, 16 :8311–8316, 2000.
- [78] B. Lonetti, J. Goulpeau, A. Ajdari, and P. Tabeling. Producing controlled concentration gradients along microchannels. In *Proc MicroTAS 2005*, 2005.
- [79] Eric Leclerc, Yasuyuki Sakai, and Teruo Fujii. Cell culture in 3-dimensional microfluidic structure of pdms (polydimethylsiloxane). *Biomedical Microdevices*, 5 :2 :109–114, 2003.
- [80] Glenn M. Walker, Henry C. Zeringue, and David J. Beebe. Microenvironment design considerations for cellular scale studies. *Lab on Chip*, 4 :91–97, 2004.
- [81] Fabrice Morin, Naoki Nishimura, Laurent Griscom, Bruno LePioufle, Hiroyuki Fujita, Yuzuru Takamura, and Eiichi Tamiya. Constraining the connectivity of neuronal networks cultured on microelectrode arrays with microfluidic techniques : A step towards neuron-based functional chips. *Biosensors and Bioelectronics*, 21 :1093–1100, 2006.
- [82] Yannick Chateau, Germaine Dorange, Jean-François Clément, Jean-Pierre Penneç, Eric Gobin, Laurent Griscom, Marie Baudrimont, Nathalie Rougier, Christophe Chesné, and Laurent Misery. In vitro reconstruction

- of neuro-epidermal connections. *Journal of Investigative Dermatology*, 127 :979–981, 2007.
- [83] Naomi Hirata, Hirotsugu Kohrogi, Hajime Iwagoe, Eisuke Goto, Junji Hamamoto, Kazuhiko Fujii, Tetsuro Yamaguchi, Osamu Kawano, and Masayuki Ando. Allergen exposure induces the expression of endothelial adhesion molecules in passively sensitized human bronchus : time course and the role of cytokines. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 18 :12–20, 1998.
- [84] Yo Tanaka, Yuji Kikukawa, Kae Sato, Yasuhiko Sugii, and Takehiko Kitamori. Culture and leukocyte adhesion assay of human arterial endothelial cells in a glass microchip. *Analytical Sciences*, 23 :261–266, 2007.

Table des figures

1.1	Principe de la thérapie génique.	12
1.2	Coupe de la peau [5].	14
1.3	Système d'électrodes placées à la surface de la peau : a) Electrode chargée négativement, b) Electrode d'administration du produit contenant des ions chargés positivement, c) à l'application du courant, les ions chargés positivement sont repoussés par l'électrode b et pénètrent dans la peau.	19
1.4	Effet des ultrasons sur les cellules de la cornée.	22
1.5	Schéma de l'application d'onde photomécanique	23
1.6	La cellule	25
1.7	Agencement des lipides en bicouches	26
1.8	Administration intracellulaire avec un liposome	27
1.9	Schéma de l'électroporation [30]	28
1.10	Aiguille d'Angioskin.	31
2.1	Mouillage total ($\theta_E = 0$) et mouillage partiel	39
2.2	De gauche à droite : ADN super enroulé (une seule boucle représentée), ADN circulaire, et ADN linéaire	44
2.3	Molécules d'ADN marquées (marqueur YOYO-1, [55])	45
2.4	Relation entre taux de cisaillement et contrainte pour différents types de fluides	46
2.5	Bouchon formé à partir de billes de polystyrène de $1\mu\text{m}$ de diamètre à l'entrée d'un microcanal [60]	49
2.6	Forces hydrodynamiques lors du passage dans un microcanal	50
2.7	Agrégation de molécules d'ADN linéaire de 50kbp à l'entrée d'un canal d'une section de $50 \times 50\mu\text{m}$ (à gauche, en lumière visible, à droite, en fluorescence)	51
2.8	Schéma du montage de PIV (suivi de particules)	53
2.9	Profils de vitesse en entrée et en fin de canal pour une solution d'ADN de 2 kbp, à une concentration de 1 mg.ml^{-1} et une pression appliquée de 20 kPa	56
2.10	Profils de vitesse en entrée et en fin de canal pour une solution d'ADN de 2 kbp, à une concentration de 1 mg.ml^{-1} et une pression appliquée de 13 kPa	57

2.11	Profils de vitesse en entrée et en fin de canal pour une solution d'ADN de 2 kbp, à une concentration de 0,5 mg.ml ⁻¹ et une pression appliquée de 10 kPa	58
2.12	Expériences réalisées pour le premier gel	59
2.13	Expériences réalisées pour le second gel	60
2.14	Résultat de la première électrophorèse	61
2.15	Résultat de la deuxième électrophorèse	62
3.1	Schéma de principe du système d'Angioskin.	68
3.2	Vue d'ensemble du circuit fluide	69
3.3	Schéma de principe de la partie fluide	69
3.4	Vue en coupe d'un canal du circuit de remplissage, (1) pendant le remplissage, (2) pendant l'injection	73
3.5	Remplissage d'un réseau de chambres dont une moitié est hydrophile et l'autre hydrophobe. La photo de gauche montre le remplissage instantané du système par capillarité, la photo de droite montre le résultat après aspiration de l'encre au travers du système.	74
3.6	Maillage du modèle mécanique de la chambre d'injection	75
3.7	Déformation de la membrane à l'intérieur de la chambre sous une pression de 45kPa	76
3.8	Acquisition du module de cisaillement du PDMS	76
3.9	Rapport entre les volumes injectés et volumes perdus dans le système en fonction de la pression appliquée	78
3.10	Chambre en coupe, déformation de la membrane à 50kPa	79
3.11	Schéma du système de mesure de déflexion de la membrane	79
3.12	Comparaison entre déflexion calculée et mesurée	80
3.13	Remplissage du système complet. Le système se remplit en 4s pour 1/10 de bar environ	84
3.14	Schema de principe d'une diode à partie mobile	86
3.15	Fabrication de la diode : a) positionnement du morceau de papier, b) collage de la membrane, c) découpe de la membrane et extraction du papier	87
3.16	Impregnation d'un cône	91
3.17	Tranche de cône et paramétrage	91
3.18	Schéma de l'évolution du liquide dans une chambre lors du remplissage. A)Quart de sphère au départ, B)Demi cylindre lorsque la paroi haute est atteinte, C)Parallélepède quand 5 parois sont touchées, D)Quart de cylindre en cas de remplissage dissymétrique	93
3.19	Etapes du remplissage d'une chambre ; la bulle d'air dans le coin en haut à droite est absorbée dans le PDMS en quelques secondes	94
3.20	Mauvais remplissage causé par un défaut géométrique du système	95
3.21	Progression de l'encre lors d'un remplissage par les coins. Pour ces images, la chambre est remplie en 2.5s	95
3.22	Résultat d'ejection dans l'air	96

4.1	Géométrie du système	100
4.2	Photo du système ; pour la visualisation, de l'encre rouge a été injectée dans les chambres, et de l'encre bleue dans le circuit de fermeture des vannes	101
4.3	Schéma de principe du système	102
4.4	Principe du remplissage sous vide : A) on plonge le système dans la solution dont on souhaite le remplir, B) on met le tout sous vide : l'air sort du système, mais aussi du PDMS qui en contient un peu, C) On remet le tout à pression atmosphérique, le liquide envahi les chambres vides et l'air restant est absorbé par le PDMS	102
4.5	Diffusion d'un composé chimique dans une série de chambres . . .	103
4.6	Concentration dans la rangée de chambres	104
4.7	Concentration dans la rangée de chambres	105
4.8	Diffusion croisée de rhodamine et de fluorescéine dans un micro-système. A gauche, visualisation de la rhodamine et à droite, la fluorescéine	105
4.9	Evolution de la population de cellule dans l'une des chambres au bout de trois, six et huit jours (environ 40, 120 et 150 cellules, de gauche à droite)	107
4.10	Principe de l'immunomarquage	109
4.11	Le microcanal et son environnement	110
4.12	Développement des cellules endothéliales dans un microcanal. A gauche, la mise en culture échoue, à droite, elle se déroule normalement.	112
4.13	Immunomarquage des molécules d'adhésion ICAM produites par les cellules endothéliales. A gauche : sans stimulation, à droite : après une stimulation chimique au $Tnf-\alpha$	112
4.14	Immunomarquage des molécules d'adhésion produites par les cellules endothéliales (en vert) ; les noyaux des cellules sont colorés en bleu.	113
A.1	Principe de la photolithographie	130
A.2	Réalisation de moule par photolithographie	131

Annexe A

Procédés de fabrication

A.1 Photolithographie

On désigne par photolithographie toutes les étapes d'un procédé de micro-fabrication basé sur le développement de résines insolées. Il s'agit du procédé employé, en particulier, pour la réalisation des composants microélectroniques.

A.1.1 Principe

Suivant ce que l'on souhaite réaliser, il peut y avoir plus ou moins d'étapes pour ce procédé. Les trois principales étant l'enduction d'une résine photosensible, l'insolation puis le développement.

L'étalement de la résine se fait par un procédé d'enduction centrifuge. Une goutte de résine est déposée sur le substrat qui est mis en rotation. La résine s'étale alors de manière uniforme sur tout le substrat. L'épaisseur de la couche de résine dépend essentiellement de la viscosité de cette dernière, mais aussi de la vitesse de rotation du substrat. La résine est ensuite mise à cuire afin de faire évaporer les solvants qu'elle contient.

La seconde étape est l'insolation de la résine. Pour cela, on utilise un masque sur lequel est dessiné le motif que l'on souhaite reproduire. La résine est exposée à un rayonnement ultraviolet au travers du masque, ce qui délimite des zones insolées et des zones non insolées. Suivant la résine utilisée, la réaction aux UV est différente. On distingue en particulier les résines positives qui sont dégradées quand elles sont exposées aux UV des résines négatives pour lesquelles l'exposition permet de polymériser la résine.

La dernière étape est le développement de la résine. Le substrat est plongé dans un bain de développeur, ce qui permet d'éliminer la résine insolée (dans le cas des résines positives) ou celle qui n'a pas été insolée (résine négative). On obtient alors sur le substrat la réplique du motif du masque utilisé.

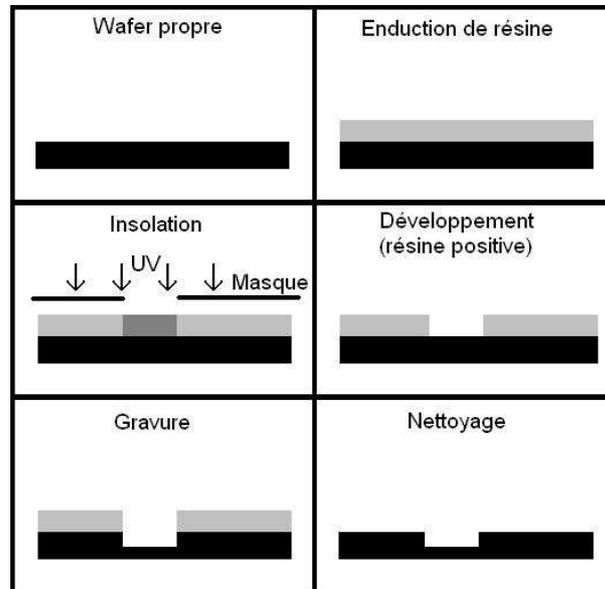


FIG. A.1 – Principe de la photolithographie

A.1.2 Gravure

La résine n'est généralement pas ce que l'on souhaite conserver sur le substrat. Dans la plupart des procédés, il ne s'agit que d'une couche sacrificielle servant à protéger une partie du matériau dessous pour une étape de gravure chimique; tout comme le masque protège une partie de la résine lors de l'insolation. On exploite la sélectivité des produits chimiques pour ne graver que ce qui se trouve sous la résine sans dissoudre la couche de résine protectrice. Pour graver certains matériaux, la résine n'est pas une protection suffisante, et on doit alors déposer et graver une couche intermédiaire; l'or, ou l'aluminium peuvent être utilisés à cet effet. Une fois la gravure réalisée, on utilise un solvant pour éliminer la couche de résine inutile.

A.1.3 Réalisation de moules

Dans le cas de la réalisation de microsystemes en polymère, on se sert de la photolithographie pour réaliser des moules. Pour cela, on utilise une résine épaisse pouvant s'étaler en couches allant de quelques micromètres à une centaine de micromètres. Contrairement à un procédé de gravure, on conserve dans ce cas la résine sur le substrat : c'est elle qui forme les motifs du moule.

Des géométries complexes, à plusieurs niveaux, peuvent être réalisées en effectuant plusieurs étapes d'enduction et d'insolation de résine (figure A.2). On peut ainsi réaliser des chambres connectées entre elles par des canaux plus

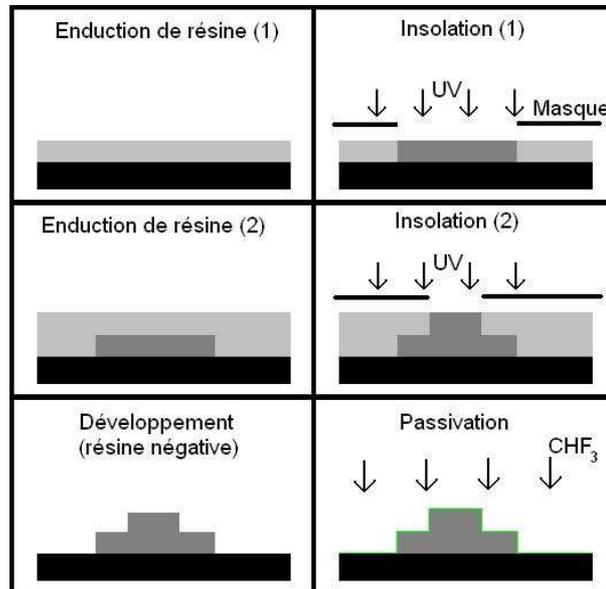


FIG. A.2 – Réalisation de moule par photolithographie

petits, par exemple. On utilise généralement la SU8, une résine épaisse négative, pour réaliser ce type de moule. Pour garantir un bon démoulage du PDMS une étape de passivation du moule est préférable. On peut utiliser pour cela un plasma de CHF_3 appliqué à la RIE.

A.2 Reactive Ion Etching

La RIE (pour Reactive Ion Etching) est un procédé de gravure sèche. Cela signifie que l'on utilise les produits chimiques sous forme de gaz plutôt qu'en solution aqueuse pour graver un substrat.

A.2.1 RIE

Le procédé de RIE consiste à placer le substrat à l'intérieur d'une enceinte contenant des gaz et deux électrodes. On crée alors un plasma à partir des gaz en appliquant une tension alternative (13MHz, puissance allant jusqu'à 300W) qui permet de casser les molécules en ions. Les ions sont accélérés par le champ électrique et précipités contre le substrat avec lequel ils réagissent de deux manières : physique et chimique. La réaction physique est une gravure due aux collisions des ions qui arrachent des molécules du substrat ; la réaction chimique est liée à l'interaction entre les gaz utilisés et le substrat.

Les réglages de ce procédé sont délicats ; pour favoriser l'une des interactions du plasma par rapport à l'autre en particulier. En effet, la gravure physique est

anisotrope tandis que la gravure chimique est isotrope. Ainsi favoriser l'une plutôt que l'autre va déterminer la forme des parois des motifs, entre parfaitement verticale (gravure anisotrope) et arrondie (gravure isotrope). Le temps de gravure est aussi un paramètre important à prendre en compte : on compte parfois en heures le temps nécessaire pour creuser le substrat de quelques dizaines de micromètres. Par exemple, pour graver du PDMS où seule la gravure physique intervient, on creuse environ 10 micromètres en une heure.

Enfin, il est possible d'utiliser ce procédé non pas pour graver le substrat, mais pour y déposer une fine couche d'un produit. C'est ce que l'on fait lorsque l'on veut rendre un moule moins adhérent (pour faciliter le démoulage) : en utilisant du CHF₃ comme gaz, on recouvre le moule d'un film ayant les propriétés du téflon.

A.2.2 DRIE

La DRIE (pour Deep RIE) est en fait un procédé permettant de réaliser des structures de très forts rapports d'aspect sur le principe de la RIE. Ce procédé, appelé parfois aussi procédé Bosch du nom de l'entreprise inventeur, exploite efficacement les deux types de gravure induite par la RIE pour obtenir une gravure anisotrope en un temps restreint.

Le procédé se présente comme une succession d'étapes élémentaires. Tout d'abord, il y a une étape de gravure RIE classique avec ses deux composante : isotrope et anisotrope. Une fois atteinte une certaine profondeur et avant que la partie isotrope de la gravure ne creuse trop les parois, on stoppe la gravure, on change les gaz dans l'enceinte et on dépose un polymère qui a pour effet d'inhiber la partie chimique de la gravure. On reprend ensuite une étape de gravure et le polymère n'étant gravé que par l'attaque physique (anisotrope), les parois ne sont pas touchées : seul le fond du motif est mis à nu et gravé. Ce procédé permet de réaliser des rapports d'aspect de 50 :1 et creuse trois à quatre fois plus vite que la gravure humide.

A.3 PDMS

Le PDMS (PolyDiMethylSiloxane) est un polymère très usité pour la réalisation de systèmes microfluidiques du fait de sa simplicité de manipulation et de la qualité de ces propriétés mécaniques. En particulier, sa souplesse en fait un candidat de choix pour la réalisation de membranes déformables, et donc de vannes ou de pompes.

A.3.1 Préparation

Le PDMS se présente sous la forme de deux composants : le polymère d'une part, et l'agent réticulant d'autre part. On mélange les deux composants dans les proportions 1 :10 (réticulant :PDMS), puis on met la préparation sous vide

pour dégazer le mélange ; c'est à dire faire disparaître les bulles d'air qui se sont formées.

Une fois le mélange fait, le PDMS, initialement liquide va se durcir et pour finalement prendre la consistance d'une sorte de caoutchouc. La réticulation du PDMS peut se faire à température ambiante en quelques jours, ou dans un four à 70°C en deux heures.

A.3.2 Moulage

Pour réaliser un motif dans du PDMS, il faut tout d'abord créer un moule de ce motif. On réalise ce moule par photolithographie. Concrètement, on utilise généralement une résine épaisse négative (la SU8) que l'on dépose sur un wafer en silicium. On peut ensuite faire subir à ce moule un traitement pour diminuer son adhérence et faciliter le démoulage du PDMS. Je dépose pour cela une couche de CHF₃ sur mes moules.

Une fois que l'on dispose d'un moule, on verse le mélange PDMS+réticulant dessus, on le passe éventuellement sous vide pour éliminer les bulles d'air qui se sont formées lors de la manipulation, puis on le met au four. Enfin, le démoulage peut-être délicat si le système est fin (moins d'un millimètre d'épaisseur) ; il y a alors un risque qu'il se déchire.

On notera aussi que le PDMS se rétracte de 1% après démoulage. Lorsque les dimensions sont critiques ou que la pièce doit être alignée sur d'autres motifs, il faudra prendre en compte ce détail. Par exemple, pour le système d'ANGIOSKIN, on doit aligner une matrice de chambres sur une matrice de trous. On a des motifs à aligner qui sont éloignés de un centimètre et si le moule n'est pas plus grand de 1%, on va avoir une erreur de 100 μm pour le positionnement d'une partie des motifs.

A.3.3 Collage

Cette méthode de moulage ne permet d'obtenir que des canaux ouverts sur une face. Pour les fermer, on doit ensuite coller le système sur une lame de verre, de silicium ou sur un autre morceau de PDMS. Pour cela, on fait subir au système PDMS et à son support un traitement plasma. On utilise typiquement une exposition à un plasma d'une puissance d'une vingtaine de watt pendant une minute. L'exposition à un plasma d'oxygène permet d'activer temporairement les surfaces ; en les mettant alors en contact, elles se collent en quelques instants. L'effet de l'activation plasma disparaît au bout d'une ou deux minutes environ ; le collage doit donc être effectué immédiatement. La qualité du collage dépend des matériaux que l'on a assemblés. Le PDMS colle au PDMS comme si les deux parties n'étaient faite que d'un seul bloc tandis que sur le silicium, le résultat est moins solide. Le collage sur le verre est en revanche excellent : sous contrainte, le PDMS peut se déchirer avant de se décoller.

A.3.4 Traitement de surface

Le PDMS est naturellement hydrophobe. Pour la réalisation de systèmes microfluidiques, cette propriété peut être encombrante. Pour le rendre hydrophile, on peut l'exposer à un plasma d'oxygène pendant quelques secondes, mais cet effet, comme pour le collage, est temporaire. Il est possible toutefois de le pérenniser en trempant le PDMS dans une solution de PVP (Poly vinyl pyrrolidone) après l'exposition au plasma. On obtient ainsi des surfaces de PDMS qui restent hydrophiles plusieurs jours en atmosphère sèche. Un trempage dans l'eau tout simplement permet aussi de garder quelques temps le caractère hydrophile du PDMS mais le résultat est moins bon qu'avec du PVP. Le traitement au PVP a fait l'objet d'un brevet déposé par l'équipe BIOMIS.

A.3.5 Connection

Lorsqu'il est utilisé pour des applications microfluidiques, le système doit souvent être connecté à une tuyauterie macroscopique. Pour cela, il suffit de percer un trou avec une aiguille non biseautée dans un morceau épais de PDMS puis d'y insérer une aiguille ou n'importe quel tube d'un diamètre légèrement supérieur à celui du trou. Les propriétés mécaniques du PDMS sont telles que le résultat est parfaitement étanche. C'est d'ailleurs là l'un des intérêts du PDMS pour les applications microfluidiques les connections sont simples à réaliser et efficaces.

Annexe B

Brevet

“FLUID DISPENSING SYSTEM”

The present invention relates to a fluid dispensing system.

5 The micro-techniques allow to realize small sized systems adapted to the deliver of different products. These techniques are particularly useful when products to be delivered are available only on small dose, or when very small quantity of product has to be handled.

10 The above techniques have a particular advantageous applications in micro-fluidics for the deliver of small quantity of fluids, for instance in medical field. Especially, microfluidics systems can serve in the transdermal administration of drug.

For instance fluid dispensing systems realized according to micro-techniques are known for the delivery of a dose of fluid, in particular a fluid containing large size molecules (DNA for example).

15 Article of B. Stoeber, D. Liepmann, “*Design, Fabrication and Testing of a MEMS Syringe*”, Technical Digest of the 2002 Solid-State Sensor and Actuator Workshop, Hilton Head Island, South Carolina, U.S.A., June 2-6 2002, pp. 77-80 describes a fluid dispensing system in a form of a multi-needle syringe wherein a deformable, flexible reservoir (figure. 1) on a
20 backside of a array of micro-needles contains a lyophilised drug suspended in non-aqueous fluid. By merely pressing the syringe against the skin it delivers several drops of drug (for instance a vaccine).

25 The above multi-needles syringe has been designed for wide spread distribution of vaccines in third-world situations where the lack of storage and trained personnel are significant problems.

The scope of the present invention is to realize a fluid dispensing system for supplying to the skin different drops of fluid with great efficacy.

30 The above scope is realized by the present invention that relates to a fluid dispensing system characterized by comprising a system of interconnected micro chambers communicating with at least one fluid inlet and with at least one suction port; each micro chamber having an output communicating with at least an exit, for example a needle, and having at

least one side defined by a deformable membrane subjected to a variable pressure so that a decrease of the pressure with respect to the pressure present at fluid inlet is transferred to the system of micro chambers through the suction port thereby establishing a suction of fluid from the inlet towards the chambers that are filled; an increase of the pressure causing the deflection of the membrane towards the inner side of each micro chamber for the ejection of the fluid contained in each chamber.

By means of a deformable membrane, the common filling reservoir is split into independent delivering chambers, leading to the distribution of all the drops (either of identical volume or of different volumes, depending on chambers geometries) through all the holes, needles or tubes.

The present invention also relates to a fluid dispensing system comprising: a pressure reservoir where pressure may be regulated, with respect to a reference pressure, thereby creating a depression or an increase of pressure,

characterized by comprising a system of interconnected micro chambers presenting each at least an outlet communicating with a needle; said system of micro chambers communicating with at least one fluid inlet at said reference pressure and with said pressure reservoir (8) through at least one suction port so that the obtained depression is transferred to the system of micro chambers establishing a suction of fluid through the inlet towards the chambers that are filled; each chamber having at least one side defined by a deformable membrane (34) facing the pressure reservoir so that said increase of pressure causes a deflection of the membrane towards the inner side of each micro chamber for the ejection of the fluid contained in the chamber.

The invention shall be described with the help of the attached drawings wherein:

- figure 1 shows a prior art device;
- figure 2 shows a fluid dispensing system in a form of a syringe realized according to the teachings of the present invention;
- figure 3 shows – in an enlarged scale and in side view - a first detail

of two dispensing units of the fluid dispensing system;

- figure 4 shows – in an enlarged scale and in a side view - a second detail of two dispensing units of the fluid dispensing system; and
- figure 5 shows in a top view a variation to the first detail .

5 In figure 2 numeral 1 indicates a fluid dispensing system that in the example shown is represented in the form of a multi-needle syringe.

It is however clear that the fluid dispensing system may comprise any pressure reservoir (in the example shown as inner part of a syringe) which allows for generating a low pressure (with respect to a reference pressure external to the filling reservoir, i.e. atmospheric pressure in normal use) and then a high pressure.

10 With more detail, syringe 1 comprises a main tubular body 2 symmetric along an axis 4 and defining, internally, a cavity 8 coaxial to axis 4. The tubular body 2 may define internally a parallelepiped cavity 8 (preferably) or a cylindrical cavity defining the pressure reservoir.

15 The syringe 1 comprises a plunger 9 (of known type) slidably moving in the cylindrical cavity 8 along axis 4 and a stem 10 stably connected to plunger 9 and coaxial to axis 4. The main cylindrical body 2, the plunger 9 and the stem 10 are preferably made with not deformable plastic, for instance PVC.

20 One end of the main cylindrical body 2 carries a system of interconnected micro chambers 13 wherein a liquid may be sucked following a manual action on plunger 9; the system of micro chambers 13 collaborates, in the example shown, with a number of needles 15 for the expulsion of the liquid contained in the micro chambers 13. However, each micro chamber may also communicate with a simple hole for the ejection of a fluid or with a tube.

25 With greater detail, the micro chambers are realized in a microfluidic layer 17 that faces the pressure reservoir 8 by closing an end of the main tubular body 2 and is perpendicular to axis 4.

30 Preferably microfluidic layer 17 and main cylindrical body 2 are manufactured independently and are further stuck together.

In the embodiment shown (see also figure 5) micro chambers 13 are disposed according to a square array structure wherein each micro chamber 13 communicates, through a communicating channel 20, with at least an adjacent micro chamber 13. More specifically, the micro-chambers disposed along respective lines of the array communicate one with respect to the adjacent other with an interconnecting straight channel 20.

A first number of micro chambers 13a disposed at first ends of the array lines communicates with a fluid inlet 22 through respective conduits 24 extending through microfluidic layer 17 and terminating in a common point defining fluid inlet 22.

Fluid inlet 22 is disposed on the outside of syringe 1 and is in communication with a source of liquid, for instance a drug disposed at atmospheric pressure.

A second number of micro chambers 13b disposed at second ends of the array lines communicates with a suction port 26 through a number of conduits 28 realizing a hydrodynamic resistance to the passage of a liquid.

Suction port 26 communicates with the variable pressure reservoir, in the example cavity 8. More specifically, suction port 26 is a hole through microfluidic layer 17 to make the conduit 28 communicating with the inner of cavity 8.

In order to avoid the liquid to spread non homogeneously into the whole system of micro chambers 13, the addition of the hydrodynamic resistance 28 provides homogeneous filling over all the micro chambers 13.

As it is known, at microscales, liquids tend naturally to flow towards slow hydrodynamic resistive channels. This resistance is roughly proportional to the length of the channel and inversely proportional to the section of the channel. In the case of the chambers array, this means that naturally the liquid tends to flow directly from the inlet to the outlet (shortest pathway), without filling completely all the chambers. By the addition of a hydrodynamic resistance 28 at the exit of the chambers array, the liquid is forced to first explore the lowest resistive pathway (chambers array) before entering the highest resistive pathway (the hydrodynamic resistance 28).

In the embodiment shown the micro chambers 13a are disposed, with respect to the second number of micro chambers 13b, on opposite sides of the array structure having a square shape.

5 Coming now to figures 3 and 4, in the embodiment shown, each micro chamber 13 defines an internal parallelepiped volume 30 that is limited by surfaces 32 of microfluidic layer 17 and by a deformable elastic membrane 34 that separates the chambers 13 from the cylindrical cavity 8.

 Therefore at least one side of each micro chamber 13 is limited by the deformable elastic membrane 34.

10 The volumes 30 are equal through all the array in the embodiment shown in the figures 3 and 4 but different micro-chambers 13 may also have different volumes.

 With more detail, according to the shown embodiment, each micro chamber 13 is defined by a square hole realized in microfluidic layer 17; the deformable membrane 34 resting on square rims 36 of the hole.

15 Membrane 34 fully covers one side of the micro fluidic layer 17 and the whole system of micro chambers 13, so that the whole membrane is free to deflect towards the system of micro-chambers 13. Rims 36 of each hole may be free or may also be glued with membrane 34.

20 Membrane 34 is stuck on micro fluidic layer 17 using oxygen plasma at manufacturing stage.

 One portion of membrane 34 also faces with a short conduit 26c communicating with the system of micro chambers 13 and forming a part of suction port 26. Under normal pressure conditions, the membrane 34 is substantially flat, the conduit 26c is opened so that the system of micro-chambers 13 is in direct connection to the pressure reservoir 8.

25 Moreover, as already described with regard to suction port 26, one portion of membrane 34 also faces with a short conduit 22c communicating with the system of micro chambers 13 and forming a part of fluid inlet 22. Under normal pressure conditions, the membrane 34 is substantially flat, the conduit 22c is opened so that the system of micro-chambers 13 is in direct connection to the outside pressure.

Finally microfluidic layer 17 defines on the side towards the exterior of the syringe 1 a number of conical elements 40 each forming a basis for a respective needle 15; the conical elements 40 having a passing hole 41 for the communication of volume 30 with the needle 15.

5 According to a not shown embodiment, each passing hole 41 may also communicate with an element other than a needle, for instance a tube.

10 In order to fill the system of micro chambers 13, the stem 10 is pulled according to a first direction (direction A, figure 2) so that a depression is created in the reservoir 8 (in the example cavity 8) of the syringe 1; as above explained, the cavity 8 communicates, through suction port 26, with the system of interconnected micro-chambers 13 so that the pressure in the micro-chambers 13 is also reduced with respect to a reference pressure (atmospheric pressure).

15 The reduction of pressure in the micro-chambers 13 causes the formation of a pressure gradient between fluid inlet 22 (at reference pressure) and suction port 26 so that a flux of liquid is drawn towards the micro chambers 13 through fluid inlet 22; the fluid first enters in the first micro chambers 13a and then spreads over all micro chambers 13.

20 During the above operation, the needles 15 are placed in a soft closing material S (shown with dashed line) to close micro chambers 13 to assure the sufficient pressure gradient between inlet 22 and suction port 26. During the above suction operation the elastic membrane may only deflect a limited amount towards the inner of cavity 8 due to the reduction of pressure in the reservoir.

25 The stem 10 arrives at an end position and the motion of the stem 10 is then reversed according to a second direction (direction B).

The movement of the stem 10 is controlled manually: i.e. before the liquid starts to exit from suction port 26, the operator can reverse the motion of the stem 10. In order to inject the liquid, the soft material S has to be removed before reversing the movement of stem 10.

30 The stem 10 is pushed so that the pressure in the cylindrical cavity 8 is increased; this increase of pressure causes the membrane 34 to deflect

(shown with dashed line) and move towards the inner part of each micro chambers 13 so that the fluid contained in each chamber 13 is ejected through the needle 15.

5 Moreover the membrane 34 deflects so that it sets down the peripheral rims 36 of any micro chamber that is closed during the ejection of the fluid.

This process of closing of all the chambers, independently one from each other, prevents from leaks from adjacent chambers 13; this process further prevent any leak through inlet and outlet while injecting without the need of closing of fluid inlet 22 and suction port 26.

10 Accordingly, each needle 15 outputs an amount of fluid; if the micro-chambers 13 have the same volume each needles (or tubes or holes) 15 outputs the same quantity of fluid (homogeneous output) with the same pressure, conversely if the chambers have different volumes different needles (or tubes or holes) 15 output different quantity of fluid
15 (heterogeneous output). In all the cases the invention provides the control of the volume dispensed by each individual chamber.

The fluid dispensing system 1 ensures the ejection of the content of each micro chamber 13 (whether all chambers 13 have the same volume or not) through the exits (needles 15, or holes or tubes), whatever the
20 pressure outside the exits as long as the outside pressure is lower than the reservoir pressure and at the same order of magnitude from one exit to the other.

25 According to the embodiment of figure 4 the bottom surface 32b of each micro-chamber 13 has a pyramidal structure 35 in order to lower the remaining liquid into the device after injection while deflecting membrane 34. In other words, the section of the chamber 13 decreases from the side defined by elastic membrane 34 towards the output 41 communicating with the needle 15.

30 The advantages of the invention are that it realizes a fluid dispensing system for supplying different drops of fluid with great efficacy and control. In fact, the distribution of all the drops (either of identical volume or of different volumes) through needles 15 is ensured by means of a single

- 8 -

deformable membrane 34 acting on a number of independent chambers 13 by closing the chambers 13 and obtaining the ejection of the fluid, wherein the ejection from each chamber is independent from the ejection obtained in other chambers.

- 5 Moreover, the invention provides the control of the volume dispensed by each of the individual chambers.

CLAIMS

1.- Fluid dispensing system characterized by comprising a system of interconnected micro chambers (13) communicating with at least one fluid inlet (22) and with at least one suction port (26);

5 each micro chamber (13) having an output communicating with at least an exit, for example a needle, (15) and having at least one side defined by a deformable membrane (34) subjected to a variable pressure so that a decrease of the pressure with respect to the pressure present at fluid inlet (22) is transferred to the system of micro chambers (13) through the
10 suction port (26) thereby establishing a suction of fluid from the inlet (22) towards the chambers (13) that are filled;

 an increase of the pressure causing the deflection of the membrane (34) towards the inner side of each micro chamber for the ejection of the fluid contained in each chamber (13).

15 2.- Fluid dispensing system as claimed in claim 1, wherein each chamber is closed individually by said membrane upon increase of the pressure.

 3.- Fluid dispensing system as claimed in claim 1, wherein said system of micro chambers comprises chambers having each the same size.

20 4.- Fluid dispensing system as claimed in claim 1, wherein said system of micro chambers comprises chambers having different sizes.

 5.- Fluid dispensing system as claimed in claim 1, wherein said system of micro chambers comprises chambers disposed according to a network structure.

25 6.- Fluid dispensing system as claimed in claim 1, wherein said micro-chambers are disposed along respective lines of an array and communicate one with respect to the adjacent other with interconnecting channels (20).

7.- Fluid dispensing system as claimed in claim 1, wherein the section of each micro-chamber decreases from the side defined by elastic membrane (34) towards the output communicating with said exit (15).

5 8.- Fluid dispensing system as claimed in claim 1, wherein a hydraulic resistance (28) is disposed between at least one micro chamber (13b) and said suction port (26); said hydrodynamic resistance (28) provides homogeneous filling over all the micro chambers (13).

9.- Fluid dispensing system comprising:

10 - a pressure reservoir (8) where pressure may be regulated, with respect to a reference pressure, thereby creating a depression or an increase of pressure,

characterized by comprising a system of interconnected micro chambers (13) presenting each at least an outlet (41) communicating with an exit, for instance a needle (15); said system of micro chambers (13) communicating with at least one fluid inlet (22) at said reference pressure and with said pressure reservoir (8) through at least one suction port (26) so that the obtained depression is transferred to the system of micro chambers (13) establishing a suction of fluid through the inlet (22) towards the chambers (13) that are filled;

20 each chamber (13) having at least one side defined by a deformable membrane (34) facing the pressure reservoir (8) so that said increase of pressure causes a deflection of the membrane (34) towards the inner side of each micro chamber for the ejection of the fluid contained in the chamber (13).

25 10.- Fluid dispensing system as claimed in claim 9, wherein the system of micro chambers (13) comprises a plurality of micro chambers disposed according a network structure.

30 11.- Fluid dispensing system as claimed in claim 9, wherein the system of micro chambers (13) comprises a first plurality of micro chambers (13a) communicating (24) with said fluid inlet (22) and a second plurality of micro chambers (13b) communicating (28) with said suction port (26).

12.- Fluid dispensing system as claimed in as claimed in claim 11, wherein said first plurality of micro chambers (13a) and said second plurality of micro chambers (13b) are disposed on opposite side of an array structure.

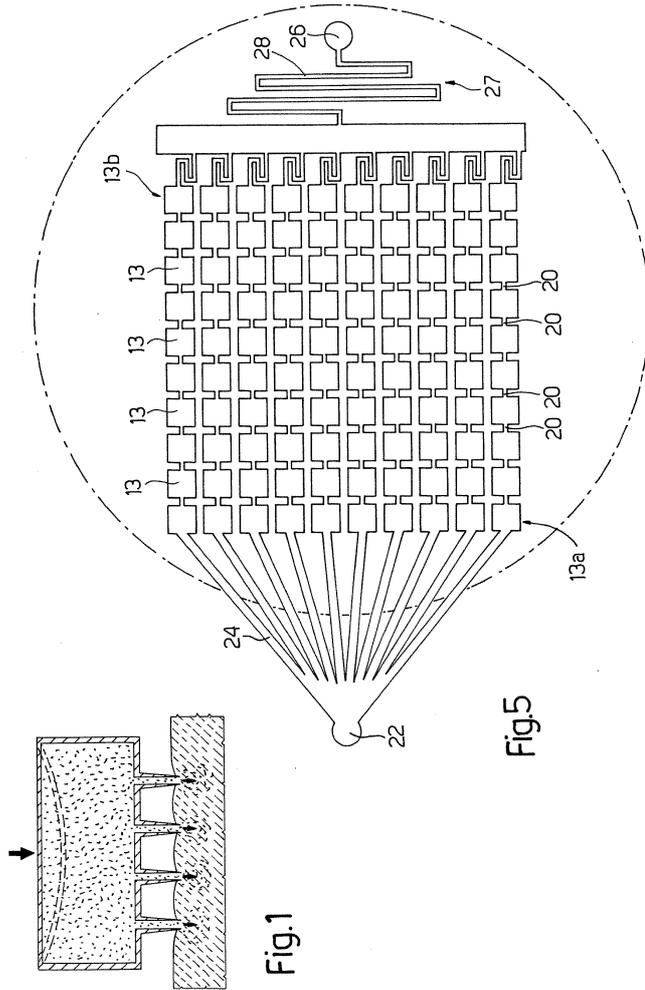
5 13.- Fluid dispensing system as claimed in claim 9, wherein the system of micro chambers (13) comprises a first plurality of micro chambers (13a) communicating (24) with said fluid inlet (22) and a second plurality of micro chambers (13b) communicating (28) with said suction port (26) through an hydrodynamic resistance (27) .

10

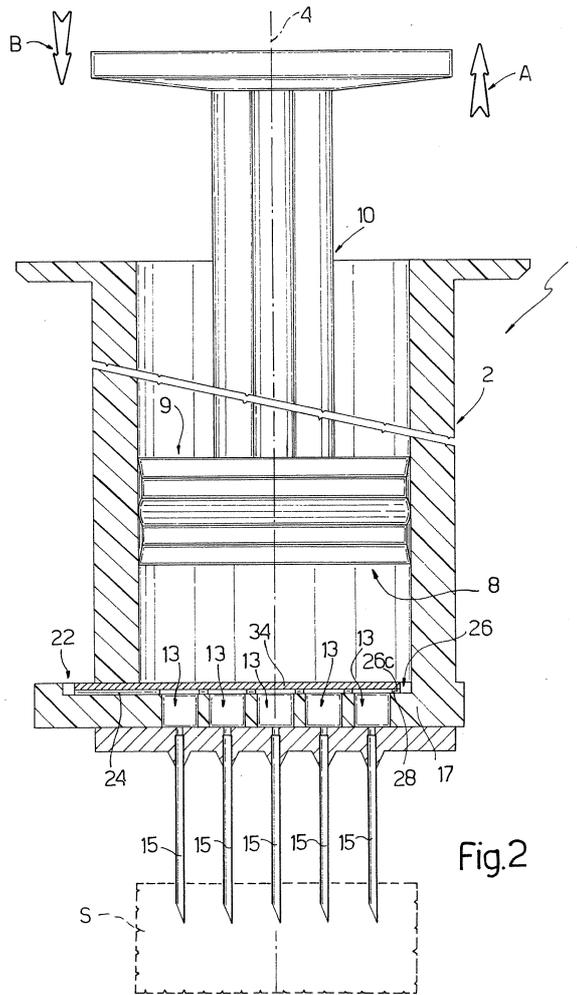
ABSTRACT

Fluid dispensing system comprising a system of interconnected micro chambers (13) communicating with at least a fluid inlet (22) and with at least a suction port (26). Each micro chamber (13) has an output communicating with a needle (15) and has at least one side defined by a deformable membrane (34) subjected to a variable pressure so that a decrease of the pressure with respect to the pressure present at fluid inlet (22) is transferred to the system of micro chambers (13) through the suction port (26) thereby establishing a suction of fluid from the inlet (22) towards the chambers (13) that are filled. An increase of the pressure, causing the deflection of the membrane (34) towards the inner side of each micro chamber, will close each dispensing unit and provoke the ejection of the fluid contained in each chamber (13) of the dispensing unit content through the outlets.

15



2 / 3



3 / 3

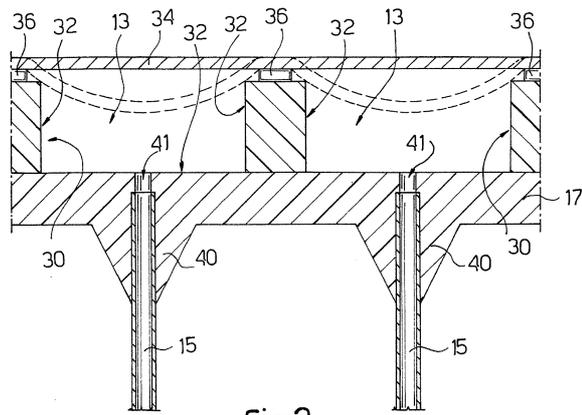


Fig.3

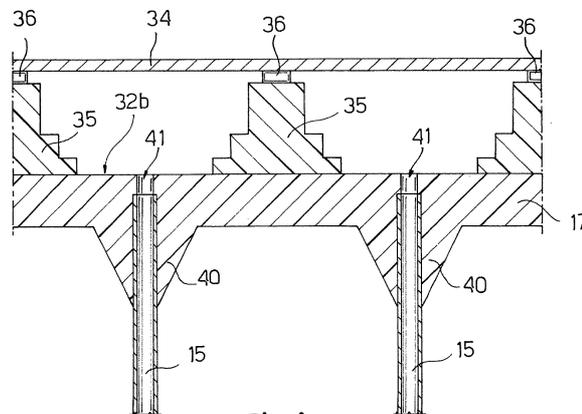


Fig.4