

Dispositifs microfluidiques pour l'injection de fluides à travers un réseau de gouttes : application biocapteur

Charles-Louis Azzopardi

▶ To cite this version:

Charles-Louis Azzopardi. Dispositifs microfluidiques pour l'injection de fluides à travers un réseau de gouttes : application biocapteur. Autre. Université Bourgogne Franche-Comté, 2018. Français. NNT : 2018UBFCD020 . tel-02001033

HAL Id: tel-02001033 https://theses.hal.science/tel-02001033

Submitted on 1 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.





THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE FRANCHE-COMTE PREPAREE A L'INSTITUT DE RECHERCHE FEMTO-ST

Ecole doctorale n°37 Ecole Doctorale SPIM

Doctorat de Sciences pour l'Ingénieur

Par M. Charles-Louis Azzopardi

Dispositifs microfluidiques pour l'injection de fluides à travers un réseau de gouttes : Application biocapteur

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 28 Juin 2018

Composition du Jury :

Mme Anne-Marie Gué Mme Rosaria Ferrigno M. Jacques Fattaccioli M. Franck Chollet M. Jean-François Manceau M. Wilfrid Boireau Directeur de Recherche, CNRS Professeur, UCBL Maître de Conférences-HDR, ENS Professeur, UFC Professeur, UFC Directeur de Recherche, CNRS Président Rapporteur Rapporteur Directeur de thèse Codirecteur de thèse Codirecteur de thèse

À ma compagne Alexandra. À mon père, ma mère, Virginie, Boris.

Remerciements

Ce travail de thèse a abouti avec l'aide et le soutien de nombreuses personnes présentes dans mon entourage de travail : groupe de recherche BioMicroDevices, l'institut FEMTO-ST, la centrale Mimento, FEMTO Engineering et l'Université de Franche Comté. Des chercheurs d'autres laboratoires, par leurs interventions éclairées, ont aussi participé à l'accomplissement de ce travail. Enfin j'ai pu compter sur le soutien de mes proches. J'exprime mes remerciements à toutes ces personnes.

Premièrement, je tiens à remercier les membres du jury pour leur participation à ma soutenance de thèse. Je remercie **Anne-Marie Gué** d'avoir accepté de présider mon jury. Je remercie de même **Rosaria Ferrigno** et **Jacques Fattaccioli** d'avoir accepté de relire cette thèse en qualité de rapporteur. Enfin, je remercie le jury pour les remarques et les commentaires qu'il m'ont adressés lors de la soutenance.

Je remercie évidement mes directeurs de thèse pour m'avoir confié ce projet et m'avoir accompagné durant ces années. **Franck Chollet** m'a enseigné ses connaissances sur la microfabrication et la microfluidique. Il m'a aussi accompagné lors de mes premiers pas dans l'enseignement. J'ai pu compter sur son soutien à de nombreuses reprises. **Jean-François Manceau** m'a transmis son savoir sur l'instrumentation et sur les capteurs microfluidiques. Il m'a donné l'envie de faire de la recherche au travers des projets et stages que nous avons entrepris ensemble. **Wilfrid Boireau** m'a guidé en biologie, ce domaine que je ne connaissais pas. Il m'a consacré un temps précieux et m'a apporté une vision d'ensemble à ce travail. Ils m'ont appris ce qu'était la recherche. Je suis heureux de les avoir eus comme encadrants.

Dans le domaine des gouttes et des émulsions, j'ai reçu l'enseignement et les conseils de spécialistes extérieurs à mon laboratoire. **Nicolas Fatin-Rouge** de l'Institut UTINAM m'a fait l'exposé de ses travaux dans son laboratoire et a répondu à mes nombreuses interrogations sur les émulsions. Je le remercie pour m'avoir offert une compréhension avancée à ce sujet grâce à ses explications détaillées. Les chercheurs de l'institut Pierre-Gilles de Gennes, **Lorraine Montel**, en Post-Doctorat, et **Jacques Fattaciolli** nous ont accueilli dans leur laboratoire pour partager avec nous leurs connaissances et savoirfaire dans la fonctionnalisation de gouttes d'huiles. J'exprime une profonde gratitude envers ces chercheurs qui m'ont permis d'avancer dans mes expérimentations en biologie.

Tout au long de ces années, les membres de mon équipe d'accueil m'ont offert une aide inestimable pour avancer dans ce projet. Je prends le temps de présenter ici les raisons qui leur valent mes remerciements. Je souhaite d'abord remercier **Thérèse Leblois** pour son implication envers moi tout au long de ces années en tant que personne, professeur, responsable de notre groupe et directrice de l'Ecole Doctorale SPIM. Je tiens spécialement à remercier **Bruno Wacogne** qui m'a accompagné pour l'écriture et la relecture de mon manuscrit, sans qui je n'aurais pu achever ce travail. Je lui suis aussi reconnaissant de l'opportunité qu'il m'a offerte de continuer ma carrière avec lui. **Rabah Zeggari** m'a appris beaucoup, sur la salle blanche, sur la recherche en général comme sur les expérimentations en microfluidique. Je le remercie pour tous ses conseils qui m'ont permis de tenir et d'évoluer toutes ces années. Je souhaite exprimer ma gratitude envers **Réda Yahiaoui** qui a accompagné et inspiré l'ensemble de mon parcours. Je tiens à remercier **Audrey Guitton** pour m'avoir enseigné la biologie et d'avoir assuré ma formation dans ce domaine. Enfin, je suis reconnaissant envers **Alain Rouleau** qui a assuré mon apprentissage dans le laboratoire de biologie et qui a toujours répondu présent pour moi que ce soit au travail ou dans la vie.

Les personnes de l'équipe ont été très présentes pour moi mais j'ai aussi pu compter sur de nombreuses autres personnes du laboratoire. Premièrement, ma reconnaissance va à **Karine Charrière** pour tout ce j'ai gagné grâce à elle. Je remercie **Betty Baudinot** pour avoir partagé avec moi ses connaissances en mécanique et pour tout ce qu'elle a réalisé pour moi. Je suis reconnaissant envers **Magali Barthès** pour tous ses conseils en microfluidiques et pour sa gentillesse. J'exprime ma reconnaissance à **Franck Lardet-Vieudrin** pour la mise à contribution de ses compétences et de son large savoir en électronique. Je remercie **Jean-Marc Cote** d'avoir orchestré mon instrumentation à un moment critique. Je remercie **Nicolas Passilly** pour ses conseils en optique. J'exprime ma gratitude envers **Sylwester Bargiel** pour tous ses conseils sur les microsystèmes et leur fabrication. Je remercie les personnes des services communs de mécanique, d'électronique et d'informatique pour le travail qu'elles ont accompli. Enfin je remercie tous les ingénieurs de la salle blanche avec qui j'ai passé un temps conséquent pour réaliser mes dispositifs.

En dehors du temps passé sur ma thèse, j'ai partagé de bons moments au laboratoire avec beaucoup de personnes. Je pense notamment à mes amis proches que je me suis fait parmi les doctorants, les ingénieurs, les stagiaires... Il y a d'abord mes chers camarades du bureau des doctorants : mon Sempai Vivien Lacour, Sameh Obeid la barbe douce, la délicate Juliana Chawich et le rêveur Claude Humbert. J'ai partagé mon labo avec le sympathique groupe des stagiaires de Jean-François : Soann Weber, Julien Dufourmantelle et Naïm El Moudni. Je pense à mes aventures ludiques avec mes amis intrépides : le royal Benoit Le Roy de Boiseaumarié, le magique Floriant Boucherie et le puissant Daniel Guneysu. Une grosse partie des personnes que j'ai remercié précédemment composent un groupe soudé au laboratoire auquel il faut ajouter « Bro Bala » Namasivayam Balasubramaniam l'apprenti du « Master » Alain, Fabien Remy-Martin notre inventeur fou, Stéphanie Seguin-Py et sa magnifique candeur pour finir avec la gentille Joëlle Berthelot. J'ai de plus apprécié d'être en compagnie de Bogdan Penkovsky et sa maîtrise folle du FPGA, du joyeux Laurent Petrini et de l'incroyable Sandrine Pyon. Je remercie toutes ces personnes pour les moments passés avec elles durant cette période de thèse.

En résumé, je remercie ma famille, mes amis et mes collègues pour leur soutien et leurs encouragements grâce auxquels j'ai mené ce projet à terme.

Je clôture en remercient les organismes financeurs qui ont contribué au paiement de mon salaire, à l'achat de matériel et de consommable et à la réalisation de dispositifs. Cette thèse a été financée par une bourse de thèse ministérielle, des crédits du Labex Action et la région de Franche-Comté. Les dispositifs ont été réalisés dans la centrale technologique de Mimento, membre du réseau Renatech. Je remercie ces organismes pour leur contribution à ce travail de recherche.

Table des matières

Introdu	iction g	énérale1
Avant-p	propos .	
1.1.	Systèn	nes microfluidiques pour de l'analyse biologique7
1.	1.1.	Méthodes de régénération8
1.	1.2.	Méthodes de détection de la capture9
	1.1.2.1	Détection Optique9
	1.1.2.2	. Détection Électrique et Électrochimique10
	1.1.2.3	Détection Acoustique10
1.2.	Conte	xte de recherche et antériorité10
	1.2.1.1	. Microfluidique diphasique accordable - Nathalie Tarchichi - 201311
	1.2.1.2 - 2008	. Innovative detection methods in liquid for a lamb wave biosensor - Feng Li 12
1.3.	Trava	ux de thèse13
1.3	3.1.	Développement d'un système microfluidique diphasique pour de la détection
bi	ologique	e par acoustique
1.3	3.2.	Homogénéisation des vitesses d'écoulement dans une chambre de détection 14
1.3	3.3.	Condensateur à capacité variable à base de microfluidique diphasique 15
Chapitr	re 1 Ét	at de l'art
1.1.	Introd	uction
1.2.	Les sy	stèmes microfluidiques18
1.3.	Physic	ue des fluides dans les microcanaux
1.3	3.1.	Les nombres sans unité
	1.3.1.1	. Nombre de Reynolds22
	1.3.1.2	. Nombre capillaire Ca22
	1.3.1.3	Nombre de Weber23
	1.3.1.4	Nombre de Bond23
	1.3.1.5	Nombre de Péclet23
	1.3.1.6	. Coefficient de diffusion23
1.3	3.2.	Equation de Navier Stokes
1.3	3.3.	Ecoulement de Poiseuille24
1.3	3.4.	Résistance hydraulique 25
1.3	3.5.	Tension de surface
1.3	3.6.	L'angle de contact
1.3	3.7.	Tensioactifs
1.3	3.8.	Les détergents
1.3	3.9.	Les phospholipides
1.4.	Micro	fluidique diphasique

1.	4.1. I	Mouvements de gouttes	
1.	4.2. 0	Génération de gouttes	31
	1.4.2.1.	Jonction en T	32
1.	4.3. I	Les modes de génération	
	1.4.3.1.	Squeezing	33
	1.4.3.2.	Dripping	34
	1.4.3.3.	Balloon	35
	1.4.3.4.	Jetting	36
1.	4.4.]	Empilement compact de gouttes	
	1.4.4.1.	Organisation par grande fraction volumique	37
	1.4.4.2.	Organisation par différence de densité	38
	1.4.4.3.	Organisation par drainage	39
	1.4.4.4.	Piégeage de bulles	39
	1.4.4.5.	Ralentissement de gouttes	40
1.	4.5. I	Ecoulements interstitiels	
1.5.	Fonctio	onnalisation biologique	43
1.	5.1. I	Fonctionnalisation de surfaces solides	44
1.	5.2. I	Fonctionnalisation d'une interface fluide	44
	1.5.2.1.	Surfactants fonctionnalisés avant/hors formation de la goutte	45
	1.5.2.2.	Particules fonctionnalisées sur goutte	45
	1.5.2.3.	Surfactants fonctionnalisés sur goutte	46
1.6.	Conclu	sion	
Chapit	re 2 Fal	prication, caractérisation et contrôle des systèmes microfluidie	Jues 50
2.1.	Introdu	iction	
2.2.	Fabrica	ation des Dispositifs	
2.	2.1.	Choix des materiaux	
2.	2.2. 1	Procedes de microfabrication	
	2.2.2.1.	Lithographie	53
	2.2.2.2.	Methodes de gravure du silicium	53
	2.2.2.3.	Collage de substrat	
2.3.	Disposi	turs et Support de montage	
2.	3.1. (Connecteurs pour biocapteurs et bioreacteurs	
	2.3.1.1.	Connecteurs integres aux dispositifs	55 FC
C	2.3.1.2.	Connecteurs demontables	
2.	3.2. I	Puces a connexion rapide standardisees	
	2.3.2.1.	Connecteurs	50 FC
	2.3.2.2.	Format de puces	טכ רי
Э 4	2.3.2.3.	Support	
2.4. ວ	Danc (1	experimentation incrontuluique	/د
۷.	4.1. 3 7/11	Matárial microfluidique	00 20
	∠. 4 .⊥.1.		

	2.4.1.2	. Programmes d'instrumentation	61
	2.4.1.3	. Vérification de la calibration des capteurs de débit	62
	2.4.1.4	. Nettoyage de l'huile dans le circuit	64
2.4	4.2.	Visualisation des écoulements	64
	2.4.2.1	. Montage d'observation grand champ	65
	2.4.2.2	. Montage d'observation à haute fréquence	66
2.5.	Conclu	usion	
Chapitr	re 3 In	jection et capture d'analyte biologique dans un réseau de gout	te 68
3.1.	Introd	luction	
3.2.	Capte	urs acoustiques en microfluidique diphasique	
3.2	2.1.	Capteurs acoustiques	
	3.2.1.1	. Technologies de capteurs	70
	3.2.1.2	. Détection à ondes de Lamb en milieu liquide	71
	3.2.1.3	. Dimensionnement d'un capteur à onde de Lamb dédié aux gout	tes71
3.2	2.2.	Intérêt des gouttes comme surface de capture	73
	3.2.2.1	. Dimensions d'une goutte confinée entre deux plaques	73
	3.2.2.2	. Surface de détection des gouttes	75
	3.2.2.3	. Écoulement dans un réseau de goutte	77
3.3.	Génér	ation de gouttes	
3.3	3.1.	Dimensionnement	
3.3	3.2.	Fabrication	
	3.3.2.1	. Procédé de fabrication puce n°1 et essais préliminaires	83
	3.3.2.2	. Procédé de fabrication n°2	85
3.3	3.3.	Tests de génération de gouttes	
	3.3.3.1	. Génération : Huile de silicone / EDI	87
	3.3.3.2	. Génération : Huile de tournesol / EDI	87
	3.3.3.3	. Génération : Huile de tournesol / SDS	
_	3.3.3.4	. Génération : huile de soja / Tween 20	
3.4.	Organ	isation des gouttes	
3.4	4.1.	Organisation à la génération	
3.4	4.2.	Organisation par drainage	
	3.4.2.1	. Fabrication puce n°2	
	3.4.2.2	. Organisation des gouttes par filtres droits	94
	3.4.2.3	Fabrication Puce n°3	
	3.4.2.4	. Traitement chimique des canaux fluidiques	
	3.4.2.5	. Organisation des gouttes par filtres fourchus	
0	3.4.2.6	. Simulation des ecoulements d'organisation de la puce 3	100
3.4	4.3.	Injection de fluide dans le reseau de goutte	
3.5.	Captu	re d'un element biologique d'intérêt	
3.	5.1.	Couple streptavidine/biotine	
3.5	5.2.	Fonctionnalisation de puce d'or	106

3.5.2	.1. Préparation de la puce et greffage de la biotine	107
3.5.2	.2. Injection de streptavidine et de biotine	107
3.5.2	.3. Analyse des résultats	
3.5.3.	Fonctionnalisation des gouttes hors puce	
3.5.3	.1. Protocole proposé	
3.5.3	.2. Stabilité des émulsions	110
3.5.4.	Fonctionnalisation des gouttes sur puce	
3.5.4	.1. Plan d'expérimentation	111
3.5.4	.2. Résultats obtenus	111
3.6. Cone	clusion	
Chapitre 4 I	Homogénéisation des vitesses d'écoulement dans une cellule	e microfluidique
4.1. Intro	oduction	
4.2. Posit	tionnement et exposé de la problématique	
4.3. Cone	ception et simulation	
4.3.1.	Caractéristiques de l'interface fluidique	
4.3.2.	Simulation des écoulements	
4.4. Micr	ofabrication par gravure anisotrope du silicium	
4.4.1.	Conception du circuit microfluidique	
4.4.2.	Procédé de fabrication	
4.4.3.	Structures micro-usinées	
4.5. Cara	nctérisation expérimentale des écoulements	
4.5.1.	Montage et méthodes expérimentaux	
4.5.2.	Résultats expérimentaux	
4.6. Cond	clusion	
Chapitre 5 I	Dispositif microfluidique diphasique pour la réalisation d'u	n condensateur
à capacité va	riable	
5.1. Intro	oduction	
5.2. Les o	capacités variables	
5.3. Prin	cipe de fonctionnement	
5.4. Choi	x de la structure et simulations numériques	
5.4.1.	Ratio de capacité et couches d'isolation	
5.4.2.	Structures d'électrodes	
5.4.3.	Simulation de la capacité	
5.5. Fabr	rication et mise en œuvre	
5.5.1.	Fabrication des dispositifs	
5.5.2.	Mesure de capacité de fluides monophasiques	
5.6. Con	clusion	
Conclusion et	t perspectives	
6.1. Con	clusion	
6.2. Pers	pectives	150
6.2.1.	Perspectives technologiques	

6.2.2.1. Détection du cytomégalovirus dans le lait maternel	6.2.2. Pe	erspectives applicatives	152
6.2.2.2. Dépistages à la naissance	6.2.2.1.	Détection du cytomégalovirus dans le lait maternel	152
6.2.2.3. Dispositif de dépistage adaptatif et personnalisable	6.2.2.2.	Dépistages à la naissance	152
Annexes 156 7.1. Réactifs utilisés dans les expériences 157 7.2. Protocole de Fonctionnalisation de gouttes hors puce 158 7.3. Fabrication des dispositifs 159 7.3.1. Proposition de protocole graphique pour la fabrication du dispositif 159 7.3.2. Protocole détaillé de fabrication des dispositifs 160 Bibliographie 166	6.2.2.3.	Dispositif de dépistage adaptatif et personnalisable	153
7.1. Réactifs utilisés dans les expériences 157 7.2. Protocole de Fonctionnalisation de gouttes hors puce 158 7.3. Fabrication des dispositifs 159 7.3.1. Proposition de protocole graphique pour la fabrication du dispositif 159 7.3.2. Protocole détaillé de fabrication des dispositifs 160 Bibliographie 166	Annexes		156
7.2. Protocole de Fonctionnalisation de gouttes hors puce 158 7.3. Fabrication des dispositifs 159 7.3.1. Proposition de protocole graphique pour la fabrication du dispositif 159 7.3.2. Protocole détaillé de fabrication des dispositifs 160 Bibliographie 166	7.1. Réactifs	utilisés dans les expériences	157
 7.3. Fabrication des dispositifs	7.2. Protocol	le de Fonctionnalisation de gouttes hors puce	158
 7.3.1. Proposition de protocole graphique pour la fabrication du dispositif acoustique	7.3. Fabricat	tion des dispositifs	159
acoustique	7.3.1. Pi	roposition de protocole graphique pour la fabrication du dispositif	
7.3.2. Protocole détaillé de fabrication des dispositifs	acoustique .		159
Bibliographie	7.3.2. Pi	rotocole détaillé de fabrication des dispositifs	160
	Bibliographie		166

Table des illustrations

Figure 1 - Système d'analyse portable de type POCT à cartouche microfluidique. Tiré
de [1]
Figure 2 – Exemple de méthodes d'analyses réalisables sur puces. Tiré de [2]
Figure 3 – Structure classique d'un microsystème d'analyse biologique
Figure 4 – Fonctionnement d'un microsystème d'analyse biologique
Figure 5 – Fonctionnement d'un microsystème d'analyse biologique électrochimique à base de billes. a) introduction des billes fonctionnalisées b) maintien des billes en face du système de détection c) injection de l'échantillon d) capture des analytes e) injection des marqueurs f) détection électrochimique g) nettoyage du capteur. Tiré de [3]
Figure 6 – (gauche) Puce compacte LRSPP. Tiré de [6]. (droite) Puce SPR à capture améliorée par ondes acoustique de surface (SAW). Tiré de [7]
Figure 7 – a) Puces pour génération de gouttes avec une jonction en T. b) Puce pour génération et mise en réseau de bulles . Adaptés de [23]1
Figure 8 – Génération en mode balloon. La distance entre goutte l varie avec la variation de débit de la phase continue. Adapté de [24]11
Figure 9 – Représentation de l'onde évanescente dans le liquide issu de l'onde de Lamb. Tiré de [25]12
Figure 10 – Puce à onde de Lamb avec fil de connexion (wire bonding). Puce sur support avec connections électriques et chambre fluidique faite en PDMS. Tiré de [25]
Figure 11 – Structure du capteur à onde de Lamb. Adapté de [25]
Figure 12 – Représentation des fonctions du microsystème à concevoir 1) Générer des gouttes 2) Fonctionnaliser les gouttes 3) Organiser les gouttes 4) Capturer les analytes 5) Détecter par ondes acoustiques
Figure 13 – Structure du capteur acoustique et architectures d'homogénéisation des écoulements étudiées
Figure 14 – Schéma de principe décrivant la variation de capacité au travers de la permittivité de l'émulsion en fonction de la distance entre gouttes
Figure 15 – Nombre de publications par années sur la microfluidique et les termes associés, notamment ceux liés aux gouttes. Tiré de [28]
Figure 16 – Circuit d'une micro pompe à insuline et son schéma de fonctionnement. Tirés de [33]
Figure 17 – Structure de mixage microfluidique. Tiré de [43]
Figure 18 – Circuit d'étude de cellules cancéreuses. Tiré de [51]
Figure 19 – Plateforme complète sur l'étude des microalgues intégrant 6 fonctions sur les gouttes. Tiré de [57]
Figure 20 - Ecoulement de Poiseuille de forme parabolique entre deux plaques parallèles. Adapté de [60]
Figure 21 – Courbures de surfaces définies par les rayons R_1 et R_2
Figure 22 – Angle de contact et énergies interfaciales à la triple interface
solide/liquide/gaz

Figure 23 - (gauche) Une goutte entourée de surfactant et une micelle (milieu) structure d'un tensioactif (droite) le déplacement des tensioactifs vers les tensions de surfaces les plus fortes
Figure 24 – Structure chimique du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Adapté de [64] 28
Figure 25 – Structure chimique du Tween 20 composé d'une chaine polyéthylène (commun aux Tween) et d'un acide gras (acide laurique). Tiré de [65]
Figure 26 – Structure de la double couche lipidique de la membrane cellulaire. Tiré de [66]
Figure 27 – Exemple de structure chimique de la phosphatidylcholine (PC) terminée par l'alcool choline. Adapté de [67]
Figure 28 – Annexine V greffée sur une bi-couche lipidique constituée de PC et de PS. Tiré de [68]
Figure 29 – Formes de gouttes dans une cellule de Hele-Shaw vu de côté et de dessus. Dans l'ordre (1) Goutte sphérique R< <h (2)="" (3)="" de<br="" goutte="" r~h="" sphérique="" écrasée="">forme « pancake » R>h. Tiré de [72]</h>
Figure 30 – Ecoulement autour d'une goutte dans une cellule de Hele-Shaw. Tiré de [74].
Figure 31 – Structures courantes de génération de gouttes : jonction en T, courants parallèles, flux localisé
Figure 32 – a) Génération de goutte en fonction de l'angle de contact b) Modes de génération en fonction de Ca et de l'angle de contact. Tiré de [75]
Figure 33 – Modes de génération : (gauche) squeezing / Ca faible et (droite) dripping / Ca élevé. Tiré de [77]
Figure 34 – Modes de génération : squeezing, dripping, balloon, jetting et écoulement stratifié
Figure 35 – Etapes de génération de goutte en mode squeezing a) remplissage du canal b) pincement menant à a séparation de la goutte. Tiré de [78]
Figure 36 – Passage de squeezing à dripping avec diminution de la taille de gouttes lorsque Ca augmente. Tiré de [80]34
Figure 37 – Passage du mode jetting à dripping avec W_c qui augmente (Λ diminue) pour différents ratios de débits. Pour Ca=0.1 et λ =1/10. Tiré de [80]35
Figure 38 – Etapes de génération de gouttes en mode Balloon. Tiré de [23]
Figure 39 – Transition des modes selon Ca Q et Λ . Adapté de [80]
Figure 40 – Gouttes organisées dans un canal vu de dessus et vue de côté
Figure 41 – a) Schéma de l'auto arrangement des gouttes b) Photo d'un réseau de bulle auto-organisé. Tiré de [82]
Figure 42 – Influence de la fraction volumique sur l'organisation des gouttes. Tiré de [83]
Figure 43 : a) Structure du dispositif de stockage fabriqué en PDMS b) Principe du stockage/déstockage par retournement. Tiré de [84]
Figure 44 : a) Dispositif d'organisation par drainage b) gouttes désordonnées et organisées. Tiré de [85]
Figure 45 – a) Schémas de fonctionnement du circuit d'organisation par canaux de drainage étroits et b) photo des gouttes organisées. Tiré de [86]

Figure 46 – a) Dispositif d'organisation de bulles. Tiré de [23]. b) structure simillaire de piege à billes. Tiré de [87]
Figure 47 - (gauche) Jonction en T et canaux de drainages (droites) gouttes ralenties par le drainage. Tiré de [88]
Figure 48 – a) Piliers utilisés pour fusionner les gouttes. Tiré de [89]. b) Schéma de principe des écoulements autour des piliers. Tiré de [90]40
Figure 49 – Modification de la forme des bulles monodisperses organisées par le drainage. Tiré de [91]
Figure 50 – Représentation de bords de Plateau en fonction de la fraction volumique. Tiré de [91]
Figure 51 – Gouttes en empilement compact et forme du simili-bord de Plateau formé dans l'espace interstitiel des gouttes
Figure 52 – Exemple de fonctionnalisation en plusieurs étapes a) surface SAM avec des terminaison COOH b) activation par EDC/NHS c) greffage d'un anticorps par liaison peptidique d) désactivation à l'éthanolamine des sites libres e) capture de l'analyte hCG. Tiré de [96]
Figure 53 – Processus de dépôt de SAM : thiols sur or et silanes sur oxyde de silicium. Tiré de [98]
Figure 54 – a) Goutte d'eau fonctionnalisée par des nanoparticules d'or b) Gouttes visibles par marqueur fluorescent GFP greffé sur les nanoparticules d'or. Tiré de [106].
Figure 55 – Goutte d'huile fonctionnalisée par biotinylation. Tiré de [107]
Figure 56 – Gouttes d'huile fonctionnalisées par des APTES. Tiré de [108] 47
Figure 57 – a) Schéma de l'expérience de capture de streptavidine en surface de goutte b) Mesure de la modification de la tension de surface par cette capture. Tiré de [109]47
Figure 58 – Etapes de fabrication des puces microfluidiques
Figure 59 – Etapes de lithographie d'une résine positive
Figure 60 – Gravure chimique d'un substrat silicium de coupe <100>
Figure 61 – Etapes de gravure du silicium en procédé DRIE Bosch
Figure 62 – Dispositif acoustofluidique avec ajout de connecteurs fluidiques (© Nanoport) et électriques (nappe fine flexible multivoies). Tiré de [122]
Figure 63 – Dispositifs de connexions fluidique et électrique amovibles a) Serrage par vis. Tiré de [124]. b) Serrage par sauterelle (© Micronit) c) Serrage avec pointes amovibles (© CorSolutions)
Figure 64 – a) Connecteur 4 voie fluidique (© Dolomite). b) Connecteur à ressort (© Préci-Dip)
Figure 65 – Format de puces et placement sur un substrat 4 pouces
Figure 66 – Support de puces a) schéma b) modélisation CAO et c) réalisation
Figure 67 – Schéma simplifié du banc expérimental.
Figure 68 – Montage expérimental assurant un écoulement par pression hydrostatique.
Figure 69 – Equivalent électrique d'un circuit fluidique alimenté en pression
Figure 70 – a) Schéma d'un montage expérimental avec écoulement contrôlé par pression b) Chambre sous pression accueillant le réservoir d'alimentation et le contrôleur de pression [125]

Figure 71 – Composants servant au montage fluidique : a) connecteur ¼ 28 b) vanne tout ou rien c) férule avec filtre d) connecteur en Y et e) vanne d'injection
Figure 72 – Montage expérimental avec vannes d'arrêt de l'écoulement et purge de pression
Figure 73 – Interfaces utilisateur des programmes de contrôle fluidique développés en LabView et en Python
Figure 74 – Schéma du montage pour la vérification des mesures de débit
Figure 75 – Structure du montage pour la vérification des mesures de débit
Figure 76 – Débits mesurés par le capteur Coriolis (Qc : bleu), le capteur thermique 50 μ L/min (Qt : orange) et le débit estimé (Qe : gris). Equation de la courbe de tendance de Qc (bleu pointillé). Mesure a) complète b) proche de zéro. 1) EDI 2) SDS 10% 3) Huile de soja
Figure 77 – Correcteur Qtc du débit d'huile Qt et sa courbe de tendance
Figure 78 – Equipement utilisé pour la visualisation des écoulements
Figure 75 – Configuration du montage en lumière blanche utilisé pour visualiser des microparticules dans les canaux
Figure 79 – Configuration du montage en fluorescence utilisé pour visualiser des fluides fluorescents
Figure 80 – Modes de vibration d'une onde de Lamb : a) antisymétrique (A ₀) et b) symétriques (S ₀). Tiré de [25]
Figure 81 – Dimension de la membrane et des électrodes de détections (IDT) d'un capteur à onde de Lamb
Figure 82 – Dimension d'une goutte écrasée entre deux plaques. Adapté de [62]
Figure 83 – Surfaces de détection en fond de canal et sur les gouttes approximées par un cylindre
Figure 84 – Gain Gs en fonction de l'angle de contact θ pour : (bleu) h=2R, (rouge) h=R, (vert) h=R/2
Figure 85 – Course d'une particule dans un canal proche d'une surface de capture (en vert) sous l'influence de forces d'advection et de dispersion
Figure 86 – Simulations 2D sous Comsol d'écoulements entre quatre lignes de gouttes organisées équivalent à trois canaux rectangulaires : a) débits et b) lignes de champs 78
Figure 87 – Surfaces de détection (vert) pour une chambre de détection de dimension L x w x h : a) capteur plan (L x W) b) capteur à gouttes : écoulement interstitiel et c) son modèle équivalent
Figure 88 – Fonctions principales à dévelloper pour la conception du capteur acoustofluidique
Figure 89 – a) Jonction en T avec wd = 20 μm et wc = 100 μm. b) Puce standardisée avec jonctions en T
Figure 90 – Puce n° 1 : a) Masques 5" pour gravure b) des canaux et c) des ouvertures d'alimentation
Figure 91 – Fonds de canaux observés au microscope. Echelle : a) 50μm b) 500 μm c) 2000 μm
Figure 92 – Imagerie MEB prise au niveau de la jonction en T pour des gravures : a) RF et b) LF

Figure 93 – Résine de protection (9μm +/- 1μm de 9260) projetée sur les canaux : a) Lithographie des ouvertures d'accès et b) protection de la jonction en T. c) Gravures non désirés à travers la résine de protection84
Figure 94 – Défaut de génération sur les puces gravées avec une protection des canaux par résine projetée
Figure 95 – a) Imagerie MEB de la jonction en T mal protégée. b) Forme de résine probable après recuit
Figure 96 – Résine projetée après lithographie des canaux fluidiques
Figure 97 – Imagerie MEB après les gravures DRIE
Figure 98 – Photos des dispositifs sur puces prêt à l'emploi après découpe
Figure 99 – a) Banc expérimental et b) puce en mode de génération
Figure 100 – Génération semblable au squeezing entre deux rails a) la goutte grossit b) la goutte s'accroche au rail supérieur : $Q_{EDI} = 1\mu L/min Q_{huile} = 2 \mu L/min$
Figure 101 – Séquence de génération de gouttes Q_{EDI} = 30 µL/min Q_{huile} = 2 µL/min 88
Figure 102 – Génération en mode dripping : EDI/SDS 5 % P_c =70 mbar, huile de tournesol P_d =110 mbar
Figure 103 – Génération en mode balloon : EDI/SDS 5 % Pc=11 mbar, huile de tournesol Pd =30 mbar
Figure 104 – Schéma du montage fluidique d'étude de génération en fonction du débit.
Figure 105 – Modes de génération {Q _c , Q _d } : 1) Dripping : 5 μL/min, 3 μL/min. 2) Jetting : 30 μL/min, 5 μL/min. 3) Squeezing : 10 μL/min, 4 μL/min
Figure 106 – Diamètre écrasé D des gouttes d'huiles de soja en fonction des débit Q _d et Q _c
Figure 107 – Remplissage de la chambre avec du SDS 0,5 % pour P _d =[100, 200, 300, 375] mbar
Figure 108 – Remplissage de la chambre pour une génération proche du mode balloon.
Figure 109 – Concept de puce intégrant toutes les fonctions a) Puce complète b) Filtres de drainage
Figure 110 – Protocole proposé pour la détection acoustique d'un élément biologique d'intérêt : 1) génération de gouttes, 2) organisation des gouttes par drainage, 3) mesure acoustique de référence, 4) injection de la solution de concentration, 5) injection de l'échantillon à analyser et 6) mesure acoustique
Figure 111 – Masques de puce n°2 a) Puce b) Implantation des puces sur le subsrat 93
Figure 112 – Puces n°2 sur substrat : a) après gravures, b) après capotage et c) après découpe
Figure 113 – Puce n° 2 et filtres après leur gravure DRIE sur 50um
Figure 114 – Montage expérimental servant à la génération et à l'organisation de gouttes
(puce n ⁻ 2)
Figure 115 – Organisation des gouttes avec la puce n°2. 1) Génération et drainage : $Q_c = 10 \mu L/min$ et $Q_d = 4 \mu L/min$. 2) Poussée des gouttes et compression : $Q_c = 3 \mu L/min$. 3) Organisation par relaxation de la mousse
Figure 116 – a) Gouttes dans les filtres et h) défaut d'organisation de gouttes de faible
diamètre

Figure 117 – Puce n°3 : a) puce complète et b) fourches en bout de filtre
Figure 118 – Imagerie MEB des fourches après gravure DRIE sur 50µm : échelles a) 50µm, b) et c) 30 µm,
Figure 119 – Photos des gouttes sur a) silicium traitée (haut) et non traitée (bas) : EDI (cercle bleu), huile de soja neuve (cercle rouge), huile de soja ancienne (cercle orange). Mesure d'angle de goutte d'EDI sur silicium b) traité et c) non traité
Figure 120 – Schéma et photographies du montage expérimental pour la puce n°3 98 Figure 121 – Protocole d'organisation. Tween 20 0,5% $Q_c=2 \mu L/min$ et Huile de soja
Gd=0,16 μL /hini
Figure 123 – Détail de l'organisation des gouttes avec les voies de drainages ouvertes (étape 3)
Figure 124 – Profil d'intensité lumineuse sur la troisième rangée de gouttes
Figure 125 – Fourches : maillage et résultat de simulation des vitesses d'écoulements (m/s)
Figure 126 – Simulation 2D : vitesses d'écoulements (m/s) et lignes de champs pour les étapes 2 et 3
Figure 127 – Visualisation par fluorescence de l'injection à $Q_p = 0,5 \mu L/min$ entre les gouttes (Huile de soja $Q_d = 0.1$ et SDS 0.5% $Q_c = 3$. Tracé des fronts de l'injection (Intervalle entre les tracés t=12,5s)
Figure 128 – Différents degrés d'homogénéités des écoulements en fonction de la qualité du réseau de goutte (gauche) écoulement symétrique (centre) dissymétrie due à une déstructuration du réseau à gauche de la chambre (droite) organisation d'un large canal d'écoulement au centre de la chambre103
Figure 129 – a) Sections analysées dans le kinogramme. b) Zones de la puce 103 Figure 130 – Kinogramme de l'écoulement au centre de la cellule (rouge) et sur le quart
 Figure 131 – Chargement de la fluorescéine Q_p = 10 μl/min : 1) 0 s : début de l'injection, 2) 10 s : passage du liquide de chargement, 3) 1 min : arrivée du liquide à injecter 104
Figure 132 – Réaction d'activation par EDC/sNHS d'un acide carboxylique d'une molécule
A et création d'une liaison amino-ester avec une molécule B aminée. Adaptée de [143].
Figure 133 – Principe de fonctionnalisation des gouttes par la biotine et de capture de la streptavidine
Figure 134 – Représentation de l'interaction entre la streptavidine et une couche de phospholipides biotinylés - Adapté de [144]
Figure 135 – Plan d'expérimentation de mesure par SPR de la capture. 1) Greffage de chaines C11/C16. 2) Activation et greffage biotine. 3) Capture de streptavidine. 4) capture de biotine sur une surface biotinylée
Figure 136 – Carte des spots et points de mesures (affichés en gris clairs) sur une image des plasmons à 59,4°
Figure 137 – Images différentielles des plasmons pour l'injection de la streptavidine. a) Début de l'injection (1h04min) et b) après élimination des interactions aspécifiques à l'OG (1h26min)

Figure 138 – Courbe SPR couvrant le protocole d'injection de la streptavidine et de la biotine
Figure 139 – Gouttes de 88 μm. a) Dans un tube OD = 1,6 mm, ID = 250 μm. b) Autoorganisées. c) en état séparation de phases dans un tube Eppendorf 1,5 mL 109
Figure 140 – Montage expérimental pour l'injection de streptavidine dans le réseau de goutte (puce n°3)
Figure 141 – Gouttes fonctionnalisées organisées avant injection de l'échantillon 111
Figure 142 – Après 30 min d'injection : a) Fluorescence du fond de canal dû à la streptavidine. b) Gouttes désorganisées et collées entre elles
Figure 143 – Déformation d'un amoncellement de goutte à Q_p = 55 µL/min après injection de la streptavidine 112
Figure 144 – Maillage de gouttes a) avant et b) après formation du couloir d'écoulement.
Figure 145 – Vue éclatée d'un capteur BioMEMS (Biomedical MicroElectroMechanical System) basé sur l'assemblage d'un réseau de membranes piézoélectriques
fonctionnalisées muni d'une interface microfluidique utilisé pour le suivi en temps réel de bioréactions
Figure 147 – Topologies d'interface microfluidique alimentant une chambre de 1 cm². La barre d'échelle représente 10 mm)121
Figure 148 – Simulation des lignes de flux dans la zone réactionnelle pour les différentes géométries
Figure 149 – Simulation numérique des vitesses moyennes des fluides dans les zones réactionnelles. La barre d'échelle est exprimée en mm/s et est limitée aux vitesses inférieures à 1 mm/s pour mieux visualiser les écoulements dans les chambres
Figure 150 – Profil des vitesses au centre des chambres réactionnelles. Les vitesses sont normalisées par la valeur de la vitesse au centre du parcours
Figure 151 – Géométrie de la structure de compensation et paramètres associés. (a) Structure Q pour l'intersection de canaux perpendiculaires. (b) Structure I pour l'intersection d'un canal avec la chambre. Les lignes en pointillés et les surfaces grisées correspondent à la forme finale après gravure
Figure 152 – Principales étapes du procédé de fabrication des dispositifs
Figure 153 – Images prises au microscope des connections canaux-canaux et canaux- chambre pour les différents paramètres de compensation testés avec une profondeur de gravure de 77 μm. (a) cas du set Q1; (b) cas du set Q2; (c) cas du set Q3; (d) cas du set I1
Figure 154 – Résultats de fabrication des interfaces. (a) géométrie C4, entrée et sortie mono-canaux. (b) géométrie C5, collecteur en entrée, mono-canal en sortie. (c) géométrie C6 à double collecteur. L'insert en figure (c) montre une vue agrandie de la ionction
entre canaux et entre les canaux et la chambre
Figure 155 – Représentation schématique du montage expérimental utilisé pour l'étude de vélocimétrie fluidique
Figure 156 – Champs de vitesses expérimentaux obtenus pour les 3 géométries retenues. Les lignes de champs sont également indiquées. A gauche, géométrie C4. Au centre, géométrie C5. A droite, géométrie C6

Figure 157 – Profil des vitesse (en mm/s) au niveau de la diagonale verticale des chambres. A gauche : géométrie C4. Au centre : géométrie C5. A droite : géométrie C6. Figure 158 – Séquence de rinçage présentée en fonction du volume de liquide à titre de comparaison. Le liquide rouge entre par la droite......132 Figure 159 – Dispositif à capacité variable : a) Diode Varicap (jonction PN) : réglable en tension, haute compacité, haute fréquence, basse tension (50V), Gc = 5 – 20, C 5 – 40 pF. [© Toshiba] b) Capacité variable à ailette (air) : réglable mécaniquement par rotation, Gc = 5 – 10, C 30 – 300 pF. [© Oren Elliot Products] c) Capacité ajustable : ajustable mécaniquement par rotation, compacte, moyenne à hautes fréquences, basse tension Figure 160 – Structure schématisée d'une capacité avec diélectrique a) huile et b) eau. Figure 161 – Schéma de principe d'accordabilité de la constante diélectrique en fonction Figure 162 – Electrodes a) murales b) coplanaires et c) parallèles dont une isolée. 139 Figure 163 – Electrodes coplanaires et pénétration T du champ électrique dans le Figure 164 – Potentiel électrique et ligne de champ électrique pour des electrodes a) Figure 165 – a) Dispositif. b) Jonction en T. c) Electrodes centrées dans les canaux. d) Figure 166 – Masques de fabrication : a) gravure DRIE 50µm, b) gravure DRIE Figure 167 – a) Puces fluidiques gravées et découpées sur silicium et b) électrodes sur Figure 168 – Puce assemblée a) côté visualisation b) côté connectiques et c) connectée Figure 169 – Admittance Y [S] du système pour de l'air, de l'eau et de l'huile d'olive. 144

Liste des Tables

Introduction générale

Les domaines de la recherche en biologie, de l'analyse médicale ou de la compréhension du vivant nécessitent de détecter des éléments spécifiques, comme des protéines, des anticorps de bactéries ou même des virus, présents dans le corps humain. Ces analytes sont présents dans le sang, la salive voire au niveau cellulaire. La détection d'analyte est réalisée généralement en laboratoire après un prélèvement plus ou moins important d'un échantillon corporel.

Les techniques d'analyses varient en fonction de l'analyte recherché (culture cellulaire, PCR, spectroscopie...) mais nécessitent l'emploi d'appareils coûteux, l'intervention de personnel qualifié, un temps de réaction plus ou moins long (de quelques heures à une journée) et des quantités d'échantillons importants (5mL par tube pour une prise de sang). Dans l'absolu, les analyses biologiques classiques représentent un coût important tant financier, du point de vue de la technicité de la mesure, qu'humain, vue la quantité d'échantillons prélevés, surtout lorsque les mesures doivent être effectuées quotidiennement (ex : dosage du glucose pour les diabétiques).

Des dispositifs d'analyses biologiques sont néanmoins sortis des laboratoires et ont su se frayer un chemin au sein de la vie courante, sous l'apparence de biocapteurs compacts, portables et peu coûteux. Les appareils de mesures de glycémie et les tests de grossesses par exemple répondent à un besoin de diagnostic médical quotidien ou occasionnel, par des méthodes de prélèvement peu invasif, demandant de faibles volumes (0,5 mL de sang pour un test de glycémie) et pour un temps de mesure faible (respectivement de l'ordre de la seconde ou de la minute). Les mesures rapides réalisées à l'aide de ce type d'appareil à destination du patient ou du praticien sont appelées test Point of care (Point Of Care Testing : POCT) (Figure 1).



Figure 1 - Système d'analyse portable de type POCT à cartouche microfluidique. Tiré de [1].

Toutefois, l'intégration de techniques de laboratoire sur des dispositifs compacts ne se limite pas à ces seuls cas. La microfluidique, le domaine de recherche lié à l'étude et à la manipulation des fluides en faible quantité, a contribué au développement de biocapteurs aux sensibilités désormais équivalentes à celles des techniques d'analyses traditionnelles tout en manipulant de faibles volumes d'échantillons, dans des temps courts et sur des dispositifs de petites tailles. Ils sont aujourd'hui utilisés dans la recherche sur la génomique, la protéomique, l'immunologie, l'étude des cellules unique ou encore la bactériologie. En intégrant des fonctionnalités équivalentes aux appareils de laboratoire, ces systèmes ont gagné le nom de laboratoire sur puce (Lab On Chip : LOC).

De surcroit, l'utilisation de ces derniers ne se limite pas aux analyses biologiques mais trouvent des applications dans le domaine de la chimie. Ils intéressent fortement l'industrie quant à la réduction de la quantité de réactifs entrant en jeu dans les synthèses chimiques. En définitive, l'utilisation de cette technologie se place aujourd'hui tant du côté de la recherche et de l'industrie que de la vie courante. Qui plus est, avec l'apparition des bracelets intelligents capables d'afficher le rythme cardiaque sur le téléphone, nous rentrons assurément dans une époque où l'auto-surveillance (self monitoring) est rentrée

dans les mœurs. Finalement, le développement de nouveaux systèmes d'analyse deviendra sans doute un enjeu important tant économique que sociétal.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux décrits dans ce manuscrit. Celui-ci est organisé autour de 5 chapitres. Au préalable, un avant-propos est présenté afin de situer mes travaux dans le cadre de systèmes microfluidiques développés à des fins d'analyse biologique, de présenter les travaux antérieurs à mon travail de thèse qui ont été réalisés au sein de notre laboratoire et enfin de présenter brièvement trois sujets concernant la microfluidique pour l'analyse biologique développés lors de cette thèse.

Le chapitre 1 présente un état de l'art restreint aux spécificités scientifiques qui seront utiles à la compréhension de l'ensemble du manuscrit. Un état de l'art complet de la microfluidique est en effet au-delà du but poursuivi ici. Cet état de l'art se focalisera donc sur les systèmes microfluidiques utilisés en biologie, la physique des écoulements en microcanaux, la microfluidique diphasique et les méthodes de fonctionnalisation biologique des biocapteurs.

La mise au point d'un banc de caractérisation des dispositifs fabriqués lors de cette thèse fera l'objet du chapitre 2. Il y est aussi présenté les techniques de microfabrication employées pour la réalisation des dispositifs. Nous y proposons un format de dispositif et un support associé permettant un branchement rapide au banc de caractérisation.

Les chapitres suivants concerneront les travaux que nous avons réalisés à travers trois sujets d'études. Dans le chapitre 3, nous présentons nos travaux relatifs à la réalisation d'un biocapteur acoustique employant des gouttes comme interface de détection. Il y est développé des dispositifs microfluidiques pouvant générer, manipuler et fonctionnaliser des gouttes. Dans le chapitre 4, nous travaillons sur des méthodes d'homogénéisation de vitesses d'écoulements dans les puces microfluidiques. Le chapitre 5 traite de puces à détection capacitive à mesure influencée par des gouttes. Une conclusion générale ainsi que les perspectives envisagées seront proposées en fin de manuscrit., Enfin, nous détaillons en annexe les procédés de réalisation des dispositifs employés dans les différents chapitres afin de fluidifier la lecture de ce manuscrit.

Avant-propos

Le but de cet avant-propos est de présenter la problématique générale des systèmes microfluidiques développés pour conduire des analyses biologiques. Une architecture type de ces microsystèmes sera présentée ainsi que quelques méthodes de détection biologique et des microsystèmes proches de ceux développés lors de cette thèse.

Cette dernière fait suite à un certain nombre de travaux réalisés au sein de notre laboratoire. Ils feront l'objet d'une courte description. La partie principale de cet avant-propos concernera la présentation des trois domaines principaux abordés dans ce travail et qui feront l'objet d'une description détaillée dans les chapitres 3 à 5 de ce manuscrit.

1.1. <u>Systèmes microfluidiques pour de l'analyse biologique</u>

L'analyse biologique en système microfluidique ne constitue encore qu'une fraction de l'ensemble des analyses biologiques possibles, mais une fraction qui augmente sans cesse. Les biocapteurs sont ainsi utilisés pour des applications variées de détection comme la quantification de protéine, la détection d'anticorps ou la visualisation d'une cellule (Figure 2).



Figure 2 – Exemple de méthodes d'analyses réalisables sur puces. Tiré de [2].

Un biocapteur est généralement constitué d'une surface recouverte de biorécepteurs chargés de capturer des analytes d'intérêt. A proximité de cette biointerface, un transducteur sert à délivrer un signal en fonction des analytes capturés. Ce système est entouré d'une structure fluidique permettant d'amener l'échantillon au contact de la zone de capture (Figure 3).



Figure 3 – Structure classique d'un microsystème d'analyse biologique.

Le cycle de fonctionnement d'un biocapteur relatif à une mesure en milieu liquide peut être décrit de la sorte :

- *Fonctionnalisation de l'interface*. Les biorécepteurs sont immobilisés sur l'interface de détection. Le greffage direct d'un biorécepteur sur l'interface n'est pas toujours réalisable en raison de leurs terminaisons chimiques. Cela peut prendre plusieurs étapes et mener à une construction biologique demandant l'empilement de plusieurs molécules.
- *Injection de l'échantillon*. L'échantillon est amené à proximité de la zone de détection. Pour cela il faut l'introduire dans le système puis appliquer une force responsable de la mise en mouvement du liquide.
- *Capture des analytes*. Les biorécepteurs capturent les analytes auxquels ils sont sensibles. Il faut veiller à la bonne spécificité de la capture et éviter les interactions non spécifiques avec les molécules environnantes.
- *Détection de la capture.* Un signal mesurable est généré en fonction de la quantité d'analytes capturés sur la surface de détection. La sensibilité de la méthode de transduction à la capture d'analyte est le facteur important ici.
- *Régénération*. Las analytes capturés sont évacués pour permettre une nouvelle mesure. L'analyte et le biorécepteurs sont difficilement séparables en raison d'une forte affinité. La méthode la plus efficace est de détruire la bio-interface et de régénérer la surface de détection pour effectuer une nouvelle fonctionnalisation (Figure 4).



Figure 4 – Fonctionnement d'un microsystème d'analyse biologique.

1.1.1. <u>Méthodes de régénération</u>

Peu de capteurs incluent une étape de régénération et donc une réutilisation immédiate. La biointerface est souvent à usage unique et demande d'être remplacée entre chaque mesure. En effet le nettoyage de la surface peut nécessiter des réactifs agressifs (ex : solution piranha) non compatibles avec l'environnement de mesure. La contamination croisée des échantillons liée à un mauvais nettoyage de la surface n'existe pas dans les dispositifs à usage unique. Les traitements chimiques liés à la fonctionnalisation sont difficilement reproductibles avec la même efficacité lorsque les biorécepteurs sont régénérés. En somme, il est souvent nécessaire de remplacer la surface active. Les systèmes de détection commerciaux comportant une partie active jetable, sous forme de languette ou de papier, sont une réponse à cette problématique. Ce n'est cependant pas une solution envisageable lorsque le dispositif est un monobloc couteux à développer ou lorsque l'enchainement rapide de mesures est souhaitable.

En résumé, la régénération de la surface active est une option intéressante mais difficile à mettre en place puisqu'elle demande de maitriser les étapes de nettoyages et de fonctionnalisation pour enchaîner les mesures. La meilleure solution permettrait la régénération directement dans le biocapteur en fonctionnement. Sans cela, chaque mesure demandera de sortir le capteur du banc de mesure pour le remplacement ou la régénération de l'interface, entrainant des étapes critiques de remise en eau ou de nettoyage du système.

Une alternative possible est de déplacer la surface active sur un support facilement évacuable par la puce en fonctionnement. Les étapes de fonctionnalisation, de nettoyage et de régénération sont alors décorrélées de la surface du transducteur. L'usage de billes magnétiques pour répondre à cette problématique est une solution étudiée actuellement [3] par différents groupes de recherche (Figure 5).



Figure 5 – Fonctionnement d'un microsystème d'analyse biologique électrochimique à base de billes. a) introduction des billes fonctionnalisées b) maintien des billes en face du système de détection c) injection de l'échantillon d) capture des analytes e) injection des marqueurs f) détection électrochimique g) nettoyage du capteur. Tiré de [3].

1.1.2. <u>Méthodes de détection de la capture</u>

Les méthodes de transductions utilisables afin de mesurer la quantité d'analyte capturé sont de nature acoustique, électrique, optique, thermique ou encore magnétique. Nous détaillons à la suite les méthodes que nous employons et qui font partie des méthodes les plus usitées.

1.1.2.1. Détection Optique

Les biologistes emploient quotidiennement des dispositifs de mesures optiques plus ou moins complexes pour étudier et observer le vivant. En plus de la microscopie classique, les techniques de fluorescence [4] ou chimiluminescence sont couramment employées pour l'observation des cellules ou la mesure d'interactions biologiques. Les dispositifs optiques permettent d'observer à distance et sans dégradation des échantillons avec un temps de mesure quasi instantané.

Il en est de même en microfluidique, les circuits étant souvent fabriqués avec des matériaux translucides pour permettre l'observation par des moyens classiques de microscopie. Pour les mêmes raisons, les techniques de spectrophotométrie (absorbance) et de spectroscopie infrarouge (FTIR) sont aussi applicables. La résonnance de plasmons de surface (SPR) est employée pour quantifier sans marquage la capture de molécules biologiques sur une surface d'or. Cette technique ainsi que la LRSPP (Long-Range Surface Plasmon Polariton), utilisant tous deux les plasmons de surface, ont été intégrées



sur puces (Figure 6). Nous relevons même dans la littérature l'existence d'un dispositif portables POCT d'un système SPR [5].

Figure 6 – (gauche) Puce compacte LRSPP. Tiré de [6]. (droite) Puce SPR à capture améliorée par ondes acoustique de surface (SAW). Tiré de [7].

1.1.2.2. Détection Électrique et Électrochimique

Les dispositifs à détection électrique ou électrochimique déterminent la quantité d'analytes présents à proximité d'électrodes de mesures en relevant des signaux électriques [8], [9]. La nature du signal mesuré peut être un courant (Figure 5), une tension, une capacité [10], [11], ou une impédance [12], [13]. Ces systèmes sont technologiquement simples, facilement intégrables et souvent peu coûteux. Cette technologie est utilisée pour des systèmes portatifs (ex : glucomètre) ou des sondes avec un ciblage précis (ex : détection d'ion, ADN [14], protéines...). Ces capteurs sont sensibles à des paramètres variés comme les changements de pH de la solution, les variations de charges, la présence d'ions, ou la modification de la surface active (conformation, épaisseur, constante diélectrique, orientation) [8]. Certains de ces systèmes permettent une détection sans marquage de protéines [11], [15], [16].

1.1.2.3. Détection Acoustique

Les systèmes à ondes acoustiques offrent la possibilité d'agir ou de sonder les éléments à leur contact. Ils fournissent des capteurs compacts, à bas coût et hautement sensibles, capables de détecter de faibles variations de la valeur de nombreuses propriétés physiques telles que la masse, la densité, la pression, la température ou la viscosité [17]. En conséquence, en plus de la détection de marqueurs biologiques, ils sont employés dans de nombreuses applications. La transduction acoustique se fait par le biais de matériaux piézoélectriques excités par des signaux électriques. La mesure de la présence d'analyte passe par la modification de la réponse acoustique du signal : déphasage, atténuation ou modifications des modes de résonnance [18]. Les dispositifs acoustiques sont différentiés selon leurs modes d'excitations, avec la nécessité en milieu liquide de prendre en compte la forte atténuation de certains types d'ondes acoustiques. Les systèmes suivants sont compatibles avec la détection d'éléments biologiques en milieu liquides sans marqueurs : les balances à Quartz (QCM) [19], les systèmes à ondes de Love [20], à ondes de volumes en couche mince (FBAR)[21] et à ondes de Lamb (FPW)[22].

1.2. Contexte de recherche et antériorité

Ce travail de recherche s'effectue dans l'équipe BioMicroDevices (BMD) du département Micro Nano Sciences & Systèmes (MN2S) de l'institut de recherche FEMTO-ST situé à Besançon. Le contexte régional nous place dans un bassin industriel lié aux microtechniques qui découle des traditions horlogères locales. Les travaux de recherches effectués dans l'institut recouvrent un spectre scientifique large (mécanique, optique, acoustique...) mais se caractérisent par une coloration des projets teintés par le monde des microsystèmes. Les thèmes de recherches de mon équipe d'accueil sont centrés sur l'analyse et la caractérisation d'éléments biologiques (protéomique, immunologie...). Au sein de l'équipe, nos travaux s'orientent particulièrement autour de la conception et la réalisation de microsystèmes acoustiques dédiés à la détection d'analytes en milieu liquides. Nous développons nos microsystèmes dans la salle blanche de la centrale de technologie MIMENTO appartenant au réseau des grandes centrales RENATECH. Les analyses biologiques s'appuient sur la plateforme protéomique CLIPP.

Différentes thèses réalisées au sein de mon équipe d'accueil ont traité de thèmes relatifs à mes travaux et portent sur l'acoustofluidique, la microfluidique diphasique et l'analyse biologique. Ils ont conditionné et influencé mes recherches et donc leur évocation est utile à l'exposé de mes travaux.

1.2.1.1. Microfluidique diphasique accordable - Nathalie Tarchichi - 2013

N. Tarchichi [23] a développé des microsystèmes fluidiques diphasiques pour étudier la génération de gouttes d'huiles dans de l'eau. Elle a aussi développé des puces pour stocker des bulles d'air dans de l'eau en réseau afin d'étudier leur interaction avec des ondes acoustiques ou des signaux optiques.



Figure 7 – a) Puces pour génération de gouttes avec une jonction en T. b) Puce pour génération et mise en réseau de bulles . Adaptés de [23]

Les circuits fluidiques sont réalisés par gravure plasma DRIE dans du silicium. Ils sont ensuite scellés avec du verre par collage anodique puis découpés à la scie pour produire des puces unitaires. Les puces sont connectées aux circuits d'approvisionnement et de contrôle fluidique par l'intermédiaire d'une aiguille collée sur chaque entrée.

Le sujet traite de l'étude de la génération de gouttes d'huiles et de bulles d'air dans de l'eau au sein de microsystèmes. Les gouttes sont générées dans une structure en T en imposant des débits sur les phases continue (eau) et dispersée (huile) à l'aide de pousse-seringues. Fait particulier, les gouttes faites d'huile de silicone sont générées dans de l'eau sans tensioactifs.



Figure 8 – Génération en mode balloon. La distance entre goutte l varie avec la variation de débit de la phase continue. Adapté de [24].

Elle a présenté un mode inédit de génération de goutte : le mode balloon [24]. En dessous d'une vitesse critique de la phase dispersée (huile), les gouttes sont générées à taille fixe et ne dépendent plus que de la dimension des canaux. La fréquence de génération de goutte est proportionnelle à la vitesse de la phase dispersée. La distance entre les gouttes est alors réglable par la variation de vitesse de la phase continue (eau) pour une vitesse de phase dispersée fixe.

La possibilité de faire varier la distance entre les gouttes sans faire varier leur diamètre est intéressante pour piloter la densité de surface occupée par la phase dispersée. Cette idée sert de principe de base au projet de capacité électrique pilotée par la fluidique étudié en chapitre 4. De plus, pouvoir générer des gouttes en contact rapproché peut se révéler utile pour créer un arrangement compact de gouttes qui est un objectif du projet de capteur acoustique diphasique du chapitre 3.

1.2.1.2. Innovative detection methods in liquid for a lamb wave biosensor - Feng Li - 2008

F. Li [25] a développé des dispositifs acoustofluidiques à onde de Lamb et étudié les réponses acoustiques de gaz et liquides au contact du capteur. Il a notamment étudié les propriétés des liquides mesurables grâce aux ondes évanescentes. Il défend l'intérêt de l'utilisation de capteurs à ondes de Lamb dans des biocapteurs, en comparaison des autres types d'ondes, en s'appuyant sur leur sensibilité et leur capacité à mesurer les propriétés des liquides.



Figure 9 – Représentation de l'onde évanescente dans le liquide issu de l'onde de Lamb. Tiré de [25].

Les capteurs à ondes de Lamb présentent la capacité de mesurer plusieurs paramètres (masse, densité, viscosité, température) au travers des modes de vibration antisymétrique A0 et symétrique S0. Le mode S0 est uniquement sensible aux propriétés des éléments sur la surface. Le mode A0 est sensible aux propriétés de la surface et du liquide traversé par l'onde évanescente générée dans ce dernier. Li a d'ailleurs montré un décalage en fréquence du mode A0 proportionnel à la concentration en sel du liquide et donc de sa densité.



Figure 10 – Puce à onde de Lamb avec fil de connexion (wire bonding). Puce sur support avec connections électriques et chambre fluidique faite en PDMS. Tiré de [25].

Ce type de capteur est composé d'une fine membrane vibrante (2 μ m ou 15 μ m x 8mm x 8mm) sur laquelle se trouve la surface bioactive. La fonction acoustique est apportée par une couche mince

piézoélectrique d'AlN déposée sur la membrane. Les ondes acoustiques sont générées et mesurées par l'intermédiaire de peignes interdigités (IDT) déposés sur la couche d'AlN.



Figure 11 – Structure du capteur à onde de Lamb. Adapté de [25].

Les ondes de Lamb présentent une bonne sensibilité pour une détection en milieu liquide. Cependant les capteurs à ondes de Lamb ont comme inconvénient d'être fragiles, leur sensibilité étant relative à la finesse de la membrane. De plus leur fabrication est difficile et les contraintes internes liées aux dépôts des couches minces sur la membrane sont à prendre en compte.

La possibilité offerte par les ondes de Lamb de mesurer les propriétés du liquide en contact permettrait de créer des capteurs acoustiques non seulement sensibles à l'interface de la membrane mais aussi dans le volume avoisinant. Nous avons pour objectif de développer un capteur acoustique dont la surface de détection (surface de gouttes) s'étend sur la hauteur du canal (50µm). Ce capteur à ondes de Lamb sert donc de référence pour le choix des technologies et des dimensions des capteurs développés dans le chapitre 3.

1.3. Travaux de thèse

Je présente dans ce manuscrit les travaux réalisés durant ma thèse. Le sujet principal porte sur le développement d'un capteur microfluidique diphasique pour de la détection biologique par acoustique (chapitre 3). Cette thèse présente aussi deux sujets ancillaires. Le premier porte sur l'homogénéisation des vitesses d'écoulements dans une chambre de détection pour un capteur biologique acoustique (chapitre 4). Le second traite de la réalisation d'un condensateur à capacité variable à base de microfluidique diphasique (chapitre 5). Ces études ont des finalités variées mais partagent toutefois des technologies de réalisation, des outils de simulation et des appareils de mesure et contrôles. Nous pouvons les réunir au sein d'une thématique commune : le développement de dispositifs microfluidiques sur silicium. Je présente ici les sujets initiaux et les premières réflexions qui en sont ressortis permettant de comprendre le cheminement de mon travail de thèse et les différentes interactions entre ces sujets.

1.3.1. <u>Développement d'un système microfluidique diphasique pour de la détection</u> <u>biologique par acoustique</u>

Les biocapteurs développés actuellement ont souvent pour défaut de ne permettre qu'une seule mesure. Après usage, la surface fonctionnalisée doit être remplacée ou, au mieux, régénérée. Néanmoins peu de dispositifs permettent une régénération *in-situ*. Donc, pour enchaîner deux mesures successives, la plupart des dispositifs demandent un arrêt du banc de mesure suivi d'un changement de dispositif puis d'une remise en fluide. Cet aspect est assurément un écueil à l'émergence de nouveaux appareils de détection biologiques.

Pour répondre à cela nous proposons l'alternative de déplacer la fonctionnalisation sur un support amovible, configurable, nettoyable et enfin régénérable : des gouttes. L'utilisation de gouttes fonctionnalisées permet de disposer d'un dispositif de détection sur lequel ne s'effectue plus de traitement chimique, sauf nettoyage. Le dispositif devient alors un capteur générique et réutilisable. De plus, la fonctionnalisation de goutte est réalisable dans le dispositif et peut-être enchainée avec
l'insertion de l'échantillon. En rajoutant les étapes de génération et d'évacuation de gouttes, nous obtenons un dispositif capable d'enchainer les mesures pour des modèles biologiques différents.

Afin d'obtenir une surface d'interaction de taille importante, nous choisissons d'organiser les gouttes en réseau 2D au contact de la membrane. Cette structure cristalline est aussi avantageuse d'un point de vue acoustique, nous supposons que cela permettrait de créer des résonances du système pour amplifier le signal de mesure. Au niveau de l'interface, les gouttes relient la membrane et la surface haute de la chambre. Les liquides d'interactions circulent alors entre les gouttes dans des espaces interstitiels de faibles dimensions. Les vitesses d'écoulement à proximité des gouttes sont non nulles et entrainent des recirculations dans les gouttes.

Les phénomènes de convection et de diffusions favorisent dès lors la capture des molécules d'intérêts sur les gouttes. Du point de vue des interactions biologiques l'utilisation de gouttes semble plus efficace. Il reste cependant à détecter la capture des analytes non plus directement à proximité de la membrane de détection mais maintenant sur la totalité de la goutte et donc sur la hauteur de la chambre. Les travaux effectués dans mon équipe d'accueil ont montré que les ondes évanescentes générées par des ondes de Lamb peuvent mesurer des propriétés physiques des fluides en contact sur toute la hauteur du canal. Cette particularité démontrée pour ce type d'onde nous fait choisir cette approche, même si la détection de variation de masse des analytes risque de ne pas être possible. Nous devrons donc nous intéresser à d'autres valeurs physiques susceptibles de modifier la réponse acoustique des ondes de Lamb. Les analytes étant capturés en surface des gouttes, nous nous intéressons aux propriétés de l'interface. La rigidification de l'enveloppe de la goutte ou la modification de sa tension de surface sont des grandeurs physiques dont la mesure pourraient refléter la capture d'analyte.

Pour la génération des gouttes nous nous appuyons sur une thèse précédente mettant en œuvre une jonction en T. Nous dimensionnons donc la structure de génération de gouttes à partir des résultats obtenus dans cette thèse. Durant cette dernière a été montré un mode de génération de gouttes particulier, le mode balloon. Il offre plus de flexibilité que les autres modes de génération permettant ainsi de régler facilement l'espacement entre des gouttes gardant la même taille. Au début du travail de thèse, nous reprenons les conditions expérimentales, incluant les réactifs (huiles, eau), pour profiter des spécificités de ce mode de génération.

Ce sujet concerne donc l'étude, c'est-à-dire la conception, la simulation, la fabrication et la caractérisation, d'un microsystème capable de détecter la présence d'un élément biologique d'intérêt dans un échantillon à analyser. La détection est à mettre en œuvre par la capture de l'élément d'intérêt autour de gouttes générées dans le dispositif. Ces gouttes sont à organiser en réseau dans une chambre de détection acoustique. L'analyse du signal acoustique doit permettre de détecter les analytes. Ces aspects sont résumés sous forme graphique en Figure 12.



Figure 12 – Représentation des fonctions du microsystème à concevoir 1) Générer des gouttes 2) Fonctionnaliser les gouttes 3) Organiser les gouttes 4) Capturer les analytes 5) Détecter par ondes acoustiques.

1.3.2. <u>Homogénéisation des vitesses d'écoulement dans une chambre de détection</u>

Les écoulements en microfluidiques sont de nature laminaire et présentent donc des lignes de flux uniformes sans perturbations ni tourbillons ce qui est intéressant pour faire circuler des fluides dans une chambre de détection acoustique. La présence de zones à faibles écoulements, les zones mortes (ex : coins d'une chambre carré), peut gêner au renouvèlement des analytes au niveau de l'interface de détection. Ce point est même critique pour la circulation des réactifs au contact de l'interface pour la fonctionnalisation ou la régénération de la surface. Les structures classiques de chambre carrée avec une entrée et une sortie montrent des écoulements non homogènes avec des vitesses importantes au centre et des zones mortes sur les bords. Pour améliorer l'efficacité de ces étapes, il est nécessaire de maitriser les écoulements et de proposer des méthodes pour homogénéiser les vitesses d'écoulement et de renouvellement des fluides dans la chambre (Figure 13).



Figure 13 – Structure du capteur acoustique et architectures d'homogénéisation des écoulements étudiées.

Ce sujet, mené en parallèle des deux autres, m'a permis de m'intéresser à la maîtrise des phénomènes d'écoulements laminaires dans les structures microfluidiques. Cette étude a pour objectif d'homogénéiser les écoulements dans une chambre de détection acoustique. Pour cela nous étudions différentes géométries d'arborescences pour les canaux d'entrées et de sortie fluidique. Le procédé de fabrication varie et la connectique est différente mais nous restons sur des dispositifs gravés sur silicium avec un capot en verre.

La visualisation des écoulements est un point important de ce projet. Il demande d'adapter une méthode de visualisation des écoulements par suivi de particule (PIV et μ PIV) aux spécificités de nos structures. En l'occurrence nous faisons face à des contraintes qui placent cette expérimentation dans un dimensionnel mésoscopique. En effet, la puce présente une profondeur inférieure à 100 μ m et la résolution recherchée est à l'échelle du micromètre. Nous sommes donc dans le cadre de la μ PIV qui nécessite l'utilisation de microscopes et de micro particules. Toutefois la chambre est de taille centimétrique. Cela rend difficile l'utilisation d'un microscope et oblige à l'utilisation d'appareillages à faible grossissement nous rapprochant de la méthode PIV macroscopique. Nous développons donc un montage expérimental dédié à l'étude de ce dispositif afin d'obtenir des résultats comparables à des simulations effectuées par méthode des éléments finis (FEM).

Cette étude demande d'améliorer l'homogénéité des écoulements dans une chambre de détection acoustique en modifiant les architectures d'entrée et de sortie par lesquelles le liquide à analyser transite. Vue la taille importante de la chambre (1cm x 1cm x 80µm), il est nécessaire de développer un montage spécifique de PIV pour caractériser les écoulements. Les résultats expérimentaux sont à mettre en parallèles avec des simulations faites par méthode des éléments finis.

1.3.3. <u>Condensateur à capacité variable à base de microfluidique diphasique</u>

Le mode balloon découvert par N. Tarchichi permet de générer des gouttes de taille fixe avec un intervalle pilotable. Cela revient à modifier la fraction volumique de l'émulsion en contrôlant le débit de la phase aqueuse. Les phases aqueuses et huileuses présentent une différence de constantes diélectriques importante ($\varepsilon_{eau} \sim 80$ et $\varepsilon_{huile} \sim 2,5$) et faire varier la distance entre les gouttes reviens donc à modifier la constante diélectrique de l'émulsion. En partant de ce constat, il est envisageable de créer une capacité électronique dont la valeur est pilotable par de la fluidique et qui varie sur une plage de valeur intéressante (Figure 14).



Figure 14 – Schéma de principe décrivant la variation de capacité au travers de la permittivité de l'émulsion en fonction de la distance entre gouttes.

Ce sujet effectivement conduit en début de thèse doit permettre de mettre en place les protocoles et appareils nécessaires à la fabrication de dispositifs microfluidique et au contrôle des écoulements utiles au sujet de thèse principal. Il comporte plusieurs verrous technologiques et a pour objectif de déterminer les protocoles de fabrication adaptés aux dispositifs microfluidiques intégrants des connecteurs électriques pour des structures acoustiques ou capacitives.

D'un point de vue du contrôle des écoulements, il est nécessaire de créer une plateforme capable de contrôler les débits des différentes phases avec des temps de réponse faible. Il faut à la fois connecter des canaux fluidiques et des contacts électriques sur des dispositifs avec des topologies et fonctionnalités différentes. Nous devons pouvoir alterner rapidement différentes versions de puces pour enchainer les expérimentations. Finalement, l'observation optique des écoulements et des réactions s'opérant dans le dispositif doit être pris en compte.

En conséquence, ce projet met en place une connectivité fluidique et électrique modulaire, avec une mise en place rapide et adaptable aux différentes versions et fonctionnalités de puces. Cette connectique est intégrée dans un banc de contrôle et de mesure microfluidique avec observation optique. Qui plus est, une standardisation des dimensions des dispositifs conçus est fixée. En particulier pour ce sujet, il faut déterminer un protocole capable d'intégrer des électrodes dans un dispositif microfluidique en prenant en compte les problématiques de packaging (étanchéité) et de mesure de capacité (risque d'électrolyse si l'électrode en contact de l'eau ou d'atténuation du signal s'il existe une couche isolante.)

Ce sujet consiste à réaliser une capacité électrique variable pilotée par une émulsion microfluidique. La valeur de la capacité dépend de la permittivité relative globale de l'émulsion. La génération de gouttes en mode balloon dans une jonction en T permettrait de contrôler la permittivité globale en pilotant la distance entre gouttes. Ce travail comporte aussi la création d'une instrumentation et d'un standard de puces adaptés aux systèmes microfluidiques que nous développons.

Chapitre 1

État de l'art

1.1. Introduction

Ce chapitre propose un état de l'art des notions qui seront utiles à la compréhension rapide du manuscrit. Comme déjà précisé dans l'introduction générale, il est hors de propos de présenter un état de l'art exhaustif de l'utilisation des techniques microfluidiques dans la détection d'entités biologiques. Le choix est fait de restreindre cet état de l'art aux seules spécificités scientifiques des travaux menés pendant cette thèse.

Ce chapitre contient en outre les définitions de base et la description des principes physiques qui ont été mis en œuvre durant ces travaux. En particulier, nous aborderons les aspects de physique des fluides dans des microcanaux et les notions de microfluidique diphasique.

Ce chapitre se terminera par une description des méthodes les plus courantes concernant la réalisation de biorécepteurs et comment des entités biologiques cibles peuvent être détectées dans les dispositifs microfluidiques. Il n'a pas été possible de mettre réellement en œuvre ces méthodes dans les dispositifs étudiés pendant cette thèse par faute de temps, principalement en raison des grandes difficultés que représente la fabrication de ces dispositifs spécifiques par technologie de salle blanche. Néanmoins, la prise en compte des contraintes liées à la bio-fonctionnalisation des dispositifs est indispensable à la conception de ces derniers.

1.2. Les systèmes microfluidiques

Les thématiques de recherche liées à l'étude des fluides et dispositifs microfluidique connaissent un intérêt croissant depuis le début des années 1990 à partir du moment où les structures de base de la fluidique (pompes, capteurs et vannes [26], [27]) ont pu être miniaturisées sur des puces à l'aide des techniques de micro fabrications. La figure 15 montre l'évolution du nombre de publications pour différents types de dispositifs ou fonction au cours des dernières décennies.



Figure 15 – Nombre de publications par années sur la microfluidique et les termes associés, notamment ceux liés aux gouttes. Tiré de [28].

C'est aussi dans ces années que sont apparues les premières puces commerciales microfluidiques dédiées à l'analyse biologique [29]. Les publications et les investissements [30] dans ce domaine sont en constante croissance depuis cette époque et notamment depuis les année 2000. Les principales applications des recherches en microfluidique sont liées aux domaines de la biologie et de la chimie. Elles ont permis l'arrivée dans la vie courante d'évolutions majeures comme les imprimantes jet d'encre, les tests de grossesse, les capteurs de glycémie, le papier électronique [31], [32] et les micros pompes à insuline (Figure 16).



Figure 16 – Circuit d'une micro pompe à insuline et son schéma de fonctionnement. Tirés de [33].

Ces méthodes permettent aujourd'hui d'intégrer sur des puces de dimensions centimétriques des applications d'analyse ou de synthèse chimique (Lab on Chip) faites autrefois en laboratoire en réduisant les volumes des échantillons et des réactifs, les coûts des appareillages et les temps de réaction [34]. En s'appuyant sur les procédés issus de la micro-électronique et des microsystèmes, la recherche a donné lieu au développement sur puces de fonctions de base microfluidiques telles que des pompes péristaltiques [35] et à diaphragme [36], des vannes [35], [36], des capteurs de pression, des capteurs de débits [37]–[41], des mélangeurs (Figure 17), des trieurs de particules et des réacteurs de synthèse [42].



Figure 17 – Structure de mixage microfluidique. Tiré de [43].

Outre la chimie, l'analyse biologique est l'une des applications majeures de la microfluidique. Grace à elle nous avons vu apparaitre des puces intégrant toutes les fonctions nécessaires à des opérations complexes comme par exemple la PCR [44]. Ces dispositifs permettent d'accomplir des analyses avec des temps de réaction courts, de faibles quantités d'échantillons (μ L) en remplacement d'appareils coûteux.

L'application de ces thématiques de recherches touchent des problématiques de santé actuelles tels que la génomique, l'immunologie [45], le recherche sur le cancer [46] (Figure 18), les interactions cellulaires [47] ou l'études des organes (organ-on-a-chip) [48], [49]. On trouve aussi des applications comme l'étude et la manipulation de cellules uniques [50], l'analyse le greffage et la capture, le ciblage de médicament sur les cellules malades et l'analyse de protéines.



Figure 18 – Circuit d'étude de cellules cancéreuses. Tiré de [51].

La microfluidique a donné naissance à une sous-catégorie, la microfluidique diphasique. C'est un domaine qui touche à la génération, la manipulation et l'utilisation de microgouttelettes. Elle est employée pour sa capacité à confiner des cellules ou des réactions dans un environnement clos transformant ainsi la goutte en bioréacteur. Déplacer les réactions de la puce à la goutte dégage des avantages significatifs. Ainsi grâce au confinement et à la séparation des réactifs dans les gouttes, on peut observer une diminution de la quantité des réactifs, un meilleur dosage et une diminution des risques de contamination entre réactions. Cela permet de réaliser des études à grandes échelles [52] en multiplexant les réactions avec des paramètres différents pour chaque goutte. Ces études tirent aussi avantage des vitesses élevées de génération de gouttes (10 KHz). La microfluidique diphasique trouvent des applications dans la biologie et la chimie : génomique, immunologie, synthèse de cristaux, microbiologie [53]. L'isolement des réactions dans des gouttes construits autour de fonctions applicables aux gouttes (Figure 19) allant de la génération de goutte à l'analyse en passant par des étapes de tris, d'incubation, de mélange [55], de rinçage, de coalescence, de section de gouttes [56]...



Figure 19 – Plateforme complète sur l'étude des microalgues intégrant 6 fonctions sur les gouttes. Tiré de [57].

Nous venons de brièvement présenter la recherche et les applications microfluidiques dans leur ensemble sans toutefois être exhaustif. Cette discipline a émergé récemment et elle demeure en constante croissance, surement parce que ses applications directes sont liées aux domaines porteurs que sont la chimie et de la santé. En particulier, l'analyse biologique est l'application qui nous intéresse ici. Nous avons d'ailleurs introduit la notion de microfluidique diphasique à dessein puisque nos recherches l'emploient comme vecteur de détection. Après avoir présenté les dispositifs microfluidiques nous présentons maintenant la microfluidiques du point de vue de la physique. En effet, les phénomènes liés à la fluidique diffèrent à l'échelle microscopique de ceux que nous connaissons à l'échelle macroscopique. Avec la diminution des échelles, les forces liées aux surfaces prévalent sur celles liées aux volumes. Nous utilisons des modèles de description de phénomènes souvent déduis d'observations expérimentales qui sont encore affinés par les recherches actuelles.

1.3. **Physique des fluides dans les microcanaux**

La microfluidique est le domaine lié aux écoulements des fluides dans des dimensions micrométriques où les forces liées aux surfaces, telles les forces électrostatiques où les tensions de surfaces, ont une influence prépondérante sur la nature des écoulements. Elle est définie par Whitesides [34] comme le domaine de la manipulation de faibles volumes de liquides (nL et inférieurs) dans des canaux de taille de l'ordre de la dizaine à la centaine de micromètres. Travailler à petite échelle modifie le comportement des liquides comparée à l'échelle macroscopique. En effet le rapport surface sur volume augmente fortement en diminuant l'échelle et les effets liés aux surfaces deviennent prédominants. Les liquides s'écoulent souvent sans turbulences (pas de tourbillons) en régime laminaire sous l'influence de la viscosité des fluides. Par ailleurs, les effets dus aux bords des canaux influencent

les vitesses et les profils d'écoulement. Pour le transport, les phénomènes de diffusion deviennent intéressants, à côté de la seule convection.

En comparaison de la fluidique macroscopique, il devient difficile de prévoir le comportement des écoulements sans prendre en compte les phénomènes liés aux interactions moléculaires et chimiques. Nous disposons toutefois d'outils et de relations dédiés à la microfluidiques permettant de prévoir, ou tout du moins, d'approximer les comportements des fluides dans les microsystèmes.

1.3.1. Les nombres sans unité

Les nombres sans unités permettent d'estimer les rapports des forces pour prévoir un comportement dominant au niveau des écoulements. Généralement la transition théorique entre les tendances s'effectue autour de la valeur 1 mais les valeurs expérimentales acceptées dans la littérature peuvent être beaucoup plus importantes. Les nombres sans unités sont donnés pour des écoulements monophasiques la plupart du temps mais sont aussi adaptés, dans leur forme, pour des écoulements diphasiques.

1.3.1.1. Nombre de Reynolds

A l'échelle de la microfluidique les forces visqueuses prévalent sur les forces inertielles. Les écoulements sont majoritairement laminaires, ce qui veut dire que les lignes de flux forment des lignes parallèles sans turbulence. Le nombre de Reynolds est un ratio de grandeurs physiques associées à ces forces qui permet de déterminer si les écoulements sont laminaires ou turbulents. Classiquement on estime que pour Re<<1 les forces visqueuses dominent alors que pour Re >>1 les forces inertielles sont plus influentes.

$$Re = \frac{forces \ convectives}{forces \ visqueuses} = \frac{\rho v D_h}{\mu}$$

ρ : masse volumique [kg/m3]
 v : vitesses moyenne d'écoulement [m/s]
 D_h : diamètre hydraulique [m]
 μ : viscosité dynamique [Pa.s ou kg/(m.s)]

Le diamètre hydraulique utilisé pour calculer le nombre de Reynolds dépend de la section et de la géométrie du canal. La formule suivante permet de rapporter le diamètre hydraulique d'un canal de section quelconque sur un équivalent de section cylindrique.

$$D_h = \frac{4A}{P}$$

A : aire de la section du canal [m2] P : périmètre mouillé du canal [m]

Cylindre	Rectangle
$D_{cyl} = \frac{4\pi r^2}{2\pi r} = 2r = D$	$D_{rect} = \frac{4ab}{2(a+b)} = \frac{2ab}{a+b}$

Tableau 1 – Diamètres hydraulique de structures courantes de canaux

1.3.1.2. Nombre capillaire Ca

Le nombre capillaire est le ratio entre les effets visqueux et les effets de la tension de surface dont les effets sont notables à l'échelle microfluidique. Il est utilisé pour prévoir les comportements en génération de gouttes.

$$C_a = \frac{forces \ visqueuses}{tension \ de \ surface} = \frac{\mu v}{\gamma}$$

v : vitesses moyenne d'écoulement [m/s] = Q/A

 γ : tension de surface [N/m]

 μ : viscosité dynamique [Pa.s ou kg/(m.s)] : Diphasique : viscosité dynamique de la phase disperse

1.3.1.3. Nombre de Weber

Le nombre de Weber oppose les forces d'inerties aux forces interfaciales. Souvent en microfluidique We < 1 et les forces inertielles sont négligeable sauf pendant les écoulements de gouttes à hautes vitesses [58].

$$W_e = \frac{forces \ inertielles}{tension \ de \ surface} = \frac{\mu v^2 L}{\gamma}$$

v : vitesses moyenne d'écoulement [m/s]
γ: tension de surface [N/m]
μ : viscosité dynamique [Pa.s ou kg/(m.s)]

1.3.1.4. Nombre de Bond

Le nombre de Bond met en relation les forces de gravité avec la tension de surface. Ce nombre et significatif par exemple pour prévoir si une goutte posée sur une surface va garder une forme sphérique sous l'influence de la tension de surface ou va s'étaler à cause de sa masse. Si Bo <1 les effets de gravité sont négligeables sur les gouttes ce qui est souvent le cas dans les circuits microfluidiques.

$$B_o = \frac{forces \ de \ gravit\acute{e}}{tension \ de \ surface} = \frac{\Delta \rho g L^2}{\gamma}$$

 ρ : masse volumique [kg/m³] ($\Delta \rho = \rho_d - \rho_c$ pour les gouttes) g : constante gravitationnelle [m/s²] L : longueur caractéristique [m] (souvent diamètre de la goutte) γ : tension de surface [N/m]

1.3.1.5. Nombre de Péclet

Le nombre de Péclet, qui vient de l'étude des transferts thermiques et tire son nom d'Eugène Péclet physicien né à Besançon en 1793, met en relation les transferts de molécules dus à la convection et à la diffusion.

$$Pe = \frac{vitesse \text{ de convection}}{vitesse \text{ de diffusion}} = \frac{vL}{D}$$

v : vitesse moyenne d'écoulement [m/s]L : longueur caractéristique [m]D : coefficient de diffusion thermique [m²/s]

1.3.1.6. Coefficient de diffusion

En microfluidique, la diffusion devient le vecteur principal d'échange de molécules entre deux phases en contacts pour des écoulements de type visqueux. Dans le cas d'écoulements laminaires l'absence de turbulence limite les échanges à l'effet de diffusion. La mécanique de la diffusion s'explique dans le mouvement Brownien des particules. Celui-ci dépend de la taille des particules, de la viscosité et de la température du fluide porteur [59] et peut-être mis sous une forme simple pour des particules sphériques :

$$D = \frac{k_{\rm B}T}{6\pi\mu r}$$

D : coefficient de diffusion $[m^2/s]$ k_B : constante de Boltzmann 1,3805 10⁻²³ [J/K] T : température [K] μ : viscosité dynamique du liquide porteur [Pa.s] r : rayon de la particule [m]

Malgré la faible valeur du coefficient de diffusion, ce phénomène peut être utilisé pour le transport de matière à petite échelle, et on peut estimer la longueur de diffusion en fonction du temps par :

$$l_D = 2\sqrt{\mathrm{Dt}_\mathrm{D}}$$

 $\begin{array}{l} l_D: \mbox{ longueur de diffusion [m]} \\ D: \mbox{ coefficient de diffusion [m^2/s]} \\ t_D: \mbox{ temps de diffusion [s]} \end{array}$

Pour le mélange de fluides à petite échelle, où l'absence de turbulences rend cette opération difficile, on n'utilise que rarement la diffusion et on préfère introduire des structures de mélange pour accélérer le processus. Cependant, la diffusion se fera aussi dans les tuyaux d'entrée et va créer un gradient de diffusion autour des échantillons ou des réactifs à injecter. Il est possible pour éviter cette diffusion d'entourer dans les tubulures, les liquides à injecter d'un fluide non miscible (ex : bulle d'air).

1.3.2. Equation de Navier Stokes

Les écoulements de fluides continus Newtoniens peuvent être représentés par l'équation de Navier-Stokes :

$$-\nabla \vec{p} + \mu \Delta \vec{u} + \vec{F} = \rho \left(\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + (\vec{u}.\nabla) \vec{u} \right)$$

 $-\nabla \vec{p}$ Correspond au gradient de pression dans le liquide. Les forces visqueuses sont représentées par $\mu \Delta \vec{u}$. Les forces externes appliqué au liquide sont réunies sous le terme \vec{F} . La partie $\rho \left(\frac{\partial \vec{u}}{\partial t} + (\vec{u}.\nabla)\vec{u}\right)$ correspondant aux forces inertielles.

Cette équation reste valable en microfluidique mais elle peut être simplifiée pour un Re faible lorsque les forces visqueuses prennent l'avantage sur les forces inertielles. Si aucune force n'est appliquée sur le liquide (ex : gravité, électrostatique) l'équation devient l'équation de Stokes :

$$\nabla \vec{p} + \mu \Delta \vec{u} = \vec{0}$$

1.3.3. Ecoulement de Poiseuille

En microfluidique, la vitesse d'un liquide est couramment considérée nulle à l'interface d'une surface solide fixe. Cette condition de non glissement aux abords des parois est déterminante pour les profils des écoulements dans des canaux microfluidique. Un écoulement microfluidique piloté par une différence de pression montre un profil de vitesses en forme de parabole dans le plan central des canaux avec une vitesse nulle sur les bords et une vitesse maximale en son centre.



Figure 20 - Ecoulement de Poiseuille de forme parabolique entre deux plaques parallèles. Adapté de [60].

Les vitesses des écoulements entre deux plaques parallèles (L>>h et l>>h) sont calculables selon les relations suivantes :

$$v(z) = \frac{1}{2\eta}(h-z)z\frac{\Delta P}{L}$$
$$v_{max} = v(h/2) = \frac{h^2}{8\eta}\frac{\Delta P}{L}$$

1.3.4. <u>Résistance hydraulique</u>

Les écoulements en microfluidique trouvent des similitudes avec les lois de l'électronique. Les canaux microfluidiques possèdent une résistance hydraulique Rh [Pa.s/m3] et voient apparaitre un écoulement de débit Q [m3/s] quand est appliquée une différence de pression à ses bornes ΔP [*Pa*]. On retrouve l'analogie avec la loi de d'Ohm U=RI. Les canaux présentent une résistance fluidique estimable par des équations dépendantes de leurs géométries (Tableau 2).

$$\Delta P = R_h Q$$



Tableau 2 – Résistance hydraulique de structures courantes de canaux [60].

Les structures fluidiques (tubes, membranes de capteur...) peuvent se déformer sous l'effet de la pression. Par cette déformation elle peut augmenter de volume et stocker temporairement un excédent de liquide. Si la source de pression est coupée, la structure va retrouver son volume initial sous l'influence des forces élastiques du matériaux le composant. La structure devient donc une source de pression locale temporaire, entrainant un écoulement, dont la valeur va diminuer jusqu'à s'annuler selon un temps donné. Ce comportement est similaire à celui d'un condensateur placé en parallèle d'un circuit électrique qui devient source de tension se déchargeant dans le circuit lorsque la source qui l'a chargé est coupée. Cet effet est visible en microfluidique lorsque l'on ferme une vanne et que le liquide continue de s'écouler dans les circuits le temps que la pression dans les tuyaux et les membranes s'abaisse. La déformabilité des structures entraine donc des temps de transitions sur les écoulements pouvant aller de la seconde pour des liquides peu visqueux (eau) à l'heure pour des liquides visqueux (huile).

Les lois applicables à l'électronique comme la loi de Kirchhoff (loi des nœuds, loi des mailles) et des équivalences sont aussi valables pour la microfluidique. Les valeurs des résistances hydrauliques sont certes approximatives mais permettent tout de même de dimensionner rapidement des circuits microfluidiques.

1.3.5. <u>Tension de surface</u>

L'énergie située à l'interface entre deux milieux s'appelle l'énergie interfaciale. La tension de surface γ [J/m2] ou [N/m] est liée aux interactions intramoléculaires des fluides au niveau de cette surface. Dans un fluide, les molécules voisines interagissent entre elles selon les forces de Van der Walls ou des liaisons hydrogénées pour les liquides polaires. Cependant, à l'interface entre deux fluides, il y a une dissymétrie au niveau des interactions des molécules de natures différentes. L'énergie qui en résulte, issue de la force de cohésion des molécules, est l'énergie interfaciale ou tension de surface exprimée sur la surface de l'interface.

 $E = \gamma S$

L'eau est un liquide polaire (liaisons hydrogènes principalement de nature électrostatiques) qui en conséquence possède une tension de surface élevée ~ 73 mN/m. L'huile ne dépendant que des forces de Van der Waals présente une tension de surface plus faible ~ 32 mN/m. En revanche, l'eau savonneuse montre une tension de surface plus faible ~ 25 mN/m grâce à l'action du tensioactif.

La tension de surface est liée aux pressions des fluides par l'équation de Laplace-Young. La pression est plus importante dans la partie concave d'une interface (intérieur d'une goutte par rapport à l'extérieur).

$$P_{int} - P_{ext} = \gamma(\frac{1}{R_1} + \frac{1}{R_2})$$

Pour une goutte libre dans un autre liquide, donc sphérique (R1 = R2), cette équation devient :

$$P_{int} - P_{ext} = \gamma \frac{2}{R}$$



Figure 21 – Courbures de surfaces définies par les rayons R₁ et R₂.

Naturellement, les liquides tendent à abaisser leur énergie interfaciale en diminuant la surface de l'interface. La sphère étant la forme offrant la plus faible surface, un liquide non contraint va prendre la forme d'une goutte sphérique. Les gouttes en contact ont aussi tendance à coalescer pour former une goutte de diamètre supérieur mais totalisant une surface moindre donc une énergie interfaciale totale plus faible.

1.3.6. <u>L'angle de contact</u>

L'angle de contact est l'angle que forme l'interface de deux fluides avec un solide. Cet angle de contact est lié à la tension de surfaces des interfaces fluide/fluide et aux deux énergies de surface des interfaces fluide/solide. Ils sont liés par la relation de Young-Dupré :

$$\gamma_{sl} + \gamma_{lg} \cos \theta = \gamma_{sg}$$



Figure 22 – Angle de contact et énergies interfaciales à la triple interface solide/liquide/gaz.

Classiquement les angles de contact donnés dans la littérature sont ceux d'une goutte liquide sur un solide entouré d'air. Ils sont associés à la notion de mouillabilité d'un liquide avec un solide. Moins l'angle de contact est important plus un liquide mouille un solide.

Mouillabilité du matériau	Angle θ	Nature de la surface par rapport à l'eau	Forme de la goutte
Non-mouillage	~ 180°	Super hydrophobe	180°
Mouillage partiel –	> 90°	Hydrophobe	>90° 0
	< 90°	Hydrophile	<90° 0
Mouillage total	~ 0	Super hydrophile	0°

Tableau 3 – Types de mouillabilité d'une surface par rapport à un liquide.

Les mêmes phénomènes physiques s'appliquent pour l'interaction entre un solide et un liquide qu'entre deux fluides. Les molécules des fluides interagissent avec les molécules des solides selon les forces de Van der Waals ou les liaisons hydrogénées résultant une énergie de surface. Ce sont ces interactions qui vont définir la mouillabilité du fluide sur le solide.

Pour le silicium, des traitements de surfaces chimiques (silanes [61]) ou plasma ou des microstructurations permettent de le rendre superhydrophobe ou superhydrophile [62].

L'angle de contact réel diffère cependant de celui calculé puisqu'il dépend aussi de la rugosité et de la structuration interne du matériau et des espèces chimiques présentes en surface (polluants absorbés en surface inclus).

1.3.7. <u>Tensioactifs</u>

Les tensioactifs servent à abaisser les tensions de surfaces à l'interface des liquides. Ils sont utilisés pour empêcher la coalescence des gouttes et de ce fait stabiliser les émulsions. Dans l'industrie agroalimentaire, des émulsifiants comme la lécithine (E322 : comportant de la phosphatidylcholine PC) sont utilisés pour stabiliser les microémulsions. Par exemple, la vinaigrette, comptant une phase aqueuse, le vinaigre, et une phase huileuse est stabilisée par la lécithine de la moutarde. Les tensioactifs servent aussi de détergent. Les détergents (ex : le savon) agissent en se mettant à l'interface entre les taches de graisse et l'eau créant des gouttelettes évacuables par la phase aqueuse.



Figure 23 - (gauche) Une goutte entourée de surfactant et une micelle (milieu) structure d'un tensioactif (droite) le déplacement des tensioactifs vers les tensions de surfaces les plus fortes.

Les tensioactifs sont des molécules amphiphiles composées d'une tête hydrophile et d'une ou plusieurs queues hydrophobes. Les tensioactifs sont classables en fonction de leur charge : ionique, zwitterionique ou non-ionique. Un tensioactif ionique peut être anionique ou cationique selon la charge de leur tête.

Ils sont solubilisés dans une des phases puis viennent naturellement se placer à l'interface entre la phase aqueuse et huileuse (ou gaz) en raison de leur caractère amphiphile. Ils recouvrent l'interface d'une monocouche orientée en se déplaçant vers les zones à plus faibles concentrations donc à plus forte tension de surface (Effet Marangoni) [62]. C'est observable par l'expérience du poivre fin chassé par du liquide vaisselle à la surface d'un bol rempli d'eau. L'histoire raconte que Benjamin Franklin aurait observé l'établissement d'une monocouche sur la surface d'un étang vers 1770 en y versant une cuillère d'huile [63] précédant les travaux de Langmuir sur les monocouches et son prix Nobel de chimie en 1932.

La concentration à l'interface dépend de la concentration du tensioactif dans le liquide. La tension de surface décroit avec l'augmentation de la concentration du surfactant jusqu'à une concentration limite. Au-delà, l'interface est saturée et la tension de surface devient constante. Cette limite est la Concentration Critique Micellaire (CMC) au-delà de laquelle les tensioactifs dilués vont s'agréger pour créer des micelles dans le liquide porteur.

1.3.8. Les détergents

Le Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) est un détergent anionique. Il perturbe les liens non covalents dans les protéines et les dénature. Il charge les protéines négativement. Cette propriété est utilisée dans l'électrophorèse en gel de polyacrylamide (SDS-PAGE) pour permettre la migration et la séparation des protéines en vue de leur identification. Le SDS n'est pas utilisable dans une application microfluidique mettant en jeu des interactions de protéines. Il est considéré comme un détergent efficace.



Figure 24 – Structure chimique du Sodium Dodecyl Sulfate (SDS). Adapté de [64].

Le Tween 20 (Polysorbate 20 ou Polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate, E432) est un tensioactif non ionique qui, à la différence du SDS, est peu agressif envers les protéines [65]. Il est utilisé dans des tampons de blocage et de lavage pour les protocoles ELISA ou western blot pour éviter les

interactions aspécifiques. Il est aussi utilisé en microfluidique lors de la génération de gouttes d'huiles dans de l'eau pour abaisser les tensions de surfaces. Il sert à la stabilisation des émulsions.



Figure 25 – Structure chimique du Tween 20 composé d'une chaine polyéthylène (commun aux Tween) et d'un acide gras (acide laurique). Tiré de [65].

1.3.9. <u>Les phospholipides</u>

Les phospholipides sont des molécules amphiphiles présentes dans les membranes plasmiques des cellules. Elles y sont organisées en double couche lipidique, orientées avec la partie hydrophobe au centre, pour former une barrière autour des cellules. La membrane cellulaire isole la cellule du milieu extérieur mais permet à des protéines de venir s'y fixer ou de s'y insérer dans la partie hydrophobe.



Figure 26 – Structure de la double couche lipidique de la membrane cellulaire. Tiré de [66].

La majorité de ces phospholipides sont des glycérophospholipides. La partie hydrophobe est composée de deux queues aliphatiques (insaturé ou non) liées par un glycérol. La tête hydrophile est composée d'un alcool monté sur un phosphate reliée aux acides gras au travers du glycérol. L'alcool détermine la nature du phospholipide. Les glycérophospholipides trouvables dans la membrane plasmique sont la phosphatidylcholine (PC), la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidyléthanolamine (PE).



Figure 27 – Exemple de structure chimique de la phosphatidylcholine (PC) terminée par l'alcool choline. Adapté de [67].

La phosphatidylcholine (Figure 27) extrait depuis des graines (soja) ou du jaune d'œuf est le composé principal de la lécithine (E322) qui est utilisé comme émulsifiant dans l'industrie agroalimentaire. Le feuillet extérieur de la membrane plasmique est constitué majoritairement de la phosphatidylcholine et de la phosphatidylsérine. Ils interviennent dans le processus d'apoptose des cellules. Leur interaction avec l'annexine V est étudiée dans la littérature (Figure 28) dans le mécanisme de capture de cette protéine sur la bicouche lipidique.



Figure 28 – Annexine V greffée sur une bi-couche lipidique constituée de PC et de PS. Tiré de [68].

Dans cette partie, nous avons présenté les principales notions de physique et de physico-chimie permettant de décrire ou de prévoir le comportement d'un ou de plusieurs fluides dans des microcanaux. En particulier, nous avons présenté les différents processus existant à l'interface entre deux phases.

Par exemple, les tensioactifs sont utilisés dans la microfluidique diphasique pour abaisser les tensions de surfaces entre les phases aqueuse et huileuse. Cela permet de générer des gouttes et de les empêcher de coalescer. Ils permettent de lubrifier les canaux pour que le liquide porteur (phase continue) mouille les parois, empêchant les gouttes de s'accrocher sur les bords des canaux, et participent alors à la mobilité des gouttes. Ils permettent aussi, en étant modifiés, d'apporter des fonctionnalités chimiques à la surface des gouttes. Ces aspects font l'objet de la partie suivante.

1.4. Microfluidique diphasique

La microfluidique diphasique consiste en l'étude de la génération et de la manipulation de goutte ou de bulles au sein d'un autre fluide dans des canaux ou sur un support. Nous nous intéressons aux gouttes mais certains sujets sont mieux détaillés pour les bulles (ex : drainages de mousses). De plus, les gouttes et les bulles ont des comportements proches (mise à part la compressibilité) et les circuits microfluidiques utilisés sont similaires. En conséquence, la bibliographie dressée ici concernera gouttes et bulles.

Par ailleurs, la littérature comporte de nombreuses études de gouttes d'eau dans l'huile présentant une configuration inverse à celle que nous recherchons. Cela peut s'expliquer par la volonté de créer des réacteurs destinés à des réactions chimiques et interactions biologiques se passant en phase aqueuse. Autrement, en mettant en contact deux gouttes d'eau entourées de phospholipides [69], il est possible de former une double couche lipidique (Droplet Interface Bilayers : DIB) simulant ainsi une membrane biologique. Des systèmes microfluidiques emploient cette technique pour étudier les mécanismes d'échange intra et extra cellulaire à travers cette membrane synthétique [70] [71].

1.4.1. <u>Mouvements de gouttes</u>

A l'intérieur d'un circuit microfluidique, les gouttes sont généralement déplacées par les forces exercées par le liquide les entourant. Dans une cellule de Hele-Shaw, les forces entrant en jeu dépendent de la forme la goutte dans le canal [72]. Si le diamètre de la goutte est inférieur aux dimensions des canaux (D << h), alors la goutte est de forme sphérique et sa vitesse découle principalement de la force de trainée induite par l'écoulement de Poiseuille.

Par contre, si le diamètre de la goutte est supérieur aux dimensions des canaux, elle prendra une forme de pancake (D > h) en étant coincée entre deux parois (Figure 29). La goutte est séparée des parois

par un film de lubrification, d'épaisseur de quelques dizaines de nanomètre, et sa vitesse devient fortement dépendante de ce film à faible valeur de Ca. De plus, l'épaisseur du film est liée à la valeur du nombre capillaire. Dans ces conditions, la vitesse de la goutte décroit avec l'augmentation de Ca et elle n'est plus dépendante du rayon du pancake et donc de l'influence de la force de trainée du fluide porteur. Ainsi, la vitesse de la goutte est inférieure à la vitesse moyenne du liquide l'entrainant.



Figure 29 – Formes de gouttes dans une cellule de Hele-Shaw vu de côté et de dessus. Dans l'ordre (1) Goutte sphérique R<<h (2) Goutte sphérique R~h (3) Goutte écrasée de forme « pancake » R>h. Tiré de [72].

De nombreux travaux ont étudié le déplacement des gouttes et les écoulements internes dans des canaux de dimensions similaires aux gouttes [73]. Il est connu que des recirculations interviennent dans les gouttes pour satisfaire les conditions de non glissement au niveau des parois ou par influence des écoulements du liquide porteur. Ce sont ces principes qu'utilisent les structures de mélange de réactifs dans les gouttes. Les écoulements autour et dans les gouttes dans une cellule de Hele-Shaw sont moins connus. Lee *et al.* (2012) (Figure 30) ont étudié les écoulements internes à une goutte stationnaire liés aux vitesses d'écoulement de la phase continue. Ils ont montré qu'à proximité de l'interface, le liquide présente un écoulement dont la direction varie sur la hauteur du canal. Ces circulations seraient dues à des contraintes superficielles au niveau de l'interface. A partir de ces suppositions ils ont proposé un modèle qui relie les écoulements internes à un effet Marangoni.



Figure 30 – Ecoulement autour d'une goutte dans une cellule de Hele-Shaw. Tiré de [74].

1.4.2. <u>Génération de gouttes</u>

La génération de microgouttelettes dans des circuits microfluidiques peut se faire de diverses manières. L'approche purement fluidique présente trois géométries principales pour générer des gouttes : courants parallèles (coflow), flux localisé (flow-focusing) et flux croisé / jonction en T (cross-flow / T-

junction) (Figure 31). Elles différent par leur géométrie et leur fonctionnement. Nous nous intéressons particulièrement à la jonction en T. Il existe aussi des méthodes actives de génération acoustique, électrique [28] ou thermique que nous ne détaillerons pas.



Figure 31 – Structures courantes de génération de gouttes : jonction en T, courants parallèles, flux localisé.

La génération de goutte se fait généralement avec une phase aqueuse et huileuse. Le liquide composant les gouttes est appelé phase dispersée. Le liquide dans lequel sont générées les gouttes est nommé phase continue. Habituellement, les tensioactifs sont dilués dans la phase continue mais les deux phases peuvent en contenir pour augmenter la stabilité des émulsions. Des gouttes de mêmes tailles sont dites monodisperses. La microfluidique permet de générer des gouttes monodisperses de façon répétable et à haute vitesse.

1.4.2.1. Jonction en T

La jonction en T est constituée d'un canal droit qui accueille la phase continue et d'un canal latéral où s'écoule la phase dispersée. Les gouttes sont générées en contrôlant le débit des deux phases qui donne naissance à plusieurs régimes ou modes de génération, qui différent légèrement par les phénomènes responsables de la formation des gouttes. La fréquence de génération, la forme et la taille des gouttes dépendent de la géométrie des canaux, des débits appliqués, des viscosités des liquides, des angles de contact et des tensioactifs utilisés [58]. Le nombre capillaire est souvent pris comme composante principale pour évaluer les limites des modes de génération. Ces transitions varient selon plusieurs paramètres. Les études menées sur les modes de génération considèrent souvent que Re<1 et We <1.

Malekzadeh *et al.* (Figure 32) ont exploré au travers de simulations sous OpenFOAM l'influence des nombres de Reynolds et capillaires, des débits et des angles de contacts dans l'apparition de la génération de goutte et des trois modes principaux de générations : dripping, jetting et squeezing.



Figure 32 – a) Génération de goutte en fonction de l'angle de contact b) Modes de génération en fonction de Ca et de l'angle de contact. Tiré de [75].

Xu *et al.* [76] ont montré que la génération des gouttes nécessitait une concentration de surfactant suffisant SDS supérieur à la CMC pour rendre les parois hydrophiles. Les expérimentations sont fixées

à C_{SDS}=0,5% dans des dispositifs en PMMA. A débits fixés : Q_c (eau) = 20 µL/min et Q_d (huile) = 10 µL/min, ils ont déterminé la concentration minimale avant de pouvoir générer des gouttes.

- C_{SDS} <0,04% w/w) Les gouttes adhèrent au mur et la génération n'est pas correcte.
- C_{SDS} >0,05% w/w) La génération est gouttes correcte.

Généralement la génération est possible quand la phase continue mouille, donc que la surface est hydrophile (>90°[76])

Oishi *et al.* [77] a visualisé par PIV les écoulements à faible Ca (1,5 10⁻³ - squeezing) et à Ca élevé (8 10⁻³ - dripping). Ils montrent expérimentalement que la génération et le mouvement de la goutte en squeezing provient peu des forces de cisaillement produites par l'écoulement continu à la différence du dripping où ils participent au mécanisme de génération de la goutte.



Figure 33 – Modes de génération : (gauche) squeezing / Ca faible et (droite) dripping / Ca élevé. Tiré de [77].

1.4.3. Les modes de génération

Plusieurs modes de génération sont possibles dans le générateur en T : dripping, squeezing, balloon et jetting (Figure 34). En dripping, les gouttes remplissent le canal et forment des bouchons de longueurs variables. Les gouttes générées en dripping ont un rayon plus faible que la largeur du canal. Leur taille et leur fréquence est variable. Le mode balloon permet de générer des gouttes de tailles fixes mais avec un espacement contrôlable. Dans le mode jetting, le filet d'huile rentre dans le canal est la génération se déplace en bout de filet. Si l'huile s'écoule dans le canal sans ne générer de gouttes, cela provoque un écoulement stratifié ou les deux phases s'écoulent en parallèles l'une de l'autre.



Figure 34 – Modes de génération : squeezing, dripping, balloon, jetting et écoulement stratifié.

1.4.3.1. Squeezing

Pour Ca très faible (Ca< 10^{-2}) des gouttes allongées remplissant le canal sont produites [78]. Le filet d'huile commence par remplir complètement le canal. Puis la goutte allongée, qui bouche le canal, se sépare sous l'influence de la tension de surface. Le mécanisme principal est dû à la chute de pression dans la goutte.



Figure 35 – Etapes de génération de goutte en mode squeezing a) remplissage du canal b) pincement menant à a séparation de la goutte. Tiré de [78].

Gupta et Kumar [79] et Xu *et al*.[76] ont étudié la longueur des gouttes bouchons (plugs) en fonction de la dimension des canaux, de Ca et des débits.

1.4.3.2. Dripping

Pour un Ca plus élevé (10⁻²<Ca), la goutte est générée par la concurrence entre les contraintes de cisaillement générées par la phase continu et la tension de surface [76]. Les dimensions des gouttes et les limites de transitions avec les autres modes sont définies par de nombreux paramètres.

Gupta et Kumar [80] ont étudié la transition des modes de génération de gouttes dans une jonction en T en fonction des viscosités, du nombre capillaire (Figure 36), des débits et des dimensions des canaux.



Figure 36 – Passage de squeezing à dripping avec diminution de la taille de gouttes lorsque Ca augmente. Tiré de [80].

La fréquence et le volume des gouttes dépendent des viscosités, du nombre capillaire, des débits et des dimensions des canaux.

$$f.V \sim \frac{Ca.Q.\lambda}{\Lambda}$$

Rapport des largeurs	Rapport des débits	Rapport des viscosités
$\Lambda = \frac{W_d}{W_c}$	$Q = \frac{Q_d}{Q_c}$	$\lambda = \frac{\mu_d}{\mu_c}$

Tableau 4 – Rapports des propriétés de génération dans une jonction en T.

Pour une largeur de canal dispersé fixe (W_d), la largeur du canal continu (W_c) permet de fixer la plage de taille des gouttes (Figure 37). Le diamètre de goutte augmente avec W_c (donc avec Λ qui diminue). Par ailleurs, si Λ diminue, la valeur de Q critique avant de passer en mode jetting et en flux parallèles diminue, donc la gamme de génération rétrécit et les fréquences maximums de génération diminuent (Figure 39).



Figure 37 – Passage du mode jetting à dripping avec W_c qui augmente (Λ diminue) pour différents ratios de débits. Pour Ca=0.1 et λ =1/10. Tiré de [80].

Pour des géométries fixes, la fréquence f de génération des gouttes et leur diamètre D augmente avec Q (avec Qd qui augmente pour Qc fixe). Augmenter la viscosité de la phase continue μ_c (ex : surfactant) permet d'augmenter la taille des gouttes et de générer à plus haut débit mais la fréquence de génération baisse.

1.4.3.3. Balloon

Le liquide de la phase dispersée s'écoule dans le canal principal pour former une goutte qui n'est pas déformée par la phase continue [24]. La goutte se gonfle tel un ballon puis se sépare du filet en conservant sa forme circulaire. Au fur et à mesure que la goutte gonfle, le col la reliant au filet du canal dispersé s'allonge jusqu'à se rompre (surement par instabilité de Rayleigh Plateau). La goutte est ensuite évacuée par la force de trainée. La génération en mode balloon est effective pour des vitesses de phase dispersée très faible et en dessous d'une largeur de canal dispersé W_d critique. Au-dessus W_d critique, le col ne s'affine pas assez pour se rompre.



Figure 38 – Etapes de génération de gouttes en mode Balloon. Tiré de [23].

1.4.3.4. Jetting

Le filet de la phase dispersée est entrainé et allongé dans le canal principal par la phase continue. La génération de la goutte est déplacée au bout du filet dans le canal principal. Pour un Ca élevé, augmenter la vitesse de la phase dispersée ou le ratio des vitesses depuis le mode dripping mène au mode jetting puis à un écoulement stratifié. Ces transitions ont été définies en fonction de Ca, des dimensions des canaux et des débits par Gupta et Kumar [80](Figure 39)



Figure 39 – Transition des modes selon Ca Q et A. Adapté de [80].

Nous venons de présenter les modes de génération de gouttes pour une structure de jonction en T. Les transitions entre les modes de génération dépendent de nombreux paramètres liés au dispositif (dimensions, structure, mouillage), aux conditions d'écoulements (débits des phases et leur ratios) et aux propriétés des fluides (viscosité). La fréquence et la taille des gouttes sont liées à ces paramètres.

Le mode de génération qui nous intéresse le plus est le mode balloon. Il permet de générer des gouttes monodisperses avec un intervalle de génération contrôlable. Cela donnerait des conditions favorables à l'établissement d'un empilement compact en produisant des gouttes rapprochées. En suivant cette logique, nous reprenons les dimensions utilisées par Tarchichi pour générer des gouttes en mode ballon : W_c =100µm et W_d = entre 10 et 40 m. Dans ce cas le rapport des largeurs de canaux donne :

$$\Lambda_{\min} = \frac{W_d}{W_c} = \frac{10}{100} = \frac{1}{10} = 0,1 \text{ et } \Lambda_{\max} = \frac{W_d}{W_c} = \frac{40}{100} = \frac{4}{10} = 0,4$$

En se référant à la Figure 39, nous constatons que plus le canal de la phase dispersée est étroit plus il sera difficile de maintenir un régime de génération de gouttes au niveau de la jonction en T. La génération risque d'évoluer rapidement vers le mode jetting ou conduire à un écoulement stratifié si le débit d'huile Q_d est trop important (Q élevé) ou si le débit général augmente (Q fixe mais Q_c et Q_d augmente donc Ca augmente). Il est donc nécessaire de contrôler efficacement les débits si l'on veut conserver l'aspect monodisperse des gouttes et éviter les transitions de mode. Aussi, il a été montré que les angles de contact et la mouillabilité ont une influence sur la génération de goutte. Ces paramètres sont influencés par les tensioactifs mais aussi par les états de surfaces (structure, topologie, chimie). Ces derniers résultant des procédés de structuration et de nettoyages utilisés en fabrication, leurs influences sur la génération sont prises en compte lors des expérimentations.

1.4.4. <u>Empilement compact de gouttes</u>

Nous cherchons à avoir des gouttes organisées en rang serré dans le but d'obtenir des propriétés de détection acoustiques et biologiques intéressantes. Les gouttes monodispersées s'auto-organisent dans le plan en empilement compact en formant des structures 2D de maille hexagonale. Pour une détection acoustique, l'intérêt réside dans le fait qu'on obtient un milieu homogène avec une structuration répétable qui, on espère, conduirait à des résonances de structure et pas seulement au niveau des gouttes isolées.

D'un point de vue de la détection biologique, avoir des gouttes les plus proches possibles oblige l'échantillon à analyser à circuler dans l'espace interstitiel des gouttes. Cet espace produit des canaux de circulation de dimensions plus faibles que la hauteur du canal favorisant ainsi la capture des analytes. La forte densité de gouttes permet de plus d'augmenter la taille de la surface de détection. Dans la littérature on note aussi l'utilisation d'empilement compact 2D de bulles comme réseau optique [23], [81].



Figure 40 – Gouttes organisées dans un canal vu de dessus et vue de côté.

Deux méthodes transparaissent de la littérature dans l'objectif d'organiser des gouttes en empilement compact. Pour la première, l'organisation se produit lors de la génération et est liée aux fractions volumiques des phases (ϕ =Vd/Vc). La deuxième méthode emploie l'évacuation du liquide de la phase continue autour des gouttes pour les rapprocher.

1.4.4.1. Organisation par grande fraction volumique

Hashimoto, Whitesides *et al.* (Figure 41)[82] (2006) ont organisé des bulles, avec une génération en flow-focusing, à des paramètres donnant une grande fraction volumique. Pour ces conditions, les bulles s'auto organisent en raison de forces élastiques issues de leurs interactions. Ils utilisent les gouttes comme réseau de diffraction optique.



Figure 41 – a) Schéma de l'auto arrangement des gouttes b) Photo d'un réseau de bulle auto-organisé. Tiré de [82].

Mary *et al.* (2011) (Figure 42) ont organisé des gouttes en grande fraction volumique afin de créer un écoulement des gouttes en empilement compact de type bouchon. Ainsi les gouttes progressent dans les canaux à la même vitesse que celles du liquide qui les entourent les empêchant de se dépasser. Cela permet de maitriser les temps d'incubation dans les gouttes.



Figure 42 – Influence de la fraction volumique sur l'organisation des gouttes. Tiré de [83].

1.4.4.2. Organisation par différence de densité

Guan *et al.* (2014) [84] ont proposé un dispositif stoquant les gouttes d'eau dans de l'huile par flotaison dans une chambre renfoncée par rapport aux canaux. Après génération, les gouttes sont entrainées par l'huile et remontent dans la chambre de capture, car moins denses, et s'y accumulent. En retournant le dispositif, les gouttes retournent au niveau des cannaux et sont évacuées par la phase continue.



Figure 43 : a) Structure du dispositif de stockage fabriqué en PDMS b) Principe du stockage/déstockage par retournement. Tiré de [84].

1.4.4.3. Organisation par drainage

Cette méthode consiste à drainer le liquide de la phase continue par des canaux latéraux pour rapprocher les gouttes.

Wang *et al.* (2015) [85] ont étudié l'organisation de gouttes d'eau dans de l'huile sur deux niveaux en fonction des débits, des dimensions des canaux et des diamètres de gouttes. L'organisation des gouttes dépend non seulement de la fraction volumique mais aussi des écoulements dans les canaux latéraux dus au différences de pressions et aux forces capillaires.



Figure 44 : a) Dispositif d'organisation par drainage b) gouttes désordonnées et organisées. Tiré de [85].

Haliburton *et al.* (2017) [86] ont réalisé un dispositif drainant activement la phase continue (huile) pour organiser des gouttes et synchroniser leur vitesse pour les introduire vers un autre dispositif. Ils présentent par ailleurs la difficulté liée à cette méthode. Pour des débits de drainage trop faible les gouttes ne s'organisent pas. Pour des débits élevés les gouttes sont aspirées ou coupées au travers des canaux de drainage. Une spécificité de ce système est l'utilisation de canaux de drainages beaucoup plus étroits que le canal continu. Cela permet d'empêcher au maximum le passage des gouttes dans les canaux transverses. La déformation de la goutte nécessaire pour rentrer dans le canal est liée à la pression de Laplace qui s'oppose au passage de la goutte.



Figure 45 – a) Schémas de fonctionnement du circuit d'organisation par canaux de drainage étroits et b) photo des gouttes organisées. Tiré de [86].

1.4.4.4. Piégeage de bulles

N. Tarchichi [23] (2014) a développé une structure permettant d'organiser des bulles dans une chambre centimétrique de détection optique et acoustique. Des grilles empêchent les bulles d'être évacuées et les piègent dans la chambre de détection en laissant passer le liquide porteur. Cette structure n'a pas permis d'organiser des gouttes. En revanche, la fréquence de génération plus élevée pour des bulles assure le remplissage de la chambre et une auto organisation.



Figure 46 – a) Dispositif d'organisation de bulles. Tiré de [23]. b) structure simillaire de piege à billes. Tiré de [87].

1.4.4.5. Ralentissement de gouttes

Le drainage du liquide porteur permet d'organiser des gouttes en agissant sur un ensemble de goutte à la fois. Appliqué à un train de goutte, cela permet de les rapprocher ou de les éloigner, donc de contrôler l'espacement entre deux gouttes. La principale application est la fusion contrôlée de gouttes. Nous présentons différentes méthodes de ralentissement de gouttes car leurs études offrent une compréhension supplémentaire des phénomènes fluidiques utilisables pour l'auto organisation de gouttes.

Prat *et al.* (2006)[88] proposent une série de canaux latéraux servant à drainer la phase continue pour ralentir les gouttes en fonction des débits de drainages.



Figure 47 - (gauche) Jonction en T et canaux de drainages (droites) gouttes ralenties par le drainage. Tiré de [88].

Niu *et al.* (2008) [89] ont proposé une structure ralentissant et piégeant la goutte entre des piliers pour la fusionner avec la gouttes suivante. L'espace entre les piliers conditionne le rayon de la goutte qui lui-même conduit à des différences de pressions ralentissant la goutte. Yoon et al (2014) [90] ont étudiés l'influence des écoulements dans un canal de déviations sur le ralentissement des gouttes.



Figure 48 – a) Piliers utilisés pour fusionner les gouttes. Tiré de [89]. b) Schéma de principe des écoulements autour des piliers. Tiré de [90].

Nous venons de voir des travaux présentant des structures servant à rapprocher et à organiser gouttes et bulles. Au fur et à mesure que la fraction volumique diminue, les gouttes désorganisées se rapprochent jusqu'à s'auto organiser en structure hexagonale (Figure 49). Si la fraction volumique diminue encore, par le drainage interstitiel, les gouttes se déforment et perdent leur forme sphérique pour devenir hexagonales.



Figure 49 – Modification de la forme des bulles monodisperses organisées par le drainage. Tiré de [91].

L'écoulement dans une goutte en microfluidique est souvent considéré avec une contrainte de continuité pour les vitesses à son interface. Pourtant il a été montré que des écoulements complexes se situant à cette interface peuvent être reliés à des contraintes interfaciales (1.4.1). Dans les mousses, les canaux au travers desquels s'écoule le liquide porteur sont réduits à des bords de Plateau (Figure 50) dans lesquels la nature des écoulements dépend des vitesses des écoulements et de la mobilité de l'interface. La prochaine partie s'intéresse à ces écoulements.



Figure 50 – Représentation de bords de Plateau en fonction de la fraction volumique. Tiré de [91].

1.4.5. <u>Écoulements interstitiels</u>

Nous serons amenés à faire circuler des liquides dans des gouttes organisées en réseau. Ces liquides serviront à modifier le comportement de la surface de gouttes pour fonctionnaliser la surface ou influencer la concentration de surfactant en surface de goutte. Ils peuvent être un échantillon à analyser ou un tampon de nettoyage qui va interagir avec des analytes et des molécules capturés en surface de gouttes de manière spécifique ou aspécifique. Il ne faut pas oublier le liquide drainé lors de l'organisation des gouttes qui s'écoulera de la même manière dans l'espace interstitiel. Cette partie s'intéresse aux écoulements dans les mousses afin de décrire les simili-bords de Plateau et des nœuds créés à l'interface des gouttes et des parois des puces (Figure 51).



Figure 51 – Gouttes en empilement compact et forme du simili-bord de Plateau formé dans l'espace interstitiel des gouttes.

Les écoulements dans les mousses de gouttes (mousses liquides) et de bulles montrent des similarités selon les études sur le drainage du liquide interstitiel à bas débit [92]. Dans les mousses les écoulements interstitiels dépendent des viscosités du liquide et de la mobilité de la membrane. Il est possible de décrire l'interface par le nombre de Boussinesq [91], [93] qui permet de déterminer l'influence de la membrane sur les vitesses d'écoulement du liquide interstitiel.

$$Bq = \frac{\mu_s}{\mu_s r}$$

 μ_s : Contrainte de cisaillement de la surface [kg/s] (Surface shear viscosity) μ : viscosité dynamique du liquide interstitiel [kg/(m.s)] (Dynamic viscosity) r: rayon de courbure (m)

A faible Bq (Bq<1) la membrane est considérée comme non mobile et le bord de goutte peut être assimilé à un solide. Le profil de vitesse du liquide est assimilable à un écoulement de Poiseuille avec une condition de non glissement sur les bords. Pour Bq=1, la membrane est mobile, le profil est semblable à un écoulement de Poiseuille avec glissement partiel. Pour B>1, la membrane est glissante. Le profil de vitesse est droit sur tout le canal. La vitesse dans le canal interstitiel est la même qu'à l'interface avec la membrane.

	Profil de drainage du film entre deux gouttes [94].	Ecoulement dans une section du bord de plateau dans des mousses [95].
Bq>>1 Interface immobile (Goutte rigide)		
Bq~1 Surface partiellement mobile		
Bq<<1 Surface mobile		

Tableau 5 – *Écoulements en fonction du nombre de Boussinesq dans les mousses.*

Dans la littérature pour la résolution de leur déplacement dans des microcanaux, les gouttes sont majoritairement simulées et observées avec une interface qui est admise comme mobile. Les bulles par contre, ont une interface plus immobile et ralentie les écoulements environnants [74]. Sous forme de mousse liquide, la mobilité de l'interface de la goutte vis-à-vis des écoulements interstitiels est moins certaine et est conditionnée par la différence de viscosité entre l'interface et le liquide environnant. La forme et les vitesses des écoulements interstitiels sont directement dépendantes de la mobilité de l'interface est immobile, la goutte est considérée comme solide et conduit à un écoulement de Poiseuille. Si l'interface est mobile, l'écoulement interstitiel induit des recirculations dans la goutte avec une transmission totale des vitesses d'écoulement à l'interface. Avec une mobilité moyenne de l'interface, l'écoulement prends la forme d'un écoulement de poiseuille avec un glissement partiel plus ou moins important.

La faible viscosité de l'eau favorise la vision immobile. L'utilisation de surfactants solubles dans l'eau favorise au contraire la mobilité de l'interface. Elle est aussi conditionnée par le rayon de courbure de l'interface. Si l'écoulement entre les gouttes réduit peu la fraction volumique de l'émulsion alors le rayon de courbure est important et favorise la mobilité de l'interface. Si le drainage devient important, l'émulsion prend une forme de nid d'abeille, le rayon de courbure diminue et la mobilité de l'interface diminue. Dans le cas de notre étude, c'est-à-dire, des écoulements interstitiels dans un arrangement compact dans une cellule de Hele-Shaw, nous pouvons nous attendre à une interface moyennement mobile.

Les surfactants (ex : SDS) et les protéines modifient les propriétés des interfaces des mousses [91], [95] et participent en conséquence à la mobilité des interfaces. Nous visons à détecter des protéines capturées en surface de gouttes. Cette modification de propriété de l'interface est une piste pour la détection de la capture. Toutefois, il faut d'abord que la goutte soit capable de capturer une protéine. La partie suivante traitera donc de la fonctionnalisation des gouttes.

1.5. **Fonctionnalisation biologique**

Les biocapteurs comportent une interface située à proximité du transducteur qui sert à capturer les analytes d'intérêt grâce à des biorécepteurs immobilisés dessus. La fonctionnalisation de la surface de l'interface sert à transformer le matériau constituant le canal, non spécifiquement réactif, en une surface montrant une sélectivité haute pour l'analyte désiré. La fonctionnalisation peut nécessiter plusieurs réactions et plusieurs molécules constituant finalement un montage complexe. La première réaction chimique nécessaire à la construction du montage dépend des matériaux de la surface et de la molécule à greffer et notamment de leurs terminaisons chimiques.



Figure 52 – Exemple de fonctionnalisation en plusieurs étapes a) surface SAM avec des terminaison COOH b) activation par EDC/NHS c) greffage d'un anticorps par liaison peptidique d) désactivation à l'éthanolamine des sites libres e) capture de l'analyte hCG. Tiré de [96].

1.5.1. <u>Fonctionnalisation de surfaces solides</u>

Parmi les éléments à surfaces solides fonctionnalisées, nous pouvons distinguer les surfaces solides de capteurs de taille millimétriques au contact du transducteur et les micro/nanoparticules. Le silicium et le verre sont des composants courants des capteurs microfluidiques et de nanosphères. L'or est un matériau utilisé comme surface active dans les capteurs à plasmons de surfaces (SPR), comme électrode dans les capteurs acoustiques et électrochimiques et en nanoparticules pour les traitements thérapeutiques [97]. Les matériaux sont souvent les mêmes : or, verre et silicium (et ses dérivés : SiO_{2...}). Les techniques de fonctionnalisation chimique employées sont identiques aux surfaces et aux particules. Les surfaces à base de silicium sont modifiables par silanisation tandis que les surfaces d'or sont modifiables par des alkane-thiols (Figure 53). Ces éléments sont déposés en monocouches auto assemblés (SAM : self-assembled monolayers) et présentent des terminaisons chimiques utiles (ex : groupements carboxyliques, amines...) [98].



Figure 53 – Processus de dépôt de SAM : thiols sur or et silanes sur oxyde de silicium. Tiré de [98].

La première fonction couramment apportée est une fonction carboxylique (-COOH) permettant de greffer une protéine, un liguant ou une autre molécule possédant une terminaison amine (-NH2) Ils forment une liaison peptidique grâce à l'activation du groupe carboxylique par de l'EDC/NHS [99]. Quelques travaux récents présentent la possibilité de modifier la fonctionnalisation de surfaces par des méthodes employant une exposition à un rayonement UV de courte durée [100], [101].

1.5.2. <u>Fonctionnalisation d'une interface fluide</u>

A la différence des surfaces des capteurs classiques et des nanoparticules qui sont solides, les gouttes présentent une interface malléable, souvent chimiquement hétérogène, non consistante et instable. Les méthodes de fonctionnalisations classiques présentent un risque de déstabilisation des émulsions. La fonctionnalisation des gouttes n'est pas aussi courante que celle des surfaces. Toutefois la recherche sur les micro capsules contenant des médicaments à délivrer à des cellules malades [97] présente des finalités semblables, à savoir la décoration de sphères. Il y a quand même quelques différences. Ce sujet ne traite pas que de gouttes mais aussi de micelles et de vésicules. Et fait plus important, ces capsules médicamenteuses sont nanométriques alors que les gouttes qui nous intéressent sont micrométriques. Les émulsions sont plus stables à l'échelle nanométrique. La nature instable des gouttes micrométriques et de leur interface ne permet pas d'appliquer directement les méthodes chimiques de fonctionnalisation de surface. Il existe cependant plusieurs méthodes variées destinées à fonctionnaliser des gouttes.

1.5.2.1. Surfactants fonctionnalisés avant/hors formation de la goutte

L'étude des interactions cellulaires au niveau de la membrane plasmique a mené au développement de surfactants fonctionnalisés. L'ajout d'une terminaison biotine à des phospholipides a été plusieurs fois employé dans ce type de recherche (Tableau 6).

Des phospholipides présentant une fonction biotinylée ont été synthétisés (Blankenburg -1989) [102] pour mimer le mécanisme de reconnaissance en surface de cellules de type anticorps-antigène. Ils ont servi à fonctionnaliser un capteur à onde de Love (Gizeli – 1997) [103] grâce à une double couche lipidique biotinylée créée par adsorption de vésicule en surface du capteur. L'utilisation d'une double couche lipidique permettrait une régénération de la surface par un nettoyage de cette dernière à l'aide de détergents. Une goutte d'huile a été décorée de protéines spécifiques pour mimer une cellule ciblée par des phagocytes (M'Barek – 2015) [104].



Tableau 6 – Exemple d'utilisation de phospholipides biotinylés.

Dernièrement, Li *et al.* (2017) [105] ont modifié le tensioactif Pluronic F127 pour y ajouter des terminaisons spécifiques (amines, carboxyliques, biotines...). Ils ont produit des gouttes d'huiles décorées qui, en fonction de leur décoration, sont capables de capturer des molécules par liaisons électrostatiques, covalentes ou spécifiques (biotine/streptavidine).

La fonctionnalisation des tensioactifs avant la formation de goutte est une solution simple est efficace. Certains tensioactifs, comme les phospholipides biotinylés, sont disponibles commercialement mais restent coûteux. Le Pluronic F127 fonctionnalisé doit être synthétisé. Les phospholipides doivent être solubilisés dans l'huile par du chloroforme, ce qui permet de contrôler la concentration de tensioactifs dans l'huile et donc de prévoir leur concentration à l'interface. Le F127 est solubilisé dans l'eau qui est la phase continue du système de production des gouttes. Une partie du surfactant vient se fixer à l'interface au moment de la production de la goutte. Cette solution est coûteuse en quantité de surfactant mais hautement modulable.

1.5.2.2. Particules fonctionnalisées sur goutte

Platzmane *et al.* (2013) (Figure 54) ont synthétisé un tensioactif (PFPE-PEG-Gold) ayant une nanoparticule d'or comme terminaison de la partie hydrophile. La fonctionnalisation a été démontrée dans une émulsion inverse à l'aide de thiols fluorescents liés aux nanoparticules d'or.



Figure 54 – a) Goutte d'eau fonctionnalisée par des nanoparticules d'or b) Gouttes visibles par marqueur fluorescent GFP greffé sur les nanoparticules d'or. Tiré de [106].

Comme pour la méthode précédente, les nanoparticules sont fixées sur le surfactant avant la génération de la goutte. Par contre, la fonctionnalisation se fait après la formation de la goutte sur les nanoparticules d'or. Ce matériau permet une immobilisation de thiols en surface sans activation chimique risquant de déstabiliser l'émulsion. C'est une solution de fonctionnalisation intéressante mais elle a été prouvée pour des émulsions inverses et les surfactants sont à synthétiser.

1.5.2.3. Surfactants fonctionnalisés sur goutte

Nous souhaitons pouvoir fonctionnaliser les gouttes dans le dispositif en fonction des besoins d'analyse. Fonctionnaliser les surfactants sur les gouttes est donc la solution que nous cherchons à développer.

Fattaccioli *et al.* (2008) [107] ont décoré des gouttes d'huile de soja avec de la biotine. Pour cela, ils ont activé les groupes carboxyliques des acides gras naturellement présents à l'interfaces de gouttes d'huiles de soja et d'eau. L'activation est faite avec de l'EDAC/sNHS qui a permis à une biotine aminée de se fixer sur les sites activés. Ils ont validé la fonctionnalisation par l'ajout de streptavidine qui a permis de ponter les gouttes à une surface biotinylée (Figure 55) puis par visualisation par fluorescence.



Figure 55 – Goutte d'huile fonctionnalisée par biotinylation. Tiré de [107].

Attia *et al.* (2015) (Figure 56) ont présenté une méthode de décoration de nanogouttes d'huile en condensant des silanes ((3-aminopropyl) triethoxysilane : APTES) à l'interface de la goutte. Les capsules de silices produites présentent une terminaison amine en surface. La fonctionnalisation de la capsule a été démontrée par la capture d'un fluorochrome ayant un groupe carboxylique actif.



Figure 56 – Gouttes d'huile fonctionnalisées par des APTES. Tiré de [108].

Les deux méthodes présentées permettent d'obtenir des gouttes décorées. La première demande une activation chimique d'acides gras présents dans les huiles végétales pour biotinyler la surface. La taille des gouttes est de l'ordre du micromètre. Il serait aussi envisageable de greffer une autre molécule aminée sur la surface activée mais cela n'a pas été démontré. Pour la deuxième méthode, les silanes (APTES) sont placés à l'interface des nanogouttes d'huile par condensation générée par des ultrasons. La taille des particules est de l'ordre de la centaine de nanomètre. La méthode n'a pas été démontrée pour des tailles de gouttes au-delà du micromètre.

Nous venons de repérer des pistes pour la fonctionnalisation d'interfaces entre fluides. La prochaine destination à explorer s'oriente vers la détection des analytes capturés à l'interface des gouttes. Il nous est nécessaire d'identifier une propriété physique variant avec la capture des analytes. En l'occurrence, Chao *et al.* (2008) (Figure 57) ont montré la corrélation entre l'abaissement de la tension interfaciale d'une goutte et la capture de la streptavidine à sa surface. La goutte est composée de chloroforme dans lequel a été dissout un lipide biotinylé (C16-PEO-Biotin ; PEO=PolyEthylene Oxide).



Figure 57 – a) Schéma de l'expérience de capture de streptavidine en surface de goutte b) Mesure de la modification de la tension de surface par cette capture. Tiré de [109].

Nous souhaitons fonctionnaliser les gouttes directement dans le dispositif fluidique. Les méthodes de fonctionnalisation des tensioactifs ou des particules à l'interface le permettent. Nous ne souhaitons toutefois pas appliquer une méthode demandant de synthétiser des éléments chimiques. Nous nous dirigeons plutôt vers l'utilisation de molécules courantes. Il faut aussi que la méthode soit compatible avec des gouttes faisant 100 µm de diamètres qui sont moins stables que les nanogouttes. Nous relevons que le couple streptavidine/biotine est fortement présent dans la littérature, à la fois pour établir des constructions biologiques, faire des ponts chimiques entre deux surfaces ou pour du marquage (streptavidine fluorescente).

Pour construire une biointerface, nous choisissons de décorer les gouttes avec de la biotine. Le biorécepteurs final pourra être immobilisé par le biais d'une streptavidine ou d'un anti-biotine. Il reste à définir comment décorer la goutte d'huile par de la biotine. L'utilisation de phospholipides biotinylés convient mais ne permet pas une fonctionnalisation dans des gouttes organisées. La goutte est biotinylée au moment de sa génération quand les phospholipides viennent naturellement se placer à l'interface de la goutte comme surfactant. La méthode de fonctionnalisation des acides gras par de la biotine sur l'interface de la goutte semble être la solution adaptée à notre problématique.

1.6. Conclusion

Les recherches sur la microfluidique recouvrent un large éventail de domaines aux applications variées. Son exploration et l'expansion de cette discipline répond aux besoins des domaines de la biologie, de la santé et de l'analyse du vivant. Il en a résulté le développement sur microsystème de biocapteurs, de laboratoires sur puces ou encore de systèmes de culture *in vitro* biomimétiques. La recherche se dirige actuellement vers le développement de capteurs microfluidiques pour de l'analyse biologique affichant l'ambition d'égaler ou de dépasser les points forts des systèmes d'analyses classiques : temps de détection, sensibilité, sélectivité, coût, encombrement...

L'état de l'art que nous avons dressé a présenté certaines de ces avancées mais il reste encore des zones d'améliorations non explorées, comme la réutilisation simple et rapide des capteurs. L'utilisation de surface de goutte comme interface de détection biologique par acoustique se dirige dans cette direction. Comme pour toute voie inexplorée, nous avons pris nos repères sur des domaines connexes et tentons de faire coïncider les connaissances pour tracer un chemin à suivre. Nos recherches naviguent à la croisée des chemins et couvrent les notions telles que la microfluidique, la fluidique diphasique, les émulsions, les mousses, les écoulements interstitiels, les fonctionnalisations de surfaces, les surfactants et les biointerfaces. L'état de l'art, qui précède a couvert ces domaines pour rendre navigables les voies empruntées par les sujets que nous traiterons dans les chapitres 3 à 5.

Concernant la détection des analytes capturés à l'interface des gouttes, l'idée à suivre est maintenant de pouvoir détecter la variation de la tension de surface d'une émulsion de gouttes dans une chambre fluidique. Les ondes de Lamb, présentées en introduction, nous offrent l'opportunité d'être sensible aux propriétés des liquides remplissant la chambre de détection. Cette piste sera suivie et développée au chapitre 3.

Nous employons ci-dessus les gouttes comme un vecteur de détection, mais nous avons aussi tenté une autre approche et les utilisons comme actionneur. Les viscosités de l'huile et de l'eau sont trop variables pour être utiles. Leurs permittivités au contraire sont suffisamment stables et de valeurs différentes. Il serait donc possible de faire varier la valeur d'une capacité entre des bornes délimitées par les permittivités de l'huile et de l'eau. La manipulation des gouttes dédiées à cette finalité se trouve au chapitre 5.

Une autre direction que nos recherches en microfluidique ont empruntée est liée à la maîtrise des écoulements. La nature, laminaire ou turbulente, des écoulements est liée à la viscosité et au débit du fluide. Le profil de vitesses de l'écoulement est aussi influencé et déterminé par les parois solides des canaux. Cela conduit au profil parabolique des écoulements de Poiseuille lorsque le liquide est mis en mouvement par un différentiel de pression. Notre objectif est de déterminer une solution sans actionneur, usant seulement de la dynamique de la microfluidique, pour uniformiser les vitesses des écoulements sur toute la largeur d'une chambre de détection. L'étude est présentée au chapitre 4.

La détermination des comportements microfluidiques repose très souvent sur l'expérimentation. L'observation ou la mesure des propriétés des écoulements dans des canaux micrométriques ne sont pas réalisables comme en électronique avec des appareils de mesures standardisés et complètement calibrés. Même si la microfluidique s'inspire des lois de l'électronique pour schématiser ses circuits, aucun standard n'a été appliqué tant aux dimensions des canaux qu'aux connectiques. Le prochain chapitre présente nos efforts déployés dans ces domaines.
Chapitre 2

Fabrication, caractérisation et contrôle des systèmes microfluidiques

2.1. Introduction

Ce chapitre présente les outils et les procédés de fabrication développés durant cette thèse qui ont été employés pour les sujets des chapitres 3 à 5. Nous y parlons du banc de caractérisation microfluidique que nous avons monté et fait évoluer pour nos différents projets. Nous présentons les bases des procédés de microfabrication que nous avons utilisés pour la réalisation des dispositifs microfluidiques. Enfin nous proposons une structure de dispositif standardisé avec un support de connexion rapide permettant la mise en fonction et le test rapide des dispositifs une fois fabriqués. Cette dernière approche répond à une absence de standard dédié à la microfluidique qui rends difficile l'interopérabilité de matériels venant de fournisseurs divers et qui ne permet pas une conception encadrée des puces microfluidiques. Ci-après nous prenons l'électronique comme référence pour évoquer le manque de standardisation lié à la microfluidique et les impacts en résultants.

La conception et la production de dispositifs électroniques sont encadrés par des normes et des standards établis au début du siècle dernier à l'émergence de ce domaine. Elles ont été établies par des consortiums réunissant les acteurs industriels majeurs et des organismes de standardisation internationaux : IEE, IEC, JEDEC, DIN, ISO... Cette normalisation recouvre, entre autres, l'uniformisation des appellations et des symboles, le format de boitiers de puces (ex : DIP) et les connectiques (format, propriétés et protocoles de communication). Ces standards ont permis l'adoption généralisée de plusieurs technologies comme l'interface GPIB (IEEE 488), les connecteurs aux pas 2,54 mm, ou encore l'USB. Le but de la standardisation était de permettre une interopérabilité des systèmes et de favoriser les échanges internationaux en levant les barrières technologiques.

La microfluidique est un domaine beaucoup plus récent. En comparaison, il existe peu de fabricants et de matériel dédié à la microfluidique. Le matériel utilisé pour les expérimentations provient majoritairement des domaines de la chromatographie (connecteurs et tubulures en PEEK) du biomédical (pousse-seringue, Luer et aiguilles) et des laboratoires de chimie et de biologie (microscope, réactifs). Quelques tentatives d'uniformisation de la microfluidique ont débutées dernièrement (SEMI, NESSI, DIN) [110] dont l'initiative européenne MFManufacturing. Actuellement, aucun standard communément adopté n'existe pour les dispositifs microfluidiques. Les dimensions, épaisseurs, matières des dispositifs microfluidiques et leurs méthodes de connexion fluidique et électronique varient selon les projets ou les fabricants.

Cette absence de standard entraine des difficultés vis-à-vis de la connectivité fluidique et électronique des dispositifs microfluidiques ; c'est même actuellement un des problèmes majeurs au niveau de la microfluidique. Il en résulte une difficulté d'utilisation et de mise en œuvre de ces dispositifs. En électronique basse fréquence, les composants sont standardisés (résistances, capacités, amplificateurs opérationnels...), avec des caractéristiques et comportements connus, mesurés et fournis par le constructeur. La caractérisation des circuits est réalisable par l'ajout d'appareils de mesure caractérisés et étalonnés ayant une faible influence sur le comportement du système global. En microfluidique, peu de capteurs et d'appareils de mesures commerciaux sont disponibles. Ils influencent le comportement du montage et les mesures fournies sont hautement dépendantes des propriétés des liquides les traversant. De plus, le comportement de chaque élément du système complet varie de manière importante avec des liquides diphasiques. La mesure et le contrôle des écoulements fluidiques demandent donc une attention particulière. Dans ce chapitre, nous présentons les efforts réalisés dans ce sens. Nous aborderons successivement les aspects de fabrication des dispositifs, les supports spécifiques fabriqués pour eux ainsi que le banc d'expérimentation microfluidique réalisé.

2.2. Fabrication des Dispositifs

2.2.1. <u>Choix des matériaux</u>

Les dispositifs microfluidiques emploient des matériaux utilisés dans le domaine de la microélectronique et des microsystèmes comme le silicium, le verre, l'or ou la résine SU8. Les systèmes acoustiques nécessitent des matériaux piézoélectriques pour la transduction [17] : LiNbO₃, PZT, AlN, ZnO, AsGa ... Ils sont complétés par des matériaux qui ne nécessitent pas obligatoirement des équipements de productions de salle blanche comme le PDMS et le PMMA. En l'occurrence, le PDMS est devenu un matériau courant de la microfluidique puisqu'il permet aussi bien de réaliser des puces fluidiques simples dans un laboratoire de biologie que des structures complexes fabriquées en salle blanche intégrant vannes et pompes. De plus, sa biocompatibilité, sa transparence et sa perméabilité aux gaz sont des propriétés qui rendent ce matériau adéquat pour l'observation et la culture cellulaire. Toutefois si les dispositifs sont soumis à de hautes pressions ou à des solvants agressifs, des matériaux plus résistants sont encore utilisés comme le silicium et le verre pour des applications en chimie [111] et en biologie. Depuis une dizaine d'années [112], le papier est devenu un matériau sur lequel développer des dispositifs d'analyse biologiques (µPADS) [113], [114]. Il permet d'effectuer des détections à bas coût, rapides et simples sur des dispositifs à usage unique (ex : détection de maladies infectieuses [115], de glucose, de métaux lourds ou test immunologique [116]).

Les dispositifs des thèses sur lesquelles nous nous appuyons ont été réalisés en silicium, PDMS et verre. Pour le système diphasique, les canaux et les ouvertures d'accès fluidiques sont réalisés par gravure plasma (DRIE) dans le silicium. Un capot en verre scelle le circuit par soudure anodique et permet la visualisation des gouttes. La connexion fluidique est réalisée au travers d'aiguilles colées sur les ouvertures d'accès réalisés par gravure traversante dans le silicium. Le capteur acoustique est réalisé sur du silicium. La gravure chimique anisotrope (KOH), qui suit les plans cristallins du silicium, est employée pour fabriquer les membranes vibrantes à une épaisseur contrôlée de 15 microns. La gravure sèche DRIE est utilisée pour les membranes de 2 microns. Le circuit fluidique est fabriqué en PDMS. La connexion fluidique se fait dans le PDMS.

PDMS: Pour le capteur acoustique, nous avions initialement envisagé de placer le circuit fluidique dans le PDMS et la partie acoustique sur silicium. Séparer ces parties permettrait de simplifier et réduire les étapes de fabrication. Pour tester ce procédé, nous avons coulé du PDMS (ratio 1 :10) sur un moule en silicium puis l'avons recuit à 60°C pendant 2h. La puce en PDMS a été démoulée et découpée pour être collée sur une lamelle de verre par activation plasma O_2 (ICP Nanoplas). Le PDMS et une lamelle de verre ont été placées dans la chambre et exposée au plasma O₂ (1000 mTorr, 20Watts) pendant 30s [117]. Elles ont été mises en contact directement après la sortie de l'appareil. La tenue du collage a été testée par pelage manuel. Le collage est effectif mais contraint à un timing précis pour être répétable. Il peut être utilisé pour la réalisation de circuits fluidiques. Nous avons cependant choisi de ne pas intégrer le PDMS dans notre procédé pour plusieurs raisons. Nous visons une réalisation de puces par traitement en lots sans étapes de packaging individuel. Le collage d'une partie en PDMS se fait de manière manuelle et individuelle pour chaque puce. De plus nous travaillons à des pressions élevées dans des cellules fluidiques de grande taille. La résistance mécanique du matériau et la force de collage maximale atteignables ne sont pas suffisants pour nos applications. Enfin nous avons pour objectif de réaliser un capteur réutilisable. La faible compatibilité chimique du PDMS avec différents solvants le rend incompatible avec l'emploi de nos dispositifs.

Silicium / Verre : Le silicium est le matériau de base utilisé pour la microélectronique et les microsystèmes. Les procédés, liés au silicium, de structuration, de nettoyage, de collage et de caractérisation sont bien établis en salle blanche. Il est chimiquement résistant aux solvants, acides ou détergents. Il est possible de faire croitre thermiquement un oxyde biocompatible (SiO₂). Le verre est transparent, chimiquement résistant mais n'est pas aussi facilement structurable. Pour tous nos projets, nous avons décidé de produire des dispositifs sur base de silicium et de verre. Le circuit fluidique est structuré dans le silicium par gravure chimique ou plasma. L'étanchéité est assurée par soudure anodique d'un substrat de verre permettant la visualisation des liquides. De l'autre côté de la puce, les ouvertures d'accès des circuits fluidiques ou électroniques sont réalisées par gravure traversante dans le silicium. La figure 58 détaille ces opérations. La partie suivante présente quelques techniques de microfabrication utilisées dans les prochains chapitres.



Figure 58 – Etapes de fabrication des puces microfluidiques.

2.2.2. <u>Procédés de microfabrication</u>

2.2.2.1. Lithographie

Le masque de protection est fabriqué par l'enduction, l'exposition et le développement d'une résine photosensible sur le substrat. Ils permettent de transférer des motifs au niveau des ouvertures du masque lors d'étapes de gravures, de dépôts de couches ou de croissance de matériaux. Le dépôt du masque se fait sur un substrat maintenu sur un plateau rotatif d'une tournette par vide d'air ou par des doigts d'indexations. La résine est déposée au centre d'un substrat puis est étalée par la mise en rotation du plateau. L'épaisseur de la couche de résine est paramétrée par, l'accélération, la vitesse et le temps de rotation du plateau. Le substrat est ensuite recuit sur plaque chauffante pour évacuer les solvants de la résine.



Figure 59 – Etapes de lithographie d'une résine positive.

L'étape suivante, l'insolation aux ultraviolets, modifie les propriétés chimiques de la résine pour rendre les motifs exposés sensibles (résine positive) ou insensibles (résine négative) à la solution de développement. Pour cela, le substrat est aligné avec un masque en quartz (4 pouces) recouvert d'une couche de chrome ayant la forme des motifs à transférer. L'alignement se fait avec le méplat du substrat ou entre les motifs d'alignements présents sur le masque et ceux gravés ou déposés sur le substrat. Après alignement, les zones de la résine non protégées par le chrome sont exposées aux UV. Le temps d'exposition est calculé selon l'énergie nécessaire à la pénétration dans l'épaisseur de résine et la puissance de la source UV. Pour finaliser le transfert de motif sur la résine, le substrat est plongé dans un développeur adapté à la résine jusqu'à ce que la résine soit solubilisée. Pour arrêter la réaction de développement, le substrat est mis dans un bain à cascade d'eau déionisée (EDI). Le substrat est laissé dans l'eau jusqu'à ce que sa résistivité indique qu'il n'y a plus de résidu significatif de développeur dans le bain. Le substrat est finalement séché à l'azote.

Parfois, certains motifs de petites tailles (μ m²) en ilots n'apparaissent pas ou ont glissé après le développement. Cela est dû à une mauvaise tenue de la résine. Pour l'améliorer, il est nécessaire de déshydrater le substrat au four puis de l'enduire d'un promoteur d'adhérence (ex : Ti prime).

2.2.2.2. Méthodes de gravure du silicium

Deux méthodes sont classiquement employées en salle blanche pour structurer le silicium La gravure humide, utilise l'hydroxyde de potassium (KOH) pour graver chimiquement le silicium de manière anisotrope selon les plans cristallins du silicium. Les formes que prennent les structures gravées sont dépendantes de la coupe du substrat, de l'orientation du masque et des vitesses de gravure de chaque plan. Pour une coupe <100> les canaux gravés dans la direction <110> ont une section de forme trapézoïdale d'angle 54.74°. Le masque utilisé pour de la gravure KOH est en SiO₂ et est au préalable ouvert au HF.



Figure 60 – Gravure chimique d'un substrat silicium de coupe <100>.

La gravure sèche structure le silicium avec un plasma par bombardement d'ions sur la surface du silicium. La gravure par plasma est de nature physicochimique. Au fur et à mesure que le plasma grave sur la profondeur, il grave aussi sous le masque de manière quasi isotrope. Les flans des canaux sont courbés. La gravure ionique réactive (DRIE : Deep Reactive-Ion Etching) utilise le procédé Bosh pour réaliser des structures à haut facteur de forme (>1:5) à bords et fonds de gravure plat avec des angles proche de 90°. L'alternance d'une étape de gravure du silicium et de protection des flans permet une gravure en profondeur. La gravure est ainsi rendue anisotrope. Ce procédé permet de réaliser des canaux de sections rectangulaires sans devoir prendre en compte la coupe du silicium ou les formes du masque.

Procédé DRIE/Bosch : Le substrat est maintenu dans la chambre de gravure par un clampage mécanique ou électrostatique. La chambre est mise sous vide pour la génération du plasma. Les gaz sont insérés alternativement et le plasma est généré par un générateur haute fréquence. Un potentiel est appliqué entre le plasma et le substrat pour diriger le bombardement des ions verticalement sur le substrat. La boucle de gravure se déroule en deux étapes.

Passivation : Un plasma C₄F₈ dépose une couche de protection (simili-Teflon) sur la zone gravée.

Gravure : La couche de protection au fond de la zone gravée est retirée par un bombardement court d'ions, laissant les bords protégés. Le plasma SF₆ grave le silicium non protégé de manière isotrope.



Figure 61 – Etapes de gravure du silicium en procédé DRIE Bosch.

La gravure DRIE est caractérisée par des flancs striés sur leur hauteur d'intervalles équivalents aux pas de gravure (scalloping). Le bord des structures en fin de gravure sont recouverts de C_4F_8 . Le retrait de cette couche est possible par l'exposition du substrat aux radicaux libres d'un plasma O_2 .

2.2.2.3. Collage de substrat

La méthode de collage de substrats dépend des matériaux à assembler. La soudure anodique est une méthode permettant la fusion d'un substrat de verre et d'un substrat de silicium par création de liaisons covalentes à l'interface des matériaux. Les substrats sont placés dans une enceinte à vide avant d'être mis en contact et chauffés (450-900°C) [118]. Un potentiel (400-1000 Volts) est appliqué aux bornes de l'empilement. Il provoque la migration d'ions O²⁻ du verre vers le silicium créant une couche de liaison (Si-O-Si). Le collage métallique par thermocompression permet de relier deux substrats de même matériau. Une couche métallique (souvent de l'or) déposée sur chaque substrat servira de couche de liaison. Une couche d'accroche, servant aussi de barrière anti-diffusion, peut être déposée avant la couche métallique. Les substrats sont mis en contact. Une force de compression est appliquée à haute température pour fusionner les couches métalliques et assurer le collage.

Dans cette partie, nous avons présenté les méthodes utilisées pour la fabrication des dispositifs microfluidiques. Elles reposent principalement sur les technologies de microfabrication salle blanche. Habituellement, les microdispositifs de type « microélectronique » sont très facilement intégrables dans des boitiers support qui intègrent les éléments de connectique reliés aux appareils de mesure et de contrôle. Le cas des dispositifs microfluidiques est cependant bien plus complexe. Le grand nombre de dispositifs fabriqués et leur large éventail dimensionnel rend nécessaire la fabrication de support de montage adaptés à cette problématique. Ce sujet est traité dans la partie suivante.

2.3. Dispositifs et Support de montage

Les procédés de microfabrication utilisés en salle blanche nous permettent de réaliser plusieurs dispositifs en même temps par substrat. Ce dernier peut contenir la même structure répétée pour assurer l'obtention d'un dispositif correctement fabriqué. Ce peut aussi être des versions de puces différentes avec des variations de structures. L'expérimentation de ces puces passe par la connexion des parties électriques et fluidiques à un banc expérimental. En microélectronique, la connectivité des puces est assurée par la mise en boitier dans un support plus robuste, manipulable et avec une connectique de taille standard assurant l'interfaçage avec les autres composants. Pour nos expérimentations, nous voulons éviter cette étape de « packaging » rajoutant, en bout de chaine, des étapes manuelles et critiques de rajout de connecteurs sur chaque puce. Aussi, nous voulons pouvoir enchainer rapidement les tests de plusieurs versions de puces avec des structures et des fonctionnalités différentes. Nous avons donc développé un montage et un standard de puce associé permettant le test et la mise en expérimentation rapide des puces juste après leur séparation.

2.3.1. <u>Connecteurs pour biocapteurs et bioréacteurs</u>

Nous trouvons dans la littérature et dans le commerce plusieurs méthodes de connexion fluidiques et électriques, réversibles ou irréversible [119]. La connexion des puces PDMS se fait couramment par l'insertion de tubulures ou d'aiguilles dans les puces. L'élasticité du matériau maintient l'étanchéité de connexion pour des basses pressions (P<1 bar) [120]. Des connecteurs peuvent être structurés dans les puces en polymères usinés [121]. Nous nous intéressons aux systèmes permettant la tenue en pressions de plusieurs bar générés par la mise en circulation des fluides par un pousse-seringue ou des pompes à pressions. L'ajout ou l'intégration d'une interface de connexion sur chaque dispositif est souvent nécessaire mais parfois, une connexion directe des dispositifs est possible.

2.3.1.1. Connecteurs intégrés aux dispositifs

Le collage de connecteurs fluidiques sur des puces est une solution basique. Il permet de relier les puces au circuit fluidique par l'intermédiaire de connecteurs standards ou dédiés. Les connecteurs filetés commerciaux (NanoPorts, CapTite) sont souvent utilisés. La connexion par un adaptateur Luer est possible par le collage d'une aiguille à embout Luer [23]. Tous ces connecteurs ont le désavantage d'être volumineux, d'alimenter un seul port à la fois et demandent d'être collés manuellement. Ils sont manipulés un à un à chaque connexion ce qui présente un fort risque de décollement.



Fluidic connector Electrical connector

Figure 62 – Dispositif acoustofluidique avec ajout de connecteurs fluidiques (© Nanoport) et électriques (nappe fine flexible multivoies). Tiré de [122].

La connectique électrique emploie des connecteurs électroniques standards collés sur le dispositif par brasage ou par utilisation d'une colle conductrice. L'utilisation de nappe fines flexibles [120](Figure 62) permet une connexion rapide et facile de plusieurs voies.

2.3.1.2. Connecteurs démontables

La connexion fluidique rapide s'effectue par l'écrasement d'un joint autour des ouvertures d'alimentation des puces (Figure 63) [123]. La connexion électrique se fait avec un système de pointes à ressort. Dans la littérature, les systèmes utilisant des joints toriques permettent d'appliquer des pressions allant de 10 bars [124] à 100 bars [111]. Les systèmes commerciaux utilisent des férules flexibles pour des pressions de 100 bars (Figure 63 - b) et 30 bars (Figure 63 - c).



Figure 63 – Dispositifs de connexions fluidique et électrique amovibles a) Serrage par vis. Tiré de [124]. b) Serrage par sauterelle (© Micronit) c) Serrage avec pointes amovibles (© CorSolutions)

2.3.2. Puces à connexion rapide standardisées

Nous avons pour objectif de développer un montage permettant de connecter rapidement un dispositif avec des connections électriques et fluidiques. La solution idéale doit permettre une connexion rapide et modulable de plusieurs voies sur des puces de petites tailles. Le serrage doit être fait sans réglage spécifique de hauteur. Une fenêtre pour la visualisation des écoulements et des gouttes en microscopie est à prévoir.

2.3.2.1. Connecteurs

Nous avons choisi d'utiliser un connecteur 4 voies (Dolomite Réf. 3000024) pour la connexion fluidique. Ce connecteur a un faible encombrement et utilise un joint unique pour les quatre connections (pas de 3 mm). Les tubulures de 1,59 mm de diamètre (1/16'') sont insérées dans le joint pour l'étanchéité et sont coincées dans des encoches. Le joint en perfluoroélastomère (FFKM) présente une bonne résistance chimique aux acides, solvants et huiles. La connexion électrique est réalisée par un connecteur à ressort (Preci-Dip Réf. 811-S1-003-10-017101) au pas standard de 2.54 mm.



Figure 64 – a) Connecteur 4 voie fluidique (© Dolomite). b) Connecteur à ressort (© Préci-Dip).

2.3.2.2. Format de puces

Les dimensions des puces, le positionnement des connections et l'agencement des parties fonctionnelles dans les puces sont liées aux fonctions à intégrer sur la puce et à la connectique fluidique

et électrique. Un connecteur fluidique contient jusqu'à 4 canaux. Un connecteur électrique peut contenir jusqu'à 5 voies dans le même encombrement. Nous avons défini une partie fonctionnelle carrée de 15 mm de côté entouré de deux zones de connexion de 15 x 5 mm de côté. Avec ces dimensions jusqu'à 14 puces sont réalisables par substrat de 4 pouces (100mm de diamètre) mais nous n'en réaliserons que 8 en gravure plasma pour assurer une meilleure homogénéité de gravure.



Figure 65 – *Format de puces et placement sur un substrat 4 pouces.*

2.3.2.3. Support

La puce est positionnée dans le support dans un logement rectangulaire et est maintenue par l'elasticité des joints de deux connecteurs. Le connecteur fluidique maintient la puce par son joint d'étanchéité. Le connecteur électrique comporte des joints toriques dédiés au maintien de la puce.



Figure 66 – Support de puces a) schéma b) modélisation CAO et c) réalisation.

Dans cette partie, nous avons présenté les choix mis en œuvre de manière à standardiser à la fois les dimensions des puces microfluidiques, les méthodes de connexion électrique et les techniques de connexion fluidique. Désormais, un support de caractérisation unique est disponible et permet d'accueillir tous les dispositifs qui seront étudiés dans la suite de ces travaux.

La standardisation étant maintenant un acquis, il reste à intégrer ces supports de puce dans un banc complet de caractérisation électro-micro-fluidique. La partie suivante présente les travaux réalisés dans ce sens.

2.4. Banc d'expérimentation microfluidique

La mise en mouvement de fluides dans les systèmes microfluidiques est réalisable par phénomène de capillarité, par différence de pression ou par électro-osmose. Dans nos systèmes, les fluides ne s'écoulent que par différence de pression dans des microcanaux. Nous considérons que les écoulements prennent la forme des écoulements de Poiseuilles pour les estimations des propriétés fluidiques des montages (système monophasique, débit faible :< 100 μ L/min). Nous utilisons des contrôleurs de pression, des pousse-seringues et une colonne de liquide pour appliquer une pression ou un débit à

l'entrée du montage fluidique. Les débits sont mesurés par des débitmètres microfluidiques montés entre les sources de pression et les dispositifs. Ils permettent de réguler en débit les pompes à pression ou de mesurer les débits réels engendrés par la hauteur d'une colonne d'eau. Des microscopes et des binoculaires associés à des caméras numériques rapides permettent de visualiser et de caractériser les écoulements dans les dispositifs. Le montage fluidique est composé de tubulures, vannes, connecteurs et jonctions en polymères à haute résistance chimique et adaptés à la circulation de micro volumes (Figure 67).



Figure 67 – Schéma simplifié du banc expérimental.

2.4.1. Système de contrôle des écoulements

2.4.1.1. Matériel microfluidique

Pousse-seringue

Le pousse-seringue est un appareil réglable générant un débit par déplacement d'un volume de liquide dans le corps d'une seringue. Le débit est calculé en fonction de la section et de la vitesse d'avance du piston ($Q = S_{piston}$. v_{piston}). Le temps de réponse d'un pousse-seringue peut être lent en microfluidique à cause de l'élasticité des matériaux qui créent des capacités fluidiques locales. La pression appliquée au montage n'est pas pilotée et dépend de sa résistance fluidique. Elle peut atteindre des valeurs importante (>100 bars) pour des seringues de petits volumes, un débit élevé ou un montage à haute résistance fluidique (liquides visqueux et faibles dimensions de canaux). Le temps de stabilisation des débits d'huiles est élevé (de la minute à l'heure) dans nos conditions d'expérimentations. De plus, les résistances fluidiques fluctuent rapidement à cause des émulsions évoluant dans les dispositifs et les tubulures. Pour ces raisons nous n'utilisons pas de pousse-seringue pour la génération et la manipulation de goutte. Ils sont cependant utilisés pour injecter des liquides peu visqueux dans les dispositifs. La référence du pousse-seringue utilisé est Harvard 11-Plus. Il est programmé manuellement par le biais d'un écran tactile de contrôle sur l'avant de l'appareil.

La colonne d'eau

La pression dans un liquide augmente avec la profondeur sous l'influence de son poids. La pression hydrostatique défini la différence de pression entre la surface d'un liquide et un point de hauteur h : $\Delta P = \rho_{liquide} \cdot g \cdot h$

Nous utilisons une colonne d'eau (h=2m => P=200 mbar) lorsqu'il est nécessaire de générer un écoulement constant (~10 μ L/min) sur quelques minutes de mesure et sans variations notables (<20Hz). Le pousse-seringue et le contrôleur de pression génèrent des impulsions dues respectivement aux pas des moteurs et à une valve de régulation pression. Cette méthode est donc une alternative à l'utilisation de ces appareils pour des expérimentations sensibles aux variations rapides de débit telle que la PIV.



Figure 68 – Montage expérimental assurant un écoulement par pression hydrostatique.

Les contrôleurs de pression

Avec ces appareils, le liquide est mis en mouvement en appliquant une pression supérieure à la pression atmosphérique au niveau du réservoir d'entrée du circuit fluidique. Le réservoir d'alimentation fluidique est placé dans une enceinte hermétique. La pression gazeuse de l'enceinte est régulée par un contrôleur de pression entre sa pression d'alimentation P_{in} et la pression atmosphérique P_{atm}. La pression du liquide du réservoir au niveau du ménisque est considérée au niveau de la pression P de la chambre. La sortie est mise à la pression atmosphérique au niveau du bac poubelle.



Figure 69 – Equivalent électrique d'un circuit fluidique alimenté en pression.

Nous employons des contrôleurs de pression Dolomite Mitos P-Pump (Rèf. 3200176)[125]. Ils régulent la pression dans le réservoir d'alimentation en le connectant alternativement à sa pression d'alimentation (10 bar max.) et à la pression atmosphérique. La précision de mesure (1 mbar) et sa stabilité (0.1% de la pression ou +/- 2 mbar) sont faibles et son temps de réponse (10ms) élevé mais sa plage de fonctionnement est large (0-10 bar). Cela permet de contrôler des liquides de viscosité différentes sur de larges plages de débits (du μ L pour de la manipulation de gouttes au mL pour du nettoyage). L'arrêt de l'asservissement ou la mise à 0 bar sont réalisés en ventilant le réservoir à la pression atmosphérique. Il en résulte d'une plage morte de contrôle entre la pression atmosphérique et une pression minimale de contrôle (variant suivant la pression d'alimentation). Cela empêche l'asservissement à très basse pression (autour du mbar).



Figure 70 – a) Schéma d'un montage expérimental avec écoulement contrôlé par pression b) Chambre sous pression accueillant le réservoir d'alimentation et le contrôleur de pression [125].

En y connectant un capteur de débit compatible, le contrôleur de pression devient capable d'asservir les écoulements en débit avec un correcteur de type PID interne. Des capteurs de débits non compatibles sont interfaçables au contrôleur de pression au travers du programme de contrôle LabVIEW que nous avons développé.

Capteur de débit thermique

Les dispositifs de mesure de débit microfluidique par mesure thermique [38]–[40] sont couramment employés. Ils permettent de détecter de faibles débits (nL/min). La mesure est dépendante des propriétés du liquide (densité) et nécessite obligatoirement une calibration. Nous utilisons des capteurs de la série LG16 (Sensirion). Le capteur employé dans ce banc mesure jusqu'à 50 μ L/min pour de l'eau (Réf. : 3200098 / LG16-0430)[126], [127]. La précision est à 5% de la valeur mesurée. En dessous de 2,4 μ L/min, la précision est de 120 nL/min.

Capteur de débit Coriolis

Ce capteur de débit massique (g/s) à forces de Coriolis [41], [126], [128] permet la mesure d'un débit volumique d'un liquide ou d'un gaz (m³/s) sans calibration. Le débit massique est mesuré grâce à l'interaction d'un fluide s'écoulant dans un tube oscillant générant des forces de Coriolis. Ces forces sont proportionnelles avec le débit massique réel et sont indépendantes de la température, pression et des propriétés du liquide.

Nous utilisons le capteur Mini-Coriflow (Bronkhorst / Elveflow). Ce capteur ne permet pas de mesurer de faibles débits mais la précision (jusqu'à 2%) est meilleure que pour les capteurs à température. La gamme de mesure se situe de 1.6 μ L/min à 3,3 mL/min pour de l'eau. La dérive du zéro est de +/- 0,01 g/h/°C ce qui équivaudrait à 0,17 μ L/min/°C pour de l'eau. Le capteur mesure la vitesse massique (g/s), la température (°K) et la densité du liquide (g/m³). Il détermine à partir de ces mesures la valeur du débit du fluide (m³/s) : $Q = Qm. \rho$.

Vannes, connecteurs, jonctions et tubulures

Les circuits fluidiques sont assemblés principalement avec des composants de chromatographie (Figure 71). Les tubulures que nous utilisons principalement sont en TEFLON fluoroéthylène propylène (FEP) transparents (1527L IDEX) de diamètre extérieur 1,6 mm (1/16") et de diamètre intérieur 0,25 mm. La connexion standard des tubes 1/16" sur les autres composants se fait avec raccords PEEK (XP-230 IDEX) à filetage ¼-28 à férule plate bleu TEFZEL ETFE (P-200 IDEX). En amont des entrées de capteur de débit ou des dispositifs fluidique, les raccords sont équipés des férules en PCTFE vert à filtre 2 µm en acier inoxydable (3200588 Dolomite). Des connecteurs en Y servent (P-512 IDEX) à connecter des circuits de purges dans le montage. La vanne à boucle d'injection (3200037 Dolomite) permet d'injecter des d'échantillons dans les dispositifs.



Figure 71 – Composants servant au montage fluidique : a) connecteur ¹/₄ 28 b) vanne tout ou rien c) férule avec filtre d) connecteur en Y et e) vanne d'injection.

Le contrôleur de pression associé à un capteur de débit peut maintenir un écoulement à débit nul. C'est le cas lorsque nous voulons stopper l'une des deux phases utilisées pour la fabrication de l'émulsion. Si un écoulement positif existe pour le système au repos, comme un écoulement gravitaire, l'absence de pression d'alimentation négative ne permet pas de l'annuler. Une élévation de 1 cm entre le réservoir d'entrée et la cuve poubelle applique environ 2 mbar sur le circuit pour de l'eau. C'est suffisant pour entraîner un écoulement dans nos circuits. Si nécessaire, des vannes tout ou rien sont placées entre chaque réservoir et entrées de puces pour assurer l'arrêt de l'écoulement (Figure 72). Elles permettent d'empêcher un refoulement (écoulement négatif) vers le réservoir lorsque l'asservissement est inopérant. Les réservoirs sont parfois placés à une élévation inférieure aux cuves poubelles pour permettre l'asservissement d'un écoulement nul. Des vannes sont aussi placées en dérivation des entrées de la puce pour permettre un remplissage rapide à haut débit (~ haute pression) du circuit fluidique en

amont de la puce. Elles servent aussi de vannes de purge pour accélérer la chute de pression résiduelle suite à l'arrêt du pousse-seringue ou des contrôleurs de pression.



Figure 72 – Montage expérimental avec vannes d'arrêt de l'écoulement et purge de pression.

2.4.1.2. Programmes d'instrumentation

Le banc de mesure et de contrôle microfluidique est piloté par un programme informatique servant à interfacer les appareils, acquérir les données de mesures et fournir une interface de contrôle à l'expérimentateur. Nous avons développé un programme LabVIEW permettant de contrôler jusqu'à deux contrôleurs en pression et en débit depuis une interface utilisateur. Nous l'utilisons pour contrôler les débits de génération des émulsions et leur manipulation dans les dispositifs fluidiques.

Les pilotes complets des régulateurs de pression et des capteurs de débits Dolomite étaient à concevoir. La communication est réalisée par liaison RS-232 : 115200 bauds, 8 bits de données, 1 bit de stop, pas de parité et pas de contrôle de flux. Le protocole de communication est propriétaire 12 bits (STX, ID, MSG, x8 DATA, CS) avec 5 types de messages en écriture et 4 en lecture. Le contrôle de l'appareil est effectué majoritairement par la lecture et l'écriture de ses registres. Cela inclus le réglage des modes de fonctionnement de l'appareil (régulation en pression ou en débit, tare, arrêt...), la lecture des mesures (pressions, débit, limites...) et l'écriture de valeurs (consignes et débits de capteurs externes).

Le pilote du capteur de débit Bronkhorst sous LabVIEW est fourni par Elveflow. Il est interfacé avec le régulateur de pression Dolomite pour l'asservissement en débit au travers de notre programme de contrôle LabVIEW. Le programme permet de choisir les grandeurs mesurées (température, densité et débit) et de régler le temps de mesure. Pour effectuer l'asservissement, le programme lit la valeur du débit dans le capteur, converti les unités et l'envoie vers le contrôleur de pression. La régulation se faisant par un régulateur de type PID intégré au contrôleur, il a fallu optimiser le temps de la lecture et de transfert de la valeur du débit vers le contrôleur. En effet, les premières versions du programme occasionnaient une oscillation de l'asservissement en débit à cause d'un temps de mesure trop long.

Le programme LabVIEW a été développé en structure modulaire. Les pilotes des appareils fonctionnent en parallèle mais leur démarrage est synchronisé pour assurer une temporalité correcte des mesures. Les commandes rentrées depuis l'interface utilisateur, la sauvegarde des mesures et les échanges des données entre appareils sont gérés de manière désynchronisée. Ainsi, l'intégration d'autres appareils, comme des caméras, ne ralentira ni le fonctionnement du programme principal ni les autres appareils. Nous avons développé sous Python 3.4 un programme équivalent pour gérer les appareils Dolomite à partir des modules Lantz et PyQtGraph. A la différence du programme LabVIEW, ce dernier génère une interface utilisateur en fonction des contrôleurs de pression et des capteurs de débit connectés. Il sert pour une utilisation rapide lors d'essais de nouvelles configurations de circuit fluidique. Développer des programmes d'instrumentations sous python permet d'inclure dans la même chaine de traitement de l'information, la mesure, la sauvegarde et le traitement des données.



Figure 73 – Interfaces utilisateur des programmes de contrôle fluidique développés en LabView et en Python.

2.4.1.3. Vérification de la calibration des capteurs de débit

La mesure du débit par le capteur à force de Coriolis est supposée exacte pour des débits supérieurs 2 μ L/min et ne nécessite pas de calibration. Il demande au minimum une acquisition de densité pour calculer le débit volumique à partir du débit massique. Le capteur thermique doit être calibré pour chaque fluide. Il est calibré en usine pour de l'eau. Il nécessite une tare du zéro pour chaque campagne de mesure. Nous avons mesuré la réponse des capteurs pour quelques fluides que nous employons afin de vérifier leurs calibrations et corriger leurs mesures.



Figure 74 – Schéma du montage pour la vérification des mesures de débit.

Le montage (Figure 74 et Figure 75) est composé d'un contrôleur de pression (Mitos Ppump) et de deux capteurs de débits (Mini-Coriflow et LG16-0430 : 50µL) montés en série. Les mesures sont effectuées en appliquant, pour chaque fluide, des paliers de pression sur la gamme de fonctionnement du contrôleur (0-10 bars). Après stabilisation en pression du système, le débit est relevé (Figure 76) en moyennant 200 mesures successives (~ 30ms entre chaque acquisition). Le débit résultant est supposé proportionnel à la pression suivant la résistance fluidique du circuit (tubes et capteurs de débits).



La résistance fluidique du circuit est adaptée selon la viscosité des fluides pour offrir la plus grande amplitude de mesure possible. Pour cela la longueur du tube entre le réservoir et les capteurs de débit est modifiée. Les fluides utilisés sont de l'eau désionisée ultra pure (EDI), du SDS 10% (SDS 20%

EU0460-B Euromedex + EDI) et de l'huile de soja (S7381 SIGMA). Le zéro du contrôleur de pression est taré avant la série de mesure. Le zéro du capteur thermique est taré pour chaque liquide à pression de consigne nulle et avec la vanne fermée pour assurer un écoulement nul. Une mesure à pression nulle avec la vanne ouverte permet de mesurer l'écoulement gravitaire dû à l'écart de hauteur des liquides dans réservoirs entourant le circuit fluidique. La densité de chaque liquide est mesurée par le capteur Coriolis avant chaque série de mesure.



Figure 76 – Débits mesurés par le capteur Coriolis (Qc : bleu), le capteur thermique 50 μL/min (Qt : orange) et le débit estimé (Qe : gris). Equation de la courbe de tendance de Qc (bleu pointillé). Mesure a) complète b) proche de zéro. 1) EDI 2) SDS 10% 3) Huile de soja.

Le système au repos présente un écoulement gravitaire (< 0,1 µL/min) équivalent à un écart de 2,5 mbar entre les bornes du système causé par environ 2,5 cm d'élévation d'eau. Le capteur Coriolis présente une réponse linéaire, sauf à bas débit (< 2 µL/min) où il sature entre 1 µL/min et 1,69 µL/min selon les liquides. Sa réponse est fortement linéaire pour l'huile de soja. Sa réponse est supposée exacte mais nous supposons un décalage de l'origine sur la valeur du débit. Nous extrayons une courbe de tendance linéaire des débits mesurés (bleu pointillé - Figure 76) que nous décalons à l'origine pour servir de courbe de calibration (courbe de débit estimé grise Qe) pour l'huile (3 - Figure 76). Les débits mesurés pour le capteur thermique Qt montrent une réponse linéaire similaire aux débits mesurés Qc et estimés Qe pour l'EDI et le SDS 10%. En revanche, la réponse du capteur pour l'huile est à corriger.



Figure 77 – Correcteur Qtc du débit d'huile Qt et sa courbe de tendance.

Nous utilisons le ratio des débits Qt et Qe pour déterminer la courbe de tendance du correcteur. Le débit d'huile Qt est corrigeable à l'aide d'un correcteur polynomial Qtc=C.Qt avec $C=Qt^2.0,0056+Qt.0,0096+1,6453$ (Figure 77).

2.4.1.4. Nettoyage de l'huile dans le circuit

Les capteurs, puces et circuits fluidiques du système doivent être nettoyés et séchés pour arrêt du banc de mesure. Ce peut être pour éviter la pollution des surfaces des puces et des dispositifs par de l'huile ou pour évacuer des réactifs biologiques. Nous avons utilisé le capteur de débit à force de Coriolis pour évaluer les temps et débits de nettoyage et de rinçage du système et établir un protocole de nettoyage. Les densités et débits sont mesurés par le capteur de débit à 27°C. Ce capteur est un outil utile pour déterminer le remplacement d'un liquide par un autre par l'observation du débit et de la densité. Nous appliquons une pression P fixe de 5 bars dans le circuit (Figure 75) et mesurons le débit Qc, la densité et le temps de remplacement d'un liquide par un autre par stabilisation du débit. L'huile de soja rempli le circuit au démarrage de la mesure. Du SDS 10 % est injecté pour l'étape de nettoyage puis l'EDI pour l'étape de rinçage.

Pression $P = 5$ bar	Huile de soja	SDS 10%	EDI
Densité [kg/m ³]	917	1017	998
Débit Qc [µL/min]	20	205	632
Temps de transition [min]	0	7,5	2

Tableau 7 – Valeurs mesurées par le capteur de débit pour la transition d'un fluide à l'autre.

Le protocole de nettoyage établi pour de l'huile végétale consiste au minimum à une injection de SDS 10% à 30°C pendant 10 min à 200 μ L/min puis de l'EDI à 30°C à 600 μ L/min pendant 5 min.

2.4.2. Visualisation des écoulements

La visualisation des écoulements microfluidiques dans nos dispositifs n'est pas chose aisée. Les colorants constituent un moyen simple de visualiser des phases différentes ou de déterminer des gradients de mélanges dans des dispositifs transparents. Nos dispositifs en silicium/verre sont opaques en lumière blanche. La visualisation ne peut se faire qu'en réflexion sur le silicium. Nous pouvons utiliser du colorant pour observer les écoulements mais le silicium est sombre. Cette méthode offre peu de contraste et n'est pas viable pour la mesure de vitesse du fluide lorsqu'il y a diffusion. Les liquides fluorescents offrent un meilleur contraste mais demandent un équipement compatible. La PIV [54] permet de visualiser les écoulements par l'ensemencement de particule dans les fluides. Elle a été

appliquée à la microfluidique, sous le nom de µPIV [129], pour visualiser des écoulements dans des microcanaux. Cette méthode emploie des nanoparticules fluorescentes observées avec un microscope à fluorescence dans des canaux d'environ 100µm de long.

Cependant, la fenêtre d'observation que nous désirons est de l'ordre du centimètre pour observer les écoulements dans la totalité des chambres et des circuits fluidiques. Les gouttes que nous produisons présentent un diamètre écrasé d'environ 100 µm dans des canaux profonds de 50 µm. Les cellules dans lesquelles elles évoluent sont de dimensions comprises entre le mm et le cm. Nous travaillons donc à une échelle mésoscopique où nous cherchons à observer des micro écoulements dans des circuits macroscopiques. La génération de gouttes peut aller jusqu'à 10 kHz dans la littérature. Nous utilisons des vitesses de génération plus faibles (1 Hz - 100Hz) mais nous avons besoin d'observer la zone de génération de gouttes à des vitesses plus élevées pour vérifier les conditions et le mode de génération des gouttes. Ces contraintes spatiales et temporelles rendent indispensables la mise au point de systèmes d'observation originaux.



Figure 78 – Equipement utilisé pour la visualisation des écoulements.

2.4.2.1. Montage d'observation grand champ

Nous utilisons une binoculaire SMZ-800 (Nikon) à faible grossissement (x1 - x6) pour observer l'évolution des gouttes dans les dispositifs et déterminer les écoulements par PIV sur un champ d'observation allant jusqu'à 1 cm².

L'acquisition est réalisée par une caméra µEyes CMOS (UI-3370CP-M-GL Rev.2 - IDS) de 1,1cm de côté. La caméra est monochrome avec une résolution de 2048 x 2048 pixels carrés. Les pixels font 5,5 µm de côtés. Les capteurs des caméras que nous utilisons fonctionnent en obturateur global (global shutter) qui acquière les la totalité des pixels du capteur en même temps. Cela permet d'acquérir l'écoulement en instantané sur toute la zone de visualisation ce qui est obligatoire pour un traitement PIV. En grossissement x1 sur l'objectif, le champ d'observation est de la taille du capteur.

Les dispositifs sont éclairés par un anneau lumineux fibré connecté à une source halogène 250W (Kl 2500 - Schott). Les mesures en PIV sont effectuées en lumière blanche avec des particules mélaminées de 920 nm (MF-NB-COOH-S1058 – Microparticles) en grossissement x1 pour caractériser des chambres de 1cm².



Figure 75 – Configuration du montage en lumière blanche utilisé pour visualiser des microparticules dans les canaux.

Les particules ne sont pas adaptées pour déterminer les écoulements entre des gouttes en arrangement serré dans une chambre. L'espace interstitiel et les dimensions des canaux entourant la chambre sont de l'ordre de dimension des particules. Ces dernières influenceraient les écoulements. Pour visualiser des écoulements autour des gouttes nous utilisons un liquide fluorescent excité à 488 nm.

Un filtre d'excitation 455-490 (GFP FXF002 - Thorlabs) est monté dans le barillet de la source lumineuse. L'éclairage passe par l'anneau lumineux ou un bras flexible pour concentrer la lumière. Un filtre passe haut à 500nm (488 BLP01-488R-25 EdgeBasic) est placé dans la binoculaire sur le chemin optique menant à la caméra. La fluorescéine (F6377 – Sigma) diluée dans de l'EDI à 1 mg/mL offre un contraste suffisant pour l'observation dynamique des écoulements.



Figure 79 – Configuration du montage en fluorescence utilisé pour visualiser des fluides fluorescents.

2.4.2.2. Montage d'observation à haute fréquence

Pour observer et déterminer les modes de génération des gouttes, nous utilisons une caméra rapide (Miro M120 – Phantom) monochrome de 1920x1200 pixels carrés. Les pixels font 10µm de côtés. Le temps d'exposition minimum est de 9 µs. A pleine résolution l'acquisition est réalisable à 730 images par secondes (FPS). En diminuant la zone d'acquisition du capteur la fréquence de prise d'image est augmentable (ex : 512x512 pixels => 5580 FPS) pour observer des générations de gouttes rapides. La caméra est montée sur une tête de microscope Mitutuyo WF avec des objectifs longue distance corrigés plans (x5, x10, x20 et x50 M Plan Apo - Mitutuyo). L'éclairage, alimenté par une source halogène 250W, passe dans l'objectif.

Dans cette partie, nous avons présenté le banc d'expérimentation spécifiquement mis au point. La partie précédente concernant les puces microfluidiques peut être décrite par le mot-clé « standardisation ». La partie présente peut être représentée par le mot-clé « multi-échelle ». En effet, la grande diversité des propriétés rhéologiques des fluides que nous utiliserons nécessite la mise en place d'un banc de mesure multi-échelle en termes de commande et de contrôle des écoulements. Parallèlement, la visualisation de détails micrométriques sur un champ d'observation centimétrique, de même que l'imagerie de débits avec des résolutions temporelles variables requièrent la mise au point d'un banc multi-échelle en termes spatiaux et temporels.

2.5. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les méthodes de fabrication des puces microfluidiques. Pour diverses contraintes liées notamment aux pressions appliquées aux fluides, nous optons pour la fabrication de puces silicium rendues étanches par soudure anodique d'un capot en verre.

Nous avons également présenté le montage que nous avons développé permettant un changement et une connexion rapides de dispositifs microfluidiques en format puce directement après la découpe. Ce système se veut modulaire et permet de connecter des dispositifs aux nombres et types d'entrées variés. Les dispositifs sont conçus suivant un standard fixant les dimensions de la puce et les positions de ses éléments. Ce standard a été utilisé pour dimensionner les dispositifs acoustofluidiques et capacitifs utilisés dans les chapitres 3 et 5. Nous présentons aussi un banc de contrôle des écoulements microfluidiques mono et diphasiques. Il est constitué d'éléments de contrôle et de mesure fluidiques couplés à des appareils de microscopie servant à observer et caractériser les fluides. Ce banc de mesure est utilisé dans les chapitres suivants et est adapté selon les mesures envisagées. Des liquides fluorescents ont été utilisés au chapitre 3 et la visualisation par PIV est appliquée au chapitre 4.

Comme précisé précédemment, ce banc d'expérimentation se défini par les mots-clés suivants : modularité du banc, standardisation des puces, aspects multi-échelle. Sa première mise en œuvre concerne l'étude et la réalisation de capteurs acoustofluidiques à gouttes pour la détection d'entités biologiques. Elle fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 3

Injection et capture d'analyte biologique dans un réseau de goutte

3.1. Introduction

Une des limites à la généralisation de l'emploi de ces biocapteurs est l'impossibilité de les réutiliser pour plusieurs mesures, principalement à cause de couches de bio récepteurs difficilement régénérables et au fait qu'actuellement, leur coût de fabrication est peu compatible avec une utilisation en usage unique. Pour pallier cet obstacle, l'interface décorée par la couche de bio récepteur pourrait être remplacée à chaque mesure, à la manière des puces de verre recouvertes d'or pour les SPRs. L'interface serait un élément jetable tandis que le transducteur resterait en permanence lié aux éléments de mesure. La contrainte serait de garantir un couplage acoustique efficace entre ces éléments pour garantir une bonne qualité de mesure. Il faut aussi prendre en compte la problématique de l'assemblage et du démontage de l'interface sur un capteur aux dimensions faibles liées à la manipulation de petites quantités de fluides.

A la différence des puces SPR nous avons envisagé l'emploi d'une interface non plus solide mais liquide. Pour nous affranchir des problèmes liés au remplacement de cette interface dans le dispositif de mesure, elle doit être générée et assemblée dans la zone de détection. Rendre le dispositif capable de déstructurer et d'évacuer cette interface de la zone de détection permettrait le renouvellement de l'interface et donc la réutilisation de la puce.

En microfluidique les gouttes sont majoritairement utilisées comme enceinte de réaction. Elles servent de conteneurs clos et hermétiques ne prenant pas part aux réactions s'y déroulant. Des études d'interactions cellulaires, notamment au niveau des échanges intramembranaires ou de la reconnaissance de cellules, mettent en œuvre la surface de gouttes comme zone d'interaction. La composition de la surface de la goutte joue un rôle dans les mécanismes de bioreconnaissance. Les gouttes sont décorées de biorécepteurs au moment de leur génération à l'aide de tensioactifs fonctionnalisés ou par activation chimique des terminaisons présentes à leur surface après formation.

Les systèmes microfluidiques permettent la génération, le tri, le rinçage, le piégeage de goutte, la fusion de goutte dans un même dispositif passivement suivant la dynamique des écoulements microfluidiques ou activement à l'aide d'actionneurs piézoélectriques ou thermiques. Elles offrent une interface de détection mobile dont les étapes de génération, activation, déplacement et remplacement sont intégrables dans un dispositif microfluidique.

Les capteurs acoustiques offrent la possibilité de détecter un large éventail de propriétés physiques de solides, fluides ou entités biologiques à proximité de l'élément de transduction. L'un des intérêts de leur utilisation dans des biocapteurs réside dans leur potentiel d'effectuer des détections sans marqueur. Ils sont de plus hautement sensibles, peu coûteux et hautement intégrables car leur fabrication s'appuie sur les procédés de microfabrication en salle blanche.

Nous proposons donc d'utiliser des gouttes fonctionnalisées comme surface de capture dans un dispositif microfluidique pour la réalisation d'un biocapteur acoustique réutilisable. Ces études font l'objet du présent chapitre.

3.2. <u>Capteurs acoustiques en microfluidique diphasique</u>

Dans cette partie, nous présentons le principe de fonctionnement des capteurs acoustique ainsi que l'intérêt que représentent les capteurs basés sur la microfluidique diphasique par rapport aux capteurs basés sur des interactions avec une surface solide. Une attention particulière sera portée aux aspects physiques caractéristiques des gouttes dans des espaces confinés.

3.2.1. <u>Capteurs acoustiques</u>

La détection par les capteurs acoustiques est réalisée par la mesure de l'influence des propriétés physiques d'un milieu sur une onde mécanique. Dans les microsystèmes acoustiques, la transduction est principalement réalisée par des matériaux piézoélectriques. Une contrainte appliquée sur un matériau piézoélectrique génère un champ électrique. Inversement, l'application d'un champ électrique conduit à une déformation mécanique. Ces phénomènes sont appelés respectivement effets piézoélectrique direct et inverse. Par exploitation de ces effets, les capteurs acoustiques génèrent une onde sinusoïdale à proximité d'un milieu à analyser puis mesurent l'onde modifiée par l'influence de ce milieu. La méthode de mesure dépend des types d'ondes employées, fortement liés à la technologie du capteur, et des propriétés physiques à mesurer. Selon les principaux types d'ondes, les technologies de capteurs peuvent être réunis en différentes familles : les systèmes à onde de volumes (BAW : Bulk Acoustic Wave), à onde de surface (SAW : Surface Acoustic Wave) et les ondes de plaques [130].

3.2.1.1. Technologies de capteurs

Les capteurs de types microbalances à quartz (QCM : Quartz Crystal Microbalance) et FBAR (Film Bulk Acoustic Resonator) emploient les ondes de volumes évoluant dans l'épaisseur du matériau piézoélectrique. Les QCM (TSM : Thickness Shear-Mode) représentent la technologie la plus répandue et la plus simple. Les balances à quartz sont constituées d'un disque de quartz massif entouré de deux électrodes d'excitation. L'ajout de masse sur l'électrode de détection provoque un décalage de la fréquence de résonnance [131]. Les QCM fonctionnent à basse fréquence (5 – 20 MHz) et ses dimensions sont trop grandes pour être produit par microfabrication (1cm² x 1mm). Les FBAR (QSM : quasi-shear mode) ont un fonctionnement similaire aux QCM mais sont produits par technique de microfabrication en déposant une couche mince piézoélectrique entre deux électrodes [132]. Ils fonctionnent à des fréquences plus élevées (2GHz), ce qui offre théoriquement une meilleure sensibilité que les QCM et les autres types de capteurs mais leur facteur de qualité est impacté par des paramètres structurels [133].

Les capteurs à ondes de surface (SAW) utilisent des ondes acoustiques se déplaçant en surface d'un matériau acoustique massif ou canalisées dans l'épaisseur du film piézoélectrique. Les ondes acoustiques sont principalement générées par des électrodes coplanaires en forme de peigne interdigités (IDT : InterDigital Transducers) déposées en surface du matériau piézoélectrique. Une configuration courante de SAW est la ligne à retard [18]. Elle est utilisée dans les filtres haute fréquence en télécommunications. L'onde acoustique est générée par un peigne, transite au travers de la surface de détection puis est mesurée par l'électrode de mesure. L'amplitude et la vitesse de l'onde traversant la surface de détection sont modifiées en fonction de la masse des éléments capturés. Les dispositifs à lignes à retard sont aussi employés comme résonateurs. Les modifications de la vitesse de l'onde, influencée par la masse capturée, provoquent un déphasage de la fréquence de résonnance [130]. Les capteurs à ondes transverses horizontales (SH-SAW : shear-horizontal SAW) confinent l'énergie en surface du matériau piézoélectrique. Ils sont compatibles avec une mesure en milieu liquide [132]. Les capteurs à ondes de Love emploient une onde acoustique transverse horizontale (SH-SAW) guidée dans une couche mince piézoélectrique. L'amplitude et la vitesse de l'onde sont modifiées par les éléments présents en surface [134]. Ils sont aussi sensibles à la viscosité et à la densité des fluides [135]. Les dispositifs à ondes de Rayleigh sont employés pour les milieux gazeux mais pas pour les fluides qui causent de fortes atténuations du signal de mesure [130].

Les dispositifs à ondes acoustiques de plaques emploient des ondes contraintes par les surfaces du matériau piézoélectrique. Les fréquences de résonances de ces dispositifs sont déterminées par l'épaisseur de la plaque et les espacements des doigts des peignes interdigités (IDT). Les capteurs à ondes de plaque transverses horizontales (SH-APM) sont constitués d'une plaque dont l'épaisseur est proche de longueur de l'onde acoustique. Ils fonctionnent entre 25 et 200 MHz et permettent une mesure sur les deux bords du capteurs [130]. Les ondes acoustiques de plaques en flexion (FPW) ou onde de Lamb apparaissent lorsque l'épaisseur de la plaque est plus faible que la longueur de l'onde acoustique. La vitesse de l'onde dans la membrane est plus faible que celle du son dans les liquides ce qui limite les atténuations. Cela rend les capteurs à onde de Lamb compatibles avec une détection en milieu liquide. Leurs plages de fonctionnement oscillent entre 1 et 50 MHz [25]. Leurs fréquences maximums d'utilisation sont limitées par la fragilité de leurs membranes. Leurs sensibilités augmentent avec la finesse de la membrane, ce qui rend ces capteurs plus fragiles que les autres. Dans les liquides, ils permettent de détecter les paramètres de densité, viscosité et vitesse du son de manière découplée grâce à l'analyse de plusieurs modes de résonance [22], [85].

Nous avons besoin d'un capteur en milieu liquide capable de détecter des variations de propriétés physiques en surface de gouttes (tension de surface) sur la hauteur du canal (50µm). Les capteurs à onde de Lamb permettent une détection de plusieurs paramètres physiques découplés du milieu liquide au

travers d'une onde évanescente. Nous pouvons dimensionner le capteur afin d'étendre la profondeur de pénétration de cette onde sur la hauteur du canal. C'est l'approche que nous proposons pour mesurer la capture de bioéléments en surface de goutte sur la hauteur du canal.

3.2.1.2. Détection à ondes de Lamb en milieu liquide

Les capteurs à ondes de Lamb sont composés d'une fine membrane vibrante d'épaisseur inférieure à la profondeur de pénétration d'une onde de Rayleigh. L'onde de Lamb est assimilable à deux ondes de Rayleigh évoluant de chaque côté de la membrane. Les modes principaux de vibration sont de type symétrique (S_0) ou antisymétrique (A_0) (Figure 80).



Figure 80 – Modes de vibration d'une onde de Lamb : a) antisymétrique (A₀) et b) symétriques (S₀). Tiré de [25].

Dans le cas des capteurs classiques en milieu liquide, les ondes de Lamb provoquent une onde évanescente traversant la bio interface accolée à la membrane puis le liquide sur une profondeur δ . Le mode symétrique (S₀) est sensible aux propriétés de l'interface biologique au niveau de la membrane (viscoélasticité, épaisseur...). Le mode antisymétrique (A₀) pénètre plus profondément dans le liquide. Il est donc aussi sensible à ses propriétés (viscosité, densité...). Le mode A₀ pourrait convenir pour mesurer les changements en surface de goutte sur la hauteur du canal.

3.2.1.3. Dimensionnement d'un capteur à onde de Lamb dédié aux gouttes

Nous définissons les dimensions du capteur acoustique en fonction des dimensions des gouttes et des canaux ainsi que des propriétés des fluides (Figure 81). Prenons le cas d'un capteur à onde de Lamb avec une membrane circulaire de rayon a et d'épaisseur e. Elle doit résister à la différence de pression entre le liquide au contact de la membrane et la pression de l'air extérieur exercée sur l'autre côté de la membrane. Une différence de pression $\Delta P = 1$ bar = 0,1 MPa est possible durant nos expérimentations. La contrainte maximale que subit cette membrane est une contrainte radiale à ses bords :

$$\sigma_{\max} = \frac{3a^2}{4e^2}\Delta P$$

Nous fixons la contrainte maximale à ne pas dépasser selon les valeurs de résistance mécanique du silicium auquel nous appliquons un coefficient de sécurité : $\sigma_{max} < 500 MPa$. Les dimensions de la membrane sont donc exprimées ainsi :

$$\frac{3}{4} \left(\frac{a}{e}\right)^2 10^5 < 5.10^8$$
$$\left(\frac{a}{e}\right)^2 < \frac{20}{3} \cdot 10^3$$
$$\frac{a}{e} < \sim 80$$

Notre équipe a développé des capteurs à ondes de Lamb avec une membrane carrée d'épaisseur de 15 μ m, de 8mm² de côté et de pénétration d'onde évanescente dans l'eau de 63,7 μ m [22], [25]. La profondeur de pénétration est proche de la profondeur de nos canaux (h = 50 μ m) et cette dimension de membrane est suffisamment résistante pour supporter des injections liquide. Nous fixons l'épaisseur de la membrane à e=15 μ m. Pour une pression P = 1 bar dans la chambre et une membrane d'épaisseur e = 15 μ m, une membrane de diamètre maximum 2,4 mm devrait résister.



Figure 81 – Dimension de la membrane et des électrodes de détections (IDT) d'un capteur à onde de Lamb.

La profondeur des canaux fluidiques utilisés pour générer des gouttes dans ce projet est typiquement de $h = 50 \mu m$. C'est la profondeur à laquelle l'onde évanescente doit pénétrer si l'on veut mesurer l'influence de la capture d'éléments biologiques sur la réponse acoustique du système. Cette profondeur est calculée suivant l'équation suivante :

$$\delta = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{1}{\sqrt{1 - \left(\frac{\nu_{A0}}{c_w}\right)^2}}$$

Considérons v_{A0} << c_w. L'équation se simplifie ainsi :

$$\delta = \frac{\lambda}{2\pi}$$
$$\lambda = 2\pi\delta$$

Pour une profondeur de pénétration raisonnable δ = 40 µm, la longueur d'onde de l'onde de Lamb vaut λ = 250 µm. L'onde acoustique est générée par des électrodes à peignes interdigités (IDT) dont l'espacement entre deux dents du peigne polarisées avec des tensions de signes opposés est environ λ /2. Le nombre de période *n* de cette structure permet d'augmenter le signal de génération et d'améliorer la détection mais il faut un minimum de 3 paires de doigts pour générer une onde. La longueur occupée par un couple de peignes utilisés l'un en génération et l'autre en détection est donc :

$$L_{peignes} = 2. n. \lambda$$

 $L_{peignes}(n = 3) = 1,5 mm$

Pour une membrane de diamètre 2,4 mm, cela laisse environ 0,9 mm de zone de détection entre les électrodes. Avec ces paramètres, la surface de la chambre de détection où les gouttes sont organisées en rang serré doit faire au minimum 1 mm².

Nous pouvons maintenant calculer les propriétés de l'onde de Lamb en fonction des dimensions du système que nous venons de fixer. La vitesse du son dans l'eau (ondes longitudinales) est $C_w = 1480$ m/s. Les huiles présentent des valeurs proches. La vitesse de phase de l'onde de Lamb en mode A_0 d'un liquide est donnée par :

$$V_{A0} = \frac{2\pi e}{\lambda} \sqrt{\frac{E}{12\rho(1-\nu^2)}}$$

Pour le silicium : module de Young E = 100 Gpa = 10^{11} Pa, coefficient de poisson υ = 0,42, densité ρ = 2,34 g/cm³ = 2340kg/m³.

$$V_{A0} = \frac{2.\pi \cdot 15.10^{-6}}{250.10^{-6}} \sqrt{\frac{10^{11}}{12 \cdot 2340(1 - 0.42^2)}} = 784 \text{ m/s}$$

L'hypothèse faite plus haut ($v_{A0} \ll c_w$) pour un dimensionnement rapide n'est pas parfaitement vérifiée et nous recalculons la profondeur de pénétration de l'onde évanescente :

$$\delta = \frac{250.10^{-6}}{2\pi} \frac{1}{\sqrt{1 - \left(\frac{784}{1480}\right)^2}} = 47\mu m$$

La profondeur de pénétration réelle est donc très proche de la hauteur de canal visée. La fréquence principale de l'onde Lamb à laquelle fonctionnera le système acoustique est donc :

$$f_0 = \frac{V_{A0}}{\lambda} = \frac{784}{250.10^{-6}} = 3,1MHz$$

La fréquence principale et la vitesse de phase de l'onde de Lamb sont cohérentes avec les travaux précédemment réalisés dans notre équipe (ex : $e = 2 \mu m$, $f_{eau} = 9,87$ [25]).

3.2.2. Intérêt des gouttes comme surface de capture

Nous avons choisi d'utiliser les gouttes comme interface de détection pour assurer la réutilisation des capteurs. Elles offrent d'autres avantages vis-à-vis de la capture des molécules. La monodispersité des gouttes permet un arrangement en rangs serrés avec une organisation de forme hexagonale. Cette disposition maximise la surface occupée par les gouttes et accroit la surface d'interaction. Dans cette partie nous étudions la géométrie des gouttes liée à leur confinement. A partir de cela nous pouvons discuter des conditions d'organisation des gouttes en rangs serrés et du gain que cela entraine sur la surface de détection.

3.2.2.1. Dimensions d'une goutte confinée entre deux plaques

Les gouttes que nous générons sont principalement de diamètre plus élevé que la hauteur des canaux (2R > h). Il en résulte un écrasement de la goutte entre les parois, sous forme de pancake, conditionné par l'angle de contact de la goutte, la hauteur du canal et le volume de la goutte (Figure 82).



Figure 82 – Dimension d'une goutte écrasée entre deux plaques. Adapté de [62].

La mesure de l'angle de contact de la goutte dans les dispositifs n'est pas possible. Pour le déterminer, nous cherchons à exprimer l'angle en fonction de données mesurables au microscope. Le diamètre du disque 2R formé par la goutte en contact avec les parois ou la largeur x de la zone courbée de la goutte sont mesurables en microscopie.

Selon les propriétés géométriques d'une goutte ayant le même angle de contact sur les deux plans l'entourant, nous déterminons les relations suivantes [62] :

$$\varphi=\theta-\frac{\pi}{2}$$

$$r\sin(\varphi) = -r\cos(\theta) = h/2$$
$$r\cos(\varphi) = r\sin(\theta) = d = \frac{h}{2\tan(\varphi)}$$
$$d = -\frac{h}{2}\tan(\theta) = -\frac{h}{2}\frac{\sin(\theta)}{\cos(\theta)}$$

Le rayon *a* du disque en contact est exprimé en fonction du rayon de la goutte écrasée R, du rayon de courbure r de la goutte et de la position d du centre de ce rayon :

a = R - r + d

En utilisant les relations citées plus haut on obtient:

$$-r = \frac{h}{2\cos(\theta)}$$
; $d = r\sin(\theta) \Rightarrow d = \frac{-h}{2\cos(\theta)}\sin(\theta)$

Nous pouvons exprimer *a* en fonction de l'angle de contact θ :

$$a = R + \frac{h}{2\cos(\theta)} - \frac{h}{2\cos(\theta)}\sin(\theta) = R + \frac{h}{2}\left(\frac{1 - \sin(\theta)}{\cos(\theta)}\right)$$

Nous désirons exprimer l'angle de contact en fonction de la largeur de la couronne *x* :

$$x = R - a = R - \left(R + \frac{h}{2}\left(\frac{1 - \sin(\theta)}{\cos(\theta)}\right)\right)$$
$$x = -\frac{h}{2}\left(\frac{1 - \sin(\theta)}{\cos(\theta)}\right)$$
$$x = \frac{h}{2}\tan\left(\frac{\theta}{2} - \frac{\pi}{4}\right)$$

Ce qui nous permet d'exprimer θ en fonction de la largeur de la courbure x et de la profondeur des canaux *h* :

$$\theta = 2 \operatorname{atan}\left(\frac{2x}{h}\right) + \frac{\pi}{2}$$

Le volume de la goutte est calculé en découpant cette dernière en disque sur la hauteur puis en additionnant leurs aires. C'est équivalent à l'intégration de disques de rayon R' sur la hauteur de la goutte [62] :

$$V = 2 \int_0^{h/2} \pi R'^2 dz$$

Avec $R' = (R - r) + \sqrt{r^2 - z^2}$.

Le volume est ainsi donné par :

$$V = 2\pi \left(\frac{h}{2} (R^2 - 2rR + 2r^2) - \frac{1}{3} \left(\frac{h}{2}\right)^3 + (R - r)r^2 \left(\theta - \frac{\pi}{2} + \frac{\sin(2\theta - \pi)}{2}\right) \right)$$

Il est intéressant de connaitre la surface en contact avec le liquide entourant la goutte. Cela équivaut à la surface de la zone courbée de la goutte. Cette surface est obtenue en intégrant les périmètres des disques découpant la goutte le long de la courbe *dl*, avec :

$$dl = \sqrt{dy^2 + dz^2} = dz \sqrt{1 + \left(\frac{d\sqrt{r^2 - z^2}}{dz}\right)^2}$$

On a ainsi :

$$Sg = \int 2\pi R' dl = 2 \int_0^{h/2} 2\pi R' \frac{dl}{dz} dz = 2 \int_0^{h/2} 2\pi R' \sqrt{1 + \frac{z^2}{r^2 - z^2}} dz$$

Soit, après calcul :

$$Sg = -\frac{2\pi h}{\cos(\theta)} \left(\left(R + \frac{h}{2\cos(\theta)} \right) \left(\theta - \frac{\pi}{2} \right) + \frac{h}{2} \right)$$

Cette surface est utile pour évaluer les interactions de capture de molécule en surface des gouttes.

3.2.2.2. Surface de détection des gouttes

Nous souhaitons comparer la surface en contact avec le liquide pour des gouttes organisées en rangs serrés et la surface au sol qu'elle occupe. Cela nous permet de calculer le gain en surface entre un capteur solide plan classique et un capteur à base de gouttes en volume (Figure 83).

Nous commençons par calculer le gain pour des gouttes de rayon écrasé R, approximés par le cylindre dans lequel elles sont inscrites. C'est équivalent à des gouttes présentant un angle de contact droit θ = 90° et un rayon *r* infini.



Figure 83 – Surfaces de détection en fond de canal et sur les gouttes approximées par un cylindre.

S1 est la surface occupée au sol d'un capteur plan et sa surface en contact avec le liquide. S2 est la surface occupée au sol par les cylindres approximant les gouttes. S3 est la surface en contact avec le liquide des gouttes approximées.

$$S1 = \sqrt{3} \cdot R^2$$
$$S2 = \frac{R^2 \pi}{2}$$
$$S3 = \pi \cdot R \cdot h$$

La fraction volumique de la surface occupée pour des gouttes S2 sur la surface au sol S1 est, quels que soient h ou R, approximativement :

$$\frac{S2}{S1} = \Phi = \frac{\pi}{2\sqrt{3}} \sim 0.9$$

Nous pouvons calculer le gain de surface de détection Gs approximé pour les gouttes :

Gain de surface de détection :
$$Gs = \frac{S3}{S1} = \frac{\pi rh}{R^2\sqrt{3}} = \frac{\pi h}{R\sqrt{3}} \sim \alpha \frac{h}{R}$$

Nous fixons la hauteur du canal à $h = 50 \mu m$. Regardons le gain de surface pour quelques valeurs significative de R et h (Tableau 8). Nous restons dans le cas où la goutte touche les parois. Pour h = 2R,

la goutte peut être de forme sphérique pour θ = 180°. C'est aussi le rapport à partir duquel la goutte risque de se détacher des parois et tente de retrouver une forme sphérique. Pour h = R, la goutte est de taille moyenne égale à la largeur des canaux de génération que nous utilisons.

Taille de goutte	Large	Moyenne	Minimale
Hauteur de canal et rayon de goutte [µm]	h = R/2	h = R	h = 2R
Diamètre du cylindre équivalent D = 2.r [µm] pour h = 50µm	$D = 200 \mu m$	$D = 100 \mu m$	$D = 50 \ \mu m$
Gain de surface pour les gouttes par rapport à la surface du canal	$Gs = \frac{\pi}{2\sqrt{3}} \sim 0.9$	$Gs = \frac{\pi}{\sqrt{3}} \sim 1.8$	$Gs = \frac{2\pi}{\sqrt{3}} \sim 3.6$

Tableau 8 – Gain de la surface de détection en fonction du rayon de goutte et de la hauteur de canal.

Cas particulier, pour des gouttes sphériques touchant les parois, nous retrouvons : h = 2R.

$$Ss = 4\pi . R^{2}/2$$

$$Gs_{sphère} = \frac{Ss}{S1} = \frac{4\pi . R^{2}}{2R^{2}\sqrt{3}} = \frac{2\pi}{\sqrt{3}} = Gs(h = 2R)$$

Calculons maintenant le gain de surface réel pour une goutte. Pour $\theta \in \left[\frac{\pi}{2}; \pi\right]$ nous connaissons déjà la surface en contact avec le liquide environnant :

$$S(\theta) = -\frac{2\pi h}{\cos(\theta)} \left(\left(R + \frac{h}{2\cos(\theta)} \right) \left(\theta - \frac{\pi}{2} \right) + \frac{h}{2} \right)$$

Nous pouvons alors calculer le gain en surface en fonction de θ (Figure 84):

$$G(\theta) = \frac{Sg}{S1} = -\frac{\pi h}{R^2 \cos(\theta) \sqrt{3}} \left(\left(R + \frac{h}{2\cos(\theta)} \right) \left(\theta - \frac{\pi}{2} \right) + \frac{h}{2} \right)$$



Figure 84 – Gain Gs en fonction de l'angle de contact θ pour : (bleu) h=2R, (rouge) h=R, (vert) h=R/2.

Pour une taille de goute donnée, le gain en surface est en général plus intéressant pour un rayon de courbure r important, donc pour θ tendant vers 180°. Lorsque le ratio des dimensions est h/R=2, le gain maximal est atteint. Le gain surfacique diminue avec h/r. Le gain devient défavorable lorsque le diamètre des gouttes dépasse le double de la hauteur du canal h/R ~>= 2. Le gain approximatif calculé pour une goutte cylindrique équivaut bien à G(θ) pour θ = 90°. Pour h/R = 2, G(θ) présente une réponse particulière sur l'intervalle $\left[\frac{\pi}{2}; \pi\right]$. Elle vaut G_{max} ~ 3,6 pour θ =90° (cylindre) et θ =180° (sphère). Archimède a montré que la surface d'une sphère est égale à la surface latérale de son cylindre circonscrit dans « De la sphère et du cylindre » (c. 225 av. J.-C.). Pour maximiser le gain en surface, il faut se rapprocher du ratio de dimensions h/R=2=D. Dans notre cas les gouttes doivent présenter un diamètre écrasé D = 50 µm pour une profondeur de canal h = 50 µm. L'angle de contact θ étant difficile à manier, nous travaillerons sur la taille des gouttes.

3.2.2.3. Écoulement dans un réseau de goutte

Dans un biocapteur, l'échantillon contenant les molécules d'intérêt doit être amené en contact des biorécepteurs de l'interface de détection. Nous nous intéressons aux capteurs faisant s'écouler l'échantillon sur la surface de détection. Les phénomènes d'advection participent au transport des molécules par le flux relativement au profil et aux vitesses de l'écoulement. Les phénomènes de diffusions participent à l'approche des molécules vers la surface de détection par leur déplacement dans la section du canal. Ces deux phénomènes contribuent à la capture des molécules sur cette surface. Le nombre de Péclet est le rapport entre les temps de déplacements d'une molécule liés aux phénomènes d'advection et de diffusion sur une longueur l. Nous opérons une approche similaire aux travaux de Squires et al. [136] en utilisant ce nombre pour évaluer la capture de molécules sur une surface de détection en rapport avec les dimensions des canaux. Dans notre cas les canaux sont situés dans l'espace interstitiel des gouttes.



Figure 85 – Course d'une particule dans un canal proche d'une surface de capture (en vert) sous l'influence de forces d'advection et de dispersion.

La configuration standard des capteurs présente une surface active plane dans un canal rectangulaire (L, w et h). Nous utilisons la surface de gouttes organisées en rang serré comme surface de détection. Nous considérons l'écoulement dans le réseau de gouttes comme un écoulement dans n canaux de dimensions (L, w_a et h_a) Nous voulons déterminer quelle longueur de canal (l) le liquide doit traverser pour qu'une molécule rencontre la surface de détection, c'est-à-dire, lorsque ses déplacements dus à la diffusion et à la convection s'équilibrent (Pe =1). En évaluant cette longueur pour un capteur plan et un capteur utilisant des gouttes, nous voulons comparer leur efficacité de capture potentielle.

Considérons un réseau de gouttes organisées occupant la même surface que le capteur (L et w). Nous pouvons assimiler l'écoulement dans le réseau de goutte (Figure 86) à un écoulement dans des canaux rectangulaires rectilignes parallèles dont la longueur est proche de L (Figure 87). Leur nombre est déterminable par le nombre par les lignes gouttes entre lesquels se fait la circulation (n = nb_{lignes}-1).



Figure 86 – Simulations 2D sous Comsol d'écoulements entre quatre lignes de gouttes organisées équivalent à trois canaux rectangulaires : a) débits et b) lignes de champs.

Pour un réseau de goutte, l'écoulement de débit Q, qui s'applique à toute la surface d'un capteur plan, est divisé dans les écoulements interstitiels donc par le nombre n de canaux équivalents. La hauteur de la chambre h devient le paramètre de largeur de la zone de détection du canal équivalent (w_a =h). L'épaisseur du canal de détection h_a dépend de l'espace interstitiel qui lui est dépendant du rayon de courbure des gouttes r.



Figure 87 – Surfaces de détection (vert) pour une chambre de détection de dimension L x w x h : a) capteur plan (L x W) b) capteur à gouttes : écoulement interstitiel et c) son modèle équivalent.

Le flux est réparti sur les deux bords du canal équivalent car les surfaces des gouttes entourant le canal interstitiel sont des interfaces de détection. Les dimensions des canaux équivalents sont faibles par rapport à un capteur plan ($h_a < h$ et $w_a < h$) ce qui est favorable aux phénomènes de diffusion. Pour des gouttes de dimension faible devant la largeur du canal, donc (R << w), les écoulements sont répartis dans de nombreux canaux q=Q/n avec n=w/2R = w/d. Il est préférable d'avoir une chambre de grandes dimensions (w, h et L) avec des gouttes de petite taille (R ou d) pour maximiser la capture.

Pour des capteurs plans et à gouttes occupant le même volume de chambre (L x w x h) on va utiliser des expressions simples des temps typiques d'advection et de diffusion :

temps d'advection :
$$t_c = \frac{l}{\overline{v}} = \frac{lhw}{Q}$$

temps de diffusion : $t_d = \frac{h^2}{D}$

Nous pouvons alors déterminer l lorsque il y a égalité des temps de diffusion et d'advection (Pe=1) pour une molécule donnée:

$$t_c = t_d$$
$$\frac{lhw}{Q} = \frac{h^2}{D}$$
$$l = \frac{Qh}{Dw}$$

Dans le canal d'un capteur plan équivalent à la chambre :

$$l_p = \frac{Qh}{Dw}$$

Dans un canal équivalent d'un capteur à goutte répartis en n exemplaires dans la chambre :

$$l_{g} = \frac{qh_{a}}{Dw_{a}} = \frac{qh_{a}}{Dh}$$

Le rapport des longueurs est :

$$\frac{l_{\rm p}}{l_{\rm g}} = \frac{\frac{Qh}{Dw}}{\frac{qh_a}{Dh}} = \frac{h^2}{h_a w} \frac{Q}{q}$$

Pour comprendre la signification de ce résultat étudions deux cas typiques distincts : tout d'abord si nous imposons le même débit volumique dans les deux types de capteur et ensuite si nous imposons la même vitesse d'écoulement.

Si le même débit Q traverse la chambre de détection du capteur plan et du capteur à goutte :

$$q = \frac{Q}{n}$$

Alors

$$\frac{l_{\rm p}}{l_{\rm g}} = \frac{h^2}{h_a w} n$$

Or

$$nd = w \Rightarrow \frac{n}{w} = \frac{1}{d}$$

Donc

$$\frac{l_{p}}{l_{g}} = \frac{h^{2}}{dh_{a}} \sim \frac{h}{h_{a}} (pour \ d \sim h)$$

Calculons maintenant ce ratio pour une hauteur de chambre $h = 50 \mu m$ et des gouttes de diamètre $d = 100 \mu m$.L'espace des canaux équivalent pour les goutes est estimé à $h_a \sim 1 \mu m$. Le ratio des longueurs vaut alors 25. Pour ces dimensions, la molécule doit, avant de rentrer en contact de la surface de détection, parcourir une plus grande longueur de canal dans le capteur plan que dans le réseau de goutte. Le rapport s'améliore en faveur du capteur à goutte en augmentant la hauteur de chambre et en diminuant le diamètre des gouttes ($d_{mini} = h$).

Si les mêmes vitesses moyennes s'écoulent dans les canaux des deux types de capteur :

$$v_a = v$$
$$\frac{q}{h_a h} = \frac{Q}{hw}$$
$$\frac{Q}{q} = \frac{w}{h_a}$$

Le ratio des distances est alors :

$$\frac{l_{p}}{l_{g}} = \frac{h^{2}}{h_{a}w}\frac{Q}{q} = \frac{h^{2}}{h_{a}w}\frac{w}{h_{a}}$$
$$\frac{l_{p}}{l_{g}} = \left(\frac{h}{h_{a}}\right)^{2}$$

En prenant le même exemple que précédemment, soit h = 50 μ m et h_a ~ 1 μ m, on trouve :

$$\frac{l_{\rm p}}{l_{\rm g}} = (50)^2 = 2500$$

Pour des vitesses moyennes équivalentes dans les canaux du capteur plans et ceux entre les gouttes, le rapport des longueurs est nettement en faveur des gouttes. Les molécules devraient rentrer en contact avec le bord des gouttes beaucoup plus rapidement que pour un capteur plan dans la même dimension de chambre. Le rapport augmente au carré avec la taille de la chambre.

En conclusion, on voit qu'un capteur employant un réseau de goutte 2D devrait permettre d'augmenter la surface de détection et de diminuer la longueur de capture des molécules. C'est d'autant plus favorable que la chambre de détection est haute et que le diamètre des gouttes s'approche de cette hauteur. Si nous voulons encore augmenter ces grandeurs, il faudrait effectuer un arrangement serré de gouttes sphérique dans les canaux de diamètre très inférieur à la hauteur du canal à la manière de colonnes de filtration.

Nous venons de déterminer les dimensions et propriétés utiles à la conception d'un capteur acoustique employant des gouttes comme surface de détection. Le type d'ondes acoustiques et la technologie du capteur acoustique associé ont été choisis et dimensionnés de manière à détecter des modifications de propriétés physiques en surface des gouttes. Les capteurs à ondes de Lamb ont été choisis pour leur capacité à effectuer des mesures en milieu liquide à l'aide d'une onde évanescente. Nous nous sommes aussi intéressés à ce que les gouttes peuvent apporter en tant que surface de détection. Elles permettent un gain de surface de détection par rapport à un capteur plan de même aire projetée pour une organisation en rangs serrés et pour des dimensionnalités particulières (ratio du diamètre de goutte sur la hauteur du canal). L'aspect du flux de molécules lié à la capture sur la biointerface a été traité pour un capteur plan classique. Cela nous a permis de proposer une approche appliquée aux gouttes pour déterminer les meilleures conditions de détection.

A partir de ces informations nous pouvons définir les fonctionnalités nécessaires au développement d'un dispositif microfluidique diphasique permettant la détection acoustique d'un

bioélément capturé en surface de gouttes (Figure 88). Le dispositif doit permettre (1) la génération de gouttes monodisperses et (2) la fonctionnalisation de leur surface par une couche de biorécepteurs. Les gouttes doivent être (3) amenées et stockées dans une chambre de détection. Le dispositif doit assurer l'organisation des gouttes en rangs serrés dans la zone de détection. Il doit permettre l'injection (4) d'un échantillon à analyser dans les gouttes et maximiser les chances de capture à leur surface. La détection de la capture des analytes sur les gouttes est (5) mesurée par méthode acoustique. La technologie acoustique à mettre en œuvre doit être compatible avec une détection en milieu liquide des molécules capturées en surface de gouttes.



Figure 88 – Fonctions principales à dévelloper pour la conception du capteur acoustofluidique.

3.3. <u>Génération de gouttes</u>

Comme nous venons de le voir, pour maximiser la surface de détection, les gouttes doivent être organisées en rangs serrés. Avec des gouttes monodisperses, cette condition est atteinte lorsque la fraction volumique s'approche de 0,9. Le rapprochement des gouttes est réalisé souvent à l'aide de structures de drainage mais il est aussi possible de générer les gouttes directement de manière rapprochée. Pour les modes de génération dripping, squeezing, et jetting, les structures de génération en T produisent des gouttes monodisperses de tailles et distances qui varient selon divers paramètres (dimensions des structures, débits, angle de contact...). Le mode balloon permet lui de générer des gouttes monodisperses de taille fixe à distance variable commandée par le débit de la phase continue. Nous cherchons en conséquence à reproduire ce mode pour faciliter l'organisation des gouttes dès la génération.

3.3.1. <u>Dimensionnement</u>

Nous avons dimensionné le système de génération de la jonction en T de nos dispositifs selon les travaux de N. Tarchichi pour reproduire le mode balloon (Tableau 9). Leurs dimensions permettent une génération de gouttes en mode balloon avec un gain de surface de détection G intéressant (entre h=r=D/2 et h=2r=D). La profondeur h de la jonction en T et des canaux fluidiques est fixée à 50 µm. La largeur du canal de la phase continue wc est fixée à 100 µm. La largeur du canal de la phase dispersée wd varie sur 4 valeurs : 10, 20, 30 et 40 µm.

	Vitesse vc	Vitesse vd	Diamètre gouttes D
Dripping	8 - 55 cm/s 24 - 165 μL/min	1.5 cm/s 2,07 μL/min	110-60 µm
Balloon	10 - 60 cm/s 30 - 180 μL/min	0,04 - 0,07 cm/s 0,55 – 0,97 μL/min	81 µm

Tableau 9 – Paramètres et résultats de génération de gouttes pour une jonction en T de dimensions : Wc = 100 μm , $Wd = 20\mu m$, $h=46\mu m$ [23].

Une première version de puce microfluidique est conçue selon nos standards dimensionnels (Figure 89). Elle vise à étudier la génération de gouttes et leur organisation dans une chambre de détection. Deux paires de jonctions en T sont placées sur les puces avec les valeurs de wd (10-20 et 30-40) pour limiter le nombre de variantes de puces par substrat. Les jonctions sont reliées à un réservoir circulaire de 5 mm de diamètre aux entrées évasées afin d'éviter la création de zones mortes ou de recirculation. Les ouvertures d'alimentations sont standardisées à 1,5 mm de diamètre pour se

rapprocher des dimensions des ouvertures du joint du connecteur fluidique. Des règles aux graduations de 10 et 100 µm sont placées autour de la jonction en T pour s'assurer des calibrations d'échelles lors des acquisitions.



Figure 89 - a) Jonction en T avec wd = $20 \mu m$ et wc = $100 \mu m$. b) Puce standardisée avec jonctions en T.

3.3.2. <u>Fabrication</u>

Les dispositifs sont réalisés par technologie de microfabrication en salle blanche sur substrats 4 pouces de silicium de 500µm d'épaisseur et de verre de 1mm d'épaisseur. La fabrication utilise deux masques correspondants à la gravure et aux ouvertures (Figure 90). Les canaux fluidiques sont réalisés sur silicium par gravure plasma DRIE sur 50 µm. Les ouvertures d'accès fluidiques sont réalisés par gravure DRIE traversante dans le silicium. L'étanchéité est assurée par collage anodique du substrat de verre sur le substrat de silicium structuré. Les puces sont ensuite découpées par une scie d'épaisseur 300 µm. Elles sont alors prêtes à l'emploi.



Figure 90 – Puce n° 1 : a) Masques 5" pour gravure b) des canaux et c) des ouvertures d'alimentation.

Les gravures sont réalisées sur machine plasma DRIE ICP (STPS Rapier). Elle emploie le procédé Bosh qui structure en profondeur le silicium par une gravure en pas à pas. Le procédé utilise une alimentation RF et des paramètres conduisant à une gravure d'environ 1 µm/pas et de 11 µm/min. Sans couche d'arrêt de gravure (ex : SiO₂ pour les SOI), la profondeur de gravure est réglée par le nombre de pas gravés. La vitesse de gravure par pas est calculée en mesurant la profondeur atteinte en cours de gravure avec un profilomètre. La vitesse de gravure varie peu pour la gravure des canaux sur 50 µm. Pour une gravure traversante sur 500 µm, elle varie suffisamment (baisse de 11,5 à 1,07 µm/pas) pour devoir être réactualisée plusieurs fois au cours de la gravure.

L'homogénéité de la gravure sur le substrat diminue avec la surface à graver. La vitesse de gravure peut-être jusqu'à 5% plus faible sur les bords. Pour assurer une bonne homogénéité de gravure sur les puces, nous les concentrons au centre du substrat et n'en produisons que 8 par substrat. La gravure des ouvertures d'alimentations est effectuée par technique de détourage.

Le choix de l'ordre de fabrication est lié au procédé de gravure. Dans la chambre de gravure DRIE, les substrats sont maintenus par contact électrostatique sur le support de refroidissement. La gravure par plasma augmente la température à la surface du substrat. Elle est maintenue à 0°C pour empêcher la résine de protection de se détériorer et maintenir une bonne qualité de gravure. La qualité du maintien du substrat sur son support est mesurée par de l'hélium fuitant sous le substrat. Un substrat troué n'est donc pas directement utilisable dans la chambre de gravure. Lors d'une gravure traversante, il faut coller le substrat à graver sur un substrat plein pour assurer une fuite d'hélium correcte. Nous avons employé plusieurs méthodes de collage au cours de nos travaux. Elles ont une importance sur le choix des procédés et sur les résultats expérimentaux. La méthode usuelle consiste à utiliser une huile de lubrification (Fomblin) déposée entre les substrat gravé mais la température reste plus élevée que par contact direct. La gravure est donc de moins bonne qualité. On préférera graver les ouvertures traversantes sur substrat collé dans la seconde étape de fabrication et réserver la gravure avec refroidissement direct pour la réalisation des canaux.

Les canaux doivent être protégés pour la gravure des ouvertures traversantes. La méthode la plus simple devrait être de graver ces ouvertures sur la face arrière du substrat où sont gravés les canaux. Au moment où la gravure des ouvertures d'accès débouche sur les canaux, le plasma s'y infiltre et détériore les canaux. Il est donc nécessaire de les protéger. L'oxydation des canaux rajouterait une longue étape de croissance de SiO₂ dans un four haute température puis une étape de désoxydation HF pour libérer l'accès des ouvertures. Nous choisissons de protéger les canaux par dépôt de résine épaisse par projection (spray coating).

3.3.2.1. Procédé de fabrication puce n°1 et essais préliminaires

Les premières gravures DRIE des canaux montraient une forte rugosité visible en fond de canal sur la totalité de la surface gravée (Figure 91). En plus de la rugosité, on distingue des impacts de 10 µm de diamètres parsemant les fonds de canaux. Ils sont susceptibles de créer des points d'ancrage pour les gouttes. Ils sont causés par l'impact à la surface d'ions provenant du plasma gravure.



Figure 91 – Fonds de canaux observés au microscope. Echelle : a) 50μm b) 500 μm c) 2000 μm.

A la suite de ces résultats, les paramètres de gravure ont été adaptés pour obtenir un fond de gravure peu rugueux et homogène, compatible avec une utilisation en microfluidique diphasique (Figure 92). La gravure s'opère à des fréquences plus basses de génération du plasma (mode LF). Les pas de gravure sont plus importants : 1,5 µm/pas. La gravure dans la réduction de la jonction présente un angle rentrant de 88°. La gravure sur le bord des canaux ne se détériore pas sur la profondeur en mode LF.



Figure 92 – Imagerie MEB prise au niveau de la jonction en T pour des gravures : a) RF et b) LF.

La réalisation des ouvertures d'accès fluidique s'effectue par gravure traversante DRIE. Les canaux sont protégés par un dépôt épais (9 μ m +/- 1 μ m) de résine 9260 par pulvérisation. La lithographie des ouvertures d'accès est réalisée sur la même résine. Après gravure, l'observation au microscope montre des défauts sur les petites structures (graduations) et sur les bords des canaux (Figure 93). La production des dispositifs est menée à terme avec la fermeture des canaux par substrat de verre en collage anodique puis la découpe à la scie.



Figure 93 – *Résine de protection (9μm +/- 1μm de 9260) projetée sur les canaux : a) Lithographie des ouvertures d'accès et b) protection de la jonction en T. c) Gravures non désirés à travers la résine de protection.*

Les dispositifs sont montés sur le banc expérimental pour des essais préliminaires. Les paramètres expérimentaux utilisés pour la génération en mode balloon sont reproduits. Les débits sont appliqués sur les différentes phases par des pousse-seringues. Les émulsions sont produites sans l'utilisation de tensioactifs. La phase aqueuse est constituée d'EDI. L'autre phase emploie une huile silicone (704 - Dow Corning).

Aucun mode de génération identifié n'a pu être mis en œuvre. Les gouttes sont générées sur le bord du canal sans s'en détacher et glissent le long du canal jusqu'à la chambre de stockage. Les gouttes ne sont pas monodisperses et ne sont pas générées à fréquences fixes (Figure 94).



Figure 94 – Défaut de génération sur les puces gravées avec une protection des canaux par résine projetée.

L'explication de l'échec réside dans la structure des canaux. Nous avons observé au MEB un substrat témoin dont la production s'est arrêtée après la gravure des ouvertures d'accès. Les angles des bordures sont érodés par les ions du plasma. On observe la gravure de sillons profonds au pied des bords de canaux (Figure 95). L'huile peut s'y infiltrer et servir de rail de guidage, ce qui peut expliquer le maintien des gouttes sur la bordure.

Nous supposons que la gravure sur 500 µm a fini par épuiser la résine aux localisations mal gravées. La résine n'a pas été déposée par projection de manière suffisamment uniforme et le recuit a surement provoqué une rétractation de la résine au niveau des bords et du fond des canaux. La protection par projection n'est donc pas adaptée à des gravures aussi longues (Figure 95).



Figure 95 – a) Imagerie MEB de la jonction en T mal protégée. b) Forme de résine probable après recuit.

3.3.2.2. Procédé de fabrication n°2

Nous inversons les étapes de gravures. Les ouvertures d'accès sont d'abord réalisées en gravure traversante. Les canaux microfluidiques sont ensuite gravés avec un masque réalisé en résine projetée (Figure 96). Le reste du procédé est identique. Les motifs développés dans la résine projetée sont beaucoup plus mince que pour le premier procédé. Il faut préparer la surface du silicium avant le dépôt de la résine pour garantir une bonne adhérence. Une étape de déshydratation au four est ajoutée avant l'enduction du Ti prime précédant la projection de résine.



Figure 96 – Résine projetée après lithographie des canaux fluidiques.
Nous réalisons une étape d'inspection au MEB après les étapes de gravure. La gravure des canaux est convenable. La gravure au niveau des bords des ouvertures d'accès fluidiques présente des défauts de gravure similaires à ceux obtenus dans le procédé n°1 (Figure 97) mais la localisation de ces défauts ne gêne en rien à l'utilisation des dispositifs.



Figure 97 – Imagerie MEB après les gravures DRIE.

Comme pour le procédé n°1 les puces sont capotées par un substrat de verre de 1 mm d'épais par collage anodique. Les puces sont finalement séparées par une découpe à la scie pour être utilisables (Figure 98).



Figure 98 – Photos des dispositifs sur puces prêt à l'emploi après découpe.

3.3.3. <u>Tests de génération de gouttes</u>

Pour le reste de ces expérimentations, la génération de gouttes d'huile dans l'eau est présentée dans une jonction en T avec une largeur de canal de la phase dispersée wd = $20 \mu m$. La gamme de dimensions des gouttes produites par cette structure est adaptée pour le reste de nos recherches.

Nous cherchons à reproduire la génération en mode balloon. Nous nous plaçons dans un premier temps dans des conditions expérimentales semblables aux travaux de N. Tarchichi. Les dispositifs génèrent des gouttes d'huile silicone dans de l'eau EDI sans tensioactif. Les débits sont appliqués par des pousse-seringues. L'huile est contenue dans une seringue 2,5 mL (Terumo ID = 9 mm). L'eau est contenue dans une seringue 10 mL (BD LuerLock ID = 14.427 mm) L'observation de la génération est réalisée à l'aide des caméras et microscopes de de notre banc expérimental (Figure 99).



Figure 99 – a) Banc expérimental et b) puce en mode de génération.

3.3.3.1. Génération : Huile de silicone / EDI

Nous avons tenté de générer des gouttes d'huile de silicone dans de l'eau à des débits compatibles avec les générations en mode balloon et dripping : $Q_{EDI} = 1$ à 100 µL/min et $Q_{huile} = 1$ µL/min (Tableau 9). Aucun mode de génération propre n'a été identifié. La génération est perturbée par des rails d'huile déposés lors du passage des gouttes dans les coins des canaux. La goutte est en permanence en contact avec le rail proche de la jonction de la génération à sa sortie dans la chambre (Figure 100). Si la goutte est suffisamment grosse pour toucher le rail supérieur elle s'étends pour se placer dans une position d'équilibre énergétique [137]. La génération n'est pas monodisperse et la fréquence de génération est variable.



Figure 100 – Génération semblable au squeezing entre deux rails a) la goutte grossit b) la goutte s'accroche au rail supérieur : $Q_{EDI} = 1 \mu L/min Q_{huile} = 2 \mu L/min$.

L'huile de silicone n'est pas nettoyable avec des détergents classique (ex : SDS). Les puces sont rapidement rendues inutilisables à cause des dépôts d'huiles même avec une génération utilisant des tensioactifs. Cela empêcherait une réutilisation des dispositifs pour plusieurs mesures. Les huiles végétales sont facilement nettoyables par des détergents ou des tensioactifs classiques. Nous n'utiliserons plus que des huiles végétales.

3.3.3.2. Génération : Huile de tournesol / EDI

Toujours dans l'optique de générer des gouttes en mode balloon avec les paramètres dédiés, nous n'utilisons pas de surfactant. Nous arrivons à produire des gouttes en mode dripping, jetting et squeezing mais l'absence de surfactant conduit l'huile à adhérer facilement dans les zones à faible vitesse d'écoulement (Figure 101). Les gouttes arrivant dans la chambre de détection ralentissent suffisamment pour mouiller les parois du canal et adhérer. De nombreuses gouttes coalescent dans la chambre ce qui empêche leur organisation. La phase aqueuse contient des tensioactifs pour empêcher la coalescence des gouttes et leur adhérence sur les parois.



Figure 101 – *Séquence de génération de gouttes* Q_{EDI} = 30 μ L/min Q_{huile} = 2 μ L/min.

3.3.3.3. Génération : Huile de tournesol / SDS

Pour les prochaines expérimentations nous remplaçons les pousses-seringue par des pompes à pression pour plusieurs raisons. Les temps de transitions et de stabilisation des écoulements passent de l'ordre de la dizaine de minute à la dizaine de seconde. Les pressions et les débits sont monitorés et régulés, ce qui rends le système de génération plus stable. La manipulation des fluides pour le remplissage initial des canaux, la génération et l'organisation sera facilitée. Néanmoins, l'intégration des capteurs de débits dans le banc d'expérimentation s'est faite tardivement. Les premières expérimentations ne comprennent que les informations des pressions appliquées aux entrées des dispositifs après stabilisation de la génération.

Nous avons reproduit les modes de génération classiques avec une phase aqueuses contenant du SDS à 5%. Il n'y a plus de trace d'huile dans les canaux et les gouttes s'écoulent dans la chambre de stockage s'en s'y fixer (Figure 102).



Figure 102 – Génération en mode dripping : EDI/SDS 5 % P_c =70 mbar, huile de tournesol P_d =110 mbar.

Un mode de génération ressemblant au mode balloon a été reproduit à très basse pression et faibles fréquences de génération de goutte (~ 0,1 Hz) (Figure 103). Vus les très faibles débits de génération, nous ne pourrons utiliser ce mode pour remplir efficacement et rapidement la chambre de stockage. Nous utiliserons principalement les modes dripping, squezing et jetting car ils sont plus simples à mettre en œuvre et permettant une génération à des fréquences plus élevées.



Figure 103 – *Génération en mode balloon : EDI/SDS* 5 % Pc=11 mbar, huile de tournesol Pd =30 mbar.

3.3.3.4. Génération : huile de soja / Tween 20

Après que le banc de mesure a intégré des capteurs de débits pour chaque phase, nous avons continué les expérimentations pour étudier la génération de gouttes d'huile de soja dans de l'EDI / Tween 20 à 5 % (Figure 104). Nous avons produit des gouttes avec la puce n°2 (présentée dans la partie suivante) car sa chambre d'observation se trouve dans la continuité du canal continu.



Figure 104 – Schéma du montage fluidique d'étude de génération en fonction du débit.

La génération des gouttes est asservie en débit par un contrôle en pression. Le capteur de débit à force de Coriolis est adapté à la mesure des débits de la phase aqueuse (Qc = 5 à 30 μ L/min). Le capteur de débit thermique nécessite une correction des mesures. Pour s'en affranchir, nous plaçons une boucle d'injection (Vb = 160 μ L) en aval du capteur à partir de laquelle l'huile est injectée dans la jonction en T. De ce fait, l'huile est poussée par une phase aqueuse asservie en débit. Le débit d'eau mesuré par le capteur thermique nécessite pas de correction (Qd = 3 à 6 μ L/min).

Pour chaque mesure à un couple de débit une vidéo est prise à la caméra rapide à : $t_{exposition} = 10$ µs, F = 700 FPS, résolution = 1920 x1200 et grossissement = x3. Cette fréquence d'acquisition élevée est nécessaire pour distinguer le mode de génération au niveau de la jonction en T pour les débits élevés. Pour des temps d'acquisitions si faibles, l'éclairage devient critique. La lumière provenant de la source halogène est concentrée sur la zone de génération par le bras amovible fibré afin d'obtenir une luminosité suffisante sur cette zone.

Nous avons retrouvé les modes de génération dripping, jetting et squeezing pour les débits suivants : $Q_c = 5 a 30 \mu L/min$ et $Q_d = 3 a 6 \mu L/min$ (Figure 105, Figure 106). Nous n'avons pas généré de gouttes en mode balloon. Le débit de la phase dispersée était trop élevé pour rentrer dans ce mode de génération. Nous emploierons les modes classiques de générations pour le reste de nos travaux.



Figure 105 – Modes de génération {Q_c, Q_d} : 1) Dripping : 5 μL/min, 3 μL/min. 2) Jetting : 30 μL/min, 5 μL/min. 3) Squeezing : 10 μL/min, 4 μL/min.



Figure 106 – Diamètre écrasé D des gouttes d'huiles de soja en fonction des débit Q_d et Q_c .

Le montage utilisé pour cette expérimentation a permis de s'affranchir d'une correction en valeur du débit d'huile mais comporte quelques défauts. Le volume d'huile présent dans la boucle s'épuise rapidement. Augmenter le volume de la boucle entrainerait l'augmentation de la résistance fluidique. Au fur et à mesure que l'huile s'épuise, elle est remplacée par l'eau ce qui diminue la résistance fluidique et donc augmente le débit pour une même pression. L'asservissement en débit rends ces variations transparentes tant que les pressions de consigne n'arrivent pas en limite de fonctionnement du régulateur de pression ($P_{min} = 30$ mbar et $P_{max} = 10$ bars). Ce montage est difficilement utilisable pour de la génération de goutte rapide et en quantité ou sur une longue durée.

Nous avons réalisé et mis en œuvre une structure de génération de gouttes contrôlées monodisperses dans des puces microfluidiques basée sur une jonction en T. Nous voulions reproduire la génération en mode balloon pour étudier l'arrangement de gouttes monodisperses en rangs serrés. Pour cela nous avons reproduit les structures et les paramètres expérimentaux utilisés lors de l'obtention de ce mode. Les résultats divergeant de l'approche originale, nous avons écarté l'utilisation du mode balloon. Nous avons reproduit les modes de génération classiques : dripping, squezzing et jetting et nous les employons dans l'étude de l'organisation des gouttes. Nous avons défini les dimensions de la structure de génération pour générer des tailles de gouttes offrant une surface de capture intéressante : $W_d = 20\mu m$, $h = 50 \mu m$ et $D = 50 à 150 \mu m$. Les expérimentations ont commencé par la génération de gouttes d'huiles de silicone dans de l'eau. L'huile polluant les canaux fluidiques, nous avons opté pour l'utilisation d'huiles végétales et de tensioactifs pour générer des gouttes durables et nettoyables. Au cours des expérimentations nous avons relevé des instabilités au niveau de la génération avec l'utilisation des pousse-seringues. Nous continuons nos expérimentations avec des régulateurs de pression, plus maniables et plus stables, pour asservir la génération de gouttes.

3.4. Organisation des gouttes

Nous voulons organiser les gouttes en rangs serrés pour augmenter la surface d'interaction avec les liquides. L'arrangement en rangs serrés est atteint pour une fraction volumique de la surface occupée par l'huile sur l'eau inférieure ou égale à 0,9 pour un réseau de goutte bidimensionnel. Pour $\Phi = 0,9$, les gouttes sont organisées en rangs serrés en structure hexagonale sans déformation. Pour $\Phi > 0,9$, les gouttes sont déformées et le réseau prend une forme de nid d'abeille au fur et à mesure que le liquide interstitiel est drainé. L'organisation des gouttes peut être contrôlée par le rapprochement des gouttes à la génération ou dans les canaux.

Pendant la génération, jouer sur la distance séparant deux gouttes consécutives permet de faire varier la fraction volumique. Le mode balloon rend le contrôle de cette distance indépendant de la taille des gouttes. Nous avions prévu d'étudier le remplissage et l'organisation des gouttes à l'aide du mode balloon. La taille de la chambre de la puce n°1 permet de ralentir suffisamment les gouttes pour observer leur rapprochement à fréquence d'acquisition standard (2-20 Hz). Elle autorise aussi l'ajout d'une structure piézolélectrique pour de la détection si les étapes d'organisation, de stockage et d'injection sont concluants. Comme présenté dans la partie précédente, le mode balloon est difficilement maniable. Nous observons tout de même le remplissage de la chambre par des gouttes générées dans les autres modes.

3.4.1. Organisation à la génération

Les gouttes sont générées par régulation de pression. La phase dispersée est constituée d'huile. Nous avons fait varier les tensioactifs et leurs concentrations pour la phase continue : OG et SDS. La pression P_c de la phase est fixée à 100 mbar. Nous faisons varier la pression P_d de la phase dispersée pour entrainer la génération de gouttes.

Tensioactif	Bornes de pression Pd (mbar)
SDS 0,05%	Génération instable
SDS 0,5%	100-375
SDS 5%	100-200
OG 40 mM	100-275

Tableau 10 – Paramètres de pression servant à la génération des gouttes pour quelques tensioactifs.

La plus grande amplitude de génération est trouvée pour le SDS 0,5% (Tableau 10). Pour une pression appliquée sur la phase continue fixe (P_c =100 mbar) lorsque que P_d augmente, le diamètre des gouttes D augmente et la fraction volumique Φ aussi (Figure 107). Pour la pression P_d max = 375 mbar, la fraction volumique Φ est inférieure à 0,9. En augmentant la pression, les gouttes ne sont plus monodisperses. Si l'on peut continuer à augmenter la pression, on se dirige vers la production de gouttes de diamètre D > 100 µm. Le gain en surface G devient inférieur à 1. On ne doit donc pas chercher à rapprocher les gouttes en augmentant leur diamètre.



*Figure 107 – Remplissage de la chambre avec du SDS 0,5 % pour P*_d=[100, 200, 300, 375] *mbar.*

Augmenter P_d revient à augmenter Q_d mais fait aussi baisser Q_c par l'augmentation de la résistance fluidique (reliée à Φ). Une étude de Φ en fonction de Q_d , Q_c et D serait sans doute mais n'est pas nécessaire pour nos recherches.

Nous nous sommes tout de même demandé si nous pouvions remplir et organiser les gouttes grâce au mode balloon. Nous avons placé le système dans un mode de génération correspondant à ce mode. Les gouttes sont générées collées à très bas débit (Figure 108). L'entrée d'eau est fermée par une vanne. Le réservoir est relevé sur une hauteur de l'ordre du centimètre pour créer une pression capable de générer des gouttes monodisperses. Une goutte générée pousse la précédente ce qui conduit au déplacement du train de goutte et au remplissage de la chambre.



Figure 108 – Remplissage de la chambre pour une génération proche du mode balloon.

Nous pouvons observer des structures d'organisation géométriques de gouttes se créer localement mais qu'un remplissage organisé de la totalité de la chambre par cette méthode est impossible. Ici, le remplissage est principalement dépendant de la géométrie. Cette méthode est trop lente est n'est pas aboutie.

Nous avons tenté d'organiser les gouttes en rangs serrées par deux approches différentes liées à l'espacement des gouttes durant leur génération. Nous concluons de ces expérimentations qu'il faut changer de méthode. Le rapprochement des gouttes et leur organisation est faisable par le drainage du liquide interstitiel par des structures fluidiques dédiées. Nous devons donc modifier la géométrie pour inclure une structure de drainage au niveau de la chambre.

3.4.2. Organisation par drainage

Un concept de puce est établi pour intégrer toutes les fonctions du projet (Figure 109) : 1) la génération, 2) l'organisation, 3) la fonctionnalisation des gouttes, 4) l'injection et la capture des bioéléments et 5) leur détection acoustique. Dans son fonctionnement elle permet aussi d'évacuer les gouttes et reprendre un nouveau cycle de détection. Nous proposons une structure de puce en deux parties séparées suivant nos standards dimensionnels. La partie basse sert à la génération de gouttes avec une jonction en T et une chambre de visualisation. La partie haute comporte une chambre de détection acoustique entourée de filtres fluidiques servant à l'organisation de gouttes et à l'injection des liquides de fonctionnalisation.



Figure 109 – Concept de puce intégrant toutes les fonctions a) Puce complète b) Filtres de drainage.

Nous dressons un protocole complet de détection acoustique lié à ce concept (Figure 110) : 1) La partie basse sert à générer les gouttes. Elle dispose d'une chambre de visualisation utilisée pour protéger la chambre de détection de l'huile pouvant affluer lors de l'étape du premier remplissage. Cette chambre sert aussi à vérifier que la génération des gouttes est stabilisée. 2) Les gouttes sont réinjectées dans la partie haute. Le liquide porteur est drainé par des canaux latéraux (ou filtres), ce qui rapproche les gouttes jusqu'à les organiser en rangs serrés. 3) Une mesure de référence de l'impédance acoustique du

réseau de gouttes est effectuée au centre de la cellule. 4) Les canaux latéraux sont utilisés pour injecter le liquide de fonctionnalisation dans l'espace interstitiel des gouttes. 5) L'échantillon à analyser circule de la même manière dans le réseau de goutte. Les éléments biologiques d'intérêts sont capturés en surface de goutte. 6) Une mesure de l'impédance acoustique du réseau de gouttes est de nouveau effectuée au centre de la cellule. Cette mesure sert à visualiser l'influence de la capture sur l'impédance acoustique du réseau de gouttes. 7) Les gouttes sont évacuées et la puce nettoyée. Une nouvelle mesure peut être réalisée à partir de l'étape 1.



Figure 110 – Protocole proposé pour la détection acoustique d'un élément biologique d'intérêt : 1) génération de gouttes, 2) organisation des gouttes par drainage, 3) mesure acoustique de référence, 4) injection de la solution de concentration, 5) injection de l'échantillon à analyser et 6) mesure acoustique.

3.4.2.1. Fabrication puce n°2

Une nouvelle puce est dimensionnée et réalisée pour étudier les fonctionnalités fluidiques de ce protocole (Figure 111). Le procédé de fabrication est similaire à celui utilisé pour la puce n°1. La partie fluidique est gravée sur 50 µm par gravure plasma DRIE sur un substrat silicium de 500 µm d'épaisseur. Les ouvertures d'accès fluidiques sont ensuite gravées par DRIE traversante sur l'autre face. Le substrat est collé sur la face des canaux fluidiques sur un support de gravure à l'aide d'un adhésif (509 clear – Crystal Bound) dont nous faisons le test. Cet adhésif sert de couche de protection. La puce est capotée par un substrat de verre de 1 mm par collage anodique avant d'être découpée.



Figure 111 – Masques de puce n°2 a) Puce b) Implantation des puces sur le subsrat.

La différence avec la première puce réside dans l'utilisation de l'adhésif. Le Crystal Bound se présente sous forme de tube solide à température ambiante. Il résiste au plasma et devient liquide à 120°C. Il est appliqué sur l'ensemble de la surface à coller du substrat chauffé à 120°C. Le support est collé par mise en contact avec le substrat chaud. L'assemblage est séparé en le refaisant chauffer à 120°C. L'adhésif présent sur le substrat est ensuite dissous dans l'acétone.



Figure 112 – Puces n°2 sur substrat : a) après gravures, b) après capotage et c) après découpe.

Les étapes de gravures se sont déroulées correctement. Le collage anodique semble correct au vu des mesures faites pendant le collage, de l'observation visuelle et des tests de séparation manuelle. Les substrats se sont cependant étonnements séparés pendant l'étape de découpe à la scie. Sur les images les parties foncées indiquent un contact du silicium et du verre et normalement un collage par liaisons covalentes (Figure 112).

Nous supposons que l'adhésif se redépose en couche fine sur le silicium lors de sa solubilisation à l'acétone. Sur plusieurs substrats, quelques puces sont restées intactes et ont été mises en œuvre. Les résultats de génération de gouttes ont montré une modification des conditions de mouillage par rapport à ceux obtenus avec la puce n°1. Pour annuler l'influence de l'adhésif sur les écoulements, plusieurs techniques de nettoyages ont été testées. Les nettoyages par réaction piranha, eau oxygénée en ébullition, divers nettoyants de résines et plasma O₂ se sont montrés inefficaces. L'étape de sciage décolle une partie importante de la surface du substrat. Seul un placement des substrats dans un bain HF a permis de retirer cette couche. Les résultats expérimentaux obtenus pour la version n°2 des puces ont été effectués après ce traitement. La modification des écoulements et de la génération des gouttes à la suite d'une variation du procédé de fabrication montre l'importance des conditions de surface et des traitements chimiques qui y sont appliqués.

3.4.2.2. Organisation des gouttes par filtres droits

Les filtres de drainages sont constitués de barreaux d'espacement et de largeur égaux à 20 µm sur 500 µm de long (Figure 113). Leur largeur est inférieure aux diamètres des gouttes générées. Pour qu'une goutte franchisse le filtre elle doit adapter son rayon aux bords des canaux ce qui augmente localement la pression dans la goutte selon la loi de Laplace. Plus le filtre est étroit, plus la pression à appliquer sur la goutte pour la faire franchir le filtre est élevée. Dans le même temps la résistance fluidique du filtre augmente, ce qui diminue la capacité des filtres à drainer le liquide interstitiel. Les filtres ont été dimensionnés intentionnellement long pour que le collage anodique résiste aux contraintes liées aux pressions élevées appliquées dans la chambre.



Figure 113 – Puce n° 2 et filtres après leur gravure DRIE sur 50µm.

Les expérimentations sont effectuées avec de l'huile de soja et du tween 20 à 5%. Un montage expérimental est dédié à ce circuit (Figure 114). Le capteur de débit thermique est monté sur la voie de la phase disperse. Les valeurs des débits d'huile mesurées sont corrigées par la fonction de correction déterminée dans le chapitre 2.



Figure 114 – Montage expérimental servant à la génération et à l'organisation de gouttes (puce n°2).

L'organisation des gouttes avec cette structure de filtre s'effectue en 3 étapes (Figure 115). 1) Les gouttes sont générées dans la jonction en T. Elles sont réinjectées dans la chambre où le liquide interstitiel est drainé. 2) Les gouttes présentes dans la tubulure reliant les deux parties de la puce sont poussées à un débit suffisamment bas pour ne plus évacuer les gouttes. Au fur et à mesure que les gouttes arrivent, la pression dans la chambre augmente et la mousse liquide se comprime. La compression de la mousse est visible par l'assombrissement des contours de gouttes dans la mousse. La compression de la mousse équivaut au passage d'une goutte d'une forme de pancake à une alvéole de nid d'abeille. Le contour de la goutte s'assombris avec l'augmentation du rayon r de courbure de la goutte. 3) Le système est mis au repos. La mousse se relaxe, évacuant l'énergie stockée à la surface des gouttes déformées. Le retour à un état d'équilibre énergétique au niveau des gouttes entraine le déplacement en arrière des gouttes et un écoulement inverse faible. Les gouttes sont organisées en rangs serrés.



Figure 115 – Organisation des gouttes avec la puce n°2. 1) Génération et drainage : $Q_c = 10 \mu L/min$ et $Q_d = 4 \mu L/min$. 2) Poussée des gouttes et compression : $Q_c = 3 \mu L/min$. 3) Organisation par relaxation de la mousse.

Cette structure comporte quelques défauts qu'il faut corriger pour améliorer les résultats. La réinjection se fait à l'extérieur de la puce, ce qui engendre deux effets négatifs. Les gouttes coalescent et se scindent dans la tubulure ou dans les zones de connexion fluidique. Dans la littérature, des structures de réinjection constituées de piliers calibrés permettent de réinjecter des gouttes monodisperses et de filtrer les particules. La première difficulté est que nous ne pouvons pas appliquer cette technique ici car nous faisons couramment varier la dimension des gouttes. Le second problème est le temps de transit des gouttes entre les deux parties de la puce. Il s'élève à plusieurs minutes aux débits employés ici. Pour répondre à ces problématiques, nous avons choisi d'intégrer le canal d'injection sur la puce. Cela offre une plus grande réactivité au niveau du contrôle des écoulements dans la puce et limite les défauts de monodispersité.

Une modification est nécessaire au niveau des canaux de drainage. Nous avons testé l'injection de liquide dans le réseau de gouttes au travers des canaux de drainage. Les débits d'injection étant très faibles (> 1µL/min) pour ne pas perturber le réseau de goutte, les réactifs diffusent avant d'arriver à la puce. De plus, la commutation transformant une des sorties de drainage en entrée d'injection provoque des pics de débits susceptibles de déstructurer le réseau de goutte. Il est nécessaire de rajouter un canal d'injection séparé des canaux de drainage.

L'objectif de l'organisation des gouttes a été atteint à l'aide des canaux de drainage. Néanmoins, la méthode d'organisation est un peu technique, s'opère à des débits faibles et manque de flexibilité par rapport aux dimensions des gouttes à organiser (Figure 116).



Figure 116 – a) Gouttes dans les filtres et b) défaut d'organisation de gouttes de faible diamètre.

Nous souhaitons fiabiliser l'organisation des gouttes et limiter les opérations qui y sont nécessaires. Pour cela, il faut augmenter la pression maximum admissible dans la chambre avant que les gouttes ne rentrent dans les filtres. Ceci implique de diminuer la largeur des filtres à l'interface des gouttes. Les modifications de structures que nous avons identifiées conduisent à la réalisation de la puce n°3.

3.4.2.3. Fabrication Puce n°3

La puce n°3 intègre les modifications nécessaires évoquées dans la partie précédente. A leur extrémité, les filtres présentent des fourches de 5 µm de large. Un canal d'injection a été rajouté. Les parties de génération et d'organisation sont reliées sur la puce (Figure 117). La réalisation de la puce reprend le procédé de la puce n°2 mais remplace le collage par adhésif par un collage à la résine.



Figure 117 – Puce n°3 : a) puce complète et b) fourches en bout de filtre.

Les canaux fluidiques sont gravés sur 50 μ m par gravure plasma DRIE (Rapier – SPTS) sur substrat silicium de 500 μ m d'épais (Figure 118). La moitié de la gravure (250 μ m) des ouvertures d'accès fluidiques est réalisée dans une autre machine DRIE (601E – Alcaltel). Le collage sur le support pour la gravure traversante est réalisé par de la résine enduite sur les deux faces à coller. La résine enduite sur le substrat protège les canaux du plasma. La fin de la gravure traversante est réalisée sur l'appareil de gravure Rapier.

Dans la machine de gravure Rapier, le plasma de gravure peut s'infiltrer par la tranche entre les substrats collés. La résine de collage ne résisterait pas à une gravure traversante de 500 µm. Dans ce cas, le substrat se détache du support, n'est plus refroidi et la résine est calcinée.

Nous utilisons une autre machine de DRIE (Alcatel 601E) pour réaliser la moitié de la gravure traversante. Dans sa chambre de gravure, le substrat est maintenu mécaniquement par un cadre. La face arrière du substrat est protégée du plasma par le cadre. Il n'y a pas besoin de résine de protection en face

arrière pour la gravure. Or, la gravure complète dans cette machine demanderait un masque métallique à cause d'une vitesse de gravure lente et d'une mauvaise sélectivité de gravure avec la résine. L'emploi des deux machines permet l'emploi de résine comme colle et limite les étapes annexes.



Figure 118 – Imagerie MEB des fourches après gravure DRIE sur 50μm : échelles a) 50μm, b) et c) 30 μm.

Le collage anodique avec un substrat de verre de 1 mm et la découpe à la scie se sont déroulés correctement. En revanche, les tests fluidiques n'ont pas permis de générer convenablement des gouttes. Les gouttes d'huile collent aux parois malgré la présence de surfactant. La génération est semblable aux puces n°1 mal gravées. Nous supposons que la résine n'a pas suffi à protéger les canaux fluidiques lors de la gravure traversante.

Nous avons alors envisagé de modifier chimiquement la surface du silicium des puces packagées pour retrouver des conditions de génération convenable.

3.4.2.4. Traitement chimique des canaux fluidiques

Nous supposons qu'augmenter la mouillabilité du silicium permettrait de retrouver une surface de canaux compatible avec les modes de génération de gouttes classiques. Le traitement au plasma O₂ est un procédé courant mais la durée de vie du traitement est faible. Le procédé de nettoyage RCA1 augmente la mouillabilité de la surface [138]. Nous testons son efficacité en plaçant un échantillon de silicium dans ce bain de nettoyage et en mesurant les angles de contact d'une goutte d'EDI et d'huile de soja.

Un échantillon de silicium est placé dans un bain d'une solution RCA1 contenant de l'ammoniaque pendant 30 min avant d'être rincé et séché. La solution RCA1 contient un mélange H_20 : H_2O_2 : NH_4OH au ratio (2 : 1 : 1). Des gouttes de 5 µL d'EDI et d'huile de soja, provenant d'un contenant neuf et d'un autre ouvert depuis 6 mois, sont déposées sur l'échantillon traité au RCA1 et un échantillon témoin non traité. Les deux proviennent du même substrat. Les angles de contact des gouttes ont été mesurés 10 min après le traitement (Figure 119).



Figure 119 – Photos des gouttes sur a) silicium traitée (haut) et non traitée (bas) : EDI (cercle bleu), huile de soja neuve (cercle rouge), huile de soja ancienne (cercle orange). Mesure d'angle de goutte d'EDI sur silicium b) traité et c) non traité.

Les mesures d'angle de contact sont effectuées visuellement sur un appareil pourvu d'un goniomètre. L'angle de contact de la goutte d'huile n'est pas modifié par le traitement : $\theta_{Hsoja} = 27^{\circ}$. L'angle de contact de la goutte d'eau évolue de $\theta_{EDI} = 25^{\circ}$ à $\theta_{EDI} = 5^{\circ}$ grâce au traitement chimique.

Nous avons appliqué ce traitement à une puce version n°3 déjà découpée. La puce est à moitié immergée dans le bain de traitement RCA1 pendant 30 min. La solution remplit les canaux par capillarité en quelques secondes. L'extérieur de la puce est rincé à la douchette et séché à l'azote. Les canaux sont rincés à l'EDI puis séchés après être montés dans le banc fluidique.

La puce traitée est la seule puce fonctionnelle de la version n°3. Trois jours après le traitement, la puce conserve ses propriétés normales de génération.

3.4.2.5. Organisation des gouttes par filtres fourchus

Le montage expérimental a été adapté pour exploiter toutes les fonctionnalités de la puce n°3 (Figure 120). Les systèmes de contrôle en pression asservis en débit permettent de générer des gouttes d'huiles dans de l'eau. L'échantillon contenant l'élément biologique à capturer est inséré manuellement dans une boucle d'injection de 150 μ L de capacité. Un pousse-seringue est connecté en amont de la boucle d'injection. Il sert à injecter l'échantillon dans la puce à un débit programmé. Des circuits de purge sont connectés à chaque source pour éliminer les surpressions avant injection. Chaque sortie comporte une vanne d'arrêt manuelle servant à modifier la configuration de sortie du système.



Figure 120 – Schéma et photographies du montage expérimental pour la puce n°3.

Avec cette nouvelle puce, nous pouvons organiser les gouttes à la vitesse de génération. Les étapes d'utilisation pour l'organisation des gouttes est la suivante (Figure 121). 1) Les gouttes sont générées dans la partie basse de la puce 2). Les gouttes sont aiguillées dans la chambre avec un rapprochement imparfait dans la partie centrale. 3) Les voies des canaux de drainages sont ouvertes. L'organisation des gouttes est assurée peu après le début de la chambre. Le drainage est suffisant pour déformer les gouttes ($\Phi > 0,9$). 4) La génération de goutte est stoppée. La mousse se détend et les gouttes retrouvent leur circularité.



Figure 121 – Protocole d'organisation. Tween 20 0,5% $Q_c=2 \mu L/min$ *et Huile de soja* $Q_d=0,16 \mu L/min$.

Regardons en détail le remplissage du canal central avec la sortie centrale ouverte (étape 2) (Figure 122). Les gouttes arrivent dans la chambre sans organisation et avancent en présentant rapidement un front droit jusqu'aux filtres. Le liquide intersticiel est drainé au niveau des filtres et les gouttes se rapprochent jusqu'à la fin des filtres. Après les filtres, elles se désorganisent. Ce schéma d'écoulement est stable dans le temps. On remarque que des microgoutelletes évoluent dans les canaux est sont focalisées à la fin du filtre jusqu'à la sortie.



Figure 122 – Détail du remplissage de la chambre avec la voie centrale ouverte (étape 2).

Nous voulons organiser les gouttes sur la partie centrale de la chambre qui correspond à la zone de détection acoustique du capteur. L'organisation sur la chambre complète, même autour des filtres permet de symétriser les écoulements au centre de la chambre lors de la phase d'injection. En ouvrant les canaux latéraux, le liquide interstitiel est drainé à travers les filtres puis est évacué par les sorties latérales. Les gouttes se rapprochent et sont rapidement déformées par le drainage du liquide interstitiel et l'arrivée de nouvelles gouttes (Figure 123). Il faut stopper l'écoulement sinon la pression augmente

suffisamment dans la chambre pour que les gouttes pénètrent et traversent les filtres. Une fois la génération stoppée, la mousse liquide se relaxe et les gouttes sont organisées.



Figure 123 – Détail de l'organisation des gouttes avec les voies de drainages ouvertes (étape 3).

Les gouttes rentrent en contact pour une fraction volumique d'huile de $\Phi \sim 0,9$. Au-delà, avec le drainage du liquide interstitiel, les gouttes se déforment, car elles sont incompressibles et passent d'une forme circulaire à hexagonale. De la même manière que les mousses dans ce cas [139], l'émulsion est assimilable à un solide soumis à une contrainte de compression (due au drainage) se déformant élastiquement et plastiquement. Le phénomène de relaxation apparait lorsque la contrainte est annulée donc lorsque le débit d'entrée est nul. Les zones sous contraintes sont visualisables par l'abaissement de l'intensité lumineuse au niveau de l'interstice (Figure 124). Cela est dû à l'apparition et à la croissance d'un plan au niveau contact entre les gouttes qui diminue la taille du rayon de courbure de la goutte.



Figure 124 – Profil d'intensité lumineuse sur la troisième rangée de gouttes.

3.4.2.6. Simulation des écoulements d'organisation de la puce 3

Pour améliorer notre compréhension de l'organisation des gouttes dans la chambre nous avons modélisé la chambre et avons simulé sous Comsol des écoulements monophasiques pour les phases 2 et 3 d'organisation dans la puce n°3.

Nous avons écarté la modélisation d'écoulement de gouttes dans un dispositif de cette dimension avec le module de simulation diphasique. Le temps que la simulation aurait demandé, et les faibles chances de convergence de la solution nous ont conduits à une approche plus pragmatique. La modélisation 3D n'est pas non plus évidente dans ce cas. Les fourches des filtres présentent des réductions de 5 µm pour une chambre de taille centimétrique. Pour une épaisseur de canaux de 50 µm, le maillage aurait été trop complexe. Les rayons des fourches conduisent d'ailleurs à des difficultés de maillage en 2D. Nous effectuons donc une simulation en 2D d'écoulements laminaires avec un maillage fin (1 500 000 éléments) (Figure 125).



Figure 125 – Fourches : maillage et résultat de simulation des vitesses d'écoulements (m/s).

La simulation porte sur l'ensemble de la chambre de la puce n°3. Afin d'économiser du temps de calcul, la puce est symétrisée par le plan central du canal. Nous simulons la chambre dans deux cas de figures. Un écoulement d'eau est fixé en débit à l'entrée de la chambre gauche à 3 μ L/min. La sortie centrale et la sortie de drainage sont connectées après 1 m de tubulure à la pression atmosphérique. La différence entre les deux cas se comprend au niveau des sorties de drainage. Elles sont bloquées dans le premier cas et passantes dans le second (Figure 126).



Figure 126 – Simulation 2D : vitesses d'écoulements (m/s) et lignes de champs pour les étapes 2 et 3.

Pour l'étape 2, le résultat de la simulation montre que le liquide est drainé jusqu'au centre de la puce puis est réinjecté juste après. Nous observons une zone de ralentissement au niveau des filtres. Les écoulements dus au drainage entrainent les gouttes contre les filtres. Elles sont en plus ralenties dans le canal par une baisse de la vitesse de l'écoulement dans la chambre. Cela permet déjà un rapprochement des gouttes. En sortie de filtre, le liquide drainé est réinjecté ce qui décolle les gouttes du bord des filtres, augmente la vitesse du canal central et désorganise les gouttes.

Pour l'étape 3, les canaux de drainage sont ouverts. La vitesse dans le canal central est divisée par 3. Les 2/3 restants sont drainés par les 2 canaux latéraux. Leur résistance fluidique est presque similaire à celle du canal central si nous ne prenons pas en compte les résistances fluidiques occasionnées par les gouttes et les filtres. Le drainage s'effectue sur 2/3 de la longueur des filtres. Il est plus important vers l'entrée de la puce. Cela devrait rester valable lorsque la puce est remplie par des gouttes. Le drainage et l'injection vers la fin des filtres pourraient disparaitre lors de l'organisation des gouttes. La résistance fluidique du canal central est augmentée par les gouttes. L'écoulement irait certainement vers le canal de drainage sans réinjection.

La simulation montre l'utilité du canal de drainage par rapport à une zone de dérivation seule. Le débit en sortie de chambre est divisé par 3 entre les deux configurations. La vitesse au centre de la chambre est inférieure d'1/3 pour la configuration 2. Les gouttes arrivent à la même vitesse dans la chambre mais sont mieux ralenties dans la configuration 2. De plus, le liquide interstitiel est drainé et les gouttes sont plus rapprochées.

3.4.3. <u>Injection de fluide dans le réseau de goutte</u>

Une fois les gouttes organisées, les étapes suivantes sont réalisées en utilisant un écoulement latéral à la chambre. Le liquide infusé dans le réseau de gouttes circule dans l'espace interstitiel. Les risques sont que l'écoulement soit assez important pour déplacer les gouttes et les faire traverser les filtres. Nous devons donc déterminer si un liquide peut être infusé dans les gouttes sans perturber leur organisation.

Pour visualiser l'écoulement entre les gouttes nous injectons de la fluorescéine diluée à 1mg/mL dans de l'EDI dans le réseau de goutte. La fluorescéine est d'abord placée dans la boucle d'injection. La boucle est insérée dans le circuit d'injection puis le pousse-seringue pousse le liquide à un débit fixe.



Figure 127 – Visualisation par fluorescence de l'injection à $Q_p = 0.5 \mu L/min$ entre les gouttes (Huile de soja $Q_d = 0.1$ et SDS 0.5% $Q_c = 3$. Tracé des fronts de l'injection (Intervalle entre les tracés t=12,5s).

La vitesse maximale relevée avant que les gouttes ne s'échappent sur les bords ou au travers des filtres est de 0,5 μ L/min. Nous avons filmé les alternances entre le liquide de poussé et l'échantillon fluorescent à cette vitesse (Figure 127). La partie centrale constituée des gouttes est une partie à géométrie variable et défini l'homogénéité de l'écoulement. Les défauts de maillage ou d'organisation entrainent des variations de résistance fluidique ce qui perturbe les écoulements. La qualité de l'homogénéité de l'écoulement dépend de celle de l'organisation des gouttes (Figure 128).



Figure 128 – Différents degrés d'homogénéités des écoulements en fonction de la qualité du réseau de goutte (gauche) écoulement symétrique (centre) dissymétrie due à une déstructuration du réseau à gauche de la chambre (droite) organisation d'un large canal d'écoulement au centre de la chambre.

Le liquide avance dans 3 types de structures (Figure 129-b). Zone 1 et 5 : A l'entrée et à la sortie, l'écoulement s'effectue entre le plafond et le fond de la chambre avec une hauteur de canal très faible par rapport à la largeur de la chambre ($w_{max} = 8 \text{ mm}$, $h = 50 \mu \text{m}$). Zone 2 et 4 : Le liquide passe dans des filtres constitués de petits canaux parallèles ($l = 500 \mu \text{m}$, $h = 50 \mu \text{m}$ w = 20 μm). Zone 3 : Le liquide passe dans l'espace interstitiel des gouttes.



Figure 129 – a) Sections analysées dans le kinogramme. b) Zones de la puce.

Pour analyser l'écoulement de la fluorescéine dans le réseau de goutte, nous avons visualisé l'intensité lumineuse en fonction du temps d'infusion sur deux lignes : l'une au centre de la chambre et l'autre à mi-distance du bord du canal (Figure 129-a). Le kinogramme obtenu (Figure 130) permet alors de déterminer les vitesses moyennes d'écoulement dans la direction de l'injection en mesurant la pente formée par le front d'avance du liquide.



Figure 130 – Kinogramme de l'écoulement au centre de la cellule (rouge) et sur le quart gauche (vert) avec les vitesses moyennes d'écoulement par zone.

On remarque tout d'abord que les vitesses moyennes d'écoulement sont linéaires dans la chambre et dans les filtres. Dans ces zones, les profils de vitesse des fronts sont similaires bien que décalés temporellement. Les zones d'entrée et de sorties ne sont pas linéaires mais sont influencés par les canaux de connexion et par la variation de largeur de la chambre à cet endroit.

Les vitesses d'écoulement dans la mousse (zone 3) dépendent peu de la position dans la chambre et la fraction volumique est de $\Phi \sim 0.9$ car les mousses sont peu drainées et peu déformées. Dans ces conditions, le réseau de goutte peut être assimilé à un milieu poreux, en suivant le même principe de modélisation que pour les mousses [140]. Le drainage dans le liquide interstitiel est assimilable à un écoulement à faible nombre de Reynolds dans un milieu poreux par l'équation de Darcy :

$$Q = \frac{kA}{\mu_{Eau}} \nabla \overline{\mathbf{F}}$$

Avec *k* le coefficient de perméabilité [m/s] et *A* la section $[m^2]$.

Le réseau de goutte (la zone 3) étant assimilable à un milieu poreux, nous pouvons relier les vitesses moyennes mesurées sur les kinogrammes à la porosité dans la zone 3 :

$$\bar{u} = \frac{k}{\mu_{Eau}} \Delta P$$

Cette relation nous montre la dépendance des vitesses en fonction des paramètres du réseau, mais il nous manque la pression pour déterminer quantitativement les paramètres du modèle. En effet il est difficile de mesurer directement la pression aux bornes de la chambre dans ce montage (les capteurs de pressions sont situés en dehors de la puce bien loin même des zone 1 et 5) et nous ne pourrons donc pas évaluer le coefficient de perméabilité *k* équivalent de notre réseau de goutte à ce stade de nos recherches.

Par ailleurs, on notera que pour un débit d'injection de 0,5 μ L/min, les tuyaux entre la boucle d'injection et l'entrée de la chambre sont remplis très lentement et le réseau risque d'être modifié pendant la durée de l'injection. Nous avons ainsi utilisé un pré-remplissage en ouvrant le canal de drainage et en injectant le liquide à un débit plus important de 10 μ L/min afin d'amener rapidement le liquide à injecter jusqu'à l'entrée de la chambre d'injection (Figure 131). Pendant cette phase on observe que le liquide entre un peu dans la zone 1.



Figure 131 – Chargement de la fluorescéine $Q_p = 10 \mu l/min : 1) 0 s : début de l'injection, 2) 10 s : passage du liquide de chargement, 3) 1 min : arrivée du liquide à injecter.$

Pour ce montage, on observe que le temps de transport de l'échantillon jusqu'à l'entrée de la chambre est de 1 min pour une injection à 10 μ L/min. Augmenter le débit de la pré-injection au-delà de 15 μ L/min provoque des déplacements de liquide dans la puce et la désorganisation des gouttes. Cela est probablement dû aux déformations des parois ou des tubes causées par une élévation de la pression dans la puce.

L'organisation des gouttes en rangs serrés est assurée par le drainage du liquide interstitiel. Nous avons réalisé et étudié 3 structures de puces en vue d'organiser les gouttes. Nous avons mis en place des structures de drainage entourant la chambre de détection et les avons modifiées pour faciliter l'organisation des gouttes. Ainsi, l'organisation des gouttes a lieu en même temps que leur génération. Nous avons effectué des simulations d'écoulements monophasiques liés à l'organisation des gouttes. Nous avons aussi déterminé les paramètres d'injections ne perturbant pas le réseau de gouttes. Les prochaines étapes sont relatives à la fonctionnalisation et à la capture d'éléments biologiques en surface de gouttes.

3.5. Capture d'un élément biologique d'intérêt

Dans les capteurs classiques, l'interface de détection est recouverte en surface d'une couche de biorécepteurs servant à capturer l'élément biologique recherché. Pour les gouttes, l'interface est fluide, mobile et changeante. Les biorécepteurs peuvent s'intégrer dans l'interface (ex : injection de tensioactifs fonctionnalisés dans l'huile) ou en modifier certaines composantes (fonctionnalisation des lipides de l'huile). A la différence des interfaces solides, la couche de biorécepteurs impacte l'interface de la goutte et donc sa stabilité.

Cette partie regroupe nos tentatives de fonctionnalisation des gouttes et de capture d'un bioélément. Pour valider les étapes de fonctionnalisation et de capture, nous choisissons un modèle biologique dont la reconnaissance est très forte et stable dans le temps : le couple streptavidine/biotine.

3.5.1. <u>Couple streptavidine/biotine</u>

La streptavidine (53 kDa) et la biotine (240 Da) forment un couple protéine/coenzime dont l'interaction spécifique est la plus forte interaction non covalente naturelle (10⁻¹⁵ M) [141]. La streptavidine est une protéine de forme tétramérique possédant 4 sites d'accroche pour la biotine (deux sites face à face). Lorsque la streptavidine s'accroche sur une surface présentant de la biotine, deux sites sur la même face peuvent être occupés. Cela laisse aux deux sites libres la possibilité d'accueillir des éléments biotinylées libres ou de se lier à une autre surface biotinylée. Il est alors envisageable de lier deux gouttes biotinylées ensemble par de la streptavidine.

Nous disposons de deux méthodes pour biotinyler des gouttes. La première consiste à activer les terminaisons carboxyliques (-COOH) (Figure 132) d'acides gras de l'huile présents à l'interface de la goutte [142].



Figure 132 – Réaction d'activation par EDC/sNHS d'un acide carboxylique d'une molécule A et création d'une liaison amino-ester avec une molécule B aminée. Adaptée de [143].

L'activation s'effectue à l'aide d'une solution contenant du 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride (EDC) et N-hydroxysulfosuccinimide (sulfo-NHS). Ces éléments viennent à tour de rôle se placer à l'extrémité de la terminaison carboxylique. Ils cèdent la place à un élément aminé (-NH2) ce qui forme une liaison amino-ester. Une biotine aminée est employée pour décorer la goute. La biotine est séparée de la fonction amine par un espaceur PEG de longueur de chaine variable. Les gouttes biotinylées capturent la streptavidine (Figure 133) et nous supposons qu'elles peuvent se ponter grâce à elle. La détection de la fonctionnalisation par de la biotine peut se faire par la détection de streptavidine fluorescente ou par la liaison de gouttes entre elles. Les étapes de d'activation, fonctionnalisation et de capture se feraient dans des gouttes organisées par injections successives de réactifs.



Figure 133 – Principe de fonctionnalisation des gouttes par la biotine et de capture de la streptavidine.

L'autre méthode consiste à diluer des phospholipides déjà biotinylés dans l'huile. La fonctionnalisation des gouttes se ferait pendant leur génération au moment où les tensioactifs se positionnent à l'interface [104]. La capture de la streptavidine se ferait pendant son injection dans les gouttes déjà organisées (Figure 134). L'interaction entre la streptavidine et les phospholipides biotinylés dépend de la longueur de l'espaceur entre la biotine et la tête du phospholipide (ex : PEG). Un espaceur trop court ou replié par la pression peut empêcher la biotine d'accéder au site de liaison à l'intérieur de la streptavidine [144].



Figure 134 – Représentation de l'interaction entre la streptavidine et une couche de phospholipides biotinylés - Adapté de [144].

3.5.2. <u>Fonctionnalisation de puce d'or</u>

Nous avons effectué un essai de fonctionnalisation par méthode SPR (Surface Plasmon Resonance) (XelPleX – Horiba Scientific) pour vérifier le procédé de fonctionnalisation sur une surface solide et stable (Figure 135). La puce utilisée est une plaque de verre sur laquelle a été déposé de l'or dont l'épaisseur permet la génération de plasmons de surface. Une monocouche-auto assemblée (SAM : Self Assembled Monolayer) de thiol sert de base de construction. Elle est composée des chaines carbonées 16-mercapto-1-hexadecanol (C16) et 11-mercapto-1-undecanol (C11). Le C16 est constitué de 16 carbones et se termine par un groupe carboxyle (HS(CH₂)₁₅COOH). Le C11 est constitué de 11 carbones et se termine par un groupe hydroxyle (HS(CH₂)₁₀OH). La monocouche présente des terminaisons carboxyliques, ce qui permet d'appliquer le même traitement que celui prévu pour les gouttes.



Figure 135 – Plan d'expérimentation de mesure par SPR de la capture. 1) Greffage de chaines C11/C16. 2) Activation et greffage biotine. 3) Capture de streptavidine. 4) capture de biotine sur une surface biotinylée.

Cette expérimentation permet de valider le protocole de greffage de la biotine aminée sur une surface présentant des groupes carboxyliques, notamment le pH de greffage. Nous voulons également vérifier la possibilité de détection par microscopie à fluorescence de la capture de la streptavidine. Nous voulons enfin vérifier l'interaction de la streptavidine capturée avec de la biotine sur ses sites libres.

3.5.2.1. Préparation de la puce et greffage de la biotine

Nous utilisons des puces déjà fonctionnalisées par des chaines C11/C16. La puce est recouverte d'une solution d'EDC (400mM) /sNHS (100mM) (200 μ L+ 200 μ L) servant à l'activation des groupes -COOH. Elle est laissée à température ambiante (TA) à l'obscurité pendant 30 min.

Nous greffons de la biotine-PEG₂-NH₂ (1,2 mg/mL à PH4 et PH6), de la streptavidine (0,5 mg/mL à PH6) et le témoin négatif : RSA (0,2 mg/mL). Ils sont déposés en 4 spots de 1 μ L sur la puce (Figure 136) qui est ensuite placée dans un bain à ultrason thermostaté (37 kHz, puissance : 30%, 19°C) pendant 45 min à l'obscurité.

La puce est rincée à l'EDI puis séchée. La surface est désactivée à l'éthanolamine (1 M, PH8,5) pendant 30 min à TA à l'obscurité. Elle est rincée, séchée puis insérée dans l'appareil de SPR XelPleX.

3.5.2.2. Injection de streptavidine et de biotine

Le tampon de course du XelPleX est un tampon phosphate salin (PBS : Phosphate Buffer Saline) filtré à 0,2 µm. A l'insertion de la puce, le canal est rempli par ce tampon de course qui va circuler tout au long de l'expérience. De l'Octyl β -D-glucopyranoside (OG) 40mM est injecté pour éliminer les molécules adsorbées à la surface de la puce puis entre chaque injection. Les plasmons sont ensuite mesurés à plusieurs angles pour déterminer le meilleur angle de travail qui est ici de 59,4°. On définit plusieurs points de mesure (gris clair) pour les spots et la surface de la puce (servant de référence). Les courbes de résultats sont tracées à partir de la moyenne des valeurs des mesures associées (Figure 136).



Figure 136 – Carte des spots et points de mesures (affichés en gris clairs) sur une image des plasmons à 59,4°.

Après nettoyage de la surface à l'OG, la streptavidine fluorescente est injectée sur les spots pour vérifier son interaction avec la biotine. La biotine-PEG-NH2 est ensuite injectée pour vérifier la disponibilité des sites de la streptavidine greffée. Le Tableau 11 résume les protocoles.

Injection	OG	Streptavidine (1 µM)	OG	Biotine (1 µM)	OG
Débit (µL/min)	100	100	100	50	100
Volume (µL)	100	200 (recirculation)	100	200	100
Temps (min)	1	10	1	4	1

Tableau 11 – Protocole d'injection de la streptavidine et de la biotine sur le XelPLeX.

3.5.2.3. Analyse des résultats

Le spot de streptavidine a une faible interaction la streptavidine injectée (Figure 137). Il est possible que la propension de la streptavidine à s'organiser en cristal soit liée à cette capture [102].



Figure 137 – Images différentielles des plasmons pour l'injection de la streptavidine. a) Début de l'injection (1h04min) et b) après élimination des interactions aspécifiques à l'OG (1h26min).

La capture de la streptavidine sur la biotine est validée par des taux de capture significatifs (Figure 138). La biotine greffée à PH4 présente un taux de capture de streptavidine ~2 fois plus important que pour la biotine greffée à PH6. Pendant la recirculation de la streptavidine une bulle s'est logée sur le spot de RSA empêchant l'analyse sur ce spot. Cependant, nous pourrons toujours nous servir de la surface comme control négatif.

La capture de la biotine sur la streptavidine provoque une légère augmentation du signal mais le signal est trop faible pour être quantifiable. La faible taille de la biotine et la limitation de la sensibilité de l'appareil peut expliquer ce résultat même si une molécule de streptavidine est susceptible de capturer deux biotines.



Figure 138 – Courbe SPR couvrant le protocole d'injection de la streptavidine et de la biotine.

La capture de la streptavidine en surface de la puce est donc vérifiée par les résultats de SPR. Il reste à valider la visualisation de la streptavidine fluorescente en microscopie. Nous avons tenté la visualisation sur notre banc expérimental mais la quantité capturée n'est pas suffisante pour être visualisée. Nous avons aussi essayé sans succès sur un macroscope (Z16 APOA - Leica) équipé pour la fluorescence avec une source à mercure 150W. En définitive, les appareils dont nous disposons ne sont pas suffisamment sensibles pour la détection de streptavidine fluorescente capturée en surface.

3.5.3. Fonctionnalisation des gouttes hors puce

La fonctionnalisation de surface solide validée, nous avons cherché à reproduire le protocole de fonctionnalisation de gouttes d'huiles de soja par de la biotine pour la détection de streptavidine [142]. Pour ce protocole , les gouttes et la phase aqueuse sont extraites de la puce de génération dans un tube Eppendorf de 1,5 mL (Figure 139). La phase continue reste au fond du tube. Les gouttes d'huile sont localisées au-dessus de la phase aqueuse et s'organisent en rangs serrés.



Figure 139 – Gouttes de 88 μ m. a) Dans un tube OD = 1,6 mm, ID = 250 μ m. b) Autoorganisées. c) en état séparation de phases dans un tube Eppendorf 1,5 mL.

3.5.3.1. Protocole proposé

Nous suivons le protocole suivant.

- 1. Génération de gouttes de soja dans du Tween20 5%.
- 2. Lavage des gouttes pour abaisser à 0,05% de Tween20.
- 3. Activation des gouttes à l'EDC/sNHS et greffage de la Biotine-PEG-NH₂.
- 4. Désactivation à l'éthanolamine des sites activés.
- 5. Capture de la streptavidine.

Les gouttes d'huiles de soja sont générées à haute vitesse dans du Tween20 à 5% avec la puce n°1 à un diamètre sphérique de D = 88 μ m. (Pc = 500 mbar, Pd = 800 mbar). Les gouttes et la phase aqueuse sont récupérées dans un tube Falcon 10 mL.

100 μ L de gouttes sont prélevées et mises en une solution tampon dans un tube Eppendorf 1,5 mL. Elles sont rincées à trois reprises par le remplacement de la solution tampon et centrifugation (2000g 10s) pour abaisser la concentration de tensioactif à 0,05%.

 $30 \ \mu L$ de gouttes sont prélevées et mises dans $220 \ \mu L$ d'une solution d'activation (EDC/sNHS) puis sont greffées (Biotine aminée). La réaction a lieu en agitation douce à l'obscurité à TA pendant 30 min. Les gouttes sont lavées à 2 reprises.

La phase aqueuse est remplacée par de l'éthanolamine 100mM à pH 8,5 pour désactiver les groupes carboxyliques activés. La réaction a lieu en agitation douce à l'obscurité à TA pendant 30 min. Les gouttes sont lavées à 3 reprises.

 $10 \ \mu L$ de gouttes sont placées dans 240 μL d'une solution contenant la streptavidine. La réaction a lieu en agitation douce à l'obscurité à TA pendant 15 min. Les gouttes sont lavées à 2 reprises.

3.5.3.2. Stabilité des émulsions

Nous avons appliqué ce protocole et avons été assez vite confrontés à une problématique de stabilité de l'émulsion. L'étape de biotinylation suffit à faire coalescer la majorité des gouttes. Nous avons aussi remarqué que la nature du tampon joue sur la stabilité à court terme de l'émulsion. L'éthanolamine perturbe la stabilité de l'émulsion.

Nous avons inséré 10 μ L de gouttes d'huiles de soja / Tween 0,5% (lavées x3) dans différentes solutions de 240 μ L afin d'y observer la stabilité des gouttes au cours du temps dans les conditions du protocole (obscurité, TA et agitation douce). La stabilité de l'émulsion a été évaluée pour les temps utiles au protocole (Tableau 12). L'émulsion est considérée comme stable si la coalescence des gouttes n'est pas remarquable ou minime.

Solution	Composition	Stabilité de l'émulsion
Tampon phosphate : 10 mM à pH 7.2	NaH2PO4 : 10 mM Na2HPO4 : 10 mM	Disparition des gouttes en 2h
Solution phosphate : 10 mM à pH 7.2	NaH2PO4 : 10 mM	Stable sur plusieurs jours
PBS	NaCl : 137 mM KCl : 2.7 mM Na2HPO4 : 8 mM KH2PO4 : 2 mM	Stable sur 2h. Instable sur plusieurs jours
Ethanolamine : 1 M à pH 8.5	H2NCH2CH2OH	Disparition des gouttes en 30 min
Ethanolamine : 100 mM à pH 8.5	H2NCH2CH2OH	Stable sur 30 min

Tableau 12 – Stabilité de l'émulsion en fonction des solutions et de leurs compositions chimiques.

Le tampon phosphate et l'éthanolamine à 1 M ne sont pas compatibles avec ce protocole. L'éthanolamine concentré à 100 mM est utilisable pour désactiver les sites activés pendant le temps défini par le protocole. Le PBS convient pour le protocole mais pas pour le stockage des gouttes. Les émulsions montrent la même stabilité dans le temps avec la solution phosphates que pour les tensioactifs que nous utilisons.

Malgré l'utilisation de la solution offrant la meilleure stabilité, l'émulsion est déstabilisée pendant le greffage de la biotine. Nous différons du protocole dont nous nous inspirons dans l'utilisation des tensioactifs de génération. Le protocole de référence emploie du Poloxamer 188 à 1%. C'est un copolymère tribloc de forme PEG-PPG-PEG. Reproduire ce protocole avec ce tensioactif pourrait conduire à une émulsion plus stable. Nous laissons de côté cette éventualité et appliquons la deuxième méthode de fonctionnalisation qui opère dans le dispositif au moment de la génération.

3.5.4. <u>Fonctionnalisation des gouttes sur puce</u>

Cette approche de fonctionnalisation consiste à diluer dans l'huile de génération des phospholipides déjà biotinylés qui décoreront la surface de la goutte au moment de sa formation dans la structure de génération microfluidique [104]. Pour valider ce concept, nous capitalisons sur les travaux présentés jusqu'à présents et avons mis en place une expérimentation de fonctionnalisation de goutes et de capture de biotine dans la puce n°3 (Figure 140). Les gouttes sont générées puis organisées dans la chambre grâce à l'utilisation des filtres de drainage. De la streptavidine fluorescente est injecté dans le réseau de goutte en vue d'être capturée par la biotine. La validation de la capture se fera par observation en microscopie optique. L'huile biotinylée utilisée ici a été fournie par l'équipe de Jacques Fattaccioli du Laboratoire Pôle Microfluidique de l'Institut Pierre-Gilles de Gennes.



Figure 140 – Montage expérimental pour l'injection de streptavidine dans le réseau de goutte (puce n°3).

3.5.4.1. Plan d'expérimentation

Nous utilisons le protocole suivant.

- 1. Génération et organisation des gouttes.
- 2. Injection de la streptavidine fluorescente
- 3. Evacuation des réactions aspécifiques par rinçage
- 4. Visualisation de la capture de la streptavidine

3.5.4.2. *Résultats obtenus*

Les gouttes d'huiles de soja biotinylées sont générées dans la jonction en T (20µm) à des débits de $Q_c = 2 \mu L/min$ pour le Tween20 1% et $Q_d = 0.5 \mu L/min$ pour l'huile. Les gouttes sont organisées dans la chambre au régime de génération (Figure 141).



Figure 141 – Gouttes fonctionnalisées organisées avant injection de l'échantillon.

La streptavidine fluorescente est mise en solution à $C_{\text{Streptavidine}} = 0,2 \text{ mg/mL}$ dans du Tween20 0,5%. Elle est injectée dans la boucle d'injection manuellement ($V_{\text{Boucle}} = 150 \mu$ L). La boucle est placée

dans le circuit d'injection. La streptavidine est chargée au niveau de la chambre par le pousse-seringue à $Q_p = 15 \mu L/min$ pendant 1m10 (Tween20 1%).

L'injection de la streptavidine dans les gouttes s'effectue à $Q_p = 0.5 \mu L/min$ pour ne pas désorganiser les gouttes. L'injection est arrêtée au bout de 30 min pour injecter 15µL de solution de streptavidine. Au moment du passage de l'étape d'injection à l'étape de rinçage une manipulation malencontreuse des vannes a provoqué la désorganisation complète des gouttes (Figure 142).



Figure 142 – Après 30 min d'injection : a) Fluorescence du fond de canal dû à la streptavidine. b) Gouttes désorganisées et collées entre elles.

Nous pouvons remarquer la fluorescence des canaux due à une capture aspécifique de la streptavidine en fond de canal. Les gouttes restant dans la chambre sont fortement fixées entre elles et sur les parois. La chambre est rincée à $Q_p = 5 \mu L/min$ pendant 1 min pour évacuer la streptavidine et faire disparaitre la fluorescence. A ce débit, les gouttes ne bougent pas dans la chambre. Il faut injecter à un débit élevé de $Q_p = 55 \mu L/min$ pour générer du mouvement au niveau des gouttes (Figure 143).



Figure 143 – Déformation d'un amoncellement de goutte à Q_p = 55 μ L/min après injection de la streptavidine.

Il est interressant de constater que les gouttes se déplacent en amoncellement mobile, forment des connection, se déconnectent et se reconnectent dynamiquement. Lorsqu'elles rentrent en contact, au lieu de glisser les unes sur les autres, elle orbitent entre elles en maintenant un contact ponctuel.

Pour observer leur interaction avec les gouttes de la chambre de détection, nous avons poussé des gouttes présentes dans la chambre de génération dans la chambre de détection à $Q_c = 2 \mu L/min$. Le canal central de la chambre est ouvert en sortie. Les canaux de drainage sont fermés. A la différence des gouttes de la chambre, ces gouttes sont mobiles et ne s'accrochent pas ensemble. Elles glissent lorsqu'elles rentrent en contact avec les gouttes de la chambre. Durant cette manipulation, des gouttes figées en sortie de chambre se sont détachées un phénomène de percolation forme un couloir d'écoulement (Figure 144). Les gouttes forment une structure maillée de gouttes fixées entre elles. Le débit imposé a augmenté la pression en amont de l'amoncellement ce qui a provoqué le détachement des gouttes dans la partie de la structure la plus fragile.



Figure 144 – Maillage de gouttes a) avant et b) après formation du couloir d'écoulement.

Nous supposons que la streptavidine capturée en surface des gouttes est responsable de la rigidification du réseau de goutte, de leur faible mobilité et des interactions de « collage dynamique » entre elles. Nous n'avons pas pu percevoir la capture de la streptavidine autour des gouttes. Nous avons pu observer la capture aspécifique de la streptavidine en surface de canal. Cela démontre qu'une étape de passivation des canaux, avec par exemple de la RSA, est à intégrer au protocole. Des expérimentations supplémentaires avec vérification par fluorescence sont nécessaires pour valider l'étape de capture de la streptavidine en surface de gouttes.

Nous avons cherché à fonctionnaliser des gouttes pour transformer leur surface en interface de détection biologique. Le modèle biologique choisi pour valider l'étape de reconnaissance a été le couple biotine/streptavidine. Pour ce couple, une forte interaction, une bonne spécificité et une bonne connaissance de ce modèle en font un bon élément de validation.

La première approche a été de vouloir fonctionnaliser des gouttes d'huile déjà formées. Nous avons tenté de reproduire un protocole d'activation des terminaisons carboxyliques présentes en surface de gouttes d'huiles végétales pour y greffer de la biotine aminée par liaison peptidique. Plusieurs des réactions misent en œuvre provoquent la déstabilisation des émulsions jusqu'à provoquer la coalescence complète des gouttes. Les mécanismes chimiques entrant en jeu au niveau de la stabilité des émulsions pendant ces réactions sont difficiles à identifier et à appréhender. Nous avons donc abandonné cette piste pour appliquer un protocole de fonctionnalisation plus robuste.

La deuxième approche consiste à fonctionnaliser les gouttes au moment de la génération dans le dispositif grâce à des tensioactifs fonctionnalisés présents dans l'huile. Nous avons pu mettre en œuvre les étapes de fonctionnalisation et de capture dans le dispositif. Nous n'avons pas pu vérifier les résultats de capture par technique de fluorescence par manque d'équipements suffisamment sensibles. Nous avons tout de même observé un comportement de gouttes inédit dans nos dispositifs après l'injection de la streptavidine.

L'objectif de fonctionnaliser des gouttes a été accompli, mais plus important encore nous sommes arrivés à valider la mise en place et l'application d'un protocole de détection sur nos dispositifs et sur le banc expérimental.

3.6. Conclusion

Le sujet traité dans ce chapitre consistait à développer un dispositif microfluidique servant à détecter un élément biologique par détection acoustique en utilisant la surface de gouttes comme interfaces de détection. Le dispositif de détection devait réaliser les fonctions principales suivantes : la génération et l'organisation de gouttes en rangs serrés, leur fonctionnalisation, la capture d'élément en surface de goutte et la détection acoustique de cette capture. De la définition du sujet nous pouvons définir des domaines liés à la microfluidique, l'acoustique, la physicochimie des surfaces et la biologie. Nous pouvons ajouter les domaines de la microfabrication et de l'instrumentation microfluidique relatifs

à l'élaboration des dispositifs et à leur mise en œuvre. Le travail réalisé pour ce chapitre recouvre donc tous ces domaines.

Nous sommes partis de l'idée d'utiliser des gouttes comme interfaces de détection acoustique comme solution à un problème de régénération de la couche de biorécepteurs des capteurs. Nous avons appuyé le choix de l'utilisation des capteurs à ondes de Lamb pour leur capacité à fournir des mesures découplées de propriétés physiques des liquides au contact de la membrane de détection (exploitation d'ondes évanescentes). Nous avons alors dimensionné une structure de détection pour générer de telles ondes capables de pénétrer le liquide sur la hauteur du canal et donc les gouttes. Les dimensions des chambres de détections et des dispositifs microfluidiques sont établies en fonction de critères multiphysiques.

Nous avons ensuite démontré l'intérêt d'utiliser des gouttes comme interface de détection par rapport au gain en surface de détection qu'elles offrent par rapport aux capteurs traditionnels plans. Ce gain en surface est maximisé pour des gouttes organisées en rang serré. A aussi été étudié l'intérêt des gouttes vis-à-vis de la dynamique de capture de molécules en surface.

A partir de ces données, nous avons réalisé trois versions de dispositifs évoluant en parallèle avec le développement du banc expérimental utilisé pour leur mise en œuvre. Par les expérimentations sur ces dispositifs, nous avons étudié la génération de gouttes dans une jonction en T en fonction des huiles et des surfactants utilisés de sorte qu'elles puissent être fonctionnalisées et réutilisées après régénération. La nature de l'huile a donc été changée pour ces raisons. Nous avons conçu et réalisé les dispositifs par technique de microfabrication en salle blanche et constaté l'influence des paramètres de réalisation sur la génération des bulles et les écoulements. Nous avons développé des structures permettant les actions combinées de l'organisation des gouttes dans une chambre de détection et de l'injection des réactifs. Nous avons ensuite optimisé ces fonctions par le redimensionnement des filtres et l'adaptation du circuit fluidique entourant le dispositif. La partie microfluidique a abouti au niveau de la mise en œuvre du dispositif. Quelques simulations liées aux écoulements des gouttes ont été effectuées sans pour autant intégrer leurs propriétés physiques. Il reste la possibilité d'étudier l'organisation des gouttes par la définition de modèles et des mesures expérimentales liées aux diamètres des gouttes et aux débits de drainage. Pour l'injection aussi, la réalisation de simulations liées à un modèle simplifié de gouttes et envisageable. En revanche, la simulation temporelle de l'organisation de gouttes en 2D et en 3D est inenvisageable en raison de la complexité du système étudié. Leur étude devra passer par la définition de modèles simplifiés.

Concernant les étapes liées à la détection d'éléments biologiques, nous sommes arrivés au niveau de la preuve de concept. Nous avons tenté de fonctionnaliser des gouttes hors puce par l'application d'un protocole tiré de la littérature mais la problématique de stabilité des émulsions lors de réactions chimiques dépasse le cadre d'application de cette thèse. Nous avons donc appliqué une méthode de fonctionnalisation dans les dispositifs, beaucoup plus robuste, permettant l'expérimentation des fonctionnalisation et la capture, jusqu'à l'étape précédant la détection acoustique. Nous avons pu réaliser cette expérimentation en nous appuyant sur la partie microfluidique du dispositif et du banc expérimental arrivé à maturité. Nous avons été limités par nos moyens de détection et les échéances du contrat de thèses pour poursuivre les expérimentations nécessaires à la validation des résultats obtenus. Néanmoins, les parties expérimental a été développé pour être facile d'utilisation et polyvalent. Le protocole expérimental est établi et reproductible. De nouvelles expérimentations sur le modèle établi ou sur un nouveau modèle sont possibles dès à présent.

La partie acoustique n'a pu être traitée en raison d'une problématique liée la réalisation. Le dispositif a été conceptualisé sur la base de notre standard de puce et les parties de génération et de mesures acoustiques ont été dimensionnées. Un protocole détaillé de fabrication du dispositif acoustique par technologie de microfabrication a été défini. Les dispositifs microfluidiques réalisés comptent 3 étapes principales de fabrication pour 2 masques : gravure des canaux, gravure traversante des ouvertures d'accès et capotage par soudure anodique d'une fenêtre en verre. La fabrication du dispositif acoustofluidique demanderait 15 étapes principales pour 7 masques. C'est un projet complexe qui

nécessitera plusieurs mois de développement en raison des verrous technologiques que nous avons identifiés. Un stage post-doctoral de 6 mois est prévu sur la continuité de ce projet pour la réalisation du dispositif final.

Sur ce sujet, la partie microfluidique diphasique a été traitée. Les dispositifs réalisés et le banc expérimental développé permettent de générer des gouttes, de les organiser et d'y injecter des réactifs. La partie liée à la biologie a été mise en pratique et a abouti sur une preuve de concept. Des expérimentations supplémentaires permettront de confirmer les résultats obtenus. La partie acoustique a été conceptualisée et nécessitera du développement lié à sa réalisation en salle blanche. Les parties réalisées sont fonctionnelles et sont réutilisables pour d'autres travaux de recherche.

Le sujet décrit dans ce chapitre a constitué une partie importante des études réalisées durant cette thèse. Il ne constitue néanmoins pas l'ensemble des travaux effectués. Nous déjà avons mentionnés les études ancillaires menées en parallèle de ce sujet principal. La première d'entre elles concerne l'homogénéisation des vitesses d'écoulements dans les puces microfluidiques de grande surface. Nous avons pu constater que dans la chambre d'injection, le liquide injecté se propageait de manière non uniforme dans le réseau de goutte, i.e. que les vitesses de traversées du réseau de goutte n'étaient pas égales sur la largeur de la chambre et que l'injection ne pénétrait pas au même instant sur tout le bord du réseau de goutte. Il est alors nécessaire de structurer les canaux d'entrées et de sortie de la chambre réactionnelle pour que les vitesses d'écoulement y soient homogènes. Cela fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 4

Homogénéisation des vitesses d'écoulement dans une cellule microfluidique

4.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté la fabrication et la mise en œuvre d'une puce microfluidique diphasique. A cette occasion, nous avons pu constater que la géométrie des puces joue un rôle prépondérant dans leur comportement fluidique.

Le nombre et la disposition des entrées/sorties fluidique impactent directement l'homogénéité des écoulements dans la chambre réactionnelle. Dans le cas de cette puce diphasique, l'homogénéité, non seulement des écoulements mais également par voie de conséquence le caractère auto-organisé des bulles dans la chambre réactionnelle, devient primordiale pour assurer une détection acoustique des interactions biologiques étudiées.

En fait, les biocapteurs résonants sont connus pour leur grande précision et pour leur capacité à être hautement miniaturisés. Cependant, le coût de leur fabrication, même dans des conditions de fabrications en lot autorisées par les procédés de microfabrication, les rend impropres à une utilisation à usage unique. En conséquence, leur intérêt comme potentiels produits commerciaux, réside dans la capacité à être utilisé le plus grand nombre de fois possible. Ainsi, toute partie du biocapteur en contact avec un fluide se doit de tolérer les procédés de nettoyage et régénération qui, souvent, utilisent des produits chimiques agressifs (bains à base de H₃PO₄ et/ou H₂SO₄) et de conserver les caractéristiques initiales du capteur. On comprend désormais que l'homogénéisation des écoulements à l'intérieur des biopuces revêt une importance cruciale.

Dans ce chapitre, nous présentons les travaux réalisés pour définir une interface fluidique qui répond aux contraintes exprimées plus haut. Elle permet de contrôler l'uniformité des écoulements au niveau de la chambre réactionnelle, *i.e.* au niveau de la surface vibrante. Nous étudions différentes configurations de canaux d'entrées et de sorties et nous estimons leurs performances en termes d'homogénéité au moyen de méthodes numériques de simulation en éléments finis. Comme pour les puces présentées dans le chapitre précédent, la microfabrication repose sur la gravure humide du silicium pour les raisons déjà mentionnées dans le chapitre 2. Egalement, et ainsi que mentionné dans les pages précédentes, la soudure anodique d'un capot de verre permet de garantir l'observation précise des écoulements au niveau de la surface réactionnelle. En conséquence, l'utilisation des méthodes de µPIV (microparticule image vélocimétrie) sur ces surfaces de grandes dimensions permet de confirmer les efficacités des différentes configurations estimées numériquement. On retrouve ici l'aspect multi-échelle dont il a déjà été fait mention dans le chapitre 2.

Dans la suite, nous présentons la problématique générale liée à l'homogénéisation des écoulements sur de grandes surfaces. Nous présenterons ensuite les travaux concernant le design et la simulation numérique. En particulier, nous détaillerons les caractéristiques des interfaces fluidiques et les simulations numériques qui en découlent. Nous aborderons ensuite les aspects de microfabrication. Entre autres choses, nous mentionnerons l'utilisation de structures de compensations de sous-gravures indispensables à la fabrication de circuits microfluidique par gravure humide du silicium. Enfin, nous présenterons les résultats expérimentaux obtenus avec les différentes configurations de puce avant de proposer une conclusion à ce chapitre.

4.2. Positionnement et exposé de la problématique

Les dispositifs piézoélectriques comme les dispositifs à ondes de volumes (BAW : bulk acoustic waves) ou à ondes de surface (SAW : surface acoustic waves) sont de plus en plus performants dans les applications biocapteurs. Ils sont très sensibles pour la détection de masse [145], [146], de variations de propriétés visqueuses ou viscoélastiques [147], [148] ou encore de changements de conformation de biomolécules greffées dans le but de mieux comprendre les interactions biomoléculaires [149], [150]. Dans le domaine des biocapteurs, la grande force des systèmes résonants piézoélectriques réside dans leur haute sensibilité et adaptabilité et à leur capacité à fournir des solutions intégrées, sans fil et nomades de petite taille. Cependant le haut degré de miniaturisation qu'il est possible d'obtenir entraine son cortège d'inconvénients. En premier lieu le coût associé à la fabrication de dispositifs piézoélectriques, les microstructures nécessaires à la fabrication de puces microfluidiques aux échelles dimensionnelles désirées. Pour répondre à ces inconvénients, nous décrivons ici une interface

microfluidique qui peut être intégrée à un capteur piézoélectrique réutilisable et qui permet de mettre les biofluides en contact avec les surfaces sensibles (Figure 145).



Figure 145 – Vue éclatée d'un capteur BioMEMS (Biomedical MicroElectroMechanical System) basé sur l'assemblage d'un réseau de membranes piézoélectriques fonctionnalisées muni d'une interface microfluidique utilisé pour le suivi en temps réel de bioréactions.

L'interface microfluidique a pour rôle essentiel d'aider au contrôle des flux sur la surface fonctionnalisée de manière à équilibrer les effets convectifs et diffusifs et de contrôler la dynamique du capteur [136], [151]. Cependant, la zone réactionnelle mesure 1 cm² et comprend plusieurs membranes piézoélectriques. Il est primordial de l'écoulement des fluides biologiques soit parfaitement homogène à l'intérieur de cette zone réactionnelle de manière à ce que chacune des membranes soit confrontée à la même quantité de fluide à analyser ou plus exactement à la même concentration en bio-analyte. De plus, l'interface doit idéalement être biocompatible (au regard des espèces biologiques concernées) et, de fait, ne doit pas libérer d'espèces chimiques ou de microparticules délétères pour les bio-reconnaissances visées. Également, et comme déjà mentionné dans l'introduction de ce chapitre, l'interface doit être chimiquement résistante, tant vis-à-vis des solutions d'analyte que vis-à-vis des produits nécessaires à son nettoyage et à sa régénération. Enfin, l'interface microfluidique étant soudée de manière anodique à la membrane piézoélectrique, les deux matériaux doivent présenter des propriétés mécaniques et thermiques similaires.

Dans la littérature, on trouve des interfaces avec entrée/sortie unique (cas de la Figure 145) avec ou sans structure d'adaptation géométrique (tapers). Dans ce cas, les structures conduisent inévitablement à des écoulements inhomogènes [151], [152]. Afin d'améliorer l'homogénéité, des systèmes à collecteur sont utilisés en entrée et/ou sortie de manière à répartir uniformément les fluides au niveau du périmètre de la chambre [153]. De manière presque surprenante, nous n'avons trouvé que très peu d'études concernant l'optimisation de l'homogénéité des écoulements, en particulier concernant des chambres réactionnelles de grande dimension (1 cm²). Sais *et al.* [151] proposent une méthode visant à réduire l'encombrement du système collecteur et permettant d'obtenir un écoulement uniforme dans une chambre rectangulaire. Dans leurs études, ils ne discutent pas des chambres en forme de losange bien qu'ils reconnaissent leur plus grande efficacité. De plus, leurs résultats ne montrent que l'amplitude des vitesses du fluide le long d'un axe unique et ne présentent pas de résultats sur le champ des vitesses sur la totalité de la surface réactionnelle. C'est précisément ce type de donnée qui peut permettre de corroborer les résultats expérimentaux aux simulations numériques. Plus récemment, Palovic et al. [152] ont amélioré l'homogénéité dans une chambre circulaire à matériau poreux en proposant une structure à 3 entrées et 3 sorties séparées angulairement de 30°. Dans leur travail, le critère d'optimisation était le temps de séjour des fluides dans la chambre réactionnelle plutôt que l'homogénéité de l'écoulement proprement dite. En fait, leur but était d'optimiser l'efficacité des réactions chimiques. Dans une autre étude, Liao *et al.* [153] proposent deux structures à bifurcation à quatre niveaux utilisés pour remplir une chambre de 1 cm². Dans une des structures, les canaux présentent une largeur unique et constante. Dans la seconde, une approche biomimétique est proposée dans laquelle, à chaque embranchement du collecteur, la largeur des canaux est divisée par 2 conformément à la loi de Murray [154]. Ils montrent que la structure biomimétique améliore les réactions photocatalytiques qu'ils étudient. En revanche, les résultats de leurs simulations numériques montrent que quand la pression à l'intérieur de la chambre est maintenue à une faible valeur, le profil des vitesses de l'écoulement devient moins homogène. Enfin, ils ne présentent pas de mesures expérimentales directes des vitesses d'écoulement dans la chambre, leur critère de jugement se rapportant aux résultats nets de photocatalyse.

Nous constatons donc que les approches proposées dans la littérature concernant l'homogénéisation des écoulements ne regroupent pas les aspects de simulation numérique et de vérification expérimentale de résultats théoriques. En particulier, la conception de structures fluidiques visant à homogénéiser les écoulements est évaluée au travers du prisme applicatif donc de manière plus ou moins empirique.

Il nous semble impératif de considérer les écoulements comme une entité physique dont il faut, dans un premier temps, modéliser le comportement et, dans un second temps, mettre à l'épreuve de l'expérience les résultats obtenus par simulation. Cela implique de visualiser les écoulements et de quantifier les champs de vitesse à une échelle microscopique dans des structures macroscopiques. Les méthodes de μ PIV développée dans ce contexte dimensionnel seront présentées dans les parties suivantes.

Avant cela, et même si l'on considère les écoulements comme une entité physique à part entière, nous ne pouvons décorréler la conception de l'interface fluidique de l'application pour laquelle nous l'imaginons. Pour cela, nous devons considérer un modèle de biointeraction type qui permettra de dimensionner les structures et d'en simuler les comportements. Cet aspect fait l'objet de la partie suivante dans laquelle nous retrouverons des notions générales sur l'écoulement des fluides présentées dans le chapitre 1.

4.3. Conception et simulation

4.3.1. <u>Caractéristiques de l'interface fluidique</u>

Nous désirons que le biocapteur atteigne des performances au moins égales à celles obtenues de manière standard en SPR c'est-à-dire atteindre des limites de détection de l'ordre de 0.1 nM, M représentant une concentration de 1 mol/L [155], [156]. L'architecture présentée sur la Figure 146 sépare la partie interface fluidique de la partie piézoélectrique [157] ce qui permet de les optimiser de manière indépendante. Les contraintes liées aux problématiques de greffage d'une biointerface et de fabrication microfluidique peuvent ainsi être adressées individuellement [158], [159]. La partie sensible du capteur a déjà été présentée par ailleurs [157]. Ici, nous nous concentrons sur sa conception de manière à mieux identifier les paramètres clés de l'interface fluidique. Le capteur résonnant piézoélectrique est fabriqué en AsGa, un matériau piézoélectrique pour lequel les méthodes de greffage utilisant la chimie des thiols sont directement transposables des méthodes utilisées sur or, or pour lequel un grand nombre d'analytes sont facilement disponibles.

La biofonctionalisation est opérée sur une surface d'AsGa désoxydée. Nous nous assurons que les réactions de bioreconnaissance se traduisent bien par un shift de la fréquence de résonance du capteur et que le fonctionnalisation thiolée de la surface peut être correctement régénérée [160]. Pour une membrane résonante carrée de 3 mm de côté et de 3 μ m d'épaisseur, la fréquence de résonance du mode fondamental est de 557 MHz. Cela conduit à une sensibilité en termes de détection de masse de 350 fg/Hz [157]. Afin d'améliorer sa fiabilité, et avec l'idée ultérieure de procéder à des analyses multicibles, le capteur est redondant dans sa forme actuelle puisqu'il comporte déjà un réseau de 3×3 membranes résonantes en regard de l'interface fluidique. La surface totale d'interaction s'élève à environ 1 cm².

Dans le but d'estimer les performances en termes de biocapteur, nous considérons comme modèle biologique une protéine standard de masse 100 kDa, ce qui correspond à 1.6×10^{-19} g/molécule. Ainsi, avec une résolution fréquentielle de 1 Hz, le capteur présente une résolution de 350 fg correspondant à la capture d'environ 2×10^6 protéines. Si l'on considère que chaque capteur présente une surface de 6 mm² et qu'on estime à environ 10^{11} sites de capture par cm², nous pouvons estimer à 10^{11} le nombre de sites de capture sur chaque membrane. Cela résulte en une dynamique pleine échelle confortable d'environ 5000 fois la résolution du capteur.

La dynamique du capteur dépend principalement du taux avec lequel les analytes atteignent la surface fonctionnalisée. Cependant, cette problématique de transport est rendue plus compliquée encore par le fait qu'apparait une zone de déplétion au-dessus de la membrane quand l'analyte se lie à la surface [136]. Le régime de fonctionnement du capteur doit être estimé en comparant les durées caractéristiques de convection et de diffusion loin de la surface (avec une profondeur de canal caractéristique *H*) et au voisinage de la surface (avec une longueur caractéristique *L*). Dans les deux cas, cela revient à évaluer les nombres de Péclet, respectivement Pe_H et Pe_L donnés par :

$$Pe_{H} = \frac{\bar{\nu}H}{D}$$
$$Pe_{L} = \frac{\bar{\nu}L^{2}}{HD}$$

Avec $\bar{\nu}$ représentant la vitesse moyenne du fluide dans la chambre. Dans le cas d'une diffusivité de D = 50 µm²/s, ce qui correspond typiquement à une protéine de 100 kDa dans de l'eau, une profondeur de chambre H = 80 µm et une longueur de capteur L = 3 mm, nous obtenons $Pe_H = 1.6 \times 10^6 \bar{\nu}$ et $Pe_L = 1.3 \times 10^{10} \bar{\nu}$. Les deux sont largement supérieurs à 1 pour une vitesse de fluide standard supérieure à 10 µm/s, ce qui signifie que, pour le premier cas, la zone de déplétion est plus fine que la profondeur de la zone réactionnelle et, dans le second cas, que cette zone de déplétion est bien plus courte que la longueur de la membrane. Le flux massique de transport des molécules vers la surface réactionnelle est donnée par [136] :

$$J \approx Dc_0 W \sqrt[3]{Pe_L}$$

Avec c_0 la concentration et W=L la largeur de la zone réactionnelle. Cela donne, pour une concentration cible en molécule de 0.1 nM et un capteur carré de 3 mm de côté, un flux net en analyte $J \approx 2.1 \times 10^7 \sqrt[3]{\bar{\nu}}$ molécules/s.

Le temps nécessaire au transport de l'analyte doit être plus rapide que le temps nécessaire à ce dernier pour se lier avec son conjugué greffé sur la surface réactionnelle de manière à augmenter l'efficacité de la bioreconnaissance. Nous savons qu'une vitesse de fluide d'environ 100 μ m/s conduit à un taux de transport de 10⁶ molécules/s. Précédemment, nous avons vu que la résolution du capteur conduisait à la capture de 2×10⁶ molécules. Ainsi, 2 s sont nécessaires pour mettre en contact ce nombre de molécules avec la surface réactionnelle, ce qui est bien inférieur que le temps caractéristique de bioreconnaissance.

Cette analyse permet d'estimer la vitesse que le fluide doit atteindre dans le capteur. Cependant, l'équation du flux montre une dépendance en racine cubique entre la vitesse du fluide et la dynamique du capteur. En fait, conduire de manière homogène l'analyte vers les 9 membranes du réseau requiert un taux de transport uniforme qui ne peut être obtenu qu'avec une homogénéité du champ de vitesse du fluide sur 1 cm². Le but de cette partie est donc de mettre en avant les stratégies d'optimisation topographique des canaux conduisant à une uniformité du champ de vitesse optimale au travers de la totalité de la zone réactionnelle tout en conservant une compacité acceptable du capteur. De plus, les contraintes liées à l'aspect multi-usage nous imposent d'être sûr que les étapes de nettoyage/régénération

seront efficaces c'est-à-dire qu'il faudra éliminer tout risque d'existence de volume mort (vitesse de fluide nulle) dans le capteur.

Pour évaluer de manière qualitative l'uniformité des vitesses et les performances de nettoyage de l'interface, nous étudions le champ des vitesses à l'aide d'outils numériques. Nous avons étudié 6 configurations microfluidiques (Figure 147). Chacune présente différentes géométries de canaux. Nous pouvons ainsi comparer les distributions de vitesses de fluide dans la zone réactionnelle.



Figure 147 – Topologies d'interface microfluidique alimentant une chambre de 1 cm². La barre d'échelle représente 10 mm).

Les 3 premières géométries (C1 à C3) sont en grande partie inspirées de la littérature et nous servirons de référence. Les 3 autres géométries (C4 à C6) sont originales. La géométrie C1 est la configuration la plus simple avec une seule entrée et une seule sortie. Tout en gardant une seule entrée et une seule sortie, la géométrie C2 permet de fortement limiter l'existence de volumes morts qui existent dans les coins de la géométrie C1. La géométrie C3 se propose d'annuler les volumes morts dans une zone réactionnelle carrée par utilisation de collecteurs tant en entrée qu'en sortie du dispositif. Les formes des canaux et l'orientation de la zone réactionnelle dans les géométries C4 à C6 ont été adaptées aux possibilités de gravure humide du silicium que nous avons choisi d'utiliser (gravure anisotrope comme nous le verrons plus loin). Il faut noter que pour ces 3 géométries, la section de la zone évolue suivant la direction de propagation du fluide (cavité en losange). La géométrie C6 est une tentative pour distribuer le fluide de manière uniforme tant en entrée qu'en sortie du dispositif.

4.3.2. <u>Simulation des écoulements</u>

Comme on peut le voir sur la Figure 147, les architectures en collecteur divisent le fluide en multiples branches qui peuvent présenter différentes géométries et dimensions de canaux. Dans ces architectures, les microcanaux présentent des longueurs et des largeurs différentes de manière à conduire aux mêmes résistances au flux suivant le sens de propagation dans chaque géométrie. Pour évaluer le champ des vitesses dans les cavités, nous utilisons le module microfluidique du logiciel d'éléments finis COMSOL multiphysics® software (version 4.2, Comsol Inc., Burlington, NJ, USA). En raison du rapport épaisseur/longueur de l'interface microfluidique (80 µm/1 cm), nous restreignons le problème à une simulation 2D des écoulements. Les simulations, relatives à un écoulement laminaire d'un fluide incompressible, sont conduites suivant le modèle de Navier-Stokes [161], [162]. Nous considérons un fluide dont les propriétés physiques sont celles de l'eau et une différence de pression de 150 mbar est
utilisée entre l'entrée et la sortie du dispositif. Les principaux résultats de simulation concernant les lignes de flux sont présentés sur la Figure 148.



Figure 148 – Simulation des lignes de flux dans la zone réactionnelle pour les différentes géométries.

En C1, et dans une moindre mesure en C4, nous observons que le flux au niveau des coins est réduit. Cela est dû au fait qu'à ces endroits, le fluide doit parcourir une distance beaucoup plus grande, ce qui augmente d'autant la résistance fluidique. Ces volumes morts sont typiques des endroits de la zone réactionnelle qu'il sera très difficile de nettoyer et également des endroits où le risque de piéger d'éventuelle bulles sera grand. De ce point de vue, la géométrie C2 réduit considérablement ce type d'inconvénient. En fait, les longueurs des lignes de flux varient dans une proportion bien moindre ce qui évite presque complètement l'apparition de volumes morts. Nous remarquons également que les configurations à collecteur C3, C5 et C6 améliorent considérablement les choses puisque le fluide est distribué de manière uniforme au niveau des entrées et sorties.

Figure 149, l'amplitude des vitesses moyennes dans la zone réactionnelle et les canaux ce qui permet d'en évaluer l'uniformité. Le profil des vitesses confirme l'existence de volumes morts dans les coins des géométries C1 et C4 avec des vitesses presque nulles. En fait, si on regarde cette figure, il devient clair que les structures avec collecteurs à l'entrée et à la sortie sont indispensables à l'obtention d'une distribution uniforme des vitesses dans la chambre réactionnelle. Dans les géométries C3 et C6, la fluctuation relative des vitesses atteint 100% (pour C6 entre 0.25 et 0.5 mm/s). Maintenant, si on ignore la zone proche du collecteur d'entrée et si l'on considère 98% de la surface totale de la chambre, les fluctuations des vitesses baissent à 4%.

Il est quelque peu contre-intuitif d'observer que la géométrie C6 est aussi efficace que la géométrie C3. En fait, comparé à la géométrie C3 pour laquelle la section de la chambre est uniforme, le parcours au centre de la géométrie C6 est plus long que celui proche des coins, ce qui devrait conduire à une résistance fluidique plus importante et donc réduire les possibilités d'un écoulement homogène. Cependant, un examen attentif des collecteurs en entrée et sortie de la géométrie C6 montre que les branches sont régulièrement distribuées sur les côtés du losange, ce qui augmente progressivement le flux au fur et à mesure que la section de la chambre augmente. On peut aussi remarquer que dans la géométrie C6, les collecteurs d'entrée et sortie ne sont pas symétriques et les canaux d'entrée et de sortie ne sont pas alignés. En fait, des collecteurs parfaitement symétriques conduisent aux plus mauvais résultats parce que les canaux d'entrée et sortie sont trop proches ce qui limite les possibilités d'homogénéisation de l'écoulement.



Figure 149 – Simulation numérique des vitesses moyennes des fluides dans les zones réactionnelles. La barre d'échelle est exprimée en mm/s et est limitée aux vitesses inférieures à 1 mm/s pour mieux visualiser les écoulements dans les chambres.

Une manière complémentaire de considérer la répartition des vitesses et de comparer les vitesses sur une section perpendiculaire au parcours le long du centre des zones réactionnelles. Le résultat est présenté en Figure 150.



Figure 150 – Profil des vitesses au centre des chambres réactionnelles. Les vitesses sont normalisées par la valeur de la vitesse au centre du parcours.

Les géométries C5 et C6 présentent des vitesses élevées à chaque extrémité du profil. Ceci est dû à la forme en losange des chambres et au fait que les collecteurs alimentent les coins supérieurs et inférieurs des chambres. Ce n'est pas le cas pour les autres géométries. Les géométries C3 et C6 conduisent à une meilleure uniformité des écoulements, la géométrie C6 présentant une homogénéité légèrement supérieure. En effet, la variation de vitesse représente 1% de la vitesse au centre de la zone

pour la géométrie C6 alors que cette variation s'élève à 4% pour la géométrie C3 (la structure C3 pourrait probablement être améliorée en élargissement un peu la chambre pour éviter d'avoir une arrivée de fluide en bordure de chambre). Ces deux géométries sont optimales pour la fabrication du capteur puisqu'elles conduisent aux meilleures homogénéités tout en évitant la formation de volumes morts.

Dans cette partie, nous avons présenté les résultats de simulation numériques des écoulements dans des chambres réactionnelles carrées ou losanges alimentées soit par des canaux uniques soit par des collecteurs aux géométries diverses. Il apparait que la géométrie optimale comporte une chambre en losange alimentée par des collecteurs dissymétriques.

Nous avons précisé plus haut que les chambres en losange pouvaient être plus facilement fabriquées en utilisant la gravure anisotrope humide du silicium. Dans la partie suivante, nous détaillons le procédé de fabrication de chambres en losange qui nécessite le recours à des structures de compensation de la sous gravure incontournables dans ce type de fabrication. Nous testerons les 3 géométries en losange décrites dans cette partie et nous mettrons en œuvre des méthodes de μ PIV sur grande surface afin de corroborer les résultats théoriques présentés ci-dessus.

4.4. Microfabrication par gravure anisotrope du silicium

Concernant les interfaces microfluidique, outre la topologie des circuits, le choix du matériau de fabrication revêt une importance particulière en raison de la nature des fluides qui devront y circuler. En fait, l'interface doit successivement véhiculer les solutions de thiols, solvants (éthanol et acétone), d'acides désoxydants (HCl et solutions à base d'H₃PO₄), les échantillons biologiques et enfin, puisque le capteur est réutilisable les solutions de nettoyage et de régénération (bains d'H₃PO₄ et d'H₂SO₄). L'interface devra donc présenter une haute résistance chimique et, bien sûr, être biocompatible.

Un grand nombre de matériaux sont utilisés en routine pour la fabrication d'interfaces microfluidiques. On peut citer par exemple le polydiméthylsiloxane (PDMS), les polymères, le verre, le silicium. Cependant, tous ne répondent pas aux critères retenus pour la fabrication de notre capteur. Dans le Tableau 13, nous recensons ce que nous identifions comme avantages et inconvénients des différentes méthodes de fabrication.

Matériau	Coût	Compatibilité AsGa	Coût de fabrication	Vieillissement	Régénération	Biocompatibilité
PDMS	bas	moyen	bas	bas	moyen	élevé
Polymère	bas	moyen	bas	bas	bas	moyen
GaAs	élevé	élevé	moyen	élevé	élevé	moyen
Verre	moyen	bas	élevé	élevé	moyen	élevé
Silicium (gravure sèche)	moyen	moyen	élevé	élevé	élevé	moyen
Silicium (gravure humide)	moyen	moyen	moyen	élevé	élevé	élevé

Tableau 13 – Avantages et inconvénients de différents matériaux pour un capteur ré-utilisable.

Le PDMS et les polymères ont tendance à se déformer par gonflement et résistent mal au vieillissement [163], [164]. Ils ne conviennent donc pas pour notre application. Le verre pourrait être un bon candidat mais son coefficient d'expansion thermique (16 ppm/K) est bien supérieur à celui de l'AsGa (6.8 ppm/K) ce qui rend les assemblages par soudure anodique verre/AsGa relativement fragiles

[165]. De plus, le verre est sujet à la corrosion dans l'acide H3PO4. Cette corrosion est cependant faible à température ambiante [166]. Au final, il apparait que le silicium répond à toutes les contraintes citées plus haut et il a déjà été couramment utilisé pour la fabrication des microsystèmes biomédicaux ou de microfluidique aux structures complexes [159], [167]. Parmi les techniques de micro-usinage du silicium, les gravures sèches et humide sont de loin les plus répandues. Cependant, la gravure sèche profonde (DRIE) provoque des résidus de films fluorocarbone sur les surfaces gravées [168]. Il est extrêmement difficile de complètement enlever ces films après gravure et ces derniers peuvent facilement se désagréger et les résidus relargués dans le capteur au long de sa durée de vie. Nous nous orientons donc vers la gravure humide au moyen de bases fortes (KOH, NaOH) qui peuvent aisément être rincées après fabrication.

Il faut enfin noter que le but poursuivi ici est de visualiser les écoulements au moyen des techniques de µPIV de manière à en estimer expérimentalement l'homogénéité. Un assemblage silicium/AsGa n'autoriserait pas la visualisation des fluides. C'est pourquoi, dans ces études de démonstration, nous retenons l'assemblage silicium/verre. Dans le cas de la fabrication réelle d'un microcapteur, l'AsGa sera évidemment utilisé pour ses propriétés piézoélectriques.

4.4.1. <u>Conception du circuit microfluidique</u>

Il existe une littérature abondante visant à comprendre les mécanismes de gravure anisotrope du silicium [169]–[172] Le but est de prévoir et contrôler la forme finale des usinages réalisés et ce, pour un large éventail de conditions de gravure. En effet, les formes, profondeurs et états de surface des structures réalisées par cette technique sont directement liées aux plans cristallographiques du cristal. Ce mécanisme de gravure interdit la fabrication de structures arrondies comme celle correspondant à la géométrie C2. Comme nous l'avons déjà précisé, nous choisissons les géométries de type collecteur C4, C5 et C6 pour notre démonstration. La formation de formes carrées dans un wafer de silicium de coupe (100) est connue et très bien maitrisée [169]–[172]. Lorsque les flancs des canaux sont orientés suivant la direction cristallographique <110> leur section est limitée par les plans (100) au fond et par les plans (111) inclinés de 54° au niveau des parois des canaux [171], [172]. Sachant que la gravure est fortement anisotrope dans notre cas de gravure humide KOH et que la vitesse de gravure des plans (111) est extrêmement basse, pour ne pas dire nulle, le phénomène de sous-gravure latérale est négligeable. Nous considérons donc que la largeur des canaux gravés est égale à la largeur des motifs photolithographiques définis sur le masque d'insolation. Les canaux ainsi formés présentent une section triangulaire limitée par les plans (111). On parle alors de V-grooves.

Cependant, les intersections des canaux avec la chambre au niveau des entrées et des sorties forment des structures convexes. Une sous-gravure importante est constatée au niveau de coins convexes car, dans ce cas, les coins frontières de gravure sont limités par des plans dont la vitesse de gravure et élevée. Les structures ainsi obtenues sont de formes complexes dont il est délicat de contrôler les géométries. La sous-gravure conduit à une déformation des angles droits correspondant aux coins ce qui influence grandement le comportement microfluidique des structures. Plusieurs plans cristallographiques émergent de cette sous-gravure, leur vitesse d'émergence dépendent des conditions de gravure (nature et concentration des bains de gravure, température et durée de gravure). La littérature précise tout de même que pour la gravure KOH, ce sont les plans {311} et {411} qui apparaissent [170], [173]–[176]. Il existe différentes approches pour compenser ce phénomène de sous-gravure. Le principe général consiste à déterminer des structures de motifs photolithographiques qui permettent de retarder l'émergence de ces plans à vitesse de gravure élevée et de retarder, autant que faire se peut, la sousgravure au niveau des coins lorsque la profondeur de gravure désirée est atteinte. La compensation repose donc sur la définition de structures retardantes devant être calculée pour définir le masque de photolithographie. Différentes équipes ont proposé de telles structures de compensation, plus ou moins complexes et efficaces. Elles recourent à des formes diverses, carrés, rectangles, triangles, orientées de différentes manières [173]–[177]. La structure de compensation que nous utilisons ici est décrite en référence [177]. L'espace requis pour la compensation est pris dans la longueur des canaux (V-grooves) grâce à une forme de structure extrêmement simple. Cette méthode peut être utilisée quelle que soit la durée de gravure totale (qui dépend de la profondeur de chambre désirée) pour peu que les V-grooves soient suffisamment longs. Cette structure de compensation ainsi que ses paramètres géométriques est présentée sur la Figure 151.



Figure 151 – Géométrie de la structure de compensation et paramètres associés. (a) Structure Q pour l'intersection de canaux perpendiculaires. (b) Structure I pour l'intersection d'un canal avec la chambre. Les lignes en pointillés et les surfaces grisées correspondent à la forme finale après gravure.

La valeur des paramètres est déterminée par des calculs de géométrie qui tiennent compte de la vitesse de gravure des différents plans susceptibles d'apparaitre. Ils sont résumés dans Tableau 14. Dans cette table, Q1, Q2 et Q3 correspondent à différent design d'intersection de canaux perpendiculaires avec des paramètres de compensation adaptés. I1 correspond aux paramètres pour une jonction entre la chambre et les canaux dans la géométrie C4. Pour la connexion des canaux avec la chambre dans les géométries C5 et C6, nous ménageons un espace de 450 µm sur le masque entre la fin du canal et le bord de la chambre.

Structure	α	β	γ	δ
Q1	100	170	50	0
Q2	100	170	50	50
Q3	100	210	25	50
I1	50	200	75	-

Tableau 14 – Valeur des paramètres géométriques des différentes structures de compensation (en μm).

4.4.2. <u>Procédé de fabrication</u>

La Figure 152 décrit le procédé de fabrication des interfaces. Les motifs sont photolithographiés sur un wafer de silicium oxydé thermiquement. Après développement de la résine et gravure de la couche d'oxyde, la gravure KOH débute dans un bain à 35% à une température de 65°C. Après gravure, le wafer est précautionneusement rincé et nettoyé de manière à enlever toute trace chimique résiduelle. Les ouvertures d'entrée et de sortie sont ménagées par usinage laser. Une méthode alternative pour créer ces ouvertures pourrait être d'utiliser une gravure sèche réactive comme la DRIE mais nous serions confrontés à la présence de résidus chimiques impossible à enlever comme mentionné plus haut. La gravure anisotrope KOH conduirait à la création d'ouvertures pyramidale dont la grande taille n'est pas envisageable ici. Rappelons qu'au final, ce type de dispositif sera fabriqué en AsGa, matériau dans lequel nous avons déjà réussi à percer des ouvertures par usinage laser. Ceci pourrait être utilisé dans le cas où les ouvertures devraient se trouver sur la même face que les membranes actives. Nous gardons donc ce procédé ici.



Les dernières étapes consistent à fermer les dispositifs avec du verre par soudure anodique puis à séparer les différents composants par une découpe à la scie de précision.

Figure 152 – Principales étapes du procédé de fabrication des dispositifs.

4.4.3. <u>Structures micro-usinées</u>

Le résultat des gravures KOH du silicium sont observée à l'ide d'un microscope (Mitutoyo FS70, Mitutoyo Corp., Kawasaki, Japan) équipé d'une caméra (IDS Eye, IDS Imaging Development Systems, Obersulm, Germany).

La Figure 153 montre les formes résultantes de la gravure pour le set de paramètres précisés en Tableau 14. Dans tous les cas, la profondeur de gravure est égale à 77 µm. Comme attendu, les structures de compensation permettent de limiter la sous-gravure au niveau des angles des canaux. Nous observons que les formes obtenues dépendent étroitement des paramètres de compensation utilisés. Par exemple, en Figure 153 (a), le coin est très fortement déformé alors qu'en Figure 153 (c), les canaux ne se rencontrent pas au niveau de ce même coin. En revanche en Figure 153 (b), la structure de compensation joue pleinement son rôle bien qu'un ajustement plus précis des paramètres est encore possible. Nous retiendrons donc ces paramètres pour la fabrication des dispositifs. Egalement, nous observons que les canaux sont correctement connectés à la chambre réactionnelle sur Figure 153 (d).



Figure 153 – Images prises au microscope des connections canaux-canaux et canaux-chambre pour les différents paramètres de compensation testés avec une profondeur de gravure de 77 μm. (a) cas du set Q1; (b) cas du set Q2; (c) cas du set Q3; (d) cas du set I1.

La Figure 154 montre l'ensemble des structures obtenues pour les géométries retenues. La durée de gravure est de 135 min dans une solution de potasse, les paramètres de compensation Q2 sont utilisés. Dans l'encart présenté en Figure 154 (c), nous observons clairement le développement des plans {411} déjà mentionnés plus haut. Ils apparaissent à la jonction des canaux dans les géométries C5 et C6. Ils apparaissent aussi à la jonction canaux-chambre malgré qu'un espacement des motifs ait été prévu.



Figure 154 – Résultats de fabrication des interfaces. (a) géométrie C4, entrée et sortie mono-canaux. (b) géométrie C5, collecteur en entrée, mono-canal en sortie. (c) géométrie C6 à double collecteur. L'insert en figure (c) montre une vue agrandie de la jonction entre canaux et entre les canaux et la chambre.

Dans cette partie, nous avons présenté les étapes clés de la conception puis de la réalisation d'interfaces microfluidiques testées en vue d'homogénéiser les écoulements au niveau des membranes actives. Après avoir choisi les matériaux compatibles avec une multi-utilisation des dispositifs, nous avons présenté les caractéristiques des gravures anisotropes du silicium dans la potasse et les phénomènes de sous-gravure qui en découlent.

L'utilisation de structures de compensation permet de fortement limiter ces phénomènes de sousgravure et de fabriquer les chambres réactionnelles conformément aux géométries décrites dans la partie précédente.

Dans la partie suivante, nous présentons le banc de caractérisation que nous avons utilisé ainsi que les méthodes de visualisation et caractérisation des écoulements que nous avons mis en œuvre.

4.5. Caractérisation expérimentale des écoulements

4.5.1. Montage et méthodes expérimentaux

Les écoulements sont caractérisés en utilisant deux méthodes : la vélocimétrie par microparticules et la visualisation par utilisation de solutions colorées.

Pour la vélocimétrie par microparticules (μ PIV), les images sont obtenues au moyen d'une loupe binoculaire (Nikon SMZ800, Nikon Instruments Inc.). Nous utilisons une caméra CCD haute résolution (2048×2048 pixels), noir et blanc, fonctionnant à 80 fps et équipée d'un shutter haute vitesse (iDS μ Eye UI-3370CP-M-GL Rev.2). L'éclairage des dispositifs est assuré par une source de lumière blanche halogène (Schott kl 2500). La loupe binoculaire est utilisée avec un grandissement ×1 de manière à imager l'ensemble de la surface des dispositifs sur le capteur de la caméra. La résolution obtenue est de 5.5 µm/pixel.

Utiliser un éclairage puissant couplé à une caméra haute sensibilité s'est révélé décisif pour obtenir des images à cadence élevée et de qualité suffisante pour pouvoir ensuite être traitée par µPIV. Ceci mérite d'être remarqué, particulièrement en raison de l'éclairage en réflexion que nous devons utiliser et du fait que la surface de silicium au fond des chambres n'est pas parfaitement plane. Ceci limite quelque peu les réflexions spéculaires, ce qui est bénéfique, mais induit des artefacts lumineux, ce qui est préjudiciable à nos mesures.

Une solution de microbilles en suspension est obtenue en ajoutant de bille de mélanine mono disperses de diamètre 920 nm dans de l'eau à une concentration de 0.1% vol./vol. (billes : MF-NB-COOH-S1058 de chez Microparticles GmbH). Le dispositif est rempli avec de l'eau dans un premier temps puis la suspension de microbille est injectée dans la boucle de chargement dans un deuxième temps (Figure 155 - trajet 1). La suspension est alors poussée dans le dispositif par de l'eau (Figure 155 - trajet 2). L'utilisation de valves permet l'injection de différents fluides sans déconnexion de tubulure. Dans le cas contraire, la formation de bulles dans le circuit serait quasiment inévitable.

Les microbilles présentent une vitesse de sédimentation estimée à 0.2 μ m/s. Nous nous arrangeons pour que les microbilles ne coulent pas de plus de 10 μ m (environ 12 % de la profondeur de la chambre) durant leur trajet au travers de la chambre. Ainsi, pour les expériences de μ PIV, nous utilisons un flux convectif de vitesse supérieure à 200 μ m/s dans la chambre. La durée de traversée de la chambre est donc de 50 s et, durant cette traversée, les microbilles coulent d'environ 10 μ m. La vitesse est contrôlée en imposant un gradient de pression hydrostatique d'environ 170 mbar (correspondant à une différence de hauteur de 1.70 m) entre le réservoir d'eau d'entrée et le réservoir de récupération en sortie (Figure 155).



Figure 155 – Représentation schématique du montage expérimental utilisé pour l'étude de vélocimétrie *fluidique*.

Pour chacune des géométries C4, C5, et C6, plus de 200 paires d'images séparées de 50 ms sont enregistrées pour traitement PIV. Le prétraitement et le traitement PIV des images sont réalisés au moyen de PyV, un software Python développé à FEMTO-ST [178]. Le prétraitement consiste à soustraire l'image de fond moyenne à toutes les images instantanées qui seront traitées. Cela permet de considérablement réduire les réflexions parasites et les motifs constants dans les images à traiter. La portion d'image sur laquelle est pratiquée lé µFIV correspond à la totalité des chambres réactionnelles. Nous excluons ainsi les canaux d'entrée et de sortie dans lesquels le gradient de vitesse est trop élevé et ne présente en fait que peu d'intérêt pour notre problématique. L'inter corrélation de chaque paire d'image conduit au champ des vitesses. Ce dernier est ensuite filtré de manière à retirer les vecteurs pour lesquels le ratio d'amplitude des deux premiers pics de corrélation est trop faible. Au final, nous faisons la moyenne des 200 champs de vitesse afin de générer une image de µPIV des vitesses fluidiques dans la chambre.

Concernant les expériences menées avec des liquides colorés, nous utilisons une caméra CCD couleur à 25 fps (iDS μ Eye) et la même source de lumière blanche ainsi que la même binoculaire que pour la μ PIV. La chambre est remplie avec de l'eau dans un premier temps. Dans un second temps, nous enregistrons les images lorsqu'une solution rouge est injectée au moyen de la boucle (Figure 155) de manière à éviter la formation de bulles lors du changement rapide de fluide.

Durant toutes les expérimentations, un capteur de flux connecté à un PC est utilisé pour un monitoring en continu des débits dans les canaux et la température est maintenue constante à 22±2 °C. Il est important de maintenir la température constante car elle agit directement sur les propriétés des fluides, notamment leurs viscosités et tensions de surface.

4.5.2. <u>Résultats expérimentaux</u>

La Figure 156 montre les champs des vitesses mesurés pour les 3 géométries retenues. Il faut noter le fait que nous avons réussi à produire des images de haute résolution sur un champ important (cm²). Cet aspect est crucial dans le sens où générer des images haute résolution sur un champ réduit aurait impliqué la mise en œuvre de recalages d'images. Ceci aurait été plus que problématique en raison du manque de motifs constants d'une image à une autre.



Figure 156 – Champs de vitesses expérimentaux obtenus pour les 3 géométries retenues. Les lignes de champs sont également indiquées. A gauche, géométrie C4. Au centre, géométrie C5. A droite, géométrie C6.

Les mesures expérimentales sont en bon accord avec les simulations présentée en Figure 149. Par exemple, dans la géométrie C4, nous mesurons clairement des zones à faibles vitesses dans les coins supérieur et inférieur de la chambre. De manière analogue, nous mesurons de rapides changements de la vitesse du fluide lorsque ce dernier se déplace de l'entrée vers le centre de la chambre puis du centre vers la sortie.

Nous observons tout de même un gradient de champ de la gauche vers la droite qui ne peut pas être uniquement expliqué par le comportement seul du fluide. En fait, dans la géométrie C4 qui présente une symétrie entre entrée et sortie (dans une plus faible mesure dans la géométrie C6) il semblerait que plus de fluide quitte la chambre qu'il n'en rentre. Ceci peut être expliqué par la combinaison de plusieurs facteurs.

Premièrement, les images excluent les zones proches des entrées et des sorties où le gradient de vitesse est trop élevé pour être mesuré par µPIV. Nous utilisons une loupe binoculaire car elle permet d'imager un champ large. Cependant, le chemin optique entre chaque objectif et la chambre n'est pas perpendiculaire aux dispositifs. Leur angle d'incidence est de 6° (angle de convergence de 12°). La caméra est fixée sur l'oculaire de droite. Ainsi, le masque utilisé pour exclure les parois de la chambre n'est pas symétriquement situé au centre de la chambre mais décalé vers la droite. On image donc plus la sortie que l'entrée du dispositif.

Bien que nous puissions exclure des effets de focalisation inertielle dus à la petite taille des microbilles [179], il se pourrait que la sédimentation constitue le second facteur à prendre en compte. La sédimentation crée un gradient de vitesse en modifiant la concentration en microbilles dans la profondeur de la chambre. En réalité, la sédimentation vide de particules les zones proches de la partie supérieure de la chambre où la vitesse est moindre (nous considérons ici une distribution de Poiseuille des vitesses du fluide suivant la profondeur de la chambre. L'algorithme de μ PIV que nous utilisons calcule la vitesse instantanée de chaque particule quelle que soit sa position en profondeur dans la chambre (en raison de la grande profondeur de champ des optiques utilisée). En conséquence, la moyenne sur 200 paires d'images est légèrement faussée, conduisant à une apparente augmentation de la vitesse mesurée.

Pour la géométrie C4, nous avons utilisé un débit plus faible que pour les géométries C5 et C6 (environ 7 μ L/min pour la première contre 14 μ L/min pour les dernières). En visualisant l'écoulement proche de l'entrée et de la sortie, nous avons noté que la configuration à entrée et sortie unique de cette géométrie conduisait certaines microbilles à parcourir un chemin de presque 20 de long. Ainsi, nous estimons la sédimentation à 16 μ M, environ 1/5 de la profondeur de la chambre, ce qui modifie la vitesse mesurée. Les microbilles circulant dans les géométries C5 et C6 subissent une sédimentation moitié moindre que celles dans la géométrie C4, ce qui rend son effet marginal.

Il est sans doute plus instructif de visualiser les écoulements en traçant le profil des vitesses suivant la section des chambres. La Figure 157 montre les vitesses mesurées au niveau de la section située sur la diagonale verticale des chambres. Nous avons en fait considéré une zone de 400 µm de large de part et d'autre de cette diagonale de manière à disposer de suffisamment de points pour la figure. Ces tracés sont en cohérence avec les résultats montrés à la Figure 150.



Figure 157 – Profil des vitesse (en mm/s) au niveau de la diagonale verticale des chambres. A gauche : géométrie C4. Au centre : géométrie C5. A droite : géométrie C6.

On constate immédiatement que la géométrie C6 offre la meilleure uniformité. En excluant un espace de 1 mm près des parois de la chambre, l'uniformité est estimée à \pm 10%. A titre de comparaison, nous obtenons \pm 70% pour la géométrie C5 et \pm 100% pour la géométrie C4. Le gradient résiduel que nous observons pour la géométrie C6 est dû à des non-uniformités au niveau de la largeur des canaux d'entrée. Rappelons que les simulations présentées dans les figures Figure 148 et Figure 149 présupposent des canaux parfaitement identiques dans les collecteurs d'entrée et de sortie. Cependant en microfabrication, des très faibles variations dimensionnelles des structures est inévitable, particulièrement lorsque l'emploi de structures de compensation est nécessaire. Cela brise la symétrie idéale des géométries qui se traduisent par de faibles différences de vitesse à la connexion de chaque canal avec la chambre. Nous pensons que les petites oscillations constatées sur le profil des vitesses (on dénombre environ 8 minima le long de la section de la chambre) sont directement reliées à ces petites variations de vitesse au niveau des canaux. Une meilleure maitrise des procédés de fabrication devrait permettre d'annuler ces gradients et oscillations résiduels.

Nous avons également étudié la capacité des dispositifs à être correctement rincés en vue de leur utilisation multiple impliquant le passage des différents composés chimiques et biologiques. Nous présentons le résultat sur la Figure 158.



Figure 158 – Séquence de rinçage présentée en fonction du volume de liquide à titre de comparaison. Le liquide rouge entre par la droite.

Il est intéressant de noter la présence de stries séparant les liquides bleu et rouge (en particulier pour la géométrie C5. Ces stries correspondent exactement aux lignes de flux présentées dans les simulations en Figure 157En fait, durant l'écoulement dans la chambre, il y a formation de cellules fluidiques séparées par de fine zones interfaciales. Ces dernières apparaissent aux point médians de l'espace entre les canaux d'entrée, là où la vitesse est la plus faible. Dans ces zones interfaciales, déjà observées sous formes d'oscillations dans la figure précédente, le liquide bleu est conservé plus longtemps mettant ainsi en évidence les lignes de flux quand le liquide rouge pénètre dans la chambre.

L'observation de l'évolution temporelle de la frontière entre liquides bleu et rouge donne des indications sur le front de flux, information non accessible par les simulations numériques effectuées en régime stationnaire. Nous observons que le front est bien plus homogène dans la géométrie C6 que dans les autres. Le centre de la chambre est rincé légèrement plus tard que les autres parties, probablement en raison des faibles variations dimensionnelles des canaux lors de la microfabrication. Sur la figure, la deuxième ligne (2 mL de liquide) illustre bien le mauvais comportement de la géométrie C4 non seulement par la présence de volumes morts dans les coins supérieurs et inférieurs de la chambre, mais également en raison de l'inhomogénéité du front de rinçage.

Des tests supplémentaires (non montrés ici) ont été pratiqués de manière à évaluer la possibilité de remplir la chambre lors de la première injection de liquide, lorsque cette dernière est encore remplie d'air. L'idée est d'observer l'éventuelle formation de bulles d'air, une difficulté couramment rencontrée en microfluidique. Les meilleures performances sont fournies par la géométrie C5 alors que la géométrie C4 se comporte plus mal de que la géométrie C6 en raison de la survenue ponctuelle de bulles. Le remplissage de la géométrie C5 au moyen de la structure en collecteur limite fortement la formation de bulles qui, même si elles se forment, sont évacuées plus facilement dans le canal unique de sortie. La géométrie C6 doit être remplie plus lentement en mettant à profit les forces capillaires pour un résultat

optimal alors que la géométrie C4 demandera une grande patience lors du remplissage pour éviter la formation de bulles au niveau des coins de la chambre.

Dans cette partie, nous avons présenté les résultats expérimentaux concernant l'homogénéité des écoulements dans les géométries retenues. Les résultats obtenus en μ PIV montrent que la géométrie C6 comportement des entrées/sorties en collecteur montre une homogénéité des vitesses optimales, sans formation de volumes morts.

Les résultats obtenus en visualisant le comportement dynamique au moyen de fluides colorés montrent également que cette géométrie est performante. En revanche, la formation de bulles lors du premier remplissage de la chambre, bien que ponctuelle, est plus facilement gérable ave la géométrie C5 qui permet une évacuation plus aisée des éventuelles bulles avec une sortie à canal unique. En règle générale, le premier remplissage des chambres devra être conduit patiemment de manière à limiter au maximum l'apparition de bulles d'air.

4.6. Conclusion.

Dans ce court chapitre, nous avons présenté le travail théorique et expérimental réalisé dans le but de fabriquer une interface microfluidique qui puisse être réutilisée de nombreuse fois. Dans cette optique, la conception repose sur la capacité des matériaux à résister à de multiples passes de fluides biologique, de réaction et de solutions de rinçage et de régénération plus ou moins agressives. Il faut en effet rappeler que les méthodes de microfabrication conventionnelles, même si elles sont bien maitrisées et autorisent la fabrication de plusieurs dispositifs sur un même substrat, restent encore trop onéreuses pour utilisation en usage unique telle qu'elle est souhaitée dans bon nombre d'applications pratiques.

Le choix s'est donc porté sur une association silicium/AsGa. Le silicium est choisi en fonction des possibilités nombreuses de microfabrication qu'il offre et également en raison de la similarité de ses caractéristiques mécaniques et thermiques avec l'AsGa. L'AsGa quant à lui, est choisi en raison des propriétés piézoélectriques qu'il présente et qui seront mises à profit en termes de capteur acoustique.

Afin de visualiser aisément les écoulements, nous avons remplacé l'AsGa par du verre. Ainsi, des techniques de µPIV ont pu être mises en œuvre, avec la levée d'une difficulté particulière consistant à obtenir des images haute résolution sur un grand champ d'observation. La µPIV permet de conclure que la plus grande homogénéité est obtenue au moyen de géométries à double collecteur (en entrée et sortie). D'autres séries d'expérimentations au moyen de liquides colorés ont confirmé les résultats et ont permis de visualiser les lignes de flux ainsi que le front de remplacement d'un liquide par un autre, étape nécessaire au rinçage et à la régénération des chambres réactionnelles. Enfin, il faut noter que la formation ponctuelle de bulles lors du premier remplissage des chambres nécessite l'utilisation de très faibles vitesses de remplissage. Sur cet aspect, la géométrie à un seul collecteur en entrée et un seul canal en sortie permet une meilleure évacuation des éventuelles bulles.

Ce chapitre constitue la première des études ancillaires réalisée durant ce travail de thèse. Les résultats obtenus ici trouveront leur application majeure dans les domaines de la détection d'entités biologiques multiples ainsi qu'il sera présenté dans les perspectives de ce manuscrit. Le chapitre suivant constitue la seconde étude ancillaire de mon travail. Il met à profit l'expérience acquise en microfluidique diphasique reportée dans le chapitre précédent dans une application non directement biomédicale, bien que les architectures qui vont maintenant être présentées pourront être mise à profit dans des applications liées au dépistage ou à la détection par seuils successifs comme précisé dans les perspectives.

Chapitre 5

Dispositif microfluidique diphasique pour la réalisation d'un condensateur à capacité variable

5.1. Introduction

Un des domaines d'application, pour le moins original de la mise en œuvre de dispositifs diphasiques, concerne l'électronique. Dans ce qui suit, nous présenterons plus spécifiquement la fabrication de capacités pouvant être ajustées sur une très large gamme basée sur une structure microfluidique diphasique. Pour cela, nous exploitons directement l'expérience décrite au chapitre 3 concernant la génération contrôlée de gouttes monodisperses. En effet, seul ce contrôle est susceptible d'ajuster précisément la capacité du dispositif que nous nous proposons de fabriquer.

5.2. Les capacités variables

Les capacités variables sont utilisées dans des montages électroniques ou associées à des dispositifs spécifiques comme des oscillateurs ou des capteurs. Outre le réglage de circuits RLC dans des montages, elles servent à compenser les capacités parasites pouvant gêner lors de mesure de signaux ou à ajuster précisément une fréquence d'oscillation. Les attentes pour ce type de composants sont nombreuses. Leur plage d'accordabilité doit être large (nF-mF) pour offrir un bon ratio ($G_c = \frac{c_{max}}{c_{min}}$), tout en garantissant un réglage fin (pF-nF) avec une variation linéaire de la valeur de la capacité. Ils doivent être compacts, peu sensibles à la température et résistant aux hautes tensions. Un exemple de quelques dispositifs est donné ci-dessous (Figure 159).



Figure 159 – Dispositif à capacité variable : a) Diode Varicap (jonction PN) : réglable en tension, haute compacité, haute fréquence, basse tension (50V), Gc = 5 - 20, C 5 - 40 pF. [© Toshiba] b) Capacité variable à ailette (air) : réglable mécaniquement par rotation, Gc = 5 - 10, C 30 - 300 pF. [© Oren Elliot Products] c) Capacité ajustable : ajustable mécaniquement par rotation, compacte, moyenne à hautes fréquences, basse tension (50V), Gc = 2 - 5, C = 0,5 - 60 pF. [© Murata]

La capacité d'un condensateur plan est définie par deux plaques en vis-à-vis, de surface S [m²], séparées par une distance d [m] par un milieu diélectrique de constante diélectrique absolue ε [F/m] :

$$C = \frac{\varepsilon S}{d}$$

Où $\epsilon = \epsilon_r$. ϵ_0 . Avec ϵ_r la permittivité relative d'un matériau en fonction de la permittivité du vide $\epsilon_0 = 8,85.10^{-12}$ [F/m]

Les condensateurs à capacité fixe sont construits avec des matériaux de natures différentes influant sur la constante diélectrique. Ils emploient principalement comme diélectrique des matériaux solides (céramique, mica, papier, verre...). Les capacités variables mécaniques font varier leur capacité en modifiant la surface. L'alignement de demi-disques rotatifs avec des plaques fixes est réglé manuellement par rotation de l'axe sur lequel elles ont montées. Certaines capacités ajustables modifient la distance entre les plaques à l'aide d'une vis. D'autres types de capacités variables utilisent du gaz (air) et plus rarement des liquides (eau ultra pure, huiles). Ce sont les valeurs de permittivité des phases gazeuses ou liquides qui permettent de modifier la capacité (Figure 160).



Figure 160 – Structure schématisée d'une capacité avec diélectrique a) huile et b) eau.

C'est dans ce domaine que portent les travaux présentés ici. Nous étudions des dispositifs pilotant de l'huile et de l'eau pour générer des gouttes évoluant dans des canaux microfluidiques. Le ratio entre les constantes diélectriques de ces liquides est d'environ 25 - 30 (Tableau 15). Prenons le cas d'un condensateur plan dont le diélectrique liquide (de l'eau par exemple). Si nous remplaçons le liquide par de l'huile, nous serions virtuellement capables de faire varier sa capacité d'un facteur 25 - 30. Nous avons donc envisagé de créer une capacité à valeur pilotée par de la fluidique diphasique.

Fluide	٤r	Fluide	٤r
Air	~1	Acétone	1.01
Acide oléique	1.9	Huile de soja	2.6
Huile d'olive	3.1	Ethanole	24
Eau	80	Formamide	109

Tableau 15 – Permittivités relatives de fluides courants.

Dans cette courte partie, nous venons d'exposer la problématique liée à l'obtention de capacités variables. Si les dispositifs classiques recourent à des matériaux, solides, ils ne permettent pas une accordabilité de la capacité sur une large gamme. Cependant, l'utilisation de diélectriques liquides interchangeables en lieu et place des diélectriques solides permet, par un choix judicieux des liquides utilisés, de considérablement modifier la capacité des dispositifs. L'accordabilité passe ainsi de quelques unités à quelques dizaines.

L'utilisation de la microfluidique diphasique doit permettre non seulement de mettre à profit ce constat mais en plus d'accéder à une accordabilité aisée, sans changement du liquide interélectrodes. La partie suivante en explique le principe de base.

5.3. Principe de fonctionnement

Dans notre groupe, les travaux de N.Tarchichi [24] ont permis de produire des gouttes d'huile dans de l'eau à diamètre fixe et permettant d'ajuster la distance entre les gouttes. Ce mode de génération particulier apparait en dessous d'une valeur limite de débit de la phase dispersée dans une jonction en T. Dans des dimensions de canaux fixes et pour un débit de phase dispersée fixe v_d, la distance entre les gouttes *l* est pilotable linéairement par le débit de la phase continue v_c :

$$l = \frac{\pi r^2}{w_d v_d} v_c - 2r$$

Avec w_{d} , la largeur du canal de la phase dispersée et D = 2r, le diamètre de goutte.

En faisant varier la distance entre les gouttes, nous pouvons faire varier la fraction volumique des liquides dans les canaux et donc contrôler la constante diélectrique efficace des canaux (Figure 161).

$$\varepsilon_{eff} = (1 - \varphi)\varepsilon e + (\varphi)\varepsilon h$$

En approximant la goutte à la section du canal dans laquelle elle est inscrite, la constante diélectrique efficace s'exprime ainsi :



Figure 161 – Schéma de principe d'accordabilité de la constante diélectrique en fonction de la distance entre gouttes.

Il nous est donc possible, *in fine*, de contrôler la valeur d'une capacité électrique en fonction d'un débit :

$$\begin{split} \varepsilon_{eff} &= \left(\frac{\frac{\pi r^2}{w_d v_d} v_c - 2r}{\frac{\pi r^2}{w_d v_d} v_c - 2r + 2r}\right) \varepsilon e + \left(\frac{2r}{\frac{\pi r^2}{w_d v_d} v_c - 2r + 2r}\right) \varepsilon h \\ &\qquad \varepsilon_{eff} = \left(\frac{\frac{\pi r^2}{w_d v_d} v_c - 2r}{\frac{\pi r^2}{w_d v_d} v_c}\right) \varepsilon e + \left(\frac{2r}{\frac{\pi r^2}{w_d v_d} v_c}\right) \varepsilon h \\ &\qquad \varepsilon_{eff} = \frac{2r}{\frac{\pi r^2}{w_d v_d} v_c} \left(\left(\frac{\pi r}{2w_d v_d} v_c - 1\right) \varepsilon e + \varepsilon h\right) \right) \\ &\qquad \varepsilon_{eff} = \frac{1}{\frac{\pi r}{2w_d v_d} v_c} \left(\left(\frac{\pi r}{2w_d v_d} v_c - 1\right) \varepsilon e + \varepsilon h\right) \\ &\qquad \varepsilon_{eff} = \frac{1}{kv_c} \left((kv_c - 1)\varepsilon e + \varepsilon h\right) \\ &\qquad \varepsilon_{eff} = \left(1 - \frac{1}{kv_c}\right) \varepsilon e + \left(\frac{1}{kv_c}\right) \varepsilon h \end{split}$$

Donc :

$$\varphi = \frac{1}{kv_c} = \frac{1}{\frac{\pi r}{2w_d v_d} v_c}$$

Où k est une constante paramétrée par les dimensions des canaux et fixée par le débit de la phase dispersée.

Si nous considérons la goutte dans la section de canal circonscrit, la fraction volumique des liquides dans cette section dépend de la forme et des dimensions des gouttes par rapport à celle du canal (Tableau 14).

Goutte sphérique	Coutto Culindriquo	Goutte Cylindrique	Goutte
	Goutte Cymianque		Cylindrique

	0	0.0		9
Dimensions	2r = D = h = w	$2\mathbf{r} = \mathbf{D} = \mathbf{h} = \mathbf{w}$	r = h = w/2	r=h/2=w/4
Volume d'huile	$Vh = \frac{4}{3}\pi r^3$	$Vh = \pi r^2 h$ $= 2\pi r^3$	$Vh = \pi r^3$	$Vh = 2\pi r^3$
Volume total	$Vt = 2rhw$ $= 8r^3$	$Vt = 8r^3$	$Vt = 4r^3$	$Vt = 16r^3$
Fraction volumique	$\Phi = \frac{1}{6}\pi \sim 0,52$	$\Phi = \frac{1}{4}\pi \sim 0.78$	$\Phi = \frac{1}{4}\pi \sim 0.78$	$\Phi = \frac{1}{8}\pi \sim 0.39$

Tableau 16 – Fraction volumique de la goutte dans sa section de canal circonscrite.

Cette dépendance de la fraction volumique vis-à-vis des géométries des canaux et des gouttes conduit à ajouter le paramètre correcteur c à la constante diélectrique efficace du canal :

$$\begin{split} \varepsilon_{eff} &= \left(\frac{l}{l+2r}\right)\varepsilon e + \left(\frac{2r}{l+2r}\right)c.\varepsilon h + \left(\frac{2r}{l+2r}\right)(1-c)\varepsilon e \\ \varepsilon_{eff} &= \left(1 - \frac{1}{kv_c}\right)\varepsilon e + \left(\frac{c}{kv_c}\right)\varepsilon h + \left(\frac{1-c}{kv_c}\right)\varepsilon e \\ \varepsilon_{eff} &= \left(1 - \frac{1}{kv_c} + \frac{1-c}{kv_c}\right)\varepsilon e + \left(\frac{c}{kv_c}\right)\varepsilon h \\ \varepsilon_{eff} &= \left(1 - \frac{c}{kv_c}\right)\varepsilon e + \left(\frac{c}{kv_c}\right)\varepsilon h \end{split}$$

Dans cette partie, nous avons expliqué comment la microfluidique diphasique permet d'ajuster la constante diélectrique d'un liquide. L'accordabilité de cette constante est obtenue en modifiant la fraction volumique entre les deux phases en présence. Nous avons en effet montré que la fraction volumique pouvait très facilement être accordée par un simple ajustement de débit. La partie suivante se propose de définir la structure du composant à fabriquer.

5.4. Choix de la structure et simulations numériques

Dans les systèmes microfluidiques, des capacités planes sont placés contre les canaux fluidiques pour identifier le passage de goutte [180], leurs propriétés (dimensions[181] [182], vitesse [183], nature du fluide) ou le passage d'un fluide à l'autre [184]. Le plus souvent les électrodes sont coplanaires, fréquemment en forme de peignes interdigités, pour être fabriquées durant la même opération lithographique. Nous trouvons moins couramment des électrodes en vis-à-vis [182] car elles doivent être déposées de chaque côté du canal. Les électrodes présentes sur les bords de canaux sont plus rares à cause de la complexité de fabrication d'un tel système [185].

5.4.1. Ratio de capacité et couches d'isolation

La valeur de la capacité mesurée aux bornes des électrodes dépend de la capacité variant avec le liquide C_f , de la capacité passant dans la structure C_s et de la capacité des couches d'isolations C_i protégeant les électrodes du liquide. Nous nous intéressons au gain en capacité selon plusieurs structures d'électrodes (Figure 162).



Figure 162 – Electrodes a) murales b) coplanaires et c) parallèles dont une isolée.

Pour des électrodes sans couches d'isolations la capacité est donnée par :

$$C = C_f + C_s$$

Le ratio des capacités Gc est :

$$G_c = \frac{C_{max}}{C_{min}} = \frac{C_{f max} + C_s}{C_{f min} + C_s}$$

Si la capacité du liquide le plus diélectrique est plus élevée que celle de la structure ($C_{f max} >> C_s$) et que la capacité du liquide le moins diélectrique équivaut à celle de la structure ($C_{f min} \approx C_s$) on obtient :

$$G_c = \frac{C_{max}}{C_{min}} \approx \frac{\varepsilon_{max}}{2\varepsilon_{min}}$$

Dans ce cas, le ratio des capacités est du même ordre de grandeur que le ratio des constantes diélectriques des liquides.

Si nous rajoutons une couche d'isolation, la capacité globale devient :

$$C = C_e + C_s$$
$$\frac{1}{C_e} = \frac{1}{C_f} + \frac{1}{C_i}$$

Si la capacité des liquides est grande devant celle des couches d'isolation (C_f>>C_i) nous obtenons :

$$G_c = \frac{C_{max}}{C_{min}} \approx 1$$

Le ratio de capacitance diminue avec l'ajout de couches d'isolations. Nous ne mettrons pas de couches d'isolation dans les canaux. Nous utilisons de l'eau ultra pure. Donc, pour éviter l'électrolyse, nous travaillerons à des tensions plus basses que la tension d'électrolyse de l'eau.

5.4.2. <u>Structures d'électrodes</u>

Pour ne pas perturber la distance entre gouttes après leur génération, nous fixons la dimension des canaux sur celle de la structure de génération $w_c = 100 \ \mu m$ pour $h = 50 \ \mu m$. Nous choisissons d'utiliser des électrodes coplanaires placées au centre des canaux pour des raisons de facilité de fabrication. Chen *et al.* [186] ont étudié le dimensionnement de capacités coplanaires en fonction des dimensions de la paire d'électrodes et du film du liquide à analyser (Figure 163). La capacité s'exprime ainsi :

$$C = \frac{2\varepsilon L}{\pi} \ln \left(1 + \frac{w}{a} + \sqrt{\left(1 + \frac{w}{a}\right)^2 - 1} \right)$$

Avec L, la longueur des électrodes, w la largeur des électrodes et *l* le demi gap entre les électrodes.



Figure 163 – Electrodes coplanaires et pénétration T du champ électrique dans le liquide. Tiré de [186].

La profondeur de pénétration T est calculée en fonction des dimensions de la paire d'électrodes de la manière suivante :

$$T = a.\sin\left(a\cos\left(1 + \frac{w}{a}\right)\right) = a\sqrt{\left(1 + \frac{w}{a}\right)^2 - 1}$$

En prenant en compte les défauts d'alignement et les variations dimensionnelles possibles durant la fabrication, nous dimensionnons les électrodes de la manière suivante : $w = 20 \mu m$, $2 a = 20 \mu m$. Cela laisse 20 μm de chaque côté du canal fluidique, ce qui devrait limiter les défauts de translation lors de l'assemblage des puces (+/- 5 μm). La profondeur de pénétration est alors :

$$T = 10 \sqrt{\left(1 + \frac{20}{10}\right)^2 - 1} = 28\mu m$$

La hauteur du canal étant $h = 50\mu m$, la valeur de la capacité dépendra principalement du liquide et dépendra peu de la matière qui constitue la paroi en arrière du liquide.

5.4.3. <u>Simulation de la capacité</u>

Nous effectuons une simulation numérique de la capacité du système que nous venons de dimensionner. La longueur des électrodes étant très grande devant leur largeur (L>>> w_c) nous pouvons représenter le système par un modèle 2D dans la section du canal.

Le système est simulé avec Comsol 4.3 en utilisant la physique Electrostatique (es) en 2D. La puce est composée de silicium ($\varepsilon_r = 11,7$) et de verre borosilicate ($\varepsilon_r = 4,8$) mis en contact (500x500 µm chacun). Le canal fluidique (w = 50 µm et h = 50 µm) est creusé dans le silicium. Les électrodes d'or sont déposées sur le verre (e = 400 nm) en face des canaux.

Deux cas de figures sont simulés. Dans le premier, une différence de potentiel $V_0 = 1V$ est appliquée entre les électrodes. La capacité est mesurée entre les électrodes coplanaires. Dans le second, la surface du silicium est mise à la masse et un potentiel $V_0 = 1V$ est appliqué sur les électrodes. La mesure est effectuée entre les électrodes et l'électrode murale. Nous déterminons la capacité du dispositif par simulation pour plusieurs fluides : air, eau, huile d'olive, huile de soja et éthanol.



Figure 164 – Potentiel électrique et ligne de champ électrique pour des electrodes a) murales : eau et coplanaires : b) eau, c) huile d'olive.

Graphiquement, le résultat de la simulation pour les deux configurations est bien différent (Figure 164). Pour les électrodes coplanaires, le champ est réparti presque symétriquement autour du plan des électrodes. Le liquide du canal perturbe le champ selon sa permittivité. Pour les électrodes murales, le champ est partagé entre la zone du canal et le support en verre mais ne rentre pas dans le silicium vu que sa surface est mise à la masse. Dans le canal, le champ se propage des électrodes en fond de canal vers le plafond et les bords du canal. Les électrodes du fond et du plafond sont positionnées face à face.

Paramètres	Electrodes murales	Electrodes coplanaires
Cs	71 pF/m	34 pF/m
C _{air}	94 pF/m	42 pF/m
Chuile de soja	130 pF/m	54 pF/m
Chuile d'olive	139 pF/m	57 pF/m
Cethanol	601 pF/m	200 pF/m
C _{eau}	1830 pF/m	568 pF/m
$G_c = C_{eau} / C_{huile d'olive}$	13	10
$\epsilon_{eau}/2.\epsilon_{huile d'olive}$		13

Le champ résultant est presque uniforme. De l'autre côté des électrodes, le champ entre dans le verre et s'étale sur les bords pour rejoindre l'interface silicium verre de part et d'autre du canal.

Tableau 17 – Résultat de capacités simulées en fonction des liquides.

Les résultats de simulation montrent des capacités plus élevées pour la configuration à électrodes murales que pour celle à électrodes coplanaires (Tableau 17). Le gain de capacité entre l'huile et l'eau est aussi plus élevé dans ce sens. Dans le cas des électrodes murales, il est directement lié aux permittivités des fluides. Pour les électrodes coplanaires, le gain est moins important. Ceci peut être expliqué par la forme des lignes de champs. Dans le cas d'électrodes murales, le champ rempli complètement et uniquement le canal fluidique au-dessus des électrodes. En dessous des électrodes, le champ entre dans le verre, ce qui explique une plus grande capacité de structure. Pour les électrodes coplanaires, du côté du canal, le champ est contenu en grande partie dans le canal (sur ~28 µm).

La configuration à électrodes murales offre des valeurs et un ratio de capacité plus importants. Il est néanmoins plus laborieux à fabriquer et nécessiterait l'ajout de plusieurs étapes de fabrication. Il est difficilement compatible avec le standard de puce que nous avons mis au point. Les électrodes coplanaires présentent tout de même un ratio de capacité de $G_c = 10$ entre l'huile et l'eau et sont plus simple à fabriquer. Nous avons donc dimensionné et fabriqué des puces à électrodes coplanaires.

Dans cette partie, nous avons présenté les différentes configurations d'électrodes permettant de réaliser une capacité en microfabrication. Contrairement aux dispositifs massifs pour lesquels les électrodes sont situées en vis-à-vis, les techniques de microfabrication permettent la définition d'électrodes coplanaires placées côte-à-côte, ce qui facilite grandement leur fabrication. La capacité d'électrodes coplanaires se déduit de celle d'électrodes parallèles par une transformation conforme couramment utilisée en optique intégrée.

Les simulations numériques montrent que l'architecture coplanaire conduit à des capacités plus faibles que l'architecture murale pour diverses raisons. Cependant, dans le cadre de cette étude démonstrative, nous conserverons l'architecture coplanaire pour des raisons de facilité technologiques.

5.5. Fabrication et mise en œuvre

5.5.1. <u>Fabrication des dispositifs</u>

Nous dimensionnons le dispositif selon nos standards de puces (Figure 165). Les connectiques fluidiques et électriques sont placées chacune d'un côté de la puce. Deux jonctions en T de dimensions

différentes (w_d variant) sont connectées aux entrées fluidiques pour générer des gouttes de tailles variables. Elles sont connectées à des canaux serpentant pour augmenter la longueur des électrodes (14 cm). Les électrodes coplanaires courent le long des canaux jusqu'à la zone de connexion. Les électrodes sortent des canaux à la perpendiculaire vers des pads au pas de 2,54 mm. L'étanchéité à ce niveau est réalisée par dépôt manuel de colle entre les pads et le canal. Des structures stop-colle sont placées à ce niveau pour absorber le surplus de colle.



Figure 165 – a) Dispositif. b) Jonction en T. c) Electrodes centrées dans les canaux. d) Structure stop-colle.

Les dispositifs sont réalisés en employant des procédés de microfabrication (Figure 166). En raison des électrodes, le procédé comporte une étape de plus que pour les dispositifs du chapitre 3. Les canaux et la zone de connexion électrique sont gravés sur 50 µm par gravure DRIE (Rapier SPTS). Les ouvertures d'accès fluidiques et électriques sont gravées par gravure DRIE traversante. La méthode de gravure traversante à deux machines et à collage résine, employée dans le chapitre 3, est utilisée ici aussi. Les électrodes sont structurées sur le verre par lift-off. La couche métallique est déposée par pulvérisation de 200 nm d'or sur une couche d'accroche de 20 nm de chrome. Les substrats de verre et de silicium sont alignés pour faire coïncider les canaux et les électrodes. Ils sont assemblés par collage anodique puis découpés à la scie de précision.



Figure 166 – Masques de fabrication : a) gravure DRIE 50µm, b) gravure DRIE traversante c) dépôt d'électrodes.

La fabrication comporte deux verrous technologiques. L'enchainement des gravures qui conduisent à des défauts de gravure ou de collages ont déjà été traité en chapitre 3. Il en a résulté l'utilisation d'une résine de collage pour l'étape de la gravure traversante. La nouvelle difficulté est liée à l'alignement des électrodes du substrat de verre avec les canaux gravés dans le silicium. L'alignement est réalisé sur un aligneur double face (620 – EVG) avec un support dédié servant au maintien en contact des substrats pour la phase de collage anodique. Durant la phase d'alignement, le substrat de silicium est maintenu par le vide. Le silicium étant percé par les canaux d'accès, il nous faut adapter le procédé de collage. Pour mener les 1ères expérimentations avec ces dispositifs, l'étape de collage n'est pas réalisée. Les puces sont découpées dans le silicium (Figure 167) puis sont alignées manuellement avec les électrodes pour les expérimentations.



Figure 167 – a) Puces fluidiques gravées et découpées sur silicium et b) électrodes sur verre.

5.5.2. Mesure de capacité de fluides monophasiques

Pour la partie expérimentale, nous mesurons la capacité du dispositif assemblé manuellement (Figure 168) pour plusieurs fluides : air, huile de soja, éthanol, eau (EDI). Nous cherchons à obtenir des résultats proches de ce que nous pourrions avoir une fois les puces terminées. Pour cela, les liquides à analyser sont déposés sur la puce de silicium pour remplir les canaux. La partie en verre sur laquelle est déposée l'électrode est posée et alignée manuellement en face des canaux. Une fois l'alignement validé par observation au microscope, une forte pression est exercée pour mettre en contact les parties de puces et chasser le liquide n'étant pas dans les canaux. Les électrodes sont connectées au circuit d'analyse par la mise en contact de pointes à ressorts avec les pads de connections à l'aide de vis micrométriques.



Figure 168 – Puce assemblée a) côté visualisation b) côté connectiques et c) connectée par des pointes à ressors.

La mesure de la capacité est effectuée par un analyseur d'impédance (4194A – Hewlett-Packard). L'impédance du système est mesurée sur la plage 10 kHz - 200 kHz sur 401 points de mesure pour V₀ = 1V (<1,2V la tension d'électrolyse de l'eau). L'appareil de mesure a été calibré avant la mesure en trois points (0 ohm, 0 siemens, 50 ohm). Les liquides sont à température ambiante Ta = 23.5°C.



Figure 169 – Admittance Y [S] du système pour de l'air, de l'eau et de l'huile d'olive.

Les courbes d'admittance de l'huile et de l'air varient linéairement avec la fréquence. Elles sont de l'ordre de 10⁻⁵ S alors que celle de l'eau est supérieure à 10⁻⁴ S.

Nous considérons le système comme un circuit linéaire RC parallèle. A partir de la réponse de l'admittance Y=1/Z du système nous pouvons trouver sa capacité à partir de la pente de la courbe (Tableau 18) et en utilisant la valeur asymptotique vers 0 Hz, nous pouvons en déduire la résistance électrique du fluide entre les électrodes (134 μ S soit 7,4 k Ω pour l'eau, >1M Ω pour l'huile et l'air). Pour l'eau (Figure 169), nous observons à basse fréquence (<100 kHz) l'existence d'une capacité de valeur très supérieure à la capacité en haute fréquence due à l'apparition d'une double couche ionique à proximité des électrodes [187]. Cet effet devient négligeable à partir de 100 kHz où le comportement de l'eau est linéaire.

Configuration	Mesure	Simulation	
Air	5,1 pF	5,9 pF	
Huile de soja	6,5 pF	7,6 pF	
Ethanol	27 pF	28 pF	
Eau	79 pF	79,5 pF	
C _{eau} /C _{huile}	12	10	

Tableau 18 – Capacités déterminées expérimentalement pour f = 100kHz et à partir de la simulation.

Les résultats expérimentaux de capacité du système sont proches de ceux estimés à partir de la simulation (Tableau 18). Nous obtenons un ratio de capacité $G_c = 12$ et une plage de variation 6,5 – 79 pF pour le couple eau / huile pour une longueur d'électrode de 14 cm.

Dans cette partie, nous avons présenté le procédé de fabrication ainsi que la mise en œuvre des dispositifs. Les difficultés de fabrication nous ont obligé à assembler les dispositifs manuellement ce qui nous interdit d'intégrer la génération de goutte envisagée au départ.

En revanche, les résultats expérimentaux obtenus en fluidique monophasique sont en bon accord avec les résultats théoriques obtenus par simulation numérique. Pour sortir du caractère ancillaire de ce travail et conduire une étude complète, il faudra surmonter les difficultés expérimentales que nous avons évoquées et inclure l'influence de paramètres tels que la température et la pression dans le traitement final de l'information.

5.6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons présenté les travaux réalisés sur le développement d'une capacité électrique variable pilotée par la fluidique diphasique. Nous avons conçu et produit un dispositif microfluidique à base de silicium dont la capacité varie avec la constante diélectrique des fluides le remplissant. Nous avons simulé la valeur de capacité du système en fonction des fluides et avons réalisé l'expérimentation liée. Les résultats expérimentaux et numériques coïncident.

Nous avons établi un modèle de variation de la capacité en fonction de la production de gouttes en mode Balloon. La puce n'a pu être complètement réalisée à cause de difficultés liées au procédé d'assemblage. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pas pu générer de gouttes dans le dispositif. Nous avons indiqué dans le chapitre 3 que le mode Balloon était difficile à reproduire. Ce sera surement aussi le cas pour ce dispositif quand la puce sera complétée.

Le comportement de l'eau diffère des autres liquides à basse fréquence (<100 kHz). A basse fréquence la polarisation des électrodes peut fausser la mesure [188]. Au-dessus de la tension d'électrolyse de l'eau, l'impédance du système variera. Pour une utilisation plus robuste de la capacité variable, il faudrait remplacer l'eau par un liquide différent et présentant une constante diélectrique égale ou supérieure.

Il nous reste à produire le dispositif complet. Nous pourrons alors étudier la variation de capacité selon plusieurs paramètres. La taille de la goutte est prise en compte dans nos calculs de capacité. Néanmoins, l'influence du remplissage latéral du canal sur la mesure des électrodes n'a pas été étudiée. Pour cela, il faudrait étudier expérimentalement la variation de capacité en fonction de la taille de goutte. La température et la pression sont responsables de variations du coefficient diélectrique de l'eau [188]. Il faudra prendre en compte la valeur de pression lors de la génération des gouttes et prévoir d'étudier les variations de capacité en fonction de la température.

Pour conclure, ce chapitre correspond à la seconde étude ancillaire réalisée dans le cadre de ce travail de thèse. Comme nous l'avons précisé à la fin du chapitre précédent, l'application décrite ici ne se situe pas dans le domaine biomédical. En revanche, nous verrons dans les perspectives à suivre, que ce type de dispositif présente un intérêt dans les domaines du dépistage et du monitoring, au lit du patient ou en cabinet de médecine de ville.

Conclusion et perspectives

6.1. Conclusion

Nous venons de présenter nos travaux sur le développement de dispositifs microfluidiques sur puces silicium au travers de trois projets étudiants le comportement de fluides mono- et di-phasiques dans des microcanaux. Ces projets sont clairement séparés et font chacun l'objet d'un chapitre dédié (3 à 5). Ils sont toutefois interconnectés au travers des techniques de réalisation employées, des thématiques d'application, de leur mise en œuvre et de leur principe de fonctionnement. Les dispositifs sont mis en expérimentation sur un banc de contrôle de mesure présenté au chapitre 2. Le chapitre 3 présente nos recherches, découlant de mon sujet de thèse, traitant du développement d'un dispositif de capture d'un élément biologique d'intérêt sur des gouttes pour une détection par mesure d'impédance acoustique. Les chapitres 4 et 5 ont montré les résultats obtenus pour deux études ancillaires menées en parallèle du sujet principal. La première concerne le développement de structures fluidiques servant à l'homogénéisation de l'écoulement d'un échantillon à analyser dans une chambre de détection acoustique. La seconde traite de la réalisation d'une capacité électrique variable dont la valeur est ajustée dans un dispositif microfluidique diphasique.

Tous les chapitres exploitent des systèmes microfluidiques dont le principe dépend d'écoulements de fluides dans des canaux de petites dimensions. A cette échelle, les phénomènes physiques dépendent majoritairement des énergies de surfaces qui conditionnent les écoulements monophasiques (flux laminaire, capillarité, profil de Poiseuille) et diphasiques (mode de génération de gouttes, stabilité des émulsions, comportement des mousses de gouttes, angles de contact). Nos études ont été réalisées en prenant en compte ces effets pour la conception (structure des canaux), la simulation, la réalisation (influence de la chimie de surface) et la mise en œuvre (matériel dédié au contrôle et à l'observation des écoulements).

Ces projets ont aussi en commun la technologie employée pour la fabrication des dispositifs et partagent d'ailleurs le même schéma de production. Nous avons réalisé tous nos dispositifs en salle blanche en employant des procédés de microfabrication. Les canaux fluidiques sont structurés par gravure humide ou sèche dans un substrat de silicium. Les ouvertures servant aux connexions fluidiques et électriques sont réalisées par gravures traversantes. Les canaux sont fermés par le soudure anodique d'un capot de verre permettant l'observation des écoulements fluidiques. Enfin les puces sont individualisées par découpe à la scie. À la suite de ces étapes, les dispositifs sont directement rendus prêts à l'emploi dans notre banc expérimental grâce à un support standardisé.

Nous avons établi un standard dimensionnel de dispositifs lié à un support de montage dédié pour accélérer et faciliter la mise en test des dispositifs. Le support dispose de connexions fluidiques et électriques rapides permettant un montage des dispositifs par serrage sans étape de packaging supplémentaire après leur découpe. Nous avons monté un banc expérimental polyvalent autour des dispositifs servant au contrôle fluidique des écoulements, à l'observation en microscopie et à la mesure de caractéristiques électriques. Nous avons développé des programmes de contrôle et de mesure microfluidique adaptables aux différentes configurations du banc. La partie microscopie a été montée pour caractériser les écoulements par techniques de PIV et de fluorescence.

Les projets ont été traités en parallèles. Les avancées relatives aux notions, techniques et résultats obtenus pour un sujet sont employées dans les autres. Les chapitres 3 et 5 emploient tout deux des techniques de génération et de manipulation de gouttes. Ils exploitent les propriétés des gouttes (tension de surface, composition, permittivité) comme vecteur de variation d'une grandeur physique du système (impédance acoustique, électrique). Le chapitre 4 est le seul à traiter explicitement d'écoulements monophasiques mais la compréhension de l'arrangement dynamique des gouttes dans le chapitre 3 passe par des simulations d'écoulements simple phase. Enfin les chapitres 3 et 4 sont liés par leur objectif final de réaliser des capteurs acoustiques.

Dans le chapitre 3 nous avons développé un dispositif diphasique dans le but de réaliser un biocapteur acoustique où l'interface de détection se situe à la surface de gouttes. Trois versions de puces ont été réalisées pour aboutir à la génération, l'organisation et la fonctionnalisation des gouttes puis la capture d'un élément biologique sur leur surface. Nous avons commencé par réaliser des jonctions en T dans lesquelles nous avons fait circuler plusieurs couples de fluides pour y générer des gouttes. Nous avons produit des gouttes à base d'huiles silicone et végétales et divers tensioactifs (SDS, Tween, OG)

dans des modes de génération classiques (dripping, squezzing, jetting), ainsi que dans un pseudo-mode Balloon. Nous avons développé des structures de drainage servant à provoquer l'auto arrangement de gouttes monodisperses en rangs serrés durant l'étape de génération. La fonctionnalisation est assurée pendant l'étape de génération par des phospholipides biotinylés dissous dans l'huile de soja. Les structures de drainage nous ont permis d'injecter des liquides dans l'arrangement de gouttes que nous avons visualisés par fluorescence. Nous avons fini par injecter de la streptavidine dans l'arrangement de gouttes pour visualiser sa capture sur des gouttes décorées de biotines. Nous avons pu observer le collage de gouttes entre elles qui est vraisemblablement dû à leur pontage par la streptavidine. Le dispositif microfluidique de manipulation de gouttes a été validé expérimentalement et est fonctionnel. L'étude de l'aspect biologique du sujet, lié à la fonctionnalisation de gouttes et à la capture d'un élément biologique, a été initiée par l'utilisation du couple streptavidine/biotine.

Dans le chapitre 4 nous avons dimensionné et caractérisé des structures d'alimentation d'une chambre de détection acoustique pour homogénéiser l'écoulement d'un échantillon à analyser. Nous avons simulé les écoulements dans 6 structures d'homogénéisation, puis nous en avons produites et étudiées 3. Un montage expérimental dédié a été mis au point pour caractériser les écoulements par PIV dans une chambre de 1 cm² par des particules de 920 nm de diamètre. Nous avons confirmé expérimentalement l'amélioration de l'homogénéité des écoulements par les structures évaluées par simulation.

Dans le chapitre 5 nous avons conçu un dispositif diphasique pour servir de capacité électrique variable et ajustable par un contrôle en fluidique. Nous avons simulé et réalisé une structure d'électrodes coplanaires dont la capacité varie en fonction de la permittivité du liquide à son contact. Les électrodes étant alignées en face de canaux microfluidiques, nous avons pu mesurer la variation de la valeur de leur capacité en fonction du liquide remplissant les canaux. Des résultats préliminaires encourageants sur puces assemblées manuellement ont été obtenus. Les valeurs mesurées sont en accord avec celles obtenues en simulation.

Désormais pour aller plus loin, nous avons un certain nombre de développements et d'études à réaliser pour finaliser les dispositifs où intégrer leurs fonctionnalités. Ces études font l'objet de la partie suivante qui concerne les perspectives technologiques. Quand les dispositifs seront finalisés et pleinement fonctionnels, ils seront prêts à être utilisés dans des applications du domaine médical comme on le précise dans les perspectives d'ordre applicative.

6.2. **Perspectives**

6.2.1. Perspectives technologiques

Le chapitre 4 s'est achevé avec la caractérisation des écoulements dans des structures étudiées par PIV sur puce silicium/verre. Ces structures ont pour finalité d'être intégrées dans un biocapteur acoustique en AsGa. La prochaine étape consiste donc à assembler les canaux fluidiques gravés dans le silicium en face d'une matrice de membranes acoustiques fabriquées dans AsGa. Les deux matériaux étant opaques, l'efficacité des structures d'homogénéisation sur les écoulements devra être jugée au travers de la réponse acoustique du capteur. La variation de signal et donc de capture d'éléments entre les membranes sera liée à l'homogénéité des écoulements dans la chambre de détection. Une des thèses actuellement en cours dans l'équipe porte sur le développement de capteurs employant des membranes couplées. Le couplage de membranes permet d'amplifier les signaux relatifs à de très faibles écarts de masse entre celles-ci. Il serait judicieux d'employer les méthodes liées au couplage de membranes pour caractériser l'écoulement dans le capteur final.

Nous avons terminé le chapitre 5 sur une preuve de concept. Les mesures de capacité dans le dispositif pour quelques fluides ont été réalisées. Afin de finaliser ce projet, il nous faut régler les problèmes de fabrication dus à un défaut d'alignement des électrodes avec les canaux durant l'étape de capotage. Sur l'aspect diphasique, il nous est nécessaire de déterminer les conditions particulières de fabrication des dispositifs les rendant capables de produire le mode Balloon. Une fois le dispositif achevé et les nécessités du mode Balloon exposées, il sera possible de créer et d'étudier, comme prévu, la variation de capacité en fonction de l'éloignement des gouttes.

Le sujet de thèse présenté dans le chapitre 3 comportait trois volets. Le premier volet concernant la microfluidique a abouti à un dispositif capable de générer des gouttes, de les arranger en rangs serrés et d'y injecter du fluide. Ces aspects sont fonctionnels mais il serait possible d'améliorer la compréhension de l'organisation des gouttes par des expérimentations liant débits d'écoulement et de drainage avec la taille des gouttes et le ratio volumique des liquides. L'injection au travers des gouttes mériterait d'être étudiée par une mise en modèle suivant un modèle poreux. En l'occurrence, notre système s'approche des dispositifs microfluidiques de chromatographie à bille à la différence que les gouttes sont plus mobiles et peuvent être générées à volonté. Il est dès lors envisageable d'utiliser la partie fluidique déjà réalisée comme dispositif de capture et d'extraction d'éléments biologiques par les gouttes. Ces dernières peuvent facilement être évacuées dans un bac de récupération. L'émulsion peut alors être séparée en deux phases par sonication pour concentrer les espèces capturées en surface de gouttes à l'interface des phases. Le volet sur la fonctionnalisation et la capture d'éléments biologiques a abouti à des résultats préliminaires présentant vraisemblablement la capture de streptavidine en surface de gouttes biotinylées. La capture sera à vérifier par fluorescence dans un microscope suffisamment sensible. La fonctionnalisation des gouttes s'effectue au moment de leur génération mais la structure d'injection permettrait d'injecter des réactifs en vue de les fonctionnaliser après leur arrangement. Ce sera une piste à expérimenter si l'émulsion n'est pas déstabilisée par les réactions de fonctionnalisation. Il sera intéressant de changer de modèle biologique à appliquer une fois le dispositif finalisé. L'étude de modèles comme ceux de l'annexine V se pontant sur des phospholipides en surface de cellules apoptotiques à l'aide d'ions calcium serait fortement adaptée à ce dispositif. La surface des gouttes serait donc assimilée à la couche extérieure de la double couche lipidique d'une cellule. Ce dispositif peut alors avoir pour application l'étude des cellules. D'un point de vue acoustique, nous avons élaboré un procédé de fabrication complexe dont les conditions de fabrication nécessiteront des mises au point et du développement en salle blanche. Ceci fera l'objet d'un travail post-doctoral sur plusieurs mois.

Nous venons de voir les perspectives des projets de manière individuelle mais comme durant nos travaux, les projets peuvent s'influencer dans leur perspective.

L'injection de fluides dans la chambre réactionnelle du chapitre 3 n'était pas homogène. Le fluide avait le temps de traverser le réseau de gouttes au centre de la chambre avant de l'atteindre sur ses bords. La détection acoustique sera d'autant plus fine que le milieu est homogène puisque la capture le sera également. Pour cela, le fluide doit s'écouler à la même vitesse dans le volume de la chambre et ne pas se concentrer au centre. Nous avons réalisé des structures d'homogénéisation des vitesses d'écoulement dans le chapitre 4. Une évolution possible du dispositif de détection à gouttes du chapitre 3 se ferait en ajoutant des canaux d'injection autour de la chambre semblables à ceux du chapitre 4. Il sera même possible de fusionner les zones correspondant à l'entrée de l'injection et aux filtres pour n'avoir qu'une zone d'arborescences autour du réseau de gouttes.

Le dispositif du chapitre 5 permettra de faire varier une capacité en modifiant le ratio entre l'huile et l'eau donc en faisant varier le ratio entre leurs constantes diélectriques. Gul et al. [10] ont présenté un dispositif de détection sans marqueur où la capacité de peignes interdigités varie en fonction de la concentration dans l'échantillon de l'espèce capturée à leur surface. La capture de protéine modifie la constante diélectrique de la biointerface, ce qui modifie la valeur de la capacité du système. La bio interface est assemblée sur autour des IDTs sur une couche d'oxyde silanisé. Sur cette base il est envisageable de détecter la capture de protéines sur des gouttes par une mesure capacitive. Dans le chapitre 3, lorsque les gouttes sont organisées dans la chambre de détection, cette dernière est remplie d'huile avec une fraction volumique constante diélectrique de la chambre varierait avec la capture de protéines en surface. En réunissant les résultats des travaux des chapitres 3 et 5, il serait possible de développer un biocapteur capacitif diphasique sans marqueur.

Nous venons de voir les perspectives liées à la technologie des dispositifs développés durant nos recherches et à leurs évolutions ou améliorations possibles. Ces dispositifs n'ont pas d'applications propres et peuvent être qualifiés d'outils ou de composants. La prochaine partie montrera qu'ils ont le potentiel pour répondre à des problématiques réelles.

6.2.2. <u>Perspectives applicatives</u>

Les études présentées dans les chapitres 3 à 5 offrent de nombreuses perspectives dans les domaines appliqués à la santé. Dans ce qui suit nous précisons 3 des multiples pistes qui mériteraient d'être explorées. Pour 2 d'entre elles, elles concernent des alternatives ou des compléments à des projets actuellement développés au sein de l'équipe BioMicroDevices : les projets VIRUMILK et NEOTAG. La troisième perspective quant à elle, revêt un caractère plus prospectif et ne correspond, pour l'instant, à aucun projet en gestation dans l'équipe.

6.2.2.1. Détection du cytomégalovirus dans le lait maternel

Le cytomégalovirus (CMV) fait partie de la famille des herpes virus. Une partie non négligeable de la population est séropositive mais asymptomatique. Ce sont en fait les personnes immunodéprimées qui ont le plus à craindre de l'infection à CMV. Parmi elles, on compte notamment les patients transplantés, les patients ayant subi une chimiothérapie et les grands prématurés (plus de 10 000 naissances par an en France).

Les grands prématurés (moins de 33 semaines) n'ont pas pu bénéficier des bienfaits du système immunitaire de leur mère en raison d'un développement *in utero* interrompu. Chez eux, l'infection congénitale à CMV peut engendrer des séquelles neurologiques graves, extrêmement préjudiciables à leur développement. A noter que ces séquelles peuvent parfois survenir des années après l'infection. Une difficulté supplémentaire réside dans la possible surinfection, entretenue dans le temps, consécutive à l'allaitement maternel par des mères possiblement séropositives. La question se pose de la stratégie nutritionnelle que l'on peut proposer à ces nouveau-nés. Ou bien on utilise du lait stérilisé, ce qui protège les nourrissons d'une éventuelle sur-contamination mais les prive des bienfaits des anticorps maternels. Ou bien on préfère l'allaitement maternel, bénéfique du point de vue immunitaire mais potentiellement dangereux en termes de risque infectieux. Il n'existe aucun consensus national ou international quant à cette stratégie nutritionnelle.

Il existerait une alternative si on disposait d'un dispositif de dépistage systématique du CMV dans le lait maternel. Le résultat personnalisé d'un tel dépistage permettrait de séparer les couples mère/enfant à risque des autres et d'adapter la stratégie d'allaitement. C'est ce que propose le projet VIRUMILK, initié au Centre d'Investigation Clinique du CHU de Besançon et développé en partie dans notre équipe. L'idée est de transposer en microfluidique les méthodes de détection virale de type ELISA. Actuellement, un dispositif intégré est à l'étude. Il consiste en un biocapteur plan qui permet la capture du CMV éventuellement présent dans un échantillon de lait maternel. Suivant le protocole ELISA, mais dans une configuration utilisable par les mères à leur domicile, l'ajout de réactifs spécifiques se traduit par la formation d'une solution colorée. Dans le projet VIRUMILK, la détection de cette solution colorée repose sur une mesure d'absorption optique.

Une difficulté existe pour les cas où la charge virale est faible et donc la solution obtenue peu colorée. La mesure de l'absorption optique peut se révéler insuffisamment sensible pour permettre une détection. La mise en œuvre du dispositif diphasique présenté au chapitre 3 permettrait, par la très grande surface d'interaction qu'elle propose, de considérablement abaisser les seuils de détection. De plus, une détection basée sur les propriétés acoustiques du mélange, outre sa sensibilité naturelle, autoriserait une plus grande intégration du dispositif.

6.2.2.2. Dépistages à la naissance

Chaque enfant en France bénéficie, à sa 72^{ème} heure de vie, d'un dépistage d'un certain nombre de maladies : la phénylcétonurie, l'hypothyroïdie congénitale, l'hyperplasie congénitale des surrénales, la drépanocytose et la mucoviscidose. Il s'agit du test de Guthrie appliqué aux quelques 600 000 enfants qui naissent chaque année en France.

Pour le pratiquer, la puéricultrice pique le talon du nouveau-né au moyen d'une lancette et doit, par pressions successives du talon de l'enfant, remplir complètement des zones imprimées sur un carton buvard spécialement conçu. Chaque zone correspond à une maladie à dépister. Si la piqure à la lancette est relativement bien tolérée comme le montre une étude clinique menée par le Centre d'Investigation Clinique du CHU de Besançon, c'est l'action de compression répétée du talon qui est la cause principale de douleur. Il est alors très difficile de convenablement imbiber les zones spécifiées sur le carton buvard. Un carton suffisamment imbibé de sang requiert plus d'un mL de sang capillaire. On comprend ici l'intérêt que peuvent constituer les techniques microfluidiques pour réduire la quantité de sang nécessaire. Une fois le carton buvard rempli, il est mis à sécher puis des emporte-pièces spéciaux de diamètres appropriés à chaque maladie sont utilisés pour découper des pastilles dans les zones correspondantes. Elles sont ensuite conditionnées et transmises au service de médecine nucléaire pour diagnostic. Ce procédé est long, peu pratique et perfectible en termes de sensibilité et répétabilité.

Dans le cadre du projet NEOTAG, notre équipe a étudié la possibilité de détecter au moins 3 de ces maladies au moyen de biopuces fonctionnalisées avec les anticorps correspondants. La détection repose sur une méthode sans marquage dans les équipements de laboratoire de résonance plasmon de surface. Un diagnostic devient alors possible de manière plus rapide et potentiellement plus sensible. Cependant, le diagnostic repose encore sur une analyse en laboratoire. Le besoin a été exprimé de disposer d'un outil qui pourrait d'une part faciliter le prélèvement sanguin et d'autre part permettre le diagnostic *in situ* au plus près de l'enfant. A FEMTO-ST, différents travaux ont déjà permis de proposer des pistes concernant le prélèvement sanguin sans douleur. Plus de 10 ans en arrière, l'idée d'adjoindre un microsystème d'analyse au dispositif de prélèvement avait été formulée, mais aucune suite n'avait été donnée à ce projet en raison du manque de dispositif adéquat.

Aujourd'hui, on pourrait très bien débuter une étude exploitant les résultats présentés au chapitre 4 sur un capteur réutilisable présentant plusieurs sites d'analyse dans une chambre réactionnelle de grande taille dans laquelle les écoulements sont homogènes sur toute la surface d'analyse. Adjoint à un des dispositifs évoqués de prélèvement sans douleur, on disposerait alors d'un système complet et compact utilisable dans les salles de soins. A terme, il faudrait pouvoir multiplier le nombre de sites d'analyse dans la chambre réactionnelle afin de répondre à des besoins existant dans certains pays. Aux Etats-Unis par exemple, le dépistage à la naissance adresse plus d'une vingtaine de pathologies.

6.2.2.3. Dispositif de dépistage adaptatif et personnalisable

Dans le chapitre 5, nous avons traité de l'utilisation de la microfluidique diphasique pour fabriquer une capacité variable. Nous avons également évoqué le couplage (fluidique diphasique - mesure capacitive) comme potentiellement utile dans le domaine médical.

En effet, un certain nombre de pathologies font l'objet d'un dépistage, pas toujours systématique au niveau de la population globale, mais proposé aux patients quand il y a suspicion d'une pathologie particulière. Dans le cas d'un dépistage positif, le patient est adressé à une unité spécialisée pour un diagnostic complet. Dans certains cas, le dépistage repose sur la détection de macromolécules comme des anticorps ou des protéines. Ces macromolécules présentent de forts gradients de champ électrique. On imagine sans peine que, capturées de manière spécifique à la surface de gouttes fonctionnalisées, ces macromolécules pourraient être détectées par une mesure capacitive, avec une sensibilité qui dépend du nombre de gouttes entre les électrodes. L'aspect de détection en fluidique diphasique autoriserait une régénération et une réutilisabilité du dispositif. Si le dispositif est capable de fonctionner avec des échantillons biologiques non préparés, on disposerait déjà d'un dispositif compact de dépistage qui pourrait être utilisé au lit du patient ou, de manière plus intéressante encore, dans les cabinets de médecine de ville.

Pour aller plus loin, le dispositif présenté au chapitre 5 offre une possibilité unique. En effet, pour certaines pathologies, et dans le cadre d'une démarche de dépistage et non de diagnostic, le test ne consiste pas à effectuer un dosage précis de la concentration en macromolécules, mais à vérifier si cette concentration existe au-delà d'un certain seuil. C'est donc une réponse de type oui/non qui est attendue. De plus, dans un certain nombre de cas, le seuil en question est dépendant du patient. Il faudrait donc, dans l'idéal, disposer d'un dispositif dont le seuil de détection soit personnalisable à façon.

C'est là que le dispositif « capacito-diphasique » montre tout son intérêt. On a précisé dans le chapitre 5 que la capacité pouvait être ajustée en modifiant la fraction volumique par une simple action sur le débit de génération des gouttes. Si on considère le dispositif en terme de capteur et non plus en terme de capacité variable (en fait à l'inverse de ce que nous avons présenté jusqu'à maintenant), la

modification de la fraction volumique, *i.e.* le nombre de gouttes entre les électrodes, se traduira par une accordabilité du seuil de détection souhaité pour un patient particulier.

On disposerait alors d'un dispositif relativement universel et personnalisable. On entend par relativement universel, le fait que c'est la phase dispersée qui confère au dispositif sa spécificité vis-àvis de la macromolécule à détecter. Dans sa configuration réutilisable et régénérable, il suffirait de choisir, parmi une collection de phases disperses fonctionnalisées, celles faisant l'objet du dépistage en cours. Enfin, par personnalisable, on comprend le fait que le débit avec lequel on génère les gouttes à partir de la phase disperse permettrait d'ajuster le seuil de détection de manière personnalisée en fonction du patient auquel le dépistage s'adresse. On perçoit tout de même le caractère pour le moins prospectif d'un tel sujet d'étude.

Annexes

7.1. Réactifs utilisés dans les expériences

- 1. Huile silicone : Silicon Pump Fluid (704 Dow Corning).
- 2. Huile de soja : Soybean Oil (S7381 Sigma).
- 3. Biotine-PEG2-Amine : EZ-Link Amine-PEG2-Biotin (21346 Thermo Scientific). Masse molaire : 374,5 kDa. Longueur de l'espaceur : 20,4 Angstrom.
- 4. Streptavidine fluorescente : Streptavidin, Alexa Fluor® 488 conjugate (S11223 Invitrogen) Emission : 495 nm. Réception : 519 nm. Masse molaire streptavidine : 52,8 kDa.
- 5. Fluorescéines : Fluorescein Sodium Salt (F6377 Sigma).
- 6. SDS : SDS 20% (EU0460-B Euromedex).
7.2. Protocole de Fonctionnalisation de gouttes hors puce

1. Génération de gouttes

Génération de gouttes d'huile de soja dans de l' EDI Tween20 5%

Pression phase continue : 500mbar

Pression phase dispersée 800mbar

Mise en Pool des gouttes dans un seul tube

2. Lavage Tween20

Laver 3x en EDI (stockage long) / PBS(stockage court) pour passer de 5% à 0.05% en concentration de Tween20

Centrifuger à 2000g 10s

3. Activation

Prélever les gouttes : 30µL

Insérer dans le Tampon PBS ph 7.4 : 70µL

Insérer la Biotine-PEG-NH2 6mg/mL: 100 µL

Insérer la solution d'activation : 50µL

30 min d'agitation douce (à 2H) à l'obscurité à Ta

4. Lavage + Blocage des sites activés

Laver 2x PBS (200µL) : Centrifuger à 2000g 10s Remplacer par l'Ethanolamine 100mM pH8.5

30 min d'agitation douce à l'obscurité à Ta

5. Rinçage (élimination éthanolamine)

Laver 3x PBS (200µL) : Centrifuger à 2000g 10s

6. Capture Streptavidine

Prélever les gouttes : 10µL

Insérer dans le Tampon PBS : 77.5µL

Insérer la streptavidine 0.1mg/mL en PBS :12.5µL

15 min d'agitation douce à l'obscurité à Ta

7. Lavage Streptavidine

Laver 2x EDI (70-170µL) : Centrifuger à 2000g 10s (100-200µL)

Autre : Préparation de la Solution d'activation

Dans 100µL de Tampon insérer : EDC : 0.06g sNHS : 0.01g

7.3. **Fabrication des dispositifs**

7.3.1. Proposition de protocole graphique pour la fabrication du dispositif acoustique



7.3.2. <u>Protocole détaillé de fabrication des dispositifs</u>

Tableau 18 – Chapitre 3 : Procédé 1.

Substrat 1 : Silicium 500 µm					
Gravure DRIE 50 μm					
Dépôt du promoteur d'adhérence	Tournette RC8	Ti'	$a = 4000 \text{ s}^{-2}$ $v = 4000 \text{ s}^{-1}$ t = 30 s		
Recuit	Plaque chauffante		T =95°C t =1min		
Dépôt de résine Face 1	Tournette RC8	ECI 3027	a = 3600 s^{-2} v = 4000 s^{-1} t = 30 s e = 2,5 µm		
Recuit	Plaque chauffante		T =95°C ; t =1min ; repos = 2 min		
Insolation	Aligneur EVG 608	Simple face	E= 160 mJ/cm ²		
2nd Recuit	Plaque chauffante		T =110°C ; t =1min ; repos = 2 min		
Développement		MF_26A	45s		
Gravure DRIE 50 µm	Rapier SPTS	APP1 / LF			
Stripage résine	Chimie	Acétone	Acétone + éthanol + EDI + N2		
Nettoyage Plasma 02	Nanoplas	Anti-Bosh	t = 1h		
Gravure DRIE traversante					
Dépôt de résine Face 1	Dépôt de résine Face 1 Spray coater AZ92		E= 9 μm +/- 1μm		
Recuit	Plaque chauffante		T =105°C ; t = 4 min ; repos = 5 min		
Insolation	Aligneur EVG 608	Simple face	E= 700 mJ/cm ²		
Développement		AZ400	AZ400/EDI (1:4) ; t = 5 min		
Collage sur support		Huile	Si = 500µm ; Huile Fomblin		
Gravure DRIE traversante	Rapier SPTS	APP1			
Stripage résine	Chimie	Acétone	Acétone + éthanol + EDI + N2		
Collage Anodique					
Nettoyage substrat 1 + verre borosilicate	Chimie	Piranha	Acide sulfurique + Eau oxygénée (SH + H2O2) t= 2 min +EDI+N2		
Collage anodique	EVG		300 – 500 – 700 – 900 V t ~ 2h40min		
Sciage	Scie diamant		Si/verre : E = 300 µm		

Substrat 1 : Silicium 500 µm					
Gravure DRIE traversante					
DéshydratationFourT =120°C t =10					
Dépôt du promoteur	Tournette RC8	Ti'	a = 4000 s ⁻² v = 4000 s ⁻¹ t = 30 s		
Recuit	Plaque chauffante		T =120°C t =2min		
Dépôt de résine Face 2	Tournette RC8	AZ 9260	a = 2000 s ⁻² v = 4000 s ⁻¹ t = 30 s		
Recuit	Plaque chauffante		$T = 105^{\circ}C$; t = 6 min; repos = 5 min		
Insolation	Aligneur EVG 608	Simple face	E= 700 mJ/cm ²		
Développement		AZ400	AZ400/EDI (1:4) ; t = 1 min		
Gravure DRIE Traversante	Rapier SPTS				
Stripage résine	Chimie	Acétone	Acétone + éthanol + EDI + N2		
Nettoyage Piranha	Chimie	Piranha	Acide sulfurique + Eau oxygénée (SH + H2O2) t= 2 min +EDI+N2		
	Gravure I	DRIE 50 µm			
Dépôt de résine Face 1 Spray coater		AZ 9260	E= 9 μm +/- 1μm		
Recuit	Plaque chauffante		T =105°C ; t = 6 min ; repos = 5 min		
Insolation	Aligneur EVG 608	Simple face	E= 700 mJ/cm ²		
Développement		AZ400	AZ400/EDI (1:4) ; t = 1 min		
Collage sur support		Huile	Si = 500µm ; Huile Fomblin		
Gravure DRIE 50 µm	Rapier SPTS	LF			
Stripage résine	Chimie	Acétone	Acétone + éthanol + EDI + N2		
Nettoyage Piranha	Chimie	Piranha	Acide sulfurique + Eau oxygénée (SH + H2O2) t= 2 min +EDI+N2		
Nettoyage Plasma 02	Nanoplas	Anti-Bosh	T = 1h		
Collage Anodique					
Nettoyage substrat 1 + verre borosilicate	Chimie	Piranha	Acide sulfurique + Eau oxygénée (SH + H2O2)t= 2 min +EDI+N2		
Collage anodique	EVG		300 – 500 – 700 – 900 V t ~ 2h40min		
Sciage	Scie diamant		Si/verre : E = $300 \ \mu m$		

Tableau 19 – Chapitre 3 : Procédé 2

Substrat 1 : Silicium 500 µm					
Gravure DRIE 50 µm					
Déshydratation	Four		T =120°C t =10 min		
Dépôt du promoteur	Tournette RC8	Ti'	a = 4000 s-2 v = 4000 s-1 t = 30 s		
Recuit	Plaque chauffante		T =120°C t =2min		
Dépôt de résine Face 1	Tournette RC8	S1813	a = 4000 s-2 v = 4000 s-1 t = 30 s e = 1,3 µm		
Recuit	Plaque chauffante		T =120°C t =2min		
Insolation	Aligneur EVG 608	Simple face			
Développement		MF26A	T = 45s		
Gravure DRIE 50 µm	Rapier SPTS	LF			
Stripage résine	Chimie	Acétone	Acétone + éthanol + EDI + N2		
Nettoyage Plasma 02	Nanoplas	Anti-Bosh	t=1h		
	Gravure DRI	E traversante			
Déshydratation	Four		T =120°C t =10 min		
Dépôt du promoteur	Tournette RC8	Ti'	$a = 4000 \text{ s}^{-2}$ $v = 4000 \text{ s}^{-1}$ t = 30 s		
Recuit	Plaque chauffante		T =105°C t =2min		
Dépôt de résine Face 2	Tournette RC8	AZ 9260	$a = 4000 \text{ s}^{-2}$ $v = 4000 \text{ s}^{-1}$ t = 30 s		
Recuit	Plaque chauffante		T =105°C t =4 min repos 5 min		
Insolation	Aligneur EVG 608	Double Face	E= 600 mJ/cm ² repos 2 min		
Développement		AZ 400	AZ400/EDI (1:4) ; t = 2 min		
Dépôt d'adhésif S1	Plaque chauffante	Crystal Bound	T =120°C		
Collage sur support	Plaque chauffante		T =120°C ; Si = 500μm		
Gravure DRIE traversante Face 2	Rapier SPTS	APP1			
Stripage résine	Chimie	Acétone	Acétone + éthanol + EDI + N2		
Nettoyage Piranha	Chimie	Piranha	Acide sulfurique + Eau oxygénée (SH + H2O2) t= 2 min +EDI+N2		

Tableau 20 – Chapitre 3 : Procédé 3.

Nettoyage Plasma 02	Nanoplas	Anti-Bosh	t=1h
Substrat 1 + Substrat 2			
Collage Anodique			
Nettoyage substrat 1 + verre borosilicate	Chimie	Piranha	Acide sulfurique + Eau oxygénée (SH + H2O2) t= 2 min +EDI+N2
Collage anodique	EVG		300 – 500 - 700 - 900 V t ~ 4h
Sciage	Scie diamant		Si/verre : E = 300 µm

Tableau 21 – Chapitre 3 : Procédé 4.

Substrat 1 : Silicium 500 µm						
Gravure DRIE 50 µm						
Déshydratation	Four		T =120°C t =10 min			
Dépôt du promoteur	Tournette RC8	Ti'	a = 4000 s-2 v = 4000 s-1 t = 30 s			
Recuit	Plaque chauffante		T =120°C t =2min			
Dépôt de résine Face 1	Tournette RC8	S1813	a = 4000 s-2 v = 4000 s-1 t = 30 s e = 1,3 µm			
Recuit	Plaque chauffante		T =120°C t =2min			
Insolation	Aligneur EVG 608	Simple face				
Développement		AZ400	T = 45s			
Gravure DRIE 50 µm	Rapier SPTS	LF				
Stripage résine	Chimie	Acétone	Acétone + éthanol + EDI + N2			
Nettoyage Plasma 02	Nanoplas	Anti-Bosh	t=1h			
Gravure DRIE traversante						
Dépôt de résine Face 2	Tournette RC8	AZ9260	a = 2000 s ⁻² v = 4000 s ⁻¹ t = 30 s e = 9,6 μ m			
Recuit	Plaque chauffante		T =120°C t =2min			
Insolation	Aligneur EVG 608	Simple face	E= 700 mJ/cm ²			
Développement		AZ400				
Gravure DRIE 250 μm Face 2	Alcatel					
Dépôt de résine de collage	Tournette RC8	AZ 9260				

(substrat 1 : Face 1 + support de gravure : Si 500 µm)			
Collage	Plaque chauffante		
Gravure DRIE traversante Face 2	Rapier SPTS	APP1	
Stripage résine	Chimie	Acétone	Acétone + éthanol + EDI + N2
Nettoyage Plasma 02	Nanoplas	Anti-Bosh	t=1h
Substrat 1 + Substrat 2			
Collage Anodique			
Nettoyage substrat 1 + verre borosilicate	Chimie		Piranha Acide sulfurique + Eau oxygénée t= 2 min (SH + H2O2) +EDI+N2
Collage anodique	EVG		300 - 500 - 700 - 900 V t ~ 4h
Sciage	Scie diamant		Si/verre : E = 300 µm

Tableau 22 – Chapitre 5 : Procédé 5.

Substrat 1 : Silicium 500 µm					
	Gravure DRIE	50 µm			
Dépôt de résine Face 1	Tournette RC8	S1813	a = 4000 s-2 v = 4000 s-1 t = 30 s e = 1,3 µm		
Recuit	Plaque chauffante		T =120°C t =2min		
Insolation	Aligneur EVG 608	Simple face			
Développement		AZ400			
Gravure DRIE 50 µm	Rapier SPTS	LF			
Stripage résine	Chimie	Acétone	Acétone + éthanol + EDI + N2		
Gravure DRIE traversante					
Dépôt de résine Face 2	Tournette RC8	9260			
Recuit	Plaque chauffante				
Insolation	Aligneur EVG 608	Simple face			
Développement		AZ400			
Gravure DRIE 250 µm Face 2	Alcatel				
Dépôt de résine de collage (substrat 1 : Face 1 + support de gravure : Si 500 μm)	Tournette RC8	9260			

Collage		Plaque chauffa	nte				
Gravure DRIE traversante Face 2		Rapier SPTS		APP1			
Stripage résine		Chimie		Acétone		Acétone + éthanol + EDI + N2	
	Sı	ubstrat 2 : Verre E	Borosi	osilicate 100		n	
		Lift-off élect	trodes	d'or F1			
Dépôt de résine]	Fournette RC8					
Recuit	Pla	aque chauffante					
Insolation	Ali	igneur EVG 608	Sim	ple face			
Développement							
Pulvérisation 200 nm d'or	-	Pulvé Plassys			20	20 nm de couche d'accroche de Chrome 200 nm d'or	
Lift - off		Chimie				Acétone + US kHz 30 min Ethanol + EDI + N2	
Substrat 1 + Substrat 2							
Collage Anodique							
Nettoyage substrat 1		Chimie			Pi ox	iranha Acide sulfurique + Eau ygénée t= 2 min (SH + H2O2) +EDI+N2	
Alignement S1F2 et S2F2	Ali	igneur EVG 608	Ali	gnement			
Collage anodique		EVG				300 - 500 - 700- 900 V t ~ 4h	
Sciage		Scie diamant				Si/verre : E = 300 µm	

Bibliographie

- W. Jung, J. Han, J.-W. Choi, et C. H. Ahn, « Point-of-care testing (POCT) diagnostic systems using microfluidic lab-on-a-chip technologies », *Microelectron. Eng.*, vol. 132, n° Supplement C, p. 46-57, janv. 2015.
- [2] J. Wu, Z. He, Q. Chen, et J.-M. Lin, « Biochemical analysis on microfluidic chips », *TrAC Trends Anal. Chem.*, vol. 80, nº Supplement C, p. 213-231, juin 2016.
- [3] J.-W. Choi *et al.*, « An integrated microfluidic biochemical detection system for protein analysis with magnetic bead-based sampling capabilities », *Lab. Chip*, vol. 2, n^o 1, p. 27-30, 2002.
- [4] L. L. Listenberger et D. A. Brown, « Fluorescent Detection of Lipid Droplets and Associated Proteins », in *Current Protocols in Cell Biology*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [5] O. Tokel *et al.*, « Portable Microfluidic Integrated Plasmonic Platform for Pathogen Detection », *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 9152, mars 2015.
- [6] O. Krupin, C. Wang, et P. Berini, « Optical plasmonic biosensor for leukemia detection », *SPIE Newsroom*, janv. 2016.
- [7] A. Sonato *et al.*, « A surface acoustic wave (SAW)-enhanced grating-coupling phase-interrogation surface plasmon resonance (SPR) microfluidic biosensor », *Lab. Chip*, vol. 16, nº 7, p. 1224-1233, 2016.
- [8] J. S. Daniels et N. Pourmand, « Label-Free Impedance Biosensors: Opportunities and Challenges », *Electroanalysis*, vol. 19, nº 12, p. 1239-1257, mai 2007.
- [9] E. Bakker et M. Telting-Diaz, « Electrochemical Sensors », *Anal. Chem.*, vol. 74, nº 12, p. 2781-2800, juin 2002.
- [10] V. Tsouti, C. Boutopoulos, I. Zergioti, et S. Chatzandroulis, « Capacitive microsystems for biological sensing », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 27, nº 1, p. 1-11, sept. 2011.
- [11] O. Gul, E. Heves, M. Kaynak, H. Basaga, et Y. Gurbuz, « Label-free, capacitive immunosensor for protein detection », 2006, p. 600-603.
- [12] Z. Zou, S. Lee, et C. H. Ahn, « A Polymer Microfluidic Chip With Interdigitated Electrodes Arrays for Simultaneous Dielectrophoretic Manipulation and Impedimetric Detection of Microparticles », *IEEE Sens. J.*, vol. 8, nº 5, p. 527-535, mai 2008.
- [13] E. Katz et I. Willner, « Probing Biomolecular Interactions at Conductive and Semiconductive Surfaces by Impedance Spectroscopy: Routes to Impedimetric Immunosensors, DNA-Sensors, and Enzyme Biosensors », *Electroanalysis*, vol. 15, nº 11, p. 913-947, juill. 2003.
- [14] O. Thipmanee *et al.*, « Label-free capacitive DNA sensor using immobilized pyrrolidinyl PNA probe: Effect of the length and terminating head group of the blocking thiols », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 38, n^o 1, p. 430-435, oct. 2012.
- [15] N. F. Y. Durand et P. Renaud, « Label-free determination of protein–surface interaction kinetics by ionic conductance inside a nanochannel », *Lab Chip*, vol. 9, nº 2, p. 319-324, 2009.
- [16] A. Syahir, K. Usui, K. Tomizaki, K. Kajikawa, et H. Mihara, « Label and Label-Free Detection Techniques for Protein Microarrays », *Microarrays*, vol. 4, nº 2, p. 228-244, avr. 2015.
- [17] Y. Q. Fu *et al.*, « Advances in piezoelectric thin films for acoustic biosensors, acoustofluidics and lab-on-chip applications », *Prog. Mater. Sci.*, vol. 89, p. 31-91, août 2017.

- [18] I. Voiculescu et A. N. Nordin, « Acoustic wave based MEMS devices for biosensing applications », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 33, nº 1, p. 1-9, mars 2012.
- [19] A. Poturnayova *et al.*, « Detection of plasmin based on specific peptide substrate using acoustic transducer », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 223, p. 591-598, févr. 2016.
- [20] H. Tarbague, « PDMS (Polydimethylsiloxane) Microfluidic Chip Molding for Love Wave Biosensor », *J. Integr. Circuits Syst.*, vol. 5, n^o n.2:125-133, 2010.
- [21] W. Xu, X. Zhang, S. Choi, et J. Chae, « A High-Quality-Factor Film Bulk Acoustic Resonator in Liquid for Biosensing Applications », *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 20, nº 1, p. 213-220, févr. 2011.
- [22] L. Zhou, Y. Wu, M. Xuan, J.-F. Manceau, et F. Bastien, « A Multi-Parameter Decoupling Method with a Lamb Wave Sensor for Improving the Selectivity of Label-Free Liquid Detection », *Sensors*, vol. 12, nº 8, p. 10369-10380, juill. 2012.
- [23] T. Tarchichi Nathalie, « Tunable diphasic microfluidic », Theses, Université de Franche-Comté, 2013.
- [24] N. Tarchichi, F. Chollet, et J.-F. Manceau, « New regime of droplet generation in a T-shape microfluidic junction », *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 14, p. 45-51, 2013.
- [25] F. Li, « Innovative detection methods in liquid for a lamb wave biosensor », Université de Franche-Comté, 2008.
- [26] P. Gravesen, J. Branebjerg, et O. S. Jensen, « Microfluidics-a review », *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 3, nº 4, p. 168, 1993.
- [27] S. Shoji et M. Esashi, « Microflow devices and systems », *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 4, nº 4, p. 157, 1994.
- [28] Z. Z. Chong, S. H. Tan, A. M. Gañán-Calvo, S. B. Tor, N. H. Loh, et N.-T. Nguyen, « Active droplet generation in microfluidics », *Lab Chip*, vol. 16, nº 1, p. 35-58, 2016.
- [29] P. Tabeling, *Introduction to microfluidics*. Oxford, U.K. ; New York: Oxford University Press, 2005.
- [30] S. Neethirajan et F. Lin, « Convergence–big potential: microfluidics for food, agriculture and biosystems industries ».
- [31] J. Heikenfeld, P. Drzaic, J.-S. Yeo, et T. Koch, « Review Paper: A critical review of the present and future prospects for electronic paper », *J. Soc. Inf. Disp.*, vol. 19, n° 2, p. 129, 2011.
- [32] L. Shui *et al.*, « Microfluidics for electronic paper-like displays », *Lab. Chip*, vol. 14, nº 14, p. 2374-2384, juill. 2014.
- [33] D. Dumont-Fillon, H. Tahriou, C. Conan, et E. Chappel, « Insulin Micropump with Embedded Pressure Sensors for Failure Detection and Delivery of Accurate Monitoring », *Micromachines*, vol. 5, nº 4, p. 1161-1172, nov. 2014.
- [34] G. M. Whitesides, « The origins and the future of microfluidics », *Nature*, vol. 442, n^o 7101, p. 368-373, juill. 2006.
- [35] M. A. Unger, H.-P. Chou, T. Thorsen, A. Scherer, et S. R. Quake, « Monolithic microfabricated valves and pumps by multilayer soft lithography », *Science*, vol. 288, n° 5463, p. 113–116, 2000.
- [36] W. H. Grover, A. M. Skelley, C. N. Liu, E. T. Lagally, et R. A. Mathies, « Monolithic membrane valves and diaphragm pumps for practical large-scale integration into glass microfluidic devices *»*, *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 89, n° 3, p. 315-323, avr. 2003.

- [37] A. Kuoni, R. Holzherr, M. Boillat, et N. F. de Rooij, « Polyimide membrane with ZnO piezoelectric thin film pressure transducers as a differential pressure liquid flow sensor », *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 13, nº 4, p. S103, juill. 2003.
- [38] S. Wu, Q. Lin, Y. Yuen, et Y.-C. Tai, « MEMS flow sensors for nano-fluidic applications », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 89, nº 1, p. 152-158, mars 2001.
- [39] M. Ashauer, H. Glosch, F. Hedrich, N. Hey, H. Sandmaier, et W. Lang, « Thermal flow sensor for liquids and gases based on combinations of two principles », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 73, nº 1, p. 7-13, mars 1999.
- [40] M. Dijkstra, M. J. de Boer, J. W. Berenschot, T. S. J. Lammerink, R. J. Wiegerink, et M. Elwenspoek, « Miniaturized thermal flow sensor with planar-integrated sensor structures on semicircular surface channels », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 143, nº 1, p. 1-6, mai 2008.
- [41] J. Haneveld *et al.*, « Modeling, design, fabrication and characterization of a micro Coriolis mass flow sensor », *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 20, nº 12, p. 125001, 2010.
- [42] K. Elvira, X. Casadevall i Solvas, R. Wootton, et A. J Demello, *The past, present and potential for microfluidic reactor technology in chemical synthesis*, vol. 5. 2013.
- [43] A. D. Stroock, S. K. W. Dertinger, A. Ajdari, I. Mezić, H. A. Stone, et G. M. Whitesides, « Chaotic Mixer for Microchannels », *Science*, vol. 295, nº 5555, p. 647-651, janv. 2002.
- [44] I. Erill, S. Campoy, N. Erill, J. Barbé, et J. Aguiló, « Biochemical analysis and optimization of inhibition and adsorption phenomena in glass–silicon PCR-chips », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 96, n° 3, p. 685-692, déc. 2003.
- [45] L. Gervais, N. de Rooij, et E. Delamarche, « Microfluidic Chips for Point-of-Care Immunodiagnostics », *Adv. Mater.*, vol. 23, nº 24, p. H151-H176, juin 2011.
- [46] A. Boussommier-Calleja, R. Li, M. B. Chen, S. C. Wong, et R. D. Kamm,
 « Microfluidics: A new tool for modeling cancer-immune interactions », *Trends Cancer*, vol. 2, nº 1, p. 6-19, janv. 2016.
- [47] M. Rothbauer, H. Zirath, et P. Ertl, « Recent advances in microfluidic technologies for cell-to-cell interaction studies », *Lab. Chip*, 2018.
- [48] D. Huh, B. D. Matthews, A. Mammoto, M. Montoya-Zavala, H. Y. Hsin, et D. E. Ingber, « Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip », *Science*, vol. 328, n° 5986, p. 1662-1668, juin 2010.
- [49] P. N. Joshi, « Cells and Organs on Chip—A Revolutionary Platform for Biomedicine », 2016.
- [50] T. Chen, « Développement de biocapteurs hyperfréquences microfluidiques pour la spectroscopie diélectrique non-invasive de la cellule unique : applications en cancérologie », Toulouse 3, 2012.
- [51] E. Agliari *et al.*, « Cancer-driven dynamics of immune cells in a microfluidic environment », *Sci. Rep.*, vol. 4, nº 1, mai 2015.
- [52] A. Baccouche *et al.*, « Massively parallel and multiparameter titration of biochemical assays with droplet microfluidics », *Nat. Protoc.*, vol. 12, nº 9, p. 1912-1932, août 2017.
- [53] T. S. Kaminski, O. Scheler, et P. Garstecki, « Droplet microfluidics for microbiology: techniques, applications and challenges », *Lab. Chip*, vol. 16, nº 12, p. 2168-2187, juin 2016.
- [54] S. Colin, Éd., *Microfluidics*. London, UK : Hoboken, NJ: ISTE ; Wiley, 2010.

- [55] M. Muradoglu et H. A. Stone, « Mixing in a drop moving through a serpentine channel: A computational study », *Phys. Fluids*, vol. 17, n^o 7, p. 073305, juill. 2005.
- [56] N. V. Quintero, Y. Song, P. Manneville, et C. N. Baroud, « Behavior of liquid plugs at bifurcations in a microfluidic tree network », *Biomicrofluidics*, vol. 6, nº 3, juill. 2012.
- [57] H. S. Kim, A. R. Guzman, H. R. Thapa, T. P. Devarenne, et A. Han, « A droplet microfluidics platform for rapid microalgal growth and oil production analysis », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 113, n^o 8, p. 1691-1701, août 2016.
- [58] H. Gu, M. H. G. Duits, et F. Mugele, « Droplets Formation and Merging in Two-Phase Flow Microfluidics », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 12, nº 4, p. 2572-2597, avr. 2011.
- [59] D. E. Angelescu, *Highly integrated microfluidics design*. Artech House, 2011.
- [60] H. Bruus, *Microfluidics lectures*. 2006.
- [61] J. Yong, F. Chen, Q. Yang, J. Huo, et X. Hou, « Superoleophobic surfaces », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 46, nº 14, p. 4168-4217, 2017.
- [62] J. Berthier et K. A. Brakke, *The physics of microdroplets*. Hoboken, New Jersey : Salem, Massachusetts: John Wiley & Sons, Inc ; Scrivener Publishing LLC, 2012.
- [63] C. H. Giles, « Historical Aspects of Surfactant Adsorption at Liquid Surfaces », in *Solution Behavior of Surfactants*, Springer, Boston, MA, 1982, p. 113-122.
- [64] S. Kim *et al.*, « PubChem Substance and Compound databases », *Nucleic Acids Res.*, vol. 44, n° Database issue, p. D1202-D1213, janv. 2016.
- [65] M. Johnson, « Detergents: Triton X-100, Tween-20, and More », *Mater. Methods*, nov. 2016.
- [66] M. Ruiz, Cell membrane detailed diagram. 2007.
- [67] Edgar181 et VIGNERON, *Details of the palmitoyl-oleyl-sn-phosphatidyl-choline structure (POPC)*. 2007.
- [68] J. Lu *et al.*, « Defining the structural characteristics of annexin V binding to a mimetic apoptotic membrane », *Eur. Biophys. J.*, vol. 44, nº 8, p. 697-708, déc. 2015.
- [69] H. Bayley *et al.*, « Droplet interface bilayers », *Mol. Biosyst.*, vol. 4, nº 12, p. 1191, 2008.
- [70] K. Funakoshi, H. Suzuki, et S. Takeuchi, « Lipid Bilayer Formation by Contacting Monolayers in a Microfluidic Device for Membrane Protein Analysis », *Anal. Chem.*, vol. 78, nº 24, p. 8169-8174, déc. 2006.
- [71] B. Schlicht et M. Zagnoni, « Droplet-interface-bilayer assays in microfluidic passive networks », *Sci. Rep.*, vol. 5, p. 9951, avr. 2015.
- [72] Y. Ling, J.-M. Fullana, S. Popinet, et C. Josserand, « Droplet migration in a Hele– Shaw cell: Effect of the lubrication film on the droplet dynamics », *Phys. Fluids*, vol. 28, n° 6, p. 062001, juin 2016.
- [73] C. C. Roberts, S. A. Roberts, M. B. Nemer, et R. R. Rao, « Circulation within confined droplets in Hele-Shaw channels », *Phys. Fluids*, vol. 26, nº 3, p. 032105, 2014.
- [74] S. Lee, F. Gallaire, et C. N. Baroud, « Interface-induced recirculation within a stationary microfluidic drop », *Soft Matter*, vol. 8, nº 41, p. 10750, 2012.
- [75] S. Malekzadeh et E. Roohi, « Investigation of Different Droplet Formation Regimes in a T-junction Microchannel Using the VOF Technique in OpenFOAM », *Microgravity Sci. Technol.*, vol. 27, n° 3, p. 231-243, juin 2015.
- [76] J. H. Xu, S. W. Li, J. Tan, Y. J. Wang, et G. S. Luo, « Preparation of highly monodisperse droplet in a T-junction microfluidic device », *AIChE J.*, vol. 52, n^o 9, p. 3005-3010, sept. 2006.

- [77] M. Oishi, H. Kinoshita, T. Fujii, et M. Oshima, « Confocal micro-PIV measurement of droplet formation in a T-shaped micro-junction », *J. Phys. Conf. Ser.*, vol. 147, nº 1, p. 012061, 2009.
- [78] P. Garstecki, M. J. Fuerstman, H. A. Stone, et G. M. Whitesides, « Formation of droplets and bubbles in a microfluidic T-junction—scaling and mechanism of break-up », *Lab. Chip*, vol. 6, n^o 3, p. 437, 2006.
- [79] A. Gupta et R. Kumar, « Effect of geometry on droplet formation in the squeezing regime in a microfluidic T-junction », *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 8, nº 6, p. 799-812, oct. 2009.
- [80] A. Gupta et R. Kumar, « Flow regime transition at high capillary numbers in a microfluidic T-junction: Viscosity contrast and geometry effect », *Phys. Fluids*, vol. 22, nº 12, p. 122001, 2010.
- [81] A. Allouch, « Microfluidique diphasique: réseaux de micro-bulles à défauts contrôlés pour la photonique », Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2011.
- [82] M. Hashimoto, B. Mayers, P. Garstecki, et G. M. Whitesides, « Flowing Lattices of Bubbles as Tunable, Self-Assembled Diffraction Gratings », *Small*, vol. 2, nº 11, p. 1292-1298, nov. 2006.
- [83] P. Mary, A. R. Abate, J. J. Agresti, et D. A. Weitz, « Controlling droplet incubation using close-packed plug flow », *Biomicrofluidics*, vol. 5, n° 2, p. 024101, juin 2011.
- [84] Z. Guan *et al.*, « A highly parallel microfluidic droplet method enabling singlemolecule counting for digital enzyme detection », *Biomicrofluidics*, vol. 8, nº 1, p. 014110, janv. 2014.
- [85] J. Wang, M. Jin, T. He, G. Zhou, et L. Shui, « Microfluidic Induced Controllable Microdroplets Assembly in Confined Channels », *Micromachines*, vol. 6, nº 9, p. 1331-1345, sept. 2015.
- [86] J. R. Haliburton, S. C. Kim, I. C. Clark, R. A. Sperling, D. A. Weitz, et A. R. Abate, « Efficient extraction of oil from droplet microfluidic emulsions », *Biomicrofluidics*, vol. 11, nº 3, p. 034111, mai 2017.
- [87] H. Andersson, W. van der Wijngaart, P. Enoksson, et G. Stemme, « Micromachined flow-through filter-chamber for chemical reactions on beads », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 67, nº 1, p. 203-208, août 2000.
- [88] L. Prat, F. Sarrazin, J. Tasseli, et A. Marty, « Increasing and decreasing droplets velocity in microchannels », *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 2, nº 3, p. 271-274, mai 2006.
- [89] X. Niu, S. Gulati, J. B. Edel, et A. J. deMello, « Pillar-induced droplet merging in microfluidic circuits », *Lab. Chip*, vol. 8, nº 11, p. 1837, 2008.
- [90] D. H. Yoon *et al.*, « Active microdroplet merging by hydrodynamic flow control using a pneumatic actuator-assisted pillar structure », *Lab. Chip*, vol. 14, nº 16, p. 3050, juin 2014.
- [91] S. Cohen-Addad, R. Höhler, et O. Pitois, « Flow in Foams and Flowing Foams », *Annu. Rev. Fluid Mech.*, vol. 45, nº 1, p. 241-267, janv. 2013.
- [92] S. Hutzler, N. Péron, D. Weaire, et W. Drenckhan, « The foam/emulsion analogy in structure and drainage », *Eur. Phys. J. E*, vol. 14, nº 4, p. 381-386, août 2004.
- [93] V. Miralles, « Migration of biphasic systems by thermal actuation in microconfinement », phdthesis, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, 2015.
- [94] K. D. Danov, « Effect of surfactants on drop stability and thin film drainage », in *Fluid Mechanics of Surfactant and Polymer Solutions*, Springer, 2004, p. 1–38.

- [95] A. Saint-Jalmes, « Physical chemistry in foam drainage and coarsening », *Soft Matter*, vol. 2, nº 10, p. 836, 2006.
- [96] I. Zaccari, A. G. Davies, C. Walti, et S. X. Laurenson, « Label-free electrochemical biosensors for clinical diagnostic », 2014, p. 15-18.
- [97] S. Mura, J. Nicolas, et P. Couvreur, « Stimuli-responsive nanocarriers for drug delivery », *Nat. Mater.*, vol. 12, nº 11, p. 991-1003, nov. 2013.
- [98] F. Böke, K. Schickle, et H. Fischer, « Biological Activation of Inert Ceramics: Recent Advances Using Tailored Self-Assembled Monolayers on Implant Ceramic Surfaces », *Materials*, vol. 7, nº 6, p. 4473-4492, juin 2014.
- [99] N. J. Mol et M. J. E. Fischer, Éd., *Surface Plasmon Resonance*, vol. 627. Totowa, NJ: Humana Press, 2010.
- [100] X. Du, J. Li, A. Welle, L. Li, W. Feng, et P. A. Levkin, « Reversible and Rewritable Surface Functionalization and Patterning via Photodynamic Disulfide Exchange », *Adv. Mater.*, vol. 27, nº 34, p. 4997-5001, sept. 2015.
- [101] V. Lacour, « Optimisation d'un microcapteur GaAs à ondes acoustiques et de sa biointerface pour la détection de pathogènes en milieu liquide », phdthesis, Université de Franche-Comté, 2016.
- [102] R. Blankenburg, P. Meller, H. Ringsdorf, et C. Salesse, « Interaction between biotin lipids and streptavidin in monolayers: formation of oriented two-dimensional protein domains induced by surface recognition », *Biochemistry (Mosc.)*, vol. 28, nº 20, p. 8214– 8221, 1989.
- [103] E. Gizeli, M. Liley, C. R. Lowe, et H. Vogel, « Antibody binding to a functionalized supported lipid layer: a direct acoustic immunosensor », *Anal. Chem.*, vol. 69, nº 23, p. 4808–4813, 1997.
- [104] K. B. M'Barek, « Adhésion et phagocytose de gouttes d'émulsions fonctionnalisées », phdthesis, Université Pierre et Marie Curie Paris VI, 2015.
- [105] M. Li *et al.*, « A versatile platform for surface modification of microfluidic droplets », *Lab Chip*, vol. 17, nº 4, p. 635-639, 2017.
- [106] I. Platzman, J.-W. Janiesch, et J. P. Spatz, « Synthesis of Nanostructured and Biofunctionalized Water-in-Oil Droplets as Tools for Homing T Cells », *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 135, nº 9, p. 3339-3342, mars 2013.
- [107] J. Fattaccioli, J. Baudry, N. Henry, F. Brochard-Wyart, et J. Bibette, « Specific wetting probed with biomimetic emulsion droplets », *Soft Matter*, vol. 4, nº 12, p. 2434, 2008.
- [108] M. F. Attia *et al.*, « Functionalization of nano-emulsions with an amino-silica shell at the oil–water interface », *RSC Adv.*, vol. 5, nº 91, p. 74353-74361, sept. 2015.
- [109] C.-Y. Chao, D. Carvajal, I. Szleifer, et K. R. Shull, « Drop-Shape Analysis of Receptor–Ligand Binding at the Oil/Water Interface », *Langmuir*, vol. 24, nº 6, p. 2472-2478, mars 2008.
- [110] H. van Heeren, « Standards for connecting microfluidic devices? », *Lab. Chip*, vol. 12, n^o 6, p. 1022, 2012.
- [111] S. Marre, A. Adamo, S. Basak, C. Aymonier, et K. F. Jensen, « Design and Packaging of Microreactors for High Pressure and High Temperature Applications », *Ind. Eng. Chem. Res.*, vol. 49, nº 22, p. 11310-11320, nov. 2010.
- [112] A. W. Martinez, S. T. Phillips, M. J. Butte, et G. M. Whitesides, « Patterned Paper as a Platform for Inexpensive, Low Volume, Portable Bioassays », *Angew. Chem. Int. Ed Engl.*, vol. 46, nº 8, p. 1318-1320, 2007.

- [113] L. Syedmoradi et F. A. Gomez, « Paper-based point-of-care testing in disease diagnostics », *Bioanalysis*, vol. 9, nº 11, p. 841-843, juin 2017.
- [114] A. Abadian, S. S. Manesh, et S. J. Ashtiani, « Hybrid paper-based microfluidics: combination of paper-based analytical device (µPAD) and digital microfluidics (DMF) on a single substrate », *Microfluid. Nanofluidics*, vol. 21, n° 4, p. 65, avr. 2017.
- [115] L. Magro *et al.*, « Paper-based RNA detection and multiplexed analysis for Ebola virus diagnostics », *Sci. Rep.*, vol. 7, nº 1, p. 1347, mai 2017.
- [116] T. Lam, J. P. Devadhasan, R. Howse, et J. Kim, « A Chemically Patterned Microfluidic Paper-based Analytical Device (C-μPAD) for Point-of-Care Diagnostics », *Sci. Rep.*, vol. 7, nº 1, p. 1188, avr. 2017.
- [117] S. Bhattacharya, A. Datta, J. M. Berg, et S. Gangopadhyay, « Studies on surface wettability of poly(dimethyl) siloxane (PDMS) and glass under oxygen-plasma treatment and correlation with bond strength », J. Microelectromechanical Syst., vol. 14, nº 3, p. 590-597, juin 2005.
- [118] E. Meng, *Biomedical Microsystems*. CRC Press, 2011.
- [119] Y. Temiz, R. D. Lovchik, G. V. Kaigala, et E. Delamarche, « Lab-on-a-chip devices: How to close and plug the lab? », *Microelectron. Eng.*, vol. 132, p. 156-175, janv. 2015.
- [120] R. Fulcrand, « Etude et développement d'une plateforme microfluidique dédiée à des applications biologiques. Intégration d'un actionneur magnétique sur substrat souple », Université Paul Sabatier-Toulouse III, 2009.
- [121] A. Pfreundt, K. B. Andersen, M. Dimaki, et W. E. Svendsen, « An easy-to-use microfluidic interconnection system to create quick and reversibly interfaced simple microfluidic devices », *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 25, nº 11, p. 115010, 2015.
- [122] R. Zeggari, J. F. Manceau, E. N. Aybeke, R. Yahiaoui, E. Lesniewska, et W. Boireau, « Design and Fabrication of an Acoustic Micromixer for Biological Media Activation », *Proceedia Eng.*, vol. 87, p. 935-938, 2014.
- [123] Z. Yang et R. Maeda, « Socket with built-in valves for the interconnection of microfluidic chips to macro constituents », *J. Chromatogr. A*, vol. 1013, nº 1, p. 29-33, sept. 2003.
- [124] Marc Fouet, « Microfluidique 3D et actionneurs magnétiques. De leur intégration à la préparation d'échantillons biologiques », 2016.
- [125] Dolomite, « Mitos P-Pump_product datasheet ». .
- [126] Elveflow, « Instruments.pdf ». 2018.
- [127] Sensirion, « Sensirion_Liquid_Flow_Meters_LG16_Datasheet_V4.pdf ». .
- [128] W. Sparreboom *et al.*, « Compact Mass Flow Meter Based on a Micro Coriolis Flow Sensor », *Micromachines*, vol. 4, nº 1, p. 22-33, mars 2013.
- [129] J. G. Santiago, S. T. Wereley, C. D. Meinhart, D. J. Beebe, et R. J. Adrian, « A particle image velocimetry system for microfluidics », *Exp. Fluids*, vol. 25, nº 4, p. 316– 319, 1998.
- [130] M.-I. Rocha-Gaso, C. March-Iborra, Á. Montoya-Baides, et A. Arnau-Vives, « Surface Generated Acoustic Wave Biosensors for the Detection of Pathogens: A Review », *Sensors*, vol. 9, nº 7, p. 5740-5769, juill. 2009.
- [131] J. K. Luo et Y. Q. F. and W. I. Milne, *Acoustic Wave Based Microfluidics and Lab-ona-Chip*. InTech, 2013.

- [132] Y. Q. Fu *et al.*, « Recent developments on ZnO films for acoustic wave based biosensing and microfluidic applications: a review », *Sens. Actuators B Chem.*, vol. 143, nº 2, p. 606-619, janv. 2010.
- [133] Y. Montagut, J. V. García, Y. Jiménez, C. March, Á. Montoya, et A. Arnau, « Validation of a Phase-Mass Characterization Concept and Interface for Acoustic Biosensors », *Sensors*, vol. 11, nº 5, p. 4702-4720, avr. 2011.
- [134] V. Raimbault, « Étude et développement d'un système microfluidique à ondes de Love dédié à la caractérisation de fluides complexes », Université Sciences et Technologies-Bordeaux I, 2008.
- [135] V. Raimbault, D. Rebière, C. Dejous, M. Guirardel, et V. Conedera, « Acoustic Love wave platform with PDMS microfluidic chip », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 142, nº 1, p. 160-165, mars 2008.
- [136] T. M. Squires, R. J. Messinger, et S. R. Manalis, « Making it stick: convection, reaction and diffusion in surface-based biosensors », *Nat. Biotechnol.*, vol. 26, nº 4, p. 417-426, avr. 2008.
- [137] M. Brinkmann et R. Lipowsky, « Wetting morphologies on substrates with striped surface domains », *J. Appl. Phys.*, vol. 92, nº 8, p. 4296-4306, oct. 2002.
- [138] K. Hermansson, U. Lindberg, B. Hok, et G. Palmskog, « Wetting properties of silicon surfaces », 1991, p. 193-196.
- [139] I. Cantat et al., Les Mousses : structure et dynamique. Belin, 2010.
- [140] N. Péron, S. J. Cox, S. Hutzler, et D. Weaire, « Steady drainage in emulsions: corrections for surface Plateau borders and a model for high aqueous volume fraction », *Eur. Phys. J. E*, vol. 22, nº 4, p. 341-351, avr. 2007.
- [141] S. A. Darst *et al.*, « Two-dimensional crystals of streptavidin on biotinylated lipid layers and their interactions with biotinylated macromolecules. », *Biophys. J.*, vol. 59, n° 2, p. 387, 1991.
- [142] J. Fattaccioli, « Mouillage Spécifique de Gouttes d'Emulsion sur des Substrats Biomimétiques », phdthesis, Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2006.
- [143] ThermoFisher, « Carbodiimide Crosslinker Chemistry ». [En ligne]. Disponible sur: https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/life-science/protein-biology/protein-biology-learning-center/protein-biology-resource-library/pierce-protein-methods/carbodiimide-crosslinker-chemistry.html. [Consulté le: 13-mai-2018].
- [144] S. Scheuring, D. J. Müller, P. Ringler, J. B. Heymann, et A. Engel, « Imaging streptavidin 2D crystals on biotinylated lipid monolayers at high resolution with the atomic force microscope », *J. Microsc.*, vol. 193, n° 1, p. 28–35, 1999.
- [145] G. Wingqvist, V. Yantchev, et I. Katardjiev, « Mass sensitivity of multilayer thin film resonant BAW sensors », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 148, nº 1, p. 88-95, nov. 2008.
- [146] R.-C. Lin, Y.-C. Chen, W.-T. Chang, C.-C. Cheng, et K.-S. Kao, « Highly sensitive mass sensor using film bulk acoustic resonator », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 147, n^o 2, p. 425-429, oct. 2008.
- [147] L. Bao, X. Qu, H. Chen, X. Su, S. Yao, et W. Wei, « A Bulk Acoustic Wave Viscosity Sensor for Determination of Lysozyme Based on Lysis of Micrococcus Lysodeikeicus », *Microchim. Acta*, vol. 132, nº 1, p. 61-65, nov. 1999.
- [148] D. W. Branch, S. M. Brozik, et A. NM, « Low-Level Detection of a Bacillus Anthracis Simulant using Love- Wave Biosensors on 36° YX LiTaO3 », p. 33.
- [149] E. Ergezen, S. Hong, K. A. Barbee, et R. Lec, « Real time monitoring of the effects of Heparan Sulfate Proteoglycan (HSPG) and surface charge on the cell adhesion process

using thickness shear mode (TSM) sensor », *Biosens*. *Bioelectron*., vol. 22, nº 9, p. 2256-2260, avr. 2007.

- [150] M. Saitakis, A. Tsortos, et E. Gizeli, « Probing the interaction of a membrane receptor with a surface-attached ligand using whole cells on acoustic biosensors », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 25, nº 7, p. 1688-1693, mars 2010.
- [151] L. Saias, J. Autebert, L. Malaquin, et J.-L. Viovy, « Design, modeling and characterization of microfluidic architectures for high flow rate, small footprint microfluidic systems », *Lab. Chip*, vol. 11, nº 5, p. 822, 2011.
- [152] P. Pálovics, F. Ender, et M. Rencz, « Microfluidic flow-through chambers for higher performance », présenté à Design, Test, Integration & Packaging of MEMS and MOEMS, Bordeaux, 2017.
- [153] W. Liao *et al.*, « Biomimetic microchannels of planar reactors for optimized photocatalytic efficiency of water purification », *Biomicrofluidics*, vol. 10, nº 1, févr. 2016.
- [154] D. R. Emerson, K. Cieślicki, X. Gu, et R. W. Barber, « Biomimetic design of microfluidic manifolds based on a generalised Murray's law », *Lab. Chip*, vol. 6, nº 3, p. 447-454, févr. 2006.
- [155] C. Cao *et al.*, « A strategy for sensitivity and specificity enhancements in prostate specific antigen-α1-antichymotrypsin detection based on surface plasmon resonance », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 21, nº 11, p. 2106-2113, mai 2006.
- [156] M. Piliarik, M. Bocková, et J. Homola, « Surface plasmon resonance biosensor for parallelized detection of protein biomarkers in diluted blood plasma », *Biosens. Bioelectron.*, vol. 26, nº 4, p. 1656-1661, déc. 2010.
- [157] A. Bienaime, L. Liu, C. Elie-Caille, et T. Leblois, « Design and microfabrication of a lateral excited gallium arsenide biosensor », *Eur. Phys. J. Appl. Phys.*, vol. 57, nº 2, p. 21003, févr. 2012.
- [158] H. J. G. E. Gardeniers *et al.*, « Silicon micromachined hollow microneedles for transdermal liquid transport », *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 12, nº 6, p. 855-862, déc. 2003.
- [159] M. J. Archer et F. S. Ligler, « Fabrication and Characterization of Silicon Micro-Funnels and Tapered Micro-Channels for Stochastic Sensing Applications », *Sensors*, vol. 8, nº 6, p. 3848-3872, juin 2008.
- [160] A. Bienaime *et al.*, « Reconstitution of a protein monolayer on thiolates functionalized GaAs surface », *Int. J. Nanosci.*, vol. 11, nº 04, p. 1240018, août 2012.
- [161] F. M. White, *Fluid Mechanics*. McGraw Hill, 2011.
- [162] N. A. Mortensen, L. H. Olesen, L. Belmon, et H. Bruus, « Electrohydrodynamics of binary electrolytes driven by modulated surface potentials », *Phys. Rev. E Stat. Nonlin. Soft Matter Phys.*, vol. 71, nº 5 Pt 2, p. 056306, mai 2005.
- [163] K.-S. Koh, J. Chin, J. Chia, et C.-L. Chiang, « Quantitative Studies on PDMS-PDMS Interface Bonding with Piranha Solution and its Swelling Effect », *Micromachines*, vol. 3, nº 4, p. 427-441, mai 2012.
- [164] C. V. Rumens, M. A. Ziai, K. E. Belsey, J. C. Batchelor, et S. J. Holder, « Swelling of PDMS networks in solvent vapours; applications for passive RFID wireless sensors », *J. Mater. Chem. C*, vol. 3, nº 39, p. 10091-10098, oct. 2015.
- [165] E. Yablonovitch, D. M. Hwang, T. J. Gmitter, L. T. Florez, et J. P. Harbison, « Van der Waals bonding of GaAs epitaxial liftoff films onto arbitrary substrates », *Appl. Phys. Lett.*, vol. 56, n° 24, p. 2419-2421, juin 1990.

- [166] K. R. Williams, K. Gupta, et M. Wasilik, « Etch rates for micromachining processingpart II », *J. Microelectromechanical Syst.*, vol. 12, nº 6, p. 761-778, déc. 2003.
- [167] M. S. Khan et J. D. Williams, « Fabrication of Solid State Nanopore in Thin Silicon Membrane Using Low Cost Multistep Chemical Etching », *Materials*, vol. 8, nº 11, p. 7389-7400, nov. 2015.
- [168] L. Haobing et F. Chollet, « Layout Controlled One-Step Dry Etch and Release of MEMS Using Deep RIE on SOI Wafer », J. Microelectromechanical Syst., vol. 15, nº 3, p. 541-547, juin 2006.
- [169] H. Seidel, « Anisotropic Etching of Crystalline Silicon in Alkaline Solutions », *J Electrochem Soc*, vol. 137, nº 11, p. 15, 1990.
- [170] M. Shikida *et al.*, « A model explaining mask-corner undercut phenomena in anisotropic silicon etching: a saddle point in the etching-rate diagram », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 97-98, p. 758-763, avr. 2002.
- [171] J. Frühauf et B. Hannemann, « Anistropic multi-step etch processes of silicon », *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 7, nº 3, p. 137, 1997.
- [172] M. C. Elwenspoek et H. V. Jansen, *Silicon micromachining*. Cambridge University Press, 1999.
- [173] H. Schröder et E. Obermeier, « A new model for Si 100 convex corner undercutting in anisotropic KOH etching », J. Micromechanics Microengineering, vol. 10, nº 2, p. 163, 2000.
- [174] P. Pal, K. Sato, et S. Chandra, « Fabrication techniques of convex corners in a (1 0 0)silicon wafer using bulk micromachining: a review », *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 17, nº 10, p. R111, 2007.
- [175] P. Pal et K. Sato, « Complex three-dimensional structures in Si1 0 0 using wet bulk micromachining », *J. Micromechanics Microengineering*, vol. 19, nº 10, p. 105008, 2009.
- [176] K. Biswas, S. Das, et S. Kal, « Analysis and prevention of convex corner undercutting in bulk micromachined silicon microstructures », *Microelectron. J.*, vol. 37, n^o 8, p. 765-769, août 2006.
- [177] B. Wacogne, R. Zeggari, Z. Sadani, et T. Gharbi, « A very simple compensation technique for bent V-grooves in KOH etched (100) silicon when thin structures or deep etching are required », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 126, nº 1, p. 264-269, janv. 2006.
- [178] D. Bonnet *et al.*, « Piv in a running automotive engine: simultaneous velocimetry for intake manifold runners », *J. Flow Vis. Image Process.*, vol. 19, nº 3, p. 239-253, 2012.
- [179] H. Amini, W. Lee, et D. Di Carlo, « Inertial microfluidic physics », *Lab. Chip*, vol. 14, nº 15, p. 2739, 2014.
- [180] T. Dong et C. Barbosa, « Capacitance Variation Induced by Microfluidic Two-Phase Flow across Insulated Interdigital Electrodes in Lab-On-Chip Devices », *Sensors*, vol. 15, nº 2, p. 2694-2708, janv. 2015.
- [181] Z. Yang, T. Dong, et E. Halvorsen, « Identification of microfluidic two-phase flow patterns in lab-on-chip devices », *Biomed. Mater. Eng.*, vol. 24, nº 1, p. 77–83, 2014.
- [182] S. Sadeghi *et al.*, « On Chip Droplet Characterization: A Practical, High-Sensitivity Measurement of Droplet Impedance in Digital Microfluidics », *Anal. Chem.*, vol. 84, nº 4, p. 1915-1923, févr. 2012.
- [183] C. Elbuken, T. Glawdel, D. Chan, et C. L. Ren, « Detection of microdroplet size and speed using capacitive sensors », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 171, nº 2, p. 55-62, nov. 2011.

- [184] M. Demori, V. Ferrari, P. Poesio, et D. Strazza, « A microfluidic capacitance sensor for fluid discrimination and characterization », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 172, nº 1, p. 212-219, déc. 2011.
- [185] J. Wei *et al.*, « Design, fabrication and characterization of a femto-farad capacitive sensor for pico-liter liquid monitoring », *Sens. Actuators Phys.*, vol. 162, n° 2, p. 406-417, août 2010.
- [186] J. Z. Chen, A. A. Darhuber, S. M. Troian, et S. Wagner, « Capacitive sensing of droplets for microfluidic devices based on thermocapillary actuation », *Lab. Chip*, vol. 4, nº 5, p. 473-480, oct. 2004.
- [187] G J Brug, A L G Van, Den Eeden, M Sluyters-Rehbach, et J H Sluyters, « The analysis of electrode impedances complicated by the presence of a constant phase element », p. 21.
- [188] D. P. Fernández, Y. Mulev, A. R. H. Goodwin, et J. M. H. L. Sengers, « A Database for the Static Dielectric Constant of Water and Steam », *J. Phys. Chem. Ref. Data*, vol. 24, nº 1, p. 33-70, 1995.

SUA

Titre : Dispositifs microfluidiques pour l'injection de fluides à travers un réseau de gouttes : Application biocapteur

Mots clés : Goutte - Biopuce - Microfluidique - Emulsion - Homogénisation d'écoulement - Hele-Shaw

Résumé : La microfluidique, domaine de recherche qui a émergé il y a juste 20 ans, a permis de réduire les dimensions des dispositifs d'analyse biologique ouvrant la porte au concept de « laboratoire-sur-puce » (lab-on-chip). Les succès de cette approche sont déjà nombreux, depuis l'analyse du génome en passant par la réduction du coût des analyses médicales. L'utilisation de gouttes comme enceinte réactionnelle au sein de ces dispositifs est une évolution récente qui permet de réduire encore le volume des échantillons biologiques et d'augmenter la vitesse d'analyse en parallélisant les mesures.

Notre équipe développe des capteurs acoustiques dédiés à la détection d'analytes biologiques en milieu liquide. Ce type de capteur a pour principal défaut de ne permettre qu'une mesure contraignant au remplacement de l'interface de biodétection pour une réutilisation éventuelle du capteur. Dès lors, ils utilisent majoritairement une chambre de détection tout ou partie jetable, même si quelques travaux de recherche ont pu montrer la régénération d'un capteur par traitement chimique.

Nous proposons ici de s'affranchir des étapes lourdes de remplacement ou de traitement de l'interface de détection qui conduisent entre chaque mesure au démontage du dispositif de détection. Nous employons dans ce cas les gouttes non plus comme enceinte réactionnelle mais comme interface de détection mobile. Elles ont ainsi le potentiel d'être générées et fonctionnalisées directement dans le dispositif pour détecter un analyte spécifique et peuvent être simplement évacuées afin de régénérer l'interface pour effectuer une mesure différente.

Les travaux présentés dans cette thèse visent plus particulièrement la capture sur gouttes fonctionnalisées dans ce type de capteur innovant. Ils exposent le développement, incluant la fabrication et la caractérisation, de ces dispositifs microfluidiques ainsi que le montage d'un banc de test expérimental dédié. Ce sujet est suivi de deux projets ancillaires de développement de dispositifs microfluidiques liés aux capteurs acoustiques et à l'utilisation de gouttes. Le premier vise à homogénéiser les vitesses d'écoulements dans une chambre réactionnelle. Le second exploite les propriétés de génération de gouttes pour réaliser un condensateur à capacité variable.

Title : Microfluidic device for injecting fluids through close-packed droplets : Application to biosensors

Keywords : Droplet - Lab-on-chip - Microfluidics - Emulsion - Flow homogenization - Hele-Shaw

Abstract : Since two decades the research on microfluidics systems allowed creating devices for biological detection with regular improvement in compactness, functionality integration and quantity of biological sample, leading to the concept of lab-on-chip. This approach has resulted in dramatic changes in the biomedical field, for example, opening the possibility to perform genomic analysis or improving the medical analysis cost. Using droplet as reaction chamber is a recent evolution that leads to a decrease in biological sample volume and an increase in analysis speed by multiplexing.

Our team develops acoustical sensors dedicated to detect biomarker of interest in liquids. The principal weakness of theses sensors lies in their need for replacement of the biodetection interface for performing a new measurement. Accordingly, they use a detection chamber partially or totally disposable. However, few research works showed reusability of sensor by regenerating the bioreceptor layer on the detection interface by chemical treatment. We are proposing to avoid the replacement or the chemical treatment of the detection interface that requires dismounting the device between measurements. We are using here droplets, not as reaction chambers but as movable detection interface. They can be generated and configured directly inside the device to detect a specific biomarker. Then, droplets can be easily evacuated and replaced through the device, which allows to chain measurement of various configurations without dismounting it.

The research work conducted in this thesis focuses on the fluidic aspects of this innovative sensor. They show development, including realization and characterization, of theses microfluidic devices and its dedicated characterization setup. This project is followed by two ancillary works about development of microfluidic devices for acoustical sensors and droplets systems. The first one is aiming at the homogenization of the flow velocity inside a reaction chamber. The second one is exploiting property of droplet generation for the realization of a variable capacitance capacitor.



Université Bourgogne Franche-Comté 32, avenue de l'Observatoire 25000 Besançon